

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Quantifizierung der ABCB1-mRNA in Lymphozytensubpopulationen: die Rolle  
genetischer Polymorphismen im ABCB1-Gen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Daniel Wolbergs

aus Regensburg

Datum der Promotion: 27.02.2015

## Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung.....	3
Abstract .....	5
1. Einleitung .....	7
1.1. Multiple Wirkstoffresistenz.....	7
1.2. ABCB1 und P-Glykoprotein .....	7
1.2.1. Das ABCB1-Gen.....	7
1.2.2. Struktur von P-Glykoprotein.....	8
1.2.3. Funktionsweise und Substratspezifität von P-Glykoprotein .....	9
1.3. Physiologische Funktion von P-Gp.....	10
1.3.1. P-Glykoprotein und das Immunsystem .....	11
1.4. Bedeutung von P-Glykoprotein für die Arzneitherapie .....	12
1.5. ABCB1-Polymorphismen .....	13
1.5.1. Bedeutung verschiedener Polymorphismen im ABCB1-Gen.....	14
2. Fragestellung .....	17
3. Materialien und Methoden .....	18
3.1. Materialien .....	18
3.2. Methoden.....	21
3.2.1. Materialgewinnung.....	21
3.2.2. Isolierung der Lymphozytensubpopulationen.....	21
3.2.3. mRNA-Isolierung aus Lymphozyten .....	23
3.2.4. Quantitative Messung der mRNA mit RT-PCR und Light Cycler PCR.....	24
3.2.5. DNA-Extraktion und Genotypisierung .....	29
3.2.6. Statistische Auswertung .....	31
4. Ergebnisse .....	32
4.1. Ergebnisse der Genotypisierung.....	32
4.2. Quantifizierung der ABCB1-mRNA von C- und N-terminaler Hälfte in Lymphozyten...	33
4.3. Auswirkung der untersuchten Polymorphismen auf die Expression von ABCB1.....	35
4.3.1. Expression der C-terminalen Hälfte von ABCB1 .....	35
4.3.2. Expression der N-terminalen Hälfte von ABCB1 .....	37
4.4. Normalisierung der ABCB1-Expression mittels Housekeeping-Gen $\beta$ -Mikroglobulin ....	39
4.4.1. Expression der C-terminalen Hälfte von ABCB1 (normalisierte Werte) .....	40
4.4.2. Expression der N-terminalen Hälfte von ABCB1 (normalisierte Werte) .....	41
5. Diskussion .....	43
5.1. Quantifizierung der ABCB1-mRNA in CD4+-, CD8+-, CD19+- und CD 56+- Lymphozyten.....	43
5.2. Auswirkung der untersuchten Polymorphismen auf die Expression von ABCB1.....	44
5.2.1. Veränderung in der Expression von P-Gp.....	45
5.2.2. Einfluss auf die Funktion von P-Gp bzw. die Bioverfügbarkeit von Substraten .....	46
5.2.3. Einfluss auf den Therapieerfolg .....	47
5.3. Rolle des alternativen Medikamententransporters Mini-P-Gp.....	49
6. Zusammenfassung .....	52
Literaturverzeichnis.....	54
Abkürzungen .....	62
Eidesstattliche Versicherung .....	63
Lebenslauf .....	64
Publikationsliste .....	65
Danksagung .....	66

# Quantifizierung der ABCB1-mRNA in Lymphozytensubpopulationen: die Rolle genetischer Polymorphismen im ABCB1-Gen

## Kurzzusammenfassung

P-Glykoprotein (P-Gp) ist ein membranständiges Protein, das als Efflux-Transporter die intrazelluläre Konzentration seines Substrats vermindert. Seine physiologische Funktion liegt im Schutz der Zelle vor schädigenden Substanzen sowie der Elimination endogener Stoffwechselprodukte. P-Gp spielt eine wichtige Rolle in der zellvermittelten Immunität sowie bei der Multiplen Wirkstoffresistenz und ist von zentraler Bedeutung für die Pharmakokinetik zahlreicher therapeutisch wichtiger Wirkstoffe. Beim Menschen wird P-Gp durch das ABCB1-Gen kodiert. Für dieses Gen ließen sich genetische Polymorphismen identifizieren, denen eine Auswirkung auf die Expression von ABCB1 und somit auf die Aktivität von P-Gp zugeschrieben wird. Untersuchungen zu dieser Frage kommen zu teilweise konträren Ergebnissen. Im Rahmen einiger Studien findet ein kleinerer Medikamententransporter Mini-P-Gp Erwähnung, der mutmaßlich durch einen alternativen Spleißvorgang an der ABCB1-RNA entsteht.

Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob sich die Expression von P-Gp, abgebildet in ABCB1-mRNA-Mengen, in vier Zelllinien der peripheren lymphatischen Blutreihe (CD4+-, CD8+-, CD56+- und CD 19+-Lymphozyten) unterscheidet. Außerdem sollte geklärt werden, ob die Höhe der P-Gp-Expression mit dem Vorhandensein bestimmter Genotypen zweier häufiger genetischer Polymorphismen im ABCB1-Gen (G2677T/A und C3435T) assoziiert ist. Durch die Auswahl spezifischer Primer zur Vervielfältigung der N- bzw. C-terminalen Hälfte des ABCB1-Gens erfolgte die Überprüfung der Existenz von Mini-P-Gp. Die Trennung der von uns untersuchten Zelllinien geschah durch FACS-Zellsortierung nach Färbung mit immunfluoreszierenden Antikörpern. Mit Hilfe eines quantitativen RT-PCR-Versuchsaufbaus wurde die ABCB1-mRNA gemessen. Zur Normalisierung der gemessenen Konzentrationen diente die gleichzeitige Quantifizierung eines Housekeeping-Gens.

Die Ergebnisse unserer Studie wiesen die höchste ABCB1-mRNA-Menge in CD 56+-, gefolgt von CD8+-, CD4+- und CD 19+-Lymphozyten nach. Dies steht in Einklang mit früheren Studien zur Aktivität des Medikamententransporters und unterstreicht die physiologische Rolle von P-Gp in der zellvermittelten zytotoxischen Immunität. Bei der Überprüfung der genetischen Polymorphismen hinsichtlich der Expression von P-Gp konnte nach Normalisierung der Daten

keine statistisch signifikante Auswirkung auf die Anzahl der ABCB1-mRNA-Kopien in allen Zellpopulationen gefunden werden. Die Frage nach der Existenz eines Mini-P-Gp konnte nicht geklärt werden. Zwar wurde in allen Zellen eine etwa halb so hohe Transkriptzahl für die N-terminale Hälfte wie für die C-terminale Hälfte gemessen, was als Indiz für die Existenz des kleineren Transporterproteins gewertet werden kann. Doch darf dabei nicht außer Acht gelassen werden, dass die Effizienz der PCR für die N-terminale Hälfte schlechter als für die C-terminale Hälfte ist. Außerdem gibt es bisher keine molekularen Analysen, die das Phänomen Mini-P-Gp erklären könnten.

# Quantification of ABCB1-mRNA in peripheral blood lymphocytes: the role of genetic polymorphisms in the ABCB1-gene

## Abstract

P-Glycoprotein (P-Gp) is a membrane-bound protein, which acts as an efflux-pump and reduces the intracellular concentration of its substrates. Its physiological function is the protection of the cell from toxic substances as well as the elimination of endogenous metabolic wastes. P-Gp plays an important role in cell-mediated immunity, in multi-drug resistance and in the pharmacokinetics of numerous therapeutic agents. In humans P-Gp is encoded by the ABCB1-gene. A number of genetic polymorphisms for this gene have been identified, which may have implications on the expression of ABCB1 and, consequently, on the activity of P-Gp. Investigations in this field have resulted in contradictory findings. In some studies a small drug transporter, Mini-P-Gp, is mentioned, which may be the result of alternative splicing of the ABCB1-RNA.

The objective of this study was to find out, whether the expression of P-Gp, as measured in ABCB1-mRNA, differs in 4 lines of the peripheral blood lymphoid cell pool (CD4+/-, CD8+/-, CD 56+/- and CD19+/-lymphocytes) and whether the amount of P-Gp expression is associated with two frequent genetic polymorphisms in the ABCB1-gene (G2677T/A and C3435T). By designing specific primers for the amplification of the N- and C-terminal half of the ABCB1-gene, respectively, we tried to verify the existence of Mini-P-Gp. Cell separation was carried out using FACS cell-sorting after staining with fluorescent antibodies. Quantification was performed with a quantitative RT-PCR assay. The results were normalised by simultaneous quantification of a housekeeping-gene.

We found the highest amount of ABCB1-mRNA in CD56+, followed by CD8+/-, CD4+/- and CD19+/- lymphocytes. This is in accordance with previous studies on the activity of the drug transporter and underlines its physiological role in cell-mediated, cytotoxic immunity. However, no statistically significant effect on the ABCB1-mRNA-copy number as a result of the different genetic polymorphisms could be seen after normalising the data. The question of the existence of Mini-P-Gp could not be clarified. We found approximately half as many transcript copies of the N-terminal half as of the C-terminal half in all cell lines, which could be an indicator of the existence of the smaller transport protein. However, this result may be confounded by a lower

PCR efficiency for the N-terminal half than for the C-terminal half. Moreover, there is to this date no molecular analysis explaining the phenomenon Mini-P-Gp.

# **1. Einleitung**

## **1.1. Multiple Wirkstoffresistenz**

Der Begriff Multiple Wirkstoffresistenz (multidrug resistance, MDR) bezeichnet ein Phänomen, das insbesondere von onkologisch tätigen Ärzten innerhalb der letzten Jahrzehnte beschrieben wurde. Sie beobachteten, dass Patienten mit unterschiedlichen Krebserkrankungen, die initial mit nur einem Chemotherapeutikum behandelt wurden, im Laufe der Behandlung eine Resistenz gegen verschiedene zytotoxische Substanzen entwickelten, die mit dem ersten Therapeutikum weder chemisch verwandt waren noch den gleichen Wirkmechanismus hatten. Dies führte in vielen Fällen zu einem völligen oder teilweisen Versagen der Chemotherapie. Inzwischen kennt man eine Reihe von Mechanismen, die zur Entwicklung von MDR führen können (1). Sie reichen von der Beeinflussung des Transports und der Aufnahme des Chemotherapeutikums in die Zelle über die beschleunigte Inaktivierung bis zum Zunichtemachen der chemotherapeutischen Wirkung durch effiziente Reparatur von gesetzten DNA-Schäden.

Häufig entsteht MDR durch das Vorhandensein von P-Glykoprotein (P-Gp), eines Effluxtransporters, der erstmals 1976 von Juliano und Ling beschrieben wurde (2). Er transportiert seine Substrate aus der Zelle und schützt die Zelle so vor möglichen Schäden. P-Gp wird, je nach Gewebeart, bereits intrinsisch in den Tumorzellen mehr oder weniger stark exprimiert, und infolge einer Chemotherapie kann die P-Gp-Aktivität ansteigen (3, 4). Die molekulare und molekulargenetische Grundlage für interindividuelle Unterschiede wird im Folgenden näher dargestellt.

## **1.2. ABCB1 und P-Glykoprotein**

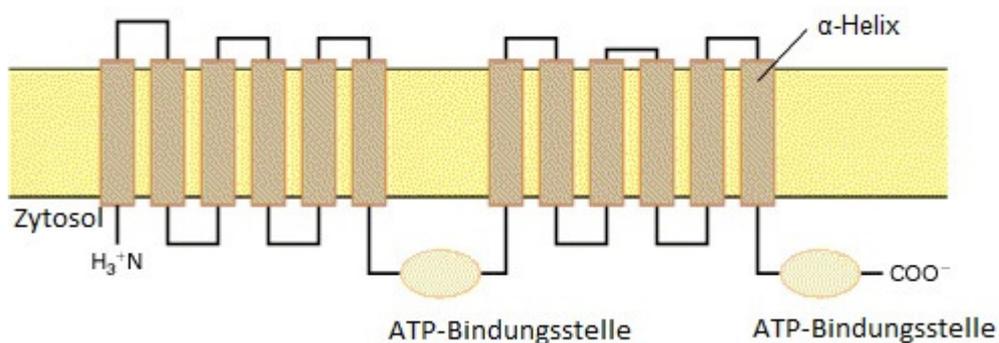
### **1.2.1. Das ABCB1-Gen**

Roninson et al. entdeckten 1986, dass MDR mit der Amplifikation von zwei miteinander verwandten DNA-Sequenzen korrelierte, die mit *mdr1* und *mdr2* bezeichnet wurden. Bei der Isolierung der Sequenzen stellte sich heraus, dass *mdr1* eine 4,5kb-mRNA kodierte und in allen untersuchten menschlichen Zelllinien mit MDR überexprimiert war, während für *mdr2* keine korrespondierende RNA entdeckt wurde (5). Somit scheint für die Expression des Medikamententransporters und die Entwicklung von MDR beim Menschen nur *mdr1* (heute ABCB1) verantwortlich zu sein. *Mdr2* (heute ABCB4) spielt wahrscheinlich eine Rolle in der Sekretion von hepatischem Phosphatidylcholin in die Gallenflüssigkeit (6).

Das menschliche ABCB1-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 7 am Locus q21.1 kartiert. Das Gen beinhaltet 28 Introns, von denen 26 die proteinkodierende Sequenz unterbrechen. Die Transkript-mRNA ist 4,5 kb lang und kodiert das P-Glykoprotein (P-Gp/MDR1/ABCB1/PGY1).

### 1.2.2. Struktur von P-Glykoprotein

Humanes P-Gp ist ein phosphoryliertes und glykosyliertes membranständiges Protein mit einer Länge von 1280 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 170 kDa. Es ist unterteilt in zwei einander sehr ähnliche Hälften von jeweils 610 Aminosäuren Länge, die durch eine flexible „Linker-Region“ verbunden sind. Jede der beiden Hälften besteht aus einer N-terminalen hydrophoben und einer C-terminalen hydrophilen Sequenz und setzt sich aus 6 membranständigen  $\alpha$ -Helices zusammen. Beide Hälften besitzen eine zytosolische Nukleotidbindungsstelle, die ATP und Analoga binden kann. Aufgrund der Homologie der beiden Hälften nimmt man an, dass das gesamte ABCB1-Gen aus der Fusion zweier verwandter Gene entstanden ist (7). Die beiden Nukleotidbindungsstellen funktionieren wahrscheinlich unabhängig voneinander, und ATP-Spaltung findet nur auf jeweils einer Seite statt. Zur vollen Funktion von P-Gp sind aber beide Seiten notwendig, da die Inaktivierung einer Seite einen Funktionsverlust des Transporters bedingt (8). Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung des Medikamententransporters.



**Abbildung 1:** schematische Darstellung von P-Glykoprotein (9)

P-Gp (ABCB1) gehört zur Subfamilie ABCB innerhalb der ABC-Transporter (ATP-binding cassette superfamily), einer Gruppe von 49 Transporterproteinen, die ATP binden und mit Hilfe

der Bindungsenergie eine Reihe verschiedener Moleküle über die Zellmembran transportieren (10).

#### Existenz eines Mini-P-Glykoproteins

Im Rahmen mehrerer Studien fanden sich Hinweise darauf, dass es neben dem herkömmlichen P-Gp ein kleineres Transporterprotein, genannt Mini-P-Gp, gibt, das durch einen alternativen Spleißvorgang an der ABCB1-mRNA gebildet wird. Dabei entsteht ein unglykosyliertes Protein von ca. 60 kDa Größe, das die Transmembrandomänen 9-12 und die ATP-bindende C-terminale-Hälfte von P-Gp enthält (11). Trambas et al. berichteten, dass dieses Protein, und nicht das herkömmliche P-Gp, für MDR in CD56-positiven natürlichen Killerzellen, der Zellpopulation der lymphatischen Reihe mit der höchsten P-Gp-Expression, verantwortlich sei (12). Zum Nachweis der mRNA beider mutmaßlich existierenden Proteine, des Mini- und des langen Transporters, wurden in unserer Arbeit Primer zur spezifischen Amplifizierung der C- bzw. N-terminalen Hälfte von ABCB1 eingesetzt.

#### 1.2.3. Funktionsweise und Substratspezifität von P-Glykoprotein

Die Erforschung der Funktionsweise des Transporters auf molekularer Ebene hat im letzten Jahrzehnt wichtige Fortschritte gemacht. P-Gp transportiert Substanzen, die in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran eingedrungen sind. Die  $\alpha$ -Helices bilden anscheinend einen Kanal, durch den der Transport des Substratmoleküls aus der Zelle heraus erfolgt. Dieser Transport erfolgt unter Verbrauch von ATP und ggf. gegen ein großes Konzentrationsgefälle. Eine Vielzahl von Verbindungen, die sich in ihren chemischen Eigenschaften stark unterscheiden, sind Substrate von P-Gp (Tabelle 1); die breite Substratspezifität ist eines der Charakteristika dieses Transporters. Sie sind jedoch hauptsächlich hydrophobe oder amphipathische Substanzen, die keine negative Ladung besitzen und, bis auf wenige Ausnahmen, zwischen 200 und 1900 Dalton groß sind. Außerdem treten sie alle aufgrund ihrer Hydrophobie durch passive Diffusion in die Zelle ein (13). Für die Pharmakokinetik einer ganzen Reihe klinisch wichtiger Wirkstoffe ist P-Gp von zentraler Bedeutung.

