

Aus dem Institut für Physiologie
Direktor Prof. Dr. med. Rainer Rettig
der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Renale und hepatische Expression
organischer Anionentransporter bei nierentransplantierten Ratten
mit spezifischer Transporterdefizienz**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2012

vorgelegt von:
David Hermkes
geb. am: 08.10.1980
in: Düsseldorf

Dekan: Prof. Dr. med. dent. R. Biffar

1. Gutachter: Prof. Dr. med. R. Rettig (Greifswald)

2. Gutachter: Prof. Dr. sc. hum. P. Gohlke (Kiel)

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum I des C_DAT

Tag der Disputation: 22. November 2012

INHALT

1. EINLEITUNG	5
1.1. Die ATP-binding-cassette-Transporter-Familie	5
1.2. Multidrug Resistance-associated Protein 2	7
1.3. Die Transportproteine MRP1, MRP3, MRP4 und P-Glykoprotein	9
1.4. Ein kongenes Transplantationsmodell	12
1.5. Zielsetzung	13
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1. Tiere und Tierhaltung	15
2.2. Generierung des kongenen MRP2^{-/-}-Stammes	15
2.3. Transplantation	16
2.3.1. Entnahme der Spenderniere	16
2.3.2. Implantation der Niere	17
2.4. RNA-Isolation	17
2.4.1. Prinzip	17
2.4.2. Durchführung	18
2.5. Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	19
2.5.1. Prinzip	19
2.5.2. Durchführung	20
2.6. DNase-I-Behandlung und Reinigung der RNA	20
2.6.1. Prinzip	20
2.6.2. Durchführung	21
2.7. cDNA-Synthese	23
2.7.1. Prinzip	23
2.7.2. Durchführung	23
2.8. Quantitative realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	24
2.8.1. Prinzip	24

INHALT

2.8.2. Auswertung der qRT-PCR	26
2.8.3. Durchführung	26
2.9. Eindimensionale Agarosegel-Elektrophorese	29
2.9.1. Prinzip	29
2.9.2. Durchführung	30
2.10. Experimentelle Protokolle	31
2.10.1. Experiment I	31
2.10.2. Experiment II	31
2.11. Statistische Auswertung	32
3. ERGEBNISSE	34
3.1. Renale und hepatische Transkriptgehalte bei nativen Ratten	34
3.2. Renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten nach Nierenkreuztransplantation	39
3.3. Einfluss der Transplantation auf renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten	47
3.4. Gel-Elektrophorese	48
4. DISKUSSION	50
4.1. Kongene Transplantationsmodelle	51
4.2. Renale und hepatische Transkriptgehalte bei nativen Ratten	52
4.3. Renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten nach Nierenkreuztransplantation	57
4.4. Einfluss der Transplantation auf renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten	62
4.5. Limitationen der Studie	65
5. ZUSAMMENFASSUNG	68
6. LITERATURVERZEICHNIS	70

1. EINLEITUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob die Transportproteine Multidrug Resistance-associated Protein 1 (MRP1), Multidrug Resistance-associated Protein 2 (MRP2), Multidrug Resistance-associated Protein 3 (MRP3), Multidrug Resistance-associated Protein 4 (MRP4) und P-Glykoprotein (Pgp) einer transkriptionalen Regulation unterliegen. Hierzu wurde ein Nierentransplantationsmodell zwischen Ratten des Inzuchtstammes Lewis-1W (Wildtyp) und eines kongenen MRP2-defizienten Stammes (MRP2^{-/-}) etabliert. Mittels quantitativer *Realtime*-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurden die Transkriptgehalte der genannten Transporter in der Leber und im renalen Kortex untersucht.

1.1. Die ATP-binding-cassette-Transporter-Familie

Der aktive Transport von Substraten über lipophile Membranen ist ein essentieller Bestandteil der transmembranösen Kommunikation zwischen intra- und extrazellulärem Raum. Viele der dafür verantwortlichen Transportproteine gehören zur Super-Familie der *ATP-binding-cassette* (ABC) Transporter. Insgesamt konnten mehr als 300 verschiedene Proteine der ABC-Familie identifiziert werden (Stavrovskaya und Stromskaya, 2008). ABC-Transporter sind in fast jedem Organismus zu finden. Sie werden in den eukaryotischen und den prokaryotischen Typ unterteilt, welche sich im Wesentlichen in ihrer Gen- und Proteinstruktur unterscheiden (Igarashi et al., 2004). Innerhalb dieser beiden Gruppen existieren wiederum sieben (oder acht, je nach Autor) Familien von ABC-Proteinen (Dean et al., 2001; Igarashi et al., 2004), darunter die Gruppe der *Multidrug Resistance-associated Protein* (MRP) Transporter.

Strukturell finden sich bei membranassoziierten Proteinen der ABC-Familie mehrere transmembranöse Domänen (engl.: *membrane spanning domaine*, MSD), welche durch intrazytosolische Schleifen (engl.: *loops*) miteinander verbunden sind. Innerhalb dieser Loops und am intrazellulär gelegenen C-Terminus existieren ein bis zwei Nukleotidbindungsdomänen (NBD), an denen es zur Hydrolyse von ATP zwecks Energiegewinnung kommt (Borst et al., 1999). Die einzelnen Bindungsdomänen unterliegen

dabei allosterischen Regulationsmechanismen (van Aubel et al., 2005). Der N-Terminus befindet sich im Interstitium (Leslie et al., 2005).

Bemerkenswert ist, dass die Aminosäuresequenzen der NBD durch verschiedene Spezies hindurch relativ konserviert erscheinen. Die Sequenzen der MSD hingegen scheinen sich im Laufe der Evolution stark verändert zu haben (Higgins, 1992). Mutationen (Deletion, Missense-mutation, etc.) in unterschiedlichen Abschnitten des Proteins können zur Dysfunktionalität der MSD beziehungsweise der entsprechenden NBD oder auch zum vollkommenen Fehlen eines Proteins führen (Paulusma et al., 1996; Ito et al., 1997; Paulusma et al., 1997; Wada et al., 1998; Toh et al., 1999).

In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich die verschiedenen Proteine der ABC-Familie durch ihre Lokalisation in den verschiedenen Organen unterscheiden. Hierbei ist nicht nur von Bedeutung, in welchem Organ sich das Protein befindet. Für die Funktion des Proteins ist es auf zellulärer Ebene auch wichtig, ob das Protein apikal oder basolateral in einem Epithel lokalisiert ist (van Aubel et al., 2000).

Die Substratspezifitäten der ABC-Transporter überschneiden sich in hohem Maße. Dadurch können sie in verschiedenen Organen sowohl kompensatorisch als auch koordinierend auf wechselnde Anforderungen an Ausscheidungsfunktionen wirken. Dem Zusammenspiel der einzelnen Transporter der ABC-Familie kommt bei physiologischen und pathologischen Prozessen besondere Bedeutung zu (van Aubel et al., 2000). Beispiele sind Cholestase, chronischer Alkoholkonsum (Zinchuk et al., 2007) und protektive Effekte in der Leber bei Fieber (Bolder et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl körpereigene als auch körperfremde Substrate meist der Konjugation z. B. mit Mono-/ Diglukuroniden (Payen et al., 2002) oder Sulfaten (Keppler und König, 2000; van Aubel et al., 2000) bedürfen, bevor die Elimination auf renalem oder hepato-biliärem Weg erfolgen kann. Die Konjugation erfolgt über „Phase-II-Enzyme“, wie dem Cytochrom-P450-System in der Leber (Wortham et al., 2007).

Das körperfremde para-Aminohippurat (PAH) wird in unkonjugierter Form transportiert. Es kommt bei der Erforschung der Nierenfunktion häufig zum Einsatz, da es vor der Ausscheidung keinen weiteren Stoffwechselprozessen unterliegt und fast ausschließlich renal

eliminiert wird (van Aubel et al., 2000; Smeets et al., 2004). PAH wird insbesondere von MRP2 und MRP4 transportiert (Grisk et al., 2009).

ABC-Transporter kommen bei Eukaryoten vor allem als Efflux-Pumpen vor. Aufgrund dieser Eigenschaft werden die Transportproteine für die Resistenz vieler Tumorzelllinien gegenüber Chemotherapeutika verantwortlich gemacht (van Aubel et al., 2000; Gerloff, 2004). Diese Bedeutung wird auch in der Namensgebung der Klasse MRP-Transporter („*Multidrug Resistance-associated Protein*“) deutlich. Resistenzmechanismen, die durch Transportproteine vermittelt werden, beruhen generell auf der schnellen Elimination zytotoxischer Substanzen aus der Zelle in den Extrazellulärraum (van Aubel et al., 2000; Gerloff, 2004).

Ein weiteres Beispiel für die patho-physiologische Bedeutung der ABC-Transporter und deren Vielfältigkeit ist die zystische Fibrose. Diese Erkrankung entsteht durch einen Defekt eines Chlorid-Kanals kodiert durch ABCC7 (Altenberg, 2003). Auch bei dem autosomal-rezessiv vererbten Dubin-Johnson-Syndrom konnte das Fehlen eines Proteins dieser Familie in der Leber nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um das Protein MRP2. Abgesehen von einer milden Hyperbilirubinämie durch vornehmlich konjugiertes Bilirubin und einem erhöhten Risiko für Medikamentenintoxikationen, scheint die Leberfunktion dieser Patienten weitestgehend unbeeinträchtigt zu sein (Paulusma und Oude Elferink, 1997; van Aubel et al., 2000). Dies spricht für Kompensationsmöglichkeiten für das Fehlen von MRP2 durch andere Transporter (Gerloff, 2004).

Im Folgenden wird das Transportprotein MRP2 beschrieben. Dann wird auf die Charakteristika der Proteine MRP1, MRP3, MRP4 und Pgp im Vergleich zu MRP2 eingegangen, insbesondere im Hinblick auf deren Lokalisation und Substratspezifitäten.

1.2. *Multidrug Resistance-associated Protein 2*

MRP2 (Gensymbol: ABCC2) ist eine reine Efflux-Pumpe für den Transport organischer Anionen aus der Zelle hinaus (Haase et al., 1978; Mannermaa et al., 2009). Durch diese Funktion trägt MRP2 zur zellulären Detoxifikation bei. Die Struktur ähnelt der der anderen Proteine der ABC-Familie in erheblichem Maße. So ist die Aminosäuresequenz

beispielsweise annähernd 50% identisch mit der von MRP1 und auch der von MRP3 (van Aubel et al., 2000).

MRP2 scheint in polarisierten Zellen ausschließlich apikal lokalisiert zu sein (Laouari et al., 2001; Bolder et al., 2006). In zahlreichen Arbeiten konnte dessen Vorkommen in proximalen Nierentubuluszellen (Schaub et al., 1999; Keppler und König, 2000; Masereeuw et al., 2000; van Aubel et al., 2000) und der apikalen kanalikulären Membran der Hepatozyten (van Aubel et al., 2000; Cherrington et al., 2002) nachgewiesen werden (Abbildung 1). Die Transportrichtung ist also in das Lumen des jeweiligen Ausscheidungsorgans. Daraus ergibt sich die besondere Bedeutung von MRP2 für die renale und hepato-biliäre Elimination organischer Anionen. Außerdem wurde MRP2 in Villi v. a. des Duodenums (Cherrington et al., 2002) gefunden, wo es ebenfalls für den Substrat(rück)transport in das Lumen verantwortlich zu sein scheint (van Aubel et al., 1998; Keppler und König).

Als Substrate von MRP2 konnten sowohl körpereigene als auch körperfremde Substanzen identifiziert werden. Diese werden zumeist sulfatiert, glukuronidiert oder mit Glutathion konjugiert transportiert. Zu den wichtigsten körpereigenen Substraten gehören Bilirubin und dessen Salze (Keppler und König, 2000; McDonagh et al., 2002; Zhou et al., 2008). Keppler und König konnten zeigen, dass MRP2 sowohl bei posthepatischer als auch bei Endotoxin-induzierter Cholestase herunterreguliert ist (Keppler und König, 2000) und somit gleichzeitig zu dieser beiträgt (Payen et al., 2002).

Bei Patienten mit cholestatischer Hepatose ist die Menge an MRP2-Protein in der Leber zwar vermindert, der spezifische mRNA-Gehalt bleibt jedoch unverändert (Zollner et al., 2001). Dies lässt eine schnelle Redistribution des Proteins von der Zellmembran in intrazelluläre Membranvesikel im Sinne einer post-translationalen Regulation vermuten (Payen et al., 2002).

Neben Bilirubin (Fickert et al., 2001) konnten als endogene Substrate für MRP2 Glukokortikoide (Courtois et al., 1999) und Endothelin (Terlouw et al., 2001) nachgewiesen werden. Als exogene Substrate gelten die meisten in der Pharmakotherapie gebräuchlichen Metallsalze (Vernhet et al., 2001), Chemotherapeutika (Kauffmann et al., 1998), Psychopharmaka sowie exogene Kortikoide (Payen et al., 2002). Auch Chemotherapeutika wie Etoposid, Vincristin, Cisplatin (Loe et al., 1998) und Pravastatin (Gerloff, 2004) scheinen

als Substrat zu dienen, was einen Erklärungsansatz bei der Frage nach der Vermittlung von Resistenzen bestimmter Tumorzelllinien wie dem hepatozellulären Karzinom darstellt (Ros et al., 2003).

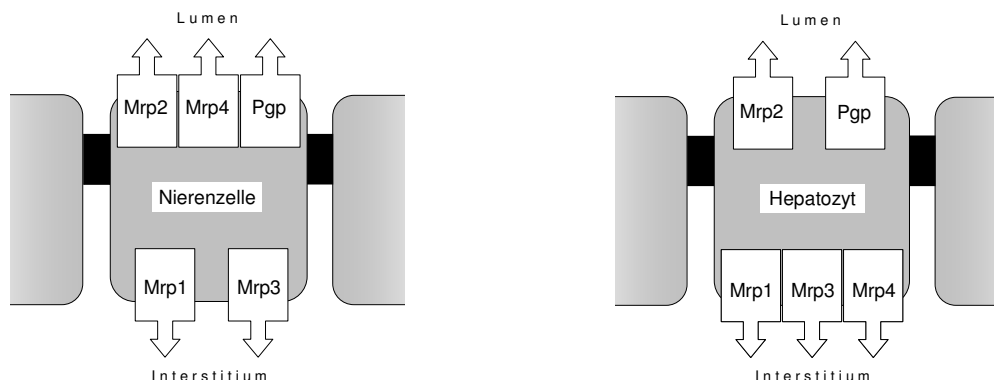


Abbildung 1: Lokalisation der untersuchten Transporter in Epithelien von Nierenkortex und Leber: MRP2 und Pgp sind in Nieren- und Leberzellen jeweils apikal lokalisiert, MRP1 und MRP3 jeweils basolateral. MRP4 ist in Nierenzellen apikal und in Leberzellen basolateral lokalisiert. „Nierenzelle“ bezeichnet in Bezug auf MRP2, MRP4 und Pgp eine Zelle des proximalen Tubulus, auf MRP1 eine Zelle der Henle-Schleife bzw. des Sammelrohrs und auf MRP3 eine Zelle des früh-distalen Tubulus bzw. der Henle-Schleife. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, Pgp: P-Glykoprotein.

Der Transport der erwähnten MRP2-Substrate kann auch von anderen Transportproteinen übernommen werden. Durch Überschneidungen der Substratspezifität sind Kompensationsmechanismen zwischen verschiedenen Transportern theoretisch möglich. Entscheidend scheint hierbei weniger das Substrat an sich als vielmehr die Substanz zu sein, mit der es konjugiert ist (Slot et al., 2008).

1.3. Die Transportproteine MRP1, MRP3, MRP4 und P-Glykoprotein

MRP1 (Gensymbol: ABCC1) ist basolateral lokalisiert. Es tritt im renalen Kortex auf, vorwiegend in der Henle-Schleife und im Sammelrohr (van Aubel et al., 2000), und in der Leber, genauer im intrahepatischen Gallengang (Abbildung 1). Die hepatische MRP1-Expression wird als niedrig im Vergleich zu MRP1-Expressionen in anderen Organen eingestuft (Keppler und König, 2000; Gerloff, 2004). MRP1 wird in proliferierenden Hepatozyten, z. B. während Leberregeneration und Leberentwicklung, aber auch in

hepatischen Karzinomzellen vermehrt exprimiert und trägt zum Transport potentiell schädlicher Stoffe aus der Zelle bei (van Aubel et al., 2000; Payen et al., 2002).

Die klinische Bedeutung von MRP1 liegt vor allem im Transport konjugierter Metabolite pharmakologischer Substanzen wie Metothrexat (MTX) (König et al., 1999; Gerloff, 2004). Dadurch wird MRP1 für die Resistenz gewisser Tumore gegenüber Chemotherapeutika verantwortlich gemacht (van Aubel et al., 2000; Gerloff, 2004). So konnte dieser Transporter erstmalig in Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms identifiziert werden (Cole et al., 1992). Mittlerweile gilt er als ubiquitär vorhanden (Cherrington et al., 2002).

Die Fähigkeit von MRP1, für das Fehlen von MRP2 zu kompensieren, ergibt sich aus der gemeinsamen Substratspezifität (Laouari et al., 2001): MRP1 transportiert ebenso wie MRP2 Substrate in glukuronidierter, sulfatierter oder mit Glutathion konjugierter Form (König et al., 1999; Gerloff, 2004). Durch die basolaterale Lokalisation dieser Efflux-Pumpe in Niere und Leber erfolgt der Transport jedoch entgegengesetzt zur Transportrichtung von MRP2. MRP1-Substrate verbleiben also im Organismus.

MRP3 (Gensymbol: ABCC3) konnte bisher jeweils basolateral in Epithelzellen des intrahepatischen Gallengangs und des früh-distalen Tubulus bzw. der Henle-Schleife (Scheffer et al., 2002) nachgewiesen werden (Abbildung 1). Auch hier scheint die Expression in der Leber eher niedrig im Vergleich zu der in anderen Organen, wie z. B. Niere, Gastrointestinaltrakt, Lunge, cerebraler Kortex, zu sein (Cherrington et al., 2002). Die durch MRP3 vermittelte Resistenz bestimmter Zelllinien gegen Chemotherapeutika (Gerloff, 2004) suggeriert als Substrate Etoposid, Teniposid und MTX (Keppler und König, 2000; Li et al., 2003). Der Transport der Substrate erfolgt wie bei MRP1 und MRP2 in glukuronidierter oder sulfatierter Form bzw. mit Glutathion konjugiert (Keppler und König, 2000; van Aubel et al., 2000).

Dadurch ergeben sich Kompensationsmöglichkeiten für eine MRP2-Defizienz analog zu denen von MRP1. Keppler und König konnten zeigen, dass MRP3 in MRP2-defizienten Ratten hochreguliert ist, ebenso wie während posthepatischer Cholestase (Keppler und König, 2000). Dies lässt vermuten, dass die Regulation von MRP3 insgesamt im Vergleich zu der von MRP1 sensibler auf das Fehlen von funktionellem MRP2 reagiert. Aufgrund der basolateralen Lokalisation von MRP3 verbleiben die Substrate im Organismus.

MRP4 (Gensymbol: ABCC4) ist an der basolateralen Membran der intrahepatischen Gallengänge und apikal im proximalen Tubulus des Nierenkortex lokalisiert (Schaub et al., 1999; van Aubel et al., 2002; van Aubel et al., 2005). In der Niere ist die Transportrichtung auf Organebene somit gleichgerichtet der Transportrichtung von MRP2 ins Lumen des Nierentubulussystems (Abbildung 1).

Außerdem überschneiden sich die Substrate beider Proteine (van Aubel et al., 2005). Smeets et al. konnten zeigen, dass MRP4 und MRP2 maßgeblich an der renalen Elimination von MTX, Östradiol-Glukuronid und dem für Forschungszwecke interessanten PAH beteiligt sind (Smeets et al., 2004). MRP4 kann aufgrund der apikalen Lokalisation in der Niere zur tubulären Sekretion beitragen. Dies ist ein Erklärungsansatz für die in anderen Studien beschriebene, vermehrte renale Expression von MRP4 bei MRP2-Defizienz (Chen et al., 2005). Weitere Substrate von MRP4 sind endogene cyclische Nukleotide (Lamba et al., 2003) und Virostatika (exogene Substrate) wie Adefovir und Ganciclovir (Schuetz et al., 1999; Adachi et al., 2002; Smeets et al., 2004).

Besondere Bedeutung erlangt MRP4 bei der Verstoffwechslung des körpereigenen Endmetabolits des Purinstoffwechsels Urat, dessen hepatische Reabsorptionsrate bei über 90% liegt und das im Cotransport (positive Kooperativität) mit cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) transportiert wird (Smeets et al., 2004; van Aubel et al., 2005). Urat gelangt so über die Blutzirkulation in die Niere. Dort erfolgt die Elimination in das tubuläre Lumen über MRP4. Dieser Umstand könnte erklären, warum in der Bürstensaummembran die Expression von MRP4 deutlich höher zu sein scheint als die von MRP2 (Choudhuri et al., 2003; Leazer und Klaassen, 2003). Urat ist jedoch kein Substrat von MRP2 (van Aubel et al., 2005), so dass die zu erwartenden Effekte der MRP2-Defizienz auf die MRP4-Expression in diesem Modell eher gering sein dürften.

Pgp (Gensymbol: ABCB1) ist sowohl im renalen Kortex als auch im intrahepatischen Gallengang apikal lokalisiert, ebenso wie MRP2 (Abbildung 1). Es ist verantwortlich für die Elimination harnpflichtiger und hepato-biliär ausgeschiedener Substanzen (Tanigawara, 2000).

Bislang konnte gezeigt werden, dass chronische Niereninsuffizienz zu einem Anstieg der hepatischen Pgp-Expression führt (Naud et al., 2008). Der Anstieg der hepatischen Pgp-Expression kann als Adaption an die bei Niereninsuffizienz anfallenden Substrate im Serum gesehen werden. Die Annahme, dass gesteigerte Anforderungen an den Leberstoffwechsel die Regulation von Pgp beeinflussen, konnte durch die in regenerierenden Hepatozyten und im hepatozellulären Karzinom nachgewiesene erhöhte Pgp-Expression gestützt werden (Vos et al., 1999; Payen et al., 2002; Ros et al., 2003). Ein weiterer Hinweis dafür findet sich in der großen Überschneidung der Substratspezifitäten [z. B. glycosidiertes Digoxin (Laouari et al., 2001)] und einer Colokalisation von Pgp mit Cytochrom-P450-Enzymen (Phase-II-Enzymen). Dies bewog manche Autoren dazu, die ABC-Proteine als „Phase-III-Enzyme“ des Stoffwechsels zu bezeichnen (Wacher et al., 1995; Fromm, 2002) und somit die Elimination als weiteren Schritt dem Stoffwechsel zuzurechnen.

1.4. Ein kongenes Transplantationsmodell

Die Erkenntnisse über Substratspezifitäten werden im Allgemeinen aus *in vitro*-Studien mit isolierten Organen oder Zelllinien und *in vivo*-Studien an Tieren, die eine funktionelle Insuffizienz bzw. Defizienz eines Proteins aufweisen (z. B. *knock-out* Mäuse), gewonnen. MRP2-Defizienz bei Ratten ist u. a. auf Polymorphismen einzelner Nukleotide (SNP: *single nucleotide polymorphism*) zurückzuführen, welche zu vermindertem Transkriptgehalt und Fehlen des Proteins führen (Paulusma et al., 1996). Diese Spontanmutationen konnten bei verschiedenen Rattenstämmen nachgewiesen werden (Büchler et al., 1996; Kato et al., 2008; Lecureux et al., 2009). Bei einem von Wistar-Ratten abstammenden Rattenstamm führen präterminale Stop-Kodons in den Positionen 401 und 855 zum Fehlen des MRP2-Proteins. MRP2 konnte mit Hilfe dieses Stammes eingehend untersucht werden (Büchler et al., 1996). MRP2-Transkript konnte in Lebern dieser Tiere mittels Northern-Blot nicht detektiert werden (Ito et al., 1997). Keppler und König vermuteten eine Instabilität des mRNA-Moleküls (Keppler und König, 2000).

Bisherige Untersuchungen an MRP2-defizienten Rattenmodellen waren meist mit dem Problem verbunden, dass diese Tiere eine große genetische Heterogenität zu den eingesetzten Kontrolltieren aufwiesen. Dadurch ist nicht auszuschließen, dass die beobachteten Unterschiede auch auf andere Ursachen als die MRP2-Defizienz zurückzuführen sind.

Außerdem wurden bei unterschiedlichen Studien verschiedene Rattenstämme für die jeweiligen Kontrollgruppen eingesetzt, so dass die Ergebnisse unterschiedlicher Studien mitunter nur bedingt miteinander vergleichbar sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Inzuchtstamm Lewis-1W (Wildtyp) genutzt, um einen kongenen MRP2-defizienten Stamm (MRP2^{-/-}) zu generieren (Grisk et al., 2009). Kongen bedeutet, dass abgesehen von der MRP2-Defizienz (ABCC2^{-/-}) bzw. Expression von MRP2 (ABCC2^{+/+}) beide Stämme genetisch weitgehend identisch sind. Bei diesem Modell geht die MRP2-Defizienz mit einer Hyperbilirubinämie einher (Grisk et al., 2009). Dies erlaubte die Durchführung von Nierentransplantationen zwischen diesen Stämmen ohne Abstoßungsreaktionen des Transplantats (Grisk et al., 2009).

