

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

## **DISSERTATION**

# ***MDR1*-Polymorphismen als Suszeptibilitätsfaktor für das Harnblasenkarzinom**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von  
Bettina Bettin  
aus Dresden

Gutachter:       1. Prof. Dr. med. I. Roots  
                      2. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. I. Cascorbi  
                      3. Prof. Dr. med. R. Stahlmann

Datum der Promotion: 30. Januar 2009

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Das Harnblasenkarzinom	1
1.1.1.	Epidemiologie	1
1.1.2.	Risikofaktoren	1
1.2.	P-Glykoprotein	3
1.2.1.	Bedeutung als Transporter	3
1.2.2.	Genetische Polymorphismen des <i>MDRI</i> -Gens	4
1.3.	<i>MDRI</i> -Polymorphismen als mögliche Suszeptibilitätsfaktoren für das Harnblasenkarzinom	8
1.4.	Aufgabenstellung	10
<b>2.</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>11</b>
2.1.	Patientenkollektiv	11
2.2.	Kontrollkollektiv	11
2.3.	DNA-Extraktion von Tumorgewebe aus Paraffinschnitten	12
2.3.1.	Chemikalien und Geräte zur DNA-Extraktion	12
2.3.2.	Entparaffinisierung	12
2.3.3.	Lyse der Zellen	13
2.3.4.	Waschen und Elution der DNA	13
2.3.5.	Bestimmung der DNA-Konzentration in den Proben	14
2.4.	Genotypisierung am Lightcycler	14
2.4.1.	Aufbau und Funktion des Lightcyclers	14
2.4.2.	Chemikalien und Geräte für die Genotypisierung am Lightcycler	15
2.4.3.	Reaktionsbedingungen	16
2.4.3.1.	Bestimmung von <i>MDRI</i> Exon 21 Mutation G2677T/A	17
2.4.3.2.	Bestimmung von <i>MDRI</i> Exon 26 Mutation C3435T	23
2.5.	Statistik	26

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
3.1.	Vergleich der demographischen Daten des Patienten- und Kontrollkollektivs	27
3.2.	Häufigkeitsverteilung der <i>MDRI</i> -Genotypen/Einzel-SNP-Analyse	28
3.3.	Assoziation zwischen <i>MDRI</i> -Genotypen und demographischen Daten adjustiert für potentielle Confounder	31
3.4.	Korrelation zwischen <i>MDRI</i> -Genotypen und Tumorstadium und -differenzierung	32
3.5.	Häufigkeitsverteilung der <i>MDRI</i> -Haplotypen	33
3.6.	Daten zur Histopathologie der Fallpatienten mit Harnblasentumor	37
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>40</b>
4.1.	Häufigkeitsverteilung der <i>MDRI</i> -Genotypen	40
4.2.	Einfluss von SNP G2677T/A und SNP C3435T auf die P-Gp-Aktivität und -Funktion	40
4.3.	Zusammenhang zwischen <i>MDRI</i> -Genotypen und Krebs susceptibilität	46
4.4.	Einfluss der Genotypenverteilung auf Tumordifferenzierungsgrad	49
4.5.	Optimierung der DNA-Extraktion aus Paraffinschnitten	50
4.6.	Zigarettenrauch als chemisches Kanzerogen im Fremdstoffmetabolismus	51
4.7.	Schlussbetrachtung	52
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>54</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>56</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>66</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>67</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>68</b>

---

## Abkürzungen

Å	Ångström
AUC	Area under the curve (Maß für die Bioverfügbarkeit eines Medikaments)
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
DMSO	Dimethylsulfoxid
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
MDR	Multidrug Resistance (Arzneimittelresistenz)
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerase Kettenreaktion)
P-Gp	P-Glykoprotein
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen)
SNP	Single nucleotide polymorphism
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus Polymerase
UNG	Uracil DNA Glykosylase (Enzym des E.coli)
wobble	Wobble-Hypothese: lockere Wechselwirkung zwischen Codon (m-RNA) und Anticodon (t-RNA) wurde auch als Wackeln (engl. wobble) bezeichnet



# **1. Einleitung**

## **1.1. Das Harnblasenkarzinom**

### **1.1.1. Epidemiologie**

Harnblasenkarzinome sind die zweithäufigsten Neoplasmen im Bereich des Urogenitaltrakts nach den Prostatakarzinomen. Im Jahre 2004 erkrankten in Deutschland 28.750 Menschen neu an Harnblasenkrebs. Männer sind mit 21.410 Neuerkrankungen knapp dreimal so häufig betroffen wie Frauen mit 7340 Neuerkrankungen. Dieser geschlechtsspezifische Unterschied ist weltweit zu beobachten. Bezogen auf alle Tumorneuerkrankungen liegt das Harnblasenkarzinom an 4. Stelle (9,3%) bei den Männern und an 8. Stelle (3,6%) bei den Frauen [1].

Das mittlere Erkrankungsrisiko liegt für Männer bei 71, für Frauen bei 74 Jahren. Damit zählen die Harnblasentumoren zu den Erkrankungen mit relativ hohem mittlerem Erkrankungsalter [1].

Die große Mehrheit der Harnblasenkarzinome ist mit 95% urothelialen Ursprungs. Nur ca. 5% entfallen auf Adeno- und Plattenepithelkarzinome. Für deren Entstehung wird eine metaplastische Reaktion der Urothelzelle aufgrund chronisch entzündlicher Veränderungen angenommen [2].

60-70% aller Blasentumoren, überwiegend Urothelkarzinome, treten multifokal auf, dabei vor allem im Seiten-, Hinterwand- und Trigonebereich der Harnblase. Im Gegensatz dazu sind Adenokarzinome solitäre Tumoren [3].

### **1.1.2. Risikofaktoren**

Für die Karzinogenese der Harnblasentumoren wird ein multifaktorielles Geschehen angenommen. Eine Reihe exogener und endogener Noxen wird diskutiert. Noch weitgehend unklar sind genetische Zusammenhänge. Erschwert wird die Identifikation der Karzinogene durch das häufig lange Zeitintervall zwischen Exposition und Auftreten des Karzinoms, das im Mittel 24 Jahre beträgt [2].

Bei der Auswertung epidemiologischer Daten stellen sich als wesentliche Risikofaktoren Alter und Geschlecht, die Zugehörigkeit zu bestimmten Rassen sowie geographische Einflüsse dar. So erkranken weiße Amerikaner etwa doppelt so häufig wie schwarze [4].

Wahrscheinlich hat unter den chemischen Noxen in den Industrieländern heute die Risikoerhöhung durch Zigarettenrauchen epidemiologisch die größte Bedeutung [5]. Der Anteil der Blasen Tumoren, die offensichtlich durch Zigarettenkonsum mit verursacht werden, wird auf etwa 30-40% geschätzt [6]. Die Analyse des Zigarettenrauchs ergab vor allem 2-Naphthylamin als verursachende Substanz [7]. Für Pfeifen- und Zigarrenraucher konnte bisher ein erhöhtes Risiko nicht nachgewiesen werden.

An zweiter Stelle unter den auslösenden Ursachen dürfte die berufliche Schadstoffbelastung stehen. Erste Hinweise für das Auftreten urothelialer Blasen Tumoren infolge Exposition mit exogenen Karzinogenen reichen bis in die Mitte des 19. Jahrhundert zurück. Besonders bekannt ist die Untersuchung von Rehn, der auf den Zusammenhang zwischen Tumorinduktion und Exposition gegenüber Anilinfarbstoffen hinwies [8]. Zu den industriellen Karzinogenen gehören weiterhin 2-Aminonaphthalin, Benzidin, 4-Aminobiphenyl und 4-Nitrodiphenyl [3].

Auch drei Medikamente, die selbst oder deren Metaboliten den aromatischen Aminen chemisch verwandt sind, konnten mit der Krebsentstehung im Harntrakt in Verbindung gebracht werden: Chlornaphazin, Phenazetin [9] und Cyclophosphamid [10]. Letztere Verbindung führt über eine Zystitis zu einem erhöhten Harnblasentumorrisiko.

Bei chronischen Entzündungszuständen werden von Bakterien, z. B. Escherichia coli, Nitrosamine freigesetzt. Diese Substanzen sind karzinogen und führen wahrscheinlich in Kombination mit einem chronischen Infekt zur Häufung von Plattenepithel-, Adeno- und Urothelkarzinomen. So fand sich eine erhöhte Inzidenz des Harnblasenkarzinoms bei Patienten mit chronischen Harnwegsinfekten, Querschnittsläsionen, Dauerkatheterableitung und Bilharziose [3,11].

Da nur wenige chemische Verbindungen bisher als komplette solitäre Karzinogene für die Harnblase identifiziert wurden, ist die Tumorinduktion in der Harnblase am ehesten ein multifaktorielles Geschehen. Dabei könnten Substanzen und Faktoren, deren Untersuchung widersprüchliche Daten in Studien ergaben (die künstlichen Süßstoffe Saccharin und Cyclamat, Kaffee, Tryptophanmetaboliten, Erbfaktoren oder eine vorangegangene Bestrahlung im kleinen Becken), eine Rolle als inkomplette oder promovierende Kokarzinogene spielen [2]. Zu diesen Faktoren gehören auch arzneimittelverstoffwechselnde Enzyme, die Karzinogene bzw. Präkarzinogene metabolisieren, und Transportproteine, die am transmembranären Transport

dieser Stoffe beteiligt sind.

## **1.2. P-Glykoprotein**

### **1.2.1. Bedeutung als Transporter**

P-Glykoprotein ist das Genprodukt des *MDR1*-Gens und gehört zur großen Gruppe der ATP-binding-cassette Transportproteine. Menschen besitzen zwei *MDR*-Gene, *MDR1* und *MDR2* [12].

Die komplette c-DNA-Sequenz des menschlichen *MDR1*-Gens wurde 1986 von Chen et al. dargestellt [13]. Callen und Kollegen zeigten durch In-situ-Hybridisierung, dass sich das *MDR1*-Gen auf dem langen Arm des Chromosoms Nummer 7 (7q21.1) befindet [14]. Das *MDR1*-Gen besteht aus 209kb, die sich in 29 Exons und 28 Introns unterteilen. 26 Introns unterbrechen die proteinkodierende Sequenz [15,16].

Verschiedene Versuche zeigten, dass das menschliche *MDR1*-Gen für Arzneimittelresistenz verantwortlich ist. C-DNA-Klone, die in arzneimittelsensitive Zellen gebracht wurden, führten zur Ausbildung eines arzneimittelresistenten Phänotyps [17,18].

Die Lokalisation von P-Glykoprotein (P-Gp) an den luminalen Oberflächen sekretorischer Epithelzellen (Hepatozyten, Tubuluszellen der Niere) weist auf eine Funktion bei Absorption oder Exkretion von endogenen und exogenen Stoffen hin [19]. Im Tiermodell fiel auf, dass Mäuse, die das *MDR1*-Gen nicht besaßen, eine schwere spontane Kolitis, vergleichbar den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen des Menschen, erlitten. Denkbar ist eine intestinale Schutzfunktion des *MDR1* zur Vermeidung einer überschießenden Immunreaktion [20]. An den Endothelzellen von Gefäßen in Gehirn, Nerven, Hoden und Plazenta fungiert P-Gp als Barriere gegenüber Toxinen. Es kann die Aufnahme von Medikamenten in das Gehirn vermindern oder ganz verhindern und trägt somit zur Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke bei [21,22]. Darüber hinaus wirkt P-Gp beim Steroid-Transport [23] und Cholesterin-Metabolismus [24,25,26,27] mit und übernimmt Funktionen im Immunsystem [28,29,30,31].

P-Glykoprotein ist ein Plasmamembranprotein mit einer Länge von 1280 Aminosäuren und einer Größe von 170 kDa. Es besteht aus zwei Hälften, die eine hochgradige Ähnlichkeit aufweisen. Diese sind über eine variable Linkerdomäne von 60 Aminosäuren miteinander verbunden. Jede

dieser homologen Hälften besteht aus einem ebenfalls variablen N-Terminus sowie einem stark konservierten C-terminalen Abschnitt und bildet sechs hydrophobe Transmembrandomänen mit einer hydrophilen Nukleotidbindungsstelle [13]. P-Gp wird posttranslational durch Glykosylierung und Phosphorylierung modifiziert.

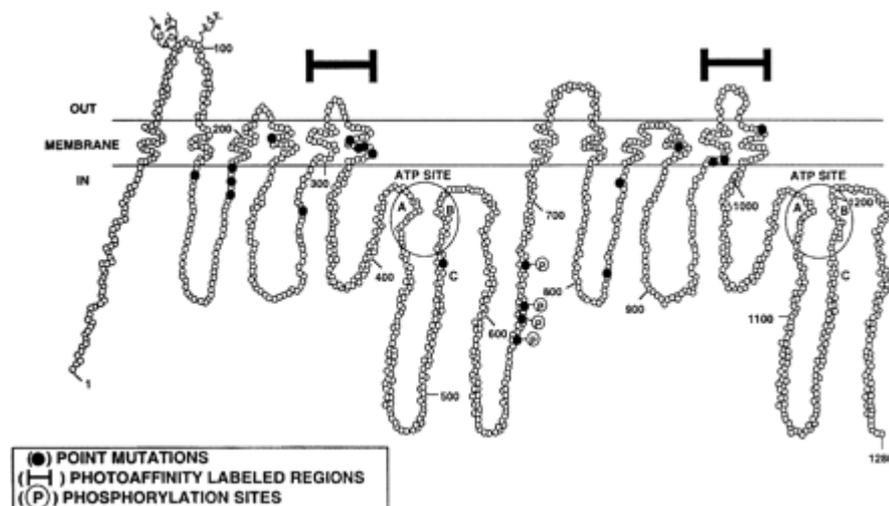


Abbildung 1: P-Gp-Modell [32]

Die Expression des *MDR1*-Gens ist gewebespezifisch. P-Glykoprotein-Isoformen finden sich hauptsächlich in den apikalen Membranen exkretorischer und sekretorischer Epithelzellen, wie Leber, Jejunum und Kolon, Niere, Pankreas und Nebenniere [33]. Weitere Lokalisationen sind Schweißdrüsen, Lunge, Prostata, Schilddrüse, Mamma, Endometrium des Uterus, Trophoblast der Plazenta, Herz- und Skelettmuskulatur, Ösophagus und Bronchien und der sich entwickelnde Fetus [34,35]. An Kapillarendothelien wie der Blut-Hirn-Schranke, Blut-Liquor-Schranke, Kapillaren des Hodens und Dermispapillen der Haut wird P-Gp exprimiert [36,37]. Im hämatopoetischen System ließ sich P-Gp in Stammzellen im Knochenmark, dendritischen Zellen und Leukozyten finden: Natürliche Killerzellen (CD56+), T-Helferzellen (CD4+), T-Suppressorzellen (CD8+), Granulozyten (CD15+) zeigen einen hohen Gehalt an P-Gp [38].

### 1.2.2. Genetische Polymorphismen des *MDR1*-Gens

Bedingt durch Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen von einzelnen Nukleotiden bzw. größeren Genabschnitten sowie Genduplikationen liegt das *MDR1*-Gen in der Bevölkerung polymorph vor. Das führt teilweise zu gravierenden Unterschieden in der Aktivität dieses Membrantransporters und damit der individuellen Kapazität zur Aufnahme oder Abgabe von

Fremdstoffen. Genetische Polymorphismen scheinen sich zudem auch auf Erkrankungsrisiko und Behandlungserfolg auszuwirken.

Die ersten genetischen Varianten des *MDR1*-Gens wurden 1994 in der Promoter-Region von Osteosarkomzellen entdeckt [39]. Mickley und Mitarbeiter beschrieben vier Jahre später Polymorphismen des *MDR1*-Gens in normalen Zellen und Tumorgewebe [40]. Hoffmeyer und Mitarbeiter führten die erste systematische Suche nach Polymorphismen im *MDR1*-Gen durch [41]. Dabei entdeckten sie 15 Variationen in einzelnen Basenpaaren (single nucleotide polymorphism, SNP). Neun davon verändern die Aminosäuresequenz, beispielsweise G2677T/A, vier Mutationen rufen keine Sequenzänderung hervor (wobble Position in C3435T). In den letzten Jahren wurden mehr als 50 SNPs in verschiedenen ethnischen Populationen entdeckt [42].

Tabelle 1: Polymorphismen des *MDR1*-Gens in der weißen Bevölkerung [41,43,44] (Auswahl)  
(In dieser Arbeit untersuchte Polymorphismen sind fett hervorgehoben.)

#	Lokalisation	Position	Allele	Effekt	Allelhäufigkeit in %	Genotyp	Genotypen-häufigkeit in %
1	Exon 1b	Exon 1b/-12	T C	?	94,1 5,9	T/T T/C	88,2 11,8
2	Intron 1	Exon 2/-1	G A	Beginn der Translation	91,0 9,0	G/G G/A A/A	82,0 18,0 0,0
3	Exon 2	Exon 2/61	A G	21 Asn 21 Asp	88,2 11,2	A/A A/G G/G	78,5 20,6 0,9
4	Intron 4	Exon 5/-35	G C	?	99,4 0,6	G/G G/C C/C	98,8 1,2 0,0
5	Intron 4	Exon 5/-25	G T	?	83,5 16,5	G/G G/T T/T	70,5 26,0 3,5
6	Exon 5	Exon 5/307	T C	103 Phe 103 Leu	100 0	T/T T/C C/C	100 0 0
7	Intron 6	Exon 6/+139	C T	?	62,8 37,2	C/C C/T T/T	39,0 47,5 13,4

## Einleitung

#	Lokalisation	Position	Allele	Effekt	Allelhäufigkeit in %	Genotyp	Genotypen-häufigkeit in %
8	Intron 6	Exon 6/+145	C T	?	98,2 1,2	C/C C/T T/T	97,6 2,4 0,0
9	Exon 7	Exon 7/548	A G	183 Asn 183 Ser	98,6 1,4	A/A A/G G/G	97,2 2,8 0,0
10	Exon 11	Exon 11/1199	G A	400 Ser 400 Asn	94,5 5,5	G/G G/A A/A	88,9 11,1 0,0
11	Exon 12	Exon 12/1236	C T	wobble	59,0 41,0	C/C C/T T/T	34,4 49,2 16,4
12	Intron 12	Exon 12/+44	C T	?	95,1 4,9	C/C C/T T/T	90,2 9,8 0,0
13	Exon 13	Exon 13/1474	C T	492 Arg 492 Cys	98,6 1,4	C/C C/T T/T	97,2 2,8 0,0
14	Intron 16	Exon 17/-76	T A	?	53,8 46,2	T/T T/A A/A	28,4 50,8 20,8
15	Intron 17	Exon 17/+137	A G	?	99,4 0,6	A/A A/G G/G	98,8 1,2 0,0
16	Exon 21	Exon 21/2650	C T	wobble	97,3 2,7	C/C C/T T/T	94,7 5,3 0,1
17	<b>Exon 21</b>	<b>Exon 21/2677</b>	<b>G T A</b>	<b>893 Ala 893 Ser 893 Thr</b>	<b>56,5 41,6 1,9</b>	<b>G/G G/T T/T G/A T/A A/A</b>	<b>30,9 49,2 16,1 2,0 1,8 0,0</b>
18	Exon 24	Exon 24/2995	G A	999 Ala 999 Thr		G/G G/A A/A	89,0 11,0 0,0
19	Exon 26	Exon 26/3320	A	1107 Gln	99,8	A/A	99,6

#	Lokalisation	Position	Allele	Effekt	Allelhäufigkeit in %	Genotyp	Genotypen-häufigkeit in %
			C	1107 Pro	0,2	A/C C/C	0,4 0,0
20	Exon 26	Exon 26/3396	C T	wobble	99,7 0,3	C/C C/T T/T	99,5 0,5 0,0
21	Exon 26	Exon 26/3421	T A	1141 Ser 1141 Thr	99,7 0,3	T/T T/A A/A	99,4 0,6 0,0
<b>22</b>	<b>Exon 26</b>	<b>Exon 26/3435</b>	<b>C T</b>	<b>wobble</b>	<b>46,1 53,9</b>	<b>C/C C/T T/T</b>	<b>20,8 50,5 28,6</b>

Manche Genvarianten in einer definierten Nukleinsäureposition bzw. SNPs sind mit benachbarten Genvarianten auf einem Chromosom gekoppelt und werden häufiger gemeinsam vererbt, als bei Unabhängigkeit zu erwarten ist. Die drei häufigsten SNPs in der kaukasischen Bevölkerung in den Positionen 1236 (Exon12), 3435 (Exon26) und 2677 (Exon21) stehen in einem Kopplungsungleichgewicht zueinander und können gemeinsam vererbt werden [43].