Tabelle 1: Substrate von P-Glykoprotein (Auswahl) (6, 14, 15, 16, 17)

Wirkstoffgruppe	Substrate
Chemotherapeutika mit Verwendung zur Krebsbekämpfung	Vinca-Alkaloide (Vincristin, Vinblastin) Anthrazykline (Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin) Epipodophyllotoxine (Etoposid, Teniposid) Paclitaxel Topotecan Mithramycin Mitomycin C
Andere zytotoxisch wirksame Substanzen	Colchicin Emetin Ethidiumbromid Puromycin
Immunsuppressiva	Ciclosporin Tacrolimus Sirolimus
HIV-Medikamente	Proteaseinhibitoren: Ritonavir, Indinavir, Saquinavir Integraseinhibitoren
Antidepressiva	Citalopram Paroxetin Amitriptylin Venlafaxin
Andere Substanzen	Rhodamin-123 Digoxin Digitoxin

### 1.3. Physiologische Funktion von P-Gp

Welche physiologische Funktion P-Gp hat, bleibt noch weitgehend einer Klärung zuzuführen. Schinkel et al. zeigten in Studien mit ABCB1-Knock-out-Mäusen, dass das Fehlen dieses Transportproteins mit dem Leben und einer normalen Entwicklung vereinbar ist: die Tiere entwickelten sich regelrecht, zeigten normale biochemische und immunologische Parameter und eine normale Fertilität. Auch wiesen die meisten Organe, die physiologischerweise P-Gp exprimieren, keine makroskopischen oder mikroskopischen Veränderungen auf. Jedoch eliminierten die ABCB1-Knock-out-Mäuse Digoxin schlechter und zeigten außerdem im Gehirn höhere Wirkstoffkonzentrationen als Tiere mit normalem P-Gp-Phänotyp (18).

Beim Menschen wurde die Expression von P-Gp hauptsächlich in Zellen mit sekretorischer Funktion nachgewiesen, und zwar in der Leber, der Bauchspeicheldrüse, der Niere, der Nebenniere und in Dick- und Dünndarm. In all diesen Organen ist P-Gp an der luminalen Seite des Epitheliums lokalisiert. Dies lässt vermuten, dass die physiologische Rolle des Transporters im Schutz der Zelle vor schädigenden Substanzen und der Elimination endogener Stoffwechselprodukte liegt (19, 20). Aufgrund des Nachweises von P-Gp im Nebennierenkortex

wird eine Rolle des Transporters im Steroidmetabolismus diskutiert. P-Gp ließ sich außerdem im Kapillarendothelium von Plazenta, Hoden und Gehirn nachweisen. Es scheint also auch dort eine Barrierefunktion auszuüben. Im Gehirn trägt P-Gp zur Bildung der Blut-Hirn-Schranke bei (6). Eine weitere wichtige Rolle spielt der Transporter in Zellen des blutbildenden Systems und des Immunsystems (siehe 1.3.1). Die P-Gp-Konzentration in den verschiedenen Geweben kann sich von Mensch zu Mensch erheblich unterscheiden. Es hat sich außerdem gezeigt, dass die P-Gp-Expression induziert werden kann; zu den Induktoren gehören so wichtige Wirkstoffe wie Rifampicin und auch das heute als Antidepressivum häufig verwendete Johanniskraut (9).

### 1.3.1. P-Glykoprotein und das Immunsystem

Eine Reihe von Zellen des blutbildenden Systems, insbesondere der lymphatischen Reihe, weisen nachweisbare P-Gp-Aktivität auf, wenn auch in geringerem Maße als andere Gewebe (6). Das Vorkommen des Medikamententransporters wurde zuerst von Chaudhary et al. in praktisch allen CD34+-Vorläuferzellen des blutbildenden Systems und in 50% aller lymphatischen Knochenmarkszellen beschrieben. Dabei zeigten pluripotente Stammzellen die höchste P-Gp-Aktivität, was auf eine physiologische Rolle des Transporters beim Schutz des Knochenmarks vor schädigenden Substanzen hindeuten mag (21). In Untersuchungen über das Vorkommen von P-Gp in Subpopulationen der peripheren lymphatischen Reihe ergab sich die höchste Aktivität in Zellen mit zytolytischer Funktion, d.h. CD56+-natürlichen Killerzellen und CD8+-zytotoxischen T-Zellen. Geringere Aktivität fand sich in CD4+-T-Helferzellen und CD19+-B-Lymphozyten. CD14+-Monozyten und Granulozyten zeigen so gut wie keine P-Gp-Aktivität (22, 23).

Innerhalb des Immunsystems wird dem Medikamententransporter eine Rolle in der Übernahme spezifischer Immunfunktionen zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass die zytolytische Aktivität von CD56+- und CD8+-Zellen durch monoklonale Anti-P-Gp-Antikörper und durch P-Gp-Modulatoren, also Substanzen, die die Wirkung von P-Gp inhibieren, dosisabhängig gehemmt werden konnte, was für eine Rolle von P-Gp in der zellvermittelten Zytotoxizität spricht (24, 25). In menschlichen T-Lymphozyten scheint P-Glykoprotein am Transport der Zytokine IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$  beteiligt zu sein. Eine Hemmung des Transporters führte in diesen Zellen zu verminderter Freisetzung dieser Proteine (26, 27).

#### **1.4. Bedeutung von P-Glykoprotein für die Arzneitherapie**

Aufgrund seiner Lokalisation und Funktion als Effluxtransporter kann P-Gp bei Wirkstoffen, die zu seinen Substraten gehören, das Erreichen adäquater Konzentrationen im Plasma oder den Zielgeweben erschweren. P-Gp an der apikalen Zellmembran der Darmzelle sorgt für die Reduktion der oralen Verfügbarkeit einer Substanz, P-Gp-Moleküle in der kanalikulären Zellmembran des Hepatozyten bzw. der apikalen Membran der renalen Tubulusepithelzelle fördern die Exkretion des Wirkstoffs, und als Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke verhindert P-Gp sein Eindringen ins Hirngewebe. Die Aktivität von P-Gp kann somit sowohl für die Absorption eines Wirkstoffes als auch für dessen Gewebeverteilung und Exkretion kritisch sein. Durch die breite P-Gp-Substratspezifität bestehen außerdem vielfältige Möglichkeiten von Arzneimittelinteraktionen, teils durch Konkurrenz um den Transporter, teils durch Induktion der P-Gp-Expression.

Wie die Tabelle der P-Gp-Substrate zeigt, sind Chemotherapeutika nicht die einzigen Wirkstoffe, deren Pharmakokinetik maßgeblich von der Aktivität des Arzneimitteltransporters beeinflusst wird. Als Beispiel sei hier nur die Therapie der HIV-Erkrankung genannt, da sie mit dem Thema der Arbeit in unmittelbarem Zusammenhang steht. Die in der Therapie der HIV-Erkrankung eingesetzten Proteaseinhibitoren, nukleosidanaloge Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NRTI) und die Integraseinhibitoren sind Substrate von P-Gp. (15, 16). Eine hohe P-Gp-Aktivität führt durch Reduktion der oralen Verfügbarkeit nicht nur zu niedrigeren Wirkstoffspiegeln im Plasma, sondern durch aktiven Transport aus den infizierten Lymphozyten auch zu niedrigen Wirkstoffspiegeln am eigentlichen Wirkort, und schwächt damit die Wirksamkeit dieser Substanzen (28, 29). Andererseits scheint eine hohe P-Gp-Expression in T-Lymphozyten die Infektiosität des HIV-1-Virus zu senken, indem sie das Virus bei der Fusion mit der Plasmamembran und auch in seinem späteren Lebenszyklus behindert (30).

Multiple Wirkstoffresistenz gegen zytotoxische Substanzen ist eine der Hauptursachen für das schlechte therapeutische Ergebnis der Chemotherapie in der Behandlung vieler maligner Erkrankungen. Dabei kann ein fehlendes Ansprechen bei einigen Tumoren intrinsisch vorhanden sein, so sprechen zum Beispiel kleinzellige Lungenkarzinome oder Kolonkarzinome a priori schlecht auf zytotoxische Substanzen an. Bei Krebserkrankungen, die nach initialem Therapieerfolg eine Resistenz auf ein breites Spektrum an Wirkstoffen entwickeln, wie zum Beispiel bei Brust- oder Ovarialkarzinomen, spricht man von erworbener MDR. Tumoren von Geweben mit physiologisch hoher P-Gp-Expression, also Karzinome des Kolon, der Niere, Bauchspeicheldrüse, Leber und Nebenniere, zeigen eine hohe P-Gp-Aktivität und zeichnen sich

intrinsisch durch ein schlechtes Ansprechen auf Chemotherapeutika aus (19). Andererseits ließ sich ABCB1 auch in solchen Tumoren nachweisen, deren gesundes Gewebe kein oder wenig ABCB1 exprimiert, was den Verdacht nahe legt, dass die maligne Transformation dieser Gewebe die ABCB1-Expression initiiert (3). Im direkten Vergleich von primären Karzinomen mit Rezidiverkrankungen konnte nach Chemotherapie bei Brustkrebs, akuter myeloischer Leukämie (AML) und einigen Lymphomen ein Anstieg der Menge an ABCB1-mRNA in diesen Geweben nachgewiesen werden (31). Bei Patienten mit AML lässt sich P-Gp in 1/3 der Fälle bei Diagnosestellung und bei 50% der Patienten mit erstem Rezidiv nachweisen (32). Wie es zu dieser Erhöhung der P-Gp-Präsenz kommt, ob durch Induktion der Proteinsynthese, durch Selektion von Tumorzellen mit intrinsisch hoher P-Gp-Aktivität oder durch einen anderen Mechanismus, wird derzeit intensiv erforscht (33).

### **1.5. ABCB1-Polymorphismen**

Im ABCB1-Gen kennt man eine Reihe genetischer Polymorphismen. Von genetischem Polymorphismus spricht man, wenn es in einer Population bei mehr als 1% der Merkmalsträger für ein Gen mehrere Allele gibt, die sich am selben Genlokus zweier homologer Chromosomen befinden. Mutationen mit einer Häufigkeit von weniger als 1% in der Bevölkerung nennt man seltene genetische Variationen. Genetische Polymorphismen können durch Punktmutationen (sogenannte SNP, „single nucleotide polymorphisms“), Deletionen oder Insertionen sowie Duplikation einzelner Nukleotide oder größerer Genabschnitte entstehen. Diese Abweichungen vom Wildtyp können in Intron- und Exon-Regionen eines Gens bzw. in kodierenden und nichtkodierenden Abschnitten der DNA auftreten, so dass daraus eine Änderung der Proteinsequenz resultieren kann. Dies führt unter Umständen zur Ausprägung eines veränderten Phänotyps. Polymorphismen können erhebliche Häufigkeitsunterschiede innerhalb einer Population und in verschiedenen ethnischen Gruppen aufweisen. Bei den meisten Polymorphismen handelt es sich um einen einzelnen Basenaustausch (SNP). Man schätzt, dass innerhalb einer DNA-Sequenz im Durchschnitt im Abstand von 1000 Basenpaaren ein SNP vorkommt.

Bei der ersten systematischen Untersuchung des menschlichen ABCB1-Gens von Hoffmeyer et al. im Jahr 2000 wurden 15 verschiedene genetische Polymorphismen gefunden. Davon befanden sich 7 in Intron-Abschnitten des Gens und 3 an einer Wobble-Position (34), also an der dritten Position eines Codons, die die Aminosäurekodierung in diesen Fällen nicht ändert. In einer Studie von Cascorbi et al. wurde die Häufigkeitsverteilung bekannter ABCB1-

Polymorphismen in einer Population von 461 Probanden deutschen Ursprungs untersucht. Es stellte sich heraus, dass sich die 3 häufigsten Polymorphismen in den Exons 12 (C1236T), 21 (G2677T/A) und 26 (C3435T) befanden. Während die genannten Polymorphismen in den Exons 12 und 26 stumme Mutationen darstellen, bewirkt die Änderung der Gensequenz im Exon 21 an cDNA-Position 2677 eine Änderung der Proteinsequenz: An Position 893 wird anstelle von Alanin Serin bzw. Threonin eingebaut (35). Die Zahl der bekannten Mutationen im menschlichen ABCB1-Gen beläuft sich inzwischen auf über 100 (36).

Polymorphismen treten in verschiedenen Populationen unterschiedlich häufig auf. Im Falle des Polymorphismus im Exon 26 hat sich herausgestellt, dass Afrikaner eine signifikant höhere Wildtyp-Allelfrequenz (> 74%) haben als Kaukasier und Asiaten (20); eine sehr hohe Anzahl von Menschen schwarzer Hautfarbe sind deshalb Träger zweier Wildtypallele (Afrikaner 83%, schwarze Amerikaner 61%, Kaukasier 26% (37)). Zwischen den Polymorphismen C1236T, G2677T/A und C3435T besteht ein starkes Kopplungsgleichgewicht (20). Das bedeutet, dass die Allele der drei Loci nicht zufällig, sondern gekoppelt weitervererbt werden. Die Kombination zweier oder mehrerer Allele verschiedener Loci auf einem Gen bezeichnet man als Haplotyp. Bei ABCB1 sind über 90% der Träger des Wildtyps im Exon 26 C3435C gleichzeitig Träger des Wildtyps im Exon 21 G2677G (38).

#### 1.5.1. Bedeutung verschiedener Polymorphismen im ABCB1-Gen

Variationen in der DNA-Sequenz eines Gens können - je nach Art und Ausprägung - Auswirkungen auf die Genexpression bzw. auf das Genprodukt haben. Sie können aber auch folgenlos bleiben, in diesen Fällen spricht man von stillen oder stummen Mutationen. Welche funktionelle Bedeutung die häufigen unter den ABCB1-Polymorphismen haben, ist Gegenstand zahlreicher Studien. Dabei beschäftigen sich die meisten Untersuchungen mit den Polymorphismen C3435T in Exon 26 und G2677T/A in Exon 21.

Zum Zeitpunkt der Vergabe dieser Arbeit gab es noch keinen Anhalt dafür, dass sich der Polymorphismus G2677T/A und die damit einhergehende Variation der Aminosäuresequenz auf die Expression bzw. Funktion von P-Gp auswirkt. Für die stumme Mutation im Exon 26 C3435T wurde 2001 am Institut für Klinische Pharmakologie der Charité, CCM gezeigt, dass sie einen signifikanten Einfluß auf die ABCB1-mRNA-Expression in duodenalen Enterozyten hat. Bei Trägern der homozygoten Mutation T/T wurden im Vergleich zu Trägern des Wildtyps C/C nur etwa halb so viele ABCB1-Kopien gefunden. Außerdem wurden bei diesen Personen nach oraler Gabe von Digoxin höhere Spiegel im Plasma gemessen, was ein Hinweis auf eine

niedrigere P-Gp-Aktivität ist (34). Diese Ergebnisse waren für uns der Anlaß, den Einfluß der beiden häufigen und teilweise aneinander gekoppelten ABCB1-Polymorphismen C3435T und G2677T/A auf die Expression von P-Gp in menschlichen Lymphozyten zu untersuchen. Tabelle 2 zeigte eine Auswahl bekannter SNP im ABCB1-Gen und ihre Auswirkung auf die Aminosäuresequenz.

Tabelle 2: Single nucleotide polymorphisms (SNP) im ABCB1-Gen (Auswahl) (20)

Exon Nummer	mRNA-Position	Wildtyp-Allel	mutiertes Allel	Aminosäure	veränderte Aminosäure
2	43	A	G	Asn	Asp
2	49	T	C	Phe	Leu
2	61	A	G	Asn	Asp
3	131	A	G	Asn	Ser
4	240	C	A	Ala	Gly
4	267	T	C	Met	Thr
5	307	T	C	Phe	Leu
7	548	A	G	Asn	Ser
8	729	A	G	Glu	Glu
8	738	G	A	Ala	Ala
8	782	A	G	Ile	Val
11	1199	G	A	Ser	Asn
12	1236	C	T	Gly	Gly
12	1308	A	G	Thr	Thr
13	1474	C	T	Arg	Cys
14	1617	C	T	Ile	Ile
14	1662	G	C	Leu	Leu
14	1696	G	A	GLy	Lys
15	1777	C	T	Arg	Cys
15	1794	C	T	Ile	Ile
15	1795	G	A	Aa	Thr
16	1985	T	G	Leu	Arg
16	2005	C	T	Arg	Cys
20	2401	G	A	Val	Met
21	2485	A	G	Ile	Val
21	2505	A	G	Val	Val
21	2506	A	G	Ile	Val
21	2587	A	G	Ile	Met
21	2650	C	T	Leu	Leu
21	2677	G	T	Ala	Ser
21	2677	G	A	Ala	Thr
24	2956	A	G	Met	Val
24	2995	G	A	Ala	Thr
24	3084	G	A	Pro	Pro
25	3151	C	G	Pro	Ala
26	3320	A	C	Gln	Pro
26	3322	T	C	Trp	Arg
26	3396	C	T	Ala	Ala
26	3421	T	A	Ser	Thr
26	3435	C	T	Ile	Ile
28	3747	C	G	Gly	Gly
28	3751	G	A	Val	Ile
28	3767	C	A	Thr	Lys

## **2. Fragestellung**

Dem Fremdstofftransporter P-Gp wird eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der Multiplen Wirkstoffresistenz (MDR) in der Chemotherapie von Krebserkrankungen zugeschrieben. Außerdem ist P-Gp von zentraler Bedeutung für die Pharmakokinetik einiger wichtiger Arzneimittel, darunter auch von antiretroviralen Substanzen. Die Expression von P-Gp ist gewebeabhängig und interindividuell unterschiedlich. Die Aktivität von P-Gp bei einem Patienten kann über den Erfolg einer Arzneimitteltherapie entscheiden. Der Transporter wird beim Menschen vom ABCB1-Gen kodiert. Das Gen ist hoch polymorph. Es wird diskutiert, ob bestimmte häufige Polymorphismen die Expression von P-Gp beeinflussen und damit zur interindividuellen Variabilität der Transporteraktivität beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Polymorphismen G2677T/A und C3435T mit der Höhe der P-Gp-Expression in Zusammenhang stehen. Dies erfolgte durch Quantifizierung der ABCB1-mRNA-Menge in vier Zelllinien der peripheren lymphatischen Blutreihe. Lymphozyten wurden gewählt, weil sie nachweisbar P-Gp exprimieren und weil die P-Gp-Aktivität in Lymphozyten sowohl für die Chemotherapie als auch für die Behandlung der HIV-Infektion kritisch sein kann.