1.5. Zielsetzung

Zentrales Thema der vorliegenden Arbeit sind die renalen und hepatischen Transkriptgehalte organischer Anionentransporter bei nierentransplantierten Ratten mit MRP2-Defizienz. Aufgrund der Substratüberschneidung von MRP1, MRP3, MRP4 und Pgp mit MRP2, wurden die Transkriptgehalte dieser Transportproteine im renalen Kortex und in der Leber untersucht.

Studien weisen darauf hin, dass bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten der MRP4-Proteingehalt im renalen Kortex durch die MRP2-Defizienz beeinflusst wird (Grisk et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit sollte die Hypothese untersucht werden, dass die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP3, MRP4 und Pgp bei MRP2^{-/-}-Ratten durch die MRP2-Defizienz beeinflusst werden. Hierzu wurden die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten mit den entsprechenden Transkriptgehalten bei nativen Wildtyp-Ratten verglichen.

Um Einblicke in den Einfluss der nierenspezifischen MRP2-Defizienz auf die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp zu erhalten, wurde ein Nierentransplantationsmodell zwischen Wildtyp- und MRP2^{-/-}-Ratten etabliert, bei dem Wildtyp- und MRP2^{-/-}-Ratten jeweils als Spender und als Empfänger dienten. Es sollte die Hypothese untersucht werden, dass die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp durch nierenspezifische MRP2-Defizienz und durch

EINLEITUNG

Zielsetzung

nierenspezifische MRP2-Expression beeinflusst werden. Hierzu wurden die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp bei Wildtyp-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren mit den entsprechenden Transkriptgehalten bei Wildtyp-Empfängern von Wildtyp-Nieren verglichen. Ebenso wurden die genannten Transkriptgehalte bei MRP2^{-/-}-Empfängern von Wildtyp-Nieren mit den entsprechenden Transkriptgehalten bei MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren verglichen.

Es sollte außerdem die Hypothese untersucht werden, dass die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp bei MRP2-defizienten Ratten durch die Nierentransplantationen stärker beeinflusst werden als die entsprechenden Transkriptgehalte bei Wildtyp-Ratten. Hierzu wurden die Veränderungen in den renalen und hepatischen Transkriptgehalten von MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp bei MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren (syngene Transplantation) ermittelt und mit den entsprechenden Veränderungen bei Wildtyp-Empfängern von Wildtyp-Nieren (syngene Transplantation) verglichen. Als Kontrollen für die MRP2^{-/-}-Empfänger dienten native MRP2^{-/-}-Ratten und für die Wildtyp-Empfänger native Wildtyp-Ratten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiere und Tierhaltung

Es wurden native Lewis-1W-Inzuchtratten (Wildtyp) und native kongene MRP2-defiziente Lewis-1W-Inzuchtratten (MRP2^{-/-}) im Hinblick auf die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp untersucht. Es wurden Nieren zwischen Wildtyp- und MRP2^{-/-}-Ratten kreuztransplantiert. Wildtyp- und MRP2^{-/-}-Ratten dienten als Nierenspender und -empfänger, so dass sich folgende Gruppen ergaben: Wildtyp-Empfänger von Wildtyp-Nieren, Wildtyp-Empfänger von MRP2^{-/-}-Nieren, MRP2^{-/-}-Empfänger von MRP2^{-/-}-Nieren und MRP2^{-/-}-Empfänger von Wildtyp-Nieren. Die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp wurden bei allen Gruppen untersucht.

Alle Tiere wurden in der Versuchstieranlage des Instituts für Physiologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald gehalten. Die Haltung erfolgte auf Streu und bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je zwölf Stunden. Als Nahrung der Tiere dienten Pressfutter und Wasser *ad libitum*. Die Nierentransplantationen wurden zwischen männlichen Ratten im Alter von drei bis sechs Monaten durchgeführt. Die Genehmigung für die Experimente war durch die Versuchstierkommission des Landesveterinär- und Lebensmittelüberwachungsamtes Mecklenburg-Vorpommern erteilt worden.

2.2. Generierung des kongenen MRP2^{-/-}-Stammes

In dieser Arbeit wurden Ratten des Inzuchtstammes Lewis-1W (Wildtyp, als Kontrollgruppe) und Tiere eines kongenen MRP2-defizienten Stamm (MRP2^{-/-}) untersucht. Die Etablierung des kongenen Stammes erfolgte durch spezielle Zuchtmaßnahmen unter Verwendung genetischer Marker (Grisk et al., 2009). Im ersten Schritt wurden Lewis-1W-Ratten mit MRP2-defizienten Wistar-Ratten gekreuzt. Die daraus hervorgehenden in Bezug auf MRP2-Defizienz heterozygoten Hybriden wurden mit Lewis-1W-Ratten rückgekreuzt. Es folgten weitere Rückkreuzungsschritte mit Lewis-1W-Ratten, für die jeweils nur solche Tiere

ausgewählt wurden, die heterozygot für die MRP2-Defizienz an den Genloci auf Chromosom 1 (*DIMgh13* und *DIMit8*) waren ($ABCC2^{+/-}$) und einen möglichst hohen Anteil der Lewis-1W-spezifischen genetischen Marker aufwiesen (Grisk et al., 2009). Bereits nach fünf Rückkreuzungszyklen konnten so die Genloci für die MRP2-Defizienz auf den genetischen Hintergrund des Lewis-1W-Stammes übertragen werden (Klötting et al., 1997). Durch anschließende Geschwisterkreuzungen konnten in Bezug auf die MRP2-Defizienz homozygote Tiere ($ABCC2^{-/-}$) erzeugt werden. Im Folgenden werden die Lewis-1W-Ratten als Wildtyp und die MRP2-defizienten Tiere als $MRP2^{-/-}$ bezeichnet.

2.3. Transplantation

Instrumentarium

- Operationsmikroskop M3Z (Firma Wild, Heerbrugg, Schweiz)
- Erbe Kauter N (Erbe Elektromedizin, Tübingen)
- Catgut 3-0 (Catgut GmbH, Markneukirchen)
- Faden Mersilene (Ethicon, Norderstedt)
- Faden Prolene (Ethicon, Norderstedt)
- Faden 9-0 (Resorba, Nürnberg)
- 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung
- Desinfektionslösung Softasept N (B. Braun Melsungen AG, Melsungen)
- Gefäßklemmen und mikrochirurgisches Besteck

2.3.1. Entnahme der Spenderniere

Alle Operationen erfolgten unter Ethernarkose. Dazu wurden die Tiere in ein Gefäß gesetzt und dessen Atmosphäre mit Etherdampf gesättigt. Nach der Fixierung des Tieres mit Pflasterstreifen auf dem Operationsplatz, der Rasur des Abdomens und der anschließenden Desinfektion des Operationsgebietes, wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt. Der Darm wurde nach kranial aus der Bauchhöhle heraus verlagert und mit einer in Kochsalzlösung getränkten Mullkompressen umhüllt.

Die weitere Spendernierenentnahme folgte dem bereits früher von Grisk et al. etablierten Protokoll (Grisk et al., 2002). Die Niere wurde mit eiskalter Euro-Collins-Lösung (Fresenius, Bad Homburg) gespült und direkt im Anschluss an die Entnahme in eiskalte Kochsalzlösung gegeben. Die Implantation im Empfänger erfolgte unmittelbar danach, so dass die kalte Ischämiezeit in keinem Fall 45 Minuten überschritt.

2.3.2. Implantation der Niere

Die Ethernarkose und Fixierung des Tieres auf dem Operationsplatz sowie die Darmverlagerung aus dem Abdomen erfolgten wie bei der Spendernierenentnahme. Die Implantation der Niere im Abdomen des Empfängers folgte dem bereits früher von Grisk et al. etablierten Protokoll (Grisk et al., 2002). Die kalte Ischämiezeit überschritt in keinem Fall 45 Minuten.

Eine Woche nach der Transplantation wurde die zweite autochthone Niere des Empfängers unter Ethernarkose entfernt (Grisk et al., 2002; Schlüter et al., 2006). Neun Wochen nach Transplantation wurden Leber und transplantierte Niere unter Ethernarkose entnommen und bei -70 °C tief gefroren.

2.4. RNA-Isolation

2.4.1. Prinzip

Dem hier beschriebenen Protokoll liegt das sogenannte *single step*-Verfahren nach Chomczynski zu Grunde (Chomczynski und Sacchi, 1987). Das hierbei verwendete Reagenz Trizol[®] ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisoithiocyanat. Das Gewebematerial wurde darin homogenisiert und lysiert. Guanidinisoithiocyanat ist ein chaotropes Salz, welches die RNA-Integrität erhält und gleichzeitig Proteine denaturiert. So werden die für die RNA schädlichen RNasen sofort nach der Lyse inaktiviert.

Das saure Phenol beseitigt Proteine und es lösen sich kleine DNA-Fragmente darin, die größeren verbleiben nach der Zentrifugation in der Interphase. Die RNA verbleibt im wässrigen Überstand und kann mit Alkohol gefällt werden.

2.4.2. Durchführung

Für die Isolation der RNA wurden jeweils zwischen 100 mg und 500 mg Gewebe eingesetzt. Es wurden 500 µl gekühltes Trizol[®] (Invitrogen life technologies, Molecular Research Center Inc., Karlsruhe) (4 °C) auf Eis in einem 5 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Nun wurde das entsprechende Gewebe der Lagerung (-70 °C) entnommen und gewogen. Die eingewogene Menge wurde in das bereits vorgelegte Trizol[®] gegeben. Hierbei war darauf zu achten, dass das Gewebe vollständig bedeckt wurde. Anschließend wurde die Probe mit Trizol[®] aufgefüllt, so dass sich ein Mengenverhältnis von 15 µl Trizol[®] pro 1 mg Gewebe ergab. Die sich daraus ergebenden Volumina für die weiteren Substanzen sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Volumina für RNA-Isolation

Substanz	Menge
Trizol Vorlage	500 µl
Trizol gesamt	15 µl / 1 mg Gewebe
Chloroform	1/5 Volumen von "Trizol gesamt"
Isopropanol	1/2 Volumen von "Trizol gesamt"
Ethanol (75%)	1 Volumen von "Trizol gesamt"
RNA-Storage Solution	1 ml / 1 g Gewebe

Das Gewebe wurde mit Hilfe eines Homogenisators (Politron PT 3000, Kinematica AG, Littau-Luzern, Schweiz) für 3x20 Sekunden mit je 20 Sekunden Pause auf Eis homogenisiert, so dass eine Erwärmung der Probe vermieden wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation des Gemischs für mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur. Erst jetzt wurde die nächste Probe der Lagerung (-70 °C) entnommen und bis zu diesem Punkt auf gleiche Weise verfahren.

Alle folgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C in der Varifuge Heraeus 20 RS (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode) durchgeführt. Die Proben wurden zunächst bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert, um feste Gewebebestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und das Pellet verworfen. Dem Überstand wurde gekühltes Chloroform (4 °C) hinzugegeben. Die Röhrchen wurden vorsichtig für 15 Sekunden invertiert und anschließend für 2–3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde das Gemisch bei 12000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig abgehoben, in ein neues Röhrchen überführt und weiterverwendet. Die Sorgfalt dieses Schritts war entscheidend für die spätere Qualität und Reinheit der RNA.

Die abgenommene Phase wurde mit Isopropanol versetzt und 50 Mal vorsichtig invertiert. Das Gemisch wurde für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 12000 g und 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und verworfen.

Auf das Pellet wurde gekühlter 75%iger Ethanol (-20 °C) gegeben und kurz geschüttelt. Dann erfolgte die Zentrifugation für 10 Minuten bei 7500 g. Der Überstand wurde soweit wie möglich dekantiert. Eventuell vorhandene Ethanolreste wurden vorsichtig mit einer Pipette mit Kapillarspitze entfernt. Das Pellet wurde unter einem Abzug getrocknet. Je nach verbliebener Flüssigkeit dauerte dies 10-15 Minuten. Zu langes Trocknen („Übertrocknen“) führt zu Problemen beim nachfolgenden Lösen der RNA.

Das Pellet wurde nach dem Trocknen in der auf 60 °C vorgewärmten RNA Storage Solution (THE RNA Storage Solution, Ambion Inc., Austin, Texas, USA) für 10 Minuten gelöst, dann kurz auf Salzeis (ca. -10 °C) gestellt und im Weiteren auf normalem Eis belassen. Im direkten Anschluss wurde photometrisch eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt (siehe Kapitel 2.5), bevor die Lösung aliquotiert und bei -70 °C eingefroren wurde.

2.5. *Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration*

2.5.1. Prinzip

Mit Hilfe der Photometrie kann die Menge eines gelösten Stoffes in einer Flüssigkeit aufgrund der Absorption von Licht bei einer bekannten Wellenlänge (λ) bestimmt werden. Jeder Stoff besitzt ein oder mehrere Absorptionsmaxima bei einer entsprechenden Wellenlänge. Verschiedene Stoffe können hierbei ein Maximum bei derselben Wellenlänge besitzen, so dass es bei einem Stoffgemisch zu Überlagerungen kommen kann.

Misst man die Intensität des Lichts der Wellenlänge λ vor und nach seinem Durchtritt durch die Lösung, lässt sich mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes (Formel 1) die Konzentration des

Stoffes in der Lösung errechnen. Eventuelle Einschränkungen der Aussagekraft ergeben sich bei Stoffgemischen aus oben genannten Gründen.

$$E = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Formel 1: Gesetz nach Lambert-Beer: E = Extinktion (=optische Dichte), I_0 = Intensität vor Durchtritt durch die Lösung, I = Intensität nach Durchtritt durch die Lösung, ε = molarer Extinktionskoeffizient, c = Konzentration der Probe, d = Schichtdicke der Messzelle

Für die Konzentrationsbestimmung von gelöster RNA und auch DNA ist vor allem UV-Licht mit $\lambda=260$ nm von Bedeutung. Proteine hingegen besitzen ein Absorptionsmaximum bei $\lambda=280$ nm. Über den Quotienten dieser beiden Absorptionsmaxima lässt sich eine Aussage über den Grad der Kontamination der RNA durch Proteine machen: liegt der Quotient E_{260}/E_{280} im Bereich von 1,8-2,0 ist die RNA als ausreichend rein anzusehen.

2.5.2. Durchführung

Zu 98 μ l TE-Puffer pH-Wert 8,0 (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer) wurden 2 μ l der Probe bzw. 2 μ l Wasser (Leerwert) hinzugefügt. Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Ansätze in Mikroküvetten überführt. Die photometrische Messung erfolgte im Photometer GeneQuant Pro (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg). Es wurden Dreifachbestimmungen für jede Probe durchgeführt. Der daraus resultierende Mittelwert diente als Berechnungsgrundlage für das einzusetzende Volumen der Probe für die cDNA-Synthese (siehe Kapitel 2.7.2).

2.6. DNase-I-Behandlung und Reinigung der RNA

2.6.1. Prinzip

Die Rest-DNA in der Probe wird mittels rekombinant hergestellter DNase I entfernt. Dieses Enzym baut DNA soweit ab, dass der kontaminierende Anteil der DNA unter die

Nachweisgrenze der Polymerasekettenreaktion (PCR) fällt. Die Integrität der RNA wird dadurch erhalten, dass das Enzym frei von RNase-Aktivität ist.

Die RNA-Aufreinigung bedient sich der Methode der selektiven Bindungsfähigkeit von Siliciagelmembranen gegenüber bestimmten Molekülen. Um die Voraussetzungen für die selektive Bindung der RNA an die Membran zu schaffen, wird die Probe mit Ethanol und einem Guanidinisothiozyanat-Puffer versehen. Der Ethanol löst die zellulären Bestandteile (z.B. Proteine). Die im Puffer enthaltenen Salze – und somit die Ionenstärke des Puffers – verleihen den RNA-Molekülen die Bindungsfähigkeit an die Membran, so dass die RNA an die Oberfläche der Membrankompartimente bindet. Ohne die Salze würde keine Bindung stattfinden. Andere Bestandteile der Probe werden durch die Zugabe von Substanzen herausgewaschen, die eine höhere Affinität zu den jeweiligen Molekülen besitzen als die Membran selbst.

2.6.2. Durchführung

Für den DNase-I-Verdau wurde der Kit DNA-free™ der Firma Ambion Inc. (Austin, Texas, USA) und für die anschließende Aufreinigung der RNeasy-MinElute-Cleanup-Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) verwendet. Alle im Folgenden erwähnten Substanzen und Materialien sind in dem jeweiligen Kit enthalten. Es wurden je Reaktion 20 µg RNA eingesetzt. Das Volumen wurde auf 100 µl ergänzt und kurz zentrifugiert.

Es folgte eine Inkubation bei 60 °C für 10 Minuten. Auf Eis wurden zu den 100 µl der Probe 10 µl des zehnfach konzentrierten DNase-Puffers aus dem DNA-free™-Kit und im Anschluss 2 µl DNase gegeben. Beide Substanzen lagerten bei -20 °C und wurden erst kurz vorher der Lagerung entnommen.

Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C wurden 20 µl Inaktivierungsreagenz zugegeben. Hierbei war zu beachten, dass das Inaktivierungsreagenz vor der Entnahme gemischt wurde, um eine homogene Suspension zu gewährleisten. Dieser Vorgang wurde nach jeder vierten bis fünften Entnahme wiederholt.

Es folgte zweimaliges Mischen bei Raumtemperatur mit einer Pause von jeweils 2 Minuten. Nach einer anschließenden 7-minütigen Zentrifugation in der Tischzentrifuge (Fuge-Vortex

2400, BioSan, Riga, Lettland) wurden die klaren Überstände vorsichtig, ohne den weißen Bodensatz zu berühren, mit einer Pipette mit Kapillarspitze abgehoben und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde verworfen.

Zur Reinigung der DNaseI-behandelten RNA wurden dem Überstand 68 µl RNase-freies Wasser aus dem RNeasy-MinElute-Cleanup-Kit zugefügt, so dass sich ein Gesamtvolumen von ca. 200 µl ergab. Nun wurden 700 µl RLT-Puffer (Guanidinisothiozyanat-Puffer) aus dem Kit hinzugefügt und durch Invertieren mit der Probe gemischt. Zu diesem Gemisch wurden dann 500 µl 96%iger Ethanol gegeben und ebenfalls gemischt.

Die Ansätze wurden auf die im Kit enthaltenen Säulen aufgetragen. Dies erfolgte in zwei Schritten, da die Säulen mit maximal 750 µl beladen werden konnten. Zwischen den beiden Schritten und danach wurden die Säulen für 15 Sekunden bei Raumtemperatur mit 8000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Anschließend wurden die Säulen auf neue 2ml-Röhrchen gesetzt und nach Hinzugabe von 500 µl RPE-Puffer wieder für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Filter in dasselbe Röhrchen zurückgestellt.

Auf die Säulen wurden 500 µl 80%igen Ethanol gegeben und 2 Minuten bei 8000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Filter wurden in neue 2ml-Röhrchen gesetzt. Hierbei war darauf zu achten, dass die Säulen nicht mit den Wänden der alten Gefäße in Berührung kamen. Diese wurden dann mit offenem Deckel der Säulen 5 Minuten bei 12000 g zum Trocknen zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurden die Säulen in neue Reaktionsgefäße gesetzt und 14 µl RNase-freies Wasser zur Elution der RNA darauf gegeben. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 1 Minute bei 12000 g. Dieser Schritt wurde wiederholt, so dass sich Elutionsvolumina von je circa 28 µl ergaben. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte auch hier photometrisch (s. Kapitel 2.5). Die Proben wurden bei -70 °C eingefroren und gelagert.

2.7. cDNA-Synthese

2.7.1. Prinzip

Das Enzym Reverse Transkriptase (RT), zunächst entdeckt bei Retroviren (Goodman und Spiegelman, 1971), ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Sie besitzt die Fähigkeit, RNA in DNA umzuschreiben. Dies wird genutzt, um aus RNA das Ausgangsmaterial für eine Polymerasekettenreaktion (PCR), das sogenannte *Template*, in Form von *complementary* DNA (cDNA) herzustellen.

Zunächst erfolgt die Auflösung der Sekundärstruktur der RNA durch Erhitzen. Nach Abkühlung auf 37 °C und Zugabe von Nukleotiden, dem Enzym und Puffer binden an verschiedenen Stellen der denaturierten RNA sogenannte Primer aus sechs Nukleotiden mit zufällmäßiger DNA-Sequenz (*random hexamer*). Von diesen Primern ausgehend synthetisiert die RT in 3'-Richtung einen komplementären DNA-Strang an den RNA-Einzelstrang. Der entstehende RNA-DNA-Hybridstrang wird durch eine Ribonuklease als Teil der RT hydrolysiert.

2.7.2. Durchführung

Zunächst wurde das Volumenäquivalent zu 1 µg gereinigte RNA berechnet. Dann wurde die Differenz zu 50 µl an DEPC behandeltem Wasser in 500 µl Mikroreaktionsgefäßen vorgelegt und das berechnete Volumen der entsprechenden RNA-Probe zugefügt. Um den Inhalt am Boden der Gefäße zu sammeln, wurde kurz zentrifugiert. Zur Lösung der RNA wurde das Gemisch für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert.

Danach wurden die Proben in gekühlte Metallständer gestellt. Pro Probe wurden 50 µl des in Tabelle 2 aufgeführten Mix hinzu gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei 25 °C, wurde die Temperatur auf 37 °C erhöht und die Proben für weitere zwei Stunden dort belassen. Zum Abschluss wurden die Proben nach späterem Bedarf aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Mixes für die cDNA-Synthese, alle Komponenten im „High-Capacity cDNA Archive Kit“ enthalten

Substanz	Menge pro Ansatz [μ l]
DEPC behandeltes Wasser	21
10x Puffer	10
25x dNTP-Mix	4
random Primer	10
Multi Scribe (Enzym)	5

2.8. Quantitative realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

2.8.1. Prinzip

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der *in vitro*-Amplifizierung von spezifischen Nukleinsäurefragmenten. Zur Durchführung einer klassischen PCR werden eine thermostabile DNA-Polymerase, DNA (*Template*), Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und zwei zur gewünschten Sequenz komplementäre Oligonukleotidprimer benötigt.

Der Primer, der in 5'-3'-Richtung am DNA-Strang hybridisiert, wird als „Sense-Primer“ (Primer S) oder „Forward-Primer“ (Primer F) bezeichnet; der in 3'-5'-Richtung hybridisierende als „Antisense-Primer“ (Primer A) oder „Reverse-Primer“ (Primer R). Nach der Denaturierung der doppelsträngigen *Template*-DNA erfolgt die Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Primer an die einzelsträngige *Template*-DNA. Anschließend werden die gebundenen Primer durch eine DNA-Polymerase verlängert.

Die *Denaturierung* erfolgt rein thermisch: die Probe wird auf 95 °C erhitzt. Dadurch separieren sich die DNA-Stränge, so dass einzelsträngige DNA entsteht. Die Primer können an die entsprechenden Stellen der DNA-Stränge binden.

In der *Annealingphase* binden die Oligonukleotidprimer an die einzelsträngigen DNA-Templates. Dies geschieht unter Abkühlung auf eine für den jeweiligen Primer

charakteristische Temperatur. Die Bindung wird zudem durch den massiven Überschuss an Primern dem komplementären DNA-Strang gegenüber begünstigt.

Die *Elongation* erfolgt bei 72 °C, welches das Temperaturoptimum für die Taq-Polymerase darstellt. Die Taq-Polymerase wurde zum ersten Mal aus dem Heißwasserbakterium *Thermus aquaticus* isoliert. Mit Hilfe dieses Enzyms werden komplementäre Nukleotide an das mit einer Hydroxylgruppe versehene 3'-Ende der Primer gebunden. Es wird ein zum jeweiligen Strang des *Templates* komplementärer DNA-Doppelstrang erzeugt. In einem Zyklus wird die DNA-Menge somit verdoppelt. Nach dem darauf folgenden Zyklus wird sich die DNA im Vergleich zur Ausgangsmenge vervierfacht haben. Die Vermehrung des *Templates* erfolgt demnach exponentiell.

Vorraussetzung für die angewandte qRT-PCR ist die von Lee et al. bei Applied Biosystems entwickelte Technik der TaqMan[®]-PCR (Lee et al., 1993). Diese Technik basiert auf der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase in Verbindung mit einer fluoreszenzmarkierten Sonde. Diese Sonde ist ein sequenzspezifisches Oligonukleotid, an dessen 5'-Ende ein Fluoreszin-Derivat (z.B. Tetrachloro-6-carboxy-fluorescein oder 2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxy-fluorescein) als „Reporter“-Farbstoff kovalent gebunden ist. Am 3'-Ende trägt das Molekül ein Rhodamin-Derivat als „Quencher“-Farbstoff (engl.: *to quench* = löschen). Zudem ist das 3'-Ende mit einem Phosphatrest blockiert, der die Elongation der Sonde verhindert. Die Sonde bindet zwischen den Primern der komplementären Stränge.

