

Aus der Abteilung für Allgemeine Pharmakologie
des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie
(Leiter Univ. Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer)
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Nachweis der ABC-Transporter
ABCG2 und MRP5 in humanem Herzgewebe
mit real-time PCR und Immunhistochemie**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Medizinischen Fakultät
der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald
2003

vorgelegt von:
Björn-Niklas Heydrich
geb. am 6.12.1975
in Lübeck

Dekan: Prof. Dr. Heyo K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. Heyo K. Kroemer

2. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Geißlinger

Raum: Hörsaal der Klinik für Innere Medizin

Tag der Disputation: 11.07.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Hintergrund und Ziel der Arbeit	1
1.2	Stofftransport über Zellmembranen.....	2
1.3	Die ABC-Transporter.....	3
1.4	Die ABCG-Familie	4
1.5	Das ABC-Transportprotein ABCG2.....	5
1.6	Die ABCC-Familie	10
1.7	Das ABC-Transportprotein MRP5 (ABCC5)	12
1.8	Anatomie des Herzens	17
1.9	Koronare Herzkrankheit (KHK)	18
1.10	Kardiomyopathien.....	20
2	Material und Methoden.....	22
2.1	Material	22
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Präparation der Gesamt-RNA.....	27
2.2.2	Gelelektrophorese	28
2.2.3	RNA-Gelelektrophorese	28
2.2.4	DNA-Gelelektrophorese	29
2.2.5	Reverse Transkription.....	29
2.2.6	Real-time PCR (<i>TaqMan</i> [®] -PCR).....	31
2.2.7	Auswertung der <i>TaqMan</i> [®] -Ergebnisse	35
2.2.8	Primer- und Sonden-Synthese	38
2.2.9	Messung der Proben	38
2.2.10	Standardklonierung.....	40
2.2.11	Statistische Auswertung.....	43
2.2.12	Immunhistochemie	43
2.2.13	Immunfluoreszenz	45
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Isolation von RNA aus Herzgewebe	46
3.2	Primer- und Sondendesign.....	47
3.3	Standardklonierung.....	49
3.4	Ermittlung der Quantifizierungsmethode für ABCG2 und MRP5	51

3.5	Ergebnisse der <i>TaqMan</i> ^â -PCR	52
3.6	Statistische Auswertung	55
3.7	Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	63
4	Diskussion.....	66
4.1	ABCG2.....	66
4.2	MRP5	69
5	Zusammenfassung	75
6	Literaturverzeichnis	76
7	Anhang	84

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleinacid)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
FACS	Durchflußzytometrie (Fluorescence-Activated Cell Sorter)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
MDR	Medikamentenresistenz (Multidrug Resistance)
mRNA	Boten-(messsenger)-RNA
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
P-gp	Phospho-Glykoprotein
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleinacid)
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	Hydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
bp	Basenpaar
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton

1 Einleitung

1.1 Hintergrund und Ziel der Arbeit

Die intrazelluläre Konzentration vieler endogener und exogener Stoffe wird durch Adenosintriophosphat (ATP)-abhängige, membranständige Proteine bestimmt, sogenannte ABC-Transporter (ATP-Binding Cassette Transporter). Als erstes wurden diese Transporter in Tumorzelllinien beschrieben, in denen sie für die Resistenz gegen zahlreiche Zytostatika verantwortlich gemacht werden. Mittlerweile sind sie in vielen Geweben und Zelllinien nachgewiesen worden. Ihr bekanntester Vertreter ist das P-Glykoprotein (P-gp). Es hat im Darm und Gehirn eine Schrankenfunktion und verhindert den Übertritt toxischer Substanzen. Zwei weniger untersuchte Vertreter der ABC-Transporter sind das ABCG2- und das MRP5-Transportprotein, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

ABCG2 ist in Mitoxantron-resistenten Tumorzelllinien entdeckt worden. Es hat als Substrate Medikamente wie das Doxorubicin, für das eine ausgeprägte Kardiotoxizität mit starker interindividueller Schwankung beschrieben worden ist. Es sollte untersucht werden, ob und wie stark dieser Transporter in humanem Herzgewebe exprimiert ist.

MRP5 ist unter anderem als Transporter zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) beschrieben, welches eine Rolle bei der Relaxation glatter Muskelzellen spielt. Der Nachweis dieses Transporters in humanem Herzgewebe könnte neue Erklärungswege für die Regulation cGMP-abhängiger Funktionen im Herzmuskel ermöglichen.

Es wurden in der vorliegenden Arbeit 15 Gewebeprobe linksventrikulären humanen Myokards von 5 gesunden Probanden, von 5 Probanden mit ischämischer Kardiomyopathie und von 5 Probanden mit dilatativer Kardiomyopathie untersucht. Des weiteren standen 52 Proben rechtsaurikulären Myokards (Gewebe aus dem rechten Herzohr) zur Verfügung, die während Koronarangiographien bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit gewonnen wurden.

1.2 Stofftransport über Zellmembranen

Von der Aufnahme in den Körper oder von seinem Entstehungsort im Körper muss jeder exogene und endogene Stoff zahlreiche Zellmembranen im Körper passieren, um an seinen Wirkort oder zu seiner Ausscheidung zu gelangen. Für diesen Transport stehen zwei grundlegend unterschiedliche Mechanismen zur Verfügung. Entweder kann der Stoffaustausch rein passiv oder aktiv erfolgen. Hauptaufgaben dieser Transportmechanismen sind die Konzentrierung von Wirkstoffen in bestimmten Kompartimenten, die Ausscheidung von Schadstoffen und die Aufrechterhaltung von Ionengradienten für die Erregbarkeit von Nerven- und Muskelzellen.

Zum passiven Teilchenaustausch, der ohne Energie auskommt und entlang eines Konzentrationsgradienten gerichtet ist, gehört die freie Diffusion. Nur nichtpolaren Molekülen ist diese Form des Membrandurchtritts möglich. Bei der erleichterten (passiven) Diffusion treten hydrophile Moleküle, geladene Moleküle und Ionen, für die die Zellmembranen wenig permeabel sind, mit Hilfe eines „Trägers“ durch die Membran. Diese „Träger“ können entweder Carrier-Proteine (Transport-Protein) oder Ionenkanäle sein. Carrier-Proteine besetzen die gesamte Lipiddoppelschicht der Zellmembran. Sie enthalten spezifische Bindungsstellen für ihre Substrate und transportieren Stoffe nur in einer Richtung (Uniport) oder als Antiport (Gegentransport) zwei Teilchen in entgegengesetzter Richtung. Carrier arbeiten immer entlang eines Konzentrationsgradienten. Daneben ermöglichen Ionenkanäle die erleichterte Diffusion. Diese sind Kanalproteine, die als wassergefüllte Pore die gesamte Membran durchziehen und nur für bestimmte Ionen durchlässig sind. Der Konzentrationsgradient und die Ladung der Ionen bestimmen die Geschwindigkeit des Durchtritts. Sie können im geöffneten oder geschlossenen Funktionszustand vorliegen. Diese Zustände können durch Signalmoleküle, Ionen, Nukleotide oder GTP-bindene Proteine moduliert werden.

Der aktive Transport ist Carrier-vermittelt. Im Gegensatz zum passiven Transport können durch Energieverbrauch Substanzen gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert werden. Es wird ein primär-aktiver und ein sekundär-aktiver Transport unterschieden. Der primär-aktive Transport ist direkt mit der energieliefernden chemischen Reaktion

verbunden. Das am besten untersuchte Beispiel für diesen Transport ist die Natrium-Kalium-ATPase. Unter Verbrauch eines ATP-Moleküls werden drei Kationen Natrium gegen zwei Kationen Kalium über die Zellmembran ausgetauscht. So wird die hohe Natriumkonzentration extrazellulär und die hohe Kaliumkonzentration intrazellulär aufrechterhalten. Weitere Beispiele für den primär-aktiven Transport sind H^+ -Sekretion der Belegzellen der Magenschleimhaut und die Calcium-Wiederaufnahme in die Calciumdepots des sarkoplasmatischen Retikulums der Muskelzellen. Bei sekundär-aktivem Transport ist der Stoffaustausch nicht direkt an eine energieverbrauchende Reaktion gekoppelt, sondern wird durch eine Potentialdifferenz ermöglicht. Es werden Teilchen im Symport gegen einen Konzentrationsgradienten transportiert. Die Glucoseaufnahme im Intestinaltrakt erfolgt über ein spezifisches Transportprotein als Symport mit Natriumionen. Ein Konzentrationsgefälle, welches über die Na^+/K^+ -ATPase aufrecht erhalten wird, ermöglicht diesen Weg für Natrium und Glucose nach intrazellulär. Als Antiport werden zahlreiche Stoffe über die Mitochondrienmembran ausgetauscht.

Neben den bisher beschriebenen Transportwegen, gibt es noch die Endozytose, bei der größere Moleküle an die Zelloberfläche binden und durch Abschnüren von Vesikeln aus der Zellmembran in die Zelle aufgenommen werden.

Die in dieser Arbeit untersuchten ABC-Transporter gehören zur Kategorie des primär-aktiven Transportes.

1.3 Die ABC-Transporter

ATP-Binding Cassette Transporter (ABC-Transporter) sind eine Gruppe von transmembranären Proteinen, die Substanzen unter ATP-Verbrauch gegen einen Konzentrationsgradienten über eine Zellmembran transportieren. Es sind bisher 48 ABC-Transporter beim Menschen beschrieben worden. Bei den meisten ist die Funktion noch unbekannt. Viele dieser Transporter besitzen die Eigenschaft durch vermehrten Auswärtstransport Resistenzen gegenüber Zytostatika zu erzeugen. Veränderungen bei einigen Transportern sind mit bestimmten Krankheiten assoziiert.

Die meisten ABC-Transporter bestehen aus zwölf Transmembrandomänen und zwei intrazellulären ATP-Bindungsstellen [1]. Die bekanntesten Beispiele für einen ABC-

Transporter sind das *Phospho-Glykoprotein (P-Glykoprotein, P-gp)*, kodiert vom MDR1-Gen (ABCB1), und die Transporter der *Multidrug-Resistance-associated-Protein-Familie (MRP)*, aus der im Rahmen dieser Arbeit das MRP5 (ABCC5) genauer untersucht wurde. Neben den ABC-Transportern, die zwölf Transmembrandomänen und zwei ATP-Bindungsstellen besitzen, gibt es auch so genannte *Half-Transporter*. Sie besitzen nur sechs Transmembrandomänen und eine ATP-Bindungsstelle. Zu dieser Gruppe gehört das in dieser Arbeit untersuchte ABCG2.

1.4 Die ABCG-Familie

Die ABCG Familie hat sechs Mitglieder ABCG1 bis ABCG5 und ABCG8, von denen ABCG2 das bekannteste und am besten charakterisierte Mitglied ist. Alle Mitglieder der ABCG2-Familie sind *Half-Transporter* und besitzen nur eine ATP-Bindungsstelle und sechs Transmembrandomänen [2]. Half-Transporter müssen erst aus zwei *Half-Transportern* zu einem *Full-Transporter* dimerisieren, um ihre volle Funktionsfähigkeit zu erlangen [3].

ABCG1 besitzt eine starke Homologie mit dem Sehpigmenttransporter von *Drosophila melanogaster*. ABCG1 transportiert beim Menschen Tryptophan und konnte im menschlichen Gehirn, der Plazenta, der Milz und der Lunge nachgewiesen werden. Es wird eine Rolle von ABCG1 bei neurologischen Erkrankungen, die den Tryptophan- bzw. Serotonin-Stoffwechsel betreffen, vermutet [4]. ABCG3 ist nahe verwandt mit ABCG2. Es wurde sowohl in der Maus als auch beim Menschen nachgewiesen. Die höchsten Konzentrationen fanden sich beim Menschen in Thymus und Milz. Das ABCG3-Gen wurde auf Chromosom 8p12 lokalisiert. ABCG3 ist vermutlich nicht in der Lage, ATP zu binden, und muss mit anderen *Half-Transportern* dimerisieren, um seine Funktion zu erlangen [5]. Für die Erkrankung der Sitosterolämie ist ein Defekt im humanen ABCG5- und ABCG8-Gen verantwortlich. Sitosterolämie ist eine Erkrankung im Cholesterinstoffwechsel des Menschen. ABCG5- und ABCG8-Transporter pumpen mit der Nahrung aufgenommenes Cholesterin nicht mehr aus den Darmwandepithelien zurück ins Darmlumen. Es kommt zu einer unkontrollierten Aufnahme von pflanzlichen

Cholesterinen im Intestinaltrakt und in deren Folge unter anderem zur Entstehung der Arteriosklerose bei den Betroffenen schon in jungen Jahren [6, 7].

1.5 Das ABC-Transportprotein ABCG2

Das ABC-Transportprotein ABCG2 wurde erstmals 1990 von Chen et al. beschrieben. Bei ihren Untersuchungen der Zytostatikaresistenz in humanem Brustkrebsgewebe fiel ihnen auf, dass trotz Hemmung des ABC-Transporters P-gp mit dem Kalziumkanalblocker Verapamil in einem Teil der untersuchten Gewebe eine Resistenz gegen das Anthrazyklin Doxorubicin vorlag. In ihren weiteren Untersuchungen konnten sie ein neues Membranprotein mit dem Molekulargewicht von 95kDa nachweisen, das für die verbliebene Zytostatikaresistenz verantwortlich ist. Mit einem polyklonalen Antikörper lokalisierten sie es immunhistochemisch auf der Zelloberfläche [8].

Doyle et al. identifizierten 1998 das von Chen et al. beschriebene Protein, bei den gleichen humanen Brustkrebszelllinie (*MCF-7/AdrVp*) als einen ABC-Transporter, für den eine 2,4kb lange mRNA kodiert. Sie benannten den Transporter nach dem Gewebe, in dem sie ihn lokalisiert hatten, als *Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)*. Sie zeigten eine Resistenz dieser Zelllinie gegen die Anthrazykline Doxorubicin und Daunorubicin und gegen das Anthrachinon Mitoxantron und einen Transport des Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin 123 [9].

Etwa zeitgleich identifizierten Allikmets et al. in humanem Plazentagewebe einen ABC-Transporter und bezeichneten ihn als *Placenta-specific ATP-Binding Cassette Transporter (ABCP)*. Sie lokalisierten ihn auf Chromosom 4q22 und stellten eine starke Homologie mit dem ABCP-Gen der Maus auf deren Chromosom 6 und einem Gen für den Transport von Sehfarbstoffen (*Drosophila white gene*) bei *Drosophila melanogaster* fest [10].

Miyake et al. untersuchten 1999 die humane Mitoxantron-resistente Kolonkarzinomzelllinie *S1-M1-80*. Sie fanden einen Transporter, den sie *Mitoxantrone Resistance-associated gene (MXR)* nannten [11].

Die drei Gene unterschieden sich in der Länge am 3'-untranslatierten Ende. Das *Human Genome Nomenclature Committee (HUGO)* ordnete alle drei Transporter BCRP, ABCP

und MXR als Nummer 2 in die Subfamilie G der ABC-Transporter unter dem Namen ATP-Binding Cassette Transporter G2 (ABCG2) ein.

Das ABCG2-Gen liegt auf Chromosom 4q22 und kodiert ein 655 Aminosäuren langes und 72,1kDa schweres Transmembranprotein mit einer N-terminalen ATP-Bindungsstelle und sechs Transmembrandomänen am C-terminalen Ende. Es besteht aus 16 Exons und 15 Introns [12]. ABCG2 ist ein *Half-Transporter* mit einer ATP-Bindungsstelle und sechs Transmembrandomänen [9]. Ein Polymorphismus an Position 482 im ABCG2-Gen ist beschrieben. Zelllinien mit Arginin an Position 482 können Mitoxantron und Topotecan transportieren, aber Rhodamin 123 und Doxorubicin nicht. Arginin an Position 482 wird als Wildtyp bezeichnet. Liegt an Position 482 Glycin oder Threonin, werden Mitoxantron, Rhodamin 123 und Doxorubicin transportiert. Diese Veränderungen wurden an Tumorzelllinien entdeckt, ob sie auch in gesundem Gewebe existieren, ist unbekannt [13, 14].

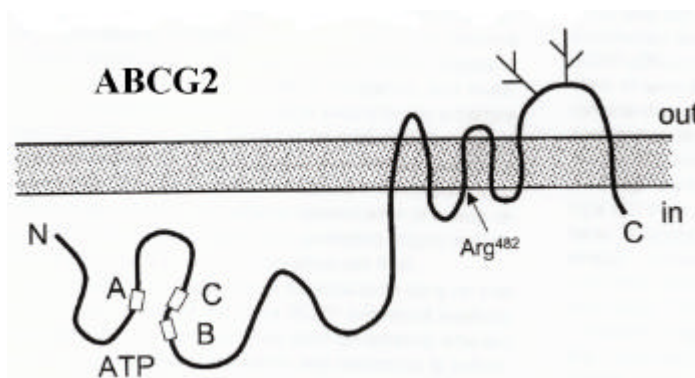


Abbildung 1.1 Schematischer Aufbau von ABCG2 nach Allen et al. [15]

Andere *Half-Transporter* TAP1/TAP2 (*Transporter associated with antigen presentation*) erlangen als Heterodimere ihre volle Funktion und pumpen Peptide über die Membran des endoplasmatischen Retikulums ins Zytoplasma [16]. In Analogie dazu nimmt man an, ABCG2 könnte in der Membran des endoplasmatischen Retikulums liegen und zum Medikamententransport von dort in die Zellmembran verlagert werden [17-19]. In normalem humanem Gewebe ist ABCG2 in der Zellmembran lokalisiert worden [20].

ABCG2 konnte bisher mit unterschiedlichen Methoden in zahlreichen Geweben und Zelllinien nachgewiesen werden (siehe Tabelle).

Tabelle 1.1 ABCG2 in Gewebe / Zelllinie

Gewebe / Zelllinie	Literatur
Tumorzelllinien	
Mamma-Ca / Subzelllinien von MCF-7 und MDA-MB-231RNOV	Ross et al. [21], Chen et al.[8], Doyle et al. [9]
Myelom / 8226	Ross et al. [21], Hazlehurst et al. [22]
Akute myeloische Leukämie / Blasten	Sargent et al.[23]
Kolon-Ca / S1-M1-80 und HT29RNOV und Caco-2 Zellen	Ross et al. [21], Miyake et al.[11], Taipalensuu et al. [24]
Magen-Ca / EPG85-257RNOV	Ross et al. [21]
Fibrosarkom / EPF86-079RNOV	Ross et al. [21]
Ovarialkarzinom / Subzelllinien von Igrov 1	Scheffer et al. [19], Maliepaard et al.[25]
Chorion-Ca / JAR, BeWo, JEG-3	Bailey-Dell et al.[12]
Lungen-Ca / PC-6/SN2-5H	Nakatomi et al. [26]
gesundes Gewebe	
Plazenta / Synzytiotrophoblast	Maliepaard et al.[20], Allikmets et al.[10]
Herz	Allikmets et al. [10]
Jejunum, Ileum, Kolon / apikale Membran	Maliepaard et al.[20]
Leber / kanalikuläre Membran	Maliepaard et al.[20]
Mamma / Ductus und Lobuli	Maliepaard et al.[20]
Gefäße / venöses und kapilläres Endothel	Maliepaard et al.[20]
Hämatopoetische Stammzellen („side population“), CD34 ^{negativ}	Zhou et al.[27], Bunting et al. [28]
Lunge, Niere, Nebenniere und Schweißdrüsen	Litman et al. [17]
andere Spezies	
Maus	Allen et al.[29], Jonker et al.[30], Schriml et al.[31]

ABCG2 fungiert in Geweben des Gastrointestinaltraktes als limitierender Faktor für die per orale Verfügbarkeit von Medikamenten durch einen auswärts gerichteten Transport zurück ins Lumen des Gastrointestinaltraktes [30]. In der Leber ist ABCG2 unter anderem für die hepatobiliäre Exkretion dieser Substrate (Tabelle 1.2) verantwortlich [30]. In der Plazenta sorgt es für den Schutz des Foetus vor Medikamenten, durch den Rücktransport in den mütterlichen Blutkreislauf [30]. ABCG2 liegt in den Kapillaren und Venolen vieler Gewebe vor [20]. In undifferenzierten Blutstammzellen zeigte sich ABCG2 als Marker der pluripotenten Zellen, der mit zunehmender Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen verschwindet [27, 32].