Neben den individuellen Unterschieden innerhalb einer Population treten die *MDRI*-Polymorphismen in verschiedenen ethnischen Gruppen mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. Als Grund dafür kann die evolutionäre Anpassung an geographisch bedingte unterschiedliche Umweltfaktoren und verschiedene Nahrungsgrundlagen angenommen werden [45]. Untersuchungen an Populationsstichproben ergaben ein häufigeres Auftreten des CC-Genotyps am SNP C3435T des *MDRI*-Gens bei Afrikanern im Vergleich zu Kaukasiern oder Asiaten [43,46,47]. Möglicherweise bietet der CC-Genotyp einen Selektionsvorteil gegenüber gastrointestinalen Infektionen, die in tropischen Ländern endemisch sind und mit einer hohen Kindermorbidität und –mortalität verbunden sind. Während die meisten Polymorphismen mit unterschiedlicher Häufigkeit in allen untersuchten Populationen vorkommen, fand man einige Mutationen bei Kaukasiern nicht. Dazu gehören der C-4T-Polymorphismus der Afroamerikaner [43] und der SNP C145G am Exon 1a in der japanischen Bevölkerung [48].

### **1.3. *MDR1*-Polymorphismen als mögliche Suszeptibilitätsfaktoren für das Harnblasenkarzinom**

Beim Harnblasenkarzinom gelten Zigarettenrauchen und die berufliche Belastung z.B. mit bestimmten aromatischen Aminen als eindeutig gesicherte ursächliche Faktoren. Nicht jeder Mensch, der diesen Noxen ausgesetzt ist, erkrankt aber an einem Harnblasenkarzinom. Es muß demnach Faktoren geben, die für die individuelle Suszeptibilität verantwortlich sind.

P-Gp ist ein Effluxtransporter, der aufgrund seiner Lokalisation an Grenzstrukturen des menschlichen Körpers eine Schlüsselstellung bei der Aufnahme und Ausscheidung vieler Fremdstoffe einnimmt, zu denen auch verschiedene Karzinogene gehören. P-Gp wird im gesunden Harnblasenepithel exprimiert [49]. Die Frage liegt deshalb nahe, inwieweit genetische Varianten, die Einfluß auf die P-Gp-Aktivität haben, am Entstehen von Harnblasenkarzinomen beteiligt sein könnten.

Bei Kaukasiern sind die häufigsten *MDR1*-Polymorphismen C1236T, G2677T/A und C3435T. Zwischen diesen drei Polymorphismen besteht ein starkes Kopplungsungleichgewicht [43]. Die P-Gp-Aktivität genetischer Transportervarianten ist auf mehreren Ebenen untersucht worden (siehe Übersicht [50]). Grundsätzlich können sich genetische Varianten quantitativ oder qualitativ auf das Genprodukt auswirken, d.h. sie können Einfluß auf die Expression oder auf die Funktion des Moleküls haben. Die P-Gp-Expression wurde in Zellkulturen untersucht, die den Transporter exprimieren, und an verschiedenen menschlichen Geweben (z.B. Darmepithel, Nierenkortex), die von Trägern unterschiedlicher P-Gp-Varianten stammten. Zur Untersuchung der Transportfunktion gibt es ebenfalls verschiedene In-vitro- und Ex-vivo-Versuchsansätze. Neben der Messung in Zellkulturen und Membranvesikelsystemen wurde die P-Gp-Aktivität auch in menschlichen Lymphozyten untersucht, die aus dem Blut von Trägern unterschiedlicher genetischer Varianten isoliert worden waren.

Darüber hinaus liegt eine große Anzahl pharmakokinetischer In-vivo-Untersuchungen vor. Hierbei wurden Plasmaspiegelverläufe bei Probanden bzw. Patienten nach oraler Aufnahme von P-Gp-Substraten dokumentiert und die Ergebnisse genotypbezogen ausgewertet. Der hierbei am häufigsten verwendete Wirkstoff ist Digoxin [51]. Ebenfalls in diese Rubrik fallen Untersuchungen, bei denen die Bioverfügbarkeit von P-Gp-Substraten indirekt über den Therapieerfolg gemessen und mit unterschiedlichen Genotypen korreliert wurde. Zu nennen sind hier vor allem klinische Untersuchungen bei Transplantationspatienten, die mit Tacrolimus oder

Ciclosporin behandelt wurden [52, 53].

Bisher ist es für die beiden bei Kaukasiern häufigen Polymorphismen G2677T/A und C3435T nicht gelungen, unter den geschilderten experimentellen Bedingungen zu einer eindeutigen Aussage zu kommen, ob und wenn ja in welche Richtung die Transportaktivität der genetischen Varianten vom Wildtyp abweicht. Dabei wurden die Polymorphismen einzeln und in Kombination untersucht (siehe Übersichten [54,55]). Hinsichtlich des SNP C3435T ist aufgrund der vorliegenden Resultate möglicherweise aber doch der Schluß gerechtfertigt, dass die Hinweise auf eine reduzierte P-Gp-Aktivität bei TT-Trägern überwiegen. Festzuhalten bleibt jedoch, dass die funktionellen Auswirkungen dieser beiden Polymorphismen auf P-Gp nicht zweifelsfrei geklärt sind.

Dessenungeachtet ist eine Vielzahl von Assoziationsstudien durchgeführt worden, die eine Beziehung zwischen bestimmten Erkrankungen und P-Gp-Genotypen herzustellen versuchten. Aufgrund der zentralen Stellung, die P-Gp beim transmembranären Transport potentieller Schadstoffe einnimmt, standen hier naturgemäß Krankheiten in P-Gp-exprimierenden Geweben im Vordergrund, in deren Pathogenese Zellnoxen vermutlich eine Rolle spielen. Hierzu gehören Nieren- und Blasenkarzinome, M. Crohn und Colitis ulcerosa [56,57,58].

Zum Zeitpunkt der Vergabe dieser Arbeit lag eine Arbeit von Siegmund und Mitarbeitern vor die über die Assoziation zwischen dem SNP C3435T und der Suszeptibilität für Nierentumoren berichtete [59]. Die Autoren hatten 212 Patienten mit Nierenkarzinomen und 537 gesunde Probanden bezüglich C3435T genotypisiert und die Häufigkeiten der Genotypen in beiden Gruppen verglichen. Die Studienteilnehmer waren Kaukasier. Bei den Nierenzellkarzinomen handelte es sich überwiegend um Klarzellkarzinome.

Siegmund und Mitarbeiter stellten fest, dass homozygote Träger des T-Allels ein größeres Risiko hatten, an Nierenkarzinomen zu erkranken, wobei vor allem das Risiko für Nicht-Klarzellkarzinome groß war. Daraufhin wurde eine zweite Studie durchgeführt, die nur Nierenkarzinompatienten mit Nicht-Klarzellkarzinomen (n=50) sowie 150 gesunde Kontrollpersonen einschloß. Diese Untersuchung identifizierte das 3435T-Allel eindeutig als Risikofaktor für die Erkrankung an einem Nicht-Klarzellkarzinom. In der gleichen Arbeit wurde die P-Gp-Expression in gesundem Nierengewebe immunhistochemisch bei homozygoten Wildtypallelträgern und homozygoten 3435T-Trägern gemessen. Dabei stellte sich heraus, dass

die Nierenzellen homozygoter Wildtypallelträger im Mittel ca. 1,5mal so viel P-Gp aufweisen wie die von homozygoten Trägern der Variante.

Kurz zuvor war im Institut für Klinische Pharmakologie ein Befund erhoben worden, der bezüglich der funktionellen Bedeutung des SNP C3435T in die gleiche Richtung wies: In einer Studie mit gesunden kaukasischen Probanden zeigten Studienteilnehmer mit 3435TT-Genotyp im Vergleich zu Wildtypallelträgern eine deutlich niedrigere MDR1-Expression im Duodenum und höhere Plasmadigoxinspiegel [41].

Diese Hinweise auf eine reduzierte P-Gp-Aktivität bei 3435T-Allelträgern waren für uns der Anlaß, die C3435T-Genotypverteilung in einem Kollektiv von Blasenkrebspatienten zu untersuchen – bei einem Tumor also, zu dessen bekannten Risikofaktoren Rauchen und die Exposition gegenüber Schadstoffen wie aromatischen Aminen gehören. Neuere Studien, die die damaligen Befunde z.T. relativiert haben, werden in der Diskussion dargestellt.

### **1.4. Aufgabenstellung**

Der Efflux-Transporter P-Glykoprotein schleust eine Reihe von Substraten, darunter auch Karzinogene, aus der Zelle in das Lumen. Genetische Polymorphismen, die zu einer geringeren Aktivität oder Expression von P-Glykoprotein führen, können die Krebsentstehung begünstigen.

Mit dem Polymorphismus C3435T in Exon 26 des *MDR1*-Gens wurden eine Reihe maligner Erkrankungen assoziiert. Es handelt sich um eine häufige Mutation. Sie steht im Kopplungsungleichgewicht mit dem Polymorphismus G2677T/A in Exon 21, auch diese Mutation kommt bei Kaukasiern häufig vor.

Wenn diese beiden Polymorphismen für die Entstehung von Harnblasenkarzinomen funktionell relevant sind, sollte sich bei Patienten mit Karzinom eine Häufung bestimmter Genotypen bzw. Haplotypen im Vergleich zu gesunden Kontrollen ergeben. Die vorliegende Arbeit untersucht diese These im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie. Dabei war es auch Aufgabe dieser Arbeit, eine Methode zur DNA-Extraktion aus Paraffinschnitten zu etablieren.

## **2. Material und Methode**

### **2.1. Patientenkollektiv**

Durchgeführt wurde eine ungematchte Fall-Kontroll-Studie, an der 428 Patienten mit Harnblasenkarzinom beteiligt waren. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte im Szpital Kolejowy (Krankenhaus der polnischen Eisenbahn) in Puszczykowo, einer Kleinstadt nahe Poznan im Zeitraum von 1993-1996.

Eingeschlossen wurden:

- Patienten beiderlei Geschlechts mit gesichertem primären Harnblasenkarzinom,
- Patienten polnischer Abstammung (aufgrund bekannter interethnischer Unterschiede der *MDRI*-Polymorphismen).

Ausgeschlossen wurden:

- Patienten mit einer anderen Krebserkrankung oder einer chronischen Krankheit.

Anhand eines standardisierten Vordrucks erfolgte bei jedem Patienten eine gezielte Anamnese, in der neben Angaben zum Geschlecht, Alter, Größe und Gewicht auch Daten zum Raucherstatus erhoben wurden.

Die histopathologische Beurteilung von Differenzierungsgrad (G) und Tumorstadium (T) erfolgte nach dem von der UICC (Union International Contre le Cancer) etablierten TNM-System von 1997.

Die Ethikkommission der Medizinischen Akademie in Poznan stimmte der Durchführung der Studie zu. Alle Studienteilnehmer gaben nach detaillierter Aufklärung ihre Einwilligung zur Teilnahme an der Untersuchung.

### **2.2. Kontrollkollektiv**

Das Kontrollkollektiv beinhaltete Mitarbeiter der Medizinischen Akademie in Poznan und Teilnehmer verschiedener klinischer Studien, die weder an malignen noch an chronischen Erkrankungen litten.

Die Untersuchung der Probanden, Probenentnahmen, Befragung und Datenerhebung war Aufgabe anderer Doktoranden. Dabei erfolgte die DNA-Gewinnung aus Venenblut mittels

Phenol-Chloroform-Extraktion.

## 2.3. DNA-Extraktion von Tumorgewebe aus Paraffinschnitten

### 2.3.1. Chemikalien und Geräte zur DNA-Extraktion

#### Chemikalien

Roticlear <sup>®</sup>	Roth, Karlsruhe
Ethanol 96%, 70%, 50%	Merck, Darmstadt
Lysis Buffer G	Invitex, Berlin
Proteinase K	Invitex, Berlin
Binding Buffer A	Invitex, Berlin
Wash Buffer I+II	Invitex, Berlin
Elution Buffer D	Invitex, Berlin

#### Geräte

96er DNA-Binding Plate C	Invitex, Berlin
96er 1 ml Collection Plate	Invitex, Berlin
Thermomixer	5436 Eppendorf, Hamburg
Schüttler/Vortexer	VF2 Janke&Kunkel IKA <sup>®</sup> Labortechnik, Staufen
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415, Hamburg Beckmann GS-6R, München
Vakuumpumpe	Uni Equip Laborgerätebau, Martinsried
Vakuummanifold	Invitex, Berlin
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Thermal Printer	DPU-414 Seiko Instruments Inc.
Kunststoffküvetten	Eppendorf, Hamburg

### 2.3.2. Entparaffinisierung

Das in Paraffin eingebettete Tumorgewebe befand sich in 1,5-ml-Eppendorfgefäßen. Mittels Roticlear<sup>®</sup> und einer absteigenden Ethanolreihe bis zum Aqua dest. erfolgte die Entfernung des Paraffins.

Zu Beginn wurde 1 ml Roticlear<sup>®</sup> zum Tumorgewebe gegeben und sehr gut mit einem Vortex-Gerät durchmischt. Anschließend inkubierten die Proben 10 min bei 52°C und 1400 rpm im Thermomixer. Danach wurden die Proben 5 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Dieses Vorgehen wurde zweimal mit 1 ml Roticlear<sup>®</sup> wiederholt.

Nach Entfernung des Roticlear<sup>®</sup> wurde Ethanol in absteigenden Konzentrationen zugesetzt. Zur Verwendung kamen jeweils 1 ml einer 96%igen, einer 70%igen und einer 50%igen Ethanollösung sowie 1 ml Aqua dest. Die Proben wurden ebenfalls 10 min bei 52°C und 1400 rpm im Thermomixer inkubiert und danach 5 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand jedes Durchgangs wurde dekantiert.

### **2.3.3. Lyse der Zellen**

Anschließend wurden die Zellen durch Verdau mit dem Enzym Proteinase K aufgeschlossen. Dazu wurden 400 µl Lysis Buffer G und 60 µl Proteinase K zum entparaffinierten Tumorgewebe gegeben. Dieser Ansatz wurde dreimal abwechselnd herunterzentrifugiert und mit einem Vortex-Gerät wieder aufgerührt. Danach wurden die Proben 12 Stunden bei 65°C und 1400 rpm im Thermomixer inkubiert.

### **2.3.4. Waschen und Elution der DNA**

Zur Extraktion der DNA wurden Proteine und Lipide mit verschiedenen Puffern ausgewaschen und mittels Vakuum von der DNA getrennt.

Dazu wurde 200 µl Binding Buffer A zu den Proben hinzugegeben und dreimal abwechselnd herunterzentrifugiert und mit einem Vortex-Gerät durchmischt. Dann wurden 500 µl der Probenlösung auf die DNA-Binding Plate C überführt und eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte in das Vakuummanifold gesetzt und an die Vakuumpumpe für 5 min angeschlossen. Nacheinander wurden 600 µl Wash Buffer I und zweimal 600 µl Wash Buffer II auf die Platte pipettiert und jeweils für drei Minuten ein Vakuum angelegt. Danach musste die Platte auf saugfähigem Papier gut trockengetupft werden. Nach erneutem Einsetzen der Platte in das Vakuummanifold wurde für 20 Minuten ein Vakuum angelegt. Anschließend wurde die Collection Plate unter die DNA-Binding Plate C gestellt. Dann wurden 150 µl des auf 52°C im Thermomixer erwärmten Elution Buffer D auf die DNA-Binding Plate C pipettiert und für 5 Minuten ein Vakuum angelegt. Nach Entfernung der DNA-

Binding Plate C wurden die eluierten DNA-Proben in Eppendorfgläser überführt.

### **2.3.5. Bestimmung der DNA-Konzentration in den Proben**

Die DNA sollte in definierter Menge bei den Experimenten eingesetzt werden, um die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Deshalb wurden die Proben auf einen Standardwert von 30 µg DNA/ml photometrisch eingestellt.

60 µl extrahierte DNA-Probe wurde in eine Küvette gegeben und gegen einen Standard von 60 µl Elution Buffer vermessen, da die DNA in diesem gelöst war.

Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Durch die Bildung des Quotienten 260/280 können Verunreinigungen mit Proteinen bestimmt werden. Ab einem Quotienten von  $260/280 > 1,6$  galten die DNA-Proben als hinreichend gereinigt.

Bei der Messung ergaben sich sehr unterschiedliche DNA-Konzentrationen. Das ist wahrscheinlich auch auf die starken Unterschiede in der Menge des paraffineingebetteten Gewebes in einem Eppendorfgläser zurückzuführen. Außerdem ging bei kleinen Probenmengen und bei Proben, die aus vielen kleinen Gewebstückchen bestanden, durch das mehrmalige Auswaschen Material verloren, so dass nicht genügend DNA extrahiert werden konnte.

DNA-Proben, die Konzentrationen größer als 30 µg/ml ergaben, wurden mit Aqua dest. auf 30 µg/ml eingestellt. Nicht messbare Proben mit zu hohen Konzentrationen wurden zuerst 1:5 mit Aqua dest. verdünnt, erneut gemessen und ebenfalls auf 30 µg/ml eingestellt.

Die gemessenen DNA-Proben wurden bis zu ihrer Genotypisierung bei +4°C gelagert.

## **2.4. Genotypisierung am Lightcycler**

### **2.4.1. Aufbau und Funktion des Lightcyclers**

Der Lightcycler ist ein extrem schneller Thermocycler mit der Möglichkeit der Online-Fluoreszenz-Detektion. Dadurch ist es möglich, die Amplifikation einer Nukleinsäure während des Laufs zu beobachten. Ermöglicht werden die Quantifizierung der Ausgangsmenge sowie die Genotypisierung von Proben mittels einer Schmelzpunktanalyse.