Die intakte Sonde wird bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) zur Fluoreszenz angeregt. Durch die räumliche Nähe des „Quenchers“ zum „Reporter“ wird die Fluoreszenz des Reporters durch das Prinzip des so genannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) unterdrückt und es ist nur das Signal des „Quenchers“ messbar. Zunächst hybridisieren Primer und Sonde am selben *Template*-Strang. Trifft die Taq-Polymerase in der Elongationsphase auf die Sonde und beginnt diese vom Strang zu trennen, entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, welche wiederum die 5'-3'-Exonuklease aktiviert. Die gebundene Sonde wird abgebaut und freie Sonden bleiben intakt.

Durch die Hydrolyse der Sonde wird die räumliche Nähe zwischen „Reporter“ und „Quencher“ aufgehoben und der FRET unterbrochen. Die Fluoreszenz des freigesetzten „Reporters“ nimmt entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes zu. Die

Sondenhydrolyse erfolgt nur dann, wenn zwischen den Primern auch die Bindung der Sonde erfolgt, so dass unspezifische Bindungen der Primer nicht registriert werden.

2.8.2. Auswertung der qRT-PCR

Die Messung der „Reporter“-Fluoreszenz durch einen entsprechenden Sensor erfolgt bei der qRT-PCR nach jedem Zyklus. Übersteigt die Gesamtfluoreszenz des PCR-Ansatzes eine spezifische Signalintensität (*Threshold*), welche sich deutlich von der Hintergrundfluoreszenz unterscheidet, wird das Signal als positiv bewertet. Zu Beginn der PCR ändert sich das detektierte Signal kaum. Dies wird genutzt, um die Hintergrundfluoreszenz zu ermitteln. Aus der Differenz des normalisierten „Reporter“-Signals (R_n , n = Nummer des Zyklus) und des Hintergrundsignals ergibt sich ΔR_n , welches als Maß für die Fluoreszenz dient.

Da die Menge der neu gebildeten DNA von der Ausgangsmenge des Templates abhängt, kann mit der TaqMan[®]-Methode auf das Verhältnis der zu amplifizierenden Gene innerhalb des Templates in den verschiedenen Proben geschlossen werden. Um nun die Verhältnisse verschiedener Gene untereinander vergleichen zu können, wird als Bezugsgröße ein sogenanntes Haushaltgen (Porphobilinogen-Desaminase [PBGD]) ausgewählt. Haushaltsgene haben die postulierte Eigenschaft konstant in allen Geweben vorhanden zu sein, unabhängig von der jeweiligen Manipulation (Janssens et al., 2004). Die Bestimmung des Haushaltgens erfolgt aus derselben cDNA-Probe wie das untersuchte Gen.

2.8.3. Durchführung

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Primer und Sonden (alle TIB Molbiol Syntheselabor, Berlin) wurden bei -20 °C gelagert, der TaqMan-Premix (2x PCR Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) und das verwendete nukleasefreie Wasser bei 4 °C. Alle Substanzen wurden möglichst zeitnah zur Verwendung aus der Kühlung genommen. Das Gemisch der genannten Substanzen mit einem Endvolumen von 16 µl je Ansatz wird im Folgenden als Premix bezeichnet.

Um eine effiziente PCR zu gewährleisten, war eine Optimierung der Primer und Sonden notwendig. Für die Optimierung wurde ein Reaktionsansatz verwendet, der als *Template*

MATERIAL UND METHODEN
Quantitative realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

immer eine Probe aus demselben cDNA-Pool enthielt. Den 16 μ l des Premix wurden je Ansatz 9 μ l dieses Pools zugefügt. Die drei Ansätze für die Mehrfachbestimmung wurden zunächst in einem gemeinsamen Mikroreaktionsgefäß angesetzt, gemischt und anschließend 23 μ l pro entsprechendem Well der Mikrotiterplatte eingesetzt.

Im ersten Experiment wurden alle Kombinationen verschiedener Primerkonzentrationen (50 nM, 300 nM, 900 nM; Tabelle 3) eines Primerpaares (S/A; F/R) bei gleicher Sondenkonzentration gegeneinander getestet. Die Kombination mit dem niedrigsten c_T -Wert wurde für die Sondenoptimierung ausgewählt.

In einem zweiten Experiment mit diesem optimierten Primerpaar wurde durch variierende Sondenkonzentration (50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM) die jeweils effizienteste Konzentration ermittelt. Als Kriterium wurde wiederum der niedrigste c_T -Wert herangezogen.

Die beste Kombination aus optimiertem Primerpaar und effizientester Sondenkonzentration wurde für die Untersuchungen der eigentlichen Proben verwendet (Tabelle 4). Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden sind aus Tabelle 5 ersichtlich.

Tabelle 3: Primer-Optimierung

Primer	Konzentration [nM]			Primer	Konzentration [nM]		
Sense	50	300	900	Forward	50	300	900
Antisense	50	50	50	Reverse	50	50	50
	300	300	300		300	300	300
	900	900	900		900	900	900

Die Vorgehensweise bei der Analyse der Proben unterschied sich nicht grundsätzlich von derjenigen bei der Primer-Sonden-Optimierung. Die günstigste Kombination aus Primer und Sonde wurde in den jeweiligen Mengen gemäß Tabelle 4 eingesetzt, um die effizienteste PCR zu erhalten. Statt des cDNA-Pools wurden 9 μ l der entsprechenden Probe den 16 μ l Premix pro Ansatz zugeführt. Auch hier wurden jeweils 23 μ l pro Well eingesetzt. Da für jede Probe eine Dreifachbestimmung erfolgte, wurden die drei Ansätze pro Probe vor der Aufteilung auf die jeweiligen Wells in einem Mikroreaktionsgefäß angesetzt und kurz gemischt.

MATERIAL UND METHODEN
Quantitative realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Tabelle 4: Konzentrationsverhältnis von Primer und Sonde für die einzelnen Gene und Menge pro Ansatz: F: Forward, R: Reverse, TM: TaqMan®

Gen	Primer	Sonde	Konzentration [nM]
PBGD	F		300
	R		900
		TM	50
Pgy1	F1		50
	R1		900
		TM	50
Abcc1	F1		300
	R1		50
		TM	100
Abcc2	F2		50
	R2		900
		TM	50
Abcc3	F1		900
	R1		50
		TM	50
Abcc4	F		300
	R		900
		TM	50

Tabelle 5: Primersequenz: A: Adenin, T: Thymin, G: Guanin, C: Cytosin, S: Sense, A: Antisense, F: Forward, R: Reverse, FAM: Fluoreszin-Farbstoff, X: Quencher-Farbstoff, p: Phosphat

Gen/Primer	Sequenz [5'-3'-Richtung]	Bindungsstrang	t [°C]	Länge [bp]
rat PBGD F	TGGGCACCCGGAAGAGT	S	59,4	16
rat PBGD R	CCTGTGGTGGACATAGCAATGAT	A	58,8	23
rat PBGD TM	6FAM-CAGACCCGACACTGTGGTAGCGATGCT-p	S	67,9	26
rat Pgp F1	GCGACAGGATATAAGCTGGTT	S	54,8	21
rat Pgp R1	GCCCATAGCCCCTTTAACA	A	56,3	19
rat Pgp TM	6FAM- AAGCGTCACTAGCGAGCCTGGTA XT-p	A	62,2	23
rat MRP1 F1	CTGGACCCTTTCAGTCAGTATT	S	54,0	22
rat MRP1 R1	TGTAGCCTCGTCCAACACTA	A	53,4	20
rat MRP1 TM	6FAM- TCCACCTTCTGCACACTCATGGTT XT-p	A	63,1	78
rat MRP2 F2	TGATGGGATAGATGTTGCCT	S	53,1	20
rat MRP2 R2	AACAAAATGGGGTCCTGG	A	55,0	18
rat MRP2 TM	6FAM- CATTGGACTGCACGACCTTCGA XT-p	S	63,5	22
rat MRP3 F1	ATGCCTTACAGGTGACCTTG	S	54,7	20
rat MRP3 R1	GCCTCAGTCTCCGTCTTAGAG	A	54,8	21
rat MRP3 TM	6FAM- ACTCCTTGACTCTCTCCACGGCTATG TXT-p	A	63,8	26
rat MRP4 F	ATGGACACTGAACTAGCAGAATCTGG	S	59,8	26
rat MRP4 R	TGTTGTATTAACCTCGTCAGTTCTCGG	A	58,7	26
rat MRP4 TM	FAM-AGTATCCGGTTTTTCTCAGAATTGCCCT-TMR	A	64,7	29

Nach der kompletten Belegung der Mikrotiterplatte wurde diese mit einer Folie (Optical Adhesive Covers, Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) überklebt, die den Verdunstungsprozess während der PCR minimierte, und dann 2 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Nach diesem Schritt war darauf zu achten, dass sich am Boden der Wells keine Luftblasen mehr befanden. Die Mikrotiterplatte wurde in das PCR-Gerät (GeneAmp® 5700 SDS, PE Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) eingelegt und mit einer 96-Well-Lochmaske, welche Streulicht von Well zu Well reduzierte, bedeckt. Hierbei war auf präzise Positionierung zu achten. Innerhalb eines Reaktionszyklus dauerte die Phase 1 (*Denaturierung*) 15 Sekunden bei 94 °C. Phase 2 (*Annealing*) und Phase 3 (*Elongation*) wurden in einem Schritt zusammengefasst, welcher 60 Sekunden bei 60 °C dauerte. Insgesamt wurden 40 Zyklen durchlaufen (Tabelle 6). Nach Beendigung der Reaktion wurden die Mikrotiterplatten bis zu Elektrophorese bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 6: PCR-Setup: Phase 1: Denaturierung, Phasen 2+3: Annealing und Elongation

PCR-Phasen	<i>Phase 1</i>	<i>Phasen 2+3</i>
Temperatur [Grad Celsius]	94	60
Dauer [Sekunden]	60	60
Zyklenanzahl	40	
Probenvolumen	23 µl	

2.9. ***Eindimensionale Agarosegel-Elektrophorese***

2.9.1. **Prinzip**

Die eindimensionale Agarosegel-Elektrophorese ist eine Methode, DNA-Fragmente nach ihrer Länge voneinander zu trennen. Die Siebstruktur der Agarose bewirkt, dass große Fragmente langsamer als kleine das Gel durchwandern. Dabei richtet sich die jeweilige Geschwindigkeit nach dem Verhältnis der Porengröße zur Molekülgröße: je größer das Verhältnis desto schneller durchläuft das Molekül das Gel. Die Auftrennschärfe richtet sich nach der Konzentration der Agarose, welche zwischen 0,5 % und 4 % liegen sollte. Je höher die Konzentration desto größer ist die Trennschärfe.

Die treibende Kraft der Auftrennung ist ein über das Gel angelegtes elektrisches Feld. Dieses Feld bewirkt, dass die negativ geladenen DNA-Moleküle in Richtung der Anode das Gel durchlaufen. Die Höhe der Spannung bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit der jeweiligen Fragmentlänge. Angelegt wird eine Spannung von 3-5 V pro cm Laufstrecke.

Im Gel können die entstehenden Banden mit einem geeigneten Farbstoff (Nukleotide: Ethidiumbromid [EtBr]) angefärbt werden. Dieser Farbstoff wird direkt dem Gel zugesetzt oder das Gel im Bad nachträglich gefärbt und wieder entfärbt, so dass nur die Banden sichtbar bleiben. Zusätzlich zu den Proben wird ein Längenstandard bestehend aus DNA-Fragmenten bekannter Länge aufgetrennt, so dass die genaue Fragmentgröße bestimmt werden kann.

2.9.2. Durchführung

Die verwendete Agarose (Seakem[®] LE Agarose, FMC Bioproducts, Philadelphia, Pennsylvania, USA) ist eine Festsubstanz. Die Agarosekonzentration des Gels betrug zwischen 2 und 4 %. Die Agarose wurde in einer entsprechenden Menge Tris-Acetat-EDTA-Puffer pH-Wert 8,3 (TE-Puffer) in der Mikrowelle vollständig aufgelöst. Unter ständigem Umrühren erfolgte eine Abkühlung auf ca. 70 °C. Anschließend wurde die Agarose in die Elektrophoresekammer gegossen. Nach Aushärtung durch vollständiges Abkühlen wurde die Kammer so weit mit TE-Puffer gefüllt, bis das Gel bedeckt war.

Die Probe wurde mit Auftragspuffer (5x-DNA-Loading-Buffer, blue, Bioline, Berlin) versetzt und das Volumen auf 30 µl mit *aqua bidest.* aufgefüllt. Ein zusätzlicher Ansatz beinhaltete als Längenmaßstab statt der Probe einen DNA-Größenstandard (Hyper Ladder V, 100 Lanes, Bioline, Berlin). Die gesamten Ansätze wurden in die im Gel vorhandenen Vertiefungen für die Proben (engl.: *slots*) überführt.

Es wurde eine Spannung von 3-5 V pro cm Laufstrecke über das Gel angelegt. Als Anhaltspunkt für das Ende der Elektrophorese diente das Fortschreiten der Färbemittelfront. Meist war dies nach ca. 2 Stunden erreicht.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 10 Minuten in mit EtBr versetztem TE-Puffer bei Raumtemperatur gefärbt. Anschließend erfolgte die Entfärbung in *aqua bidest.* für 20

Minuten, bevor das Gel unter UV-Licht ausgewertet wurde. Unter diesen Bedingungen waren die Banden bei geringer Hintergrundfärbung klar zu erkennen.

2.10. Experimentelle Protokolle

2.10.1. Experiment I

Die Entnahmen von Lebern und Nieren der nativen Ratten wurden im Alter von drei bis sechs Monaten durchgeführt. Es wurden die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp in nativen MRP2^{-/-}-Ratten untersucht. Als Kontrollen dienten native Wildtyp-Ratten. Die Auswirkungen der Transplantation auf diese Transkriptgehalte wurden anhand des Vergleichs von nativen Tieren mit Nierenempfängern des gleichen genetischen Hintergrundes untersucht (Tabelle 7).

Tabelle 7: Experimentelle Gruppen

Gruppe	Behandlung	n
I	native MRP2 ^{-/-} -Ratten	7
II	native Wildtyp-Ratten	7
III	MRP2 ^{-/-} -Empfänger von Wildtyp-Nieren	10
IV	MRP2 ^{-/-} -Empfänger von MRP2 ^{-/-} -Nieren	8
V	Wildtyp-Empfänger von MRP2 ^{-/-} -Nieren	8
VI	Wildtyp-Empfänger von Wildtyp-Nieren	7

2.10.2. Experiment II

In einem weiteren Experiment wurden die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp nach Nierenkreuztransplantation untersucht. Die Nierentransplantationen wurden zwischen männlichen Ratten im Alter von drei bis sechs Monaten durchgeführt. In der gleichen Operation wurde jeweils eine autochthone Niere entfernt. Die Entfernung der jeweils zweiten autochthonen Niere erfolgte eine Woche später. Die Lebern und transplantierten Nieren wurden jeweils neun Wochen nach der Transplantation unter Ethernarkose entnommen (siehe auch Kapitel 2.3).

Es wurden zwei Aspekte betrachtet: zum einen wurde der Einfluss nierenspezifischer MRP2-Defizienz auf die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp untersucht. Hierzu wurden die Transkriptgehalte bei Wildtyp-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren mit denen bei Wildtyp-Empfängern von Wildtyp-Nieren verglichen. Ebenso wurden die Transkriptgehalte bei MRP2^{-/-}-Empfängern von Wildtyp-Nieren mit denen bei MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren verglichen (Tabelle 7).

Zum anderen wurde untersucht, ob es von Bedeutung ist, in welcher genetischen Umgebung sich die transplantierten Nieren befinden. Es wurden die renalen und hepatischen Transkriptgehalte der genannten Transporter von Wildtyp-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren mit den entsprechenden Transkriptgehalten von MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren verglichen. Analog wurden die Transkriptgehalte bei MRP2^{-/-}-Empfängern von Wildtyp-Nieren mit den entsprechenden Transkriptgehalten bei Wildtyp-Empfängern von Wildtyp-Nieren verglichen (Tabelle 7).

2.11. *Statistische Auswertung*

Die in den Säulendiagrammen angegebenen Werte sind Mittelwerte. Die angegebenen Fehlerindikatoren stellen Standardfehler der Mittelwerte dar. Für die statistische Auswertung wurde das Programm „SigmaStat 3.0“ der Firma STATCON (Witzenhausen) verwendet. Als Voraussetzung für einen statistisch signifikanten Unterschied galt die Bedingung $P < 0,05$.

Die PCR-Ergebnisse für die nativen MRP2^{-/-}-Ratten und die Wildtyp-Kontrollen wurden mittels Rangsummentest nach Mann und Whitney verglichen. Dieser Test wurde gewählt, da bei den erhobenen Daten nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte (Boussard, 2005). Die Organe Niere und Leber wurden getrennt betrachtet.

Die Daten für die PCR der transplantierten Gruppen wurden mit der Einwege-Varianzanalyse nach Kruskal und Wallis (ANOVA) statistisch ausgewertet. Auch hier konnte eine Normalverteilung der Daten nicht angenommen werden (Szakacs et al., 2004). Die Organe Niere und Leber wurden getrennt betrachtet.

Bei der Auswertung der Daten der PCR-Untersuchungen kam die so genannte „delta-delta- c_T -Methode“ ($\Delta\Delta c_T$ -Methode) zur Anwendung. Diese Methode dient der relativen Quantifizierung der Expressionen entsprechender Zielgene zueinander. Es werden nicht die absoluten Kopienzahlen miteinander verglichen, sondern deren Verhältnis zu einem (möglichst) ubiquitär vorhandenen Haushaltsgen (in diesem Fall PBGD). Methodisch erfolgt diese Normierung dadurch, dass zunächst die Differenz aus dem c_T -Wert des Zielgens und des entsprechenden Referenzgens in der zu untersuchenden Gruppe gebildet wird (Δc_T). Von diesem Wert wird anschließend der ebenfalls normierte Wert der Kontrollgruppe subtrahiert ($\Delta\Delta c_T$). Der relative Expressionsunterschied ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta c_T}$ (Pfaffl, 2004).

3. ERGEBNISSE

3.1. *Renale und hepatische Transkriptgehalte bei nativen Ratten*

Die renalen und hepatischen Transkriptgehalte der organischen Anionentransporter MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp wurden miteinander verglichen, um festzustellen, welche dieser Transporter von der MRP2-Defizienz bei MRP2^{-/-}-Ratten betroffen sind. Hierfür wurden die jeweiligen Transkriptgehalte im renalen Kortex und in der Leber bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten untersucht. Als Kontrollen dienten die entsprechenden Transkriptgehalte bei Wildtyp-Ratten.

Die MRP2-Transkriptgehalte in Niere und Leber waren bei MRP2^{-/-}-Ratten gegenüber denen bei Wildtyp-Ratten etwa um den Faktor acht niedriger (Abbildung 2). Im Folgenden werden die Ergebnisse bei nativen Tieren des MRP2^{-/-}-Stammes und des Wildtyp-Stammes für die Transporter MRP1, MRP3, MRP4 und Pgp dargestellt.

ERGEBNISSE
Renale und hepatische Transkriptgehalte bei nativen Ratten

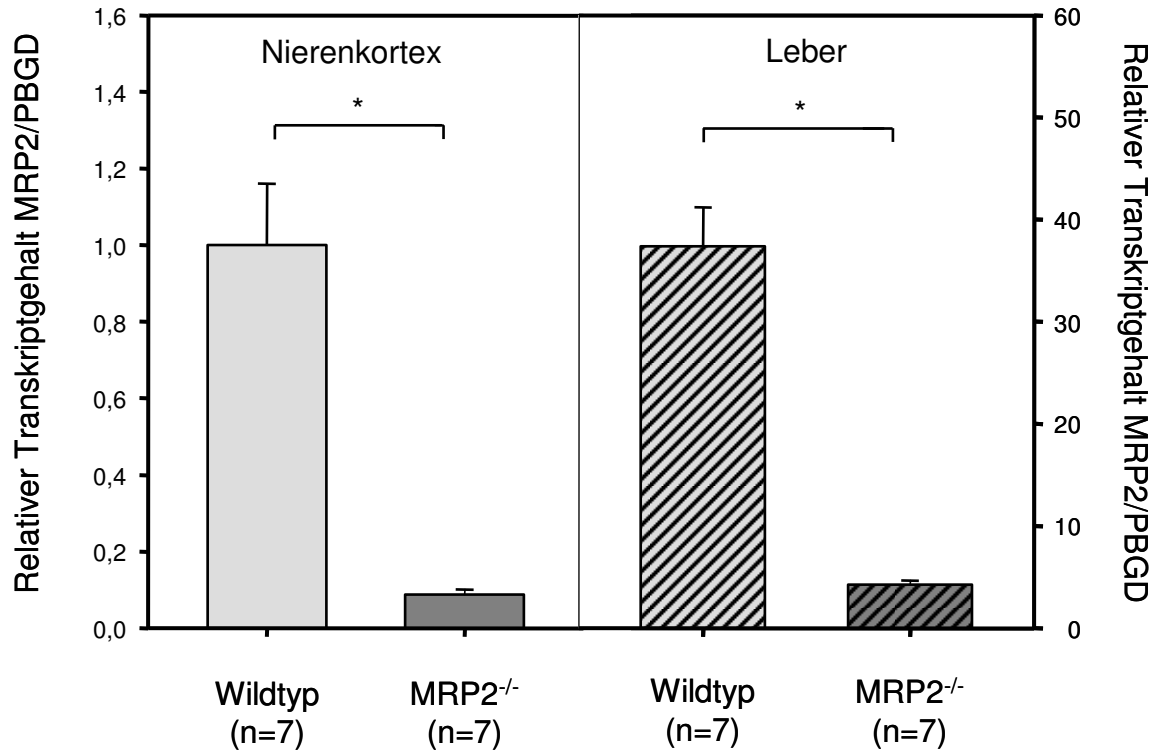


Abbildung 2: MRP2-Transkriptgehalte im Nierenkortex und in der Leber. In dieser Abbildung haben die Y-Achsen unterschiedliche Maßstäbe. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, MRP2^{-/-}: MRP2-defizienter Stamm, * p<0,05.

Beim Vergleich der renalen und hepatischen MRP1-Transkriptgehalte ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen nativen MRP2^{-/-}-Ratten und nativen Wildtyp-Ratten (Abbildung 3).

ERGEBNISSE
Renale und hepatische Transkriptgehalte bei nativen Ratten

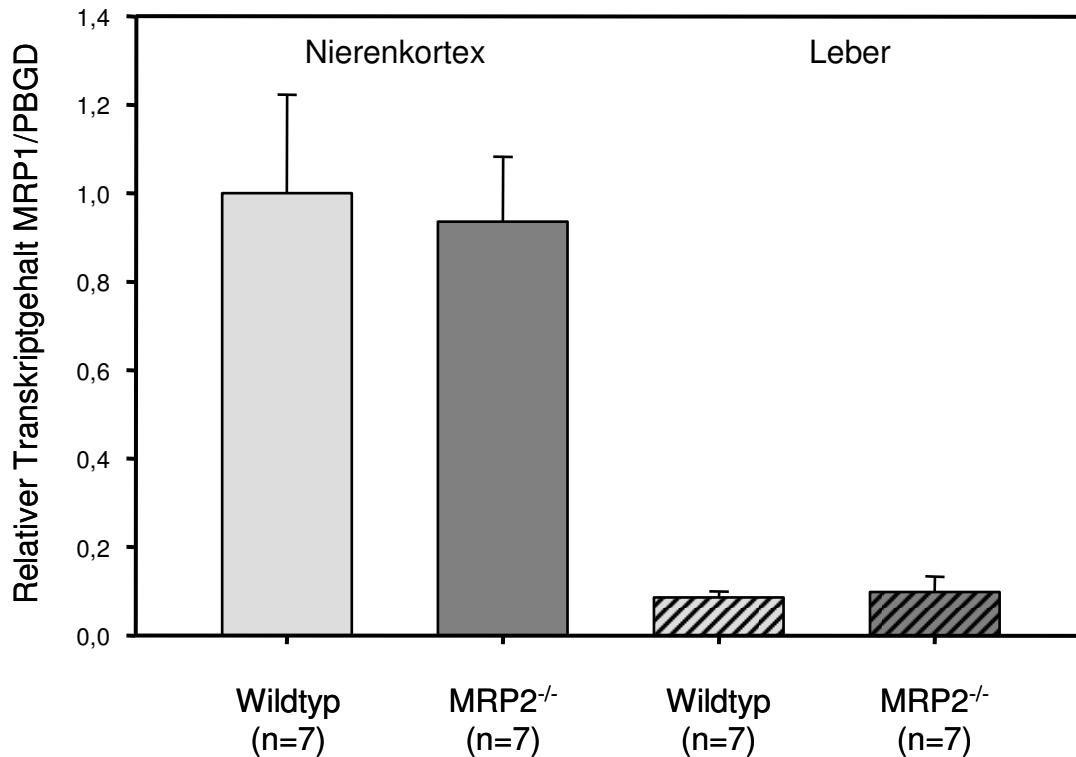


Abbildung 3: MRP1-Transkriptgehalte im Nierenkortex und in der Leber. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, MRP2^{-/-}: MRP2-defizienter Stamm.