Als Substrate werden von ABCG2 zahlreiche Zytostatika, aber auch Fluoreszenzfarbstoffe, die auch für die FACS-Analyse von Zellen verwendet werden können, transportiert. Auch einzelne Medikamente anderer Gruppen werden von ABCG2 transportiert. (Tabelle 1.2)

Tabelle 1.2 Substrate von ABCG2

Substanzgruppe	Substrat	Literatur
Topoisomerase II Inhibitor	Mitoxantron	Doyle et al. [9]
Anthrazykline	Daunorubicin, Doxorubicin	Doyle et al. [9] Litman et al. [33]
Flavonoid	Flavopiridol	Litman et al. [17]
Topoisomerase I Inhibitor	Topotecan	Litman et al. [33] Maliepaard et al. [34]
Topoisomerase I Inhibitor	SN-38 (aktiver Metabolit von Irinotecan) SN-38-Glukuronid	Robey et al. [35] Maliepaard et al. [34] Nakatomi et al. [26]
Topoisomerase I Inhibitor	ST1481 (lipophiles, modifiziertes Camptothecin Analogon)	Perego et al. [36]
Topoisomerase I Inhibitor	9-Aminocamptothecin	Maliepaard et al. [34]

Topoisomerase I Inhibitor	NB-506 und J-107088	Komatani et al. [37]
Podophyllotoxin-Derivat	Etoposid	Diah et al. [38]
Anthracendion	Bisantren	Litman et al. [33]
Selektiver α_1 -Blocker	Prazosin	Litman et al. [33]
Fluoreszenzfarbstoff	BODIPY-Prazosin	Robey et al. [39]
Fluoreszenzfarbstoff	Rhodamin 123	Doyle et al. [9] Litman et al. [33] Robey et al. [39]
Fluoreszenzfarbstoff	LysoTracker Green	Robey et al. [39]
Fluoreszenzfarbstoff	DMD-26	Robey et al. [39]
Fluoreszenzfarbstoff	Hoechst 33342	Kim et al. [40]

Als Inhibitoren von ABCG2 konnten zahlreiche Substanzen identifiziert werden, die ganz unterschiedlichen Ursprungs sind und unter anderem auch als Inhibitoren anderer ABC-Transporter dienen. Ein Beispiel ist das *GF120918*, das auch als Inhibitor von P-gp bekannt ist.

Tabelle 1.3 Inhibitoren von ABCG2

Substanzgruppe	Inhibitor	Literatur
Indoldiketopiperazin aus <i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumitremorgin C (FTC)	Rabindran et al. [41] Robey et al. [35]
FTC Analogon	Ko143	Allen et al.
Acridoncarboxamid	GF120918	Maliepaard et al. [34]
HER Tyrosinkinase Inhibitor	CI1033	Erlichman et al. [42]
Hormone	Estron 17 β -Estradiol	Imai et al. [43]
Dipyridamol Analogon	BIB-E	Schlegel et al. [44]

zyklisches Polypeptid	Cyclosporin A	Özvegy et al. [45]
Sonstige Substanzen	Na-Orthovanadat, N-Ethylmaleimid	Özvegy et al. [45]

Verschiedenste Antikörper von ABCG2 sind mittlerweile hergestellt worden für die Untersuchung von Geweben mittels Immunhistochemie und Western Blot (Tabelle 1.4).

Tabelle 1.4 Antikörper gegen ABCG2

Antikörper	Anwendung	Literatur	Herkunft
BXP-21	Western Blot, Immunhistochemie an Paraffin- und kryo-fixiertem Gewebe	Maliepaard et al. [20]	monoklonal, von der Maus, käuflich zu erwerben
BXP-34	Immunhistochemie an kryo-fixiertem Gewebe	Scheffer et al. [19]	monoklonal, von der Maus, käuflich zu erwerben
87405	Immunhistochemie an Paraffin-fixiertem Gewebe	Litman et al. [33]	polyklonal, nicht käuflich zu erwerben

Neben dem ABCG2-Transporter wurde auch das Mitglied der ABCC-Familie MRP5 (ABCC5) im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

1.6 Die ABCC-Familie

Die ABCC-Familie ist die größte der ABC-Familien. Sie hat zwölf Mitglieder MRP1 bis MRP9 (*Multidrug Resistance Protein*), SUR1 und SUR2 (*Sulfonylurea Receptor*) und CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). Im Gegensatz zu der vorher beschriebenen ABCG-Familie und ihrem in dieser Arbeit untersuchten Mitglied ABCG2 sind die Mitglieder der ABCC-Familie keine *Half-Transporter*. Sie sind *Full-*

Transporter und besitzen zwei ATP-Bindungsstellen und mindestens zwölf transmembranäre Domänen.

In der MRP-Untergruppe ist MRP1 unter anderem für die Medikamentenresistenz (*Multidrug Resistance, MDR*) zahlreicher Tumoren mit verantwortlich. MRP1 und MRP2 sind für den Transport von amphiphilen Anionen, vor allem Konjugaten lipophiler Substanzen mit Glutathion, Glukuronsäure oder Sulfat verantwortlich [46-49]. Ein Defekt im MRP2-Gen führt zum *Dubin-Johnson-Syndrom*. Durch einen Defekt der Sekretionsfunktion der Hepatozyten ist die Exkretion von Stoffen in die Gallenwege gestört. Die Erkrankung ist verbunden mit einer Hyperbilirubinämie, Einlagerung von Melanin-ähnlichem Pigment in ansonsten normale Hepatozyten und abdominellen Schmerzen [50, 51]. MRP3 wurde in Hepatozyten basolateral nachgewiesen und wird unter anderem beim *Dubin-Johnson-Syndrom* und Cholestase hochreguliert [1, 52]. Für MRP4 konnte eine Ähnlichkeit mit MRP5 im Transport zyklischer Nukleotide gezeigt werden. Die Affinität zu diesen Substraten ist bei MRP4 jedoch deutlich geringer [53, 54]. Auch MRP6 spielt eine Rolle bei der Resistenz gegen Medikamente [55]. Eine Mutation im MRP6 Gen ist mit der Erkrankung *Pseudoxanthoma elasticum* assoziiert. Sie ist eine degenerative Systemerkrankung des elastischen Gewebes der Haut und führt zu einer Hyperelastizität, kolloidaler Altersdegeneration am Auge und zu Durchblutungsstörungen in den arteriellen Gefäßen [56]. Die physiologische Funktion von MRP7, MRP8 und MRP9 ist nicht geklärt. Es wurde bisher lediglich ihre Existenz im Genom beschrieben [57, 58].

SUR1 und SUR2 sind *Sulfonylharnstoffrezeptoren*. Sie sind wichtig bei der Freisetzung von Insulin aus den β -Zellen des Pankreas bei Gabe von Sulfonylharnstoffen zur Therapie des nicht Insulin-abhängigen Diabetes mellitus. Sulfonylharnstoffe hemmen die Leitfähigkeit ATP-abhängiger Kaliumkanäle. Bei Mutationen im SUR1-Rezeptor kommt es zur persistierenden hyperinsulinämischen Hypoglykämie im Kindesalter. Ein defekter negativer Feedbackmechanismus zwischen Insulin und dem Blutglukosespiegel führt zur Hyperinsulinämie und zur Hypoglykämie [59, 60].

CFTR (*Cystis Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Protein*) ist ein Chloridkanal, der durch cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) aktiviert wird. Eine Mutation im CFTR-Gen führt zur *Mukoviszidose (zystische Fibrose)*. Es resultiert eine Sekretionsstörung über epitheliale Strukturen im menschlichen Organismus. Durch diese Sekretionsstörung kommt es im Intestinaltrakt zum Mekoniumileus, in der Leber zur biliären Zirrhose und in der Lunge zu chronischen bronchopulmonalen Infektionen mit Emphysembildung. In den Schweißdrüsen wird Schweiß mit einem hohen Gehalt an Elektrolyten sezerniert. Sowohl bei der Frau als auch beim Mann führt diese Erkrankung zu Infertilität [61].

1.7 Das ABC-Transportprotein MRP5 (ABCC5)

MRP5 wird in der Literatur nicht einheitlich benannt. Seine Sequenz wurde von verschiedenen Gruppen unabhängig von einander veröffentlicht. Diese Entwicklung soll im folgenden kurz dargestellt werden, um die verschiedenen Namen ein und des selben Transportproteins zu erläutern.

MRP5-Teilsequenzen wurde durch *EST Dateianalyse (Expressed Sequence Tag Database Analysis)* 1996 von Allikmets et al. [62] und 1997 von Kool et al. [63] identifizierten. Sie untersuchten die EST Datei nach Homologen der MRP-Transporter. Kool et al. fanden mehrere Homologe und nannten eines von diesen MRP5. Sie gehören zu den ersten, die die MRP5-Expression in zahlreichen Geweben und Tumorzelllinien untersuchten [63].

Suzuki et al. klonierten 1997 aus einer humanen Adenokarzinomzelllinie (*PC-14/CDDP*) der Lunge eine kurze cDNA-Sequenz. Eine Spleißvariante, die sie als *SMRP (Short Type of Multidrug Resistance Protein)* bezeichneten [64].

Von Belinsky et al. wurde 1997 ein weiterer Name für MRP5 eingeführt. Sie nannten MRP5 *MOAT-C (Multispecific Organic Anion Transporter)* [65].

McAleer et al. beschrieben 1999 einen neuen ABC-Transporter in humanen embryonalen Nierenzellen *HEK293*, den sie *pABC11* bezeichneten [66].

Vom *Human Genome Nomenclature Committee (HUGO)* wird *MRP5 / MOAT-C / SMRP / pABC11* als Nummer 5 in der Subfamilie C der ABC-Transporter unter dem Namen ATP-

Binding Cassette Transporter C5 (ABCC5) geführt. MRP5 ist der in der Literatur am meisten verwendete Name.

Das MRP5 Gen liegt auf Chromosom 3q27 und hat eine Länge von 5881 Basenpaaren [64, 66]. Es kodiert für ein 1437 Aminosäuren langes transmembranäres Transportprotein. MRP5 besteht aus 12 Transmembrandomänen und zwei intrazellulären ATP-Bindungsstellen [65]. In polarisierten Zellen liegt MRP5 vorwiegend in der basolateralen Zellmembran vor [67].

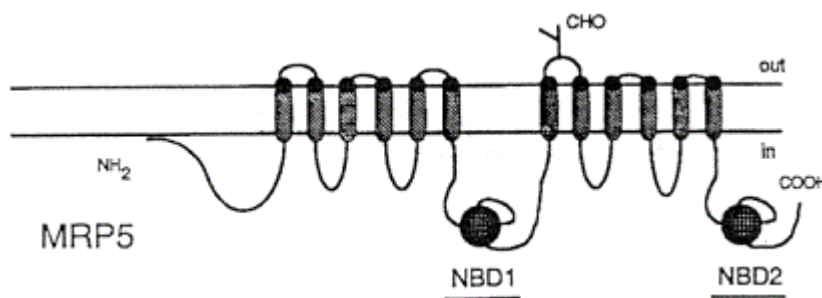


Abbildung 1.2 Schematischer Aufbau von MRP5 (NBD = Nukleotid bindende Domäne) nach Borst et al. [48]

MRP5 ist ubiquitär im menschlichen Körper in unterschiedlich starker Expression vorhanden. Die höchsten Konzentrationen fanden sich im Skelettmuskel und im Gehirn (Tabelle 1.5). Die Expression von MRP5 in humanem Herzgewebe ist auf mRNA-Ebene bisher mit RNase protection assays und Northern Blot nachgewiesen worden. Genaue Angaben zur Höhe der Expression wurden von den Autoren nicht gemacht. Es wird von „mittleren bis niedrigen Konzentrationen“ in humanem Herzen im Vergleich zu humanem Skelettmuskel und Gehirn gesprochen [55, 65, 66].

Tabelle 1.5 MRP5 in Gewebe / Zelllinie

Gewebe / Zelllinie	Literatur
Organe	
hohe Konzentration: Skelettmuskel, Gehirn	Kool et al. [63]
mittlere Konzentration: Lunge, Niere, Harnblase, Milz, Speicheldrüsen, Hoden, Nerven, Magen, Gallenblase, Kolon, Herz, Tonsillen	Kool et al. [63] Belinsky et al. [65]
niedrige Konzentration: Schilddrüse, Leber, Nebenniere, Plazenta, Ovarien, Pankreas	Kool et al. [63]
Urogenitaltrakt: Harnblase, Ureter, Corpus cavernosum	Nies et al. [68]
Zelllinien	
kleinzelliges Lungen-Ca / GLC ₄ und Subzelllinien	Kool et al. [63]
Adeno-Ca der Lunge / MOR/P und MOR/R	Kool et al. [63]
Harnblasen-Ca / T24 und Subzelllinien	Kool et al. [63]
Ovarial-Ca / 2008 und Subzelllinien, A2780 und Subzelllinien, PXN94 und Subzelllinien	Kool et al. [63]
Kolon-Ca / HCT8 und Subzelllinien	Kool et al. [63]
Hoden-Ca / GCT27 und Subzelllinien	Kool et al. [63]
Epidermoid-Ca / KB-3-1 und KCP-4(-)	Kool et al. [63]

MRP5 ist ein multispezifischer, ATP-abhängiger Anionentransporter. Mit hoher Affinität transportiert er 3',5'-zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP), mit niedriger Affinität zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) [47]. MRP5 ist auch als Transporter für Gluthation (GSH) und seiner Konjugate für die Entgiftung über die Leber beschrieben worden [67]. Daneben sind auch zahlreiche Medikamente Substrate von MRP5, die keiner einheitlichen Gruppe angehören (Tabelle 1.6). Einige Substanzen sind jedoch nicht

ausschließlich Substrate von MRP5, so wird z.B. PME A auch von MRP4 transportiert [69]. Die physiologische und pathophysiologische Funktion von MRP5 muss noch weiter aufgeklärt werden. Wie für ABCG2 wird für MRP5 eine Schutzfunktion gegenüber toxischen Substanzen vermuten [30].

Tabelle 1.6 Substrate von MRP5

Substanzgruppe	Substrat	Literatur
zyklisches Guanosin-monophosphat	cGMP	Jedlitschky et al. [47]
zyklisches Adenosin-monophosphat	cAMP	Jedlitschky et al. [47]
Thiopurin	6-Mercaptopurin	Wijnholds et al. [67]
Thiopurin	Thioguanin	Wijnholds et al. [67]
Anti-HIV-Medikament	PMEA (9-(2-Phosphonyl-methoxyethyl)adenin)	Wijnholds et al. [67]
Amphiphile Anionen	Glutathion (GS) und Konjugate	Wijnholds et al. [67]
Amphiphile Anionen	DNP-GS (S-(2,4-dinitrophenyl)glutathion)	Wijnholds et al. [67]
Schwermetalle	CdCl ₂ (Resistenz) Kaliumantimonyltartrat	McAler et al. [66]

Nur wenige Substanzen sind bisher als Inhibitoren von MRP5 identifiziert worden. Es handelt sich hierbei um Urikosurika und um Phosphodiesterasehemmer (Tabelle 1.7).

Tabelle 1.7 Inhibitoren von MRP5

Substanzgruppe	Substrat	Literatur
Urikosurikum	Sulfinpyrazon	Wijnholds et al. [67]
Urikosurikum	Probenecid	Jedlitschky et al. [47]
Phosphodiesteraseinhibitoren	Sildenafil Trequinsin Zaprinast	Jedlitschky et al. [47]
Fluoreszenzfarbstoff	Fluorescein Diacetat	Jedlitschky et al. [47]

Neben der Inhibition ist auch die Induktion von MRP5 beschrieben. Durch das Zytostatikum Doxorubicin ist es möglich, eine Überexpression von MRP5 in humanen Lungenkrebszellen (*SBC-3/ADM*, *AdR MCF7*, *K562/ADM*) auszulösen [70]. In den humanen Lungenkrebszelllinien *PC-7*, *PC-9*, *PC-14*, *SBS-3* und *H69* wurde nach Behandlung mit Cisplatin und Carboplatin ebenfalls eine Überexpression von MRP5 beobachtet [71].

Verschiedenste Antikörper sind mittlerweile für die Untersuchung von Geweben mittels Immunhistochemie, Western Blot und FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorter (Durchflußzytometrie)*) hergestellt worden (Tabelle 1.8).

Tabelle 1.8 Antikörper gegen MRP5

Antikörper	Anwendung	Literatur	Herkunft
AMF	Immunoblot, Immunhistochemie	Jedlitschky et al. [47]	polyklonal, vom Kaninchen
M ₅ I-1	Western Blot, FACS und kryo-fixiertes Gewebe	Scheffer et al. [72]	monoklonal, von der Ratte, käuflich zu erwerben
M ₅ II-54	Western Blot, FACS und kryo-fixiertes Gewebe	Scheffer et al. [72]	monoklonal, von der Ratte, käuflich zu erwerben

Die beiden Transportproteine wurden in humanen Geweben mit sehr hoher Expression von ABCG2 in Plazenta und von MRP5 in Skelettmuskel und Gehirn nachgewiesen. ABCG2 transportiert unter anderem Medikamente, die in der Therapie maligner Erkrankungen eingesetzt werden und eine ausgesprochene Kardiotoxizität besitzen. MRP5 transportiert als Substrat zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), welches bei der Relaxation glatter Muskelzellen kardialer Gefäße eine große Rolle spielt. Daher wäre die Expression beider Proteine im menschlichen Herzen von erheblicher Bedeutung und wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.8 Anatomie des Herzens

Das Herz (Cor) ist ein muskuläres Hohlorgan. Es liegt im Brustkorb (Thorax) und pumpt das Blut durch den Körper. Das Herz trennt Körper- und Lungenkreislauf von einander. Es besitzt vier Herzhöhlen, den rechten Vorhof (Atrium dextrum) und die rechte Kammer (Ventriculus dexter) und den linken Vorhof (Atrium sinistrum) und die linke Kammer (Ventriculus sinister). Das Herz pumpt das Blut über die Aorta in den Körperkreislauf. Die Blutgefäße für die Eigenversorgung des Herzmuskels, die Koronargefäße, entspringen der Aorta direkt oberhalb ihres Abgangs aus dem Herzen. Es wird eine linke und eine rechte Herzkranzarterie unterschieden. Das linke Gefäß (Arteria coronaria sinistra) teilt sich in einen Ramus circumflexus (RCX) und einen Ramus interventricularis anterior (RIVA). Aus der rechten Herzkranzarterie entspringt der Ramus interventricularis posterior und der Ramus marginalis. Die Koronararterien ziehen von außen nach innen durch das Myokard. Ihre Kapillaren sind funktionelle Endarterien, die untereinander keine Anastomosen besitzen. Gebildet werden die Koronararterien von Endothelzellen, denen die Basalmembran und kontraktile Zellen (Perizyten) aufliegen.