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Beantwortung folgender Fragen:

- 1) Wird ABCB1 in den von uns untersuchten 4 Lymphozytensubpopulationen verschieden stark exprimiert?
- 2) Haben die beiden häufigen genetischen Polymorphismen G2677T/A und C3435T auf dem ABCB1-Gen Auswirkung auf die Expression des Medikamententransporters in den untersuchten Zelllinien?
- 3) Existiert neben dem klassischen P-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 170 kDa ein kleinerer Medikamententransporter (Mini-P-Gp), wie in der Literatur beschrieben?

### **3. Materialien und Methoden**

#### **3.1. Materialien**

##### **Verwendete Puffer**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
PBS Dulbecco's	Phosphatpuffer	Invitrogen

##### **Fluoreszierende Farbstoffe**

<b>Name</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
CD19 PerCP-Cy5.5		Becton Dickinson
CD 8 APC	Antikörper-konjugierter	Becton Dickinson
CD 4 FITC	Farbstoff	Immunotech Beckman Coulter
CD 56 PE		Immunotech Beckman Coulter

##### **Weitere Chemikalien**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Biocoll Gradientenlösung (Dichte 1,077)	Biochrom KG
EDTA, Ethanol, Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Fötales Rinderserum (BSA), MgCl <sub>2</sub>	

##### **Enzyme**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Recombinanter RNasin® Ribonuclease Inhibitor,	Promega
RQ1-DNase, T7-RNA-Polymerase	
Mu-MLV Reverse Transkriptase,	Invitrogen
Taq-DNA-Polymerase	
BshNI	Fermentas

##### **Kits**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
RNeasy Mini Kit	Qiagen

## Geräte

Name	Hersteller
FACSDiva	Becton Dickinson
FACSCalibur	Becton Dickinson
Biophotometer	Eppendorf
MagNA Pure LC; Light Cycler	Roche

## Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz
oligo dT(15)	5'-TTTTTTTTTTTTTTTT
dmdr1	5' - GAGCATACATATGTTCAAACCTTC
umdr1	5' - CCATCATTGCAATAGCAGG
mdr1 FL	5' - TGGGAAGATCGCTACTGAAGCAAT Fluorescein
mdr1 LC	5' - LC Red640-AACTTCCGAACCGTTGTTTCTTTGA Ph
mdr1 170v	5' - AAAGTCGGAGTATCTTCTTCCAAG
mdr1 170r	5' - CCAATTTGAATAGCGAAACATTGA
mdr1 170FL	5' - TTCTTCTTTGCTCCTCCTCCATTGCGG - x
mdr1 170LC	5' - LC Red 640 - CCCCTTCAAGATCCATCCCGACC Ph
bMG se	5' - CCAGCAGAGAATGGAAAGTC
bMG as	5' - CATGTCTCGATCCCCTTAAC
b2M705	5' - LC Red 705 -ATGAAACCCAGACACATAGCAATTCAG - Ph
b2MFL	5' - TTCTTCAGTAAGTCAACTTCAATGTTCGGA X
MDR11	5' - TGTTTTTCAGCTGCTTGATGG
MDR12	5' - AAGGCATGTATGTTGGCCTC
C3435T Anc L	5' - LC Red 640 - GGAAGAGATCGTGAGGGCAG Ph
C3435 Sensor L	5' - GACAACAGCCGGGTGGTGTCA-X
MDR1 ex 21S	5' - GCAGGAGTTGTTGAAATGAAAATG
MDR1 ex 21B	5' - CGCCTGCTTTAGTTTGACTCA
21 Sensor	5' - ACCTTCCCAGTACCTTCT - X
21 Anchor	5' - LC Red 640 - CTTTCTTATCTTTCAGTGCTTGTC-Ph

Alle Oligonukleotide vom Hersteller Tib Molbiol, Berlin

### Computerprogramme

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Light Cycler Analysis Software 3.1	Roche
Light Cycler Run Software 3.5	Roche
Magna Pure Software	Roche
SPSS für Windows 10.0	SPSS

### Sonstiges Zubehör

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Kapillaren für LightCycler	Roche
UV-Küvetten	Eppendorf
Übliches Verbrauchsmaterial (EDTA-Blutbildröhrchen, Eppendorfgefäße, Pipettenspitzen, PCR-Platten, etc.)	

## **3.2. Methoden**

### 3.2.1. Materialgewinnung

Nach Genehmigung des Studienprotokolls durch die Ethikkommission der Charité wurden 45 gesunde Probanden (39 Männer, 6 Frauen) aus der Probandenkartei des Instituts für Klinische Pharmakologie der Charité in die Studie aufgenommen. Den Teilnehmern wurde der Zweck der Studie erläutert und sie erklärten ihr Einverständnis zur Teilnahme durch ihre Unterschrift. Eine regelmäßige Einnahme von Medikamenten führte zum Ausschluss aus der Studie. Den Probanden wurden 25 ml Vollblut in EDTA-Blutbildröhrchen abgenommen, 20 ml wurden sofort zur Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) verwendet und 5 ml wurden bei -20°C für die spätere Genotypisierung tiefgefroren.

### 3.2.2. Isolierung der Lymphozytensubpopulationen

#### 3.2.2.1 Isolierung von PBMC aus Vollblut

Zur Isolierung von PBMC aus Vollblut wurde die Ficoll-Gradientenzentrifugation benutzt. 20 ml Vollblut wurden im Verhältnis 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt. Jeweils 20 ml der Lösung wurden auf 10 ml Ficoll-Lösung in 50 ml Falcon-Röhrchen geschichtet, ohne die beiden Lösungen zu vermischen. Anschließend wurden die Röhrchen bei 1200 U/min für 25 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, ohne die Zentrifuge danach abzubremesen. Der Plasmaüberstand wurde vorsichtig abpipetiert, danach wurde die Zellschicht mit PBMC mit Hilfe kleiner Pasteurpipetten in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen übertragen. Die Zellsuspension wurde mit 15 ml PBS verdünnt und bei 1000 U/min für 15 min zentrifugiert, um Thrombozyten und Reste des Ficollmediums zu entfernen. Die Zellen wurden ein weiteres Mal in 2 ml PBS/BSA/EDTA-Lösung gewaschen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgegossen und die Zellen schließlich in 200 µl PBS/BSA/EDTA aufgenommen.

#### 3.2.2.2. Färbung der Lymphozyten mit konjugierten monoklonalen Antikörpern

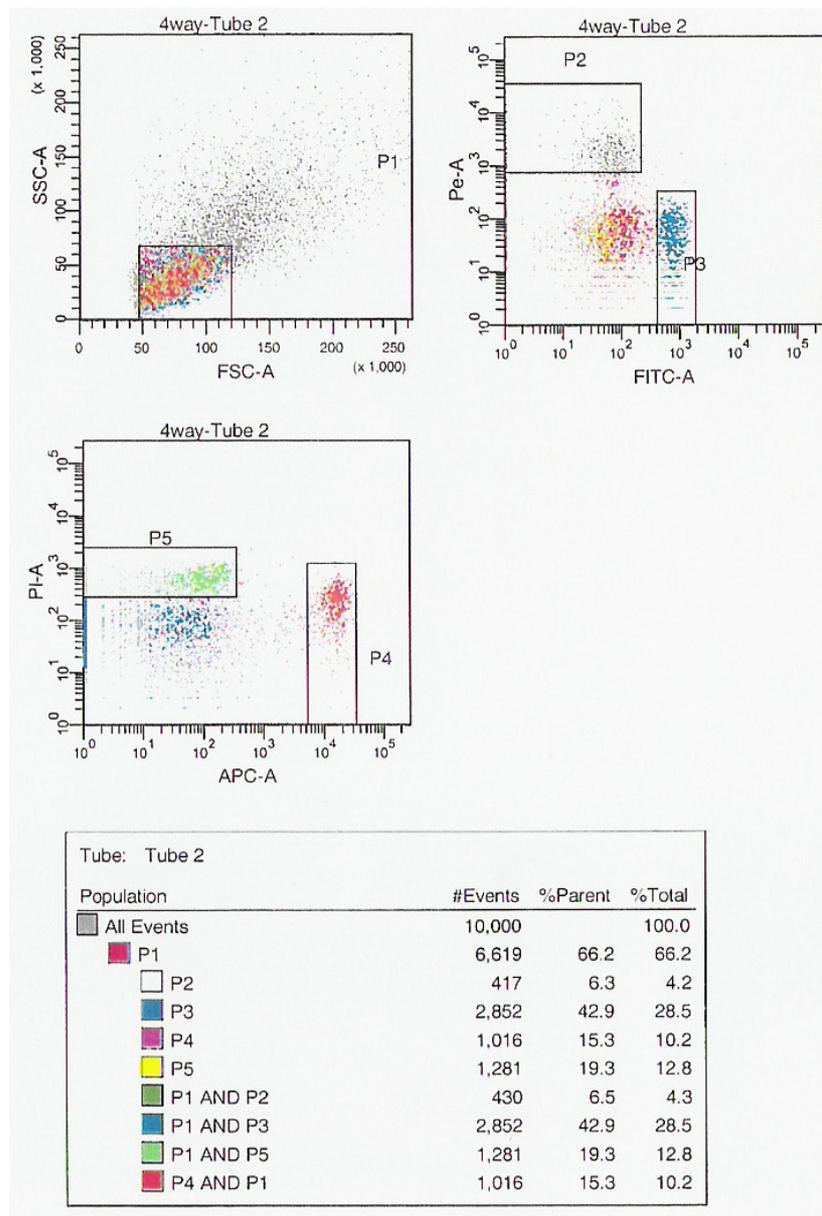
Die Zellsuspension wurde mit 20 µl FITC-konjugierter anti-CD4, 15 µl PE-anti-CD56, 15 µl APC-anti-CD8 und 15 µl PerCP-Cy5.5-anti-CD19 Antikörperlösung versetzt und für 30 min in Dunkelheit auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen in 3 ml PBS/BSA/EDTA-Lösung aufgenommen und bei 1000 U/min für 10 min zentrifugiert, der Überstand wurde abgegossen.

Dieser Schritt wurde wiederholt und die gefärbten Zellen zuletzt wieder in 3 ml PBS/BSA/EDTA aufgenommen.

### 3.2.2.3. Zellsortierung mit dem FACSDiva-Durchflußzytometer

Bei der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) handelt es sich um ein Verfahren zur Zellsortierung, bei dem mehrere Parameter einer Zelle vermessen und zur Sortierung genutzt werden können. Verschiedene Emissionsmaxima der verwendeten fluoreszierenden Antikörper ermöglichen eine Unterscheidung der unterschiedlich gefärbten Zellen. Graphisch dargestellt werden die verschiedenen Eigenschaften einer Zelle im Dot-Plot, einer zweidimensionalen Darstellung zweier Parameter, wobei jede Zelle als Punkt auf einem Koordinatensystem zwischen X- und Y-Achse dargestellt wird. Im Dot-Plot lassen sich Flächen (Gates) für eine anschließende Zellsortierung kennzeichnen. Zur Trennung wird die Zellsuspension in einzelne Tröpfchen zerlegt, die ein elektrisches Feld durchfliegen. Die einzelnen Zelltröpfchen werden dort aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften in mehrere Auffanggefäße abgelenkt.

Bei der Messung der Proben wurden die Ergebnisse dargestellt in einem Dot-Plot mit dem FSC (also der Zellgröße) als X-Achse und dem SSC (also der Granularität der Zelle) als Y-Achse. In den Plot wurde ein Gate um die Gruppe der PBMC gesetzt. Deren Fluoreszenz wurde gemessen und in zwei weiteren Dot-Plots abgebildet. Dabei wurden FITC-positive Zellen als X-Achse und PE-positive Zellen als Y-Achse in dem einen, und APC-positive Zellen als X-Achse und PerCP-Cy5.5 emittierende Zellen als Y-Achse in dem anderen Plot dargestellt (Abbildung 2). Um die jeweiligen Zellpopulationen wurde ein Gate gesetzt, und die sortierten Zellen wurden in vier Probengefäßen aufgefangen. Die Reinheit der sortierten Zellen wurde nach 10 stichprobenartig gewählten Läufen mit einem FACSCalibur-Durchflußzytometer überprüft und lag für alle vier Zellfraktionen bei  $\geq 95\%$ .



**Abbildung 2:** Zellsortierung mit dem FACSDiva-Durchflußzytometer: Im Dot Plot 1 (links oben) ist ein Gate (P1) um die Gesamtheit der PBMC einer Probe gesetzt. Dot Plot 2 (rechts oben) zeigt die Sortierung mittels Gate um FITC-positive CD4-Lymphozyten (P3) und PE-positive CD56-Lymphozyten (P2), im Dot Plot 3 (Mitte) Gate um APC-positive CD8- (P4) und PerCP (PI)-positive CD19-Lymphozyten (P5). Anschließend Sortierung der Lymphozytensubpopulationen aus der Gesamtpopulation der PBMC (Schnittmenge P1 und P2, P1 und P3, usw.) und Trennung in unterschiedliche Auffanggefäße.

### 3.2.3. mRNA-Isolierung aus Lymphozyten

Die Extraktion der gesamten Messenger-RNA aus den FACS-sortierten Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits von QIAGEN in Anlehnung an das Herstellerprotokoll. Nach FACS-Sortierung wurde die Zellsuspension mit 1500 U/min für 10 min zentrifugiert, der Überstand

wurde abgossen. Durch Schütteln wurden die Zellen vom Boden des Probengefäßes gelöst und anschließend durch Zugabe von 350 µl RLT-Puffer lysiert. Das Lysat wurde auf eine QIAshredder-spin-Säule pipettiert und bei 15000 U/min für 2 min zentrifugiert, um eine Homogenisierung der Probe zu erreichen. Die in der Probe enthaltene RNA wurde mit 400 µl 70%igem Ethanol präzipitiert, anschließend wurde die Probe einschließlich Präzipitat auf eine RNeasy Minisäule aufgetragen. Die Säule wurde bei 12000 U/min 15 Sekunden zentrifugiert, der wässrige Ablauf verworfen. Die jetzt in der Säule befindliche RNA wurde dann mit 700 µl RW1-Puffer und zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen, bevor sie in zwei Arbeitsschritten mit jeweils 50 µl Rnase-freiem Wasser in ein 1,5 ml Eppendorf Probengefäß eluiert wurde. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der im Probengefäß befindlichen RNA mit einem Eppendorf BIO-Photometer. Schließlich wurden die Proben bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren.

### 3.2.4. Quantitative Messung der mRNA mit RT-PCR und Light Cycler PCR

#### 3.2.4.1. RT-PCR-Reaktion

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können beliebige DNA-Abschnitte ohne Verwendung von Restriktionsenzymen, Vektoren und Wirtszellen in vitro enzymatisch vermehrt werden. Man benötigt dazu lediglich zwei Oligonukleotide (Primer), die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Segments hybridisieren, die vier einzelnen am Aufbau der DNA beteiligten Nukleotide und ein spezielles Enzym, die DNA-Polymerase. Die PCR besteht aus einem wiederholten, zyklischen Ablauf von drei Schritten, an deren Ende eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnitts steht. Allerdings lassen sich mittels PCR nur DNA-Sequenzen amplifizieren. Zur Amplifikation von RNA-Abschnitten ist es deshalb notwendig, in einer vorgeschalteten Reaktion die instabile RNA in stabile cDNA umzuschreiben, die dann in der PCR amplifiziert werden kann. Dies geschieht mit Hilfe eines viralen Enzyms, der reversen Transkriptase, die den umgekehrten Prozeß der Transkription durchführt, wobei also mRNA in cDNA umgeschrieben wird. Eine Kombination aus reverser Transkription und anschließender cDNA-Amplifikation mit der Polymerase-Kettenreaktion nennt man RT-PCR.

Die Bedingungen für die Reverse Transkription waren für ABCB1 und  $\beta$ -Mikroglobulin gleich. Der Reaktionsmix enthielt folgende Komponenten:

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Menge (<math>\mu</math>l)</b>
5 x Puffer		5
DTT	0,1 M	2,50
dNTPs	je 10 mM	1
oligo dT 15	10 $\mu$ M	2
RNasin	40 U/ $\mu$ l	0,2
Mu-MLV	200 U/ $\mu$ l	0,6
Wasser		0,2
BSA	1 mg/ml	0,5

Der RT-PCR-Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l: 13  $\mu$ l Reaktionsmix, jeweils 50 ng Gesamt-mRNA in 12  $\mu$ l Rnase-freiem Wasser sowie die Serienverdünnungen der RNA-Standards mit bekannter Konzentration. Er wurde 10 min bei 26°C, 60 min bei 42°C, 2 min bei 95°C inkubiert, dann auf 4°C gekühlt. Die Real-time-PCR im Light Cycler erfolgte unmittelbar danach.

#### 3.2.4.2. Real-Time-quantitative-PCR mit Light Cycler

Die Light-Cycler-PCR-Technologie erlaubt die Kombination zweier getrennter Verfahren, nämlich der Vervielfältigung eines Genabschnittes in der konventionellen PCR und der Darstellung des Ergebnisses in einem Schritt. Die PCR findet in einer Glaskapillare statt, die entstehenden DNA-Fragmente werden mit Hilfe einer Fluoreszenzmarkierung detektiert. Dabei kommen sogenannte Hybridisierungs sonden zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um zwei Oligonukleotide, die benachbarte Abschnitte einer DNA-Matrize spezifisch hybridisieren. Während eine Sonde am 5'-Ende mit einem LC Red (640 bzw. 705 nm) markiert ist, trägt die andere Sonde am 3'-Ende ein Fluoreszin. Die freie 3'-Hydroxygruppe ist dabei phosphoryliert, um einer Extension an der LC Red Sonde vorzubeugen. Bei Annäherung der beiden Sonden aneinander wird das Fluoreszin von einer externen Lichtquelle angeregt, und es kommt zu einem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) vom Donor (Fluoreszin) zum Akzeptor (LC Red). Der angeregte Akzeptor emittiert messbares Licht, so dass auf diese Weise der Verlauf der PCR am Monitor verfolgt werden kann. Die Quantifizierung erfolgt über einen externen Standard, der in der Sequenz mit der gemessenen mRNA identisch ist, und der in einer Verdünnungsreihe aus bekannten Konzentrationen mitgeführt wird, nachdem er im selben

Ansatz in cDNA transkribiert wurde. So lässt sich eine Kalibrierungskurve herstellen, aus der sich die Anzahl der RNA-Moleküle in den Proben berechnen lässt.