Während für den Nierenkortex kein signifikanter Unterschied im MRP3-Transkriptgehalt zwischen MRP2^{-/-}-Ratten und Wildtyp-Ratten zu verzeichnen war, wurde im Lebergewebe bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten ein deutlich höherer MRP3-Transkriptgehalt als bei nativen Wildtyp-Ratten gefunden (Abbildung 4).

ERGEBNISSE
Renale und hepatische Transkriptgehalte bei nativen Ratten

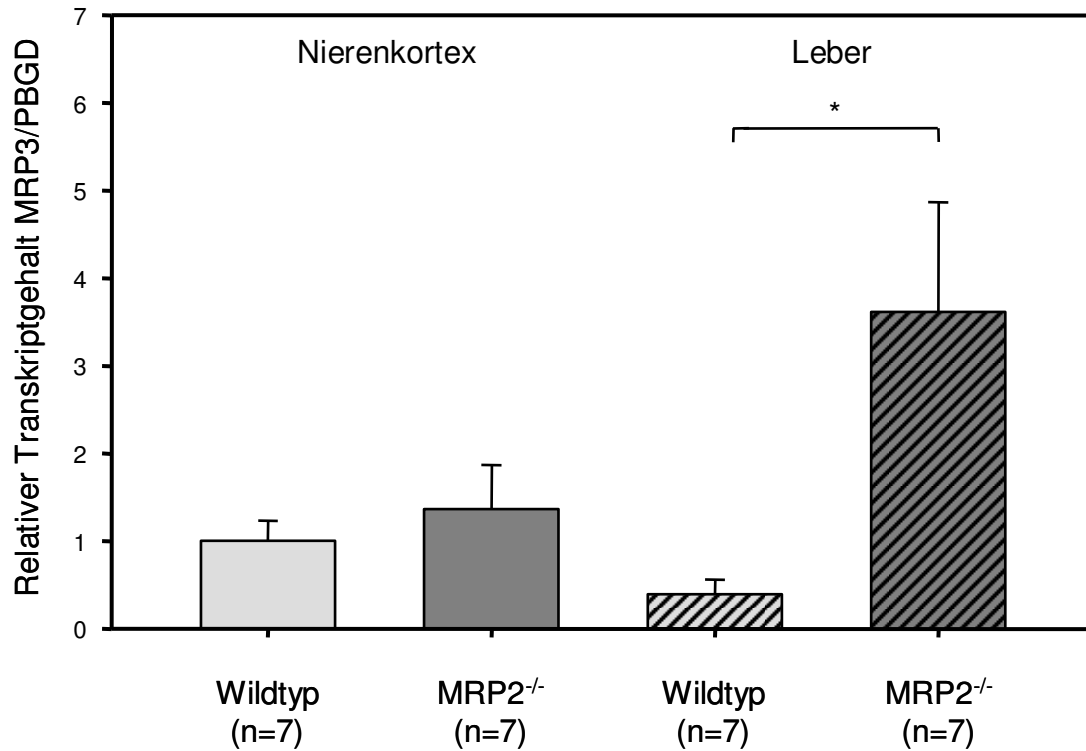


Abbildung 4: MRP3-Transkriptgehalte im Nierenkortex und in der Leber. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, MRP2^{-/-}: MRP2-defizienter Stamm, * p<0,05.

Beim Vergleich der renalen und hepatischen MRP4-Transkriptgehalte konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen nativen MRP2^{-/-}-Ratten und nativen Wildtyp-Ratten gefunden werden (Abbildung 5).

ERGEBNISSE
Renale und hepatische Transkriptgehalte bei nativen Ratten

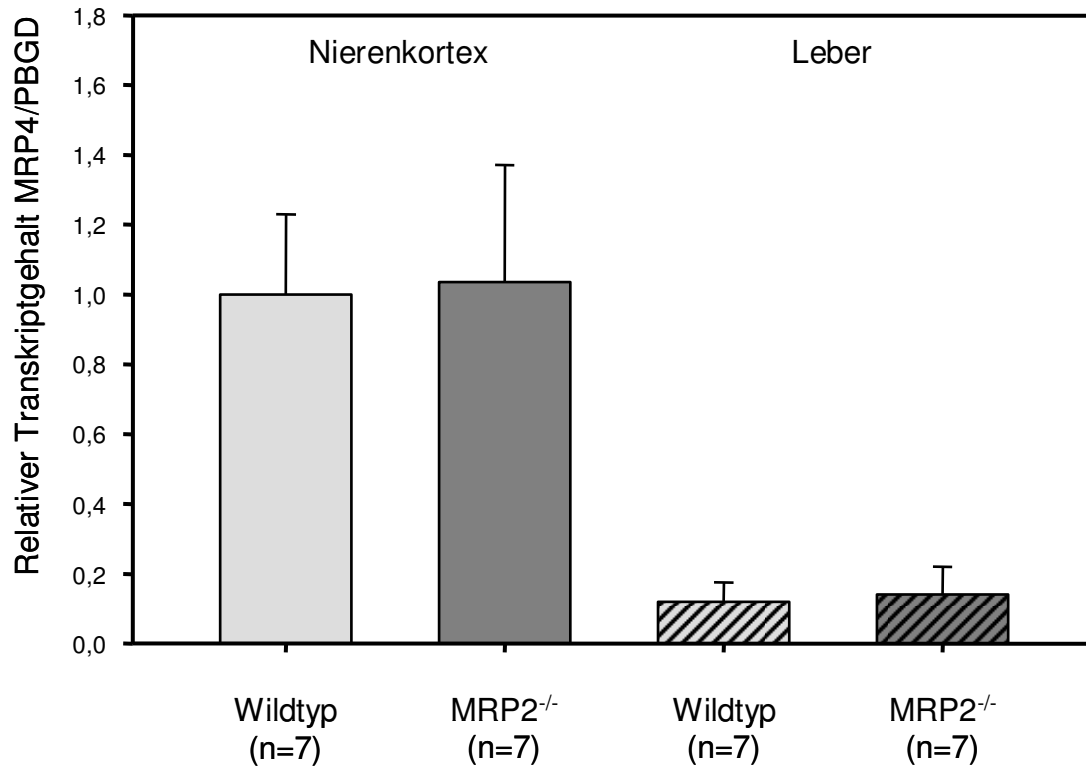


Abbildung 5: MRP4-Transkriptgehalte im Nierenkortex und in der Leber. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, MRP2^{-/-}: MRP2-defizienter Stamm.

Bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten war der Pgp-Transkriptgehalt in der Niere signifikant niedriger, im Lebergewebe signifikant höher als im entsprechenden Gewebe nativer Wildtyp-Ratten (Abbildung 6).

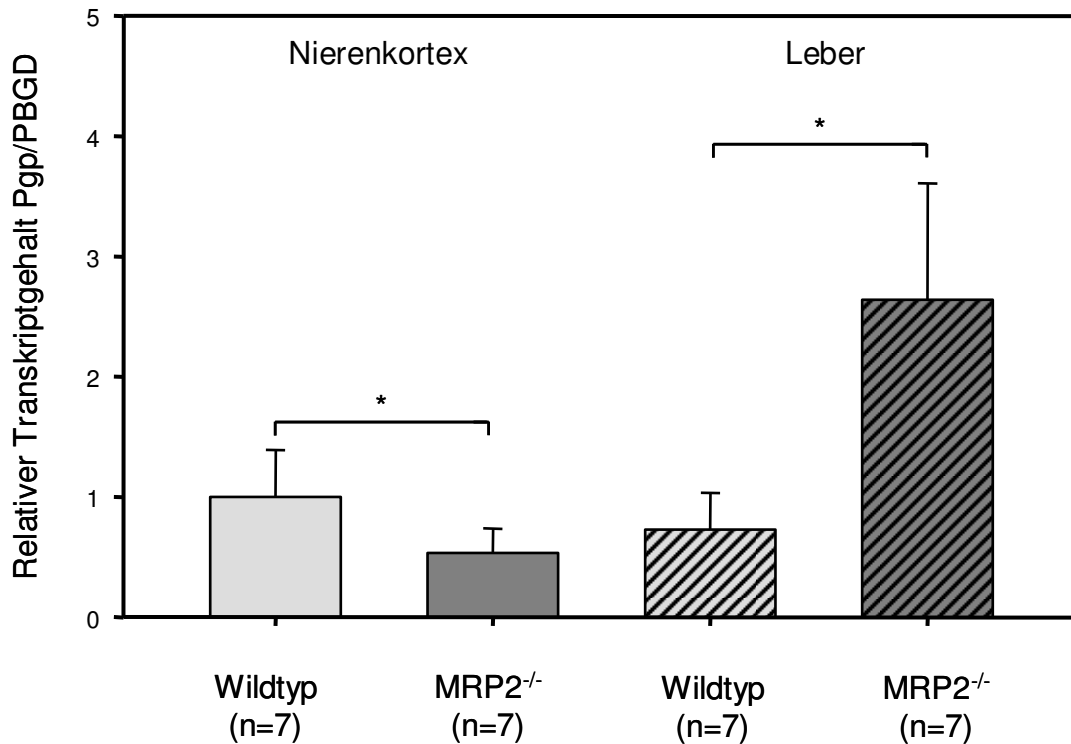


Abbildung 6: Pgp-Transkriptgehalte im Nierenkortex und in der Leber. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, MRP2^{-/-}: MRP2-defizienter Stamm, * p<0,05.

3.2. Renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten nach Nierenkreuztransplantation

Den folgenden Untersuchungen der Transkriptgehalte der Transporter MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp in Niere und Leber liegt ein Kreuztransplantationsmodell zu Grunde, bei dem MRP2-exprimierende Ratten (Wildtyp) MRP2-defiziente (MRP2^{-/-})-Nieren und MRP2-defiziente Ratten (MRP2^{-/-}-Ratten) MRP2-exprimierende (Wildtyp) Nieren erhielten. Als Kontrollen dienten jeweils Wildtyp-Empfänger von Wildtyp-Nieren bzw. MRP2^{-/-}-Empfänger von MRP2^{-/-}-Nieren. Die autochthonen Nieren wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entfernt: Die jeweils erste autochthone Niere wurde während der Transplantation, die jeweils zweite autochthone Niere eine Woche nach der Transplantation entnommen. Die Tiere verfügten also zum Untersuchungszeitpunkt nur über die transplantierte Niere.

ERGEBNISSE

Renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten nach Nierenkreuztransplantation

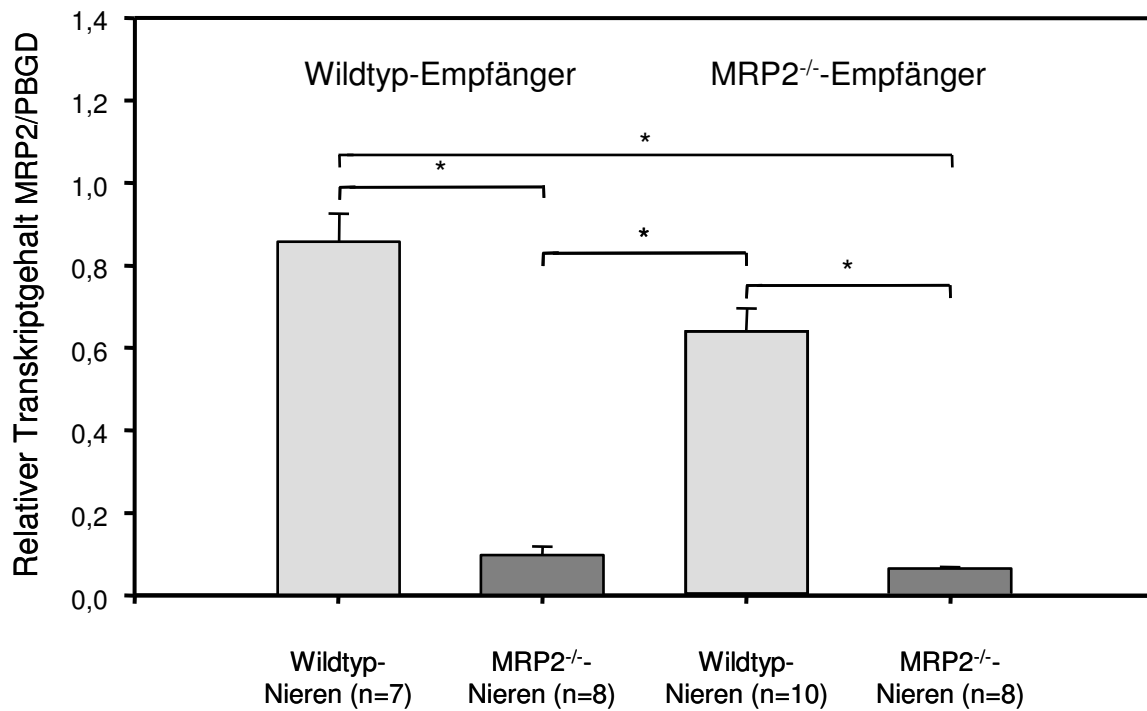


Abbildung 7: MRP2-Transkriptgehalte im Nierenkortex nach Nierentransplantation. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, MRP2^{-/-}: MRP2-defizient, * p<0,05.

Der MRP2-Transkriptgehalt war neun Wochen nach der Transplantation in transplantierten MRP2^{-/-}-Nieren erwartungsgemäß etwa um den Faktor zehn niedriger als in transplantierten Wildtyp-Nieren. Diese Unterschiede waren unabhängig vom genetischen Hintergrund der Empfänger (Abbildung 7). Der hepatische MRP2-Transkriptgehalt war bei MRP2-defizienten Empfängern ebenfalls signifikant niedriger als bei Wildtyp-Empfängern. Der Unterschied im hepatischen MRP2-Transkriptgehalt war unabhängig vom genetischen Hintergrund der transplantierten Niere (Abbildung 8). Die Ergebnisse hinsichtlich der renalen und hepatischen MRP2-Transkriptgehalte bei nierentransplantierten Ratten entsprechen somit den bei nativen Ratten erhobenen Befunden.

ERGEBNISSE

Renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten nach Nierenkreuztransplantation

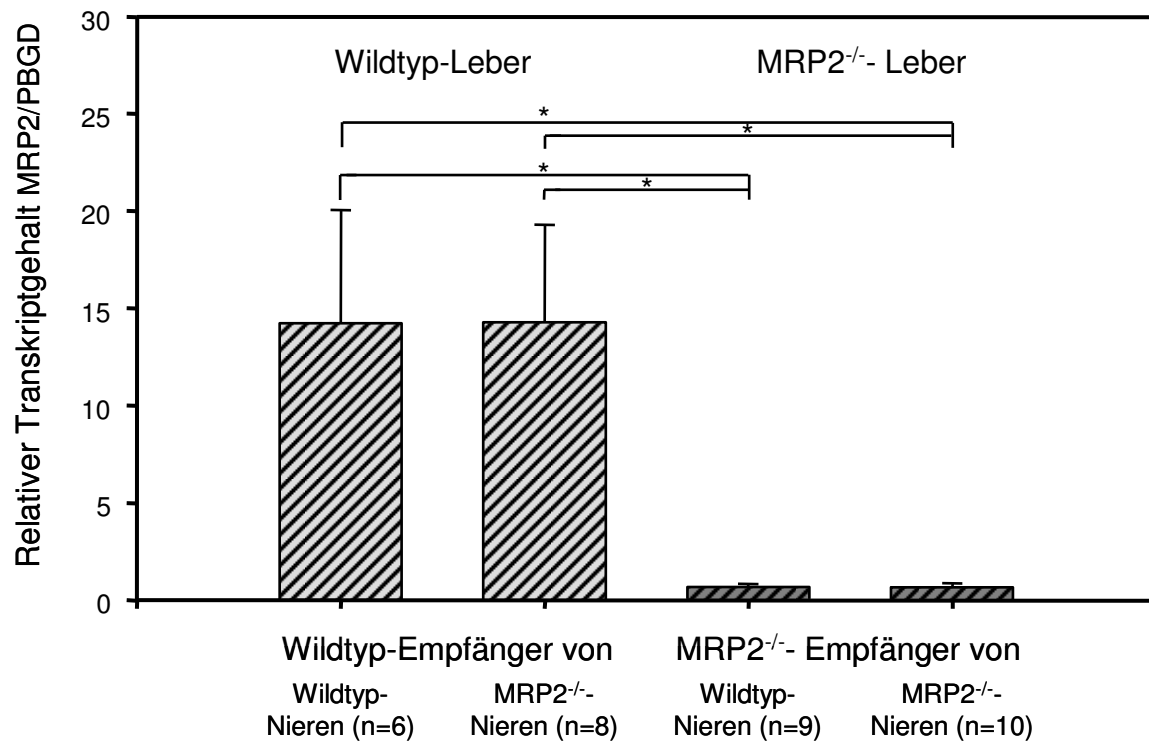


Abbildung 8: Hepatische MRP2-Transkriptgehalte nach Nierentransplantation. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, MRP2^{-/-}: MRP2-defizient, * p<0,05.

Der MRP1-Transkriptgehalt transplantiert MRP2^{-/-}-Nieren war neun Wochen nach der Transplantation bei Wildtyp-Empfängern signifikant geringer als bei MRP2^{-/-}-Empfängern. Der MRP1-Transkriptgehalt transplantiert Wildtyp-Nieren war bei MRP2^{-/-}-Empfängern signifikant höher als bei Wildtyp-Empfängern (Abbildung 9).

ERGEBNISSE

Renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten nach Nierenkreuztransplantation

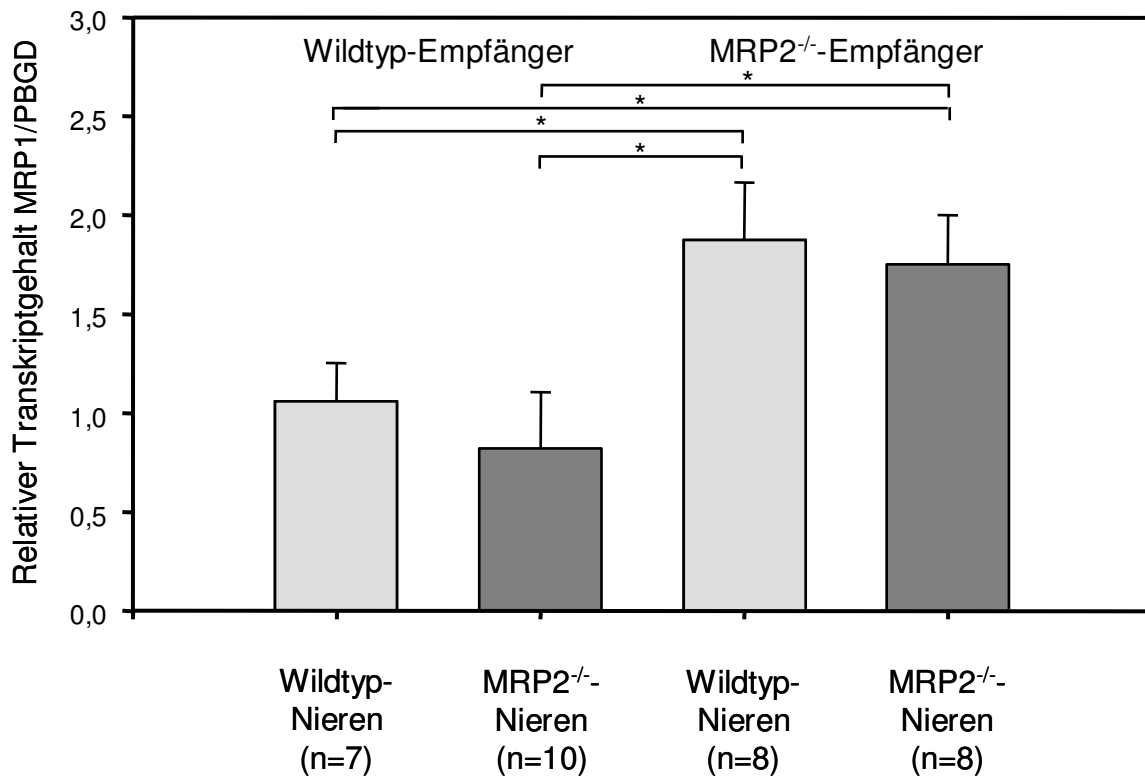


Abbildung 9: MRP1-Transkriptgehalte im Nierenkortex nach Nierentransplantation. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, MRP2^{-/-}: MRP2-defizient, * p<0,05.

Der hepatische MRP1-Transkriptgehalt war neun Wochen nach der Transplantation bei MRP2^{-/-}-Empfängern von Wildtyp-Nieren signifikant niedriger als bei Wildtyp-Empfängern von Wildtyp-Nieren. Der hepatische MRP1-Transkriptgehalt bei Wildtyp-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu dem bei MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren (Abbildung 10).

Der MRP3-Transkriptgehalt sowohl transplantiert MRP2^{-/-}-Nieren als auch transplantiert Wildtyp-Nieren war neun Wochen nach der Transplantation unabhängig vom genetischen Hintergrund der Empfänger (Abbildung 11). Der hepatische MRP3-Transkriptgehalt bei MRP2^{-/-}-Empfängern von Wildtyp-Nieren war ähnlich dem hepatischen MRP3-Transkriptgehalt bei Wildtyp-Empfängern von Wildtyp-Nieren. Der hepatische MRP3-Transkriptgehalt war bei Wildtyp-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren signifikant niedriger als bei MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren (Abbildung 12).

ERGEBNISSE

Renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten nach Nierenkreuztransplantation

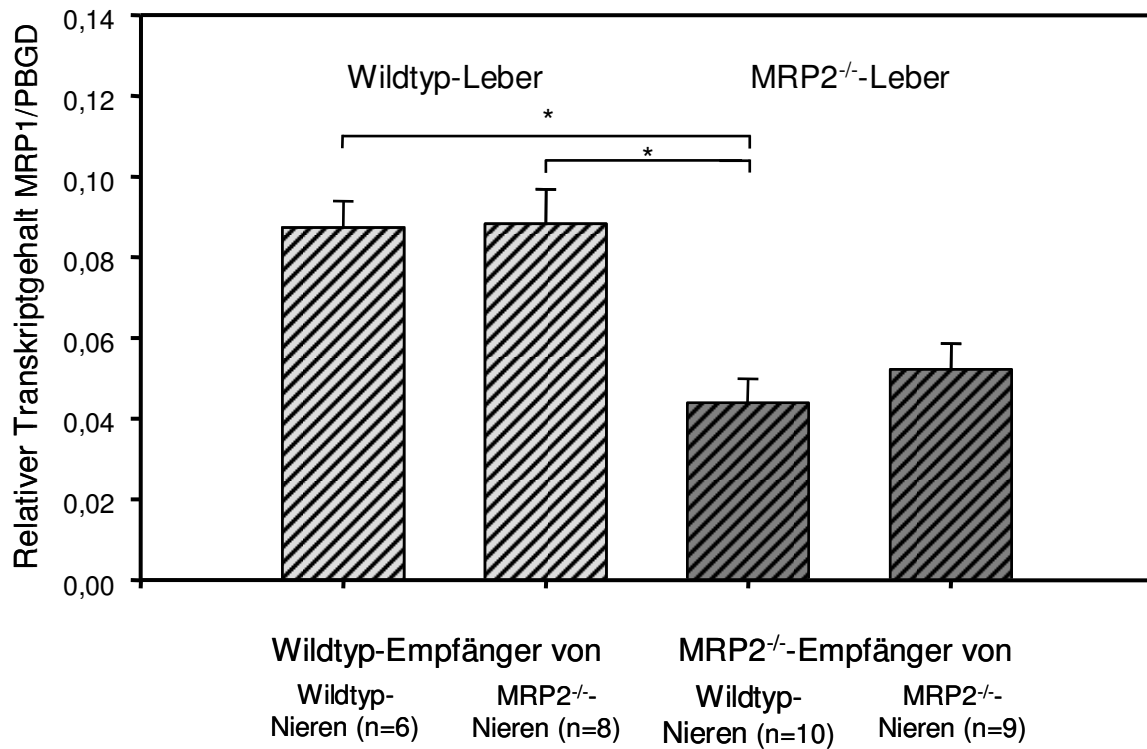


Abbildung 10: Hepatische MRP1-Transkriptgehalte nach Nierentransplantation. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, MRP2^{-/-}: MRP2-defizient, * p<0,05.