Die Herzmuskulatur (Myokard) ist mesenchymalen Ursprungs. Myoblasten verschmelzen zu Kardiomyozyten. An ihren Zellgrenzen liegen die Disci intercalares (Haftkomplexe), deren wichtigster Bestandteil für die Erregungsleitung die Nexus (kommunizierende Zellkontakte) sind. Sie ermöglichen die elektrische Kopplung und die Ausbreitung einer Erregung von Zelle zu Zelle. Herzmuskelzellen gehören, ähnlich wie die Skelettmuskulatur, zur quergestreiften Muskulatur. Wie in der Skelettmuskulatur ist die

Interaktion der sich überlappenden Aktin-Myosin-Filamente für die Kontraktion der Kardiomyozyten verantwortlich. Eine passive Vordehnung der Sarkomere (kleinste kontraktile Einheit) führt zu einer verbesserten Kontraktion (Frank-Starling-Mechanismus) [73].

Erkrankungen der Herzkranzgefäße, wie die koronare Herzkrankheit (KHK), oder der Herzmuskulatur, wie die Kardiomyopathien, können die Herzfunktion beeinträchtigen.

1.9 Koronare Herzkrankheit (KHK)

Die koronare Herzerkrankung umfasst alle stenosierenden Prozesse der Herzkranzgefäße, die zu ischämischen Zuständen des Myokards führen. Sie ist eine der häufigsten Erkrankungen in den Industrienationen.

Bei der KHK liegt eine Atherosklerose der Koronararterien mit Einengung des Lumens vor. Am Beginn der Atherosklerose steht eine Endotheldysfunktion in der Intima (innerste, dem Lumen zugewandte Gefäßwandschicht) der Arterien. Verantwortlich für diese Dysfunktion sind Hypertonus, Nikotinabusus, Immunmechanismen, hämodynamische Faktoren oder eine Hyperlipoproteinämie. Die Endotheldysfunktion führt zum Lipoproteineinstrom in die Intima. Makrophagen nehmen diese Lipoproteine auf und werden zu Schaumzellen. Es kommt zur Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten und zur Proliferation der glatten Muskelzellen und Fibroblasten. Durch die Vermehrung der Schaumzellen wächst der atherosklerotische Plaque [74-76]. Ab einer Stenose von 75% des Querdurchmessers ist die koronare Reserve des Blutflusses in den Koronararterien erschöpft. Ab 80% ist bereits die Ruhedurchblutung eingeschränkt. Es kommt zu einer Myokardischämie beginnend an den Innenschichten der Herzkammern. Ein kompletter Verschluss eines Gefäßes führt zum Myokardinfarkt.

Die Therapie der KHK steht auf drei Säulen. Zuerst sollte versucht werden, die Risikofaktoren zu minimieren (z.B. Aufgabe des Rauchens, Anpassung der körperlichen Belastung, Gewichtsreduktion). Außerdem muss die Behandlung der Grunderkrankungen eingeleitet werden. Patienten mit Hyperlipidämie profitieren von der Einnahme von HMG- CoA- Reduktase- Hemmern (Hydroxy- Methylglutaryl- Coenzym A- Reduktase Hemmern). Sie haben unter der Einnahme weniger tödliche kardiale Ereignisse im Verlauf

[77]. Im zweiten Schritt folgt die symptomatische Therapie der KHK. Für die Behandlung stehen unterschiedliche Stoffklassen zur Verfügung.

1. Die Nitrate wie Nitroglyzerin (sublingual oder transdermal) und Isosorbiddinitrat (oral) führen zu einer systemischen Venendilatation und damit zur Abnahme der myokardialen Wandspannung und des Sauerstoffbedarfs. Des weiteren sorgen sie für eine Dilatation der epikardialen Koronargefäße und Erhöhung des Blutflusses. Nitrate erhöhen den NO-Spiegel in den Endothelien. Als second-messenger von NO (Stickstoffmonoxid) führt cGMP am Ende einer intrazellulären Signalkaskade zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur der Endothelien kardialer Gefäße [78-80]. In der glatten Gefäßmuskelzelle oder den Kardiomyozyten aktiviert NO die Guanylylzyklase (GC), die aus Guanosintriphosphat (GTP) den second messenger zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) synthetisiert [78]. Der intrazelluläre cGMP-Spiegel wird durch Abbau von cGMP zu Guanosinmonophosphat (GMP) oder über den MRP5-Transporter, der cGMP aus der Zelle pumpt, gesenkt. Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen und Hypotonie können bei Einnahme von Nitraten auftreten und zu einer Dosisreduktion zwingen [81].

2. β -Rezeptorenblocker wirken negativ chronotrop und negativ inotrop bei adrenerger Erregung. So verringern sie den myokardialen Sauerstoffverbrauch. Müdigkeit, Bradykardie, Erregungsleitungsstörungen, Impotenz, Asthma bronchiale, Linksherzinsuffizienz und Hypoglykämien unter Diabetes mellitus-Therapie sind unerwünschte Nebenwirkungen.

3. Als dritte große Gruppe stehen die Kalziumantagonisten zur Verfügung. Sie sind koronare Vasodilatoren und bewirken durch ihre negative Inotropie und Senkung des Blutdruckes eine Verminderung des kardialen Sauerstoffbedarfs [82]. Sie können Reizleitungsstörungen und Bradyarrhythmien auslösen. Die drei Stoffklassen sollten bei der Therapie kombiniert werden.

4. Zur Verbesserung der Mikrozirkulation können als Thrombozytenaggregationshemmer niedrigdosierte Acetylsalicylsäure und Clopidogrel verabreicht werden, um thrombembolische Ereignisse zu verhindern [83-85].

Die dritte Säule nach der Minimierung der Risikofaktoren und der symptomatischen Therapie ist die Intervention mittels perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) oder aortokoronarer Bypassoperation [86].

Der MRP5-Transporter hat cGMP als Substrat [47], welches am Ende der Signalkaskade zur Gefäßdilatation steht. Seine Expression wurde im Rahmen dieser Arbeit im menschlichen Herzen gezeigt. Die medikamentöse Beeinflussung des MRP5-Transporters am Herzen könnte eine neue Ansatzstelle für die Therapie der KHK sein.

1.10 Kardiomyopathien

Kardiomyopathien sind das Myokard betreffende Erkrankungen, die mit einer myokardialen Dysfunktion einhergehen [87]. Die heute gebräuchliche Klassifikation unterscheidet drei Basistypen der funktionellen Beeinträchtigung: 1. die dilatative, welche die häufigste ist, ist gekennzeichnet durch eine ventrikuläre Dilatation und eine kontraktile Dysfunktion, 2. die hypertrophe, die mit einer Hypertrophie des linken Ventrikels und oft auch des Septums einhergeht und 3. die restriktive, die durch eine Beeinträchtigung der diastolischen Füllung charakterisiert ist. Außerdem werden noch eine arrhythmogene Form und nicht klassifizierte Kardiomyopathien unterschieden [87]. Die ischämische Kardiomyopathie (ICM) gehört zu den spezifische Kardiomyopathien. Diese Herzmuskelerkrankungen sind durch bestimmte systemische oder kardiale Störungen verursacht [87]. Die Symptome der verschiedenen Kardiomyopathien ähneln sich sehr stark [88].

Die dilatative Kardiomyopathie (*DCM*) geht mit einer Herzvergrößerung, einer Beeinträchtigung der systolischen Pumpfunktion eines oder beider Ventrikel und den Symptomen einer Herzinsuffizienz einher. Die Inzidenz der Erkrankung liegt bei 5-8 pro 100000 Einwohner pro Jahr [88] und scheint besonders in den Industrieländern steigend zu sein. Vorwiegend sind Männer im mittleren Lebensalter betroffen.

Eine Vielzahl verschiedener zytotoxischer, metabolischer, immunologischer, familiärer und infektiöser Noxen können zu einer dilatativen Kardiomyopathie führen [88]. Alkohol, Schwangerschaft, Selenmangel, Hypophosphatämie, Hypokalzämie und unkontrollierte

Tachykardien können eine reversible Form der DCM hervorrufen. Bei etwa 20% der Patienten besteht eine familiäre Form mit unterschiedlichen Vererbungsmustern [89].

Klinisch zeigen die Patienten das typische Bild einer Rechts- bzw. Linksherzinsuffizienz mit Dyspnoe, Müdigkeit, peripheren Ödemen und Palpitationen.

Die DCM zeigt eine unaufhaltsame Progredienz. Unter anderem sind die Therapie der Erkrankung und die Risikofaktoren wie Alter, Ejektionsfraktion, ventrikuläre Arrhythmien und erhöhte Serumcatecholaminspiegel von wesentlicher Bedeutung [88].

Die ischämische Kardiomyopathie (*ICM*) gehört zu den spezifischen Kardiomyopathien [87]. Bei dieser Erkrankung liegt zunächst eine Schädigung der Koronararterien vor. Ursachen, Risikofaktoren, Pathophysiologie und Pathomorphologie der Gefäßwände entsprechen denen der koronaren Herzkrankheit (KHK). Multiple Mikroinfarkte führen zur Entstehung der ischämischen Kardiomyopathie. Sie beschreiben die Ursachen dieser Erkrankung aber nicht vollständig. Die klinischen Symptome entsprechen denen der dilatativen Kardiomyopathie [87]. Bei kurzzeitigen Ischämien des Myokards kommt es zu einer Präkonditionierung des Herzmuskels gegenüber späteren prolongierten Ischämien [90]. Hierbei spielen erhöhte NO- und cGMP-Spiegel in den Kardiomyozyten eine wichtige Rolle [91]. MRP5 beeinflusst den intrazellulären cGMP-Spiegel und könnte dadurch auch Einfluss auf die Präkonditionierung des Herzmuskels nehmen.

Viele Stoffe, die in der Pharmakotherapie ganz unterschiedlicher Erkrankungen eingesetzt werden, können zu Schädigungen des Herzmuskels führen. Vor allem für Zytostatika existieren solche Effekte. Eine besonders starke Kardiotoxizität ist für das Anthrazyklin Doxorubicin beschrieben. Es verursacht eine Hemmung des Wachstums der Kardiomyozyten. Daraus resultiert langfristig eine Kardiomyopathie. Als Risikofaktoren sind neben der Gesamtdosis zusätzliche Bestrahlung, Begleitmedikation, Alter und bekannte Herzerkrankungen des Patienten benannt worden [92]. Doxorubicin ist nicht nur Substrat von P-gp [93] sondern auch von ABCG2 [9], dessen Expression am Herzen für die interindividuell unterschiedliche Kardiotoxizität eine Rolle spielen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Zur Durchführung der Versuche sowie Ermittlung und Auswertung der Ergebnisse wurden die nachstehenden Materialien verwendet. Alle Reagenzien wurden mindestens in der Spezifikation „reinst“ oder in der höchstmöglichen kommerziell erhältlichen Reinheit verwendet.

Chemikalien

Agarose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat (<i>APS</i>)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ampicillin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, Steinheim, Deutschland
Borsäure	Sigma, Steinheim, Deutschland
Diaminobenzidin (<i>DAB</i>)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ethylendiaminotetraacetat (<i>EDTA</i>)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ethanol	J. T. Backer, Deventer, Holland
Ethidiumbromid (<i>EB</i>)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Formaldehyd	Sigma, Steinheim, Deutschland
Formamid, deionisiert	Sigma, Steinheim, Deutschland
H ₂ O ₂	Sigma, Steinheim, Deutschland
Hydroxymethylaminomethan (<i>Tris</i>)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
IPTG	Promega, Mannheim, Deutschland
Isopropanol	Sigma, Steinheim, Deutschland
LB Medium	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Morpholinopropansulfonsäure (<i>MOPS</i>)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumacetat	Sigma, Steinheim, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (<i>SDS</i>)	Sigma, Steinheim, Deutschland

N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (<i>TEMED</i>)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS	Biochrom, Cambridge, UK
Saccharose	Sigma, Steinheim, Deutschland
Vistra Green Nucleic Acid Stain	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
X-Gal	Promega, Mannheim, Deutschland
Xylol	J.T. Baker, Deventer, Holland

Enzyme

T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	Biolabs, Beverly, MA, USA

Antikörper

AMF	Jedlitschky et al.[47]
BXP-21	Alexis, Grünberg, Deutschland
Anti-CD34	Novocastra, Newcastle, UK
Anti-Aktin	DAKO, Glostrup, Dänemark
Anti-Desmin	DAKO, Glostrup, Dänemark
Alexa 488 [®] goat anti-mouse IgG 2 α	Molecular Probes, Leiden, Holland

Kits für die Molekularbiologie

PeqGOLD RNAPure	peqlab, Erlangen, Deutschland
100 bp-DNA-Marker	peqlab, Erlangen, Deutschland
TaqMan [®] Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland

TaqMan [®] Core PCR	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Pre-Developed TaqMan [®] assay Reagents endogenous Control Human GAPDH (huGAPDH)	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Pre-Developed TaqMan [®] assay Reagents endogenous Control Human Beta 2 Microglobulin (huB2M)	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Pre-Developed TaqMan [®] assay Reagents endogenous Control Human Beta-Actin (huBeta- Actin)	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Pre-Developed TaqMan [®] assay Reagents endogenous Control Ribosomal RNA control (18 S)	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
GFX [™] Micro Plasmid Prep Kit	amersham pharmacia biotech, Buckinghamshire, UK
GFX [™] PCR DNA and Gel Band Purification Kit	amersham pharmacia biotech, Buckinghamshire, UK

Kits für die Immunhistochemie

LSAB [®] -HRP-Detektionssystem	DAKO, Glostrup, Dänemark
Ventana NexES IHC Staining System	Ventana Medical Systems, Frankfurt, Deutschland

Verwendete Lösungen

1x TBE-Puffer	90 mM Tris-HCl 90 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 8,0
1x TE-Puffer	10 mM TRIS-HCl 1mM EDTA pH 8,0

1x PBS	8 g / l Natriumchlorid 2 g / l Kaliumchlorid 1,44 g / l Dinatriumhydrogenphosphat 0,2 g / l Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,4
LB-Agar	1x LB + 15 g / l Agar Noble
10x Saccharose-Auftragspuffer	0,2 mM EDTA 25% Saccharose 0,25% Bromphenolblau
10x MOPS-Puffer	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 7,0
Ethidiumbromidlösung	10 mg/ ml
RNA-Ladepuffer	500 µl Formamid 166 µl Formaldehyd (37% ig) 100 µl 10x MOPS 68 µl Bromphenolblau (2% ig) 2,5 µl EB 166 µl Aqua dest.
Citrat-Puffer	18 ml 0,05 M Zitronensäure 82 ml 0,11 M Natriumcitrat 900 ml Aqua dest.

Bakterien und Vektor

Ultrakompetente E.coli XL10-Gold-Zellen	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
pGEM [®] -T Easy Vektor	Promega, Mannheim, Deutschland

Geräte und Verbrauchsmaterialien

ABI PRISM 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Brutschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
CCD-Kamera	Hitachi Denshi, Rodgau, Deutschland
Elektrophoresekammer	Serva, Heidelberg, Deutschland
Elektrophorese	Bio Rad, München, Deutschland
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Filtertips	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Lasermikroskop, konfokal	Visi Tech, Sunderland, UK
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrodismembrator	Braun, Melsungen, Deutschland
Mikroskop	Nikon Europa, Düsseldorf, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Power Supply	Biometra, Göttingen, Deutschland
Reaktionsgefäße	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttelinkubator	Edmund Bieller, Hechingen, Deutschland
UV-Spektrometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Waage	Ohaus, Giessen, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.2 Methoden

In Rahmen dieser Dissertation wurde humanes Herzgewebe untersucht. Es standen 15 Proben linksventrikulären Myokardgewebes zur Verfügung, die bei Herztransplantationen entnommen wurden. Bei 5 Proben (D1-5) lag eine dilatative Kardiomyopathie (DCM, dilated cardiomyopathy) vor, bei 5 weiteren (I1-5) ein ischämische Kardiomyopathie (ICM, ischemic cardiomyopathy) und die letzten 5 waren von herzgesunden Personen (N1-5).

Des weiteren standen 52 Proben von Herzgewebe zur Verfügung, die im Rahmen von Bypassoperationen aus dem rechten Atrium entnommen wurden (1-52). Die Patienten unterzogen sich dieser Untersuchung wegen 2- bzw. 3-Gefäßerkrankungen der Herzkranzgefäße.

Alle Proben wurden sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff oder 4% Paraffin fixiert. Die in Stickstoff fixierten Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.2.1 Präparation der Gesamt-RNA

Die bei -80°C gelagerten Gewebestücke wurden mit einem Mikrodismembrator pulverisiert, und anschließend im Lysepuffer homogenisiert.

Die Präparation der RNA aus 60-80 mg homogenisiertem Gewebe erfolgte durch eine Guanidinium-Isothiocyanat-Extraktion (*peqGOLD RNAPure TM Kit*). Das vom Hersteller angegebene Standardprotokoll wurde hierzu in Teilen verändert.

Zunächst wurde das tiefgefrorene Gewebehomogenat in der 1,5-fachen vom Hersteller angegebenen Menge des Lysepuffers unter Zuhilfenahme einer 5 ml-Spritze und einer Kanüle vollständig gelöst. Erst nach Abwiegen und Aufnahme des Gewebes in Lysepuffer wurde der Versuch bei Raumtemperatur fortgesetzt. Die anschließende RNA-Präparation erfolgte mit der jeweils 1,5-fachen Menge der einzelnen Reagenzien. Das RNA-Pellet wurde in 50 μl RNase-freiem Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Da für die Reverse Transkription eine definierte RNA-Menge jeder Probe eingesetzt werden sollte, wurde mit Hilfe der optischen Dichtemessung (OD) bei 260 nm die

Konzentration der isolierten RNA bestimmt. Mit Hilfe der folgenden Formel ließ sich daraus die Konzentration der RNA berechnen.

$$C = A * U * V$$

C - Konzentration

A - Absorption bei 260 nm

U - Umrechnungsfaktor

V - Verdünnungsfaktor

Der Umrechnungsfaktor für RNA ist 40.

Bei der Messung wurde gleichzeitig die Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, gemessen. Aus dem Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm kann auf die Reinheit der RNA geschlossen werden. Für RNA sollte der Quotient bei 2,0 liegen. Kontamination der Probe mit Protein führt zu einem niedrigeren Quotienten.