### 3.2.4.3. Synthese externer Standards für die quantitative Real-Time-PCR

Für die Erstellung einer Kalibrierungskurve in der Real-Time-PCR wurden externe RNA-Standards für die C- und die N-terminale Hälfte von ABCB1 und für das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Mikroglobulin hergestellt. Dabei wurde im ersten Schritt eine RT-PCR mit den jeweiligen Primern durchgeführt. In der folgenden PCR-Reaktion wurde eine Matrize zur erhaltenen cDNA hergestellt, die nach Reinigung mit Ultrafree MC 30000 Filtern mit Hilfe der DNA-abhängigen T7 RNA-Polymerase in vitro transkribiert wurde. Die somit erhaltene Standard-RNA wurde anschließend mit Rnase-freier RQ1-Dnase behandelt und mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen gereinigt. Alle RNA-Standards wurden spektroskopisch gemessen und die Spezifität des Fragments wurde durch DNA-Sequenzanalyse bestätigt. Abschließend wurde eine Serienverdünnung der RNA hergestellt, von  $10^{10}$  bis  $10^6$  Kopien für  $\beta$ -Mikroglobulin und  $10^8$  bis  $10^6$  Kopien für die C- und N-terminale Hälfte von ABCB1.

### 3.2.4.4. Versuchsbedingungen Real-Time-PCR mit Light Cycler

Der Reaktionsmix für die PCR-Reaktion enthielt, abhängig vom zu vervielfältigenden Genabschnitt, folgende Komponenten:

Für ABCB1-C-terminale Hälfte:

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Menge (<math>\mu</math>l)</b>
10xPuffer		1,6
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,7
dNTPs	je 2 mM	0,7
BSA	1 mg/ml	0,6
umdr1	10 $\mu$ M	0,5
dmdr1	10 $\mu$ M	0,5
mdr1 FL	10 $\mu$ M	0,2
mdr1 LC	10 $\mu$ M	0,2
Taq	5 U/ $\mu$ l	0,25
Wasser		5,75

Für ABCB1-N-terminale-Hälfte:

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Menge (µl)</b>
10xPuffer		1,6
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,7
dNTPs	je 2 mM	0,7
BSA	1 mg/ml	0,6
mdr1 170v	10 µM	0,5
mdr1 170r	10 µM	0,5
mdr1 170 FL	10 µM	0,2
mdr1 170 LC	10 µM	0,2
Taq	5 U/µl	0,25
Wasser		5,05
DMSO	100%	0,7

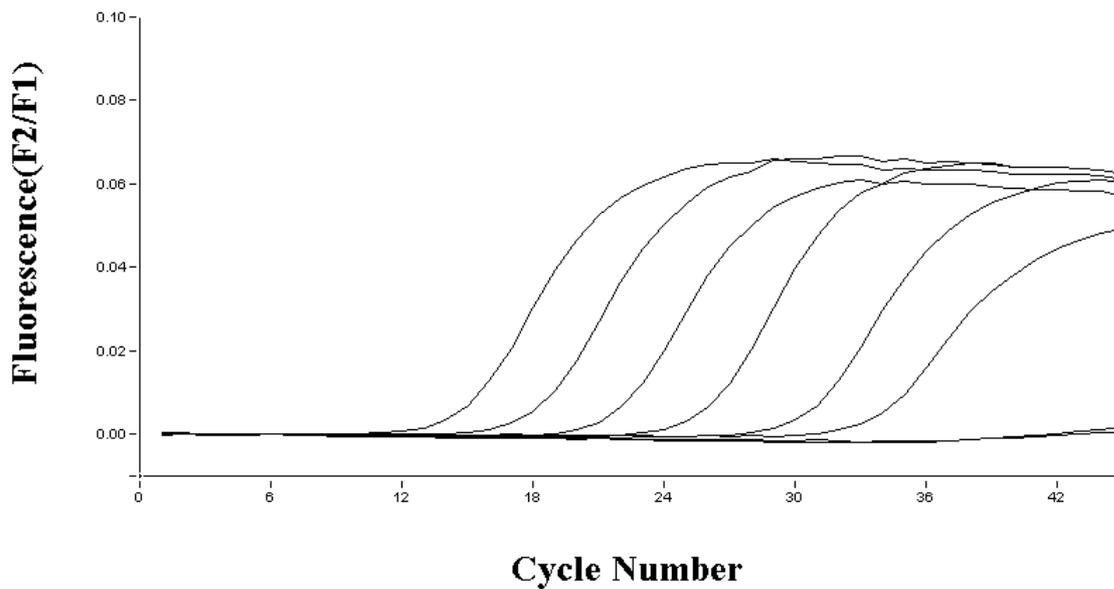
Für β-Mikroglobulin:

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Menge (µl)</b>
10xPuffer		1,6
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0,8
dNTPs	je 2 mM	0,8
BSA	1 mg/ml	0,8
bMG se	10 µM	0,8
bMG as	10 µM	0,8
b2M705	10 µM	0,3
b2MFL	10 µM	0,3
Taq	5 U/µl	0,2
Wasser		3,6
DMSO	100%	1

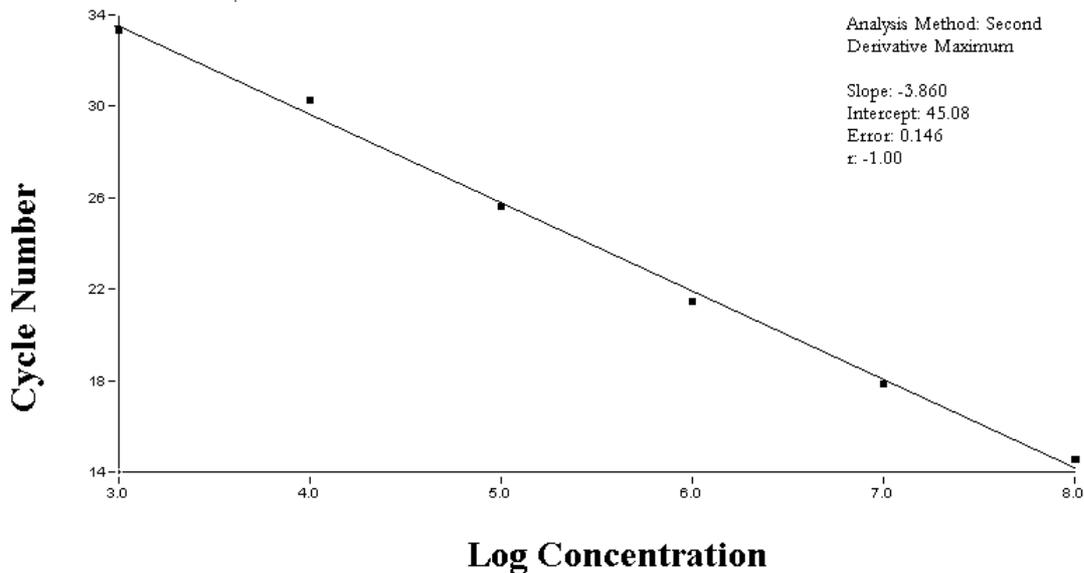
Folgende Reaktionsbedingungen stellten sich als optimal heraus: Denaturation 60 s bei 95°C, anschließend 45 Zyklen aus 0 s bei 95°C, Annealing für 10 s bei 55°C (ABCB1-C-terminale Hälfte) bzw. 60°C (ABCB1-N-terminale Hälfte und β-Mikroglobulin) und 10 s bei 72°C. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, wurden die Primer und Hybridisierungssonden so gewählt, dass sie Intron/Exon-Übergänge beinhalteten. Die PCR-Produkte wanderten als Einzelfragmente auf einem Agarosegel und ihre Spezifität wurde durch Sequenzierung bestätigt.

### 3.2.4.5. Quantifizierung der ABCB1-mRNA in CD4+-, CD8+-, CD19+- und CD 56+- Lymphozyten

Mit Hilfe der Serienverdünnungen der Standard-mRNA bekannter Konzentration wurde nach Anleitung des Herstellers mit Hilfe der Light-Cycler Run Software 3.5 bei jeder Messung eine Kalibrierungskurve erstellt (Abbildung 3), aus der die mRNA-Ausgangskonzentrationen der einzelnen Proben bestimmt werden konnten (Abbildung 4). Die Kalibrierungskurven verliefen bei einem Korrelationskoeffizienten  $r \geq 0,98$  stets linear.



**Abbildung 3:** Verlauf der PCR einer ABCB1-C-terminalen Hälfte mRNA – Standardverdünnungsreihe einschließlich Negativkontrollen. Die X-Achse (cycle number) repräsentiert die Anzahl der Amplifizierungszyklen, die Y-Achse (fluorescence F2/F1) die Anzahl der amplifizierten Moleküle.



**Abbildung 4:** Erstellung einer Kalibrierungskurve für die mRNA-Konzentration von ABCB1-C-terminaler Hälfte, abgeleitet aus den in Abbildung 3 dargestellten Daten. Es ist der Logarithmus der Konzentration (X-Achse) gegen den threshold cycle  $C_T$  (Y-Achse) jedes Experiments eingezeichnet. Die  $C_T$ -Werte der Proben wurden auf der Kalibrationskurve interpoliert und zur Errechnung der Ausgangskonzentration verwendet.

### 3.2.5. DNA-Extraktion und Genotypisierung

#### 3.2.5.1. DNA-Extraktion

Aus den Blutproben der Probanden wurde aus jeweils 200  $\mu$ l Vollblut mit Hilfe des MagNA Pure LC gemäß dem Protokoll des Herstellers genomische DNA extrahiert. Die Reinheit und die Ausbeute der erhaltenen DNA wurden anschließend photometrisch überprüft.

#### 3.2.5.2. Genotypisierung mit Light-Cycler-Schmelzkurvenanalyse

Das der Schmelzkurvenanalyse zugrunde liegende Prinzip ist die Eigenschaft der DNA, bei einer charakteristischen Temperatur zu schmelzen, d.h. ihre Helixstruktur zu verlieren. Die Schmelztemperatur eines DNA-Abschnitts ist abhängig von seiner Nukleotidzusammensetzung. Wie in der quantitativen Real-time-PCR werden zwei markierte Oligonukleotide als Sonden verwendet. Eine Sonde fungiert als Ankersonde, während die Sensorsonde die Region mit der Sequenzvariation umfasst. Wenn ein Genabschnitt eine Punktmutation in dieser Region enthält, kommt es zu einem „Mismatch“ der Sonde mit dem komplementären DNA-Abschnitt. Beim Schmelzen des PCR-Produktes resultiert ein Absinken der Schmelztemperatur der Sensorsonde, die dann ihr Fluoreszenzverhalten ändert. Die Schmelzkurvenanalyse erfolgte nach einem Protokoll und mit der Software des Herstellers. Für den Nachweis der Mutation C3435T im

Exon 26 setzte sich der Reaktionsmix folgendermaßen zusammen, wobei der PCR-Ansatz 20 µl Reaktionsmix und in 1 µl Wasser gelöste DNA enthielt:

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Menge (µl)</b>
10xPuffer		2
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1
dNTPs	je 2 mM	1
BSA	1 mg/ml	0,6
MDR 11	10 µM	0,6
MDR 12	10 µM	0,6
C3435T Anc L	10 µM	0,4
C3435 Sensor L	10 µM	0,4
Taq	5 U/µl	0,2
Wasser		12,2
DMSO	100%	1

Bei Vorliegen des Wildtyps auf einem Allel lag die Schmelztemperatur bei 64°C, bei der Mutation bei 55°C.

Für die Mutation G2677T/A im Exon 21 erwies sich folgender Reaktionsmix als am besten geeignet:

<b>Substanz</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Menge (µl)</b>
10xPuffer		2,0
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,7
dNTPs	je 2 mM	1
BSA	1 mg/ml	0,6
MDR1 ex 21S	10 µM	0,4
MDR1 ex 21B	10 µM	0,4
21 Sensor	10 µM	0,6
21 Anchor	10 µM	0,6
Taq	5 U/µl	0,2
Wasser		12,5

Bei Vorliegen des Wildtyps lag die Schmelztemperatur bei 55,8°C, bei der homozygoten Mutation T/T bei 52,1°C. Für die heterozygoten Zustände zeigten sich bei G/T Schmelzkurven bei 52,5°C und 54,6°C, bei G/A bei 55,9°C und 57,8°C und bei T/A bei 52,8°C und 58,9°C.

### 3.2.5.3. Überprüfung der Ergebnisse für Exon 21 durch herkömmliche PCR mit Verdau und Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Ergebnisse für den untersuchten Polymorphismus im Exon 21 von ABCB1 wurde eine herkömmliche PCR mit anschließender RFLP-Analyse durchgeführt. Die 224 bp großen Amplifikate wurden mit dem Enzym Bsh NI nach Anleitung des Herstellers verdaut und die Fragmente durch Gelelektrophorese getrennt. Die PCR-Produkte des Wildtyp-Allels G wiesen Banden bei 198 bp und 26 bp auf, die Produkte des mutierten Gens zeigten eine Bande bei 224 bp, und wenn der Spender des Blutes ein heterozygoter Träger der Mutation (G/T) gewesen war, zeigten sich Banden bei 224 bp, 198 bp und 26 bp. Die Ergebnisse waren mit denen der Schmelzkurvenanalyse identisch.

### 3.2.6. Statistische Auswertung

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Die Unterschiede der ABCB1-mRNA-Mengen zwischen den Zellpopulationen sowie zwischen der N-terminalen und der C-terminalen ABCB1-Hälfte innerhalb einer Zellreihe wurden unter Verwendung des Wilcoxon-Rangsummentests zum Vergleich zweier abhängiger Zufallsgrößen ausgewertet. Die unterschiedliche ABCB1-mRNA-Expression als Ausdruck unterschiedlicher Genotypen innerhalb der Zellreihen wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert. Zur relativen Quantifizierung der Ergebnisse wurde die Expression des Zielgens mit der eines nicht regulierten Housekeeping-Gens normalisiert. Dabei werden nicht die absoluten Startkopienzahlen oder -konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen bezogen. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienz sowie Fehler bei der RT innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das Housekeeping-Gen betreffen. Die normalisierten mRNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe der Ergebnisse für das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Mikroglobulin nach folgender Formel berechnet:

$$ABCB1_{\text{norm}} = (\text{ABCB1-mRNA-Kopien})_{\text{Probe}} \times (\beta\text{-Mikrogl.-mRNA-Kopien})_{\text{Mittelwert}} / (\beta\text{-Mikrogl.-mRNA-Kopien})_{\text{Probe}}$$

Alle Berechnungen wurden mit SPSS für Windows (Version 10, SPSS Inc, Chicago, IL) durchgeführt. Ein p-Wert  $< 0,05$  galt als statistisch signifikant.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Ergebnisse der Genotypisierung**

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Genotypisierung mittels Schmelzkurvenanalyse dargestellt. Untersucht wurden die ABCB1-Polymorphismen C3435T in Exon 26 und G2677T/A in Exon 21 bei 45 deutschen Probanden. Da nur ein Proband Träger der Mutation 2677T/A war, wurde dieser Genotyp bei der weiteren Untersuchung des G2677T/A-Polymorphismus nicht berücksichtigt.

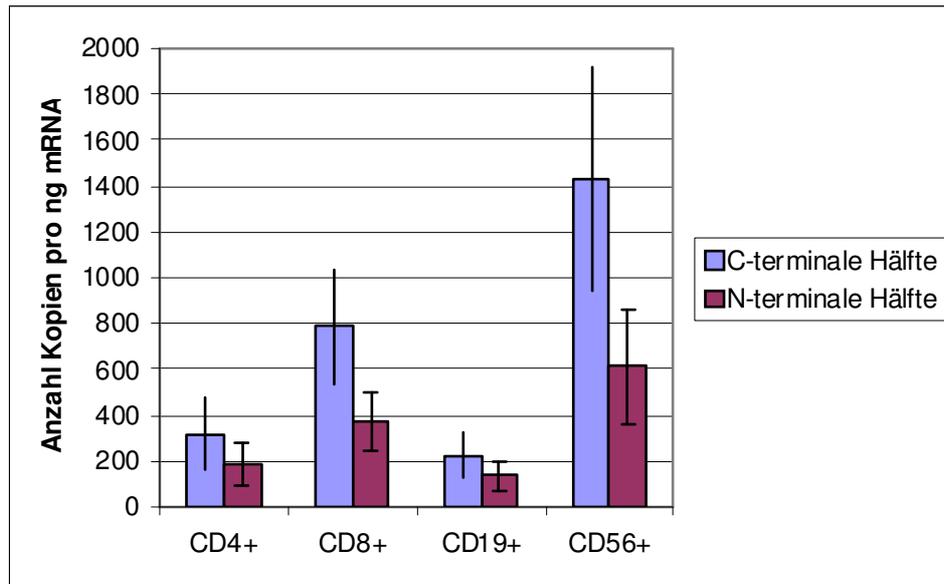
Die Ergebnisse der Genotypisierung des Polymorphismus in Exon 21 wurden durch eine konventionelle PCR mit anschließendem Verdau und Trennung der Fragmente in der Gelelektrophorese überprüft. Dies ergab das gleiche Resultat wie die Schmelzkurvenanalyse. Eine Darstellung des Genotyps T/A war hier nicht möglich.