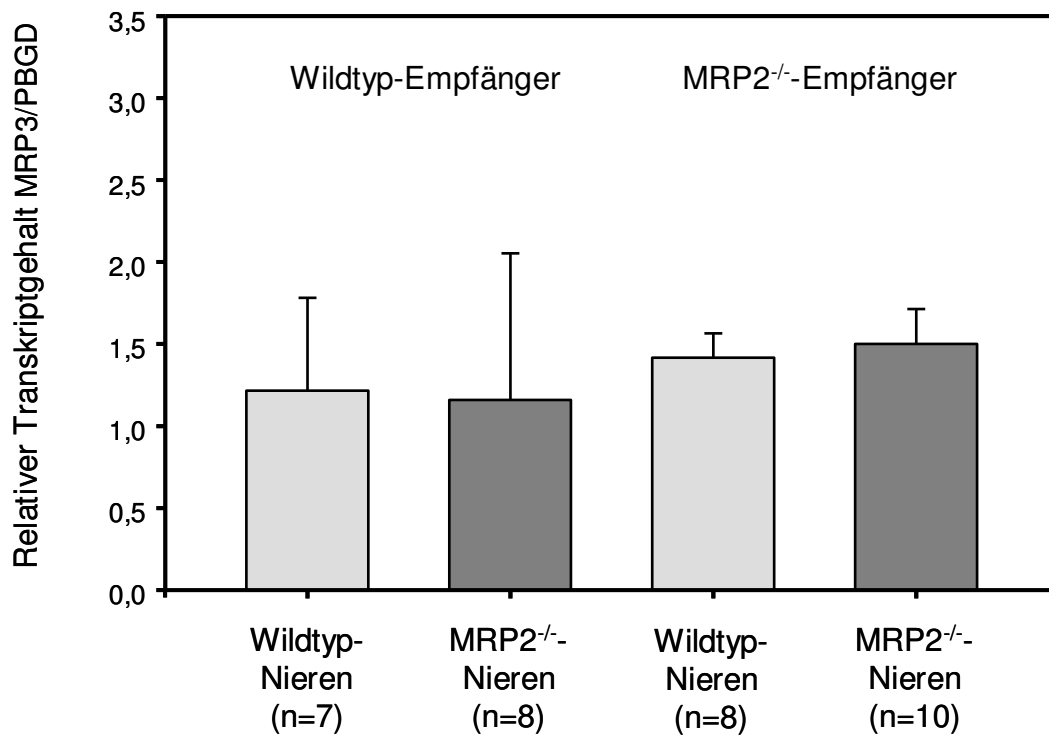


Abbildung 11: MRP3-Transkriptgehalte im Nierenkortex nach Nierentransplantation. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, MRP2^{-/-}: MRP2-defizient.

ERGEBNISSE

Renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten nach Nierenkreuztransplantation

Der MRP4-Transkriptgehalt sowohl transplantierte MRP2^{-/-}-Nieren als auch transplantierte Wildtyp-Nieren war neun Wochen nach der Transplantation unabhängig vom genetischen Hintergrund der Empfänger (Abbildung 13). Ebenso waren die hepatischen MRP4-Transkriptgehalte sowohl bei MRP2^{-/-}-Empfängern als auch bei Wildtyp-Empfängern unabhängig vom genetischen Hintergrund der transplantierten Nieren (Abbildung 14).

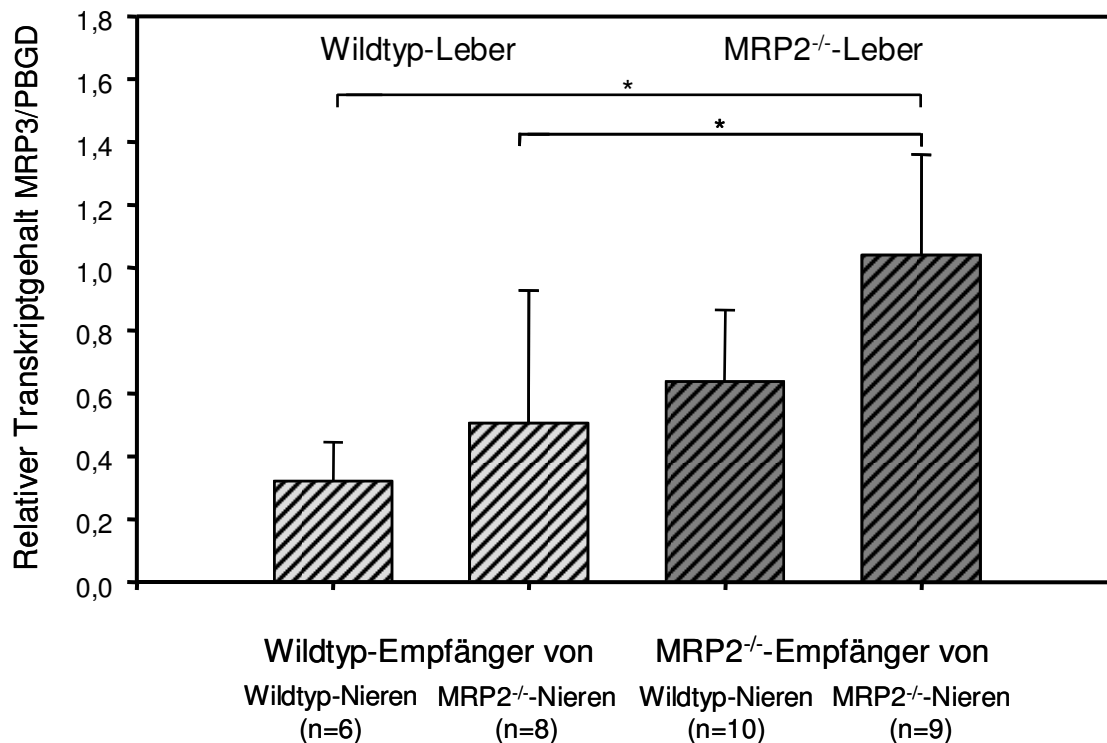


Abbildung 12: Hepatische MRP3-Transkriptgehalte nach Nierentransplantation. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, MRP2^{-/-}: MRP2-defizient, * p<0,05.

Der Pgp-Transkriptgehalt transplantierte Wildtyp-Nieren war neun Wochen nach der Transplantation bei MRP2^{-/-}-Empfängern signifikant geringer als bei Wildtyp-Empfängern (Abbildung 15). Dagegen war der Pgp-Transkriptgehalt transplantierte MRP2^{-/-}-Nieren unabhängig vom genetischen Hintergrund der Empfänger.

ERGEBNISSE

Renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten nach Nierenkreuztransplantation

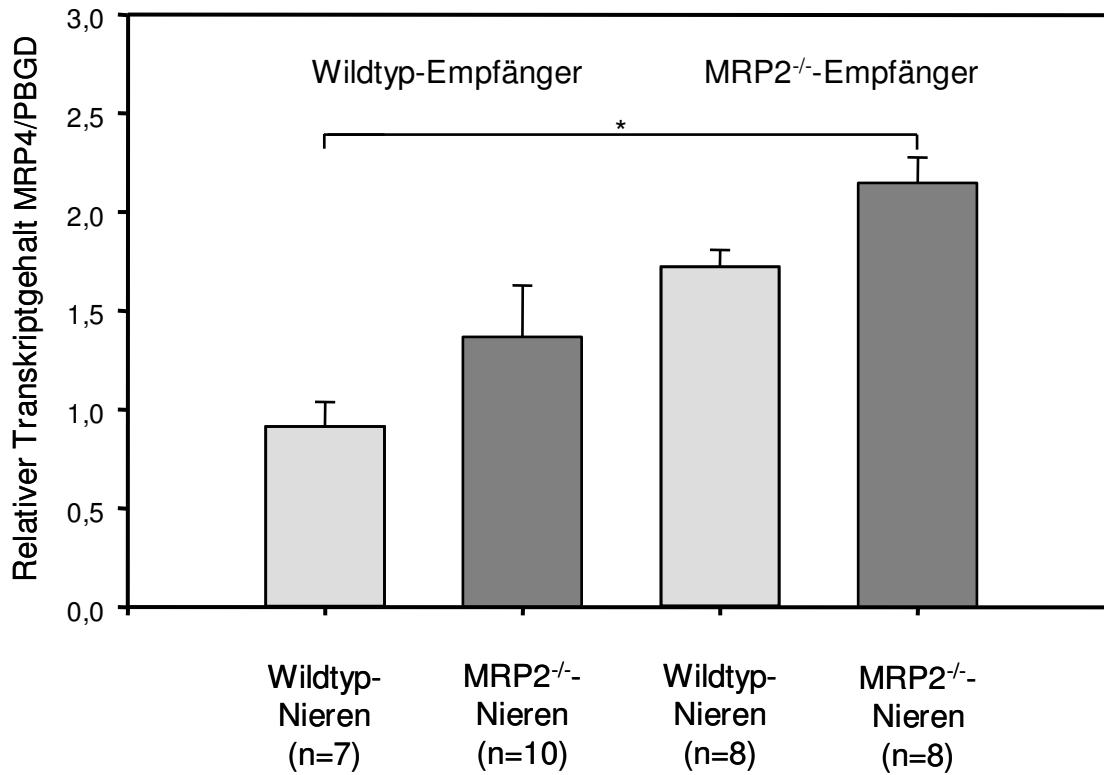


Abbildung 13: MRP4-Transkriptgehalte im Nierenkortex nach Nierentransplantation. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, MRP2^{-/-}: MRP2-defizient.

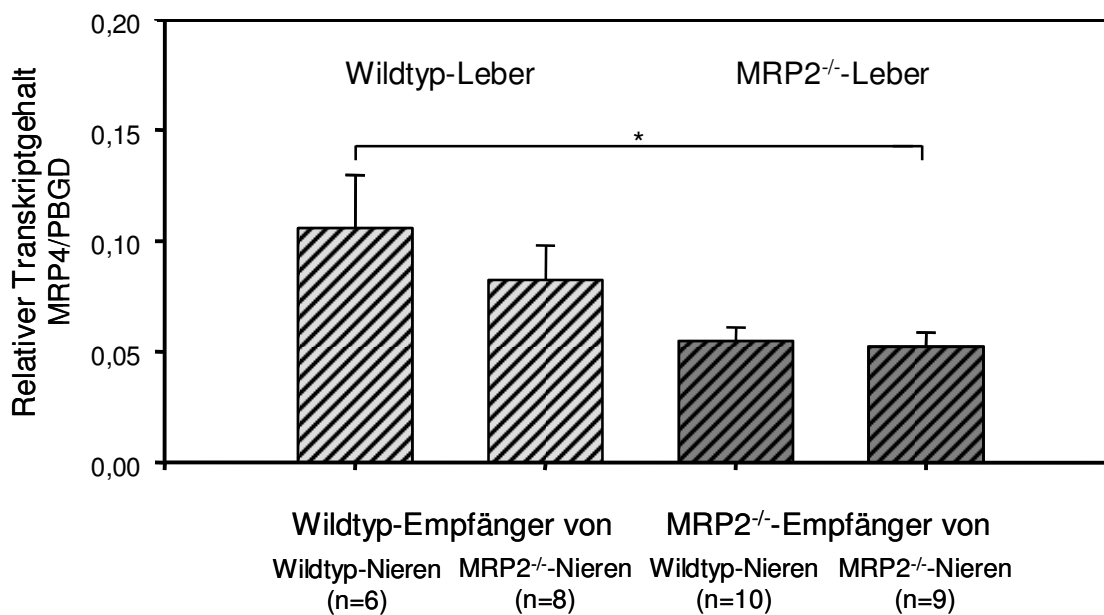


Abbildung 14: Hepatische MRP4-Transkriptgehalte nach Nierentransplantation. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, MRP2^{-/-}: MRP2-defizient.

ERGEBNISSE

Renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten nach Nierenkreuztransplantation

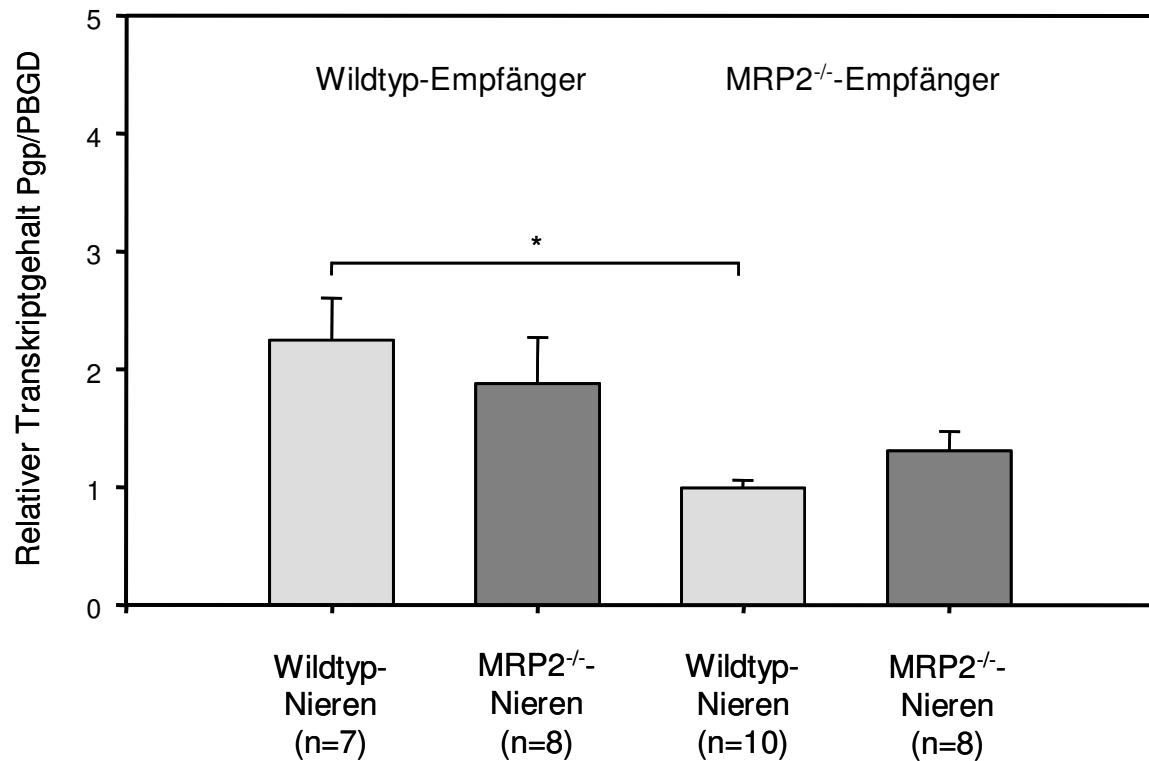


Abbildung 15: Pgp-Transkriptgehalte im Nierenkortex nach Nierentransplantation. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, MRP2^{-/-}: MRP2-defizient, * p<0,05.

Der hepatische Pgp-Transkriptgehalt war neun Wochen nach der Transplantation von Wildtyp-Nieren bei MRP2^{-/-}-Empfängern signifikant geringer als bei Wildtyp-Empfängern. Der hepatische Pgp-Transkriptgehalt war nach Transplantation von MRP2^{-/-}-Nieren bei Wildtyp-Empfängern signifikant höher als bei MRP2^{-/-}-Empfängern (Abbildung 16).

ERGEBNISSE

Einfluss der Transplantation auf renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten

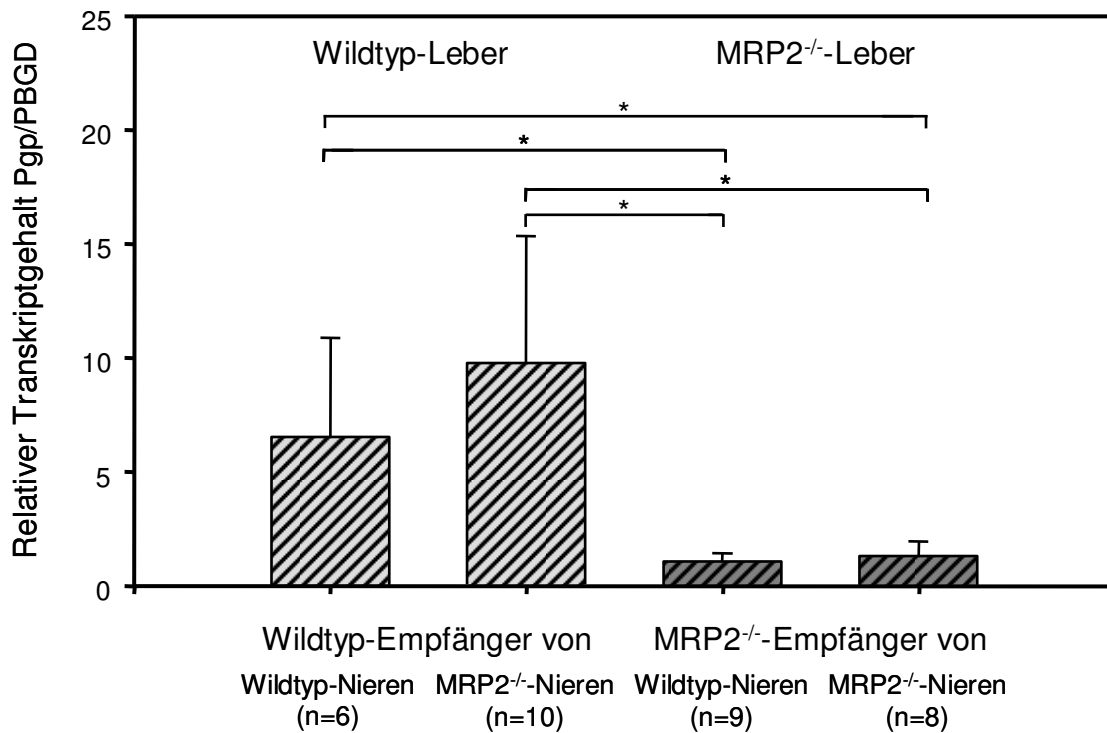


Abbildung 16: Hepatische Pgp-Transkriptgehalte nach Nierentransplantation. MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, MRP2^{-/-}: MRP2-defizient, * p<0,05.

3.3. Einfluss der Transplantation auf renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten

In einem weiteren Schritt wurden die bereits dargestellten Daten unter dem Aspekt untersucht, ob und inwieweit die Transplantation und das daraus resultierende Vorhandensein nur einer transplantierten Niere Einfluss auf die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp bei den Empfängern hatten. Neun Wochen nach Transplantation wurden die renalen und hepatischen Transkriptgehalte bei Wildtyp-Empfängern von Wildtyp-Nieren mit denen bei nativen Wildtyp-Ratten verglichen. Analog wurden die renalen und hepatischen Transkriptgehalte bei MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren im Vergleich zu denen bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten untersucht (Tabelle 8).

Neun Wochen nach Transplantation waren die MRP1-, MRP2-, MRP3-, MRP4- und Pgp-Transkriptgehalte transplantiert Wildtyp-Nieren bei Wildtyp-Empfängern ähnlich denen bei nativen Wildtyp-Ratten. Ebenso waren die hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP2, MRP3 und MRP4 bei Wildtyp-Empfängern von Wildtyp-Nieren ähnlich denen bei nativen

ERGEBNISSE
Gel-Elektrophorese

Wildtyp-Ratten. Der hepatische Pgp-Transkriptgehalt hingegen war bei Wildtyp-Empfängern von Wildtyp-Nieren signifikant höher als bei nativen Wildtyp-Ratten (Tabelle 8).

Tabelle 8: Relative renale und hepatische Transkriptgehalte von MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp bei nativen Wildtyp- und MRP2^{-/-}-Ratten und nach syngener Nierentransplantation

Gruppen	1	2	3	4	5	6	7	8
Rattenstamm	Wildtyp				MRP2 ^{-/-}			
Organ	Niere		Leber		Niere		Leber	
Behandlung	Syngen		Syngen		Syngen		Syngen	
	Nativ	transplantiert	Nativ	transplantiert	Nativ	transplantiert	Nativ	transplantiert
Anzahl	n = 7	n = 7	n = 7	n = 6	n = 7	n = 8	n = 7	n = 9
MRP1	1,00 ± 0,22	1,06 ± 0,19	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,93 ± 0,15	1,75 ± 0,25 *	0,10 ± 0,04	0,05 ± 0,02 **
MRP2	1,00 ± 0,43	0,86 ± 0,18	37,37 ± 10,13	14,24 ± 5,81	0,09 ± 0,03	0,06 ± 0,01	4,25 ± 1,06	0,66 ± 0,17
MRP3	1,00 ± 0,23	1,22 ± 0,57	0,40 ± 0,17	0,32 ± 0,12	1,36 ± 0,51	1,50 ± 0,21	3,61 ± 1,25	1,04 ± 0,32
MRP4	1,00 ± 0,23	0,91 ± 0,31	0,12 ± 0,06	0,11 ± 0,06	1,04 ± 0,33	2,15 ± 0,36 *	0,14 ± 0,08	0,05 ± 0,02 **
Pgp	1,00 ± 0,39	2,25 ± 0,94	0,73 ± 0,30	6,51 ± 4,37 ⁺	0,53 ± 0,20	1,30 ± 0,46 *	2,64 ± 0,97	1,31 ± 0,63

⁺p < 0,05 vs. Gruppe 3; *p < 0,05 vs. Gruppe 5; **p < 0,05 vs. Gruppe 7

Neun Wochen nach Transplantation waren die renalen MRP2- und MRP3-Transkriptgehalte bei MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren ähnlich den entsprechenden Transkriptgehalten bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten. Die MRP1-, MRP4- und Pgp-Transkriptgehalte transplantiert MRP2^{-/-}-Nieren waren neun Wochen nach der Transplantation bei MRP2^{-/-}-Empfängern signifikant höher als bei autochthonen Nieren nativer MRP2^{-/-}-Ratten (Tabelle 8).

Neun Wochen nach Transplantation waren die hepatischen MRP2-, MRP3- und Pgp-Transkriptgehalte bei MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren ähnlich den entsprechenden Transkriptgehalten bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten. Die hepatischen MRP1- und MRP4-Transkriptgehalte waren bei MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren signifikant niedriger als bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten (Tabelle 8).

3.4. Gel-Elektrophorese

Die Fragmentgröße der mittels qRT-PCR amplifizierten cDNA wurde bestimmt, um die Qualität der erhaltenen Ergebnisse zu evaluieren. Unter den in Kapitel 2.9 beschriebenen

ERGEBNISSE
Gel-Elektrophorese

Bedingungen waren die Banden bei geringer Hintergrundfärbung klar zu erkennen. Für jedes der untersuchten Transportproteine stellte sich jeweils eine diskrete Zone dar, so dass von einer Amplifikation lediglich dieses Gens innerhalb eines Ansatzes ausgegangen werden konnte. Dies wurde sowohl bei Leber als auch Niere deutlich. Die Fragmentgröße des für MRP1 kodierenden Gens lag im Bereich von 100 bp. Die Fragmentgrößen der Gene von MRP2, MRP3, MRP4, Pgp und PBGD lagen zwischen 175 bp und 200 bp (Abbildung 17 und Abbildung 18).

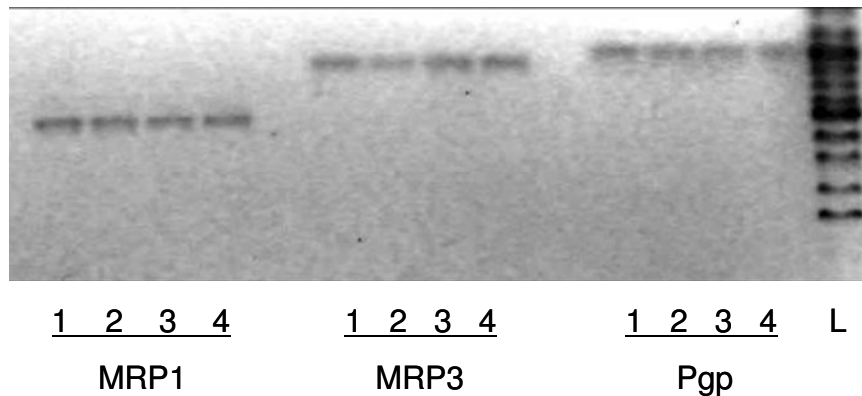


Abbildung 17: Gel-Elektrophorese von PCR-Produkten des Nierenkortex (exemplarisch). Für MRP1, MRP3 und Pgp konnten jeweils diskrete Banden gleicher Längen bei allen untersuchten Nierenkortex dargestellt werden. Bahnen 1 und 2 entsprechen transplantierten MRP2^{-/-}-Nieren, Bahnen 3 und 4 transplantierten Wildtyp-Nieren jeweils bei MRP2^{-/-}-Empfängern. L: Längenstandard 25-500 Basenpaare, MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, Pgp: P-Glykoprotein.