2.2.2 Gelelektrophorese

Über die Integrität von DNA und RNA kann mit Hilfe der OD-Messung keine Aussage gemacht werden, da die einzelnen Nukleotide für die Absorption des Lichtes verantwortlich sind. Degradierete RNA und Kontamination mit DNA verfälschen die Messung. Zur Identifizierung der Länge von DNA- oder RNA-Fragmenten macht man sich ihre Wanderungseigenschaften im elektrischen Feld zu Nutze. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Nukleinsäuren in einem Gel mit definierter Porengröße ist abhängig von der im Strang enthaltenen Basenzahl, der Ladung und der Sekundär- und Tertiärstruktur der Nukleinsäure.

2.2.3 RNA-Gelelektrophorese

Eine Aussage über die Integrität der RNA kann mittels RNA-Gelelektrophorese getroffen werden. Hierzu wurde die isolierte RNA auf ein Formaldehydgel aufgetragen. Formaldehyd hat denaturierende Eigenschaften und löst so Wasserstoffbindungen in der RNA, die zur Ausbildung von Aggregaten und Sekundärstrukturen in der RNA führen und damit ein unterschiedliches Laufverhalten der RNA bedingen können. Abhängig von

ihrem Molekulargewicht und ihrer Ladung wandern Moleküle unterschiedlich weit im elektrischen Feld. RNA besteht zu 95 % aus 18 S ribosomaler RNA und zu 5 % aus 28 S ribosomaler RNA. Bei nicht kontaminierten Proben ist mit nur zwei Banden zu rechnen, die bei humaner RNA für 18 S rRNA bei 1,9 kb und für 28 S rRNA bei 5,1 kb liegen.

2.2.4 DNA-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese wird ein Standard mit DNA-Fragmenten bekannter Länge neben den Proben im Gel aufgetrennt. Er erlaubt die Längenbestimmung der Fragmente in der Probe. Zur optischen Auswertung der Banden im Gel nutzt man die Interkalation von Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiumbromid) aus, welches dem Gel und dem Laufpuffer (1x Tris-Borat-EDTA-Puffer, TBE) in einer Konzentration von 0,01% zugesetzt wird. Im ultravioletten Licht (254-366 nm) wird die interkalierte DNA zur Emission von sichtbarem Licht (590 nm) angeregt, welches mit einer Kamera aufgezeichnet und als Schwarzweißbild ausgegeben werden kann.

Die Agarose wurde durch mehrmaliges Erhitzen in 1xTBE Puffer gelöst und auf einen Gelträger aufgebracht. Es wurden 3%ige Agarosegele hergestellt. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Saccharose-Ladepuffer versetzt und dann im elektrischen Feld aufgetrennt.

2.2.5 Reverse Transkription

RNA kann nicht als Matrize für eine DNA-Polymerasekettenreaktion dienen. Sie muss in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Diese Reaktion nennt man Reverse Transkription (RT).

Für diese Reaktion können Oligo (dT)-, Random Hexamer oder sequenzspezifische Primer verwendet werden. Die Oligo (dT)-Primer ermöglichen das Umschreiben der mRNA in cDNA, da nur mRNA ein polyA⁺-Ende besitzt, an das die Oligo (dT)-Primer spezifisch binden. Random Hexamer Primer bestehen aus Hexamerkombinationen aller 4 Basen. Sie lagern sich über die RNA verteilt an und ermöglichen es, die isolierte RNA in cDNA umzuschreiben. Dies ermöglicht es später, die gemessenen Werte von ABCG2 und MRP5 auf die 18 S rRNA zu normalisieren, die kein polyA⁺-Ende besitzt. Im Rahmen dieser Dissertation wurden nur Random Hexamer Primer verwendet.

Die Reaktion wird durch das Enzym Reverse Transkriptase katalysiert. Es kann aus dem *Moloney-Mäuseleukämievirus* (M-MLV-Reverse Transkriptase) und dem *Avian Myeloblastosis Virus* (AMV-Reverse Transkriptase) gewonnen werden. Wir verwendeten eine M-MLV-Reverse Transkriptase.

Für die RT-Reaktion wurden für die Proben D1-5, I1-5 und N1-5 je 200 ng RNA und für die Proben 1-52 je 250 ng RNA für einen 50 µl Ansatz verwendet. Hierzu wurde die RNA der Proben D1-5, I1-5 und N1-5 auf 100 ng/µl und die der Proben 1-52 auf 125 ng/µl verdünnt.

Für die Reverse Transkription wurde das *TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents-Kit* von *Applied Biosystems* nach folgendem Pipettierschema verwendet:

Tabelle 2.1 Pipettierschema einer RT (50 µl)

Komponenten für die RT-PCR	Volumen in µl	Endkonzentration
RT-Buffer 10x	5	1 x
MgCl ₂	11	5,5 mM
dNTP	10	500 µM
Hexamer Primer	2,5	2,5 µM
RNAse Inhibitor	1	0,4 U/µl
Reverse Transkriptase	1,25	1,25 U/µl
H ₂ O	17,25	-
RNA	2	4 oder 5 ng/µl
Gesamtvolumen	50	-

Die Reverse Transkription wurde auf dem *Gradienten Cyler* von *Eppendorf* durchgeführt.

Tabelle 2.2 Temperaturschema einer RT

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in min
Inkubation	25	10
Reverse Transkription	48	30
Inaktivierung der Transkriptase	95	5

Die Inkubation bei 25°C diente der Anlagerung der *Random Hexamer Primer* an die RNA. Im zweiten Schritt bei 48°C wurde die Reverse Transkriptase aktiv und synthetisierte die komplementäre DNA. Der letzte Schritt diente der Inaktivierung der Reversen Transkriptase. Die synthetisierte cDNA wurde bei –20°C gelagert.

2.2.6 Real-time PCR (*TaqMan*[®]-PCR)

Eine konventionelle Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), wie sie von Mullis und Saiki [94] beschrieben wurde, dient der Amplifizierung von DNA. Wird cDNA amplifiziert, spricht man von einer RT-PCR (reversen Transkriptions-PCR).

Für die PCR werden Oligonukleotid-forward- und reverse-Primer benötigt, die an den DNA-Strang binden und den zu amplifizierenden Bereich eingrenzen. Als katalysierende Polymerase wird bei einer PCR meistens die Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet. Diese Polymerase hat den Vorteil, aufgrund ihrer Thermostabilität im ersten Schritt einer PCR die Denaturierung der DNA zu überstehen. Nach der Denaturierung liegt die DNA als Einzelstrang vor. Im nächsten Schritt kommt es zur Anlagerung der Primer (Annealing). Darauf folgt die Synthese der DNA durch die Taq-Polymerase. Denaturierung, Annealing und DNA-Synthese werden in einer PCR zyklisch wiederholt. Eine PCR besitzt eine sigmoidale Kinetik. Im linearen Bereich führt jeder erneute Zyklus zu einer Verdopplung der DNA. Im Plateaubereich ist die abnehmende Konzentration an Oligonukleotiden (dNTPs) der limitierende Faktor. Es kommt nicht mehr zur Verdopplung der DNA.

Mit einer konventionellen PCR kann ein Fragment amplifiziert werden. Bei einer semi-quantitativen PCR kann die Ausgangskopienzahl des Fragmentes bestimmt werden. Es

hierfür müssen zahlreiche Optimierungsschritte unternommen werden, um zum Beispiel die Zyklenanzahl zu bestimmen, bei der die Proben im linearen Bereich der PCR liegen. Des Weiteren muss das PCR-Produkt noch am Ende der PCR mit einem Agarosegel aufgetrennt werden, um eine Quantifizierung vornehmen zu können.

Ein *TaqMan*[®]-PCR läuft prinzipiell wie eine konventionelle PCR ab. Neben den Oligonukleotid-forward- und reverse-Primer wird in der *TaqMan*[®]-PCR noch eine Sonde (engl. Probe) verwendet, die aus einem kurzen DNA-Fragment besteht, das zwischen den Primern an den DNA-Strang bindet. Die Sonde hat eine 10°C höhere Annealingtemperatur (Anlagerungstemperatur) als die Primer. Sie hat an ihrem 5'Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff. Bei ABCG2 und MRP5 liegt am 5'Ende das Fluorochrom FAM, und bei β -Actin, 18S, GAPDH und β_2 -mikrogloblin das Fluorochrom VIC. Am 3'Ende liegt bei jeder Sonde der Quencher TAMARA (to quench – unterdrücken).

Tabelle 2.3 Daten der verwendeten Farbstoffe (R=Reporter, P=passiver Referenzfarbstoff, Q=Quencher)

Farbstoff	Chemische Bezeichnung	Typ	Anregung [nm]	Emission[nm]
FAM	6-Carboxy-Fluorescein	R	488	518
VIC	nicht bekannt	R	488	nicht bekannt
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin	P	488	602
TAMARA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin	Q	488	582

Während der PCR im *TaqMan*[®] 7700 *Sequence Detector* von *ABI Prism*TM wird jeder der 96 Reaktionsansätze, die sich auf einer *TaqMan*[®] Platte befinden, mit Licht der Wellenlänge 488 nm bestrahlt. Durch die räumliche Nähe von Reporter und Quencher kommt es zu einem Fluoreszenz-Energietransfer (FET), das Signal wird unterdrückt. Nach Hybridisierung der Primer und der Sonde an den DNA-Strang wird die Sonde in der Extensionsphase von der Taq-Polymerase in eine y-förmige Sekundärstruktur geformt. Die *AmpliAq Gold DNA Polymerase*, die in der *TaqMan*[®] PCR verwendet wird, besitzt wie jede Taq-Polymerase eine Exonukleaseaktivität. Sie wird aktiviert und schneidet die

Sonde. Reporter und Quencher werden räumlich von einander getrennt, ein Signal wird registriert. Es entspricht genau einer Kopie und ist spezifisch für die Sequenz, die durch die Sonde kodiert wird. Bei nicht hundertprozentiger Übereinstimmung der Basen der Sonde und des DNA-Strangs verdrängt die Taq-Polymerase die Sonde vom Strang, bevor diese von der *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* geschnitten wird. Es wird kein Fluoreszenzsignal emittiert.

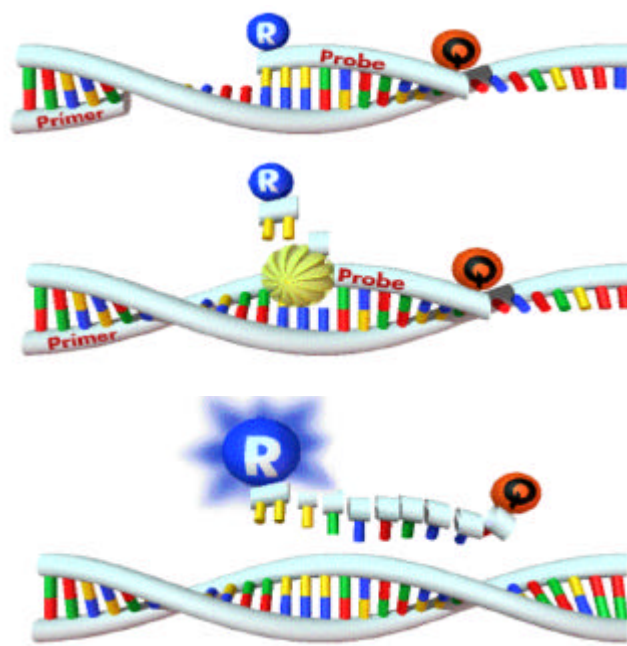


Abbildung 2.1 Schematischer Ablauf einer TaqMan® PCR [89], Probe - Sonde

Das Fluoreszenzsignal wird im *ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection System (SDS)* von *Applied Biosystems* fortlaufend für 96 Proben gleichzeitig während der Zyklen registriert, seine Intensität ist ein Maß für die Anzahl der synthetisierten DNA. Man spricht von einer PCR mit Messwerterfassung in „Echtzeit“ (engl. „real-time“).

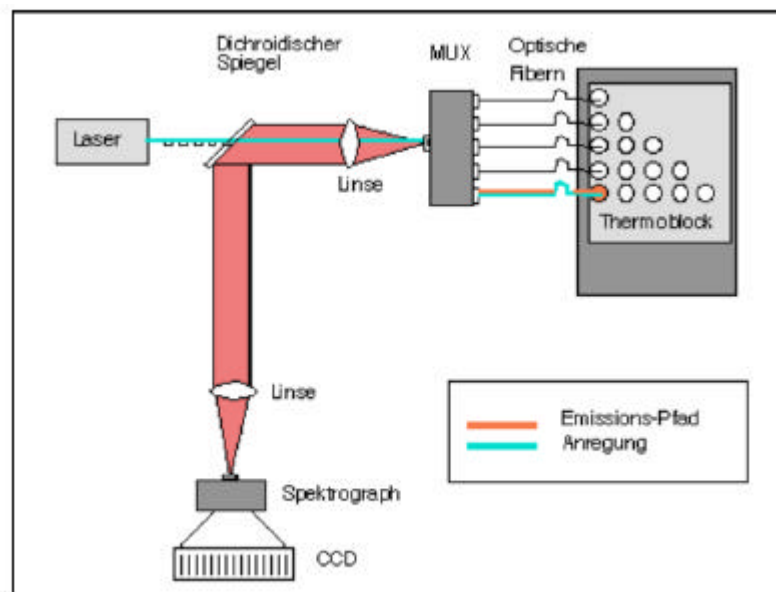


Abbildung 2.2 Schematischer Aufbau der Signaldetektion im ABI PRISM® 7700 SDS [95], (CCD – Kamera, MUX – Multiplexer)

Die Software *ABI PRISM^â Sequence Detection Software (Vers. 1.6)* zur Auswertung der registrierten Daten gibt einen sogenannten *Amplification Plot* (Amplifikationsaufzeichnung) aus (siehe Abbildung 2.3). In ihm wird das registrierte Fluoreszenzsignal jeder Probe in Abhängigkeit vom Zyklus als ΔR_n aufgetragen. R_n (normalisiertes Reportersignal) ist der Quotient der Emissionsintensität des Reporterfarbstoffes dividiert durch die Emissionsintensität des passiven Referenzfarbstoffes (ROX), der jedem Reaktionsansatz zu gesetzt ist. ΔR_n ist die Differenz aus der Hintergrundaktivität, die während der ersten Zyklen einer PCR registriert wird, und dem R_n -Wert eines jeden Zyklus.

Um einen *Amplification Plot* auswerten zu können, muss die Aktivität definiert werden, bei der die ΔR_n -Werte für alle Proben im linearen Bereich liegen. Diese Schwelle wird als *Threshold* bezeichnet und sollte eine Zehnerpotenz über der Hintergrundaktivität (Baseline) liegen. Mit diesem *Threshold* kann für jede Probe ein Schwellenwert (*Threshold Cycle [C_T]*) bestimmt werden. Da für die PCR im linearen Bereich eine Effizienz von annähernd 100% angenommen wird, bedeutet die Zunahme des C_T -Wertes um eins eine Verdopplung der Kopienzahl.

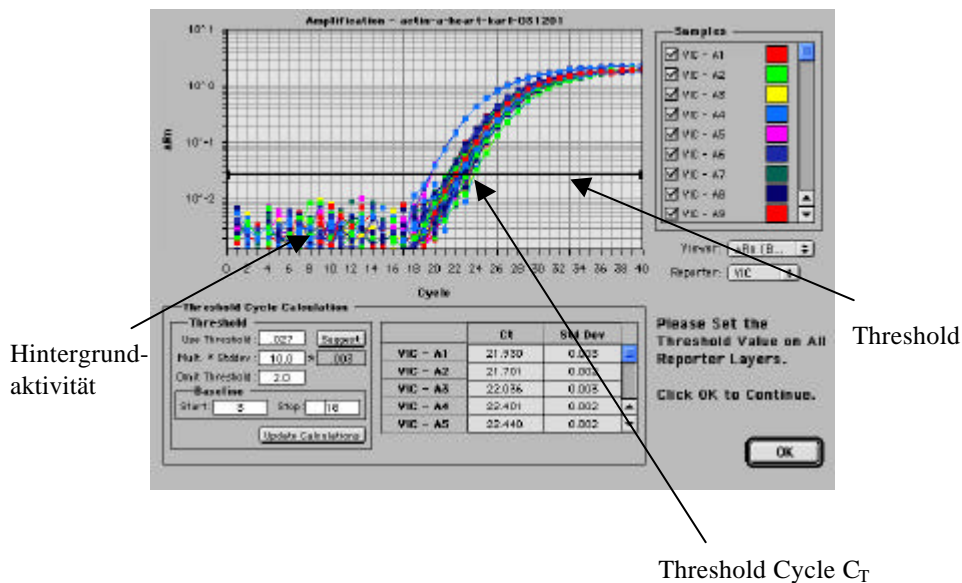


Abbildung 2.3 Beispiel für einen Amplification Plot

2.2.7 Auswertung der $TaqMan^{\hat{a}}$ -Ergebnisse

Der $TaqMan^{\hat{a}}$ bestimmt für jede Probe einen C_T -Wert. Um von diesem Wert ausgehend Aussagen über die relative oder absolute Kopienzahl machen zu können, gibt es zwei Methoden, die Standardkurvenmethode oder die **DDC_T-Methode**. Im Rahmen dieser Arbeit wurden beide Methoden angewendet.

Bei der Standardkurvenmethode wird bei jedem $TaqMan^{\hat{a}}$ -Lauf eine Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen eines Standards des zu messenden Zielgens mitgeführt. Hierzu muss ein Standard gewonnen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden das *ABCG2*- und das *MRP5-TaqMan^â-PCR-Produkt* kloniert, isoliert und so als Standard eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.8).

Wird vor der Messung im $TaqMan^{\hat{a}}$ in der Auswertungssoftware *ABI PRISM^â Sequence Detection Software (Vers. 1.6)* die Standardreihe definiert, gibt der $TaqMan^{\hat{a}}$ am Ende der Messung eine Kopienzahl für das Zielgen in jeder Probe aus. Diese absoluten Kopienzahlen sind untereinander noch nicht vergleichbar. Sie müssen erst auf ein Housekeeping-Gen normalisiert werden, um so eventuelle Unterschiede in der

eingesetzten cDNA-Menge auszuschließen. Housekeeping-Gene sind Gene, bei denen man davon ausgeht, dass sie in menschlichen Organen unterschiedlicher Individuen in gleicher Höhe exprimiert werden und nicht durch körpereigene oder körperfremde Prozesse oder Stoffe in ihrer Expression verändert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Housekeeping-Gene 18S, β -Actin und GAPDH bestimmt [96]. Steht eine Referenzgruppe, wie bei dieser Arbeit die fünf Proben aus herzgesundem Myokard (N1-5), zur Verfügung, so können alle Werte auf diese Gruppe bezogen werden, und es lässt sich eine Aussage über eine Zunahme oder Abnahme der Expression eines bestimmten Gens zum Beispiel bei bestimmten Erkrankungen machen.