Tabelle 3: Verteilung der genetischen Polymorphismen auf Exon 21 G2677T und Exon 26 C3435T im ABCB1-Gen bei 45 deutschen Probanden

Genotyp	<b>3435CC</b>	<b>3435CT</b>	<b>3435TT</b>
<b>2677GG</b>	12	5	4
<b>2677GT</b>	1	10	5
<b>2677TT</b>	0	0	7
<b>2677TA</b>	0	0	1

#### 4.2. Quantifizierung der ABCB1-mRNA von C- und N-terminaler Hälfte in Lymphozyten

In 50 ng Gesamt-RNA wurde bei allen Zellreihen die Ursprungsmenge an ABCB1-mRNA gemessen und die Ergebnisse als Anzahl der Moleküle pro ng Gesamt-RNA dargestellt (Abbildung 5). Dabei wurden zum Nachweis eines mutmaßlich existierenden Mini-P-Gp unterschiedliche Primer zur spezifischen Vervielfältigung der C- bzw. N-terminalen Hälfte des ABCB1-Gens eingesetzt.



**Abbildung 5:** Anzahl der mRNA-Kopien von C- und N-terminaler Hälfte von ABCB1 pro ng Gesamt-mRNA in CD4+, CD8+, CD19+ und CD56+-Lymphozyten bei 45 Probanden; die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

Bei der Messung der mRNA-Menge der C-terminalen Hälfte wurde in CD 56+-Lymphozyten der höchste Mittelwert ermittelt ( $1,43 \times 10^3 \pm 4,85 \times 10^2$  Moleküle pro ng mRNA) mit einem bis zu 14-fachen Unterschied zwischen einzelnen Probanden. Die zweithöchste mittlere Konzentration wurde in CD8+-Zellen gemessen ( $7,87 \times 10^2 \pm 2,52 \times 10^2$  Moleküle pro ng mRNA mit bis zu 5-fachen interindividuellem Unterschied), gefolgt von CD4+-Zellen ( $3,17 \times 10^2 \pm 1,57 \times 10^2$  Moleküle pro ng mRNA, 16-facher Unterschied). Die geringste Ausbeute an mRNA für die ABCB1-C-terminale Hälfte fand sich in CD19+-Zellen ( $2,23 \times 10^2 \pm 9,88 \times 10^1$  Moleküle pro ng mRNA, 8-facher Unterschied).

Die Ermittlung der Ursprungsmenge an mRNA der N-terminalen Hälfte ergab deutlich geringere Werte, jedoch mit einer analogen Verteilung auf die verschiedenen Zelllinien wie bei der C-terminalen Hälfte: die höchste mittlere Konzentration wurde bei CD56+-Zellen gemessen ( $6,10 \times$

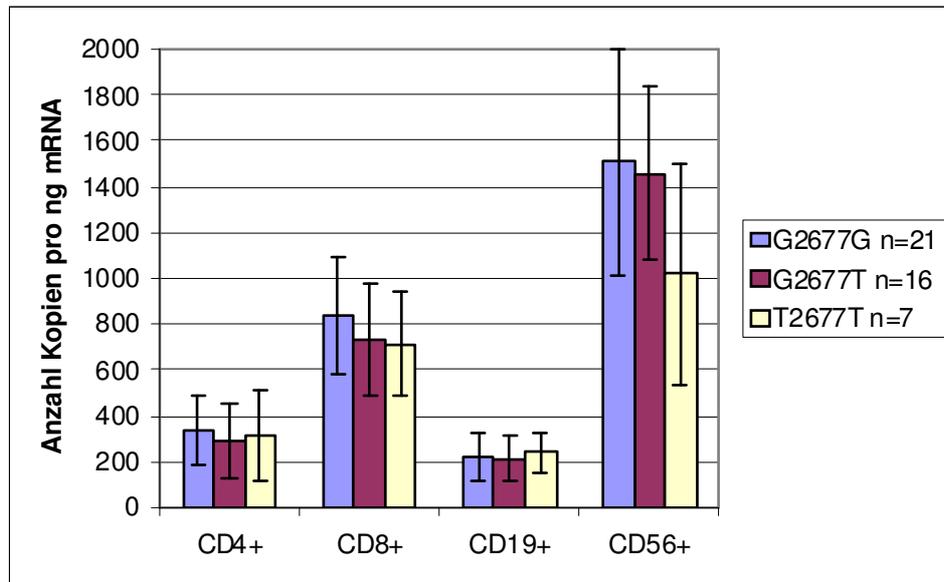
$10^2 \pm 2,55 \times 10^2$  Moleküle pro ng mRNA; bis zu 17-facher interindividueller Unterschied), gefolgt von CD8+-Zellen ( $3,71 \times 10^2 \pm 1,33 \times 10^2$  Moleküle pro ng mRNA, 18-facher Unterschied) und CD4+-Zellen ( $1,81 \times 10^2 \pm 9,34 \times 10^1$  Moleküle pro ng mRNA, 37-facher Unterschied). CD19+-Zellen wiesen auch hier die geringste mittlere Konzentration an mRNA auf ( $2,23 \times 10^2 \pm 6,92 \times 10^1$  Moleküle pro ng mRNA, 25-facher Unterschied).

Bei den einzelnen Lymphozytengruppen waren die Konzentrationen der C-terminalen Hälfte etwa doppelt so hoch wie die der N-terminalen Hälfte, der Unterschied war statistisch hoch signifikant (p-Werte  $< 0,0001$ ; nach Wilcoxon-Test). Die statistische Auswertung bezüglich der Konzentrationen von C-terminaler und N-terminaler ABCB1-Hälfte zwischen den untersuchten Zellpopulationen ergab ebenfalls signifikante Unterschiede (p-Werte  $< 0,05$ ), lediglich zwischen CD4+- und CD19+-Lymphozyten wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht (p  $> 0,09$ , nach Wilcoxon-Test).

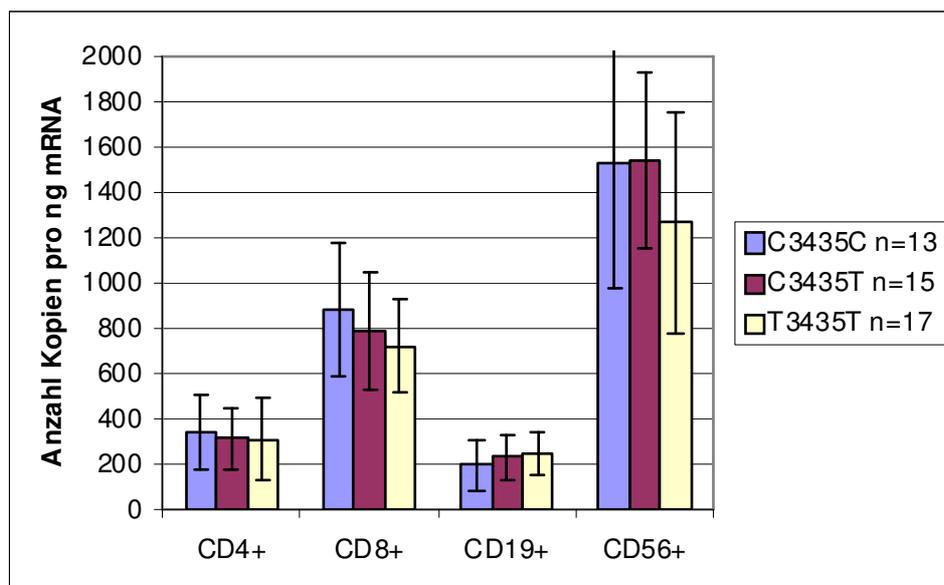
### 4.3. Auswirkung der untersuchten Polymorphismen auf die Expression von ABCB1

#### 4.3.1. Expression der C-terminalen Hälfte von ABCB1

Die Auswirkung der beiden genetischen ABCB1-Polymorphismen G2677T und C3435T auf die Expression der C-terminalen Hälfte ist in Abbildung 6 und Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 6:** Expression der C-terminalen Hälfte von ABCB1 in CD4+, CD8+, CD19+ und CD56+ Lymphozyten bezogen auf den ABCB1-Polymorphismus G2677T in Exon 21. Werte von 44 Probanden, dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

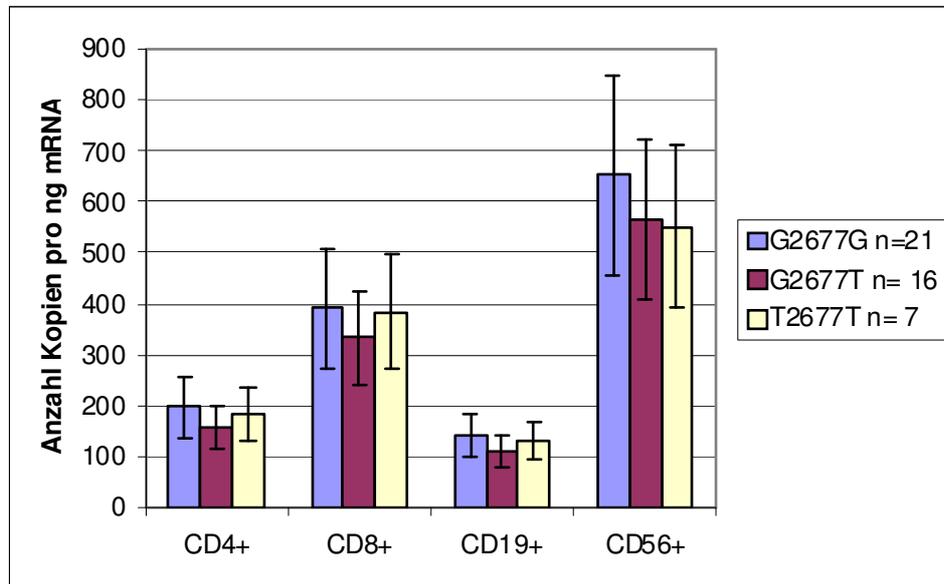


**Abbildung 7:** Expression der C-terminalen Hälfte von ABCB1 in CD4+, CD8+, CD19+ und CD56+ Lymphozyten bezogen auf den ABCB1-Polymorphismus C3435T in Exon 26. Werte von 45 Probanden, dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

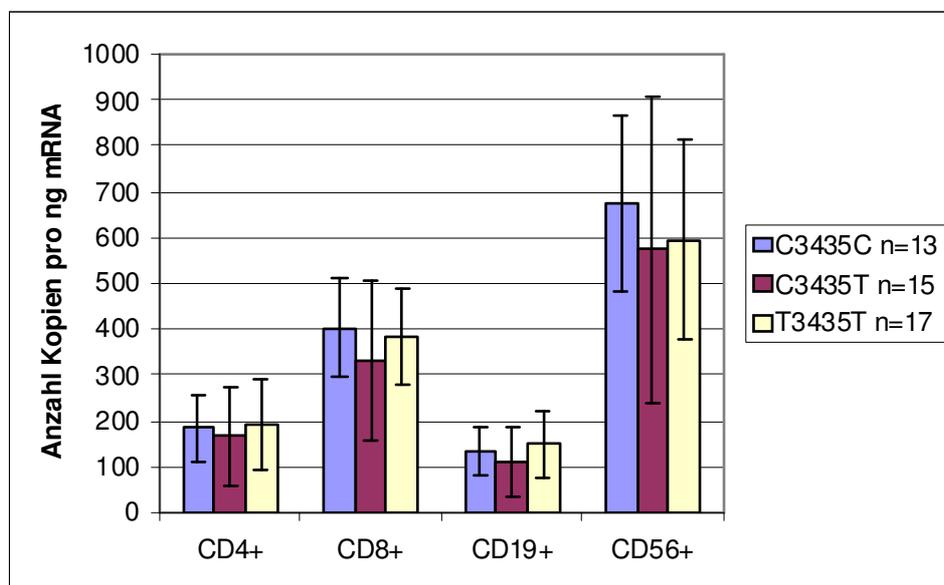
Homozygote Träger der Mutation T/T scheinen zwar bei beiden Polymorphismen die geringste Menge an ABCB1-mRNA in CD8<sup>+</sup>- und CD56<sup>+</sup>-Lymphozyten zu bilden, dieser Trend war jedoch nach Normalisierung der Ergebnisse nicht mehr zu erkennen (siehe 4.4.1). Die statistische Analyse der Ergebnisse ergab darüber hinaus keine signifikanten Unterschiede in der Expression der C-terminalen Hälfte von ABCB1 zwischen den verschiedenen genetischen Konstellationen auf Exon 21 G2677T und Exon 26 C3435T (p-Werte > 0,05; nach Kruskal-Wallis-Test). Für beide untersuchten Polymorphismen kann also keine eindeutige Auswirkung auf die Expression der C-terminalen Hälfte von ABCB1 nachgewiesen werden.

#### 4.3.2. Expression der N-terminalen Hälfte von ABCB1

Die Auswirkung der beiden genetischen ABCB1-Polymorphismen G2677T und C3435T auf die Expression der N-terminalen Hälfte ist in Abbildung 8 und Abbildung 9 dargestellt.



**Abbildung 8:** Expression der N-terminalen Hälfte von ABCB1 in CD4+, CD8+, CD19+ und CD56+ Lymphozyten bezogen auf den ABCB1-Polymorphismus G2677T in Exon 21. Werte von 44 Probanden, dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

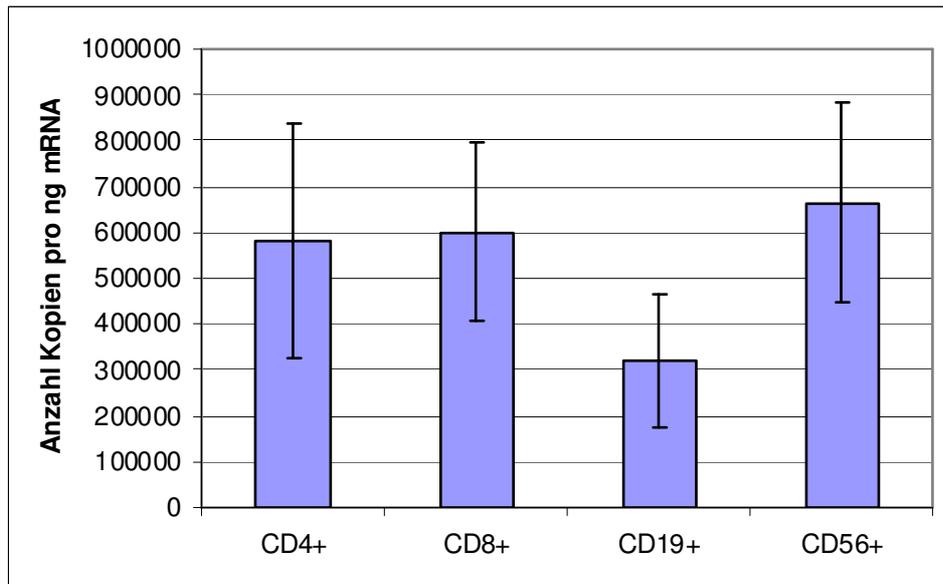


**Abbildung 9:** Expression der N-terminalen Hälfte von ABCB1 in CD4+, CD8+, CD19+ und CD56+ Lymphozyten bezogen auf den ABCB1-Polymorphismus C3435T in Exon 26. Werte von 45 Probanden, dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

Auch hier ergab die statistische Auswertung keine signifikanten Unterschiede in der Expression der N-terminalen Hälfte von ABCB1 als Folge unterschiedlicher genetischer Konstellationen auf Exon 21 und Exon 26 ( $p$ -Werte  $> 0,05$ ; nach Kruskal-Wallis-Test). Es zeigt sich demnach kein eindeutiger Effekt auf die Expression der N-terminalen Hälfte von ABCB1 durch die untersuchten Polymorphismen im Gen des Medikamententransporters.

#### 4.4. Normalisierung der ABCB1-Expression mittels Housekeeping-Gen $\beta$ -Mikroglobulin

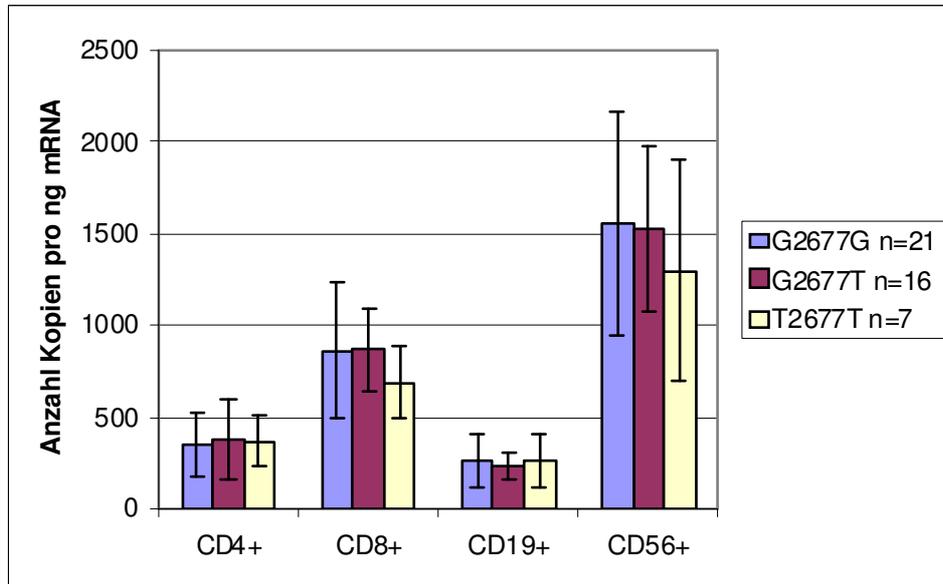
Zur Normalisierung der gemessenen mRNA-Werte wurde in den verschiedenen Zelltypen auch die Expression von  $\beta$ -Mikroglobulin bestimmt. Im Mittel wurden in CD4+-Lymphozyten  $5,8 \times 10^5$  Kopien, in CD8+-Zellen  $6,0 \times 10^5$  Kopien, in CD19+-Zellen  $3,22 \times 10^5$  Kopien und in CD56+-Zellen  $6,64 \times 10^5$  Kopien der mRNA für  $\beta$ -Mikroglobulin pro ng Gesamt-mRNA gemessen (Abbildung 10).