Für die Typisierung werden zwei Oligonukleotidsonden, sogenannte Hybridisierungs-sonden,

verwendet, die komplementär zur gewünschten Matrize in 3'-Richtung liegen. Eine Sonde trägt am 3'-Ende Fluorescein (3FL) und die andere Sonde ist 5'-terminal mit dem Farbstoff Lightcycler Red 640 (LC640) oder LC705 markiert. Um einer Extension durch die Polymerase vorzubeugen, ist die 3'-Hydroxylgruppe am LC Red mit einer Phosphatgruppe blockiert. Beide Sonden binden in einem Abstand von 1-5 Basen (4-25 Å) auf der Matrize zueinander. Erst dann kann ein Energietransfer stattfinden. Dabei können benachbarte Fluorophore ihre Energie aufeinander übertragen. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet. Das Donor-Fluorophor (3'-Fluorescein) wird durch die LED (Light Emitting Diode) des Lightcyclers angeregt und transferiert Energie zum Akzeptor (5'LC Red). Die Messung erfolgt während des Annealings der Primer und Sonden über die Fluoreszenz (rotes Licht) des Akzeptorfarbstoffes.

Mit Hilfe der Hybridisierungssonden kann das Vorliegen von Sequenzvariationen, wie Basenaustausche, Insertionen oder Deletionen, detektiert werden. Dafür werden die hybridisierten Produkte langsam unter kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz erhitzt. Da die Sensorsonde die variable Sequenz überdeckt, führt jede Änderung der Sequenz zu einer Erniedrigung des Schmelzpunkts. Eine einheitliche Probe ergibt einen definierten Schmelzpunkt, eine heterozygote Probe zwei Schmelzpunkte, und eine homozygot veränderte, mutierte Probe einen einheitlichen Schmelzpunkt bei einer niedrigeren Temperatur. Der Schmelzpunkt  $T_m$  beschreibt die Temperatur, bei der gebundene und freie Sequenz miteinander im Gleichgewicht stehen.

## 2.4.2. Chemikalien und Geräte für die Genotypisierung am Lightcycler

### Chemikalien

10x Gen Therm Buffer	Rapidozym, Berlin
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	Rapidozym, Berlin
dNTP, dUTP	Rapidozym, Berlin
Primer	TIB MOLBIOL, Berlin
Hybridisierungssonden	TIB MOLBIOL, Berlin
BSA	Bio Labs <sup>®</sup> INC.
DMSO	Merck, Darmstadt
Uracil DNA Glykosylase (UNG)	MBI Fermentas
Taq DNA-Polymerase	Rapidozym, Berlin

## Geräte

Lightcycler®	Roche, Mannheim
LC Carousel Zentrifuge	Roche, Mannheim
Thermocycler, GeneAmp® PCR System 9700	Perkin Elmer/Applied Biosystems
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415, Hamburg C1200 National Labnet Co. Beckmann GS-6R, München
Schüttler	VF2 Janke&Kunkel IKA® Labortechnik, Staufen

### 2.4.3. Reaktionsbedingungen

Die Mengenangaben der Reaktionsansätze sind für eine Probe berechnet und wurden jeweils mit der Anzahl  $n$  multipliziert. In einem Lightcyclerdurchgang konnten höchstens 32 Proben amplifiziert und genotypisiert werden. Die bei  $+4^{\circ}\text{C}$  bzw.  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlten Reagenzien wurden im Lightcycler-Kühlblock entsprechend dem Mastermix pipettiert. Nach Zentrifugieren, Mischen und Aufteilen des Mastermixes in die Lightcycler-Kapillaren wurden  $2\ \mu\text{l}$  extrahierte DNA dazugegeben. Danach wurde das Karussell mit den Glaskapillaren zentrifugiert und anschließend in den Lightcycler eingesetzt.

Bei der Durchführung einer PCR (Polymerase-Kettenreaktion) im Lightcycler besteht die Gefahr, dass DNA aus vorherigen Reaktionen zur Verunreinigung führt. An Stelle von dTTP (Desoxythymidin-5'-triphosphat) wurde deshalb dem Mastermix dUTP (Desoxyuridin-5'-triphosphat) zugegeben. Bei den folgenden Reaktionen wurde dUTP anstatt von dTTP in das PCR Produkt eingebaut und dem Mastermix wurde zusätzlich Uracil-DNA-Glykosylase beigefügt. Diese zersetzte Uracil enthaltende Reaktionsprodukte vor Beginn der PCR bei Zimmertemperatur. Während dieses Schritts blieb die extrahierte DNA erhalten, da sie kein Uracil enthält.

Der dUTP-Mix enthielt je  $10\ \mu\text{l}$  Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP), Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP), Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP) und  $20\ \mu\text{l}$  dUTP. Der Mix wurde mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf  $500\ \mu\text{l}$  Gesamtvolumen verdünnt.

**2.4.3.1. Bestimmung von *MDR1* Exon 21 Mutation G2677T/A**

Zur Amplifikation mittels PCR und Genotypisierung wurden je Probe 20 µl eines Mastermix nach folgendem Protokoll hergestellt:

**Mastermix**

10x Gen Therm Buffer	2 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1,7 µl
d-UTP	1 µl
Primer MDR1 ex21 S	0,4 µl
Primer MDR1 ex21 B	0,4 µl
Sonden 21 Sensor A	0,6 µl
Sonden 21 Anchor	0,6 µl
BSA 1:10	0,6 µl
H <sub>2</sub> O	12 µl
Glykosylase	0,5 µl
Taq DNA-Polymerase	0,2 µl

**Primersequenzen**

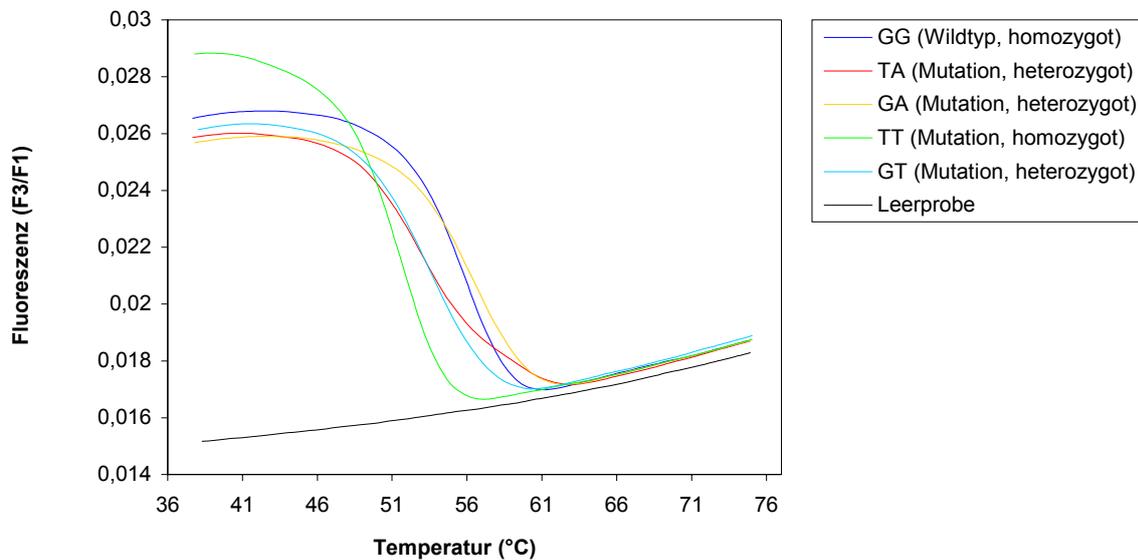
MDR1 ex21 S (Forward Primer)	5'-GCA GGA GTT GTT GAA ATG AAA ATG-3'
MDR1 ex21 B (Reverse Primer)	5'-CGC CTG CTT TAG TTT GAC TCA-3'

**Sondensequenzen**

21 Anchor	5'-LC-Red640-CTT TCT TAT CTT TCA GTG CTT GTC C-ph
21 Sensor A	5'-ACC TTC CCA GTA CCT TCT-Flu



## Schmelzkurve



## 1. Ableitung

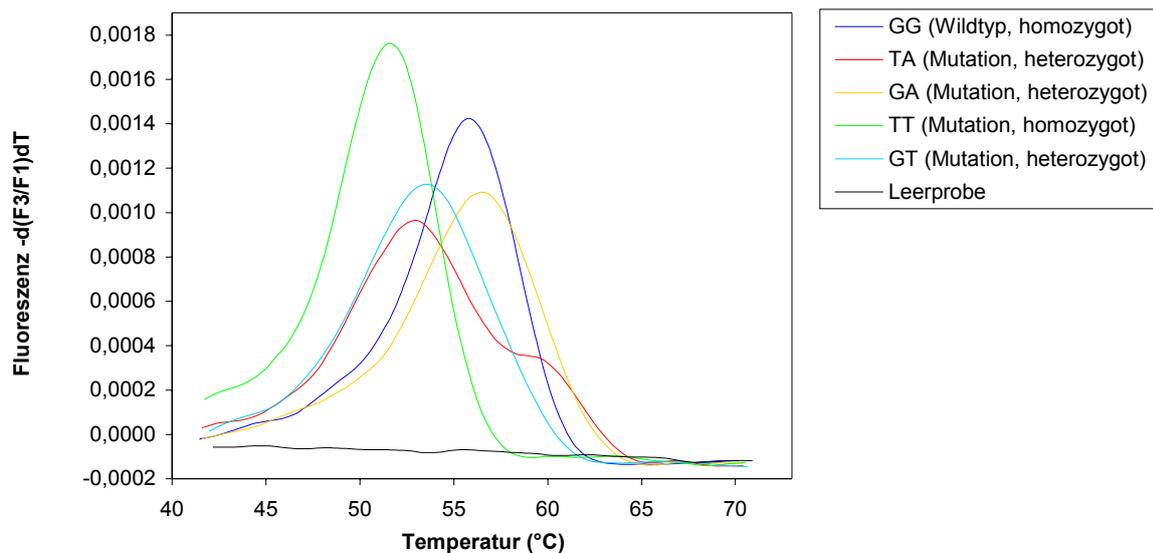


Abbildung 3: Typische Schmelzkurven und die erste Ableitung der verschiedenen Genotypen des *MDR1* Exon 21

Der Polymorphismus G2677T/A (Exon21) ist ein Triple-SNP mit der Möglichkeit von drei unterschiedlichen Basenaustauschen. Proben mit einem Schmelzpunkt bei 55,8°C sind homozygote Wildtypen (Basenpaar GG). Als Mutationen ergaben sich vier verschiedene Varianten: Eine homozygote Mutation (Basenpaar TT) hat ihren Schmelzpunkt bei 52,1°C.

Heterozygote Proben mit dem Basenpaar GT haben zwei Schmelzpunkte bei 52,5°C und 54,6°C. Die heterozygote Mutation mit dem Basenpaar GA ergab zwei Schmelzpunkte bei 55,9°C und 57,8°C, und Proben mit dem Basenpaar TA haben zwei Schmelzpunkte bei 52,8°C und 58,9°C.

### 2.4.3.1.1. Kontrolle der Genotypisierung mittels konventioneller PCR

Einige Proben ergaben sehr flache Schmelzkurven, wodurch die bei dieser Mutation eng beieinander liegenden Schmelzpunkte schwer zu unterscheiden waren. Die Gründe dafür könnten Verunreinigungen durch Paraffinrückstände oder geringe DNA-Mengen sein. Um trotzdem zufriedenstellende Ergebnisse zu erhalten, wurde eine 'nested PCR-Technik' angewendet. Das heißt, in einem ersten Schritt wurde mittels konventioneller PCR ein größeres Fragment, das das Exon 21 enthielt, amplifiziert. Dieses spezifische PCR-Produkt wurde - im Verhältnis von 1:10 verdünnt - als Matrix für die oben beschriebene Reaktion im Lightcycler verwendet. Die einzige Veränderung zum Originalprotokoll bestand in einer Verringerung der Zyklenanzahl auf 25 Zyklen. Der Erfolg der PCR wurde durch die Gelelektrophorese kontrolliert und das Ergebnis mit einem digitalen Videosystem dokumentiert.

Die Mengenangaben der Reaktionsansätze sind für eine Probe berechnet. Die bei +4°C bzw. – 20°C gelagerten Reagenzien wurden auf Eis gestellt und entsprechend dem Mastermix pipettiert. Nach Zentrifugieren, Mischen und Aufteilen des Mastermixes auf die PCR-Gefäße wurde 2 µl extrahierte DNA dazugegeben. Der PCR-Mix wurde erneut gemischt und zentrifugiert und anschließend bei 60-70°C in den Cycler eingesetzt.

Zur Amplifikation mittels PCR wurden je Probe 20 µl eines Mastermix nach folgendem Protokoll hergestellt:

#### Mastermix

10x Gen Therm Buffer	2 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0,8 µl
d-NTP	0,6 µl
MDR Bet F01 Primer	0,5 µl
MDR Bet R01 Primer	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	15,4 µl
Taq DNA-Polymerase	0,2 µl

**Primersequenzen**

MDR Bet F01 (Forward Primer)	5'-ATG GTT GGC AAC TAA CAC
MDR Bet R01 (Reverse Primer)	5'-AGC ACT AGG GAG TAA CAA A

**Cycler-Programm**

	Temperatur in °C	Zeit in Sekunden
Denaturierung	94	120
Amplifikation (Denaturierung, Annealing, Elongation)	94	40
	58	40
	72	120
Terminale Elongation	72	7 Minuten

Die Amplifikation durchlief 35 Zyklen, in denen es zur exponentiellen Vermehrung des *MDR1* Exon 21 kam. Nach Ablauf des letzten Zyklus gewährleistete die terminale Elongation den vollständigen Verbrauch der Reagenzien.

**2.4.3.1.2. Agarosegel Elektrophorese****Chemikalien**

Agarose	Eurogentec
100 bp DNA-Marker GeneRuler TM	MBI Fermentas
10x Tris-Borat-EDTA-Puffer (10 x TBE, Konzentrat)	109 g Tris (900 mM) + 55 g Borsäure (890 mM) + 40 ml 0,5 M EDTA-Lösung, pH 8,0 (20 mM) pH-Wert mit 1 M HCL auf 8,0 eingestellt ad 1 l mit aqua bidest.
1x TBE	zum Gebrauch 10x TBE 1:10 mit aqua bidest. verdünnen
Probenlaufpuffer	0,25 g Bromphenolblau + 15 g Ficoll-400 (Pharmacia, Schweden) ad 100 ml 1x TBE, mischen, bei 4°C lagern
SYBR Green/Gold Färbepuffer	10 µl SYBR Green/Gold (BioWhittaker Molecular Applications) gelöst in 1x TBE

### Geräte

Flachbett-Elektrophoresekammern, Kämmen	Protrans, Ketsch
Elektrophorese-Spannungsgeräte	Renner GmbH, Dannstadt Biorad, München
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Videosystem Eagle Eye <sup>TM II</sup>	Stratagene, Heidelberg

### Agarosegelherstellung

Die Kontrolle der PCR wurde auf 2,5%igen Agarosegelen durchgeführt. Für 250 ml Agarosegel wurden 6,25 g Agarose mit 1x TBE auf 250 ml in einem Glasbehälter aufgefüllt, abgedeckt und anschließend mehrmals in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Danach kühlte ein Magnetrührer die Agarose bis auf ca. 45°C ab. Schließlich wurde die Agarose blasenfrei in die waagrecht ausgerichteten Elektrophorese-Schlitten gegossen und diese mit den entsprechenden Elektrophorese-Kämmen bestückt. Nachdem die Agarose erkaltet und gehärtet war (ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur), wurden die Kämmen vorsichtig aus dem Gel entfernt und die Gelschlitten in die Elektrophoresekammern gestellt.

### Elektrophorese

Die Elektrophorese diente der Erfolgskontrolle der zu Beginn durchgeführten nested PCR. 10 µl PCR-Produkt wurden zu 10 µl Probenlaufpuffer in eine Mikrotiterplatte pipettiert, gemischt und auf ein 2,5%iges Agarosegel aufgetragen. Eine Tasche jeder Probenreihe wurde zusätzlich mit einem 100-bp-DNA-Marker als Kontrolle bestückt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 Volt und 500 Milliampere für 30 Minuten. Nach der Anfärbung der Agarosegele für 45 Minuten im SYBR-Green-Färbebad wurden die Ergebnisse mit einem digitalen Videosystem unter UV-Licht fotografisch dokumentiert. SYBR Green diente als fluoreszierender Farbstoff zur Sichtbarmachung der DNA-Banden.

PCR-Produkte mit einer deutlichen Bande wurden zur Genotypisierung im Verhältnis von 1:10 verdünnt im Lightcycler eingesetzt. War kein PCR-Produkt vorhanden, wurde die nested PCR wiederholt.

### 2.4.3.2. Bestimmung von *MDR1* Exon 26 Mutation C3435T

Die Bestimmung des *MDR1* Exon 26 wurde nach der Methode von Nauck und Mitarbeitern durchgeführt [61].