Nach der *DDC_T-Methode* lässt sich mathematisch die Anzahl der amplifizierten Moleküle des Zielgens in einer PCR beim Erreichen des C_T-Wertes für ein Zielgen wie folgt beschreiben:

$$(1) \quad \mathbf{X_T = X_0 * (1 + E_X)^{C_{T,X}} = konst. (K)}$$

X_T = Anzahl der amplifizierten Moleküle des Zielgens

X_0 = Startkopienzahl des Zielgens

E_X = Effizienz der PCR des Zielgens

$C_{T,X}$ = Thresholdwert des Zielgens

Die Formel für die Referenzgene lautet:

$$(2) \quad \mathbf{R_T = R_0 * (1 + E_R)^{C_{T,R}} = konst. (K)}$$

R_T = Anzahl der amplifizierten Moleküle des Referenzgens

R_0 = Startkopienzahl des Referenzgens

E_R = Effizienz der PCR des Referenzgens

$C_{T,R}$ = Thresholdwert des Referenzgens

Dividiert man beide Gleichungen durch einander, ergibt sich:

$$(3) \quad \frac{X_T}{R_T} = \frac{X_0 * (1+E_X)^{C_{T,X}}}{R_0 * (1+E_R)^{C_{T,R}}} = \text{konst. (K)}$$

Setzt man die Effizienzen beider PCRs als gleich voraus und bezieht jede Probe noch auf einen Kalibrator (z.B. Nullstundenwert oder gesunde Probanden) ergibt sich folgende Formel:

$$(4) \quad X_N = K * (1 + E)^{-\Delta C_T}$$

$$\begin{aligned} X_N &= X_0 / R_0 \\ \Delta C_T &= C_{T,X} - C_{T,R} \\ E &= \text{Effizienz} \end{aligned}$$

Wenn man jeden X_N -Wert durch den X_N -Wert eines Kalibrators (z.B. Nullstundenwert oder Material von gesunden Probanden) dividiert, ergibt sich folgende Formel:

$$(5) \quad X_{N,X} / X_{N,kal} = (1 + E)^{-\Delta \Delta C_T}$$

$$\begin{aligned} \Delta \Delta C_T &= \Delta C_{T,X} - C_{T,kal} \\ kal &= \text{Kalibrator} \end{aligned}$$

Die Konzentration des Zielgens normalisiert auf eine endogene Referenz (Housekeeping-Gen) und in Relation zu einem Kalibrator gesetzt, lässt sich näherungsweise wie folgt berechnen:

$$(6) \quad X_{N,kal} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Vorraussetzung ist, dass ein Housekeeping-Gen bekannt ist, dessen *TaqMan*^â-PCR mit annähernd der gleichen Effizienz abläuft wie die PCR der Zielsequenz. Um dies zu testen, wird eine Verdünnungsreihe eines Gewebes, in dem die Zielsequenz in hoher Expression

vorhanden ist, auf das Zielgen und die Housekeeping-Gene im *TaqMan*[®] getestet. Die ΔC_T -Werte (C_T -Werte des Housekeeping-Gens subtrahiert vom C_T -Werte des Zielgens) werden gegen den Zehnerlogarithmus der eingesetzten cDNA Konzentration aufgetragen. Die Steigung der Regressionsgeraden sollte kleiner 0,1 seien, da dann annähernd gleiche Effizienzen der *TaqMan*[®]-PCR des Housekeeping-Gens und des Zielgens vorliegen..

2.2.8 Primer- und Sonden-Synthese

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit war ein Primerpaar benötigt, das exonüberspannend ist, um Verunreinigungen mit genomischer DNA nicht zu amplifizieren, sondern nur die isolierte RNA bzw. cDNA. Zur Primer- und Sondensynthese wurden mit *Blast 2 Sequences* im Internet beim *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) zunächst die Exon- und Introngrenzen analysiert. Folgende mRNA-Sequenzen wurden zu Grunde gelegt, für ABCG2 (AN-Nr.: AF098951) auf Chromosom 4q22 (AN-Nr.: AC084732) und MRP5 (AN-Nr.: AF146074) auf Chromosom 3q27 (AN-Nr.: NT_022676) [24]. Mit dem Programm *Primer Express* wurden neue Primer und Sonden entworfen unter Verwendung der mRNA Sequenzen für ABCG2 und MRP5.

Zur Kontrolle der einwandfreien Funktion der Primer wurde auch genomische DNA auf die beiden Gene hin getestet und das PCR-Produkt auf ein 3%iges Agarosegel aufgetragen.

2.2.9 Messung der Proben

Es wurde für den PCR-Ansatz zur Messung der Herzproben auf ABCG2 und MRP5 der *Universal PCR Master Mix (UMM)* von *Applied Biosystems* verwendet und die zu analysierenden Gewebeproben nach folgendem Schema pipettiert (Tabelle 2.4).

Es wurden für die Messung der Proben D1-5, I1-5 und N1-5 auf ABCG2 und MRP5 je 8ng cDNA in die PCR eingesetzt und für die Messung der Proben 1-52 je 10ng cDNA. Die Proben wurden in Dreifachbestimmung gemessen.

Tabelle 2.4 TaqMan® PCR Pipettierschema für ABCG2 und MRP5

Reagenz	Volumen in μl	Endkonzentration
reverse Primer 3 μM	2,5	0,3 μM
forward Primer 3 μM	2,5	0,3 μM
2x Universal Master Mix	12,5	1x
FAM-Sonde 2 μM	2,5	0,2 μM
Aqua dest.	3	-
cDNA	2	8 oder 10 ng/ μl
Gesamtvolumen	25	-

Zur Optimierung der *TaqMan*[®] PCR wurden nach dem Protokoll von *Applied Biosystems* [95] eine Primermatrix und eine Sondenmatrix pipettiert und im *TaqMan*[®] gemessen. Für die beiden Zielgene ABCG2 und MRP5 ergaben sich nach Auswertung laut Protokoll die optimalen Bedingungen für die PCR bei forward- und reverse-Primerkonzentrationen von 3 μM und Sondenkonzentrationen von 2 μM .

Zur Messung der Proben auf die Housekeeping-Gene 18S, β -Actin und GAPDH wurde der zum jeweiligen Housekeeping-Gen gehörende Primer- und Sonden-Master-Mix sowie der *Universal PCR Master Mix (UMM)* verwendet. Es wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 2.5 TaqMan® PCR Pipettierschema für die Housekeeping-Gene

Reagenz	Volumen in μl
2x Universal Master Mix	12,5
20x Primer-Sonden MM	1,25
Aqua dest.	9,25
cDNA	2
Gesamtvolumen	25

2.2.10 Standardklonierung

Um einen Standard herzustellen, muss das PCR-Produkt des Zielgens in einen Vektor kloniert werden. Als Vektor wurde das Plasmid *pGEM^â-T Easy* von *Promega* verwendet. Plasmide sind zirkuläre doppelsträngige DNA Strukturen mit einer Länge von 1 bis 20 kb, in die DNA-Fragmente eingefügt werden können. Der *pGEM^â-T Easy* Vektor ist in linearisierter Form kommerziell erhältlich. Er ist 3015 bp lang. Seine „multiple cloning site“ (Klonierungsregion) trägt an ihren 3`-Enden T-Überhänge und wird von den Promotoren für die RNA-Polymerasen SP6 und T7 begrenzt. Innerhalb der „multiple cloning site“ liegt das *lacZ*-Gen für die *β*-Galaktosidase. Es ermöglicht die weiß/blau Selektion der rekombinaten Bakterienkolonien. Durch das Vorhandensein eines Ampicillinresistenz-Gens ist selektives Bakterienwachstum möglich.

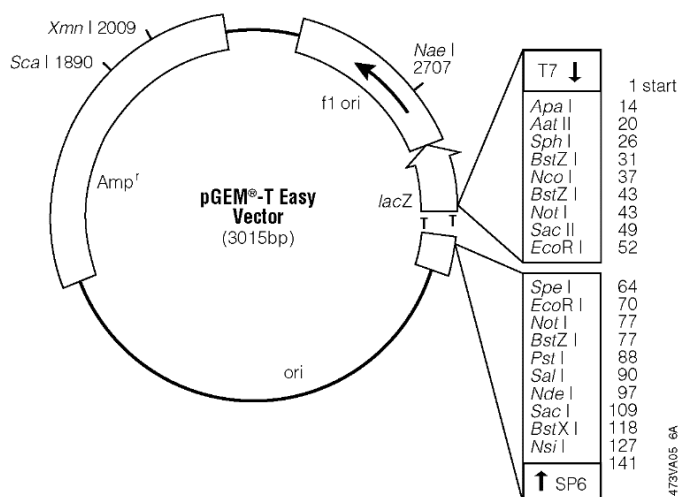


Abbildung 2.4 Struktur des pGEM[®]-T Easy Vektors

Vor der Klonierung muss ein PCR-Produkt des Zielgens amplifiziert werden. Dies geschah mit einer *TaqMan^â Core PCR* nach dem Protokoll der *TaqMan^â So Easy Rechentabellen* von *Applied Biosystems*. Es wurden die Reagenzien von *Applied Biosystems* verwendet. Als forward- und reverse-Primer wurden die jeweiligen Primer für ABCG2 und MRP5 eingesetzt.

Tabelle 2.6 TaqMan® Core PCR Pipettierschema

Reagenz	Volumen in μl
TaqMan Buffer A 10x	5,00
dATP 200 μM	1,00
dCTP 200 μM	1,00
dGTP 200 μM	1,00
dUTP 400 μM	1,00
forward Primer 300nM	5,00
reverse Primer 300nM	5,00
MgCl ₂ 5mM	5,00
AmpliTaq Gold 0.025U/ μl	0,25
cDNA	5,00
Aqua dest.	13,75
Gesamtvolumen	50,00

Das entstandene PCR-Produkt wurde nach der Standardanleitung zur Isolation von PCR-DNA aus Lösungen (*Procedure A: Purification of DNA from Solution*) des *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kits* von *amersham pharmacia biotech* isoliert.

Nach der Isolation wurde das aufgereinigte PCR-Produkt auf ein 3%iges Agarosegel aufgetragen.

Im nächsten Schritt wurde für 12 bis 16 Stunden bei 4°C im Kühlschrank die Ligation des PCR-Produktes in den *pGEM^ä-T Easy Vektor* durchgeführt. Hierzu wurde ein Ligationsansatz mit folgenden Reagenzien hergestellt:

Tabelle 2.7 Ligationsansatz

Reagenz	Volumen in μl
Rapid Ligation Buffer 2x	5,00
PGEM [®] -T Easy Vektor (50ng)	1,00
PCR Produkt	2,00
T4 DNA Ligase	1,00
Aqua dest.	1,00
Gesamtvolumen	10,00

2 µl des Ligationsansatzes wurden zu 50 µl aufgetauter, ultrakompetenter *Escherichia coli XL-Gold Bakterien* gegeben und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Dieser Transformationsansatz wurde im Wasserbad einer Temperatur von 42°C für 90 Sekunden ausgesetzt. Nach einer weiteren Inkubation für 2 Minuten auf Eis wurden 950 µl LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz für 90 Minuten bei 37°C und 150 rpm geschüttelt.

Von dem Transformationsansatz wurden 200µl auf einem LB-Ampicillin-Agar ausplattiert, der 30 Minuten vorher mit 35µl X-Gal (50mg/ml) und 20µl 100mM IPTG beimpft worden war. Die Agarplatte wurde für 12 bis 16 Stunden bei 37°C im Brutschrank bebrühtet. Es wuchsen weiße und blaue Bakterienkolonien. In den weißen Kolonien war es zu einer Insertion des Zielgens in den Vektor und einer Transformation in die *E.coli XL-Gold Bakterien* gekommen. Das lacZ-Gen wurden zerschnitten und keine β-Galaktosidase mehr synthetisiert, die X-Gal und IPTG in einen blauen Farbstoff zerlegt hätte. Die weißen Kolonien wurden mit einer 100 µl Pipettenspitze gepickt und in einem Falcontube mit 2 ml 1x LB-Medium und 2µl Ampicillin erneut für 12 bis 16 Stunden bei 37°C und 250 rpm inkubiert.

Die DNA aus den E.coli Bakterien der weißen Kolonien wurde nach der Standardanleitung für die Aufreinigung von DNA aus Bakterienkulturen (*Procedure A: Purification from 1-1.5ml of Culture*) des *GFXTM Micro Plasmid Prep Kit* von *amersham pharmacia biotech* durchgeführt.

In einem letzten Schritt wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt, um das Zielgen aus dem Vektor wieder heraus zu schneiden. Hierzu wurde ein Restriktionsansatz für 3 Stunden bei 37°C in ein Wasserbad gestellt:

Tabelle 2.8 Restriktionsansatz

Reagenz	Volumen in µl
Eco R1 Restriktionsenzym	0,50
10x Buffer für Eco R1	2,20
Aqua dest.	8,30
DNA aus weißen E.coli Kolonien	10,00
Gesamtvolumen	20,00

Restriktionsenzyme erlauben das Herausschneiden von DNA-Fragmenten definierter Länge. Es handelt sich um bakterielle Desoxyribonukleasen die doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen schneiden. Es entstehen kohäsive (sticky ends) oder glatte Enden (blunt ends).

Tabelle 2.9 Restriktionsenzym

Name	Herkunft	Erkennungssequenz mit Schnittstelle	Art der entstehenden Enden
EcoR I	E.coli RY 13	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTTAA↑G...5'	sticky ends

Nach dem Restriktionsverdau wurde ein 3%iges Agarosegel von 5 µl Restriktionsverdau und 3 µl 10xLaufpuffer durchgeführt, um zu zeigen, dass Zielgene mit der richtigen Länge an Basenpaare kloniert wurden. Es wurde eine photometrische Konzentrationsmessung des Restriktionsverdau durchgeführt. Für beide Standards von ABCG2 und MRP5 wurde je eine Verdünnungsreihe von 10^8 Kopien bis 10^2 Kopien hergestellt und bei -20°C gelagert.

2.2.11 Statistische Auswertung

Die mittels *ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection System (SDS)* von *Applied Biosystems* registrierten Daten wurden nach der $\Delta\Delta C_T$ - und der Standardkurvenmethode ausgewertet. Die Berechnungen und graphischen Darstellungen erfolgten mit den Programmen *Excel* von *Microsoft* und *SPSS*.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels ungepaartem t-Test (zweiseitig).

2.2.12 Immunhistochemie

Mit der Immunhistochemie können mit spezifischen Antikörpern Proteine und andere Substanzen in Gewebeschnitten lokalisiert und sichtbar gemacht werden.

Für die Immunhistochemie wurden je ein 3 x 3 x 3 mm große Gewebestück sowohl der Proben N1-5, D1-5 und I1-5 sowie der Proben 1-52 für 12 Stunden in 4% Formalin fixiert

und anschließen in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden mit Hilfe des *Ventana NexES IHC Staining System* Paraffinschnitte von 2 µm Dicke angefertigt und auf Objektträgern aufgezogen. Die Schnitte trockneten über Nacht bei 60°C aus. Xylol und Ethanol wurden zur Entparaffinierung verwendet. Zugabe von 10 µM Citratpuffer (pH 6,1) für 3 min bei 96-99°C diente zur Antigendemaskierung. Mit frisch hergestellter 3%iger H₂O₂-Lösung und einer Einwirkzeit von 3 min wurde die endogene Peroxidase blockiert. Es folgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper. Zur Markierung von ABCG2 wurde der monoklonale Anti-ABCG2-Antikörper *BXP-21* (Verdünnung 1:50) verwendet. *BXP-21* ist ein monoklonaler Mausantikörper gegen 126 Aminosäuren des ABCG2 Peptids [20]. Er wurde von der Firma *Alexis* käuflich erworben. Für den Nachweis von MRP5 wurde der Anti-MRP5-Antikörper *AMF* (Verdünnung 1:150) verwendet. *AMF* ist ein monoklonaler Kaninchenantikörper gegen 14 Aminosäuren am carboxy-terminalen Ende von MRP5 (AMFAAAENKVAVKG) [47]. Nach einem Spülschritt mit TRIS-HCl-Puffer (pH 7,4) für 5 min folgte die Detektion mit dem *LSAB[®]-HRP-Detektionssystem* der Firma *DAKO* (*LSAB^â=labelled (markiert) streptavidin-biotin, HRP=horseradish-peroxidase (Meerrettich)*). Diaminobenzidin (DAB) wurde als Chromogen verwendet.

Neben den Antikörpern *BXP-21* und *AMF* wurden monoklonale Antikörper gegen Aktin der glatten Muskulatur, gegen Desmin und gegen CD34 mit den Verdünnungen 1:25, 1:25 und 1:40 verwendet. Mit Anti-Aktin- und Anti-Desmin-Antikörpern können glatte Muskelzellen und Kardiomyozyten und mit Anti-CD34-Antikörpern können Endothelzellen markiert werden.

Die technischen Arbeiten im Zusammenhang mit dem Nachweis von ABCG2 wurden mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr. Vogelgesang am Institut für Pathologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald und Frau Dr. Kunert-Keil am pharmakologischen Institut durchgeführt. Für den Nachweis von MRP5 mit Hilfe der Immunhistochemie zeichnet neben dem Institut für Pathologie Frau Dr. Jedlitschky am pharmakologischen Institut verantwortlich.

2.2.13 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie die Immunhistochemie. Auch bei dieser Methode können mit spezifischen Antikörpern Proteine und andere Substanzen in Gewebeschnitten lokalisiert und sichtbar gemacht werden. Jedoch wird der primäre Antikörper mit einem sekundären Antikörper detektiert, der Fluoreszenz-markiert ist.

Die Immunfluoreszenz wurde an Paraffinschnitten humaner Herzohrproben zum Nachweis von ABCG2 durchgeführt. Nach Entparaffinierung und Antigendemaskierung mit 10 μ M Citratpuffer (pH 6,1) für 3 min bei 96-99°C (siehe Kapitel 2.2.10) folgten Waschschrte mit 1x PBS für 2x5 min. Über Nacht wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper BXP-21 (Verdünnung 1:20) bei 4°C inkubiert. Es folgten erneut zwei Waschschrte mit 1x PBS für 2x5 min. Als sekundärer immunfluoreszenz-markierter Antikörper diente *Alexa 488^â goat anti-mouse IgG 2a* (Ziegen Anti-Maus IgG) (Verdünnung 1:500). Die Schnitte wurden unter einem konfokalen Lasermikroskop ausgewertet und photographiert. Die aufgenommen schwarz-weiß Bilder wurden zum besseren Kontrast in Grün-Ton Bilder konvertiert.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Dissertation wurde humanes Herzgewebe untersucht. Es standen 15 Proben linksventrikulären Myokardgewebes zur Verfügung, die bei Herztransplantationen gewonnen wurden. Bei 5 Proben (D1-5) lag eine dilatative Kardiomyopathie (DCM, dilated cardiomyopathy) vor, bei 5 Proben (I1-5) ein ischämische Kardiomyopathie (ICM, ischemic cardiomyopathy) und 5 Proben sind von herzgesunden Personen (N1-5). Die Patienten mit ICM bzw. DCM wurden medikamentös mit Digitalis, Nitraten, Diuretika, und ACE-Hemmern behandelt.

Des weiteren standen 52 Proben von Herzgewebe zur Verfügung, die im Rahmen von Bypassoperationen aus dem rechten Herzhohr entnommen wurden (1-52). Die Patienten unterzogen sich dieser Untersuchung wegen 2- bzw. 3-Gefäßerkrankungen der koronaren Herzgefäße. Zu den einzelnen Proben gab es Angaben zum Geschlecht und Alter, zur Körpergröße, zu Begleiterkrankungen, zum Blutdruck, zur Medikamenteneinnahme und zu zahlreichen Laborparametern.