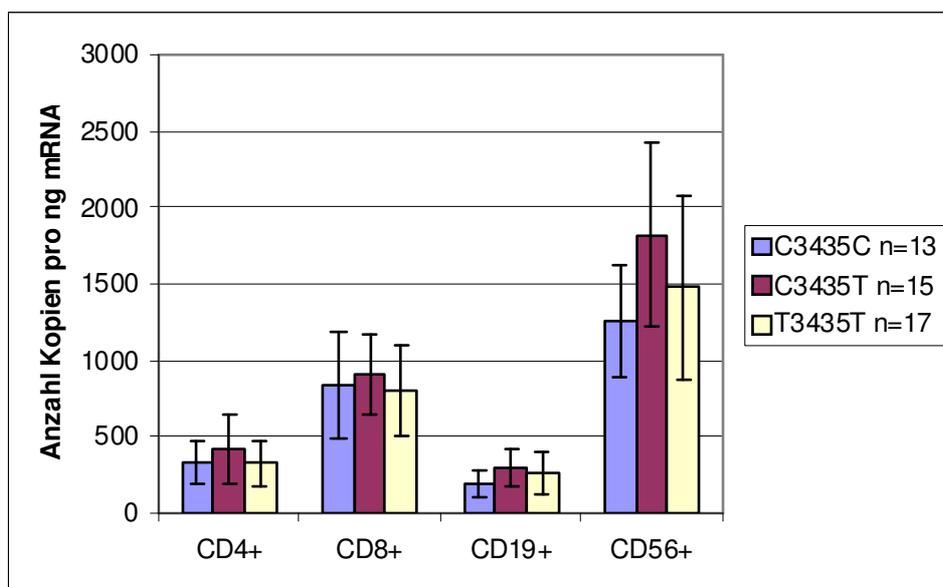
**Abbildung 10:** Anzahl der mRNA-Kopien von  $\beta$ -Mikroglobulin pro ng Gesamt-mRNA in CD4+-, CD8+-, CD19+- und CD56+-Lymphozyten bei 45 Probanden; die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

#### 4.4.1. Expression der C-terminalen Hälfte von ABCB1 (normalisierte Werte)

In Abbildung 11 und 12 sind die normalisierten Werte für die 4 Lymphozytenlinien bezogen auf die Genotypen der beiden untersuchten ABCB1-Polymorphismen, G2677T bzw. C3425T, graphisch dargestellt.



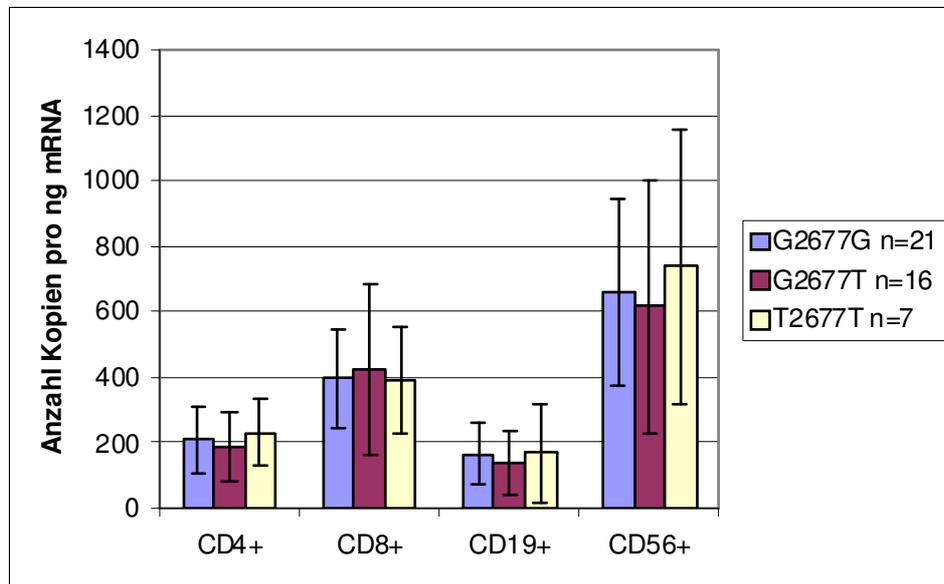
**Abbildung 11:** Expression der C-terminalen Hälfte von ABCB1 in CD4+-, CD8+-, CD19+ und CD56+-Lymphozyten bezogen auf den ABCB1-Polymorphismus G2677T in Exon 21 (normalisiert). Werte von 44 Probanden, dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung



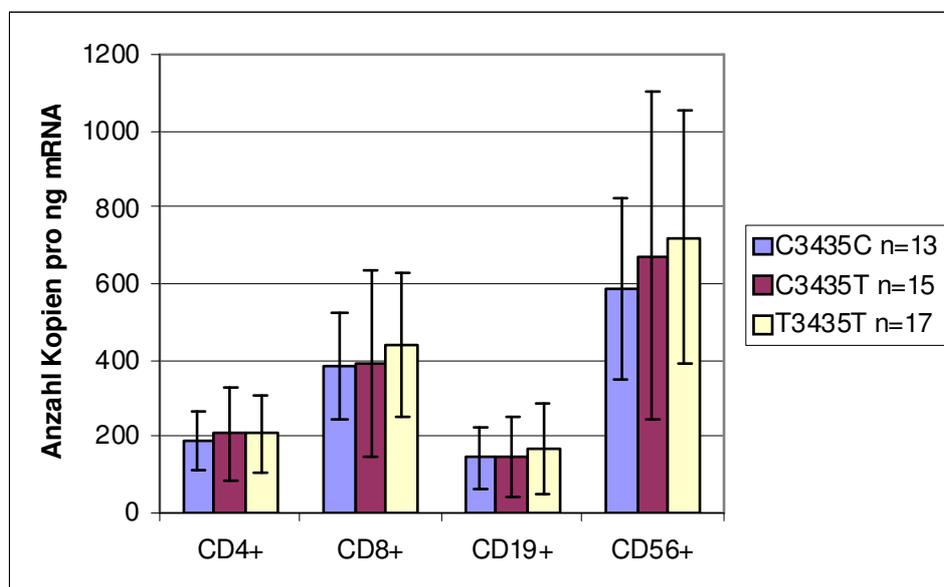
**Abbildung 12:** Expression der C-terminalen Hälfte von ABCB1 in CD4+-, CD8+-, CD19+ und CD56+-Lymphozyten bezogen auf den ABCB1-Polymorphismus C3435T in Exon 26 (normalisiert). Werte von 45 Probanden, dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

#### 4.4.2. Expression der N-terminalen Hälfte von ABCB1 (normalisierte Werte)

Abbildung 13 und 14 zeigen die normalisierten Werte für die 4 Lymphozytenlinien bezogen auf die Genotypen der beiden untersuchten ABCB1-Polymorphismen, G2677T bzw. C3425T.



**Abbildung 13:** Expression der N-terminalen Hälfte von ABCB1 in CD4+-, CD8+-, CD19+ und CD56+ Lymphozyten bezogen auf den ABCB1-Polymorphismus G2677T in Exon 21 (normalisiert). Werte von 44 Probanden, dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung



**Abbildung 14:** Expression der N-terminalen Hälfte von ABCB1 in CD4+-, CD8+-, CD19+ und CD56+ Lymphozyten bezogen auf den ABCB1-Polymorphismus C3435T in Exon 26 (normalisiert). Werte von 45 Probanden, dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

Beim Betrachten der Ergebnisse nach Normalisierung lässt sich kein eindeutiger Trend im Hinblick auf die Auswirkung unterschiedlicher genetischer Konstellationen auf die Menge an exprimierter mRNA mehr ausmachen. Dies bestätigt sich bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse. Die vermeintlichen Unterschiede in der Expression als Ursache eines genetischen Polymorphismus sind, wie schon in absoluten Zahlen, auch nach Normalisierung weder für die C- noch für die N-terminale Hälfte statistisch signifikant (p-Werte > 0,05, nach Kruskal-Wallis Test). Ein eindeutiger Einfluss auf die Aktivität des Medikamententransporters in CD4+-, CD8+-, CD19+- und CD56+-Lymphozyten durch die von uns untersuchten Polymorphismen lässt sich also auf mRNA-Ebene nicht nachweisen.

## **5. Diskussion**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines quantitativen Real-Time-PCR-Versuchsaufbaus die Aktivität von ABCB1 auf mRNA-Niveau untersucht. Dies geschah an 4 Zelllinien der peripheren lymphatischen Reihe, nämlich CD4+-T-Helferzellen, CD8+-zytotoxischen T-Zellen, CD19+-B-Lymphozyten und CD56+-natürlichen Killerzellen, die aus dem Blut gesunder Probanden isoliert worden waren. Diese Zellen zeichnen sich durch eine bereits in der wissenschaftlichen Literatur dokumentierte, messbare Expression von MDR1 aus (22, 23) und sind außerdem leicht verfügbar. Die Sortierung der Zellen erfolgte mit Hilfe eines FACS-Zellsortierers. Die Reinheit der sortierten Zellen wurde stichprobenartig überprüft und lag für alle Zellfraktionen bei > 95%. Die Verlässlichkeit der Schmelzkurvenanalyse als Mittel zur Genotypisierung der hier untersuchten Polymorphismen wurde durch Bestätigung der Ergebnisse in einer herkömmlichen PCR-Reaktion mit RFLP-Analyse und Auftrennung über Gelelektrophorese stellvertretend für einen Polymorphismus nachgewiesen, die Übereinstimmung lag hier bei 100%. Die Quantifizierung der mRNA gelang durch einen quantitativen Real-Time-PCR-Versuchsaufbau mit Hilfe von Kalibrierungskurven aus Standardverdünnungsreihen. Als interner Standard für die Quantifizierung der mRNA wurde das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Mikroglobulin verwendet. Die Normalisierung der Ergebnisse mit Hilfe der Expression eines Housekeeping-Gens erlaubt eine Standardisierung des gemessenen Signals und damit einen Ausgleich von Messfehlern. Die Studienteilnehmer wurden so ausgewählt, dass die drei Genotypen der beiden untersuchten Polymorphismen in einer ebenbürtigen Gruppenstärke vertreten waren. Für den Polymorphismus C3435T konnte das in beinahe idealer Weise (13 x C/C, 15 x C/T und 17 x T/T) erreicht werden. Im Falle des Polymorphismus G2677T war aufgrund des relativ seltenen Vorkommens des T/T-Genotyps die Ausgangslage nicht ganz so günstig (21 x G/G, 16 x G/T, 7 x T/T). Die Ergebnisse unserer Untersuchungen wurden 2003 im European Journal of Clinical Investigation publiziert (39).

### **5.1. Quantifizierung der ABCB1-mRNA in CD4+-, CD8+-, CD19+- und CD 56+- Lymphozyten**

Der Medikamententransporter kommt in einer Reihe von Stammzellen des hämatopoetischen Systems und in einigen peripheren Blutzellen vor, unter anderem in den vier hier untersuchten Lymphozytenreihen. Für CD56+- und CD8+-Lymphozyten wird eine Rolle von P-Gp in der zellvermittelten Zytotoxizität diskutiert (24, 25), bei CD4+-T-Helferzellen scheint der Transporter für den Transport von Zytokinen verantwortlich zu sein (26, 27). Eine frühe Studie

zum Vorkommen von P-Gp in peripheren Lymphozyten von Chaudhary et al. 1991 konnte eine Aktivität des Medikamententransporters in CD56+-, CD8+-, CD20+- und zu einem geringeren Ausmaß in CD4+-Lymphozyten durch Nachweis eines Effluxes des fluoreszierenden Farbstoffes DiOC<sub>2</sub> aus diesen Zellen feststellen (22). Ebenso konnten Drach et al. 1993 einen signifikanten Rhodaminefflux als Beleg einer Aktivität von P-Gp in den vier von uns untersuchten Zelllinien nachweisen (23). Eine verlässliche Quantifizierung der Aktivität war jedoch durch den Versuchsaufbau in beiden Studien nicht möglich. Diese fand durch Ludescher et al. 1998 durch Messung des Rhodamineffluxes der einzelnen untersuchten Zelltypen statt und zeigte eine abnehmende P-Gp-Aktivität in der Reihenfolge CD56+-Lymphozyten > CD8+-Zellen > CD4+-Zellen > CD19+-Zellen. In Monozyten und Granulozyten fand sich so gut wie keine P-Gp-Aktivität (40). Diese Ergebnisse werden unterstützt von einer weiteren Untersuchung zum Nachweis des Medikamententransporters, die Ford 2003 mit Hilfe eines Immunfluoreszenz-Versuchsaufbaus mit fluoreszierenden P-Gp-Antikörpern durchführte. Auch hier zeigt sich eine abnehmende Konzentration von P-Gp in den Zellen CD56+ > CD8+ > CD4+ (41).

In Übereinstimmung mit den Resultaten dieser beiden Studien, in denen die P-Gp-Aktivität gemessen wurde, konnten im Rahmen unserer Arbeit die größten Mengen an ABCB1-mRNA in CD56+-Zellen nachgewiesen werden, gefolgt von CD8+- und CD4+-Lymphozyten. CD19+-Lymphozyten weisen innerhalb der untersuchten Zelllinien die geringste Expression an P-Gp auf. Die gemessenen Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Zellfraktionen waren außer zwischen CD4+- und CD19+-Zellen statistisch signifikant. Die von uns in den vier Lymphozytenzelllinien festgestellten Unterschiede in der P-Gp-Expression korrelieren demnach sehr gut mit den Unterschieden, die andere Autoren bezüglich der P-Gp-Aktivität gefunden haben.

## **5.2. Auswirkung der untersuchten Polymorphismen auf die Expression von ABCB1**

Während die Mutation G2677T/A eine Änderung der Aminosäuresequenz von Alanin zu Serin bzw. zu Threonin zur Folge hat, stellt der Polymorphismus C3435T eine stille (nicht-kodierende) Mutation dar, da er sich an einer Wobble-Position befindet (34). Es gibt Hinweise, dass diese stille Mutation zwar zur Bildung eines Proteins mit der gleichen Aminosäuresequenz wie der Wildtyp, aber mit unterschiedlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften führen könnte (42). Zur Auswirkung dieser veränderten genetischen Konstellationen auf die Aktivität des Medikamententransporters und die Entwicklung von MDR gibt es eine Vielzahl klinischer und experimenteller Studien, die jedoch zu keinem eindeutigen Resultat kommen. Die überwiegende

Mehrheit dieser Studien widmet sich dem Polymorphismus C3435T. Diese Studien gilt es im Hinblick auf ihre Ergebnisse nach folgenden Kriterien zu unterscheiden:

Haben die untersuchten genetischen Varianten Einfluss auf die Expression von P-Gp? Verändern sie die Aktivität und Funktion des Genprodukts in Bezug auf seine Substrate? Ergeben sich daraus möglicherweise therapeutische Konsequenzen?

### 5.2.1. Veränderung in der Expression von P-Gp

In einer Studie von Hoffmeyer et al. aus dem Jahr 2000 an 21 weißen Probanden konnte erstmals durch quantitative Immunhistochemie eine signifikante Korrelation der Mutation im Exon 26 (C3435T) mit erniedrigter ABCB1-mRNA-Expression in duodenalen Enterozyten gezeigt werden. Dabei wiesen Träger der homozygoten Mutation T/T signifikant niedrigere ABCB1-mRNA-Mengen auf als C/T- und insbesondere C/C-Merkmalsträger. Analog dazu fand sich eine signifikant niedrigere Aktivität von P-Gp in vivo, gemessen an höheren Plasmadigoxinspiegeln nach oraler Gabe der Substanz als bei Trägern des Wildtyps C/C (34). In einer von Fellay et al. an 59 weißen HIV-infizierten Patienten durchgeführte Studie wies bei der Quantifizierung der ABCB1-mRNA analog zu unserem Versuchsaufbau in PBMC die Gruppe T/T eine geringere ABCB1-Expression auf als C/C-Träger. Eine Normalisierung fand mit dem Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin statt. Paradoxe Weise hatten Probanden mit dem T3435T-Genotyp signifikant niedrigere Nelfinavir-Plasmaspiegel als homozygote Träger des Wildtyps (43). Eine Ursache hierfür mag eine kompensatorische Überexpression anderer Medikamententransporter mit Affinität zu antiretroviralen Medikamenten sein oder das im Vergleich zum Plasmavolumen sehr hohe Verteilungsvolumen von Nelfinavir.

Für CD56<sup>+</sup>-Zellen, die Zelllinie der lymphatischen Reihe mit der höchsten P-Gp Aktivität, konnte in einer Untersuchung von Hitzl et al. an 31 gesunden weißen Probanden zwar ein erniedrigter Rhodaminefflux in Individuen mit dem T/T-Genotyp an Position 3435 im Vergleich zu Trägern des Wildtyps C/C nachgewiesen werden. Eine quantitative Bestimmung der ABCB1-mRNA durch eine wie in unserem Versuchsaufbau eingesetzte RT-PCR erbrachte in diesem Zusammenhang erwartungsgemäß die niedrigste mRNA-Konzentration bei T/T-Trägern, gefolgt von C/T-Individuen und der höchsten mRNA-Konzentration bei C/C-Trägern. Nach Normalisierung der Werte mit dem Housekeeping-Gen Cyclophilin waren diese Unterschiede in der mRNA-Konzentration zwischen den verschiedenen Genotypen jedoch nicht mehr statistisch signifikant (44). Calado et al. konnten in einer Studie an CD34<sup>+</sup>-hämatopoetischen Stammzellen von 33 gesunden Knochenmarksspendern keine signifikanten Unterschiede im gemessenen

Rhodamineefflux bei Trägern der verschiedenen Genotypen für die Polymorphismus C3435T und G2677T ausmachen (45).