Zur Amplifikation mittels PCR und Genotypisierung wurden je Probe 20 µl eines Mastermix nach folgendem Protokoll hergestellt:

#### Mastermix

10x Gen Therm Buffer	2 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1 µl
d-UTP	1 µl
Primer MDR11	0,6 µl
Primer MDR12	0,6 µl
Sonden C3435T Anc LIT	0,4 µl
Sonden C3435T Sens LIT	0,4 µl
BSA 1:10	0,6 µl
DMSO	1 µl
H <sub>2</sub> O	11,6 µl
Glukosylase	0,5 µl
Taq DNA-Polymerase	0,3 µl

#### Primersequenzen

MDR11 (Forward Primer)	5'-TGT TTT CAG CTG CTT GAT GG-3'
MDR12 (Reverse Primer)	5'-AAG GCA TGT ATG TTG GCC TC-3'

#### Sondensequenzen

C3435T Sens LIT	5'-GGA AGA GAT CGT GAG GGC AG-Flu
C3435T Anc LIT	5'-LC-Red640-GAC AAC AGC CGG GTG GTG TCA-ph

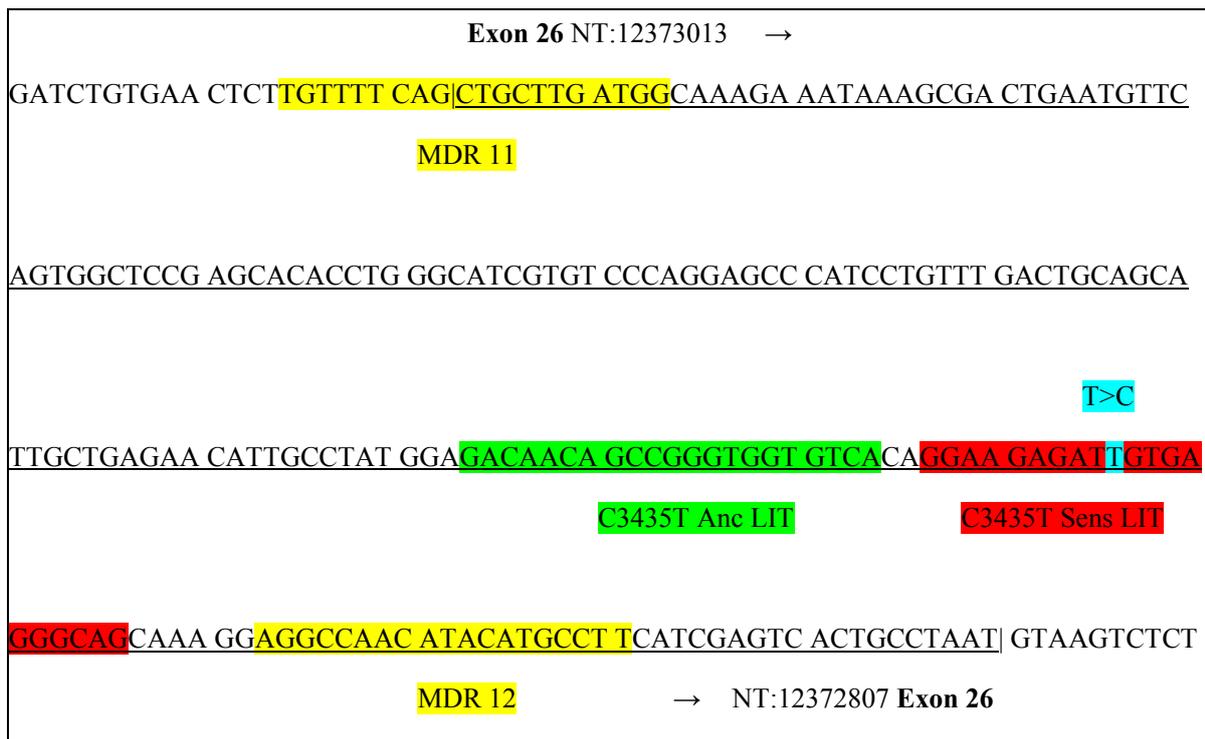


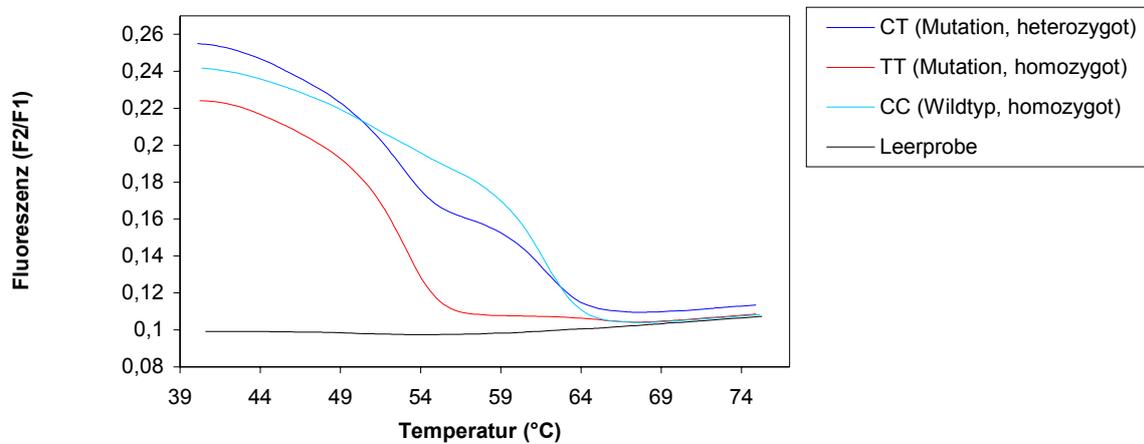
Abbildung 4: Sequenz des *MDRI* Exon 26 mit Primern und Sonden [60]

### Cycler Programm

	Temperatur in °C	Hold in Sekunden	Slope in °C/Sekunde
Denaturierung	94	30	20
Amplifikation	94	10	20
	55	20	20
	72	20	2
Schmelzkurve	94	40	20
	40	120	10
	75	0	0,1
Kühlen	40	10	20

Es wurden 55 Zyklen durchlaufen. Fluoreszenz-Modus: F2/F1

## Schmelzkurve



## 1. Ableitung

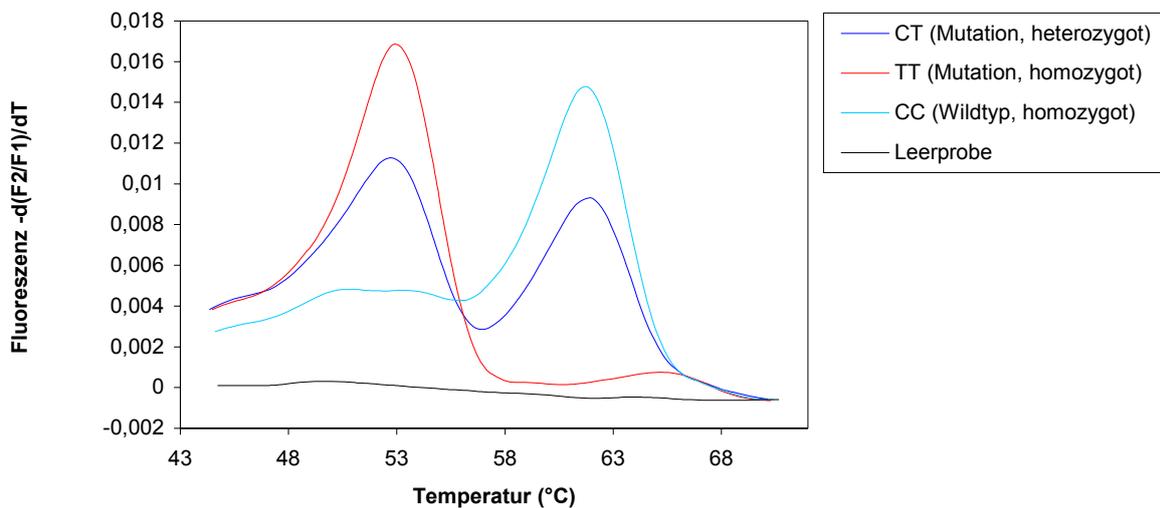


Abbildung 5: Typische Schmelzkurven und die erste Ableitung der verschiedenen Genotypen des *MDR1* Exon 26

Proben mit einem Schmelzpunkt bei 64°C sind homozygote Wildtypen (Basenpaar CC). Homozygote Mutanten (Basenpaar TT) haben ihren Schmelzpunkt bei 55°C. Heterozygote Proben (Basenpaar CT) zeigen zwei Schmelzpunkte bei 55°C und 64°C.

## 2.5. Statistik

Der Hauptzielparameter dieser Arbeit war die Frage nach der Anfälligkeit, an Harnblasenkrebs zu erkranken in Abhängigkeit von zwei häufig vorkommenden Polymorphismen des *MDR1*-Gens. Da es sich um eine Fall-Kontroll-Studie handelt, wurde diese Assoziation mittels Odds-Ratio und 95% Konfidenzintervall quantifiziert. Störgrößen (Confounder), zum Beispiel Alter und BMI, wurden mit Hilfe der logistischen Regression berücksichtigt. Die Modellwahl erfolgte mit einer Rückwärtsselektion anhand des Likelihood Ratio Tests auf dem 5% Niveau.

Darüber hinaus stützt sich die statistische Auswertung überwiegend auf den Chi-Quadrat-Test (Vergleich der beobachteten mit den erwarteten Häufigkeiten) und den Exakten Test nach Fisher für kategoriale Daten (Vergleich kleiner Stichproben). Weiterhin wurden der Nichtparametrische Test nach Mann-Whitney (Vergleich zweier unabhängiger Stichproben) und der Test nach Kruskal-Wallis (Vergleich mehrerer unabhängiger Stichproben) für ordinale oder kontinuierliche Daten angewendet. Als Signifikanzniveau galt  $P=0,05$ . Für multiples Testen wurde nicht adjustiert. Unterschiede in der Häufigkeit der Gene und Allele wurden als Odds-Ratio mit 95% Konfidenzintervall quantifiziert. Zusätzlich wurde der P-Wert des  $\chi^2$ -Tests angegeben. Die Berechnungen wurden mit SPSS Version 12 vorgenommen.

Die Haplotypzerlegung wurde *in silico* mit dem Programm PHASE 2.0 [62,63] bestimmt, das Genotypsequenzen in populationsgenetisch plausible Haplotypaare zerlegt. Haplotypen ergeben sich aus den spezifischen Kombinationen der Mutationen in den beiden Chromosomen.

### 3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden 428 polnische Patienten mit Harnblasenkrebs und 465 gesunde polnische Probanden auf Polymorphismen (SNPs) in den *MDRI*-Genorten G2677T/A (Exon 21) und C3435T (Exon 26) untersucht.

#### 3.1. Vergleich der demographischen Daten des Patienten- und Kontrollkollektivs

Die demographischen Daten des Patienten- und Kontrollkollektivs sind in Tabelle 2 aufgeführt. Dabei zeigte sich hinsichtlich der Parameter Geschlecht, Alter, Größe und Gewicht eine ähnliche Verteilung zwischen Fällen und Kontrollen. Nur bezüglich des Raucherstatus war ein signifikanter Unterschied (Odds-Ratio = 1,84; 95% Konfidenzintervall [1,39-2,45];  $P < 0,0001$ ) zu erkennen mit einem deutlichen Überwiegen der Raucher bei den Harnblasenkrebspatienten. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde die weitere Auswertung zusätzlich nach Rauchern und Nichtrauchern getrennt durchgeführt.

Mit dem Mann-Whitney-Test wurde untersucht, ob die Verteilungen der Variablen Alter und BMI dieselben sind in der Gruppe der Harnblasenkrebspatienten und in der Kontrollgruppe. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Verteilungen zwischen beiden Gruppen.

Tabelle 2: Demographische und anamnestische Daten des Patienten- und Kontrollkollektivs

	<b>Harnblasenkrebs</b> n=428	<b>Kontrollen</b> n=465	<b>Gesamt</b> n=893	<b>Odds Ratio mit 95% Konfidenz- intervall</b>
<b>Geschlecht</b>				
Frauen (n/%)	59 (13,8%)	69 (14,8%)	128 (14,3%)	1,09 [0,74-1,61]
Männer (n/%)	369 (86,2%)	396 (85,2%)	765 (85,7%)	
<b>Alter</b>				
Spannweite (Jahre)	33 - 87	34 - 84	33 - 87	1,00 [0,76-1,31]
Median (Jahre)	61	61	61	
Alter < 61 Jahre	235 (54,9%)	255 (54,8%)	490 (54,9%)	
Alter > 61 Jahre	193 (45,1%)	210 (45,2%)	403 (45,1%)	

<b>Größe</b>				
Spannweite (cm)	149 - 194	144 - 198	144 - 198	
Median (cm)	172	171	172	
<b>Gewicht</b>				
Spannweite (kg)	50 - 130	47 - 122	47 - 130	
Median (kg)	80	77	79	
<b>BMI im Mittel</b>				
< 30	27,0	26,3	26,7	1,16 [0,86-1,57]
< 30	295 (68,9%)	335 (72,0%)	630 (70,5%)	
> 30	133 (31,1%)	130 (28,0%)	263 (29,5%)	
<b>Raucherstatus*</b>				
Nichtraucher (N/%)	220 (52,8%)	313 (67,3%)	533 (60,4%)	1,84 [1,39-2,45]
Raucher (N/%)	197 (47,2%)	152 (32,7%)	349 (39,6%)	

\*Für 12 Harnblasenkrebspatienten fehlten die Angaben zum Raucherstatus.

### 3.2. Häufigkeitsverteilung der *MDRI*-Genotypen/Einzel-SNP-Analyse

Tabelle 3: Verteilung der *MDRI*-Genotypen im Blasenkrebs- und Kontrollkollektiv

SNP C3435T	Harnblasenkrebs		Kontrollen		Odds-Ratio mit 95% Konfidenzintervall	P-Wert $\chi^2$
	n=428	%	n=465	%		
CC	81	18,9	115	24,7	1 (Referenz)	0,106
CT	234	54,7	240	51,6	0,72 [0,51-1,03]	
TT	113	26,4	110	23,7	0,69 [0,46-1,03]	
SNP G2677T/A						
GG	147	34,3	152	32,7	0,91 [0,67-1,23]	0,509
GT	198	46,3	226	48,6	1 (Referenz)	
GA	7	1,6	10	2,2	1,5 [0,43-3,72]	
TT	64	15,0	71	15,3	0,97 [0,65-1,46]	
TA	12	2,8	6	1,3	0,44 [0,14-1,28]	

In Tabelle 3 und Abbildung 6 auf Seite 29 sind die Häufigkeiten der *MDRI*-Genotypen der beiden untersuchten Polymorphismen dargestellt. Beim Vergleich der Häufigkeitsverteilungen der Genotypen von SNP C3435T zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Allerdings ist der Genotyp CC mit 18,9% in der Gruppe der Harnblasenkrebspatienten gegenüber 24,7% in der Kontrollgruppe leicht unterrepräsentiert.

Beim SNP G2677T/A zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung zwischen beiden Gruppen.

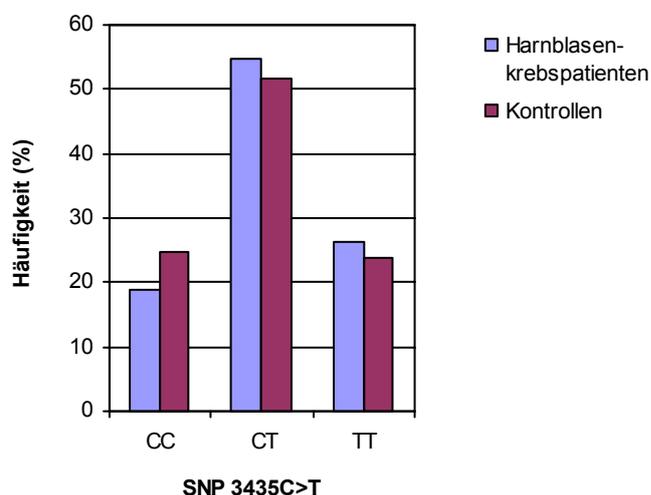


Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung des *MDR1* SNP C3435T im Harnblasenkrebs- und im Kontrollkollektiv

Wird ein dominantes Erbmodell des SNP C3435T angenommen (Tabelle 4, Abbildung 7 auf Seite 30), indem die Genotypen CT und TT zusammengefasst werden, so ergibt sich mit  $P=0,036$  (Odds-Ratio = 1,41; 95% Konfidenzintervall [1,01-1,97]) ein signifikanter Befund: Das T-Allel des SNP C3435T ist im Kollektiv der Harnblasenkrebspatienten überrepräsentiert.

Tabelle 4: Häufigkeit der Ausprägung der Eigenschaften C und T von SNP C3435T im Harnblasen- und Kontrollkollektiv bei Annahme einer dominanten Vererbung von T

SNP C3435T	Harnblasenkrebs		Kontrollen		Odds Ratio mit 95% Konfidenzintervall	P-Wert $\chi^2$
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent		
CC	81	18,9%	115	24,7%	1,41 [1,01-1,97]	0,036
CT+TT	347	81,1%	350	75,3%		

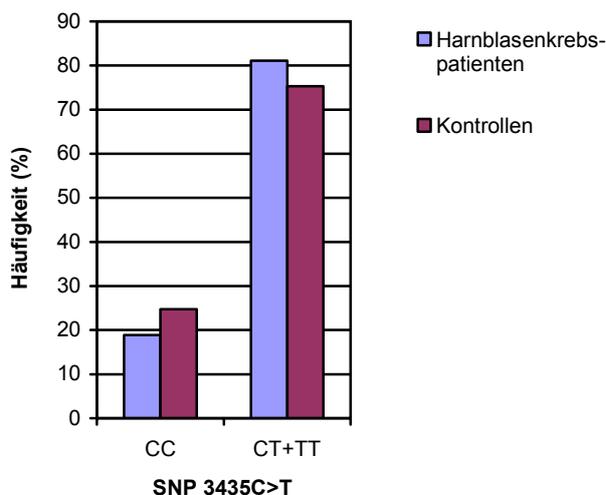


Abbildung 7: Häufigkeit der Ausprägung der Eigenschaften C und T von SNP C3435T im Harnblasen- und Kontrollkollektiv bei Annahme einer dominanten Vererbung von T

Bei Berücksichtigung des Raucherstatus zeigte sich der Genotyp CC von C3435T in der Gruppe der Nichtraucher unter den Harnblasenkrebspatienten tendenziell unterrepräsentiert (Tabelle 5). Nimmt man an, dass die Mutation dominant ist, zeigt sich mit  $P=0,053$  (Odds-Ratio = 1,55; 95% Konfidenzintervall [0,97-2,49]) eine grenzwertige Signifikanz (Tabelle 6, S. 31). Für die Raucher ergab sich bezüglich SNP C3435T kein Unterschied. Keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen zeigten sich bezüglich SNP G2677T/A, weder bei Rauchern noch bei Nichtrauchern.

Tabelle 5: Verteilung der Genotypen im Blasenkrebs- und Kontrollkollektiv nach dem Raucherstatus

SNP C3435T	Nichtraucher		Raucher	
	Harnblasenkrebs	Kontrollen	Harnblasenkrebs	Kontrollen
CC	35 (16%)	71 (23%)	45 (23%)	44 (29%)
CT	125 (57%)	160 (51%)	103 (52%)	80 (53%)
TT	60 (27%)	82 (26%)	49 (25%)	28 (18%)
Gesamt	220 (100%)	313 (100%)	197 (100%)	152 (100%)
<b>P-Wert <math>\chi^2</math></b>	0,148		0,238	
<b>Odds Ratio mit 95% Konfidenzintervall</b>	CC vs. CT: 0,63 [0,38-1,03]		CC vs. CT: 0,79 [0,46-1,36]	
	CC vs. TT: 0,67 [0,39-1,18]		CC vs. TT: 0,58 [0,30-1,14]	

Tabelle 6: Häufigkeit der Ausprägung der Eigenschaften C und T von SNP C3435T bei den Nichtrauchern beider Studienkollektive bei Annahme einer dominanten Vererbung von T

SNP C3435T	Harnblasenkrebs		Kontrollen		Odds Ratio mit 95% Konfidenzintervall	P-Wert $\chi^2$
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent		
CC	35	15,9%	71	22,7%	1,55 [0,97-2,49]	0,053
CT+TT	185	84,1%	242	77,3%		

### 3.3. Assoziation zwischen *MDRI*-Genotypen und demographischen Daten adjustiert für potentielle Confounder

Zur Untersuchung der möglichen Störgrößen wurde eine logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Eingeschlossen wurden zunächst Geschlecht, Alter, BMI, Raucherstatus und die Häufigkeitsverteilung der *MDRI*-Genotypen von C3435T und G2677T/A. Das Ergebnis der Rückwärtselimination findet sich in Tabelle 7. Es zeigte sich zum einen ein Einfluss des SNP C3435T bei den Genotypen CT vs CC (Odds-Ratio = 1,44; 95% Konfidenzintervall [1,02-2,02]) und TT vs CC (Odds-Ratio = 1,54; 95% Konfidenzintervall [1,04-2,29]). Zusätzlich fand sich, wie schon im Vergleich der demographischen Daten zu Beginn des Kapitels, eine starke Assoziation bezüglich des Raucherstatus (Odds-Ratio = 1,90; 95% Konfidenzintervall [1,44-2,50]). Somit können sowohl der Nikotinabusus als auch die Genotypen CT und TT des SNP C3435T als potentielle Risikofaktoren für die Krebsentstehung angenommen werden. Für den SNP G2677T/A konnte keine signifikante Assoziation errechnet werden.