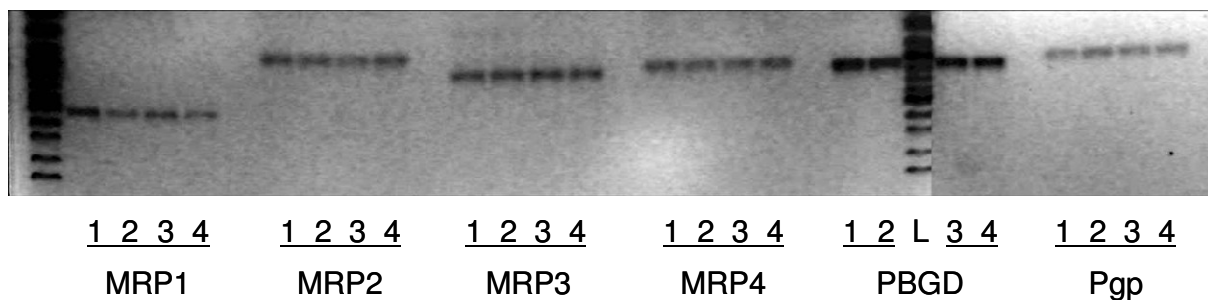


Abbildung 18: Gel-Elektrophorese von PCR-Produkten der Leber (exemplarisch). Für MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, PBGD und Pgp konnten jeweils diskrete Banden gleicher Längen bei allen untersuchten Lebern dargestellt werden. Bahnen 1 und 2 entsprechen Lebern bei MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren. Bahnen 3 und 4 entsprechen Lebern bei MRP2^{-/-}-Empfängern von Wildtyp-Nieren. L: Längenstandard 25-500 Basenpaare, MRP: Multidrug Resistance-associated Protein, PBGD: Porphobilinogen-Desaminase, Pgp: P-Glykoprotein.

4. DISKUSSION

Niere und Leber sind zwei der wichtigsten Ausscheidungsorgane bei allen Säugetieren. Ein großer Teil schädlicher Stoffe wird über eine transportervermittelte Sekretion in das Tubulussystem der Nieren und in die intrahepatischen Gallengänge ausgeschieden. Eine bedeutende Rolle insbesondere bei der Elimination pharmakologisch relevanter Substrate spielen hierbei die Efflux-Transporter der ABC-Familie (*ATP-binding-cassette*).

In der vorliegenden Arbeit wurden die renalen und hepatischen Transkriptgehalte der wichtigsten Transporter der ABC-Familie – **MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp** – bei nativen Wildtyp-Ratten vom Stamm Lewis-1W und kongenen nativen MRP2^{-/-}-Ratten untersucht. So konnten Rückschlüsse auf mögliche Kompensationsmechanismen für die MRP2-Defizienz bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten gezogen werden. Außerdem wurde ein kongenes Kreuztransplantationsmodell der Nieren etabliert, bei dem Wildtyp-Ratten und MRP2^{-/-}-Ratten als Nierenspender und als Nierenempfänger dienten. Auf diese Weise konnte ein Modell mit nierenspezifischer MRP2-Defizienz bzw. nierenspezifischer MRP2-Expression etabliert werden. Anhand dieses Modells wurden die Einflüsse nierenspezifischer MRP2-Defizienz und syngener Nierentransplantationen (Spender und Empfänger mit demselben genetischen Hintergrund) auf die renalen und hepatischen Transkriptgehalte der genannten Transporter untersucht.

Bei **nativen Ratten** korrelierte die MRP2-Defizienz mit einem erhöhten renalen MRP3- und hepatischen Pgp-Transkriptgehalt sowie mit einem verminderten hepatischen MRP3-Transkriptgehalt. Nach Kreuztransplantationen der Nieren konnte die nierenspezifische MRP2-Defizienz auf transkriptionaler Ebene bestätigt werden. Dies war die Grundvoraussetzung für die Untersuchungen der renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP3, MRP4 und Pgp bei nierentransplantierten Ratten in diesem Modell.

Nierenspezifische MRP2-Defizienz nach Nierenkreuztransplantation hatte keinen Einfluss auf die renalen und hepatischen Transkriptgehalte der untersuchten Transporter. Syngene Nierentransplantationen hatten bei MRP2^{-/-}-Ratten einen größeren Einfluss auf die untersuchten Transkriptgehalte als bei Wildtyp-Ratten im Vergleich zu den jeweiligen nativen Tieren. Transplantierte MRP2^{-/-}-Ratten reagierten auf syngene Nierentransplantationen mit

weit reichenderen Veränderungen der untersuchten Transkriptgehalte als nierentransplantierte Wildtyp-Ratten.

4.1. Kongene Transplantationsmodelle

Es gibt insgesamt nur wenige Expressionsstudien an kongenen Transplantationsmodellen. An demselben Modell wie in der vorliegenden Arbeit untersuchten Grisk et al. die renalen Expressionen von MRP2 und MRP4 bei nierentransplantierten Ratten (Grisk et al., 2009).

Bei **Kreuztransplantationen** zwischen genetisch verschiedenen Rattenstämmen mussten akute bzw. chronische Abstoßungsreaktionen gewöhnlich durch den Einsatz immunsupprimierender Medikamente verhindert werden. Einige dieser Medikamente (z. B. Cyclosporin) sind jedoch nephrotoxisch, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Ergebnisse von Studien an nicht-kongenem Transplantationsmodellen durch die Verabreichung der Immunsuppressiva beeinflusst werden (Gasser et al., 2004). In kongenen Kreuztransplantationsmodellen können Abstoßungsreaktionen auch ohne Immunsuppressiva minimiert werden (Churchill et al., 2001; Grisk et al., 2009). Dies hat den Vorteil, dass die gefundenen Ergebnisse solcher Studien allein auf die Effekte der Transplantation zurückgeführt werden können.

Bei dem Tiermodell der vorliegenden Arbeit wurden durch spezielle Zuchtmaßnahmen unter Verwendung genetischer Marker die **Genloci** für die MRP2-Defizienz von MRP2-defizienten Wistar-Ratten auf den genetischen Hintergrund des Inzuchtstammes Lewis-1W übertragen (Grisk et al., 2009). Aus Geschwisterkreuzungen der für die MRP2-Defizienz heterozygoten Lewis-1W-Ratten resultierten ein MRP2-exprimierender Lewis-1W-Stamm (Wildtyp) und ein kongener MRP2-defizienter Stamm (MRP2^{-/-}). Es bestand zwischen den Wildtyp-Ratten und den MRP2^{-/-}-Ratten also eine hohe genetische Homogenität (Grisk et al., 2009).

Neun Wochen nach Nierentransplantation konnten in den Transplantaten keine Hinweise auf Abstoßungsreaktionen gefunden werden (Grisk et al., 2009). Dies stellte die Grundvoraussetzung für die Untersuchungen der Effekte nierenspezifischer MRP2-Defizienz bzw. nierenspezifischer MRP2-Expression auf die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP3, MRP4 und Pgp dar. Es kann dabei angenommen werden, dass die

gefundenen Ergebnisse überwiegend auf MRP2-Defizienz bzw. MRP2-Expression zurückzuführen sind.

4.2. *Renale und hepatische Transkriptgehalte bei nativen Ratten*

In diesem Teil der Arbeit wurden die Auswirkungen der MRP2-Defizienz auf die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP3, MRP4 und Pgp bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten untersucht. Als Kontrollen dienten die entsprechenden Transkriptgehalte bei Wildtyp-Ratten. Es wurden jeweils die Transkriptgehalte der MRP2-defizienten Organe mit den entsprechenden der MRP2-exprimierenden Organe verglichen.

Die **renalen und hepatischen MRP2-Transkriptgehalte** bei MRP2^{-/-}-Ratten betragen nur noch zehn Prozent der entsprechenden Transkriptgehalte bei den nativen Wildtyp-Kontrollen. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit die zu erwartende MRP2-Defizienz bei MRP2^{-/-}-Ratten gegenüber den Wildtyp-Ratten auf transkriptionaler Ebene bestätigt werden. Grisk et al. bestätigten dies auch auf Proteinebene mittels Western-Blot und immunhistochemischen Methoden (Grisk et al., 2009). Ein verminderter MRP2-Transkriptgehalt scheint also bei MRP2^{-/-}-Ratten mit dem Fehlen des MRP2-Proteins assoziiert zu sein.

Konjugiertes Bilirubin ist ein endogenes Substrat von MRP2 und wird unter anderem über die Nieren und die Leber ausgeschieden (Jedlitschky et al., 1997; Grisk et al., 2009). Die Plasmaspiegel von konjugiertem Bilirubin waren bei MRP2^{-/-}-Ratten 100 Mal höher als bei Wildtyp-Ratten (Grisk et al., 2009). Die renale Exkretion der exogenen MRP2-Substrate PAH und Morphin-6-Glukuronid (M6G) war bei MRP2^{-/-}-Ratten höher als bei Wildtyp-Ratten (Grisk et al., 2009). Offenbar bilden MRP2^{-/-}-Ratten Mechanismen aus, für die MRP2-Defizienz im Hinblick auf die renale Ausscheidung dieser Substrate zu kompensieren.

Die **renalen und hepatischen MRP1-Transkriptgehalte** bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten waren im Vergleich zu den entsprechenden Transkriptgehalten bei Wildtyp-Ratten unverändert. Auf transkriptionaler Ebene konnten somit keine Hinweise darauf gefunden werden, dass sich die MRP2-Defizienz auf die renale und hepatische Expression von MRP1 bei MRP2^{-/-}-Ratten

auswirkt. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass der MRP1-Transkriptgehalt in gesunden Lebern niedriger ist als in Nieren, im Gastrointestinaltrakt, in der Lunge und im Gehirn (Cherrington et al., 2002; Choudhuri et al., 2003; Ros et al., 2003). Andererseits konnte in Hepatozyten nach Leberteilektomie eine hohe MRP1-Expression bei Wistar- und Fischer-344-Ratten gefunden werden (Ros et al., 2003). Dies ist ein Indiz dafür, dass MRP1 insbesondere für regenerative Prozesse der Leber von Bedeutung ist.

MRP3 ist ein basolateraler Effluxtransporter und könnte zur Detoxifikation renaler Tubuluszellen beitragen (Keppler und König, 2000; Scheffer et al., 2002). MRP3 könnte einer intrazellulären Akkumulation unter anderem von MRP2-Substraten entgegenwirken, da es große Substratüberschneidungen zwischen MRP2 und MRP3 gibt (Villanueva et al., 2008). MRP3-Substrate werden ebenso wie MRP2-Substrate in glukuronidierter Form bzw. konjugiert mit anderen Substanzen (z. B. Glutathion, Sulfat) transportiert (Ogawa et al., 2000; Tanaka et al., 2002). In Abwesenheit von MRP2 könnte MRP3 die Detoxifikation von intrazellulär akkumulierenden MRP2-Substraten übernehmen und folglich hoch reguliert werden. Der renale MRP3-Transkriptgehalt war jedoch bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten ähnlich wie bei nativen Wildtyp-Ratten. Es konnten in der vorliegenden Arbeit somit keine Hinweise darauf gefunden werden, dass die MRP2-Defizienz bei MRP2^{-/-}-Ratten die Expression von MRP3 in der Niere beeinflusst.

Für die unveränderten **MRP1- und MRP3- Transkriptgehalte** bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten ist jedoch auch folgende Erklärung möglich: Der Transport aus den Tubulusepithelzellen hinaus führt überwiegend über die apikale Membran in das Lumen des Tubulussystems der Nieren. Während des Transports von Bilirubin, einem gemeinsamen Substrat von MRP1, MRP2 und MRP3, vom Interstitium in das Lumen des renalen Tubulussystems akkumuliert Bilirubin in intrazellulären Kompartimenten der Epithelzellen (Jedlitschky et al., 1997; van Aabel et al., 2000; Borst et al., 2007; Grisk et al., 2009; Quiros et al., 2010). Darüber hinaus gibt es auch einen Transport über die basolaterale Membran in das Interstitium, über dessen Funktion bisher wenig bekannt ist (van Aabel et al., 2000). Hier könnten MRP1 und MRP3 als basolaterale Effluxtransporter zur Detoxifikation renaler Tubuluszellen beitragen (van Aabel et al., 2000). Bei MRP2-Defizienz könnte es aufgrund der Substratüberschneidungen mit MRP2 zur Induktion der MRP1- und MRP3-Expressionen kommen (Jedlitschky et al., 1997; Borst et al., 2007; Nies und Keppler, 2007). Andererseits können erhöhte Plasmaspiegel der entsprechenden Substrate zur Inhibition der MRP1- und MRP3-Expressionen führen (Tanaka

et al., 2002). Es ist denkbar, dass die erhöhten Bilirubinplasmaspiegel bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten eine verringerte renale Expression von MRP1 und MRP3 bewirken (Grisk et al., 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen jedoch auf transkriptionaler Ebene weder auf eine erhöhte, noch auf eine erniedrigte renale MRP1- oder MRP3-Expression bei MRP2^{-/-}-Ratten hin. Daher kann vermutet werden, dass sich die Effekte von Induktion zur zellulären Detoxifikation und von Suppression durch erhöhte Bilirubinplasmaspiegel in der Niere aufheben, so dass keine Unterschiede der renalen MRP1- und MRP3-Transkriptgehalte zwischen Wildtyp- und MRP2^{-/-}-Ratten gefunden werden konnten. Ein entsprechender Erklärungsansatz ist auch für den unveränderten hepatischen MRP1-Transkriptgehalt bei MRP2^{-/-}-Ratten im Vergleich zu Wildtyp-Ratten denkbar.

Der **hepatische MRP3-Transkriptgehalt** andererseits war bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten höher als bei nativen Wildtyp-Ratten. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass bei Wistar-Ratten der hepatische MRP3-Transkriptgehalt und hepatische MRP3-Proteingehalt miteinander korrelieren (Tanaka et al., 2002). Eine Korrelation zwischen MRP3-Transkript- und Proteingehalt auch bei MRP2^{-/-}-Ratten vorausgesetzt, ist der erhöhte hepatische MRP3-Transkriptgehalt ein Indiz dafür, dass MRP3 zur zellulären Detoxifikation der Hepatozyten und den erhöhten Bilirubin-Plasmaspiegeln bei MRP2^{-/-}-Ratten beiträgt (Grisk et al., 2009). Diese Annahme ist mit den Ergebnissen früherer Studien an anderen Modellen konsistent. In Studien am MRP2-defizienten Rattenstamm *Eisai hyperbilirubinemic rats* und bei Leberuntersuchungen von Patienten mit Dubin-Johnson-Syndrom konnte gezeigt werden, dass die Bilirubinplasmaspiegel und die Expression von MRP3 in der Leber erhöht waren (Keppler und König, 2000; Borst et al., 2007). Eine erhöhte Expression von MRP3 in der Leber wird als „kompensatorischer Ausscheidungsweg“ bei MRP2-Defizienz gewertet, um die Detoxifikation der Zellen von Substraten zu gewährleisten, welche nicht biliär ausgeschieden werden können (Keppler und König, 2000). Aufgrund der basolateralen Lokalisation von MRP3 in der Leber werden diese Substrate jedoch nicht in intrahepatische Gallengänge, sondern aus der Zelle hinaus zurück ins Interstitium und somit in die Blutbahn transportiert (Keppler und König, 2000; Villanueva et al., 2008). Über die Blutbahn können diese Substrate in die Nieren gelangen und aufgrund der vorherigen Konjugation in den Hepatozyten renal ausgeschieden werden (Fleck und Bräunlich, 1984; Keppler und König, 2000). Bei der renalen Ausscheidung erfolgt der Transport nach Aufnahme der Substrate in die Tubuluszellen über die apikale Membran hinaus ins Lumen des Tubulussystems und letztlich über den Urin aus dem Organismus.

MRP3 kann zur zellulären Detoxifikation von M6G und Bilirubin beitragen (Ogawa et al., 2000; Tanaka et al., 2002). Nach Infusion von M6G waren dessen Plasmaspiegel bei $MRP2^{-/-}$ -Ratten höher als bei Wildtyp-Ratten. Die hepato-biliäre Ausscheidung von M6G war bei nativen $MRP2^{-/-}$ -Ratten vermindert (Grisk et al., 2009). Die Bilirubinplasmaspiegel bei $MRP2^{-/-}$ -Ratten waren 50-fach höher als bei Wildtyp-Ratten (Grisk et al., 2009). Der erhöhte hepatische **MRP3**-Transkriptgehalt bei nativen $MRP2^{-/-}$ -Ratten kann ein Hinweis dafür sein, dass **MRP3** zu den erhöhten Bilirubinplasmapipegeln bei nativen $MRP2^{-/-}$ -Ratten beiträgt. Es ist denkbar, dass die normalerweise quantitativ unbedeutende renale Elimination von Bilirubin bei erhöhten Bilirubinplasmaspiegeln an Bedeutung gewinnt (Keppler und König, 2000; Grisk et al., 2009). Die erhöhten Bilirubinplasmaspiegel bei $MRP2^{-/-}$ -Ratten sprechen dafür, dass die basolaterale Bilirubinsekretion in der Leber schneller ist als die renale Exkretion von Bilirubin – ein Vorgang, der auch bei Patienten mit Dubin-Johnson-Syndrom im Zusammenhang mit der **MRP2**-Defizienz als Mechanismus hinter der Hyperbilirubinämie angenommen wird (Keppler und König, 2000).

Die unveränderten **renalen und hepatischen MRP4-Transkriptgehalte** bei nativen $MRP2^{-/-}$ -Ratten im Vergleich zu den entsprechenden Transkriptgehalten bei Wildtyp-Ratten sind konsistent mit früheren Forschungsergebnissen bei anderen Tiermodellen (van Aubel et al., 2002). Es gibt allerdings auch Arbeiten, die Unterschiede der renalen **MRP4**-Transkriptgehalte zwischen **MRP2**-defizienten $TR^{-/-}$ -Ratten (*transport-deficient*) und Wistar-Hannover-Ratten beschreiben (Chen et al., 2005). **MRP4**-Transkriptgehalte scheinen also in Abhängigkeit von den zugrunde liegenden Tiermodellen in unterschiedlicher Weise durch die **MRP2**-Defizienz beeinflusst zu werden.

In der Niere ist **MRP4** ebenso wie **MRP2** in der apikalen Membran des Tubulusepithels lokalisiert, so dass beide Transporter zur Elimination ihrer jeweiligen Substrate aus dem Organismus hinaus beitragen (Chen et al., 2005). Grisk et al. konnten bei nativen $MRP2^{-/-}$ -Ratten einen höheren renalen **MRP4**-Proteingehalt als bei nativen Wildtyp-Ratten nachweisen (Grisk et al., 2009). Ebenso war die renale Exkretion von PAH, welches ein gemeinsames Substrat von **MRP2** und **MRP4** ist (Smeets et al., 2004), bei nativen $MRP2^{-/-}$ -Ratten höher als bei Wildtyp-Ratten (Grisk et al., 2009). Renales **MRP4** scheint also einer post-transkriptionalen Regulation zu unterliegen und kann an der Kompensation für die

MRP2-Defizienz beteiligt sein, was sich auf transkriptionaler Ebene jedoch nicht widerspiegelt.

Der **renale Pgp-Transkriptgehalt** war bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten signifikant niedriger als bei nativen Wildtyp-Ratten. In der aktuellen Literatur finden sich nur wenige Expressionsstudien zu renalem Pgp bei Ratten. Nishio et al. konnten zeigen, dass bei Wistar-Ratten die renalen Pgp-Transkriptgehalte und die renalen Pgp-Proteingehalte miteinander korrelierten (Nishio et al., 2005). Auch konnte eine Korrelation zwischen Pgp-Transkriptgehalt, Pgp-Proteingehalt und Pgp-Funktion in MRP2-defizienten Nierenzellkulturen nachgewiesen werden (van de Water et al., 2007). Ob der verminderte renale Pgp-Transkriptgehalt auch bei MRP2^{-/-}-Ratten mit einem verminderten renalen Pgp-Proteingehalt und einer verminderten Pgp-Funktion korreliert, muss weiter untersucht werden. Der Grund für den verminderten renalen Pgp-Transkriptgehalt bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten im Vergleich zu nativen Wildtyp-Ratten bleibt unklar.

Der **hepatische Pgp-Transkriptgehalt** war bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten signifikant höher als bei nativen Wildtyp-Ratten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit hatten MRP2-defiziente Wistar-Ratten und MRP2-exprimierende Wistar-Ratten ähnliche hepatischen Pgp-Transkriptgehalte (Hoffmann und Löscher, 2007). Der Einfluss der MRP2-Defizienz auf den hepatischen Pgp-Transkriptgehalt scheint also je nach Tiermodell unterschiedlich zu sein.

Pgp ist wie MRP2 in intrahepatischen Gallengängen apikal lokalisiert (Tanigawara, 2000). Der Transport über Pgp aus der Zelle hinaus erfolgt also in die intrahepatischen Gallengänge (Marchetti et al., 2007). Betrachtet man nur die apikale Lokalisation in den intrahepatischen Gallengängen, wäre Pgp für die Kompensation für die MRP2-Defizienz prädestiniert. Dies ist jedoch fraglich, da MRP2 und Pgp in der Leber unterschiedliche Aufgaben erfüllen (Hoffmann und Löscher, 2007). Beide Proteine transportieren ihre Substrate zwar in glukuronidierter und sulfatierter Form sowie mit Glutathion konjugiert (Laouari et al., 2001; Marchetti et al., 2007; Nies und Keppler, 2007), Pgp jedoch vornehmlich lipophile bzw. kationische Substrate und MRP2 überwiegend organische Anionen (Leier et al., 2000; Chiba et al., 2007).

Bezüglich der Korrelation zwischen **Pgp-Transkriptgehalt und Pgp-Proteingehalt** in der Leber gibt es in der Literatur widersprüchliche Angaben. Einerseits wurden bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten mit chronischer Niereninsuffizienz in der Leber sowohl deutlich erhöhte Pgp-Transkriptgehalte als auch erhöhte Pgp-Proteingehalte im Vergleich zu den Kontrollen ohne Niereninsuffizienz beobachtet (Naud et al., 2008). Andererseits führen erhöhte hepatische Pgp-Transkriptgehalte nicht in jedem Modell zu vermehrtem, funktionellem Pgp (Nishio et al., 2005; Kageyama et al., 2006). Insgesamt gibt es Hinweise darauf, dass die hepatische Pgp-Expression durch veränderte Anforderungen an den Lebermetabolismus meist induziert wird (Nishimura et al., 2006; Han et al., 2008; Dopp et al., 2009). Inwieweit der erhöhte hepatische Pgp-Transkriptgehalt bei MRP2^{-/-}-Ratten mit einer erhöhten Funktionsfähigkeit des Pgp-Proteins bei MRP2^{-/-}-Ratten korreliert, bedarf weiterer Untersuchungen.

4.3. Renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten nach Nierenkreuztransplantation

Zur Etablierung des vorliegenden kongenen **Kreuztransplantationsmodells der Nieren** dienten Wildtyp-Ratten und MRP2^{-/-}-Ratten sowohl als Nierenspender als auch als Nierenempfänger. Zunächst wurde die nierenspezifische MRP2-Defizienz dieses Modells geprüft. Im nächsten Schritt wurden die Einflüsse der nierenspezifischen MRP2-Defizienz auf die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP3, MRP4 und Pgp untersucht. In einem weiteren Schritt sollten die Veränderungen in den genannten Transkriptgehalten in Abhängigkeit davon untersucht werden, ob Wildtyp-Nieren in Wildtyp-Ratten oder in MRP2^{-/-}-Ratten transplantiert werden.

Ein Zeichen dafür, dass die Nierenkreuztransplantationen erfolgreich waren, sind die normalen **glomerulären Filtrationsraten** (Grisk et al., 2009). Außerdem waren die glomerulären Filtrationsraten bei MRP2^{-/-}-Empfängern und Wildtyp-Empfängern unabhängig vom genetischen Hintergrund der transplantierten Nieren (Grisk et al., 2009). Die Nierenfunktion wurde also durch die Transplantationen nicht beeinflusst und war vom genetischen Hintergrund der transplantierten Niere unabhängig.

Bei dem Vergleich von **transplantierten MRP2^{-/-}-Nieren** mit transplantierten Wildtyp-Nieren konnte auf transkriptionaler Ebene die MRP2-Defizienz der MRP2^{-/-}-Nieren unabhängig vom genetischen Hintergrund der Empfänger bestätigt werden. Die hepatischen MRP2-Transkriptgehalte waren sowohl bei Wildtyp-Empfängern als auch bei MRP2^{-/-}-Empfängern unabhängig vom genetischen Hintergrund der transplantierten Niere. Der hepatische MRP2-Transkriptgehalt war dagegen bei MRP2^{-/-}-Empfängern deutlich niedriger als bei Wildtyp-Empfängern, unabhängig vom genetischen Hintergrund der transplantierten Niere. Dies ist mit den Ergebnissen bei nativen Tieren und anderen Untersuchungen an diesem Modell konsistent (Grisk et al., 2009).