3.1 Isolation von RNA aus Herzgewebe

Zur Bestimmung der mRNA-Expression von ABCG2 und MRP5 in den Herzproben sind eine hohe Reinheit und Intaktheit der isolierten RNA Voraussetzung. Es wurden von den Proben denaturierte Formamidgele angefertigt. Diese Gele zeigten nur zwei für eukaryontische Zellen typische Banden der 18S und 28S rRNA.

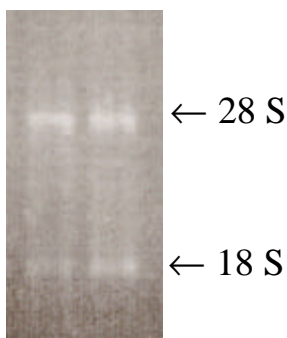


Abbildung 3.1 Denaturierendes Formamidgel zur Überprüfung der Integrität der isolierten RNA am Beispiel der Proben I1 und I2

3.2 Primer- und Sondendesign

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit war ein Primerpaar gewünscht, das exonüberspannend ist, um Verunreinigungen mit genomischer DNA nicht zu amplifizieren, sondern nur die isolierte RNA bzw. cDNA. Zur Primer- und Sondensynthese wurden mit *Blast 2 Sequences* im Internet beim *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html) zunächst die Exon- und Intronengrenzen analysiert. Folgende mRNA-Sequenzen wurden zu Grunde gelegt, für ABCG2 (AN-Nr.: AF098951) auf Chromosom 4q22 (AN-Nr.: AC084732) und MRP5 (AN-Nr.: AF146074) auf Chromosom 3q27 (AN-Nr.: NT_022676) [24]. Für ABCG2 wurden 16 Exons gefunden. Diese Anzahl stimmt mit der in der Literatur veröffentlichten Zahl überein [12]. Für MRP5 wurden 30 Exons bestimmt.

Mit dem Programm *Primer Express* wurden neue Primer und Sonden gesucht mit den mRNA-Sequenzen für ABCG2 und MRP5, bei denen darauf geachtet wurde, dass sie exonüberspannend sind. Folgende Sequenzen wurden gewählt:

ABCG2 forward Primer: TGAGGATGTTACCAAGTATTATATTTACCTGTA

ABCG2 reverse Primer: CCATGGAACTGGCTGAATAAGC

ABCG2 TaqMan^â Sonde: ATCTGCCTTTGGCTTCAATCCTAACATGAA

MRP5 forward Primer: CACCATCCACGCCTACAATAAA

MRP5 reverse Primer: CACCGCATCGCACACGTA

MRP5 TaqMan^â Sonde: GCTTGGTTGTCATCCAGCAGCTCCTG

Das PCR-Produkt der Primer und Sonde von ABCG2 ist 129bp und das der Primer und Sonde von MRP5 ist 105bp lang. Zur Kontrolle der einwandfreien Funktion der Primer wurde auch genomische DNA auf die beiden Gene hin getestet und das PCR-Produkt auf ein 3%iges Agarosegel aufgetragen.

Tabelle 3.1 verwendete Primer und Sonden

	forward Primer	reverse Primer	Sonde
Sequenz auf der mRNA von ABCG2	von 1680 bp bis 1712 bp	von 1787 bp bis 1808 bp	von 1721 bp bis 1750 bp
Exon auf der mRNA von ABCG2	12	12 / 13	12 / 13
Sequenz auf der mRNA von MRP5	von 3382 bp bis 3403 bp	von 3468 bp bis 3486 bp	von 3428 bp bis 3453 bp
Exon auf der mRNA von MRP5	22	23	23

Die Primer für ABCG2 wurden auf cDNA von humaner Plazenta getestet. Die Primer von MRP5 wurden auf cDNA humaner Leber getestet. Bei beiden Geweben handelt es sich um die Gewebe, in denen die jeweils höchsten Expressionen von ABCG2 und MRP5 beschrieben wurden. Die genomische DNA stammt aus Vollblut.

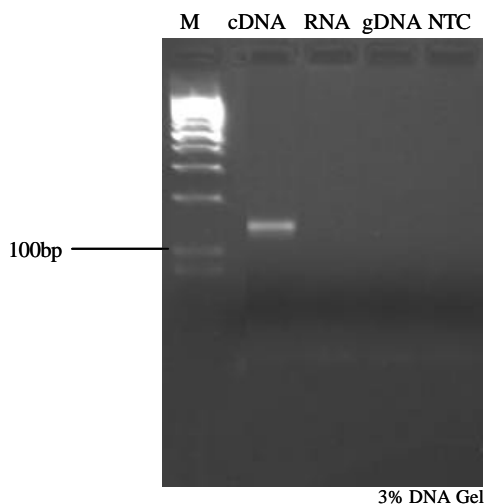


Abbildung 3.2 Gel zum Primertest von ABCG2; gDNA - genomische DNA, M - Marker, NTC - Nullwert (H₂O)

In dem Gel kommt das 129bp lange PCR-Produkt des Primerpaares für ABCG2 zur Darstellung. Es wurde mit einer *TaqMan*[®]PCR von cDNA humanen Plazentagewebes synthetisiert, wie sie auch später zur Messung der Proben verwendet wurde.

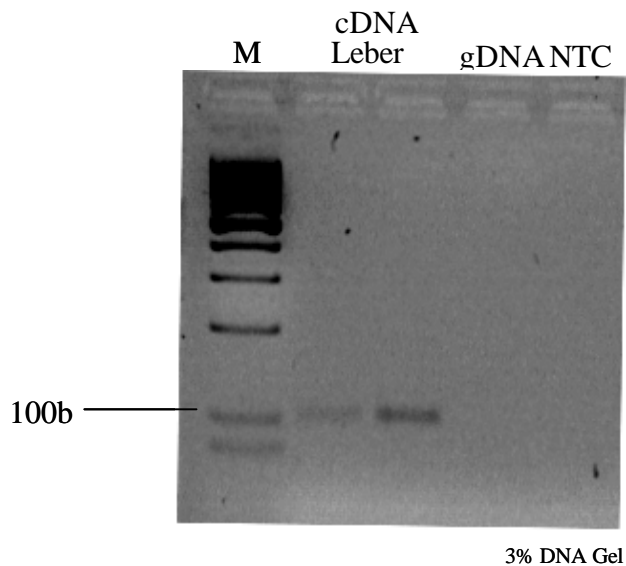


Abbildung 3.3 Gel zum Primertest von MRP5; gDNA - genomische DNA, M - Marker, NTC - Nullwert (H₂O)

Im zweiten Gel kommt ebenfalls das 105bp lange PCR-Produkt der Primer für MRP5 zur Darstellung. Es wurde mit einer *TaqMan*[®]PCR von cDNA humanen Lebergewebes synthetisiert, wie sie auch später zur Messung der Proben verwendet wurde.

Die beiden Gele zeigen sowohl für ABCG2 und MRP5, dass die jeweiligen Primerpaare und Sonden nur auf cDNA reagieren und bei genomischer DNA kein Amplifikat zeigen. Damit ist die Spezifität der Primer von ABCG2 und MRP5 für cDNA gezeigt.

3.3 Standardklonierung

Durch eine *TaqMan*[®] Core PCR gewonnene PCR-Produkte für ABCG2 und MRP5 wurden getrennt von einander in das Plasmid *pGEM*[®]-T Easy kloniert. Nach Ligation des Vektors in ultrakompetente *Escherichia coli* XL-Gold Bakterien und Anzuchtung

derselben wurde die DNA aus den *Escherichia coli* Bakterien isoliert und einem Restriktionsverdau unterzogen, um die jeweiligen PCR-Produkte von ABCG2 und MRP5 als hochkonzentrierten Standard zu gewinnen. Von den DNA-Isolaten wurden 3%ige Agarosegele angefertigt, um die jeweiligen PCR-Produkte nachzuweisen.

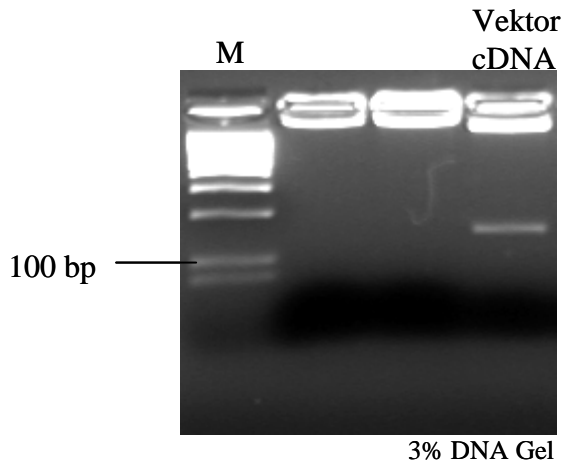


Abbildung 3.4 Gel des Standardklons für ABCG2

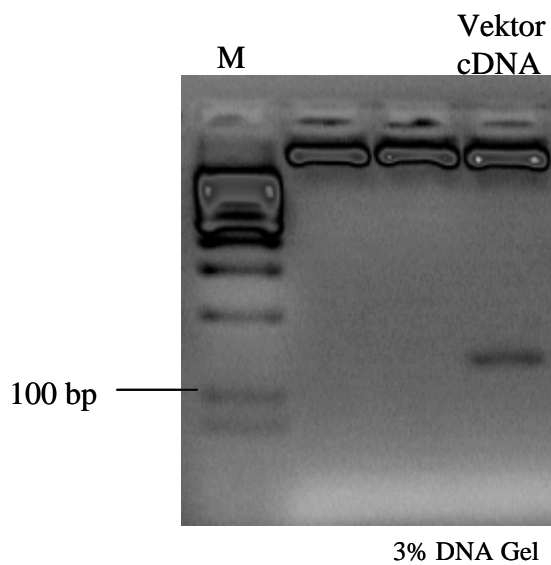


Abbildung 3.5 Gel des Standardklons für MRP5

Für ABCG2 und MRP5 kommen die PCR-Produkte mit den jeweiligen Längen von 129bp und 105bp zur Darstellung. Es handelt sich somit um die jeweiligen Standards für ABCG2 und MRP5.

3.4 Ermittlung der Quantifizierungsmethode für ABCG2 und MRP5

Für ABCG2 wurde β -Actin als Referenzgen bestimmt zur Berechnung der relativen Konzentration an ABCG2-Kopien im Herzgewebe nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Nach Messung von Verdünnungsreihen an humanem plazentarem Gewebe auf ABCG2 und β -Actin, GAPDH, 18S und β 2-mikroglobulin konnte gezeigt werden, dass nur β -Actin als Referenzgen geeignet ist. Es ergab sich eine geforderte Steigung von kleiner 0,1 in der logarithmischen Darstellung gegen ABCG2.

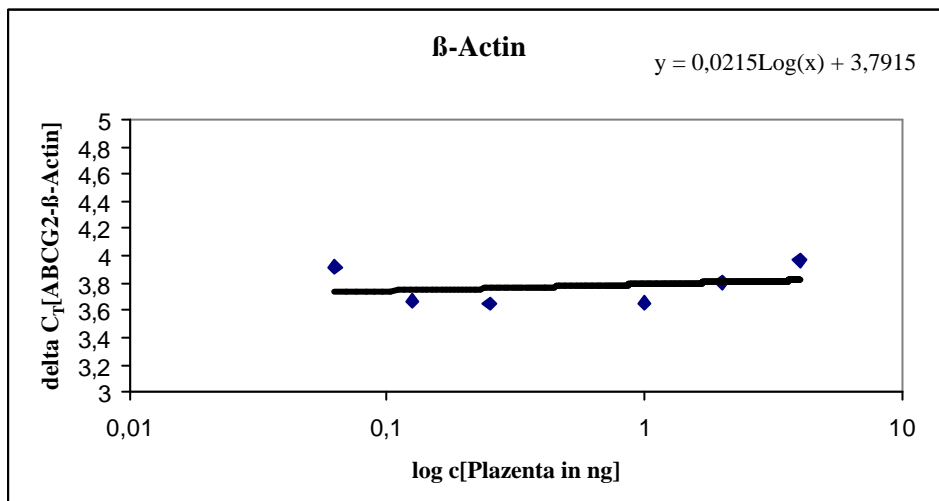


Abbildung 3.6 logarithmische Darstellung von DCT [CT(ABCG2)- CT(β -Actin)]

Die anderen Housekeeping-Gene zeigten alle in der logarithmischen Darstellung gegen ABCG2 Steigungen von $m > 0,1$ und damit unterschiedliche Effizienzen der PCR.

Für MRP5 konnte gezeigt werden, dass kein Housekeeping-Gen zur Nutzung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode geeignet ist. Alle Housekeeping-Gene haben in der logarithmischen Darstellung eine Steigung $m > 0,1$. Als Gewebe für die Verdünnungsreihe war humanes Lebergewebe verwendet worden.

Tabelle 3.2 Effizienztestung der Housekeeping-Gene gegen ABCG2

Gegen ABCG2 getestete Primer/ Sonden-Kombinationen	Steigung der Geraden	Quantifizierungsmethode	
		absolute	$\Delta\Delta-C_T$
β -Actin	0,0215	nein	ja
18S	-0,7993	ja	nein
GAPDH	0,0977	ja	nein
β 2-mikroglobulin	0,1903	nein	nein

Tabelle 3.3 Effizienztestung der Housekeeping-Gene gegen MRP5

Gegen MRP5 getestete Primer / Sonden-Kombinationen	Steigung der Gerade	Quantifizierungsmethode	
		absolute	$\Delta\Delta-C_T$
β -Actin	-0,4348	nein	nein
18S	-0,6363	ja	nein
GAPDH	-0,6987	ja	nein

3.5 Ergebnisse der *TaqMan*[®]-PCR

Die RNA aus den Proben D1-5, N1-5, I1-5 und 1-52 wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Darauf wurden die Herzproben auf ABCG2 bzw. MRP5 und die Housekeeping-Gene β -Actin, GAPDH und 18S inklusive der jeweiligen Standards mit dem *TaqMan*[®] gemessen. Für β -Actin lag im Labor kein Standard vor. Es wurde für β -Actin keine Standardkurve gemessen. Beispielhaft werden einige Amplification Plots gezeigt:

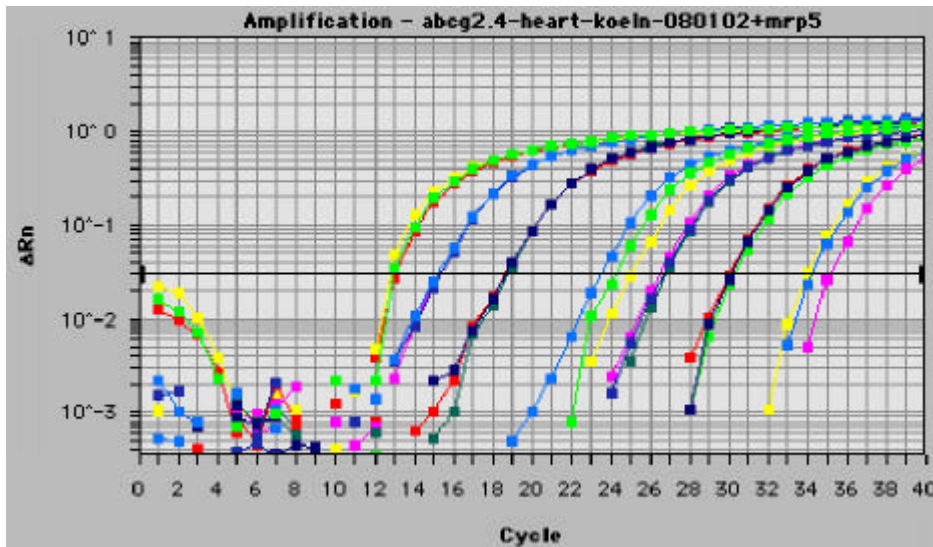


Abbildung 3.7 Amplification Plot der Standardkurve von ABCG2

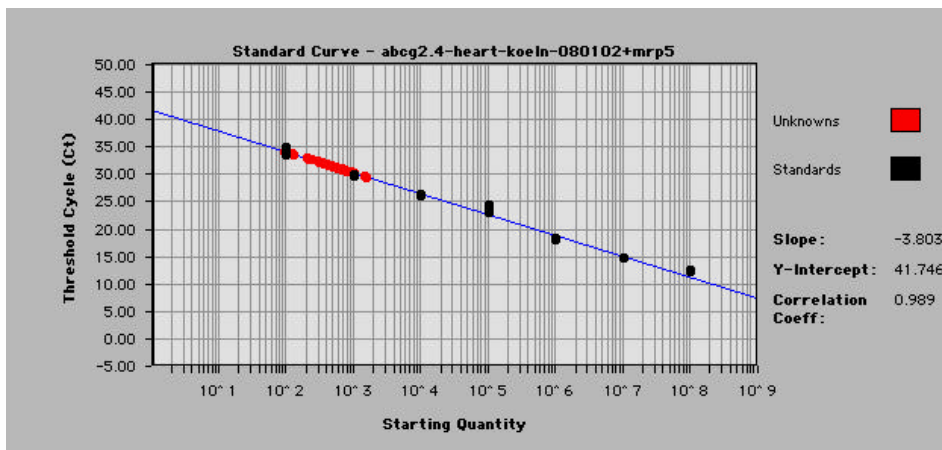


Abbildung 3.8 Standardkurve von ABCG2, unterschiedliche Konzentrationen an ABCG2-Standard-cDNA als schwarze Punkte dargestellt, Probenwerte als rote Punkte dargestellt