Tabelle 7: Logistische Regressionsanalyse

Störgrößen	Regressionskoeffizient	Standardfehler	Odds-Ratio	95% Konfidenzintervall
Raucher	0,639	0,14	1,90	1,44-2,50
C3435T				
CT	0,362	0,175	1,44	1,02-2,02
TT	0,431	0,202	1,54	1,04-2,29

### 3.4. Korrelation zwischen *MDR1*-Genotypen und Tumorstadium und -differenzierung

Es zeigte sich bei C3435T versus Differenzierungsgrad ein signifikanter Unterschied ( $P=0,014$ ) (Abbildung 8), der sich als Trend ebenfalls bei den Rauchern unter den Harnblasenkarzinompatienten findet. Der Genotyp CC zeigt sich bei den gut differenzierten Tumoren (G1) deutlich unterrepräsentiert und in den mäßig differenzierten Tumoren (G2) entsprechend überrepräsentiert. Die schlecht differenzierten bzw. undifferenzierten Karzinome weisen in allen drei Genotypen eine ähnliche Verteilung auf.

Beim Tumorstadium versus C3435T zeigt sich gleichfalls ein Trend mit einem Überwiegen des CC-Genotyps bei den Bindegewebe und Muskulatur infiltrierenden Karzinomen sowie einer Unterrepräsentation bei den nicht-invasiven papillären Karzinomen. In der Untergruppe der Raucher zeigt sich ein signifikantes Ergebnis ( $P=0,027$ ; Abbildung 9, S. 33).

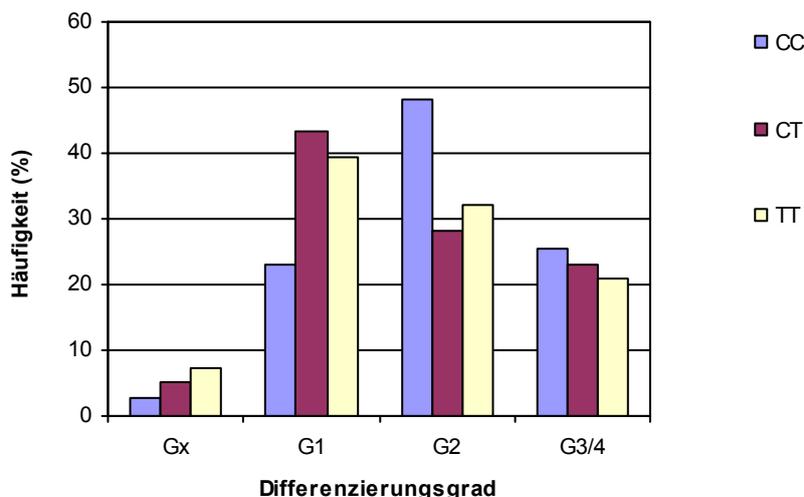


Abbildung 8: Prozentuale Verteilung der Genotypen von SNP C3435T auf verschiedene Tumordifferenzierungsgrade bei Harnblasenkrebspatienten. Zu erkennen ist eine Überrepräsentation des Genotyps CC bei den mäßig differenzierten Tumoren.

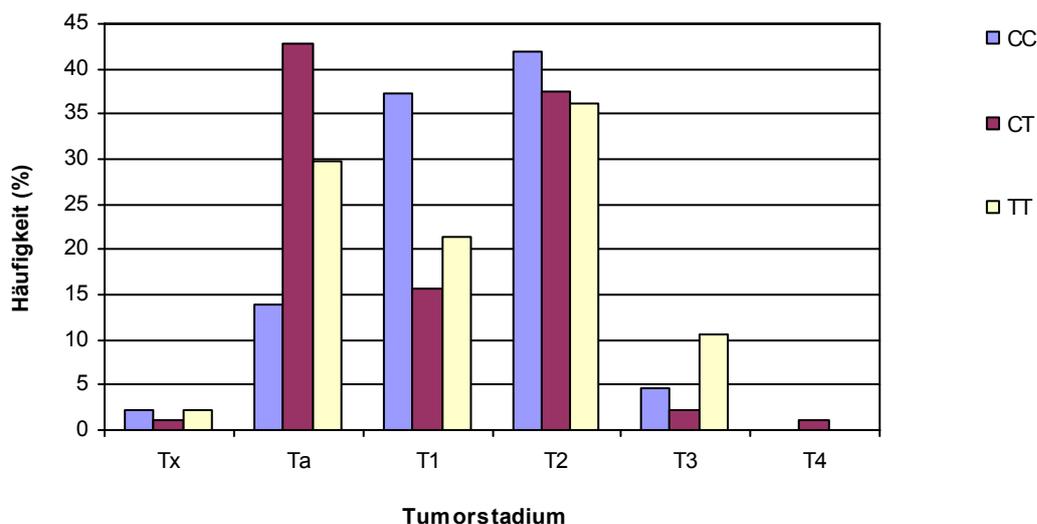


Abbildung 9: Prozentuale Verteilung der Genotypen von SNP C3435T auf verschiedene Tumorstadien bei Rauchern. Festzustellen ist eine signifikante Überrepräsentation des Genotyps CC bei den Karzinomen mit Infiltration der Lamina propria und des Genotyps CT bei den nicht-invasiven papillären Karzinomen.

Im Gegensatz dazu besteht zwischen Tumorstadium und -differenzierung und den verschiedenen Genotypen von G2677T/A sowohl in der Gesamtgruppe als auch in der Untergruppe der Nichtraucher kein signifikanter Zusammenhang.

### 3.5. Häufigkeitsverteilung der *MDR1*-Haplotypen

Mit den üblichen Genotypisierungsmethoden kann bei Heterozygotie schon von zwei SNPs nicht unterschieden werden, ob die beiden von der Referenz abweichenden Basen auf demselben Chromosom sitzen oder sich auf die beiden homologen Chromosomen verteilen. Die Abfolge der spezifischen Allele an mehreren SNP-Positionen entlang eines Chromosoms wird als Haplotyp bezeichnet. Da die exakte Bestimmung von Haplotypen im Labor aufwändig ist, begnügt man sich in der Regel mit der statistischen Schätzung der jeweils wahrscheinlichsten Haplotypenpaare der einzelnen Individuen; sichere Haplotypenpaare sind dabei dann solche, bei denen höchstens ein heterozygoter SNP vorliegt. Für diese Studie wurde das Programm PHASE 2.0 zur Haplotypschatzung benutzt.

## Ergebnisse

Die absoluten und relativen Häufigkeiten der Haplotypen bezüglich der beiden polymorphen Gene C3435T und G2677T/A finden sich in der nachfolgenden Tabelle 8.

Tabelle 8: Haplotypfrequenzen

Haplotyp	Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit
C/G	785	0,422
T/T	643	0,346
T/G	296	0,159
C/T	100	0,054
C/A	20	0,011
T/A	16	0,009

Assoziationsuntersuchungen auf der Grundlage von Haplotypendaten können auf mehreren Vererbungsmodellen basieren. Im additiven Modell wird für jeden Haplotyp eine Variable generiert, die den Erbgang widerspiegelt. Die Variable nimmt die Werte 0/0, 1/0 oder 1/1 an, je nachdem, ob der betreffende Proband diesen Haplotypen nicht, einmal oder zweimal besitzt. Beim Modell des dominanten Erbgangs werden die Probanden für jeden Haplotyp danach unterschieden, ob der Haplotyp mindestens einmal (Kodierung 1/0 oder 1/1) oder gar nicht (Kodierung 0/0) präsent ist. Die Verteilungen der so erzeugten Variablen mit den möglichen Werten 0/0, 1/0 und 1/1 werden jeweils auf Gleichheit in den beiden Gruppen Harnblasenkrebspatienten und Kontrollpatienten getestet (Tabellen 9a/b, S. 35).

Tabelle 9a: Häufigkeit der gefundenen Haplotypenpaare in den beiden Studienkollektiven

Genotyp	Harnblasenkrebs						Kontrollen						P-Wert $\chi^2$
	0/0		1/0		1/1		0/0		1/0		1/1		
Haplotyp	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
C/A	416	97,2	12	2,8	0	0	458	98,5	7	1,5	0	0	n.s.
C/G	139	32,5	228	53,3	61	14,3	140	30,1	253	54,4	72	15,5	n.s.
C/T	396	92,5	30	7	2	0,5	405	87,1	54	11,6	6	1,3	0,024
T/A	421	98,4	7	1,6	0	0	456	98,1	9	1,9	0	0	n.s.
T/G	297	69,4	113	26,4	18	4,2	340	73,1	107	23	18	3,9	n.s.
T/T	171	40	210	49,1	47	11	203	43,7	216	46,5	46	9,9	n.s.

Tabelle 9b: Häufigkeit der Merkmalsausprägung bei Annahme eines dominanten Erbgangs der jeweiligen Haplotypenpaare in den beiden Studienkollektiven

Genotyp	Harnblasenkrebs				Kontrollen				P-Wert $\chi^2$
	1/0 oder 1/1		0/0		1/0 oder 1/1		0/0		
Haplotyp	N	%	N	%	N	%	N	%	
C/A	12	2,8	416	97,2	7	1,5	458	98,5	n.s.
C/G	289	67,5	139	32,5	325	69,9	140	30,1	n.s.
C/T	32	7,5	396	92,5	60	12,9	405	87,1	0,008
T/A	7	1,6	421	98,4	9	1,9	456	98,1	n.s.
T/G	131	30,6	297	69,4	125	26,9	340	73,1	n.s.
T/T	257	60	171	40	262	56,3	203	43,7	n.s.

0/0 Haplotyp nicht vorhanden, 1/0 heterozygot, 1/1 homozygot

Beim Vergleich der *MDR1*-Haplotyp-Verteilungen zwischen den Fällen und den Kontrollen war der Haplotyp C/T in der Kontrollgruppe signifikant überrepräsentiert ( $P=0,024$ ). Dabei sind sowohl Probanden mit einem als auch mit zwei Haplotypen häufiger anzutreffen. Nimmt man einen dominanten Erbgang an, wird dieser Unterschied mit  $P=0,008$  (Odds-Ratio=1,83; 95% Konfidenzintervall [1,17-2,88]) noch deutlicher (Abbildung 10, S. 36). Dieses Ergebnis hat auch bei der sicheren Haplotypzerlegung Bestand. Somit ist der Haplotyp C3435/2677T in der Gruppe der Harnblasenkrebspatienten deutlich weniger vertreten. Die Berechnung des rezessiven Erbgangs ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen.

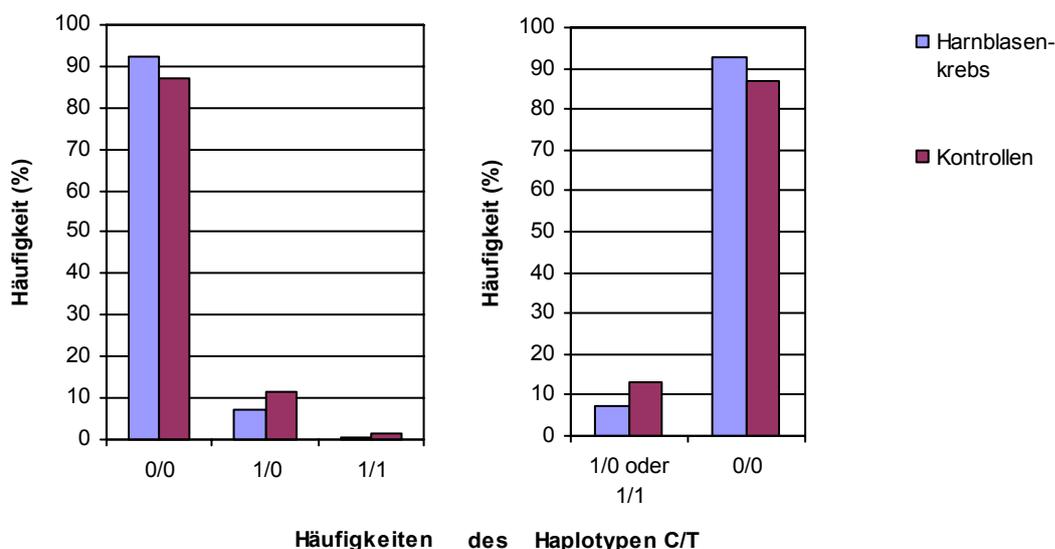


Abbildung 10: Häufigkeit des Haplotypen C/T bei Harnblasenkrebspatienten und Kontrollen (links) und der sich daraus ergebenden Häufigkeit der Merkmalsausprägung bei Annahme eines dominanten Erbgangs (rechts)

Werden Raucher und Nichtraucher getrennt betrachtet (Tabelle 10a), zeigt sich für die Nichtraucher das gleiche Bild, nämlich eine signifikante Überrepräsentation des Haplotypen C/T ( $P=0,024$ ) bei den Kontrollen, die bei einem angenommenen dominanten Erbgang (Tabelle 10b, S. 37) noch deutlicher wird (Odds-Ratio=2,55; 95% Konfidenzintervall [1,27-5,11];  $P=0,008$ ). In der Gruppe der Raucher konnte keiner dieser statistischen Effekte nachgewiesen werden.

Tabelle 10a: Häufigkeit des Haplotypenpaares C/T bei Rauchern und Nichtrauchern in beiden Studienkollektiven

Genotyp	Harnblasenkrebs						Kontrollen						P-Wert $\chi^2$
	0/0		1/0		1/1		0/0		1/0		1/1		
Haplotyp	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
<b>Nichtraucher</b>													
C/T	209	95	10	4,5	1	0,5	276	88,2	35	11,2	2	0,6	0,024
<b>Raucher</b>													
C/T	177	89,4	19	9,6	1	0,5	129	84,9	19	12,5	4	2,6	n.s.

Tabelle 10b: Häufigkeit der Merkmalsausprägung C/T bei Annahme eines dominanten Erbgangs bei Rauchern und Nichtrauchern in beiden Studienkollektiven

Genotyp	Harnblasenkrebs				Kontrollen				P-Wert $\chi^2$
	1/0 oder 1/1		0/0		1/0 oder 1/1		0/0		
Haplotyp	N	%	N	%	N	%	N	%	
<b>Nichtraucher</b>									
C/T	11	5	209	95	37	11,8	276	88,2	0,007
<b>Raucher</b>									
C/T	20	10,2	177	89,8	23	15,1	129	84,9	n.s.

### 3.6. Daten zur Histopathologie der Fallpatienten mit Harnblasentumor

Nach histopathologischer Begutachtung des Karzinomgewebes (Tabelle 11) stellte sich heraus, dass nicht-invasive papilläre Karzinome (Ta) mit 39,7% am häufigsten waren. Mit geringem Abstand folgten die muskelinvasiven Karzinome (T2: 36,2%) und an dritter Stelle in der Häufigkeitsverteilung standen Karzinome mit subepithelialer Infiltration (T1: 18,5%). Organüberschreitendes Wachstum (T3/4) fand sich bei weniger als 5% der untersuchten Harnblasenkarzinome.

Insgesamt waren die Tumorzellen überwiegend gut bis mäßig differenziert (71,7%), 23% schlecht bis undifferenziert. Eine Minderheit von 5,3% konnte nicht beurteilt werden.

Tabelle 11: Klassifikation des Primärtumors und histopathologischer Differenzierungsgrad im Patientenkollektiv, zusätzlich nach dem Raucherstatus unterteilt

Tumorstadium*	Gesamt		Nichtraucher		Raucher	
	n=401	%	n=204	%	n=186	%
Tx	3	0,7	0	0	3	1,6
Ta	159	39,7	93	45,6	61	32,8
T1	74	18,5	32	15,7	41	22
T2	145	36,2	69	33,8	71	38,2
T3	17	4,2	8	3,9	9	4,8
T4	3	0,7	2	1	1	0,5
			P-Wert ( $\chi^2$ ) = 0,065			

## Ergebnisse

Differenzierungsgrad*	n=413		n=210		n=192	
Gx	22	5,3	11	5,2	11	5,7
G1	159	38,5	99	47,1	54	28,1
G2	137	33,2	61	29	74	38,5
G3/4	95	23	39	18,6	53	27,6
			P-Wert ( $\chi^2$ ) = 0,001			

\*Für 27 Harnblasenkrebspatienten fehlten die Angaben zum Primärtumor und/oder Differenzierungsgrad.

Es fand sich ein deutlicher Hinweis auf eine Assoziation der Variablen Raucherstatus und Differenzierungsgrad ( $P=0,001$ ). Der Einfluss des Raucherstatus zeigt sich in einer Überrepräsentation der gut differenzierten Tumoren in der Gruppe der Nichtraucher und einer entsprechenden Unterrepräsentation in der Gruppe der Raucher (Abbildung 11). Gleichfalls zeigt sich mit  $P=0,065$  ein Trend im Zusammenhang zwischen Raucherstatus und Tumorgroße. Tumoren mit Infiltration der Nachbarorgane sind in der Gruppe der Raucher zahlreicher vertreten. Bei den Nichtrauchern wuchs die Mehrzahl der Tumoren als nicht-invasives papilläres Karzinom (Tabelle 11, S. 37).

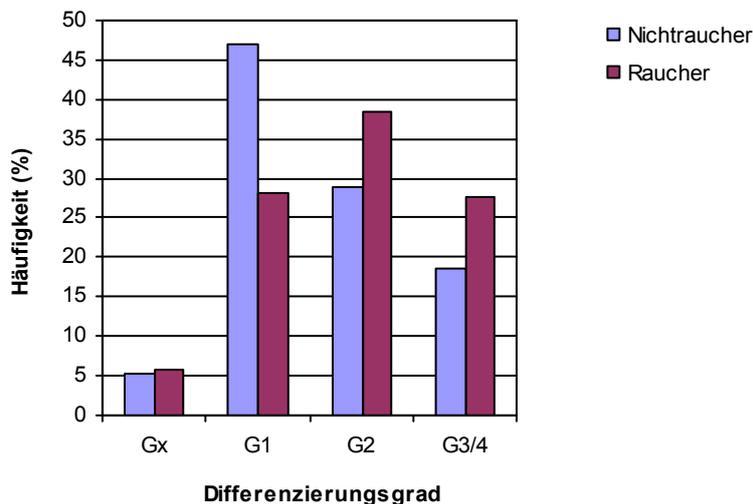


Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung von Harnblasenkarzinomen unterschiedlichen Differenzierungsgrades bei Rauchern und Nichtrauchern

Für Tumorstadium und Differenzierungsgrad ließ sich weder mit der Variablen Alter noch mit der Variablen BMI eine Assoziation nachweisen. Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede in den Verteilungen der Tumordifferenzierung und der Tumorgroße zwischen männlichen und weiblichen Patienten ermittelt werden.