Dies deckt sich mit den Ergebnissen unserer Studie, die keinen Hinweis für eine signifikante Auswirkung der untersuchten Mutation auf die Konzentration der ABCB1-mRNA zeigen konnte. In unserer Untersuchung wiesen homozygote Träger der Mutation in beiden Polymorphismen (T2677T bzw. T3435T) zwar im Mittel die geringste Menge an ABCB1-C-terminale Hälfte-mRNA in CD56+-und CD8+-Lymphozyten auf, nach Normalisierung der Daten mit dem Housekeeping-Gen  $\beta$ -Mikroglobulin war dieser Trend jedoch nicht mehr zu erkennen. Auch eine statistische Überprüfung der Ergebnisse zeigte keine signifikante Auswirkung der untersuchten genetischen Polymorphismen im ABCB1-Gen auf die Menge an ABCB1-mRNA in allen vier Zelllinien. Die Zahl der gemessenen Kopien des Housekeeping-Gens sollte etwa auf gleichem Niveau mit der Kopienzahl des Zielgens liegen, damit eine verlässliche Quantifizierung gewährleistet ist. Dies könnte eine Schwachstelle des von uns gewählten Gens darstellen, da für  $\beta$ -Mikroglobulin deutliche höhere Kopienzahlen ermittelt wurden als für das Zielgen ABCB1. Für das Erzielen des Signifikanzniveaus erschwerend ist außerdem die sehr breite Streuung aller gemessenen mRNA-Konzentrationen um den Mittelwert, die sich in einer hohen Standardabweichung niederschlägt.

Erwähnenswert ist die Unterschiedlichkeit der Ergebnisse in Bezug auf die ethnische Herkunft des Probandenkollektivs. Nakamura et al. konnten - im Widerspruch zu der oben erwähnten Studie von Hoffmeyer et al. an weißen Probanden - in duodenalen Enterozyten von gesunden japanischen Probanden höhere ABCB1-mRNA Mengen bei homozygoten Mutationsträgern T3435T als bei Individuen mit dem C/T oder C/C-Genotyp messen. In dieser Studie wurde analog zu unserer Untersuchung ein RT-PCR-Ansatz eingesetzt, eine Normalisierung der Werte erfolgte durch das Housekeeping-Gen Villin (46). Sakaeda et al. wiesen bei 15 japanischen Probanden die höchste Aktivität von P-Gp in vivo (niedrigere Digoxin-Plasmaspiegel nach oraler Gabe von 0,25 mg der Substanz) bei Trägern des mutierten Allels 3435T nach (47).

### 5.2.2. Einfluss auf die Funktion von P-Gp bzw. die Bioverfügbarkeit von Substraten

Zwar wurde in der bereits erwähnten ersten systematischen Studie von Hoffmeyer et al. eine Assoziation zwischen homozygoten Trägern der Mutation T3435T und erhöhten Digoxinplasmaspiegeln ermittelt (34), in folgenden Studien konnte dieser Zusammenhang jedoch zumindest für die P-Gp-Substrate Digoxin und Ciclosporin nicht überzeugend belegt

werden. Bereits 2002 konnte von Gerloff et al. in einer Studie an 50 gesunden, weißen Probanden kein Hinweis für einen Einfluß des Polymorphismus C3435T auf die Absorption von 1 mg Digoxin gefunden werden. Diese mangelnde Assoziation sei jedoch womöglich der erschöpften Transportkapazität von P-Gp geschuldet, also einer zu hohen Digoxindosis (48). In einer Metaanalyse von Chowbay et al. aus dem Jahr 2005, die Daten von 13 Studien an weißen und japanischen Probanden auswertete, ließ sich in einer Subgruppenanalyse bei weißen Probanden für den C3435T-Polymorphismus zwar eine niedrigere Bioverfügbarkeit oral verabreichten Digoxins bei Trägern des Wildtyps C/C als bei Mutationsträgern nachweisen, im Literaturvergleich zeigte sich jedoch keine Auswirkung des Polymorphismus auf die intestinale Expression von ABCB1-mRNA (49). Zwischen der Mutation C3435T und pharmakokinetischen Parametern von Ciclosporin konnte in einer Studie von Min et al. an 14 gesunden Probanden kein Zusammenhang festgestellt werden. Weder in den Medikamentenspitzenkonzentrationen noch in der AUC zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Genotypen (50). In einer Studie von Ahsen et al. an 124 weißen nierentransplantierten Patienten waren für Merkmalsträger der unterschiedlichen Polymorphismen keine unterschiedlichen Medikamentendosen zum Erhalt des gleichen Talspiegels notwendig, was für eine in etwa gleich stark ausgeprägte Aktivität des Medikamententransporters spricht (51).

### 5.2.3. Einfluss auf den Therapieerfolg

Aufgrund des Vorkommens des Medikamententransporters in vielen unterschiedlichen, sowohl gesunden als auch maligne entarteten Geweben, stellt sich die Frage, ob Polymorphismen von P-Gp nicht nur zu unterschiedlichen Konzentrationen einer Substanz im Plasma, sondern auch zu unterschiedlichen Konzentrationen eines Medikaments an seinem Wirkort führen könnten. Ähnlich wie in der HIV-Therapie könnte die Aktivität von P-Gp in der Membran von Lymphozyten eine Rolle beim Behandlungserfolg von lymphatischen Erkrankungen spielen. Jedoch macht auch hier eine uneinheitliche Datenlage eine konkrete Aussage schwierig.

In der bereits erwähnten Studie von Fellay et al. an 123 weißen HIV-infizierten Patienten zeigte sich bei homozygoten Mutationsträgern T3435T, der Gruppe mit der geringsten ABCB1-mRNA-Expression, ein besseres klinisches Ansprechen auf antiretrovirale Behandlung, gemessen an einem markanteren CD4+-Zellanstieg innerhalb von 6 Monaten nach Therapiebeginn (T/T>C/T>C/C) (42). Eine Studie von Verstuyft et al. zur Auswirkung der Polymorphismen G2677T/A und C3435T auf das klinische Ansprechen einer hochaktiven antiviralen Therapie (HAART) an 139 HIV-infizierten Probanden konnte jedoch keinen Unterschied in Bezug auf

den CD4+-Zellanstieg oder den Abfall der HIV-Viruslast feststellen. Auch fand sich kein Unterschied in Bezug auf die Pharmakokinetik von Indinavir, gemessen an Spitzen- und Talspiegeln der Substanz nach 8-wöchiger Therapie (52). Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen ABCB1-Genotypen und verbessertem klinischem Outcome bei mutierten Merkmalsträgern lieferte eine Untersuchung von Illmer et al. zur Auswirkung der beiden in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen in Exon 21 und 26 auf den Therapieerfolg bei 405 Therapie-naiven AML-Patienten. Dort zeigten homozygote Wildtypträger (G/G, C/C) die niedrigste ABCB1-mRNA-Expression, gemessen mit einem RT-PCR-Ansatz, sowie eine reduzierte Überlebensrate und eine höhere Rate an Rezidiven (53). Im Gegensatz dazu konnten Jamroziak et. al. im Falle der B-CLL bei 22 unbehandelten weißen Patienten für den Genotyp C3435C eine höhere P-Gp Aktivität als für die Genotypen C/T und T/T nachweisen. Die Autoren ermittelten für die Träger der Mutation ein erhöhtes Risiko, eine B-CLL zu entwickeln (54). In einer Studie an 150 über 60-jährigen AML-Patienten konnten van der Holt et al. keinen Nachweis einer signifikanten Assoziation der Polymorphismen G2677T und C3435 mit einer veränderten ABCB1-mRNA-Expression in AML-Blasten und CD34+-Zellen oder klinischen Parametern wie kompletter Remission und Überlebensrate feststellen (55).

Ähnlich uneinheitlich ist das Bild bei den psychotropen Substanzen. P-Gp ist auch an der luminalen Seite der Endothelzellen der Hirnkapillaren lokalisiert und trägt damit zur Bildung der Blut-Hirn-Schranke bei, indem es seine Substrate direkt zurück in das Blut transportiert. Es hält daher die Penetration in das Gehirn niedrig und ist einer der Faktoren, die für das schlechte Ansprechen von Antidepressiva in der Behandlung der Depression verantwortlich gemacht werden. Dies wurde in einer Studie von Uhr et al. an ABCB1 knockout-Mäusen verdeutlicht. Es konnten bei den knockout-Mäusen nach subkutaner Injektion höhere zerebrale Konzentrationen von Substanzen, die P-Gp-Substrate sind (Citalopram, Paroxetin, Amitriptylin, Venlafaxin) nachgewiesen werden als bei den Wildtyp-Mäusen. Für Mirtazapin, das kein Substrat von P-Gp ist, fand sich hingegen kein Unterschied. Die Autoren wiesen außerdem für eine Reihe der untersuchten Polymorphismen eine Assoziation mit klinischem Ansprechen im Sinne einer Remission nach. Besonders eindrücklich zeigte sich dies im Falle der Polymorphismen rs2032583 (C2685+49T) und rs2235015 (G287-25T). Patienten mit dem seltenen C-Allel in rs2032583 oder dem T-Allel in rs2235015 hatten unter Behandlung mit P-Gp-Substraten eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit, eine Remission zu erlangen, als Träger von 2 Kopien des anderen Allels (T/T im SNP rs2032583, G/G im SNP rs2235015). Für die von uns untersuchten Polymorphismen C3435T und G2677T/A war dieser Nachweis jedoch nicht zu führen (keine signifikant unterschiedlichen mRNA-Mengen, kein unterschiedliches Therapieansprechen). Die

Autoren schlußfolgerten daraus, dass diese Ergebnisse einen Schritt in Richtung einer individualisierten antidepressiven Behandlung darstellten (17). In einer aktuellen Pilotstudie, die diese Einschätzung umsetzte, konnte gezeigt werden, dass sich durch ein diagnostisches Genotypisieren ein besseres Behandlungsergebnis erzielen ließ: Bei den genotypisierten Patienten fand sich eine höhere Remissionsrate bei Entlassung als in der Kontrollgruppe. Patienten mit dem T/T- und dem G/G- Genotyp profitierten von einer Dosissteigerung der P-Gp-Substrate. Ihre Krankenhausaufenthalte verkürzten sich (56).

Für den von uns untersuchten Polymorphismus C3435T wurde 2012 in einer Studie mit dem Antidepressivum Escitalopram an 107 kaukasischen und asiatischen Patienten gezeigt, dass zum Erreichen einer Remission bei T/T-Trägern eine geringere Medikamentendosis als bei C/T- und C/C-Trägern notwendig war (57). Für eine Therapie mit antiepileptischen Medikamenten scheint dies jedoch nicht zu gelten: In einer Metaanalyse von 23 Studien aus dem Jahr 2010 konnte eine Assoziation der Polymorphismen C1236T, G2677T und C3435T mit klinischem Ansprechen weder in den Studien insgesamt noch in ethnischen Subgruppen nachgewiesen werden (58).

Anhand der vorliegenden Studien läßt sich keine eindeutige Aussage darüber machen, ob und in welche Richtung die beiden Polymorphismen Einfluß auf Expression und Aktivität von P-Gp ausüben. Unsere Arbeit konnte keinen Beitrag dazu leisten, diese Situation zu klären. Einige SNP im menschlichen ABCB1-Gen weisen einen hohen Grad an Verknüpfung (linkage) mit anderen Polymorphismen auf, so sind 90% der Träger des Wildtyps in Exon 26 gleichzeitig Träger des Wildtyps in Exon 21 (38). Es ist somit vorstellbar, dass selbst eine stille Mutation wie die von uns untersuchte Auswirkungen auf die Proteinbiosynthese hat, da sie die Aktivität eines anderen, ggf. bisher unbekanntem Polymorphismus reflektiert. Daher sind möglicherweise Haplotyp-basierte Ansätze, also Betrachtungen von zwei oder mehreren Polymorphismen auf einem Allel eher in der Lage, die Ausprägung eines anderen Phänotyps vorherzusagen. Auch hier ist ein Vergleich zwischen unterschiedlichen Ethnien nur sehr eingeschränkt möglich, da - wie schon im Falle der einzelnen SNP - auch deren Kombination ethnisch unterschiedlich häufig exprimiert wird.

### **5.3. Rolle des alternativen Medikamententransporters Mini-P-Gp**

Kawai et al. konnten neben dem klassischen Genprodukt von ABCB1, dem Medikamententransporter P-Gp mit einem Molekulargewicht von 170 kDa, in einer Reihe von Zellen mit Multipler Wirkstoffresistenz einen Transporter mit einem geringeren

Molekulargewicht von 65 kDa identifizieren, der mutmaßlich durch einen alternativen Spleißvorgang an der ABCB1-mRNA entsteht. Dieses als Mini-P-Gp bezeichnete Protein ist im Gegensatz zum herkömmlichen P-Gp nicht N-glykosyliert und phosphoryliert (59). In einer Studie von Trambas et al. kamen die Autoren zu dem Schluß, dass Mini-P-Gp, und nicht der lange Medikamententransporter, in humanen CD56+-natürlichen Killerzellen exprimiert wird. In der Western-Blot-Analyse exprimierten die untersuchten Zellen Proteine mit einem Molekulargewicht von ungefähr 70 und 80 kDa. Das bisher bekannte 170 kDa schwere P-Gp ließ sich jedoch nicht detektieren (12). Ma et al. konnten nach Transfektion von cDNA, die die Sequenz des Hamster pgp1-Gens enthielt, zwei Transkripte in Hamsterlungenzellen nachweisen, nämlich die 4,3kb-mRNA des langen P-Gp und eine kleinere 2,3kb-mRNA-Sequenz, die durch eine Spleißvariante am Gen entsteht. Dieses Transkript kodiert ein 57 kDa schweres Protein, das die Transmembrandomänen 9-12 und die ATP-bindende C-terminale Hälfte von P-Gp enthält (11). Es ist also davon auszugehen, dass nur der lange Transporter N-terminale Glykosylierungsstellen enthält, während beide Proteine die C-terminale Hälfte von P-Gp beinhalten. Zur Unterscheidung der mRNA der beiden Transporter wurden daher in unserer Studie unterschiedliche Primerpaare verwendet. Die Primer zur Amplifizierung der C-terminalen Hälfte führten zu einer Abbildung der Expression beider Transporter, des Mini- und des vollständigen P-Gp. Die Primer zur Amplifizierung der N-terminalen Hälfte bestimmten dagegen nur die mRNA des langen P-Gp.

In allen untersuchten Zellreihen zeigte sich für die ABCB1-N-terminale Hälfte eine etwa halb so hohe Transkriptanzahl wie für die ABCB1-C-terminale Hälfte. Der gemessene Unterschied war statistisch signifikant. Dieses Ergebnis könnte man als einen indirekten Beleg für die Existenz des Mini-P-Gp deuten und postulieren, dass unsere Zellen etwa eine gleich große Zahl von Kopien von Mini-P-Gp und P-Gp gebildet haben. Beweisen kann dieser Befund das Vorhandensein des Mini-P-Gp in den untersuchten Lymphozytenlinien jedoch nicht, denn er muss aus Gründen, die in der Methode liegen, relativiert werden. Eine allgemein geforderte Voraussetzung an eine RT-PCR ist die Verwendung eines kurzen Genprodukts (50 bis 150 bp), da für kürzere PCR-Produkte die Effizienz der Methode höher ist als für größere DNA-Abschnitte. Das PCR-Produkt umfasst in unserem Falle bei der Abbildung der N-terminalen Hälfte eine Sequenz von 201 Basenpaaren, bei der C-terminalen Hälfte dagegen ist es mit 168 Basenpaaren deutlich kleiner. Es kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass der von uns gemessene Unterschied in der Expression von N-terminaler und C-terminaler ABCB1-mRNA ein methodischer Artefakt ist.

Es kann als gesichert gelten, dass in den von uns untersuchten Zellreihen sowohl C- als auch N-terminale Hälfte des Medikamententransporters P-Gp auf mRNA-Niveau exprimiert werden. Vor dem Hintergrund unserer Ergebnisse ist es daher sehr unwahrscheinlich, dass nur Mini-P-Gp in CD56+-natürlichen Killerzellen exprimiert wird, wie von Trambas et al. vermutet. Die Autoren dieser Studie vermuteten als Ursache für die Entstehung von Mini-P-Gp einen alternativen Spleißvorgang an der ABCB1-mRNA. Auch wird diskutiert, ob Mini-P-Gp vielleicht durch andere Gene mit hoher struktureller Homologie zur C-terminalen Hälfte von ABCB1 kodiert wird (12). Inwieweit die statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen den beiden Hälften wirklich für das Vorhandensein eines Mini-Transporters sprechen, bleibt somit unklar. Auch in der wissenschaftlichen Literatur der letzten Jahre ließ sich kein Beleg dafür finden. Überdies gibt es bisher keine molekulare Analyse, die dieses Phänomen und seine Ursachen erklären könnte (60).

## **6. Zusammenfassung**

P-Glykoprotein (P-Gp) ist ein membranständiges Protein, das unter ATP-Verbrauch als Efflux-Transporter die intrazelluläre Konzentration seines Substrats vermindert. Seine physiologische Funktion liegt im Schutz der Zelle vor schädigenden Substanzen sowie der Elimination endogener Stoffwechselprodukte. P-Gp spielt eine wichtige Rolle in der zellvermittelten Immunität sowie bei der Multiplen Wirkstoffresistenz und ist von zentraler Bedeutung für die Pharmakokinetik zahlreicher therapeutisch wichtiger Wirkstoffe. Beim Menschen wird P-Gp durch das ABCB1-Gen kodiert. Für dieses Gen ließ sich eine Reihe von genetischen Polymorphismen identifizieren, denen eine Auswirkung auf die Expression von ABCB1 und somit auf die Aktivität von P-Gp zugeschrieben wird. Untersuchungen zu dieser Frage kommen zu teilweise konträren Ergebnissen. Im Rahmen einiger Studien findet ein kleinerer Medikamententransporter Mini-P-Gp Erwähnung, der mutmaßlich durch einen alternativen Spleißvorgang an der ABCB1-RNA entsteht.

Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob sich die Expression von P-Gp, abgebildet in ABCB1-mRNA-Mengen, in vier Zelllinien der peripheren lymphatischen Blutreihe (CD4+-, CD8+-, CD56+- und CD 19+-Lymphozyten) unterscheidet. Außerdem sollte geklärt werden, ob die Höhe der P-Gp-Expression mit dem Vorhandensein bestimmter Genotypen zweier häufiger genetischer Polymorphismen im ABCB1-Gen (G2677T/A und C3435T) assoziiert ist. Durch die Auswahl spezifischer Primer zur Vervielfältigung der N- bzw. C-terminalen Hälfte des ABCB1-Gens erfolgte die Überprüfung der Existenz von Mini-P-Gp. Die Trennung der von uns untersuchten Zelllinien geschah durch FACS-Zellsortierung nach Färbung mit immunfluoreszierenden Antikörpern. Mit Hilfe eines quantitativen RT-PCR-Versuchsaufbaus wurde die ABCB1-mRNA gemessen. Zur Normalisierung der gemessenen Konzentrationen diente die gleichzeitige Quantifizierung eines Housekeeping-Gens.