Die Fähigkeit der Niere, **glukuronidiertes Bilirubin** oder andere organische Anionen zu eliminieren, scheint bei erhöhten Plasmaspiegeln der jeweiligen Substrate an Bedeutung zu gewinnen (Grisk et al., 2009). Bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten waren die Plasmaspiegel von Gesamtbilirubin 50-fach und von glukuronidiertem Bilirubin 100-fach höher als bei nativen Wildtyp-Ratten. Die Plasmaspiegel von glukuronidiertem Bilirubin waren bei MRP2^{-/-}-Empfängern unabhängig vom genetischen Hintergrund der transplantierten Nieren höher als bei Wildtyp-Empfängern (Grisk et al., 2009). Die renale Bilirubin-Clearance war bei MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren signifikant niedriger als bei MRP2^{-/-}-Empfängern von Wildtyp-Nieren und bei Wildtyp-Empfängern unabhängig vom genetischen Hintergrund der transplantierten Niere (Grisk et al., 2009). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MRP2 nur bei hohen Bilirubinplasmaspiegeln, wie sie bei MRP2^{-/-}-Ratten vorkommen, an der renalen Bilirubinexkretion in nennenswertem Umfang beteiligt ist.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die renalen und hepatischen Transkriptgehalte der Transporter MRP1, MRP3, MRP4 und Pgp bei Wildtyp-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren im Vergleich zu denen bei Wildtyp-Empfängern von Wildtyp-Nieren unterscheiden. Analog wurden die genannten Transkriptgehalte bei MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2-exprimierenden (Wildtyp-)Nieren mit denen bei MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren verglichen.

Bei den **renalen und hepatischen Transkriptgehalten** von MRP1, MRP3, MRP4 und Pgp wurden bei Wildtyp-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren im Vergleich zu denen bei Wildtyp-Empfängern von Wildtyp-Nieren keine signifikanten Unterschiede gefunden. Gleiches gilt für die untersuchten Transkriptgehalte bei MRP2^{-/-}-Empfängern von Wildtyp-Nieren im Vergleich zu MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren. Auf transkriptionaler Ebene konnten

DISKUSSION

Renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten nach Nierenkreuztransplantation

somit keine Hinweise darauf gefunden werden, dass die Expressionen der untersuchten Transporter bei Wildtyp- und bei MRP2^{-/-}-Empfängern durch die MRP2-Defizienz des Transplantats beeinflusst werden.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien an demselben Transplantationsmodell. Zum Beispiel konnte mittels Western-Blot hinsichtlich der **renalen MRP4-Expression** kein Unterschied zwischen Wildtyp-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren und Wildtyp-Empfängern von Wildtyp-Nieren nachgewiesen werden (Grisk et al., 2009). Andererseits war bei nierenspezifischer MRP2-Defizienz im Vergleich zu Wildtyp-Empfängern von Wildtyp-Nieren die renale Transkription von 61 Genen induziert und von 26 gehemmt (Grisk et al., 2009). Die Funktion der meisten dieser Proteine konnte bisher jedoch nicht geklärt werden (Grisk et al., 2009). Dies lässt vermuten, dass andere als die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Transportproteine zur Kompensation für die nierenspezifische MRP2-Defizienz genutzt werden.

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob es zu Veränderungen in den renalen und hepatischen Transkriptgehalten von MRP1, MRP3, MRP4 und Pgp in Abhängigkeit davon kommt, ob Wildtyp-Nieren in Wildtyp-Ratten oder in MRP2^{-/-}-Ratten transplantiert wurden. Analoge Betrachtungen erfolgten für MRP2^{-/-}-Nieren.

Unabhängig vom genetischen Hintergrund der transplantierten Niere war der **renale MRP1-Transkriptgehalt** bei MRP2^{-/-}-Empfängern höher als bei Wildtyp-Empfängern. Möglicherweise ist der erhöhte renale MRP1-Transkriptgehalt eine Reaktion auf die Akkumulation von Bilirubinglukuronid im Plasma und unter Umständen auch in den renalen Tubuluszellen von MRP2^{-/-}-Empfängern (Grisk et al., 2009). Dadurch könnte MRP1 zur Detoxifikation der Zellen von Bilirubin, einem gemeinsamen Substrat von MRP1 und MRP2, beitragen (Jedlitschky et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit war der **hepatische MRP1-Transkriptgehalt** bei MRP2^{-/-}-Empfängern geringer als bei Wildtyp-Empfängern, unabhängig vom genetischen Hintergrund der transplantierten Niere. Bei nierentransplantierten Ratten unterschieden sich also die Ergebnisse hinsichtlich der untersuchten MRP1-Transkriptgehalte von den Befunden bei nativen Wildtyp- und MRP2^{-/-}-Ratten. Bei nativen Ratten konnten keine Unterschiede in den renalen und hepatischen MRP1-Transkriptgehalten gefunden werden, wohingegen bei

DISKUSSION

Renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten nach Nierenkreuztransplantation

den nierentransplantierten MRP2^{-/-}-Ratten der renale MRP1-Transkriptgehalt höher und der hepatische MRP1-Transkriptgehalt niedriger war als bei den nierentransplantierten Wildtyp-Ratten. Ein erhöhter Bilirubinplasmaspiegel bei MRP2^{-/-}-Ratten allein kann also nicht als Erklärung für die Veränderungen der MRP1-Transkriptgehalte dienen, da bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten mit ebenfalls erhöhten Bilirubinplasmaspiegeln keine Unterschiede in den renalen und hepatischen MRP1-Transkriptgehalten gefunden werden konnten (Grisk et al., 2009). Die Ergebnisse bei nierentransplantierten Wildtyp-Ratten mit normwertigen Bilirubinplasmaspiegeln (Grisk et al., 2009) zeigen außerdem, dass auch die Nierentransplantation alleine keinen Einfluss auf die untersuchten MRP1-Transkriptgehalte hatte. Es scheint vielmehr so zu sein, dass erst das Zusammentreffen von erhöhtem Bilirubinplasmaspiegel und der Nierentransplantation bei den untersuchten Ratten zu Veränderungen der renalen und hepatischen MRP1-Transkriptgehalte führt.

Für diese Befunde wäre folgende Erklärung denkbar: bei **erhöhten Bilirubinplasmaspiegeln der MRP2^{-/-}-Ratten** kann der renale Ausscheidungsweg von konjugiertem Bilirubin funktionell relevant werden (Grisk et al., 2009). Die nativen MRP2^{-/-}-Ratten verfügten jeweils über zwei autochthone Nieren, die sich die renale Elimination von Bilirubin gewissermaßen teilen konnten, so dass der Einfluss erhöhter Bilirubinplasmaspiegel und möglicherweise intrazellulärer Akkumulation von Bilirubin auf den renalen MRP1-Transkriptgehalt bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten nicht sichtbar wurde. Die transplantierten MRP2^{-/-}-Ratten besaßen hingegen nur eine transplantierte Niere. Der erhöhte MRP1-Transkriptgehalt der transplantierten Nieren bei MRP2^{-/-}-Ratten kann ein Hinweis darauf sein, dass MRP1 vermehrt an der zellulären Detoxifikation von Bilirubin nach der Nierentransplantation beteiligt ist. Bilirubin verbleibt jedoch aufgrund der basolateralen Lokalisation von MRP1 im Blutplasma. Erhöhte Bilirubinplasmaspiegel könnten dann zum verminderten hepatischen MRP1-Transkriptgehalt bei nierentransplantierten MRP2^{-/-}-Ratten führen.

Die **renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP3 und MRP4** waren nach Transplantation einer Wildtyp-Niere unabhängig vom genetischen Hintergrund der jeweiligen Empfänger. Dieses Ergebnis ist mit anderen Studien an demselben Modell konsistent. Der MRP4-Proteingehalt und die fraktionelle PAH-Sekretion waren bei transplantierten MRP2^{-/-}-Nieren denen bei transplantierten Wildtyp-Nieren ähnlich und vom genetischen Hintergrund der jeweiligen Empfänger unabhängig (Grisk et al., 2009). Im Fall von

transplantierten Nieren korrelierten also MRP4-Transkriptgehalt, MRP4-Proteingehalt und MRP4-Funktionalität miteinander.

Der **Pgp-Transkriptgehalt transplantiert Wildtyp-Nieren** hing vom genetischen Hintergrund der Empfänger ab und war bei Wildtyp-Empfängern höher als bei MRP2^{-/-}-Empfängern. Möglicherweise bilden native MRP2^{-/-}-Ratten bereits vor der Implantation einer Wildtyp-Niere andere Eliminationswege aus, so dass im Wildtyp-Transplantat die Pgp-Expression im renalen Kortex herunterreguliert werden kann. Beispielsweise wurde in verschiedenen Arbeiten die besondere Bedeutung der exkretorischen Funktion des Gastrointestinaltraktes hervorgehoben (Chan et al., 2004; Hoffmann und Löscher, 2007; van de Water et al., 2007; Naud et al., 2008). Ob und inwieweit der gastrointestinale Eliminationsweg bei MRP2^{-/-}-Empfängern von Wildtyp-Nieren eine Rolle spielt, bedarf weiterer Untersuchungen. Denkbar wären ebenso Veränderungen der Expressionen anderer als die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Transporter und Proteine.

Der **hepatische Pgp-Transkriptgehalt** war bei MRP2^{-/-}-Empfängern unabhängig vom genetischen Hintergrund der transplantierten Nieren niedriger als bei Wildtyp-Empfängern. Beim hepatischen Pgp-Transkriptgehalt nativer Ratten war dieses Verhältnis umgekehrt. Bei Wildtyp-Ratten korreliert das Vorhandensein nur einer transplantierten Niere also mit einem vermehrten Pgp-Transkriptgehalt in der Leber unabhängig vom genetischen Hintergrund der transplantierten Niere.

Bei **transplantierten MRP2^{-/-}-Nieren** war der **MRP1-Transkriptgehalt** bei MRP2^{-/-}-Empfängern höher als bei Wildtyp-Empfängern. Der MRP1-Transkriptgehalt transplantiert MRP2^{-/-}-Nieren war also vom genetischen Hintergrund der Empfänger und nicht vom genetischen Hintergrund des Transplantats abhängig.

Bei transplantierten MRP2^{-/-}-Nieren war der **MRP3-Transkriptgehalt** unabhängig vom genetischen Hintergrund der Empfänger. Es konnten somit auf transkriptionaler Ebene keine Hinweise darauf gefunden werden, dass die MRP3-Expression bei transplantierten MRP2^{-/-}-Nieren und bei transplantierten Wildtyp-Nieren durch den genetischen Hintergrund der jeweiligen Empfänger beeinflusst wird.

Nach Transplantation einer MRP2^{-/-}-Niere war der **hepatische MRP3-Transkriptgehalt** bei MRP2^{-/-}-Empfängern höher als bei Wildtyp-Empfängern. Auch bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten war der hepatische MRP3-Transkriptgehalt höher als bei nativen Wildtyp-Ratten. Die Transplantation einer MRP2^{-/-}-Niere hatte also keinen Einfluss auf den hepatischen MRP3-Transkriptgehalt. Vielmehr geht im vorliegenden Modell die MRP2-Defizienz an sich mit einem erhöhten MRP3-Transkriptgehalt und einer Hyperbilirubinämie einher (Grisk et al., 2009). Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen von Studien an anderen Rattenmodellen konsistent. Bei MRP2-defizienten *Eisai*-Ratten mit Hyperbilirubinämie war die MRP3-Expression in der Leber ebenfalls erhöht (Borst et al., 2007).

Bei transplantierten MRP2^{-/-}-Nieren war der **MRP4-Transkriptgehalt** unabhängig vom genetischen Hintergrund der Empfänger. Auch konnten keine Unterschiede in den hepatischen MRP4-Transkriptgehalten bei MRP2^{-/-}-Empfängern und Wildtyp-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren gezeigt werden. Es konnten somit keine Hinweise darauf gefunden werden, dass die renalen und hepatischen MRP4-Transkriptgehalte durch die Transplantationen von MRP2^{-/-}-Nieren beeinflusst werden.

Der **hepatische Pgp-Transkriptgehalt** war nach Transplantation einer MRP2^{-/-}-Niere bei Wildtyp-Empfängern höher als bei MRP2^{-/-}-Empfängern. Interessanterweise war das Verhältnis der hepatischen Pgp-Transkriptgehalte bei nativen Ratten umgekehrt. Allerdings sind die Ergebnisse bezüglich der Korrelation zwischen hepatischem Pgp-Transkript- und -Proteingehalt bzw. der Pgp-Funktion in der Literatur widersprüchlich (Nishio et al., 2005; Kageyama et al., 2006; Naud et al., 2008). Es bedarf somit weiterer Untersuchungen, ob sich die gefundenen, umgekehrten Verhältnisse der hepatischen Pgp-Transkriptgehalte auch auf den Proteingehalt oder gar die Funktion auswirken.

4.4. Einfluss der Transplantation auf renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten

Um Hinweise darauf zu bekommen, wie sich die Transplantation und das Vorhandensein einer solitären transplantierten Niere auf die Expressionen von MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp in Niere und Leber auswirkt, wurden native Wildtyp-Ratten mit Wildtyp-

DISKUSSION

Einfluss der Transplantation auf renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten

Empfängern von Wildtyp-Nieren (syngene Nierentransplantation) und native MRP2^{-/-}-Ratten mit MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren (syngene Nierentransplantation) verglichen.

Bei Wildtyp-Empfängern waren neun Wochen nach syngener Nierentransplantation sowohl die **renalen als auch die hepatischen MRP1-, MRP2-, MRP3- und MRP4-Transkriptgehalte** im Vergleich zu den nativen Wildtyp-Ratten unverändert. Die Operation hatte bei Wildtyp-Empfängern somit keinen Einfluss auf die transkriptionale Regulation dieser Transporter in Niere und Leber.

Bei syngen transplantierten Wildtyp-Nieren war der **Pgp-Transkriptgehalt** neun Wochen nach Transplantation ähnlich wie bei nicht transplantierten Wildtyp-Nieren. Der hepatische Pgp-Transkriptgehalt hingegen war bei syngen nierentransplantierten Wildtyp-Ratten neun Wochen nach der Transplantation signifikant höher als bei nativen Wildtyp-Ratten. Die Nierentransplantation bei Wildtyp-Ratten hatte also Auswirkungen auf den Transkriptgehalt von Pgp in der Leber.

Die **Transkriptgehalte von MRP1 und MRP4** zeigten bei MRP2^{-/-}-Ratten nach syngener Nierentransplantation parallele Regulationsmuster in Niere und Leber. Die Transkriptgehalte beider Transporter waren bei MRP2^{-/-}-Empfängern neun Wochen nach syngener Transplantation in der Niere höher und in der Leber niedriger als bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten. Die veränderten Expressionen von MRP1 und MRP4 nach syngener Transplantation bei MRP2^{-/-}-Ratten können auf die Transplantation und dem damit verbundenen Fehlen einer Niere zurückzuführen sein.

Aufgrund der Ergebnisse von Studien an anderen Rattenmodellen sind als Ursachen für die veränderten Transkriptionen von **MRP1 und MRP4** bei MRP2^{-/-}-Empfängern von MRP2^{-/-}-Nieren neben dem Fehlen einer Niere auch weitere Faktoren denkbar. Eine mögliche Ursache ist die passagere Ischämie des Transplantats während der Operation. Dies kann zu erhöhtem oxidativem Stress führen (Villanueva et al., 2007). Oxidativer Stress wiederum kann den Proteingehalt verschiedener Proteine in MRP2^{-/-}-Nieren beeinflussen (Grisk et al., 2009). Desweiteren führte die mit der Nierentransplantation verbundene Denervierung des Transplantats (Grisk et al., 2002) bei nierentransplantierten SH-Ratten (*spontaneously hypertensive*) zu einer verminderten Renin-Expression im Vergleich zu nativen SH-Ratten (Schlüter et al., 2006). Ob und inwieweit die genannten Faktoren bei syngen

DISKUSSION

Einfluss der Transplantation auf renale und hepatische Transkriptgehalte bei Ratten

nierentransplantierten MRP2^{-/-}-Ratten tatsächlich für die beobachteten Veränderungen der renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1 und MRP4 verantwortlich sind, muss weiter untersucht werden.

Insgesamt scheint die **transkriptionale Regulation** von MRP1 und MRP4 bei MRP2^{-/-}-Ratten sensibler auf die syngene Nierentransplantation zu reagieren als bei Wildtyp-Ratten. Ein Grund hierfür kann zumindest hinsichtlich der renalen Transkriptgehalte in dem erhöhten oxidativen Stress in den MRP2^{-/-}-Transplantaten liegen (Grisk et al., 2009).

Bei MRP2^{-/-}-Ratten waren neun Wochen nach syngener Nierentransplantation die renalen und die hepatischen **MRP2- und MRP3-Transkriptgehalte** bei den Empfängern im Vergleich zu den nativen Tieren unverändert. Syngene Nierentransplantationen hatten somit weder bei MRP2^{-/-}-Ratten noch bei Wildtyp-Ratten einen Einfluss auf die transkriptionale Regulation dieser beiden Transporter in Niere und Leber.

Der **Pgp-Transkriptgehalt** syngen transplantiertes MRP2^{-/-}-Nieren war neun Wochen nach Transplantation höher als der renale Pgp-Transkriptgehalt bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten. Der renale Pgp-Transkriptgehalt wurde bei MRP2^{-/-}-Ratten durch die Nierentransplantation offenbar stärker beeinflusst als bei Wildtyp-Ratten. Dies kann bei der renalen Exkretion von M6G, einem gemeinsamen Substrat von Pgp und MRP2, von Bedeutung sein (Drewe et al., 2000; Grisk et al., 2009). Hinsichtlich der renalen M6G-Clearance konnte unabhängig vom genetischen Hintergrund der Empfänger bei transplantierten MRP2^{-/-}-Nieren kein Unterschied zu transplantierten Wildtyp-Nieren gefunden werden (Grisk et al., 2009). Dieser Befund wurde von Grisk et al. darauf zurückgeführt, dass M6G überwiegend glomerulär filtriert und nicht aktiv sezerniert wird (Grisk et al., 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern aber auch die Erklärungsmöglichkeit, dass über eine Induktion der Pgp-Expression die renale M6G-Clearance aufrecht erhalten werden kann. Bei syngen transplantierten Wildtyp-Nieren können sich MRP2 und Pgp die M6G-Ausscheidung gewissermaßen teilen, so dass Veränderungen der renalen Transkriptgehalte dieser beiden Transporter hier nicht gefunden werden konnten.

Bei MRP2^{-/-}-Ratten konnten keine signifikanten Unterschiede der **hepatischen Pgp-Transkriptgehalte** zwischen nativen und syngen nierentransplantierten Ratten gefunden werden. Auf transkriptionaler Ebene konnte somit kein Hinweis dafür gefunden werden, dass

die hepatische Pgp-Expression durch die syngene Nierentransplantation bei MRP2^{-/-}-Ratten beeinflusst wird. Ein Grund für die unterschiedlichen Befunde bei syngenen nierentransplantierten Wildtyp- und MRP2^{-/-}-Ratten hinsichtlich der hepatischen Pgp-Transkriptgehalte könnte darin liegen, dass die Pgp-Transkription bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten so stark gesteigert ist, dass eine weitere Hochregulation nach syngener Nierentransplantation wie bei Wildtyp-Ratten nicht möglich ist.

4.5. *Limitationen der Studie*

Eine Limitation der vorliegenden Studie stellt die **geringe Substratspezifität** der untersuchten Transportproteine dar. Für Transportproteine der ABC-Familie konnte eine immense Vielfalt von transportierten Substraten und von Substratüberschneidungen gefunden werden (van Aubele et al., 2000). MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp transportieren vor allem Glukuronide, Sulfate, organische Anionen und mit Glutathion konjugierte Substanzen (Leslie et al., 2005; Nishio et al., 2005; Nishimura et al., 2006; Borst et al., 2007). Diese Substrate unterscheiden sich in ihrer molekularen Struktur (Marchetti et al., 2007). Keine zwei Proteine der ABC-Familie weisen exakt die gleichen Substratspezifitäten und Organdistributionen auf (Borst et al., 2007). Daher sind durch funktionelle Studien alleine keine Aussagen darüber zu machen, welche Transporter an möglichen Kompensationsmechanismen beteiligt sind. Gen-Expressionsstudien (ebenso wie Protein-Expressionsstudien) wie in der vorliegenden Arbeit können hingegen Hinweise auf die an Kompensationsmechanismen beteiligten Gene und Proteine geben.

Kenntnisse über **Transkriptgehalte** allein, welche in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der qRT-PCR gewonnen wurden, lassen keine Rückschlüsse auf funktionelle Aspekte der jeweiligen Proteine zu. Viele Proteine unterliegen einer post-transkriptionalen Regulation (Keppler und König, 2000), so dass veränderte Transkriptgehalte nicht zwangsläufig mit gleichgerichteten Veränderungen der entsprechenden Proteinnmenge einhergehen. Niedrige Transkriptgehalte können ein Hinweis auf niedrige Proteingehalte sein (Hoffmeyer et al., 2000). Niedrige Proteingehalte können wiederum mit einer verminderten Funktionalität der Proteine assoziiert sein, da die Gesamttransportkapazität von der jeweiligen Menge des vorhandenen Proteins abhängig ist (Hoffmeyer et al., 2000). Für eine Beurteilung, ob Veränderungen in Transkriptgehalten mit Veränderungen der Proteinmengen oder der

Funktionalität der Proteine assoziiert sind, sind daher zusätzliche Untersuchungen notwendig, wie z. B. Bestimmung des entsprechenden Proteingehalts, Ausscheidungsfunktion von Niere und Leber oder Plasmaspiegel der jeweiligen Substrate (Grisk et al., 2009).

Vor diesem Hintergrund kann von dem verminderten **MRP2-Transkriptgehalt** bei MRP2^{-/-}-Ratten allein nicht auf eine MRP2-Defizienz geschlossen werden. Jedoch konnten Grisk et al. das Fehlen von MRP2-Protein mittels Western-Blot nachweisen (Grisk et al., 2009). Außerdem konnten bei MRP2^{-/-}-Ratten im Vergleich zu Wildtyp-Ratten erhöhte Bilirubin-Plasmaspiegel gezeigt werden (Grisk et al., 2009). Es kann also davon ausgegangen werden, dass MRP2^{-/-}-Ratten über kein funktionelles MRP2 verfügten und dass folglich bei MRP2 im vorliegenden Modell Transkriptgehalt, Proteingehalt und Funktion miteinander korrelieren.

Die **PCR** ist eine eher störanfällige Methode im Hinblick auf Verunreinigungen des Untersuchungsmaterials und der verwendeten Chemikalien. Der Grund hierfür liegt darin, dass die PCR eine sehr sensible Methode ist, um Gene und Genfragmente in kleinsten Mengen nachzuweisen (Nishimura et al., 2006). Kleinste Verunreinigungen der Proben oder der verwendeten Chemikalien für die PCR können zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Eine Möglichkeit, Verunreinigungen aufzuspüren, besteht darin, Negativ-Kontrollen durchzuführen. Die Durchführung einer PCR ohne Verunreinigungen vorausgesetzt findet bei diesen Negativ-Kontrollen keine Amplifikation statt. Um Verunreinigungen der verwendeten Chemikalien durch DNA-Fragmente auszuschließen, wurden in der vorliegenden Arbeit Negativ-Kontrollen mit *aqua bidest.* durchgeführt. Um Verunreinigungen der Proben durch Enzyme auszuschließen, wurden Negativ-Kontrollen ohne RT durchgeführt. Beide hätten im Falle von Verunreinigungen zu (falsch-) positiven Ergebnissen geführt, was in der vorliegenden Arbeit nicht der Fall war.

Ein Vorteil der PCR ist die **Vielzahl verschiedener Transkriptgehalte**, die in relativ kurzer Zeit untersucht werden kann (Bustin, 2000). Um die Verhältnisse verschiedener Transkriptgehalte miteinander vergleichen zu können, wird als Bezugsgröße ein sogenanntes Haushaltsgen ausgewählt. Haushaltsgene besitzen die postulierte Eigenschaft, dass die Expression unter verschiedenen experimentellen Bedingungen konstant bleibt (Bär et al., 2009). Wenn ein geeignetes Haushaltsgen verwendet wird, sind die Ergebnisse gut zu quantifizieren (Hu et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde Porphobilinogen-

Desaminase (PBGD) als Haushaltsgen verwendet, welches sich als ein solches bewährt hat (Janssens et al., 2004).

Es konnte bisher jedoch noch kein **Haushaltsgen** identifiziert werden, welches unter verschiedenen experimentellen Bedingungen absolut konstant exprimiert wird (Bär et al., 2009). Eine Möglichkeit, den Einfluss dieser Schwankungen auf das Ergebnis zu minimieren, ist die Verwendung mehrerer Haushaltsgene in einer Studie als Bezugsgrößen (Stamova et al., 2009). Ein Problem hierbei besteht jedoch in der Praktikabilität und den höheren Kosten bei der Verwendung mehrerer Haushaltsgene, so dass die meisten Studien lediglich ein Haushaltsgen verwenden (Vandesompele et al., 2002).