## 4. Diskussion

### 4.1. Häufigkeitsverteilung der *MDR1*-Genotypen

Die Einzel-SNP-Analyse der vorliegenden Arbeit ergab eine ähnliche Genotypenverteilung bei Fällen und Kontrollen (SNP C3435T: CC-18,9%/24,7%, CT-54,7%/51,6%, TT-26,4%/23,7%, SNP G2677T/A: GG-34,3%/32,7%, GT-46,3%/48,6%, GA-1,6%/2,2%, TT-15%/15,3%, TA-2,8%/1,3%). Die von uns gefundenen Häufigkeiten stimmen damit weitgehend mit den Genotypenfrequenzen überein, die Kurzawski et al. in ihrer Untersuchung von 204 polnischen Individuen kaukasischen Ursprungs ermittelt haben (SNP C3435T: CC-22%, CT-51%, TT-27%, SNP G2677T/A: GG-38,7%, GT-39,7%, GA-2%, TT-17,6%, TA-2%) [64], wobei in der von uns untersuchten Gruppe der Genotyp 2677GT etwas häufiger auftrat und der Genotyp 2677GG dementsprechend seltener war. Die Resultate dieser Arbeit, wie auch von anderen Studien an polnischen Probanden [65,66,67], stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Jamroziak und Kollegen, die in einer Gruppe von 122 polnischen Individuen eine höhere Frequenz des 3435C-Allels beobachtet hatten [68]. Da die beiden SNPs C3435T und G2677T/A im Kopplungsungleichgewicht stehen, hätte das 2677G-Allel auch entsprechend häufiger auftreten müssen, was jedoch nicht berichtet wurde [66].

Untersuchungen anderer europäischer Populationen erbrachten mit den vorliegenden Daten übereinstimmende Allel- und Genotypenfrequenzen [44,46,69,70]. Jedoch zeigen Allelfrequenzen große interethnische Unterschiede: So hat das 3435T-Allel bei Kaukasiern und Asiaten eine Frequenz von annähernd 50%, bei Afrikanern dagegen um ca. 20% [43,46,47,70,71,72,73]. Auch das 2677T-Allel ist in afrikanischen Populationen weniger häufig (unter 20%) als bei Kaukasiern und Asiaten (ca. 40-45%). Das 2677A-Allel wurde bisher nur sehr selten bei Afrikanern gefunden, bei Kaukasiern beträgt die Allelfrequenz ca. 2-10% und bei Asiaten bis zu ca. 20% [43,48,71,74,75].

### 4.2. Einfluss von SNP G2677T/A und SNP C3435T auf die P-Gp-Aktivität und -Funktion

#### In-vitro- und Ex-vivo-Untersuchungen

Der SNP G2677T/A bewirkt einen Aminosäureaustausch. Dabei wird Alanin durch Serin, d. h. eine lipophile durch eine hydrophile Aminosäure ersetzt. Die strukturelle Neutralität wird

---

aufgehoben, was die Sekundärstruktur und damit die Substrat-Bindungsstelle beeinflussen könnte. Verschiedene Arbeitsgruppen haben herauszufinden versucht, inwieweit sich der G2677T/A-Polymorphismus auf P-Gp-Expression und -Funktion auswirkt.

Salama und Mitarbeiter [76] untersuchten die transepitheliale Transportfunktion verschiedener P-Gp-Varianten in kultivierten proximalen Tubulusepithelzellen der Schweineniere (LLC-PK1-Zellen). Dabei zeigte die Variante 2677T eine deutlich reduzierte Transportfunktion im Vergleich zum Wildtyp, wobei das Ausmaß substratabhängig zu sein schien. Einige Jahre zuvor hatten Morita und Mitarbeiter beim Experimentieren mit der gleichen Zelllinie beobachtet, dass sich der SNP G2677T/A nicht auf die P-Gp-Aktivität auswirkt [77].

Eine andere Gruppe untersuchte die Transportkinetik von P-Gp-Varianten in einem Membranvesikelsystem aus kultivierten Insektenzellen (HighFive-Zellen) [78]. Es stellte sich heraus, daß die Varianten 2677A und 2677T bei diesem Versuchsaufbau eine erheblich höhere Transportkapazität als der Wildtyp haben: Im Vergleich zum Wildtyp war die Transportrate für Vincristin bei Vesikeln mit der Variante 2677A dreimal und von solchen mit der Variante 2677T 1,5mal so hoch. Die Hemmbarkeit des Transports durch unterschiedliche P-Gp-Substrate war substrat- und variantenabhängig. In einem anderen In-vitro-Membransystem, das ebenfalls aus Insektenzellen hergestellt wurde (Sf9-Zellen), bestätigten Sakurai und Mitarbeiter, dass die Aktivität der verschiedenen 2677-Varianten unterschiedlich und vom Substrat abhängig ist [75].

Bei der Proteinexpression fand die eben beschriebene Arbeit keine Unterschiede. Dagegen beobachteten Haenisch und Mitarbeiter in gesunden Kortexzellen von Patienten mit Nierenzellkarzinomen eine höhere *MDRI*-mRNA-Konzentration bei Trägern des 2677T- und 2677A-Allels [79], während Schwarz und Mitarbeiter in Duodenalmukosazellen gesunder Probanden bei Trägern der Allelvarianten eine niedrigere *MDRI*-mRNA-Konzentration als bei Wildtypträgern feststellten [80]. Sowohl bei den Nierenkarzinompatienten als auch bei den gesunden Probanden handelte es sich um Kaukasier.

Ein Grund für diese widersprüchlichen Befunde können die unterschiedlichen Versuchsansätze und -bedingungen sein, mit denen die einzelnen Forschergruppen gearbeitet haben. Anhand der geschilderten Versuchsergebnisse kann jedoch keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob und ggf. in welche Richtung die 2677-Varianten Expression und Funktion von P-Gp beeinflussen.

Der Polymorphismus **C3435T** ist ein „stiller“ SNP, der keine Änderung in der Aminosäuresequenz bewirkt (Isoleucin>Isoleucin) und sich ebenfalls nicht in der Promoterregion des *MDR1*-Gens befindet. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass dieser SNP die P-Gp-Expression direkt beeinflusst. Dennoch wurden im gesunden Nierengewebe von Nierenkarzinompatienten bei Trägern des 3435T-Allels höhere *MDR1*-mRNA-Konzentrationen als bei Wildtypträgern gefunden [79]. In der Duodenalschleimhaut dagegen wurde bei gesunden homozygoten 3435T-Trägern eine deutlich niedrigere P-Gp-Expression als bei Wildtypträgern beobachtet [41]. Auch die CD56<sup>+</sup>-Zellen gesunder kaukasischer Probanden mit TT-Genotyp zeigten eine geringere *MDR1*-mRNA-Konzentration als die von Probanden mit CC-Genotyp [81]. Wang und Mitarbeiter untersuchten die mRNA-Expression in Material aus Leberbiopsien (überwiegend weiße US-Amerikaner) und fanden in Proben von homozygoten T-Allel-Trägern deutlich kleinere Werte als bei Proben von Wildtypträgern, die Werte der Heterozygoten lagen dazwischen [82]. In einer Metaanalyse kommen Chowbay und Mitarbeiter zu dem Ergebnis, dass die intestinale MDR1-Expression bei homozygoten kaukasischen Wildtypträgern geringer ist als bei den Genotypen 3435CT- und 3435TT [51].

Morita und Mitarbeiter fanden in ihrem Transportassay mit LLC-PK1-Zellen keinen signifikanten Unterschied zwischen der Transportaktivität von Zellen mit Wildtypallel und solchen mit der 3435T-Variante [77], während Salama und Mitarbeiter an den gleichen Zellen mit der 3435T-Variante eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant niedrigeren transmembranären Transport beobachtet haben [76]. Auch die P-Gp-Transportleistung, die in einem Ex-vivo-Ansatz mit CD56<sup>+</sup>-Zellen gesunder kaukasischer Probanden gemessen wurde, war bei den Zellen von Trägern des TT-Genotyps geringer als bei solchen von Wildtypträgern [81].

Die vorliegenden Versuchsergebnisse bezüglich des SNP C3435T weisen somit ebenfalls nicht alle in eine Richtung, scheinen aber tendenziell eher darauf hinzudeuten, dass das T-Allel mit einer reduzierten P-Gp-Funktion assoziiert ist. Die Frage, inwieweit ein stummer, nichtcodierender SNP überhaupt Einfluß auf die Proteinstruktur oder -expression haben kann, ist Gegenstand verschiedener Hypothesen. Wang und Mitarbeiter [82] hatten in einem aufwendigen Versuchsaufbau, bei dem verschiedene *MDR1*-Varianten mittels Transfektion in Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster eingebracht worden waren, beobachtet, dass die 3435T-Variante mit niedrigeren mRNA-Konzentrationen einhergeht. Diese Autoren konnten außerdem zeigen,

dass 3435T eine Änderung der Sekundärstruktur der mRNA nach sich zieht, die die mRNA-Stabilität beeinflusst. Kimchi-Sarfaty und Mitarbeiter beobachteten, dass 3435T in Kombination mit einem oder zwei anderen Polymorphismen die Struktur der Bindungsstelle für Substrate und Inhibitoren von P-Gp verändert. Diese Autoren vertreten die Ansicht, dass die Verwendung seltener Codons – wie beispielsweise bei 3435T – die Geschwindigkeit der Translation beeinflusst und damit Auswirkungen hat auf die gleichzeitig stattfindende Faltung des P-Gp-Moleküls und dessen Einbau in die Membran, was auch Folgen für die Substratspezifität haben kann [83].

### **Pharmakokinetische In-vivo-Untersuchungen**

Eine Methode, die P-Gp-Aktivität in vivo zu messen, sind Plasmaspiegelbestimmungen nach Gabe von P-Gp-Substraten. Zu den häufig verwendeten Modellsubstraten gehört Digoxin.

Larsen und Mitarbeiter untersuchten nach einer Einmaldosis von 0,5 mg die Plasmaspiegel von Digoxin bei 30 gesunden kaukasischen Probanden. Die Versuchsteilnehmer wurden hinsichtlich G2677T/A und C3435T genotypisiert. Homozygote Träger des Wildtyps von C3435T hatten deutlich niedrigere AUC<sub>0-4</sub>-Werte als Heterozygote und TT-Träger, was darauf hinweist, dass das Wildtypallel eine höhere P-Gp-Aktivität vermittelt. Der Polymorphismus G2677T/A hatte keinen Einfluß auf die Digoxinplasmaspiegel [84]. Schon einige Jahre zuvor hatte die Metaanalyse von Chowbay und Mitarbeitern gezeigt, dass bei Kaukasiern mit zwei Wildtypallelen die orale Bioverfügbarkeit von Digoxin tendenziell niedriger ist als beim TT-Genotyp. Studien mit Japanern ergaben genau den entgegengesetzten Trend [51]. Daraus kann man den Schluß ziehen, dass bei beiden Ethnien andere Faktoren das Ergebnis beeinflussen. Im Interesse einer klaren Hypothesenbildung sollten deshalb die Daten verschiedener Ethnien nicht zusammen betrachtet werden. Im weiteren Verlauf der Diskussion werden – soweit es sich um klinische Daten handelt – nur Untersuchungen mit Kaukasiern berücksichtigt.

Für die beiden Immunsuppressiva Tacrolimus und Ciclosporin A, die beide Substrate von P-Gp sind, liegt eine Reihe von Studien mit Transplantationspatienten vor. Dabei wurden entweder die gemessenen Plasmaspiegel oder der Therapieerfolg (Nichteintreten einer Abstoßungsreaktion) ins Verhältnis zum Genotyp gesetzt. In einer retrospektiven Studie, die die Daten von 106 Nierentransplantationspatienten auswertete, konnten Anglicheau und Mitarbeiter keinen

Zusammenhang zwischen den auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten SNPs und der Kinetik von Ciclosporin A feststellen. Bei der Auswertung nach Haplotypen, die noch den SNP C1236T einschloß, zeigte sich für den Haplotyp TTT ein statistisch nicht signifikanter Trend in Richtung auf höhere AUC-Werte [85].

In einer anderen Studie beobachtete die gleiche Forschergruppe [86] bei 81 Nierentransplantationspatienten, dass homozygote Wildtypträger von G2677T/A oder C3435T einen Monat nach Therapiebeginn mit Tacrolimus zum Erreichen der gewünschten Plasmaspiegel eine höhere Dosis benötigten als homozygote Träger der jeweiligen Varianten; die Werte der Heterozygoten lagen dazwischen. Eine Haplotypanalyse, die die SNPs C1236T, G2677T/A und C3435T einschloß, ergab, dass Patienten mit Wildtypallelen in diesen drei Genorten eine signifikant höhere Tacrolimusdosis benötigten als solche, die ein oder mehrere Varianten trugen.

Hesselink und Mitarbeiter untersuchten die Ciclosporin- bzw. Tacrolimusspiegel bei insgesamt 174 Nierentransplantationspatienten 3 und 12 Monate nach Transplantation. Weder bei den 110 mit Ciclosporin eingestellten Patienten noch bei den Patienten unter Tacrolimus fand sich bei der Dosierung oder in den Plasmaspiegeln Unterschiede zwischen den C3435T-Genotypen [87].

Demgegenüber fand eine Forschergruppe in der Schweiz, die bei 64 Transplantationspatienten (Niere, Leber, Lunge) unter einer festen Ciclosporinmedikation die intrazelluläre Konzentration von Ciclosporin in peripheren Lymphozyten untersuchte, höhere interzelluläre Werte und auch höhere Plasmaspiegel bei Trägern des 3435T-Allels. Der SNP G2677T/A hatte keinen Einfluß [88].

Die Studie einer finnischen Forschergruppe beschäftigte sich mit dem Einfluß einer Reihe genetischer Varianten auf die Ciclosporinkinetik bei Kindern, die vor einer Nierentransplantation standen [89]. In dieser Studie zeigten Patienten mit 2677GG-Genotyp eine höhere prähepatisch Elimination und demzufolge eine niedrigere orale Bioverfügbarkeit als Patienten mit 2677TT-Genotyp; die Werte der Heterozygoten lagen zwischen denen der beiden homozygoten Gruppen. Diese Beobachtung trifft nur für Kinder über 8 Jahren zu.

Ein anderes wichtiges P-Gp-Substrat, für dessen klinische Wirksamkeit der Transporter eine wichtige Rolle spielen könnte, ist die antiretrovirale wirksame Substanz Nelfinavir. Fellay und Mitarbeiter haben die Plasmakonzentrationen von Nelfinavir bei 67 kaukasischen HIV-Patienten

---

gemessen und außerdem CD4-Zellzahl als Wirksamkeitsparameter und die P-Gp-Expression in peripheren Lymphozyten in Abhängigkeit zum C3435T-Polymorphismus dokumentiert [90]. Die Untersucher fanden die niedrigste P-Gp-Expression bei Trägern des 3435TT-Genotyps und die höchste bei homozygoten Wildtypträgern. Es zeigte sich außerdem, dass sich bei HIV-Patienten mit 3435TT-Genotyp die CD4-Zellzahl nach 6 Monaten deutlich besser erholt hatte als bei Patienten mit zwei Wildtypallelen oder Heterozygoten. Paradoxerweise verhielten sich die gemessenen Plasmaspiegel von Nelfinavir anders als erwartet: Patienten mit 3435TT-Genotyp hatten im Mittel die niedrigsten Spiegel und homozygote Wildtypträger die höchsten.

Haas und Mitarbeiter untersuchten ebenfalls die Plasmanelfinavirspiegel in Abhängigkeit von verschiedenen *MDR1*-Polymorphismen in einem großen Kollektiv (n=504) von AIDS-Patienten verschiedener Ethnien. Die Auswertung für die Untergruppe der weißen Patienten (n=177) ergab, dass die beiden Polymorphismen G2677T/A und C3435T keinen signifikanten Einfluß auf die Nelfinavir-AUC-Werte ausüben [91].

Eine andere Forschergruppe hat die Nelfinavir-AUC-Werte in peripheren Lymphozyten von 28 AIDS-Patienten gemessen und die Ergebnisse mit den Genotypen von 89 genetischen Varianten verschiedener Transporter, darunter auch P-Gp, in Beziehung gesetzt [92]. Es zeigte sich, dass Träger von 3435TT größere lymphozytäre AUC-Werte hatten als Patienten mit zwei Wildtypallelen. Für den SNP G2677T/A fand sich keine eindeutige Abhängigkeit.

Aus den hier referierten Untersuchungen läßt sich keine eindeutige Aussage bezüglich der funktionellen Bedeutung der Polymorphismen G2677T/A und C3435T treffen. Es lassen sich aber mit aller Vorsicht folgende Schlüsse ziehen:

a) In-vitro-Versuche zeigen, dass die einzelnen G2677T/A-Varianten unterschiedliche Aktivität haben, die jedoch vom Substrat abzuhängen scheinen. Für die In-vivo-Situation ist keine klare Aussage möglich.

b) Die Mehrzahl der vorliegenden Ergebnisse deutet darauf hin, dass das 3435T-Allel insgesamt eine niedrigere P-Gp-Aktivität vermittelt, wobei offen bleibt, ob diese durch eine geringere P-Gp-Expression, durch ein verändertes Transportermolekül oder durch beides bedingt ist.

### 4.3. Zusammenhang zwischen *MDR1*-Genotypen und Krebs susceptibility

P-Gp ist ein wichtiger Schutzmechanismus des Körpers gegen Xenobiotika. Zu seinen Substraten gehören einige Bestandteile des Tabakrauchs und andere potentielle Kanzerogene [93,94]. Heterozyklische Amine (2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine), die beim Erhitzen von Fleisch entstehen und gleichzeitig Inhaltsstoffe des Tabakrauches sind, wurden ebenfalls als Substrate von P-Glykoprotein beschrieben [95]. Bei einer Schwächung der Transportfunktion können diese Fremdstoffe die Barriere Darmepithel vermehrt passieren und werden über die Nieren langsamer ausgeschieden. Als Folge sind diese und andere Gewebe einer höheren Schadstoffkonzentration ausgesetzt, als dies bei normaler Funktion von P-Gp der Fall wäre.

Die weiter oben dargestellten Untersuchungen zur funktionellen Relevanz von P-Gp-Polymorphismen erlauben die Hypothese, dass bei Trägern von 3435T-Allelen die P-Gp-Aktivität niedriger ist als bei homozygoten Wildtypallelträgern. Diese Menschen sollten daher eine höhere Suszeptibilität für Tumoren haben, in deren Pathogenese - wie beim Harnblasenkarzinom - exogene Kanzerogene von großer Bedeutung sind. Nach dieser Hypothese wäre zu erwarten, dass das 3435T-Allel bei Karzinompatienten häufiger zu finden ist als bei gesunden Kontrollen. Für den Polymorphismus G2677T/A allein läßt sich auf der Grundlage der vorhandenen Daten über die funktionelle Auswirkung keine Hypothese bilden.