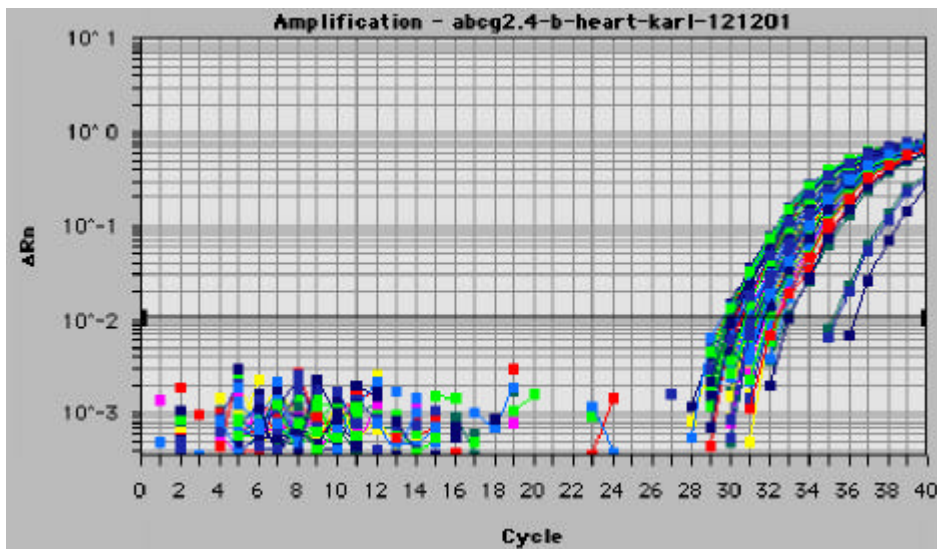


Abbildung 3.9 Amplification Plot der Proben 26-47 auf ABCG2

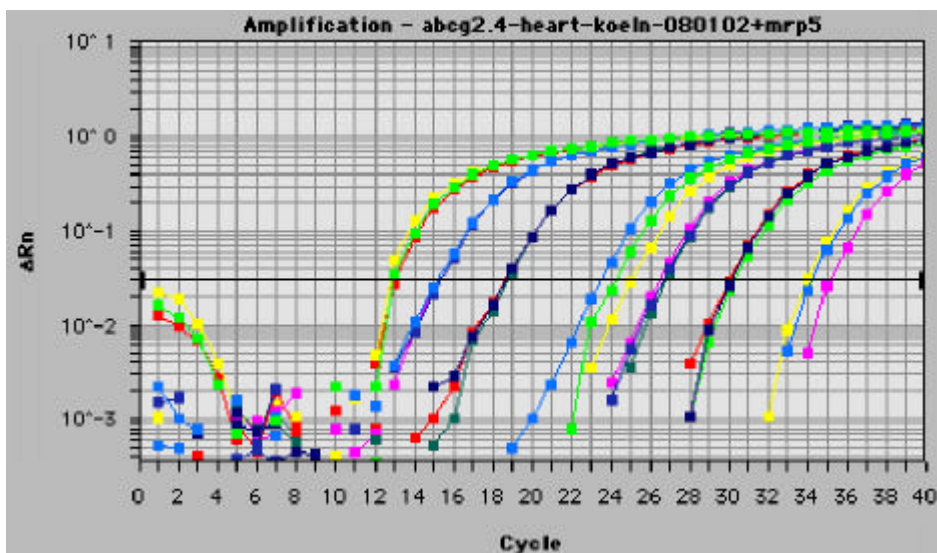


Abbildung 3.10 Amplification Plot der Standardkurve von MRP5

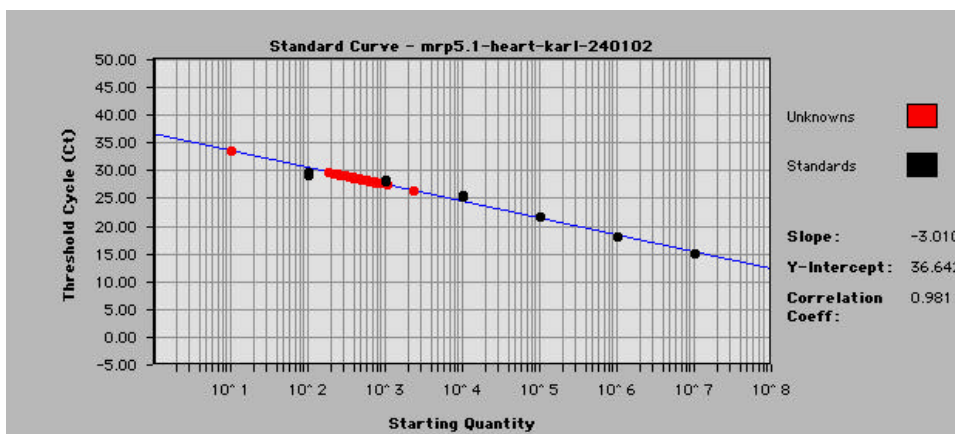


Abbildung 3.11 Standardkurve von MRP5 und Standardkurve unterschiedlicher Konzentrationen an MRP5 Standard cDNA als schwarze Punkte dargestellt, Probenwerte als rote Punkte dargestellt

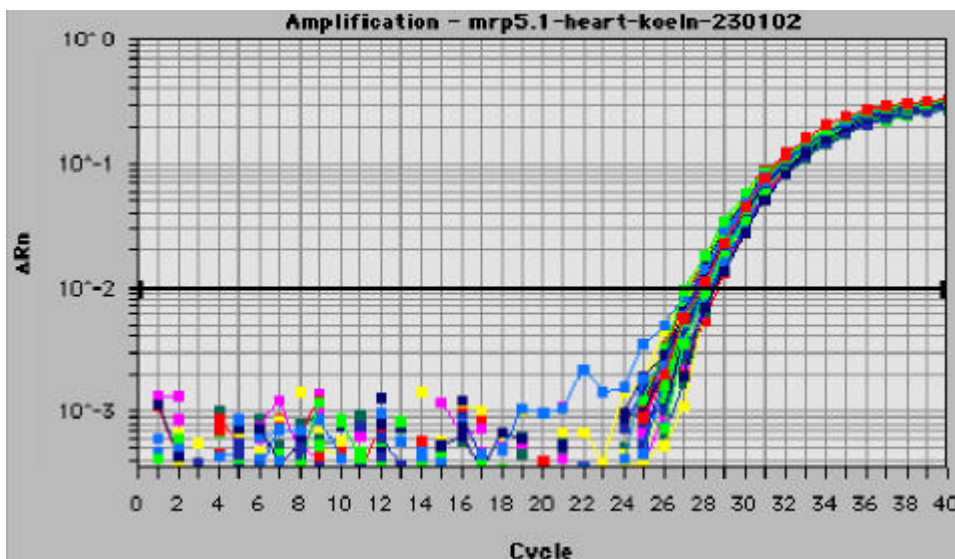


Abbildung 3.12 Amplification Plot von D1-5, N1-5, I1-5 auf MRP5

Die Amplification Plots der Proben D1-5, N1-5, I1-5 und 1-52 von den einzelnen Housekeeping-Genen β -Actin, GAPDH und 18S inklusive der jeweiligen Standards für GAPDH und 18S werden hier nicht gezeigt.

3.6 Statistische Auswertung

Die Proben N1-5, I1-5 und D1-5 wurden für ABCG2 sowohl nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode als auch nach der Standardkurvenmethode ausgewertet. Die Mittelwerte von I1-5 und D1-5

wurden auf den Mittelwert von N1-5 normalisiert, da die Proben N1-5 von herzgesunden Probanden stammten.

Bei der Standardkurvenmethode wurden absolute Kopienzahlen der Proben für ABCG2 im Verhältnis zu den Kopienzahlen der Proben auf 18S bestimmt. So konnte der Einsatz ungleichmäßiger Mengen an cDNA in die PCR in der Berechnung eliminiert werden.

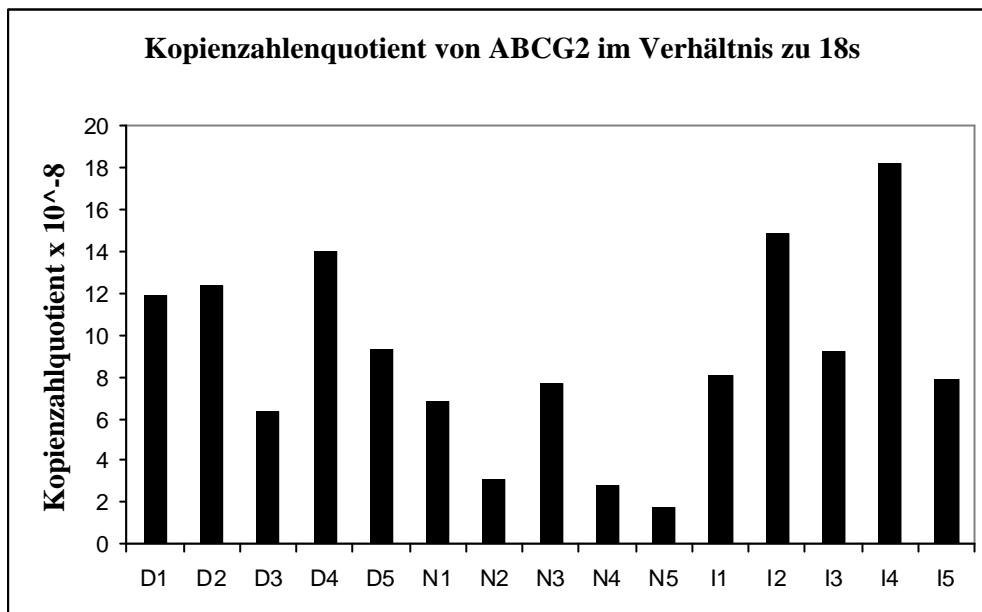


Abbildung 3.13 Kopienzahlenquotient von ABCG2 im Verhältnis zu 18S der Proben D1-5, N1-5 und I1-5

Die Ergebnisse zeigen, dass alle Proben ABCG2 enthalten. Die interindividuellen Unterschiede jedoch sehr stark ausgeprägt sind. Die Werte des Verhältnisses der Kopienzahlen von ABCG2 zu 18S reichen von $2 \cdot 10^{-8}$ bis $18 \cdot 10^{-8}$ mit einer Standardabweichung von $0,467 \cdot 10^{-8}$.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von ABCG2 in den Proben der Patienten mit dilatativer (D1-5) und ischämischer Kardiomyopathie (I1-5) im Verhältnis zu den herzgesunden Probanden deutlich erhöht ist.

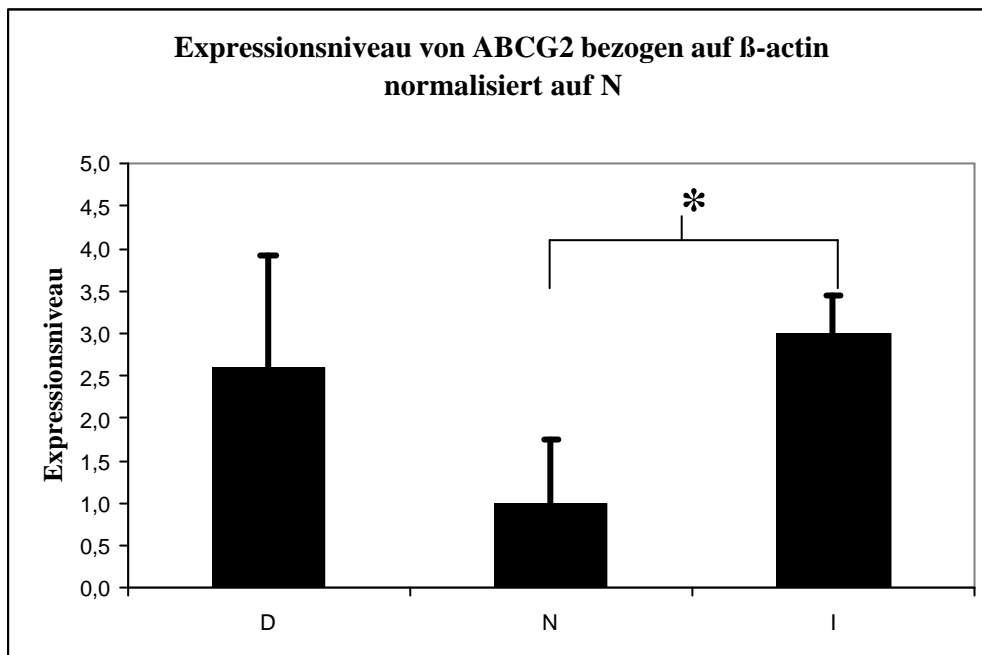


Abbildung 3.14 Expressionsniveau von ABCG2 bezogen auf β Actin normalisiert auf N der Proben D1-5, N1-5 und I1-5 nach der $\Delta\Delta$ CT-Methode, * = statistisch signifikant

Nach der $\Delta\Delta$ C_T-Methode ist die Erhöhung der ABCG2-Expression in den Proben bei ischämischer Kardiomyopathie auf das 3,0fache gegenüber den Proben der herzgesunden Probanden als statistisch signifikant ($p < 0,05$) erwiesen. Hingegen ist die Erhöhung der ABCG2-Expression in den Proben mit dilatativer Kardiomyopathie auf das 2,6fache statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

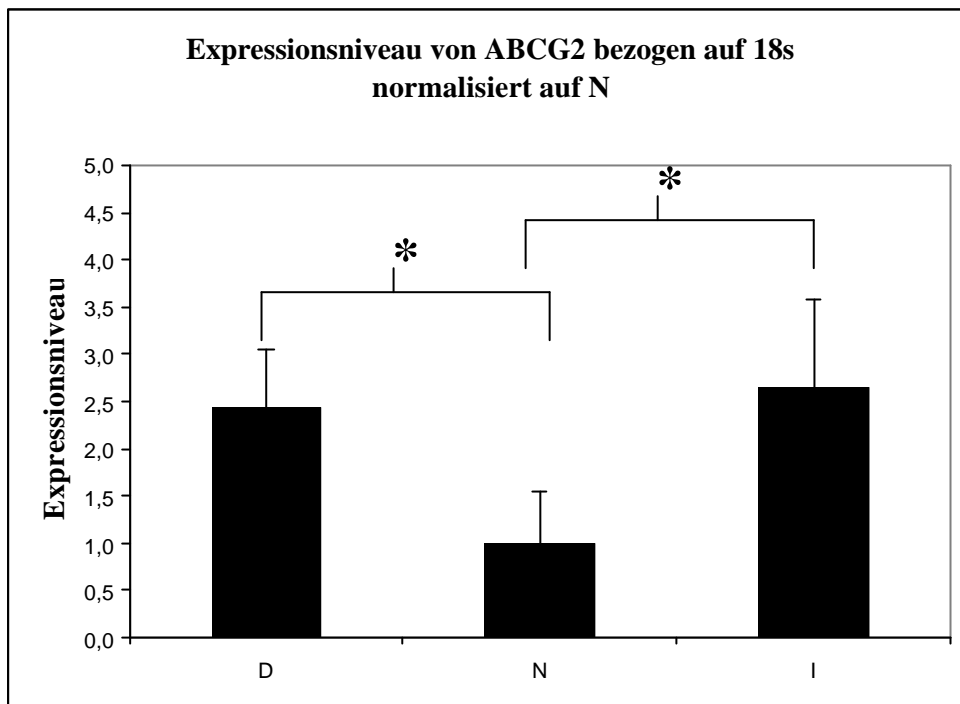


Abbildung 3.15 Expressionsniveau von ABCG2 bezogen auf 18S normalisiert auf N der Proben D1-5, N1-5 und I1-5 nach der Standardkurvenmethode, * = statistisch signifikant

Auch die Standardkurvenmethode zeigte Erhöhungen der ABCG2-Expression bei ischämischer um den Faktor 2,64 und bei dilatativer Kardiomyopathie um den Faktor 2,45. Bei dieser Methode waren beide Erhöhungen der Expression von ABCG2 statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Die Proben N1-5, I1-5 und D1-5 wurden für MRP5 nach der Standardkurvenmethode ausgewertet.

Bei der Standardkurvenmethode wurden absolute Kopienzahlen der Proben für MRP5 im Verhältnis zu den Kopienzahlen der Proben auf 18S bestimmt. So konnte der Einsatz ungleichmäßiger Mengen an cDNA in die PCR in der Berechnung eliminiert werden.

Da für MRP5 kein Housekeeping-Gen für die $\Delta\Delta C_T$ -Methode geeignet war, wurde nur nach der Standardkurvenmethode die Expression von MRP5 in den Proben D1-5, N1-5 und I1-5 ausgewertet.

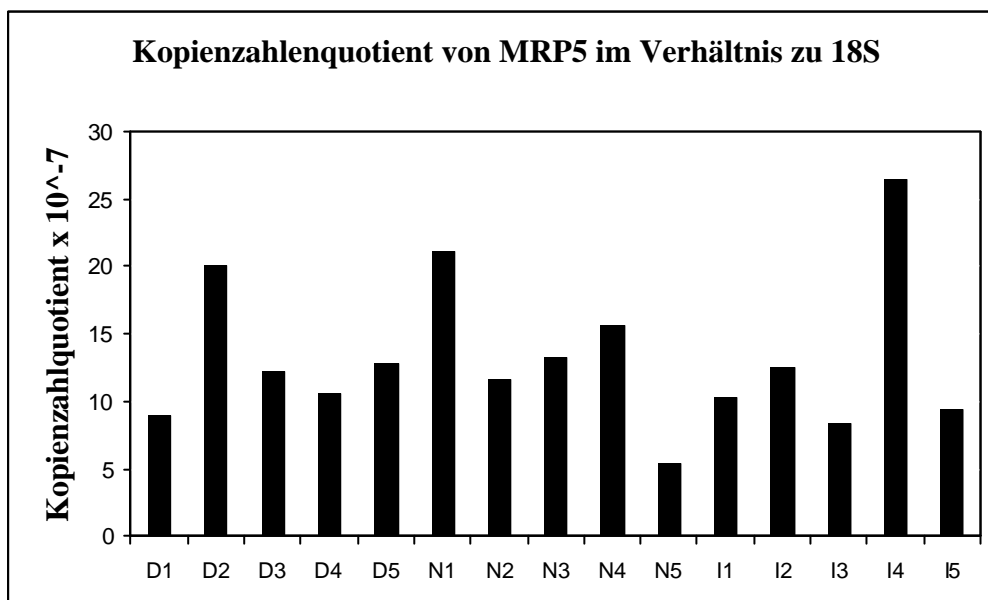


Abbildung 3.16 Kopienzahlenquotient von MRP5 im Verhältnis zu 18S der Proben D1-5, N1-5 und I1-5

In allen Proben D1-5, N1-5 und I1-5 konnte MRP5 mRNA nachgewiesen werden. Die Proben zeigten eine große interindividuelle Schwankungsbreite. Die Werte des Verhältnisses von MRP5 zu 18S liegen zwischen $5 \cdot 10^{-7}$ und $26 \cdot 10^{-7}$ mit einer Standardabweichung von $5,63 \cdot 10^{-7}$.

Die Proben 1-52 wurden auch bezüglich ihrer Expression von ABCG2 und MRP5 untersucht. Die Ergebnisse wurden als Histogramme dargestellt.

Für die Verteilung der Kopienzahlquotienten von ABCG2 und 18S ergab sich folgendes Histogramm mit 12 Klassen, einem Mittelwert von $35,9 \cdot 10^{-8}$ und einer Standardabweichung von $17,3 \cdot 10^{-8}$.

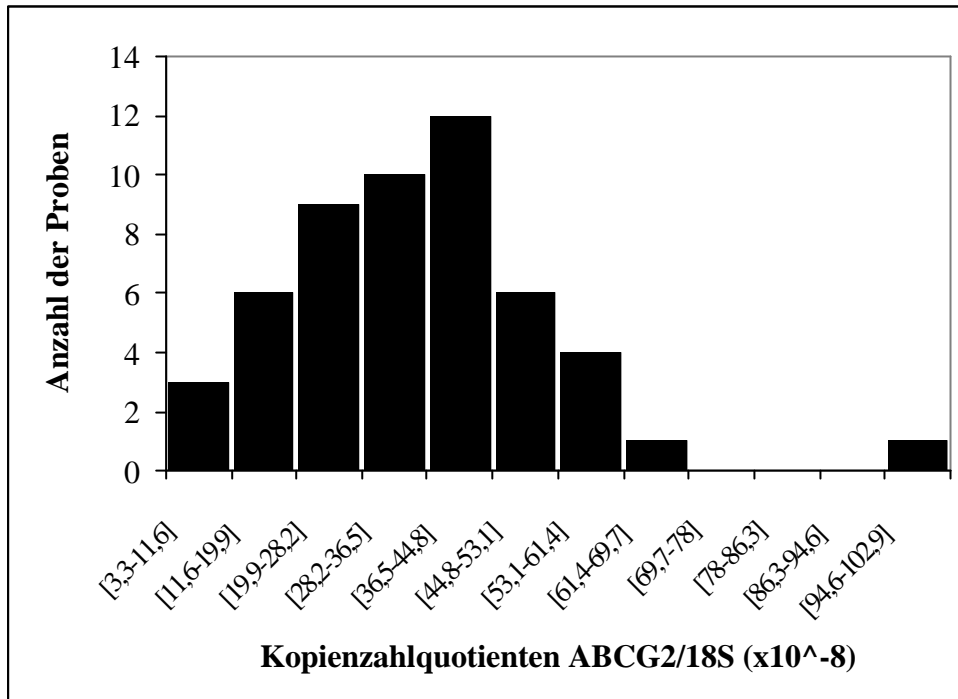


Abbildung 3.17 Histogramm der ABCG2-Kopienzahlquotienten (ABCG2/18S) $\cdot 10^{-7}$ der Proben 1-52

Für die Verteilung der Kopienzahlquotienten von MRP5 und 18S ergibt sich folgendes Histogramm mit 13 Klassen, einem Mittelwert von $58,4 \cdot 10^{-7}$ und einer Standardabweichung von $38,17 \cdot 10^{-7}$.