Die Ergebnisse unserer Studie wiesen die höchste ABCB1-mRNA-Menge in CD 56+-, gefolgt von CD8+-, CD4+- und CD 19+-Lymphozyten nach. Dies steht in Einklang mit früheren Studien zur Aktivität des Medikamententransporters in den untersuchten Zelllinien und unterstreicht die physiologische Rolle von P-Gp in der zellvermittelten zytotoxischen Immunität. Bei der Überprüfung der Auswirkung der genetischen Polymorphismen auf die Expression von P-Gp wiesen homozygote Mutationsträger zwar im Mittel die geringste Menge an ABCB1-mRNA in CD56+- und CD8+-Zellen auf, dieser Trend war nach Normalisierung jedoch nicht mehr

nachweisbar. Eine statistische Überprüfung der Daten zeigte keine signifikante Auswirkung auf die Anzahl der ABCB1-mRNA-Kopien in allen Zellpopulationen. Die Frage nach der Existenz eines Mini-P-Gp konnte nicht geklärt werden. Zwar wurde in allen Zellen eine etwa halb so hohe Transkriptzahl für die N-terminale Hälfte wie für die C-terminale Hälfte gemessen, was als Indiz für die Existenz des kleineren Transporterproteins gewertet werden kann. Doch darf dabei nicht außer Acht gelassen werden, dass die Effizienz der PCR für die N-terminale Hälfte schlechter als für die C-terminale Hälfte ist. Außerdem gibt es bisher keine molekularen Analysen, die das Phänomen Mini-P-Gp erklären könnten.

## Literaturverzeichnis

- 1) **Gillet JP, Gottesman MM:** Mechanisms of multidrug resistance in cancer, *Methods Mol Biol.* 2010;596: S. 47-76.
  
- 2) **Juliano RL, Ling V:** A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, *Biochim Biophys Acta.* 1976 Nov 11;455(1): S. 152-62.
  
- 3) **Gottesman MM, Pastan I:** Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter, *Annu Rev Biochem.* 1993;62: S. 385-427.
  
- 4) **Nagy H, Goda K, Arceci R, Cianfriglia M, Mechetner E, Szabo G Jr:** P-Glycoprotein conformational changes detected by antibody competition, *Eur J Biochem.* 2001 Apr;268(8): S. 2416-20.
  
- 5) **Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, Shen DW, Gottesman MM, Pastan I:** Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jun;83(12): S. 4538-42.
  
- 6) **Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM:** Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999;39: S. 361-98.
  
- 7) **Chen CJ, Clark D, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB:** Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins, *J Biol Chem.* 1990 Jan 5;265(1): S. 506-14.
  
- 8) **Hrycyna CA:** Molecular genetic analysis and biochemical characterization of mammalian P-glycoproteins involved in multidrug resistance, *Semin Cell Dev Biol.* 2001 Jun;12(3): S. 247-56.
  
- 9) **Lodish H, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J:** *Molecular Cell Biology*, 4th edition, W. H. Freeman New York 2000 (Onlinezugriff am 22.04.2014: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mcb.figgrp.4086>)

- 10) Cascorbi I, Haenisch S:** Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters and clinical implications, *Methods Mol Biol.* 2010;596: S. 95-121.
- 11) Ma JF, Grant G, Staelens B, Howard DL, Melera PW:** In vitro translation of a 2.3-kb splicing variant of the hamster *pgp1* gene whose presence in transfectants is associated with decreased drug resistance, *Cancer Chemother Pharmacol* (1999) 43: S. 19-28
- 12) Trambas C, Wang Z, Cianfriglia M, Woods G:** Evidence that natural killer cells express mini P-glycoproteins but not classic 170 kDa P-glycoprotein, *Br J Haematol.* 2001 Jul;114(1): S. 177-84.
- 13) Estudante M, Morais JG, Soveral G, Benet LZ:** Intestinal drug transporters: An overview, *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 Oct 4. pii: S0169-409X(12)00303-1.
- 14) Cascorbi I:** Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs, *Pharmacol Ther.* 2006 Nov;112(2): S. 457-73.
- 15) Chandler B, Almond L, Ford J, Owen A, Hoggard P, Khoo S, Back D:** The effects of protease inhibitors and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors on p-glycoprotein expression in peripheral blood mononuclear cells in vitro, *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003 Aug 15;33(5): S. 551-6.
- 16) Cianfriglia M, Dupuis ML, Molinari A, Verdoliva A, Costi R, Galluzzo CM, Andreotti M, Cara A, Di Santo R, Palmisano L:** HIV-1 integrase inhibitors are substrates for the multidrug transporter MDR1-P-glycoprotein, *Retrovirology.* 2007 Mar 7;4:17.
- 17) Uhr M, Tontsch A, Namendorf C, Ripke S, Lucae S, Ising M, Dose T, Ebinger M, Rosenhagen M, Kohli M, Kloiber S, Salyakina D, Bettecken T, Specht M, Pütz B, Binder EB, Müller-Myhsok B, Holsboer F:** Polymorphisms in the drug transporter gene *ABCB1* predict antidepressant treatment response in depression, *Neuron.* 2008 Jan 24;57(2): S. 203-9.
- 18) Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ, van der Valk MA, Voordouw AC, Spits H, van Tellingen O, Zijlmans JM, Fibbe WE, Borst P:** Normal

viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 15;94(8): S. 4028-33.

**19) Fardel O, Lecureur V, Guillouzo A:** The P-glycoprotein multidrug transporter, *Gen Pharmacol*. 1996 Dec;27(8): S. 1283-91.

**20) Fung KL, Gottesman MM:** A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function, *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009: S. 860–871

**21) Chaudhary PM, Roninson IB:** Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells, *Cell*. 1991 Jul 12;66(1): S. 85-94.

**22) Chaudhary PM, Mechetner EB, Roninson IB:** Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes, *Blood*. 1992 Dec 1;80(11): S. 2735-9.

**23) Drach D, Zhao S, Drach J, Mahadevia R, Gattringer C, Huber H, Andreeff M:** Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype, *Blood*. 1993 Jun 15;81(12): S. 3480-1.

**24) Gupta S, Kim CH, Tsuruo T, Gollapudi S:** Preferential expression and activity of multidrug resistance gene 1 product (P-glycoprotein), a functionally active efflux pump, in human CD8+ T cells: a role in cytotoxic effector function, *J Clin Immunol*. 1992 Nov;12(6): S. 451-8.

**25) Klimecki WT, Taylor CW, Dalton WS:** Inhibition of cell-mediated cytotoxicity and P-glycoprotein function in natural killer cells by verapamil isomers and cyclosporine A analogs, *J Clin Immunol*. 1995 May;15(3): S. 152-8.

**26) Drach J, Gsur A, Hamilton G, Zhao S, Angerler J, Fiegl M, Zojer N, Raderer M, Haberl I, Andreeff M, Huber H:** Involvement of P-glycoprotein in the transmembrane transport of interleukin-2 (IL-2), IL-4, and interferon-gamma in normal human T lymphocytes, *Blood*. 1996 Sep 1;88(5): S. 1747-54.

- 27) Raghu G, Park SW, Roninson IB, Mechetner EB:** Monoclonal antibodies against P-glycoprotein, an MDR1 gene product, inhibit interleukin-2 release from PHA-activated lymphocytes, *Exp Hematol.* 1996 Aug;24(10): S. 1258-64.
- 28) Bazzoli C, Jullien V, Le Tiec C, Rey E, Mentré F, Taburet AM:** Intracellular pharmacokinetics of antiretroviral drugs in HIV-infected patients, and their correlation with drug action, *Clin Pharmacokinet.* 2010;49(1): S. 17-45.
- 29) Valentin A, Morrow M, Poirier RH, Aleman K, Little R, Yarchoan R, Pavlakis GN:** Identification of a potential pharmacological sanctuary for HIV type 1 in a fraction of CD4(+) primary cells, *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2010 Jan;26(1): S. 79-88.
- 30) Lee CG, Ramachandra M, Jeang KT, Martin MA, Pastan I, Gottesman MM:** Effect of ABC transporters on HIV-1 infection: inhibition of virus production by the MDR1 transporter, *FASEB J.* 2000 Mar;14(3): S. 516-22.
- 31) Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I:** Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Jan;84(1): S. 265-9.
- 32) Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM:** P-glycoprotein: from genomics to mechanism, *Oncogene* 2003 Oct 20;22(47): S. 7468-85.
- 33) Drain S, Catherwood MA, Alexander HD:** Multidrug resistance in the chronic lymphoproliferative disorders, *Leuk Lymphoma.* 2010 Oct;51(10): S. 1793-804.
- 34) Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmüller J, Johne A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U:** Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28;97(7): S. 3473-8.
- 35) Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I:** Frequency of single nucleotide polymorphisms in the

P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects, *Clin Pharmacol Ther.* 2001 Mar;69(3): S. 169-74.

**36) Maeda K, Sugiyama Y:** Impact of genetic polymorphisms of transporters on the pharmacokinetic, pharmacodynamic and toxicological properties of anionic drugs, *Drug Metab Pharmacokinet.* 2008;23(4): S. 223-35.

**37) Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger UM, Schwab M:** Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people, *Lancet.* 2001 Aug 4;358(9279): S. 383-4.

**38) Zheng H, Webber S, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Lamba J, Bowman P, Burckart GJ:** The MDR1 polymorphisms at exons 21 and 26 predict steroid weaning in pediatric heart transplant patients, *Hum Immunol.* 2002 Sep;63(9): S. 765-70.

**39) Oselin K, Nowakowski-Gashaw I, Mrozkiewicz PM, Wolbergs D, Pähkla R, Roots I:** Quantitative determination of MDR1 mRNA expression in peripheral blood lymphocytes: a possible role of genetic polymorphisms in the MDR1 gene, *Eur J Clin Invest.* 2003 Mar;33(3): S. 261-7.

**40) Ludescher C, Pall G, Irschick EU, Gastl G:** Differential activity of P-glycoprotein in normal blood lymphocyte subsets, *Br J Haematol.* 1998 Jun;101(4): S. 722-7.

**41) Ford J, Hoggard PG, Owen A, Khoo SH, Back DJ:** A simplified approach to determining P-glycoprotein expression in peripheral blood mononuclear cell subsets, *J Immunol Methods.* 2003 Mar 1;274(1-2): S. 129-37.

**42) Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV, Gottesman MM:** A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity, *Science.* 2007 Jan 26;315(5811): S. 525-8.

**43) Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave JP, Decosterd LA, Furrer H, Opravil M, Pantaleo G, Retelska D, Ruiz L, Schinkel AH, Vernazza P, Eap CB, Telenti A:** Swiss HIV Cohort Study: Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected

individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study, *Lancet*. 2002 Jan 5;359(9300): S. 30-6.

**44) Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schaffeler E, Fischer J, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF:** The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells, *Pharmacogenetics*. 2001 Jun;11(4): S. 293-8.

**45) Calado RT, Falcao RP, Garcia AB, Gabellini SM, Zago MA, Franco RF:** Influence of functional MDR1 gene polymorphisms on P-glycoprotein activity in CD34+ hematopoietic stem cells, *Haematologica*. 2002 Jun;87(6): S. 564-8.

**46) Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K:** Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects, *Clin Pharmacol Ther*. 2002 Apr;71(4): S. 297-303.

**47) Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, Kakumoto M, Ohmoto N, Sakai T, Morita Y, Tamura T, Aoyama N, Hirai M, Kasuga M, Okumura K:** MDR1 genotype-related pharmacokinetics of digoxin after single oral administration in healthy Japanese subjects, *Pharm Res*. 2001 Oct;18(10): S. 1400-4.

**48) Gerloff T, Schaefer M, Johne A, Oselin K, Meisel C, Cascorbi I, Roots I:** MDR1 genotypes do not influence the absorption of a single oral dose of 1 mg digoxin in healthy white males, *Br J Clin Pharmacol*. 2002 Dec;54(6): S. 610-6.

**49) Chowbay B, Li H, David M, Cheung YB, Lee EJ:** Meta-analysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 gene expression, *Br J Clin Pharmacol*. 2005 Aug;60(2): S.159-71.

**50) Min DI, Ellingrod VL:** C3435T mutation in exon 26 of the human MDR1 gene and cyclosporine pharmacokinetics in healthy subjects, *Ther Drug Monit*. 2002 Jun;24(3): S. 400-4.

**51) von Ahsen N, Richter M, Grupp C, Ringe B, Oellerich M, Armstrong VW:** No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients, *Clin Chem*. 2001 Jun;47(6): S. 1048-52.

**52) Verstuyft C, Marcellin F, Morand-Joubert L, Launay O, Brendel K, Mentré F, Peytavin G, Gérard L, Becquemont L, Aboulker JP; ANRS081 Study Group:** Absence of association between MDR1 genetic polymorphisms, indinavir pharmacokinetics and response to highly active antiretroviral therapy, *AIDS*. 2005 Dec 2;19(18): S. 2127-31.

**53) Illmer T, Schuler US, Thiede C, Schwarz UI, Kim RB, Gotthard S, Freund D, Schakel U, Ehninger G, Schaich M:** MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients, *Cancer Res*. 2002 Sep 1;62(17): S. 4955-62.

**54) Jamroziak K, Balcerczak E, Smolewski P, Robey RW, Cebula B, Panczyk M, Kowalczyk M, Szmigielska-Kapłon A, Mirowski M, Bates SE, Robak T:** MDR1 (ABCB1) gene polymorphism C3435T is associated with P-glycoprotein activity in B-cell chronic lymphocytic leukemia, *Pharmacol Rep*. 2006 Sep-Oct;58(5): S. 720-8.

**55) van der Holt B, Van den Heuvel-Eibrink MM, Van Schaik RH, van der Heiden IP, Wiemer EA, Vossebeld PJ, Löwenberg B, Sonneveld P:** ABCB1 gene polymorphisms are not associated with treatment outcome in elderly acute myeloid leukemia patients, *Clin Pharmacol Ther*. 2006 Nov;80(5): S. 427-39.

**56) Breitenstein B, Scheuer S, Pfister H, Uhr M, Lucae S, Holsboer F, Ising M, Brückl TM:** The clinical application of ABCB1 genotyping in antidepressant treatment: a pilot study, *CNS Spectr*. 2013 Jul 23: S. 1-11. [Epub ahead of print]

**57) Singh AB, Bousman CA, Ng CH, Byron K, Berk M:** ABCB1 polymorphism predicts escitalopram dose needed for remission in major depression, *Transl Psychiatry*. 2012 Nov 27;2:e198. doi: 10.1038/tp.2012.115.

- 58) Haerian BS, Lim KS, Tan CT, Raymond AA, Mohamed Z:** Association of ABCB1 gene polymorphisms and their haplotypes with response to antiepileptic drugs: a systematic review and meta-analysis, *Pharmacogenomics*. 2011 May;12(5): S. 713-25.
- 59) Kawai K, Kusano I, Ido M, Sakurai M, Shiraishi T, Yatani R:** Identification of a P-glycoprotein-related protein (mini-P-glycoprotein) which is overexpressed in multidrug resistant cells, *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Jan 28;198(2): S. 804-10.
- 60) Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ:** Characterization of the human MDR1 gene, *AAPS J*. 2005 Feb 16;7(1): S.1-5.

## Abkürzungen

AML	akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
Bp	Basenpaare
CD	Cluster of differentiation
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
(c)DNA	(copy) Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Fluorescence activated cell sorting)
FSC	forward scatter
IFN- $\gamma$	Interferon - $\gamma$
IL-2/IL-4	Interleukin 2/4
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
(k)DA	(kilo)Dalton
kb	Kilobasen
MDR	Multiple Wirkstoffresistenz (multidrug resistance)
mdr1	MDR1-Gen, ABCB1-Gen
(m)RNA	(messenger) Ribonukleinsäure
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P-Gp	P-Glykoprotein
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RT	reverse Transkriptase
SNP	single nucleotide polymorphism
SSC	sideways scatter

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Daniel Wolbergs, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Quantifizierung der ABCB1-mRNA in Lymphozytensubpopulationen: die Rolle genetischer Polymorphismen im ABCB1-Gen" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Publikationsliste**

Oselin K, Nowakowski-Gashaw I, Mrozikiewicz PM, Wolbergs D, Pähkla R, Roots I:  
Quantitative determination of MDR1 mRNA expression in peripheral blood lymphocytes: a  
possible role of genetic polymorphisms in the MDR1 gene, European Journal of Clinical  
Investigation, 2003 Mar;33(3): S. 261-7.

Hofmann F, Pierskalla M, Paul M-L, Wolbergs D, Schuster M: Erstmanifestation einer  
systemischen Mastozytose als anaphylaktoider Schock im Rahmen einer Allgemeinanästhesie,  
Anästh Intensivmed 2011, 52: S. 368

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Ivar Roots möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für seine kontinuierliche Betreuung bei der Erstellung dieser Dissertation danken.

Ich möchte Frau Dr. Gabriele Laschinski für die geduldige Betreuung und die kritische Durchsicht der Arbeit danken. Jederzeit gewährte sie mir während dieser Arbeit sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung.

Ina Lieker und Georg Reischl danke ich für die vielen konstruktiven Diskussionen, die kritische Durchsicht dieser Arbeit, ihr Motivieren und ihre emotionale Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre stete inhaltliche, mentale und emotionale Unterstützung während des gesamten Entstehungsprozesses dieser Arbeit.

Ein Dankeschön an die vielen hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeiter des Instituts für Klinische Pharmakologie der Charité Berlin für das sehr freundliche und angenehme Arbeitsklima.