Beim Vergleich der Genotypverteilung zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe zeigt sich in der Tat, dass homozygote Wildtypallelträger in der Gruppe der Harnblasenkrebpatienten mit 18,9% gegenüber 24,7% in der Kontrollgruppe leicht unterrepräsentiert sind, ohne dass dieser Unterschied statistische Signifikanz erreicht. Wird ein dominantes Erbmodell durch Zusammenfassen der Genotypen CT und TT zugrunde gelegt, ergibt sich mit  $P=0,036$  (Odds-Ratio = 1,41; 95% Konfidenzintervall [1,01-1,97]) ein signifikanter Befund: Das T-Allel des SNP C3435T ist im Kollektiv der Harnblasenkrebpatienten überrepräsentiert. Mittels logistischer Regressionsanalyse konnten die Genotypen CT und TT sowie der Nikotinabusus als unabhängige Risikofaktoren identifiziert werden. Alle drei Faktoren können als potentielle Risikofaktoren für die Krebsentstehung angenommen werden, da das T-Allel auch bei den Nichtrauchern unter den Harnblasenkrebpatienten überrepräsentiert war.

Beim SNP G2677T/A zeigte sich in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung zwischen Fall- und Kontrollgruppe.

Bei der In-silico-Haplotypenanalyse ergaben sich 6 verschiedene Haplotypen. In der Frequenzverteilung dominierte der Haplotyp C/G mit 42%, es folgten T/T mit 35% und T/G mit 16%. Die seltenen Haplotypen C/T, C/A, T/A lagen unter 6%. Diese Verteilung stimmt mit der ermittelten Haplotypenfrequenz von kaukasischen Individuen aus Polen überein (C/G 45%, T/T 37%, T/G 14%, C/T 1,5%, C/A 0,8%, T/A 1,1%) [64].

Während bei der Genotypenverteilung signifikante Unterschiede nur in den Untergruppen erkennbar waren, zeigt die Haplotypenanalyse beim Vergleich der *MDR1*-Haplotyp-Verteilungen zwischen Fällen und Kontrollen zwar beim häufigsten Haplotyp C3435/G2677 keine Unterschiede, der seltene Haplotyp C3435/2677T (C/T) ist aber in der Kontrollgruppe signifikant überrepräsentiert. Bei Annahme eines dominanten Erbgangs wurde der Unterschied noch deutlicher. Somit ist der Haplotyp C/T in der Gruppe der Harnblasenkrebspatienten seltener vertreten. Dieses Ergebnis wurde sowohl bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern erhoben, hat also auch bei Berücksichtigung des Confounders Nikotinabusus Bestand. Dabei ist anzumerken, dass wegen des multiplen Testens die gefundene Signifikanz von 0,008 für den Haplotypen C/T nur als Hinweis auf einen Trend zu verstehen ist. Für eine statistisch fundierte Aussage wären weitere Untersuchungen an einem größeren Kollektiv erforderlich. Außerdem handelt es sich bei der von uns vorgenommenen Haplotypenanalyse um eine Rechenoperation, bei der die wahrscheinlichsten Haplotypen mit einem speziellen Computerprogramm vorausgesagt wurden. Die Haplotypen wurden nicht experimentell bestimmt, es wurde auch keine Analyse der Diploypen durchgeführt.

Bereits 2002 hatten Siegmund und Mitarbeiter in ihrer Untersuchung an 262 deutschen Patienten mit Nierenzellkarzinom beobachtet, dass die Anfälligkeit für Nierenzellkarzinome vom C3435T-Genotyp beeinflusst wird [59]. Alle Nierenzellkarzinome, vor allem aber Nicht-Klarzellkarzinome, traten signifikant häufiger bei 3435T-Trägern auf. Daher wurde für das T-Allel, und insbesondere für homozygote Träger dieser Variante, ein erhöhtes Risiko, an einem epithelialen, nicht-klarzelligen Nierenkarzinom zu erkranken, postuliert.

Bislang konnte die beobachtete Assoziation jedoch nicht bestätigt werden. Haenisch und Mitarbeiter untersuchten die *MDR1*-mRNA-Konzentration im gesunden Nierengewebe und die Häufigkeiten der *MDR1*-Varianten 2677T/A und 3435T bei einer Gruppe von 82 Nierenkarzinompatienten [79], wobei wiederum ca. 75% der Patienten an Klarzellkarzinomen erkrankt waren. Die Vergleichswerte kamen von einer gepaarten Stichprobe von

Kontrollpersonen. Hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung der *MDR1*-Genotypen zeigten sich keine Unterschiede zwischen Nierenkarzinompatienten und Kontrollen. Die *MDR1*-mRNA-Konzentrationen im gesunden Nierengewebe waren bei Trägern der Varianten 2677T/A und 3435T höher als bei Trägern von Wildtypallelen.

Ein weiteres Karzinom, zu dessen Entstehung P-Gp aufgrund seiner Barrierefunktion beitragen könnte, ist das Kolonkarzinom. Auch hier haben bisherige Studien keine eindeutigen Ergebnisse erbracht.

Petrova und Mitarbeiter untersuchten in Bulgarien die Häufigkeit der *MDR1*-Varianten 2677T und 3435T bei 146 Patienten mit kolorektalen Karzinomen und verglichen sie mit der bei 160 gesunden Probanden; weder bezüglich der Allelhäufigkeit noch der Genotypen bestanden zwischen den beiden Kollektiven statistisch relevante Unterschiede [96].

Eine Studie an 184 polnischen Kolonkarzinom-Patienten und 188 gesunden Probanden der gleichen Nationalität ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Genotypenverteilung zwischen Fällen und Kontrollen [67]. Allein in der Altersgruppe der unter 50jährigen war der 3435TT-Genotyp mit 42% versus 24,5% häufiger vertreten und mit einem signifikant höheren Krankheitsrisiko verbunden. Ein erhöhtes Risiko ergab sich auch für die heterozygoten Variantenträger.

Eine Studie bei russischen Patienten mit kolorektalen Karzinomen zeigte, dass homozygote Träger von Wildtypallelen oder Varianten beider SNPs (G2677T/A und C3435T) ein höheres Erkrankungsrisiko haben. Dies gilt allerdings nur für die Gruppe der lebenslangen Nichtraucher mit einem Erkrankungsalter über 63 Jahren, in allen anderen Untergruppen überwog der Risikofaktor Rauchen die eventuell vorhandene genetische Prädisposition [97].

Eine andere Gruppe untersuchte die Häufigkeit von vier verschiedenen *MDR1*-Polymorphismen bei Patienten mit histologisch nachgewiesenem Kolonkarzinom mit Mikrosatelliteninstabilität (n=38). Zu den untersuchten SNPs gehörten auch G2677T/A und C3435T. Die Vergleichsdaten stammten von 355 Blutspendern. Als Ergebnis hielten die Autoren fest, dass u.a. der Genotyp 2677TT mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko behaftet war. Die Haplotypanalyse zeigte das höchste Risiko für einen Haplotyp, der auch das Allel 3435T beinhaltet [98].

In der Lunge wird P-Gp apikal an zilientragenden Epithelzellen exprimiert, vor allem in der Trachea und den großen Bronchialästen, nicht jedoch an schleimproduzierenden Becherzellen

[99]. Bronchialkrebs ist von den häufigen bösartigen Tumoren am stärksten mit dem Rauchen assoziiert. Der Zusammenhang zwischen P-Gp-Polymorphismen und der Suszeptibilität für ein Bronchialkarzinom wurde bisher selten untersucht.

Gervasini und Mitarbeiter haben in einem relativ kleinen spanischen Kollektiv von 96 Bronchialkarzinompatienten und 86 gesunden Kontrollpersonen die beiden uns hier interessierenden Polymorphismen analysiert [100]. Diese Forschergruppe fand einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen dem 2677T-Allel und dem Auftreten von Bronchialkarzinomen, vor allem bei homozygoten Variantenträgern und für spindelzellige Plattenepithelkarzinome. Für den SNP C3435T allein ergab sich kein Zusammenhang, wohl aber bei der Haplotypanalyse: hier erwiesen sich 2677TT-Träger, die bezüglich C3435T heterozygot waren, als besonders gefährdet.

Auch eine andere spanische Arbeitsgruppe hat keinen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus C3435T und der Suszeptibilität für Bronchialkarzinome gefunden. An dieser Studie nahmen 134 Krebspatienten und 134 Kontrollpersonen teil [101].

In der Pathogenese der Larynx- und Pharynxkarzinome spielen Rauchen und daneben auch Alkoholkonsum eine entscheidende Rolle. Bisher wurde nur eine Studie über einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus C3435T und der Entwicklung dieser Karzinome publiziert. Allerdings gehören die Patienten dem indischen Volksstamm der Tamilen an; die Ergebnisse können deshalb aus den oben bereits erwähnten Gründen in dieser Diskussion nicht uneingeschränkt verwendet werden. Immerhin soll nicht unerwähnt bleiben, dass diese Autoren ein erhöhtes Risiko für den 3435TT-Genotyp fanden, was sich bei Rauchern noch verstärkte und mit einer Odds-Ratio von 45,29 am ausgeprägtesten bei Personen zutage trat, die gewohnheitsmäßig Tabak kauten [102].

#### **4.4. Einfluss der Genotypenverteilung auf Tumordifferenzierungsgrad**

Beim Vergleich der SNP-Häufigkeitsverteilungen versus Differenzierungsgrad zeigt sich ein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Genotypen CC des SNP C3435T. In der Gruppe der gut differenzierten Tumoren (G1) ist er deutlich unterrepräsentiert und bei den mäßig differenzierten Tumoren (G2) entsprechend überrepräsentiert. Im Gegensatz dazu besteht zwischen Tumorstadium und den verschiedenen Genotypen von G2677T/A kein statistisch

signifikanter Zusammenhang. Eine Bewertung dieses Befundes ist jedoch problematisch, da Tumordifferenzierung und Tumorstadium zum Zeitpunkt der Operation (Zystektomie oder transurethrale Resektion) erhoben wurden und Informationen über eine eventuelle vorangegangene Therapie sowie zur Krankengeschichte nicht vorlagen.

In der vorhandenen Literatur finden sich bisher keine Assoziationsstudien zu Genotypen des *MDR1*-Gens und zum Differenzierungsgrad einer Tumorerkrankung, mit denen die vorliegenden Daten verglichen werden könnten. Ein Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad und P-Gp-Expression des *MDR1* konnte nicht nachgewiesen werden [103].

### **4.5. Optimierung der DNA-Extraktion aus Paraffinschnitten**

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die DNA-Extraktion von Harnblasen-Karzinomgewebe aus Paraffinblöcken zu optimieren.

Bei den verwendeten Gewebeschnitten handelte es sich um Operationsmaterial von Harnblasen-Karzinomgewebe, das in Paraffin eingebettet vorlag. Im Gegensatz zur DNA-Extraktion aus venösem Blut sind die so konservierten Gewebeproben einfach zu lagern und zu transportieren. Die Proben unterschieden sich stark in Bezug auf Größe, Beschaffenheit und Anteil an Tumorgewebe.

Ausgehend von einem kommerziell erhältlichen Extraktionsset wurde dieses soweit modifiziert, dass durch mehrmaliges Waschen der Gewebeproben Verunreinigungen mit Proteinen minimiert werden konnten. Durch photometrische Messungen wurde sichergestellt, dass zum einen ausreichend DNA für eine anschließende Genotypisierung zur Verfügung stand und zum anderen die Proben hinreichend von Proteinen gereinigt waren. Unterschiedliche DNA-Konzentrationen sind auf Unterschiede in der Menge des paraffin-eingebetteten Gewebes und Verluste bei den Wasch-Schritten zurückzuführen. Sie konnten mittels Verdünnung behoben werden. In der Literatur wurden sehr gute Resultate bei der Genotypisierung von extrahierter DNA aus Paraffinblöcken beschrieben [104]. Allerdings sollten folgende Voraussetzungen für eine erfolgreiche Extraktion gegeben sein: eine kurze Formalinfixationsdauer und ein kleines Zielallel. Ursächlich dafür ist möglicherweise eine Beschädigung der Nukleinsäuren durch die initiale Formalinfixation (Fragmentation in einer Länge von 300-400 Basenpaaren). Das gesuchte Fragment in dieser Arbeit befand sich innerhalb dieser Spanne und war somit nicht

durch eine Beschädigung der Nukleinsäuren gefährdet. Keinen Einfluss auf die DNA-Qualität schien die Lagerungszeit zu besitzen. Zusätzlich wirkte sich eine geringe Menge an Gewebematerial nicht negativ auf die Ergebnisse aus. Im Gegenteil: größere Paraffinblöcke enthalten einen höheren Anteil an Chemikalien, die die PCR inhibieren können. Eine erfolgreiche DNA-Gewinnung hängt somit sowohl vom Gewebe als auch von der Extraktionsmethode ab. Dabei ist die DNA-Extraktion aus Paraffingewebe bei Beachtung der Voraussetzungen und optimiertem Extraktionsprotokoll eine vergleichbar günstige, einfach zu handhabende Methode mit guten Ergebnissen.

#### **4.6. Zigarettenrauch als chemisches Kanzerogen im Fremdstoffmetabolismus**

Die demographischen Daten des Patienten- und des Kontrollkollektivs zeigten für Geschlecht, Alter, Größe und Gewicht eine ähnliche Verteilung. Nur bezüglich des Raucherstatus war ein signifikanter Unterschied mit einem deutlichen Überwiegen der Raucher bei den Harnblasenkrebspatienten zu erkennen. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da Rauchen ein bekannter Risikofaktor für das Entstehen des Harnblasenkarzinoms ist. Die logistische Regressionsanalyse zeigt, dass Rauchen ein bedeutenderer Risikofaktor als die in dieser Arbeit untersuchten genetischen Polymorphismen ist. Weiterhin überwiegen die Raucher bei den mäßig-, schlecht- und undifferenzierten Tumoren. In der Untergruppe der Nichtraucher fanden sich überwiegend gut differenzierte Karzinome. Als Trend fiel zusätzlich eine Überrepräsentation der Raucher bei den invasiv wachsenden Karzinomen auf, während sich die Mehrzahl der Tumoren im Kollektiv der Nichtraucher als nicht-invasive papilläre Karzinome entwickelte. In einer aktuellen spanischen Studie fanden sich im Kollektiv der Raucher ebenfalls schlechter differenzierte, multiple und größere Tumoren als bei den Nichtrauchern [105].

Das Ergebnis dieser Arbeit steht in Einklang mit der vorhandenen Literatur, wonach der Zigarettenrauch als Risikofaktor nicht nur für das Harnblasenkarzinom [6,106], sondern auch für zahlreiche andere Tumoren und chronische Erkrankungen ermittelt wurde [97,107]. Als pathogene Inhaltsstoffe wurden polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, N-Nitrosamine und aromatische Amine (4-Aminobiphenyl, 2-Naphthylamin) identifiziert, deren Bedeutung als chemische Karzinogene für die Entstehung von Blasentumoren beim Menschen als gesichert angesehen werden kann [7].

Der Zigarettenrauch als Präkarzinogen wird durch die am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Enzyme aktiviert. Die Arylamin-N-Acetyltransferase beispielsweise, ein Phase-II-Enzym, entgiftet oder toxifiziert aufgenommene Fremdstoffe. Dabei können Aromatische Amine, die im Zigarettenrauch enthalten sind, als Präkanzerogene durch Acetylierung zu ultimativen Karzinogenen umgewandelt werden. Eine niedrige Aktivität dieses Enzyms resultiert in einer verminderten Acetylierung von Fremdstoffen und erhöht besonders in der Untergruppe der Raucher das Risiko für die Entstehung von Harnblasenkarzinomen [108]. Eine genetische Defizienz der Glutathione-S-Transferase (GSTMI\*0/\*0), eines weiteren Enzyms des Phase-II-Metabolismus, konnte als Risikofaktor für Lungen-, Larynx- und Harnblasenkrebs identifiziert werden [108,109,110].

### 4.7. Schlussbetrachtung

Die vorliegende Untersuchung zur Assoziation zwischen zwei häufigen genetischen *MDR1*-Varianten und der Entwicklung von Harnblasenkarzinomen wurde an einem relativ großen Patientenkollektiv durchgeführt (n=428). Dennoch beantworten die Ergebnisse nicht die Frage, ob die beiden untersuchten Polymorphismen einen relevanten Beitrag zur Entstehung von Harnblasenkarzinomen leisten. Zwar scheint sich im Trend abzuzeichnen, dass dem 3435CC-Genotyp und dem Haplotyp C3435/2677T eine gewisse Schutzfunktion zukommt, dies kann jedoch mangels statistischer Signifikanz allenfalls als ein Hinweis angesehen werden.

Die meisten Erkrankungen sind polygenetisch determiniert, d. h. es müssen mehrere disponierende SNPs vorhanden sein, um das Krankheitsgeschehen auszulösen bzw. um bedeutsam zu dessen Auslösung beizutragen. Die einzelne Variante hat nur eine geringe Penetranz. Um den Anteil eines einzelnen SNP überzeugend nachzuweisen, sind deshalb Studien an großen, gut definierten, einheitlichen Kollektiven erforderlich.

In dieser Beziehung weist die vorliegende Untersuchung gewisse Schwachstellen auf. So ist es z.B. nicht möglich gewesen, eine detaillierte Subgruppenanalyse vorzunehmen, da genaue, verlässliche Informationen über den Zigaretten- und Alkoholkonsum, die Ernährungsgewohnheiten und die berufliche Schadstoffbelastung der Patienten fehlten. Die Datenerhebung lag nicht in der Hand der Doktorandin und es war ihr auch nicht möglich, diese Informationslücken im Nachhinein zu schließen, da die Krankenakten nicht in Berlin verfügbar sind.

Insgesamt scheinen die vorliegenden Resultate zusammen mit publizierten Studienergebnissen bei anderen Krebserkrankungen jedoch darauf hinzuweisen, dass die beiden häufigen Polymorphismen G2677T/A und C3435T eine Rolle bei der Entstehung von Harnblasenkrebs spielen. Es bleibt zu hoffen, dass Untersuchungen an größeren, gut charakterisierten Kollektiven, die noch weitere Varianten im *MDR1*-Gen berücksichtigen und damit die Analyse von Variantenkombinationen in größerem Umfang erlauben, hier bald Klarheit schaffen werden.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genotypenverteilung der beiden *MDR1*-Polymorphismen C3435T und G2677T/A an einem Harnblasenkarzinom-Kollektiv (n=428) und einer Kontrollgruppe gesunder Probanden (n=465) untersucht. Daraus abgeleitet wurde das Risiko für die Entstehung eines Harnblasenkarzinoms aufgrund genetischer Polymorphismen diskutiert.

Da das Tumorgewebe in Paraffin eingebettet vorlag, wurde eine Methode der DNA-Extraktion aus Paraffinschnitten etabliert. Ausgehend von einem kommerziell erhältlichen Extraktionsset wurde dieses soweit modifiziert, dass zum einen ausreichend DNA für eine anschließende Genotypisierung zur Verfügung stand und zum anderen die Proben hinreichend von Proteinen gereinigt waren. Anschließend erfolgte die Genotypisierung durch PCR im Lightcycler.

Der Hauptzielparameter der statistischen Auswertung war die Frage nach der Suszeptibilität der Krebserkrankung in Abhängigkeit von genetischen Polymorphismen von *MDR1*. Diese Assoziation wurde mittels Odds-Ratio und 95% Konfidenzintervall quantifiziert. Störgrößen, zum Beispiel Alter und BMI, wurden mit Hilfe der logistischen Regression berücksichtigt.