Unterschiedliche Effizienzen bei der **RNA-Isolation** und bei der reversen Transkription der RNA in cDNA stellen ebenso Fehlerquellen dar, welche die Ergebnisse bei der PCR beeinflussen (Pfaffl, 2004). Die in der vorliegenden Arbeit angewendete $\Delta\Delta c_T$ -Methode kann zu einer Reduktion dieser Varianz führen, da unterschiedliche Effizienzen der RNA-Extraktionen und der reversen Transkriptionen gleichermaßen beim Haushaltsgen wie beim Zielgen auftreten und sich somit herausrechnen lassen (Pfaffl, 2004).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Transportproteine Multidrug Resistance-associated Protein (MRP) 1, MRP2, MRP3, MRP4 und P-Glykoprotein (Pgp) nehmen Schlüsselrollen bei der zellulären Detoxifikation und bei der Elimination harnpflichtiger sowie hepato-biliär ausgeschiedener Substanzen ein und zeichnen sich durch gemeinsame Substratspezifitäten aus. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Kreuztransplantationsmodell der Nieren zwischen Lewis-1W-Ratten (Wildtyp) und kongenen MRP2-defizienten (MRP2^{-/-}) Ratten etabliert, bei dem Wildtyp- und MRP2^{-/-}-Ratten jeweils als Spender und als Empfänger dienten. Anhand dieses Modells konnten die Hypothesen untersucht werden, dass die renalen und hepatischen Transkriptgehalte von MRP1, MRP2, MRP3, MRP4 und Pgp bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten durch die MRP2-Defizienz (erste Hypothese), durch nierenspezifische MRP2-Defizienz (zweite Hypothese) und durch die Nierentransplantation an sich bei MRP2-defizienten Ratten stärker als bei Wildtyp-Ratten (dritte Hypothese) beeinflusst werden.

Bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten wurden erhöhte hepatische MRP3- und Pgp-Transkriptgehalte sowie ein erniedrigter renaler Pgp-Transkriptgehalt gefunden. Nierenspezifische MRP2-Defizienz hatte keinen Einfluss auf die untersuchten Transkriptgehalte. Andererseits waren bei MRP2^{-/-}-Empfängern die MRP1-Transkriptgehalte in der Niere höher und in der Leber niedriger als die bei Wildtyp-Empfängern unabhängig vom genetischen Hintergrund der transplantierten Nieren. Der Pgp-Transkriptgehalt transplantiert Wildtyp-Nieren war bei Wildtyp-Empfängern höher als bei MRP2^{-/-}-Empfängern. Nach Transplantation von MRP2^{-/-}-Nieren war der hepatische MRP3-Transkriptgehalt bei MRP2^{-/-}-Empfängern höher als bei Wildtyp-Empfängern. Bezüglich des hepatischen Pgp-Transkriptgehalts war es umgekehrt. Nach syngener Wildtyp-Nierentransplantation war im Vergleich zu nativen Wildtyp-Ratten lediglich der hepatische Pgp-Transkriptgehalt erhöht. Nach syngener MRP2^{-/-}-Nierentransplantation waren die renalen MRP1- und MRP4-Transkriptgehalte höher und die hepatischen niedriger als die bei nativen MRP2^{-/-}-Ratten. Der Pgp-Transkriptgehalt syngen transplantiert MRP2^{-/-}-Nieren war höher als bei autochthonen Nieren nativer MRP2^{-/-}-Ratten.

ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassend konnte die MRP2-Defizienz der nativen MRP2^{-/-}-Ratten auf transkriptionaler Ebene bestätigt werden. Durch die MRP2-Defizienz wurde die transkriptionale Regulation von MRP3 und Pgp bei nativen Ratten beeinflusst (erste Hypothese). Nach Nierenkreuztransplantationen wurden zwar keine Veränderungen auf transkriptionaler Ebene gefunden, publizierte Daten zum renalen MRP4-Proteingehalt geben jedoch Hinweise auf post-transkriptionale Regulationsmechanismen (Grisk et al., 2009). Außerdem scheint der genetische Hintergrund der Empfänger bei Transplantationen von Wildtyp- und MRP2^{-/-}-Nieren für die untersuchten Transkriptgehalte von MRP1, MRP3 und Pgp von Bedeutung zu sein (zweite Hypothese). Die untersuchten Transkriptgehalte scheinen bei MRP2^{-/-}-Ratten durch die syngene Nierentransplantation in größerem Umfang beeinflusst zu werden als bei Wildtyp-Ratten (dritte Hypothese).

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Adachi M, Sampath J, Lan LB, Sun D, Hargrove P, Flatley R, Tatum A, Edwards MZ, Wezeman M, Matherly L, Drake R and Schuetz J (2002) Expression of MRP4 confers resistance to ganciclovir and compromises bystander cell killing. *The Journal of Biological Chemistry* **277**:38998-39004.
- Altenberg GA (2003) The engine of ABC proteins. *News in Physiological Sciences* **18**:191-195.
- Bär M, Bär D and Lehmann B (2009) Selection and Validation of Candidate Housekeeping Genes for Studies of Human Keratinocytes[mdash]Review and Recommendations. *Journal of Investigative Dermatology* **129**:535-537.
- Bolder U, Jeschke MG, Landmann L, Wolf F, de Sousa C, Schlitt HJ and Przkora R (2006) Heat stress enhances recovery of hepatocyte bile acid and organic anion transporters in endotoxemic rats by multiple mechanisms. *Cell Stress & Chaperones* **11**:89-100.
- Borst P, de Wolf C and van de Wetering K (2007) Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **453**:661-673.
- Borst P, Evers R, Kool M and Wijnholds J (1999) The multidrug resistance protein family. *Biochimica et Biophysica Acta* **1461**:347-357.
- Boussard T (2005) Use cases for Genotyping. *The Pharmacogenomics Knowledge Base*:1-7.
- Büchler M, König J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T and Keppler D (1996) cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *The Journal of Biological Chemistry* **271**:15091-15098.
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**:169-193.

- Chan LMS, Lowes S and Hirst BH (2004) The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **21**:25-51.
- Chen C, Slitt AL, Dieter MZ, Tanaka Y, Scheffer GL and Klaassen CD (2005) Up-regulation of Mrp4 expression in kidney of Mrp2-deficient TR- rats. *Biochemical Pharmacology* **70**:1088-1095.
- Cherrington NJ, Hartley DP, Li N, Johnson DR and Klaassen CD (2002) Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **300**:97-104.
- Chiba M, Itagaki S, Kobayashi M, Hirano T and Iseki K (2007) Down-regulation of intestinal multidrug resistance-associated protein 2 in long-evans cinnamon rats. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **22**:450-455.
- Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**:156-159.
- Choudhuri S, Cherrington NJ, Li N and Klaassen CD (2003) Constitutive expression of various xenobiotic and endobiotic transporter mRNAs in the choroid plexus of rats. *Drug Metabolism and Disposition* **31**:1337-1345.
- Churchill PC, Churchill MC, Bidani AK and Kurtz TW (2001) Kidney-specific chromosome transfer in genetic hypertension: The Dahl hypothesis revisited. *Kidney International* **60**:705-714.
- Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM and Deeley RG (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**:1650-1654.
- Courtois A, Payen L, Guillouzo A and Fardel O (1999) Up-regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) expression in rat hepatocytes by dexamethasone. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters* **459**:381-385.

- Dean M, Hamon Y and Chimini G (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research* **42**:1007-1017.
- Dopp JM, Moran JJ, Abel NJ, Wiegert NA, Cowgill JB, Olson EB and Sims JJ (2009) Influence of intermittent hypoxia on myocardial and hepatic P-glycoprotein expression in a rodent model. *Pharmacotherapy* **29**:365-372.
- Drewe J, Ball HA, Beglinger C, Peng B, Kemmler A, Schächinger H and Haefeli WE (2000) Effect of P-glycoprotein modulation on the clinical pharmacokinetics and adverse effects of morphine. *British Journal of Clinical Pharmacology* **50**:237-246.
- Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Pojer C, Zenz R, Lammert F, Stieger B, Meier PJ, Zatloukal K, Denk H and Trauner M (2001) Effects of ursodeoxycholic and cholic acid feeding on hepatocellular transporter expression in mouse liver. *Gastroenterology* **121**:170-183.
- Fleck C and Bräunlich H (1984) Methods in testing interrelationships between excretion of drugs via urine and bile. *Pharmacology & Therapeutics* **25**:1-22.
- Fromm MF (2002) The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Advanced Drug Delivery Reviews* **54**:1295-1310.
- Gasser M, Waaga-Gasser AM, Kist-van Holthe JE, Yuan X, Lenhard SM, Abdallah KA and Chandraker A (2004) Chronic Rejection: Insights from a Novel Immunosuppressive-Free Model of Kidney Transplantation. *Journal of the American Society of Nephrology* **15**:687-694.
- Gerloff T (2004) Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **369**:69-77.
- Goodman NC and Spiegelman S (1971) Distinguishing reverse transcriptase of an RNA tumor virus from other known DNA polymerases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**:2203-2206.
- Grisk O, Klötting I, Exner J, Spiess S, Schmidt R, Junghans D, Lorenz G and Rettig R (2002) Long-term arterial pressure in spontaneously hypertensive rats is set by the kidney. *Journal of Hypertension* **20**:131-138.

- Grisk O, Steinbach AC, Ciecholewski S, Schlüter T, Klötting I, Schmidt H, Dazert E, Schaeffeler E, Steil L, Gauer S, Jedlitschky G, Schwab M, Geisslinger G, Hauser IA, Volker U, Kroemer HK and Rettig R (2009) Multidrug resistance-related protein 2 genotype of the donor affects kidney graft function. *Pharmacogenetics and Genomics* **19**:276-288.
- Haase W, Schäfer A, Murer H and Kinne R (1978) Studies on the orientation of brush-border membrane vesicles. *The Biochemical Journal* **172**:57-62.
- Han Y, Chin Tan TM and Lim LY (2008) In vitro and in vivo evaluation of the effects of piperine on P-gp function and expression. *Toxicology and Applied Pharmacology* **230**:283-289.
- Higgins CF (1992) ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annual Review of Cell Biology* **8**:67-113.
- Hoffmann K and Löscher W (2007) Upregulation of Brain Expression of P-Glycoprotein in MRP2-deficient TR- Rats Resembles Seizure-induced Up-regulation of This Drug Efflux Transporter in Normal Rats. *Epilepsia* **48**:631-645.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M and Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America* **97**:3473-3478.
- Hu R, Fan C, Li H, Zhang Q and Fu Y-F (2009) Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. *BioMed Central Molecular Biology* **10**:93.
- Igarashi Y, Aoki KF, Mamitsuka H, Kuma K-i and Kanehisa M (2004) The Evolutionary Repertoires of the Eukaryotic-Type ABC Transporters in Terms of the Phylogeny of ATP-binding Domains in Eukaryotes and Prokaryotes. *Molecular Biology and Evolution* **21**:2149-2160.
- Ito K, Suzuki H, Hirohashi T, Kume K, Shimizu T and Sugiyama Y (1997) Molecular cloning of canalicular multispecific organic anion transporter defective in EHBR. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **272**:G16-22.

- Janssens N, Janicot M, Perera T and Bakker A (2004) Housekeeping genes as internal standards in cancer research. *Molecular Diagnosis* **8**:107-113.
- Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Burchell B and Keppler D (1997) ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochemical Journal* **327**:305-310.
- Kageyama M, Fukushima K, Togawa T, Fujimoto K, Taki M, Nishimura A, Ito Y, Sugioka N, Shibata N and Takada K (2006) Relationship between excretion clearance of rhodamine 123 and P-glycoprotein (Pgp) expression induced by representative Pgp inducers. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **29**:779-784.
- Kato Y, Takahara S, Kato S, Kubo Y, Sai Y, Tamai I, Yabuuchi H and Tsuji A (2008) Involvement of multidrug resistance-associated protein 2 (Abcc2) in molecular weight-dependent biliary excretion of beta-lactam antibiotics. *Drug Metabolism and Disposition* **36**:1088-1096.
- Kauffmann HM, Keppler D, Gant TW and Schrenk D (1998) Induction of hepatic mrp2 (cmrp/cmrat) gene expression in nonhuman primates treated with rifampicin or tamoxifen. *Archives of Toxicology* **72**:763-768.
- Keppler D and König J (2000) Hepatic secretion of conjugated drugs and endogenous substances. *Seminars in Liver Disease* **20**:265-272.
- Klötting I, Berg S, Kovacs P, Voigt B, Vogt L and Schmidt S (1997) Diabetes and Hypertension in Rodent Models. *Annals of the New York Academy of Sciences* **827**:64-84.
- König J, Nies AT, Cui Y, Leier I and Keppler D (1999) Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta* **1461**:377-394.
- Lamba JK, Adachi M, Sun D, Tammur J, Schuetz EG, Allikmets R and Schuetz JD (2003) Nonsense mediated decay downregulates conserved alternatively spliced ABCC4 transcripts bearing nonsense codons. *Human Molecular Genetics* **12**:99-109.

- Laouari D, Yang R, Veau C, Blanke I and Friedlander G (2001) Two apical multidrug transporters, P-gp and MRP2, are differently altered in chronic renal failure. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **280**:F636-645.
- Leazer TM and Klaassen CD (2003) The presence of xenobiotic transporters in rat placenta. *Drug Metabolism and Disposition* **31**:153-167.
- Lecureux L, Dieter MZ, Nelson DM, Watson L, Wong H, Gemzik B, Klaassen CD and Lehman-McKeeman LD (2009) Hepatobiliary Disposition of Thyroid Hormone in Mrp2-Deficient (TR(-)) Rats: Reduced Biliary Excretion of Thyroxine Glucuronide Does Not Prevent Xenobiotic-Induced Hypothyroidism. *Toxicological Sciences* **108**:482-491.
- Lee LG, Connell CR and Bloch W (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Research* **21**:3761-3766.
- Leier I, Hummel-Eisenbeiss J, Cui Y and Keppler D (2000) ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2. *Kidney International* **57**:1636-1642.
- Leslie EM, Deeley RG and Cole SP (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology* **204**:216-237.
- Li T, Ito K and Horie T (2003) Transport of fluorescein methotrexate by multidrug resistance-associated protein 3 in IEC-6 cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **285**:G602-610.
- Loe DW, Deeley RG and Cole SP (1998) Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Research* **58**:5130-5136.
- Mannermaa E, Vellonen KS, Ryhanen T, Kokkonen K, Ranta VP, Kaarniranta K and Urtti A (2009) Efflux protein expression in human retinal pigment epithelium cell lines. *Pharmaceutical Research* **26**:1785-1791.

- Marchetti S, Mazzanti R, Beijnen JH and Schellens JH (2007) Concise review: Clinical relevance of drug drug and herb drug interactions mediated by the ABC transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *The Oncologist* **12**:927-941.
- Masereeuw R, Terlouw SA, van Aubel RA, Russel FG and Miller DS (2000) Endothelin B receptor-mediated regulation of ATP-driven drug secretion in renal proximal tubule. *Molecular Pharmacology* **57**:59-67.
- McDonagh AF, Lightner DA, Boiadjev SE, Brower JO and Norona WS (2002) Hepatobiliary excretion of dipyrinone sulfonates in Mrp2-deficient (TR(-)) rats. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **12**:2483-2486.
- Naud J, Michaud J, Leblond FA, Lefrancois S, Bonnardeaux A and Pichette V (2008) Effects of chronic renal failure on liver drug transporters. *Drug Metabolism and Disposition* **36**:124-128.
- Nies AT and Keppler D (2007) The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **453**:643-659.
- Nishimura M, Koeda A, Suzuki E, Kawano Y, Nakayama M, Satoh T, Narimatsu S and Naito S (2006) Regulation of mRNA expression of MDR1, MRP1, MRP2 and MRP3 by prototypical microsomal enzyme inducers in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* **21**:297-307.
- Nishio N, Katsura T, Ashida K, Okuda M and Inui K-i (2005) Modulation of P-glycoprotein expression in hyperthyroid rat tissues. *Drug Metabolism and Disposition* **33**:1584-1587.
- Ogawa K, Suzuki H, Hirohashi T, Ishikawa T, Meier PJ, Hirose K, Akizawa T, Yoshioka M and Sugiyama Y (2000) Characterization of inducible nature of MRP3 in rat liver. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **278**:G438-446.
- Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJR, Bakker CTM, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P and Elferink RPJO (1996) Congenital Jaundice in Rats with a Mutation in a Multidrug Resistance-Associated Protein Gene. *Science* **271**:1126-1128.

- Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, J. SR, Tytgat GN, Borst P, Baas B and Elferink RP (1997) A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* **25**:1539-1542.
- Paulusma CC and Oude Elferink RP (1997) The canalicular multispecific organic anion transporter and conjugated hyperbilirubinemia in rat and man. *Journal of Molecular Medicine* **75**:420-428.
- Payen L, Sparfel L, Courtois A, Vernhet L, Guillouzo A and Fardel O (2002) The drug efflux pump MRP2: Regulation of expression in physiopathological situations and by endogenous and exogenous compounds. *Cell Biology and Toxicology* **18**:221-233.
- Pfaffl MW (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* **10**:92 ff.
- Quiros Y, Vicente-Vicente L, Morales AI, Lopez-Novoa JM and Lopez-Hernandez FJ (2010) An Integrative Overview on the Mechanisms Underlying the Renal Tubular Cytotoxicity of Gentamicin. *Toxicological Sciences* **119**:245-256.
- Ros JE, Roskams TA, Geuken M, Havinga R, Splinter PL, Petersen BE, LaRusso NF, van der Kolk DM, Kuipers F, Faber KN, Müller M and Jansen PL (2003) ATP binding cassette transporter gene expression in rat liver progenitor cells. *Gut* **52**:1060-1067.
- Schaub TP, Kartenbeck J, König J, Spring H, Dorsam J, Staehler G, Storkel S, Thon WF and Keppler D (1999) Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *Journal of the American Society of Nephrology* **10**:1159-1169.
- Scheffer GL, Kool M, de Haas M, de Vree JML, Pijnenborg ACLM, Bosman DK, Oude Elferink RPJ, van der Valk P, Borst P and Scheper RJ (2002) Tissue Distribution and Induction of Human Multidrug Resistant Protein 3. *Laboratory Investigation* **82**:193-201.
- Schlüter T, Grimm R, Steinbach A, Lorenz G, Rettig R and Grisk O (2006) Neonatal sympathectomy reduces NADPH oxidase activity and vascular resistance in spontaneously hypertensive rat kidneys. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **291**:R391-399.

- Schuetz JD, Connelly MC, Sun D, Paibir SG, Flynn PM, Srinivas RV, Kumar A and Fridland A (1999) MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nature Medicine* **5**:1048-1051.
- Slot AJ, Wise DD, Deeley RG, Monks TJ and Cole SPC (2008) Modulation of Human Multidrug Resistance Protein (MRP) 1 (ABCC1) and MRP2 (ABCC2) Transport Activities by Endogenous and Exogenous Glutathione-Conjugated Catechol Metabolites. *Drug Metabolism and Disposition* **36**:552-560.
- Smeets PH, van Aubel RA, Wouterse AC, van den Heuvel JJ and Russel FG (2004) Contribution of multidrug resistance protein 2 (MRP2/ABCC2) to the renal excretion of p-aminohippurate (PAH) and identification of MRP4 (ABCC4) as a novel PAH transporter. *Journal of the American Society of Nephrology* **15**:2828-2835.
- Stamova B, Apperson M, Walker W, Tian Y, Xu H, Adamczyk P, Zhan X, Liu D-Z, Ander B, Liao I, Gregg J, Turner R, Jickling G, Lit L and Sharp F (2009) Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human peripheral blood. *BioMed Central - Medical Genomics* **2**:49.
- Stavrovskaya AA and Stromskaya TP (2008) Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry* **73**:592-604.
- Szakacs G, Annereau JP, Lababidi S, Shankavaram U, Arciello A, Bussey KJ, Reinhold W, Guo Y, Kruh GD, Reimers M, Weinstein JN and Gottesman MM (2004) Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells. *Cancer Cell* **6**:129-137.
- Tanaka Y, Kobayashi Y, Gabazza EC, Higuchi K, Kamisako T, Kuroda M, Takeuchi K, Iwasa M, Kaito M and Adachi Y (2002) Increased renal expression of bilirubin glucuronide transporters in a rat model of obstructive jaundice. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **282**:G656-662.
- Tanigawara Y (2000) Role of P-glycoprotein in drug disposition. *Therapeutic Drug Monitoring* **22**:137-140.
- Terlouw SA, Masereeuw R, Russel FG and Miller DS (2001) Nephrotoxicants induce endothelin release and signaling in renal proximal tubules: effect on drug efflux. *Molecular Pharmacology* **59**:1433-1440.

- Toh S, Wada M, Uchiumi T, Inokuchi A, Makino Y, Horie Y, Adachi Y, Sakisaka S and Kuwano M (1999) Genomic Structure of the Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter Gene (MRP2/cMOAT) and Mutations in the ATP-Binding Cassette Region in Dubin-Johnson Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* **64**:739-746.
- van Aubel RA, Smeets PH, Peters JG, Bindels RJ and Russel FG (2002) The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *Journal of the American Society of Nephrology* **13**:595-603.
- van Aubel RA, van Kuijk MA, Koenderink JB, Deen PM, van Os CH and Russel FG (1998) Adenosine triphosphate-dependent transport of anionic conjugates by the rabbit multidrug resistance-associated protein Mrp2 expressed in insect cells. *Molecular Pharmacology* **53**:1062-1067.
- van Aubel RAMH, Masereeuw R and Russel FGM (2000) Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **279**:F216-232.
- van Aubel RAMH, Smeets PHE, van den Heuvel JJMW and Russel FGM (2005) Human organic anion transporter MRP4 (ABCC4) is an efflux pump for the purine end metabolite urate with multiple allosteric substrate binding sites. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **288**:F327-333.
- van de Water FM, Boleij JM, Peters JGP, Russel FGM and Masereeuw R (2007) Characterization of P-glycoprotein and multidrug resistance proteins in rat kidney and intestinal cell lines. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **30**:36-44.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**:research0034.0031 - research0034.0011.
- Vernhet L, Seite MP, Allain N, Guillouzo A and Fardel O (2001) Arsenic induces expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) gene in primary rat and

- human hepatocytes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **298**:234-239.
- Villanueva S, Cespedes C, Gonzalez AA, Vio CP and Velarde V (2007) Effect of ischemic acute renal damage on the expression of COX-2 and oxidative stress-related elements in rat kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **292**:F1364-F1371.
- Villanueva SSM, Ruiz ML, Ghanem CI, Luquita MG, Catania VA and Mottino AD (2008) Hepatic Synthesis and Urinary Elimination of Acetaminophen Glucuronide Are Exacerbated in Bile Duct-Ligated Rats. *Drug Metabolism and Disposition* **36**:475-480.
- Vos TA, Ros JE, Havinga R, Moshage H, Kuipers F, Jansen PL and Müller M (1999) Regulation of hepatic transport systems involved in bile secretion during liver regeneration in rats. *Hepatology* **29**:1833-1839.
- Wacher VJ, Wu CY and Benet LZ (1995) Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Molecular Carcinogenesis* **13**:129-134.
- Wada M, Toh S, Taniguchi K, Nakamura T, Uchiumi T, Kohno K, Yoshida I, Kimura A, Sakisaka S, Adachi Y and Kuwano M (1998) Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Human Molecular Genetics* **7**:203-207.
- Wortham M, Czerwinski M, He L, Parkinson A and Wan Y-JY (2007) Expression of Constitutive Androstane Receptor, Hepatic Nuclear Factor 4{alpha}, and P450 Oxidoreductase Genes Determines Interindividual Variability in Basal Expression and Activity of a Broad Scope of Xenobiotic Metabolism Genes in the Human Liver. *Drug Metabolism and Disposition* **35**:1700-1710.
- Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG and Li Y (2008) Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development. *Current Medicinal Chemistry* **15**:1981-2039.

LITERATURVERZEICHNIS

Zinchuk V, Zinchuk O, Akimaru K, Moriya F and Okada T (2007) Ethanol consumption alters expression and colocalization of bile salt export pump and multidrug resistance protein 2 in the rat. *Histochemistry and Cell Biology* **127**:503-512.

Zollner G, Fickert P, Zenz R, Fuchsbichler A, Stumptner C, Kenner L, Ferenci P, Stauber RE, Krejs GJ, Denk H, Zatloukal K and Trauner M (2001) Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. *Hepatology* **33**:633-646.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, David Hermkes geboren am 08.10.1980 in Düsseldorf, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Universitätsmedizin Greifswald der Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald im Institut für Physiologie angefertigt.
An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre Hilfsbereitschaft zur Anfertigung der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. med. Rainer Rettig für die Vergabe des Themas, für die Unterstützung bei der Erstellung der Manuskripte und für die zahlreichen wertvollen Anregungen während der Fertigstellung meiner Doktorarbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Torsten Schlüter für die gute Betreuung meiner Doktorarbeit, für zahlreiche fruchtbare wissenschaftliche Diskussionen und für viele hilfreiche Hinweise bei der Laborarbeit und der Auswertung der Ergebnisse.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie für Ihre andauernde und vorbehaltlose Unterstützung.