Wie zu erwarten, war der Prozentsatz der Raucher in der Gruppe der Harnblasenkrebspatienten signifikant höher als im Kontrollkollektiv. Die gefundene Genotypenverteilung bei Fällen und Kontrollen stimmt mit der Frequenz anderer kaukasischer Populationen überein. Beim Vergleich der SNP C3435T-Häufigkeitsverteilungen zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe zeigte sich ein Trend zur Unterrepräsentation des Genotyps CC in der Gruppe der Harnblasenkrebspatienten mit 18,9% gegenüber 24,7% in der Kontrollgruppe. Wird ein dominantes Erbmodell angenommen, indem die Genotypen CT und TT zusammengefasst werden, ergibt sich mit  $P=0,036$  (Odds-Ratio = 1,41; 95% Konfidenzintervall [1,01-1,97]) ein signifikanter Befund: Das T-Allel des SNP C3435T ist im Kollektiv der Harnblasenkrebspatienten überrepräsentiert. Mittels logistischer Regressionsanalyse konnten die Genotypen CT und TT sowie der Nikotinabusus als unabhängige Risikofaktoren identifiziert werden.

SNP G2677T/A hatte in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluß auf die Suszeptibilität für Harnblasenkarzinome.

Zur Charakterisierung der *MDR1*-Phänotyp-Genotyp-Beziehung wurden die Genotypsequenzen *in silico* in 6 verschiedene Haplotypaare zerlegt. Die Frequenzverteilung der Haplotypen stimmte mit der Haplotypverteilung der kaukasischen Bevölkerung überein. In dieser Arbeit war

der seltene Haplotyp C3435/2677T in der Kontrollgruppe signifikant überrepräsentiert, sowohl bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen im Trend die Hypothese, dass das 3435T-Allel mit einer geringeren Aktivität von P-Gp gekoppelt ist und damit die Suszeptibilität für Malignome, für deren Entstehung die Exposition gegenüber Schadstoffen eine große Rolle spielt, erhöht.

## Literaturverzeichnis

1. Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Berlin, 2008: 12,82-85.
2. Rübber H, Otto T: Harnblasenkarzinom. 3. Auflage. Berlin, Heidelberg, Springer, 2001: 85-158.
3. Jocham D, Miller K: Praxis der Urologie. 2. Band. 1. Auflage. Stuttgart, New York, Thieme, 1994: 53-66.
4. Wingo PA, Ries LA, Giovino GA et al: Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. J Natl Cancer Inst 1999; 91: 675-690.
5. Zeegers MP, Tan FE: The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk. Cancer 2000; 89: 630-9.
6. Cole P: Coffee-drinking and cancer of the lower urinary tract. Lancet 1971; 1: 1335-1337.
7. Hoffman D, Masuda Y, Wynder EL: Alpha-naphthylamine and beta-naphthylamine in cigarette smoke. Nature 1969; 221: 254.
8. Rehn L: Blasengeschwülste bei Fuchsin-Arbeitern. Arch Family Med 1895; 50: 588-600.
9. Gonwa TA, Corbett WT, Schey HM et al: Analgesic associated nephropathy and transitional cell carcinoma of the urinary tract. Ann Intern Med 1980; 93: 249.
10. Fairchild WV, Spence CR, Solomon HD et al: The incidence of bladder cancer after cyclophosphamide therapy. J Urol 1979; 122: 163-164.
11. Locke JR, Hill DE, Walzer Y: Incidence of squamous cell carcinoma in patients with long-term catheter drainage. J Urol 1985; 133: 1034-1035.
12. Hennessy M, Spiers JP: A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. Pharmacological Research 2007; 55: 1-15.
13. Chen C, Chin JE, Ueda K et al: Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. Cell 1986; 47: 381-389.

14. Callen DF, Baker E, Simmers RN et al: Localization of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1. *Hum Genet* 1987; 77: 142-144.
15. Chen C, Clark D, Ueda K et al: Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *J Biol Chem* 1990; 265: 506-514.
16. Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ: Characterization of the human MDR1 Gene. *The AAPS Journal* 2005; 7: E1-E5.
17. Gros P, Neriah YB, Croop JM et al: Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* 1986; 323: 728-731.
18. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM et al: Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 3004-3008.
19. Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E et al: Normal viability and altered pharmacogenetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 4028-4033.
20. Panwala CM, Jones JC, Viney JL: A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for a multiple drug resistance gene, mdr1a, spontaneously develop colitis. *J Immunology* 1998; 161: 5733-5744.
21. Schinkel AH, Smit JJM, van Tellingen O et al: Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell* 1994; 77: 491-502.
22. Smit JW, Huisman MT, van Tellingen O et al: Absence or pharmacological blocking of placental P-glycoprotein profoundly increases fetal drug exposure. *J Clin Invest* 1999; 104: 1441-1447.
23. Ueda K, Okamura N, Hirai M et al: Human P-glycoprotein transports Cortisol, Aldosterone and Dexamethasone, but not Progesterone. *J Biol Chem* 1992; 267: 24284-24252.
24. Luker GD, Nilsson KR, Covey DF et al: Multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein enhances esterification of plasma membrane Cholesterol. *J Biol Chem* 1999; 274: 6979-6991.

25. Garrigues A, Escargueil AE, Orłowski S: The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates Cholesterol redistribution in the cell membrane. *PNAS* 2002; 99: 10347-10352.
26. Batetta B, Dessì S, Putzolu M et al: MDR1 gene expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J Vasc Res* 1999; 36: 261-271.
27. Batetta B, Pani A, Putzolu M et al: Correlation between Cholesterol esterification, MDR1 gene expression and rate of cell proliferation in CEM and MOLT4 cell lines. *Cell Prolif* 1999; 32: 49-61.
28. Chong ASF, Markham PN, Gebel HM et al: Diverse multidrug-resistance-modification agents inhibit cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother* 1993; 36: 133-139.
29. Gupta S, Kim CH, Tsuruo T et al: 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; 12: 451-458.
30. N'cho M, Hobbs JA, Brahmi Z: Over-expression of multidrug resistance P-glycoprotein inhibits NK granule-mediated lytic ability without affecting the Fas lytic pathway. *Hum Immunol* 1999; 60: 223-230.
31. Randolph GJ, Beaulieu S, Pope M et al: A physiologic function for P-glycoprotein (MDR1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6924-6929.
32. Gottesman MM, Pastan I: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 385-427.
33. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H et al: Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7735-7738.
34. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J et al: Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 1990; 38: 1277-1287.
35. Van Kalken CK, Giaccone G, van der Valk P et al: Multidrug resistance gene (P-

- glycoprotein) expression in the human fetus. *Am J Pathol* 1992; 141: 1063-1072.
36. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D et al: Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 695-698.
  37. Rao VV, Dahlheimer JL, Bardgett ME et al: Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 3900-3905.
  38. Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM et al: P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* 1994; 83: 2451-2458.
  39. Stein U, Walther W, Wunderlich V: Point mutations in the *mdr1* promoter of human osteosarcomas are associated with in vitro responsiveness to multidrug resistance relevant drugs. *Eur J Cancer* 1994; 30A: 1541-1545.
  40. Mickley LA, Lee JS, Weng Z et al: Genetic polymorphism in MDR-1: A tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors. *Blood* 1998; 91: 1749-1756.
  41. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O et al: Functional polymorphisms of the human multidrug resistance gene: Multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *PNAS* 2000; 97: 3473-3478.
  42. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE et al: P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003; 22: 7468-7485.
  43. Kim RB, Leake BF, Choo EF et al: Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70: 189-199.
  44. Cascorbi I, Gerloff T, Johne A et al: Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 169-174.
  45. Nebert DW: Drug-metabolizing enzymes, polymorphisms and interindividual response to environmental toxicants. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 857-861.

46. Ameyaw MM, Regateiro F, Li T et al: MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 217-221.
47. Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U et al: Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. *Lancet* 2001; 358: 383-384.
48. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N et al: Expression of P-glycoprotein in human placenta: Relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 1137-1143.
49. Clifford SC, Neal DE, Lunec J: High level expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in the normal bladder urothelium: a potential involvement in protection against carcinogens? *Carcinogenesis* 1996; 17: 601-4.
50. Sakaeda T: MDR1 genotype-related pharmacokinetics: fact or fiction? *Drug Metab Pharmacokinet* 2005; 20: 391-414.
51. Chowbay B, Li H, David M et al: Meta-analysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 gene expression. *Br J Clin Pharmacol* 2005; 60: 159-71.
52. Burckart GJ, Liu XI: Pharmacogenetics in transplant patients: can it predict pharmacokinetics and pharmacodynamics? *Ther Drug Monit* 2006; 28: 23-30.
53. Thervet E, Anglicheau D, Legendre C et al: Role of pharmacogenetics of immunosuppressive drugs in organ transplantation. *Ther Drug Monit* 2008; 30: 143-50.
54. Cascorbi I: Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther* 2006; 112: 457-73.
55. Kerb R: Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Lett* 2006; 234: 4-33.
56. Annese V, Valvano MR, Palmieri O et al: Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3636-3644.
57. Chinn LW, Kroetz DL: ABCB1 pharmacogenetics: progress, pitfalls, and promise. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81: 265-9.

- 
58. Ferguson LR, Shelling AN, Browning BL et al: Genes, diet and inflammatory bowel disease. *Mutat Res* 2007; 622: 70-83.
  59. Siegsmond M, Brinkmann U, Schaeffeler E et al: Association of the P-glycoprotein transporter MDR1 <sup>C3435T</sup> polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 1847-1854.
  60. NCBI: RefSeq Evidence viewer Homo sapiens ABCB1 (Zugriff am 23.05.2003 auf <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/LocRpt.cgi?l=5243>).
  61. Nauck M, Stein U, von Karger S et al: Rapid detection of the C3435T polymorphism of multidrug resistance gene 1 using fluorogenetic hybridization probes. *Clin Chem* 2000; 46: 1995-1997.
  62. Stephens M, Donnelly P: A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 1162-1169.
  63. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P: A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 978-989.
  64. Kurzawski M, Pawlik A, Gornik W et al: Frequency of common MDR1 gene variants in a Polish population. *Pharmacological Reports* 2006; 58: 35-40.
  65. Drozdik M, Rudas T, Pawlik A et al: The effect of 3435C>T MDR1 gene polymorphism on rheumatoid arthritis treatment with disease-modifying antirheumatic drugs. *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62: 933-937.
  66. Tan EK, Drozdik M, Bialecka M et al: Analysis of MDR1 haplotypes in Parkinsons disease in a white population. *Neurosci Lett* 2004; 372: 240-244.
  67. Kurzawski M, Drozdik M, Suchy J et al: Polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in colon cancer patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 61: 389-394.
  68. Jamroziak K, Balcerczak E, Mlynarski W et al: Distribution of allelic variants of functional C3435T polymorphism of drug transporter MDR1 gene in a sample of polish population. *Polish Journal of Pharmacology* 2002; 54: 495-500.
  69. Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz PM et al: Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C6, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a

- Russian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59: 303-312.
70. Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM et al: Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 481-494.
71. Horinouchi M, Sakaeda T, Nakamura T et al: Significant genetic linkage of MDR1 polymorphisms at positions 3435 and 2677: functional relevance to pharmacokinetics of digoxin. *Pharm Res* 2002; 19: 1581-1585.
72. Kimchi-Sarfaty C, Marple AH, Shinar S et al: Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene. *Pharmacogenomics* 2007; 8: 29-39.
73. Streetman DS: Clinical pharmacogenetics of the major adenosine triphosphate binding cassette and solute carrier drug transporters. *Journal of Pharmacy Practice* 2007; 20: 219-233.
74. Tang K, Ngoi SM, Gwee PC et al: Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetics* 2002; 12: 437-450.
75. Sakurai A, Onishi Y, Hirano H et al: Quantitative structure-activity relationship analysis and molecular dynamics simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporter ABCB1 (P-glycoprotein/MDR1). *Biochemistry* 2007; 46: 7678-93.
76. Salama NN, Yang Z, Bui T et al: MDR1 haplotypes significantly minimize intracellular uptake and transcellular P-gp substrate transport in recombinant LLC-PK1 cells. *J Pharm Sci* 2006; 95: 2293-308.
77. Morita N, Yasumori T, Nakayama K: Human MDR1 polymorphism: G2677T/A and C3435T have no effect on MDR1 transport activities. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 1843-52.
78. Schaefer M, Roots I, Gerloff T: In-vitro transport characteristics discriminate wild-type ABCB1 (MDR1) from ALA893SER and ALA893THR polymorphisms. *Pharmacogenetics and Genomics* 2006; 16: 855-861.
79. Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E et al: Influence of polymorphisms of ABCB1 and

- ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *Pharmacogenomics J* 2007; 7: 56-65.
80. Schwarz UI, Hanso H, Oertel R et al: Induction of intestinal P-glycoprotein by St John's wort reduces the oral bioavailability of talinolol. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81: 669-78.
  81. Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H et al: The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD54+ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 293-298.
  82. Wang D, Johnson AD, Papp AC et al: Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenetics and Genomics* 2005; 15: 693-704.
  83. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW et al: A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007; 315: 525-8.
  84. Larsen UL, Hyldahl Olesen L, Guldborg Nyvold C et al: Human intestinal P-glycoprotein activity estimated by the model substrate digoxin. *Scand J Clin Lab Invest* 2007; 67: 123-34.
  85. Anglicheau D, Thervet E, Etienne I et al: CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75: 422-33.
  86. Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P et al: Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1889-96.
  87. Hesselink DA, van Schaik RHN, van der Heiden IP et al: Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacogenetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 74: 245-54.
  88. Crettol S, Venetz JP, Fontana M et al: Influence of ABCB1 genetic polymorphisms on cyclosporine intracellular concentration in transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18: 307-15.
  89. Fanta S, Niemi M, Jönsson S et al: Pharmacogenetics of cyclosporine in children suggests an age-dependent influence of ABCB1 polymorphisms. *Pharmacogenet Genomics* 2008;

- 18: 77-90.
90. Fellay J, Marzolini C, Meaden ER et al: Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet* 2002; 359; 30-36.
  91. Haas DW, Smeaton LM, Shafer RW et al: Pharmacogenetics of long-term responses to antiretroviral regimens containing efavirenz and/or nelfinavir: an adult AIDS clinical trials group study. *JID* 2005; 192: 1931-42.
  92. Colombo S, Soranzo N, Rotger M et al: Influence of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 haplotypes on the cellular exposure of nelfinavir in vivo. *Pharmacogenetics and Genomics* 2005; 15: 599-608.
  93. Ferguson LR, De Flora S: Multiple drug resistance, antimutagenesis and anticarcinogenesis. *Mutat Res* 2005 Dec 11; 591(1-2): 24-33.
  94. Leslie EM, Deeley RG, Cole PC: Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 204: 216-37.
  95. Walle UK, Walle T: Transport of the cooked-food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine (PhIP) across the human intestinal Caco-2 cell monolayer: role of efflux pumps. *Carcinogenesis* 1999; 20: 2153-2157.
  96. Petrova DT, Nedeva P, Maslyankov S et al: No association between MDR1 (ABCB1) 2677G>T and 3435C>T polymorphism and sporadic colorectal cancer among Bulgarian patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 317-22.
  97. Osswald E, Johne A, Laschinski G et al: Association of MDR1 genotypes with susceptibility to colorectal cancer in older non-smokers. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63: 9-16.
  98. Potocnik U, Glavac D, Dean M: Common germline MDR1/ABCB1 functional polymorphisms and haplotypes modify susceptibility to colorectal cancers with high microsatellite instability. *Cancer Genet Cytogenet* 2008; 183: 28-34.
  99. Van der Deen M, de Vries EGE, Timens W et al: ATP-binding cassette (ABC) transporters in normal and pathological lung. *Respir Res* 2005; 6: 59.

100. Gervasini G, Carrillo JA, Garcia M et al: Adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) (multidrug resistance 1) G2677T/A gene polymorphism is associated with high risk of lung cancer. *Cancer* 2006; 107: 2850-7.
101. Sinués B, Fanlo A, Bernal ML et al: MDR-1 C3435T genetic polymorphism and tobacco-related lung cancer. *Oncology* 2003; 64: 183-5.
102. Sam SS, Thomas V, Sivagnanam K et al: ABCB1 genetic polymorphism and risk of upper aerodigestive tract cancers among smokers, tobacco chewers and alcoholics in an Indian population. *Pharmacogenet Genomics* 2007; 17: 861-6.
103. Serretta V, Pavone C, Allegro R et al: Correlation between GP-170 expression, prognosis and chemoresistance of superficial bladder carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 472-476.
104. Legrand B, de Mazancourt P, Durigon M et al: DNA genotyping of unbuffered formalin fixed paraffin embedded tissues. *Forensic Science International* 2002; 125: 205-211.
105. Garcia Mediero JM, Angulo Cuesta J, Lujan Galan M et al: Smoking habit and superficial bladder tumours' natural history. *Actas Urol Esp* 2007; 31: 349-54.
106. Bjerregaard BK, Raaschou-Nielsen O, Sorensen M et al: Tobacco smoke and bladder cancer - in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Int J Cancer* 2006; 119: 2412-2416.
107. Das SK: Harmful health effects of cigarette smoking. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2003; 253: 159-165.
108. Brockmöller J, Cascorbi I, Kerb R et al: Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res* 1996; 56: 3915-3925.
109. Brockmöller J, Kerb R, Drakoulis N et al: Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class mu isoenzymes mu and psi in lung cancer patients and controls. *Cancer Res* 1993; 53: 1004-1011.
110. Trizna Z, Clayman GL, Spitz MR et al: Glutathione S-transferase genotypes as risk factors for head and neck cancer. *Am J Surg* 1995; 170: 499-501.

---

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Ivar Roots danke ich für die Übertragung des Dissertationsthemas und für die Möglichkeit, die Untersuchung am Institut für Klinische Pharmakologie der Charité durchzuführen.

Herrn Dr. Mrozikiewicz gilt mein Dank für die Bereitstellung der Paraffinproben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Andreas Johne und Frau Dr. Gabriele Laschinski für die Bereitschaft auftretende Fragen und Probleme schnell und produktiv zu lösen, auch danke ich für Ihre Anregungen bei der Erstellung und Ihre Hilfe bei der Korrektur der Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Mark Goldammer, der immer Zeit für mich fand und mich sowohl in theoretischen Fragen als auch bei den experimentellen Untersuchungen engagiert beriet.

Allen weiteren Mitarbeitern des Instituts danke ich für die freundliche und aufgeschlossene Arbeitsatmosphäre und die fachliche Beratung.

Meinem lieben Mann Alberto Bettin und Frau Dr. Petra Hager danke ich für die beständige Motivierung und die informationstechnische Unterstützung.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für die Möglichkeit freier Entfaltung sowie die ideelle und materielle Unterstützung.

---

## **Lebenslauf**

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

---

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Thema: „MDR1-Polymorphismen als Suszeptibilitätsfaktor für das Harnblasenkarzinom“ selbstständig und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 05. Dezember 2008

Bettina Bettin