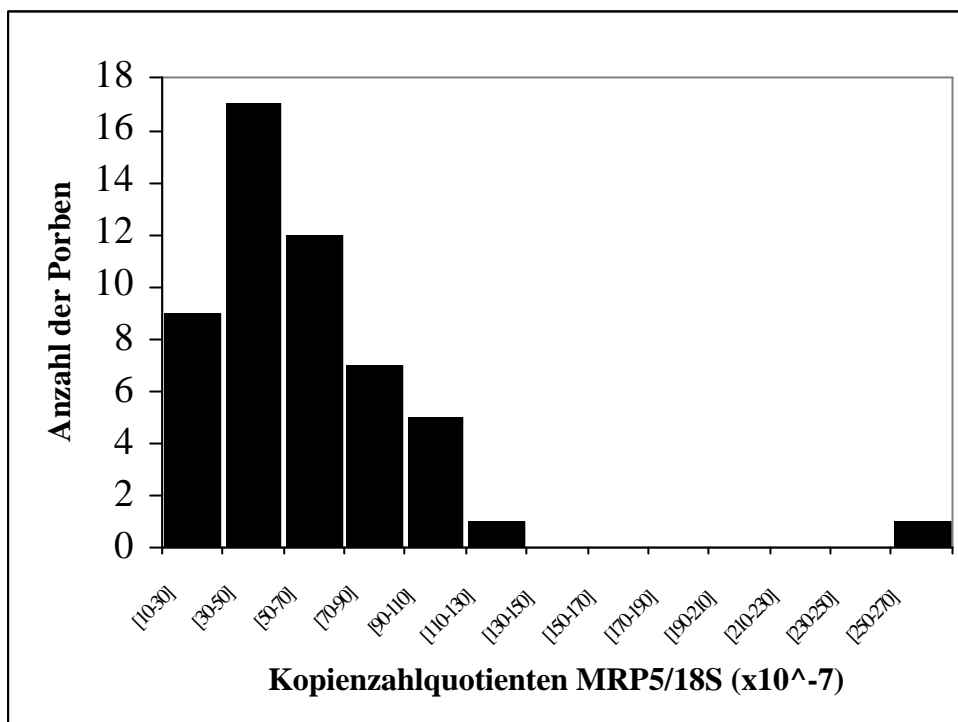


Abbildung 3.18 Histogramm der MRP5-Kopienzahlquotienten (MRP5/18S) · 10⁻⁷ der Proben 1-52

Für MRP5 und ABCG2 wurden Versuche zur statistischen Auswertung gemacht. Es wurde unter anderem verglichen, ob das Geschlecht, ein Body-mass-Index (BMI=Körpergewicht dividiert durch die Körpergröße zum Quadrat) von über 25, ein Blutdruck von über 140/85 und die Einnahme von Medikamenten wie zum Beispiel Digitalisglykosiden, Bisoprolol und Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmern (CSE-Hemmer) Einfluss auf die Expression von ABCG2 oder MRP5 haben. Bei allen statistischen Auswertungen der eben beschriebenen Parameter zeigten sich sowohl für ABCG2 als auch für MRP5 keine Korrelation zur mRNA-Expression.

Exemplarisch wird hier das Diagramm des Vergleichs der Geschlechter bezüglich ihrer ABCG2-Expression in den Proben 1-52 und das Diagramm des Vergleichs von Einnahme und Nichteinnahmen von CSE-Hemmern bezüglich ihrer MRP5 Expression gezeigt. CSE-Hemmer wurden ausgewählt, weil sie bei der Therapie der koronaren Herzerkrankung weit verbreitet sind.

Sowohl das Geschlecht hatte kaum Einfluss auf die ABCG2-mRNA-Expression, als auch die Einnahme von CSE-Hemmern auf die mRNA-Expression von MRP5. Für den Vergleich der Geschlechter wurde männlich als 1 gesetzt. Für den Vergleich der Medikamenteneinnahme wurde die Nichteinnahme der CSE-Hemmer als 1 gesetzt. In beiden Diagrammen sind die minimalen Veränderungen statistisch nicht signifikant.

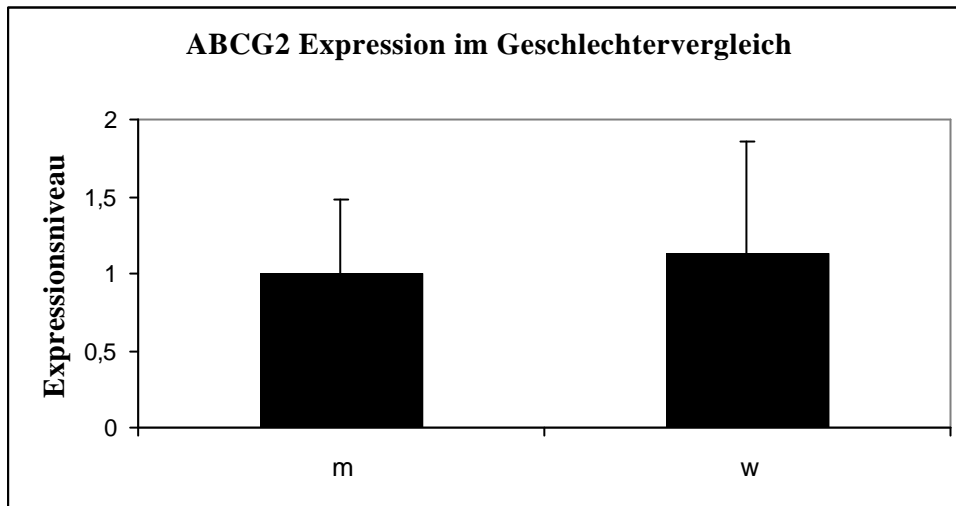


Abbildung 3.19 Expression von ABCG2 im Geschlechtervergleich in den Proben 1-52 (w=weiblich, m=männlich)

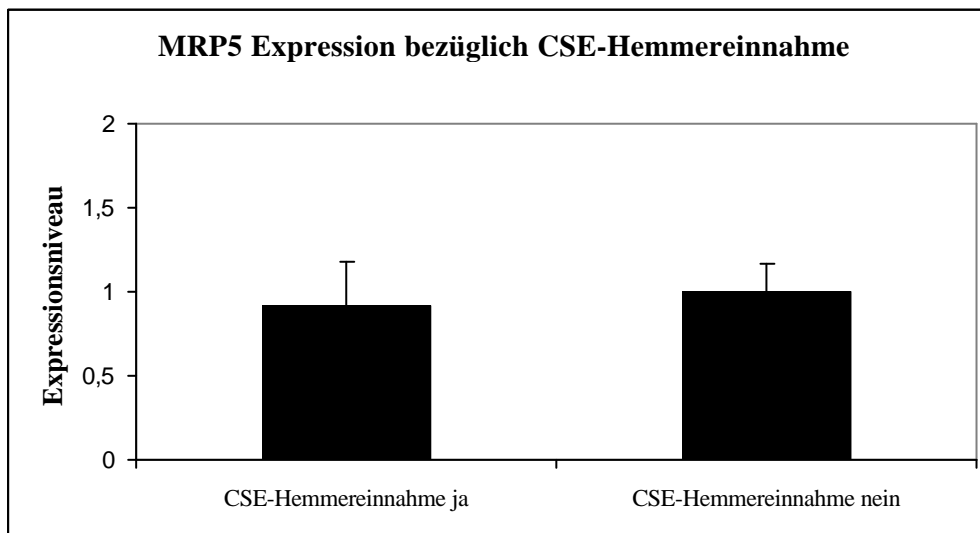


Abbildung 3.20 Vergleich der Expression von MRP5 bei CSE-Hemmereinnahme und Nichteinnahme

3.7 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Die Verteilung von ABCG2 in der Immunhistochemie aurikulären Herzgewebes zeigte nach Inkubation mit dem Antikörper *BXP-21* eine Anfärbung des Endothels von Gefäßen.

Außerdem wurden Immunfluoreszenzbilder mit *BXP-21* als primärem Antikörper angefertigt, die die gleiche Verteilung von ABCG2 in den Gefäßwänden im Herzgewebe zeigen.

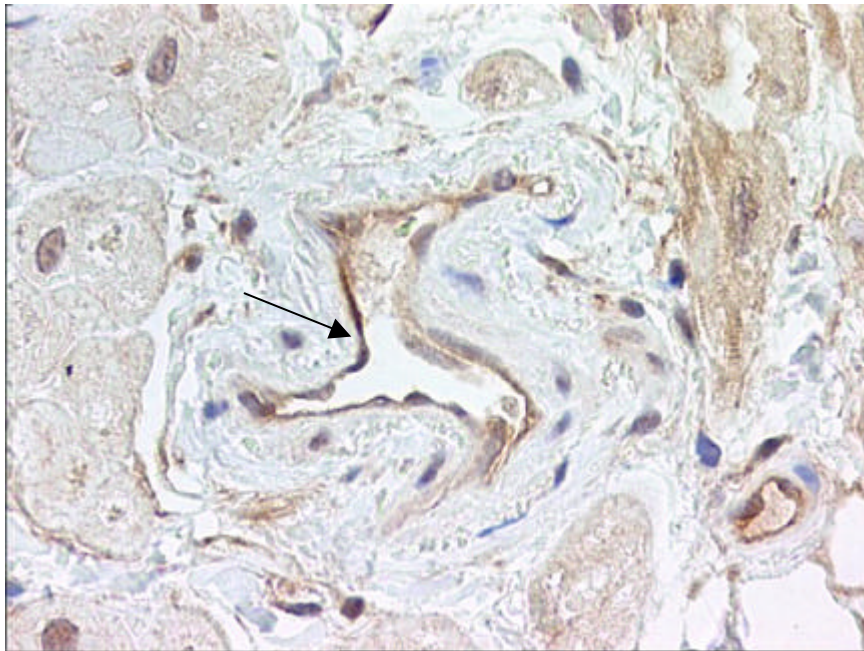


Abbildung 3.21 Immunhistochemie zum Nachweis von ABCG2 in humanem aurikulären Herzgewebe. Zu sehen ist die ABCG2-Expression entlang des Endothels eines Gefäßes (?).

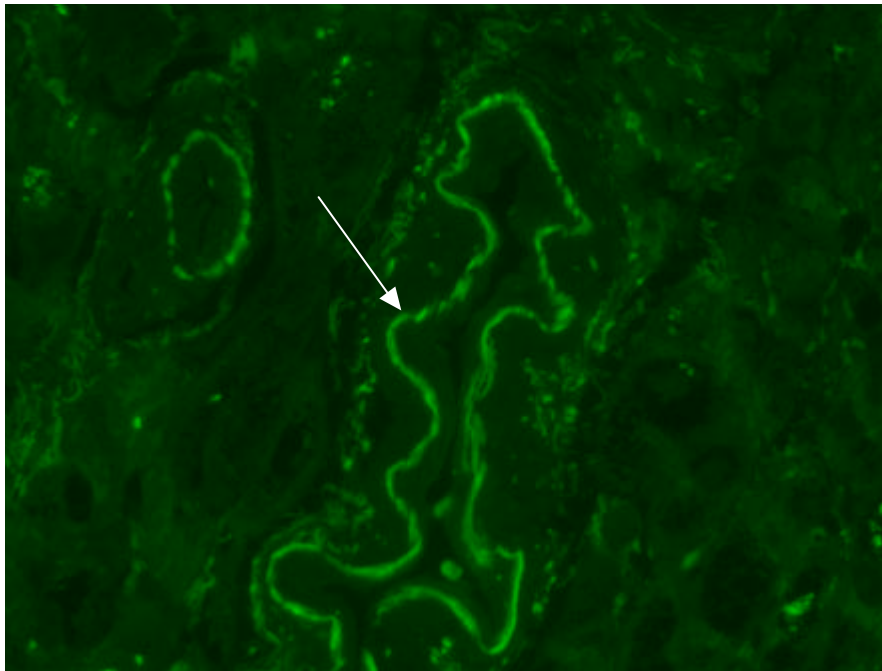


Abbildung 3.22 Immunfluoreszenz zum Nachweis von ABCG2 in humanem aurikulären Herzgewebe. Zu sehen ist die ABCG2-Expression entlang des Endothels eines Gefäßes (?).

Inkubation mit dem AMF-Antikörper zeigte eine Verteilung von MRP5 im kardiovaskulären Endothel und der glatten Muskulatur aber nicht im Bindegewebe des Herzens. Auch in den Kardiomyozyten und im Endokard zeigte sich eine Anfärbung.

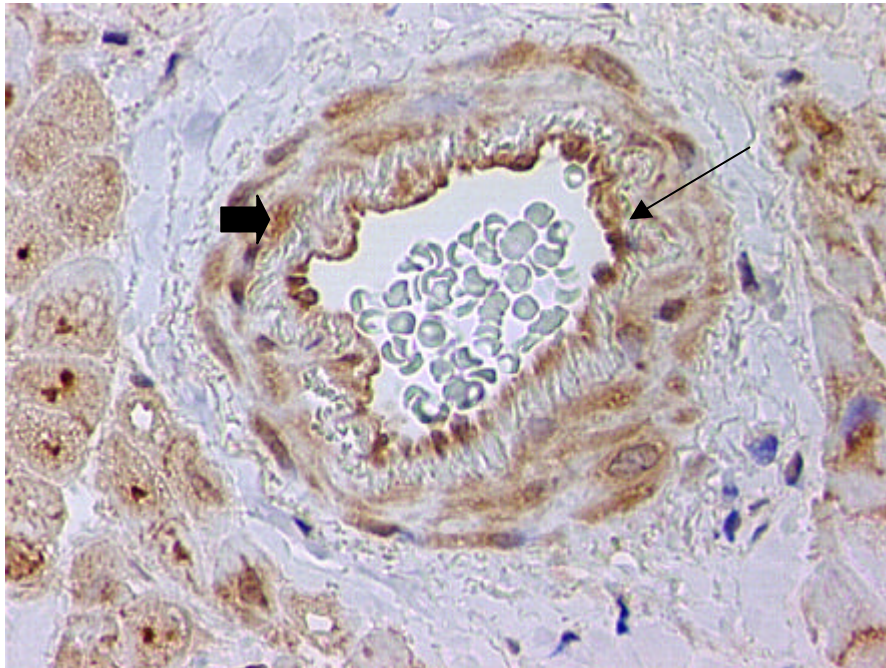


Abbildung 3.23 Immunhistochemie zum Nachweis von MRP5 in humanem aurikulären Herzgewebe. Zu sehen ist die MRP5-Expression entlang des Endothels eines Gefäßes (?) und in den glatten Gefäßmuskelzellen (dicker Pfeil).

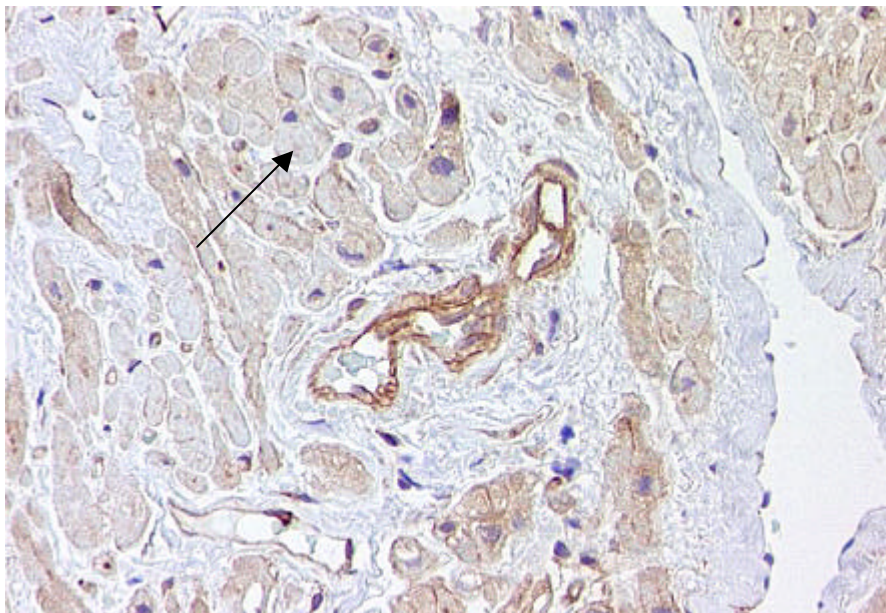


Abbildung 3.24 Immunhistochemie zum Nachweis von MRP5 in humanem aurikulären Herzgewebe. Zu sehen ist die MRP5-Expression in den Kardiomyozyten (?).

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der ABC-Transporter ABCG2 und MRP5 in humanem Herzgewebe auf mRNA- und Proteinebene mittels real-time RT-PCR und Immunhistochemie untersucht. Zuerst sollen die Ergebnisse für ABCG2 diskutiert werden, gefolgt von der Diskussion der Ergebnisse für MRP5.

4.1 ABCG2

ABCG2 konnte im Rahmen dieser Arbeit zum erstenmal in humanem Herzgewebe auf mRNA-Ebene mittels real-time PCR nachgewiesen und mittels Immunhistochemie / Immunfluoreszenz auf Proteinebene lokalisiert werden.

Entdeckt wurde der ABCG2-Transporter in zahlreichen resistenten Tumorzelllinien [8, 9, 11, 21, 25]. Humane Plazenta ist als Gewebe mit der höchsten Expression von ABCG2 beschrieben worden [20]. Allikmets et al. erbrachten den RNA-Nachweis von ABCG2 an humanen Herzproben mittels Northern Blot. Aussagen zur Expressionsstärke machten sie nicht [10]. Mittels semiquantitativer RT-PCR zeigten Maliepaard et al., dass humanes Herzgewebe eine der niedrigsten ABCG2-Expression aller von ihnen getesteten Gewebe hatte [20]. Mit den von der Maus stammenden Antikörpern BXP-21 [20] und BXP-34 [72] gegen Proteinstrukturen von ABCG2 zeigten sie in der Immunhistochemie von gefrorenen Gewebeschnitten, dass das Myokard sich nicht anfärben lässt, ABCG2 jedoch im Endothel von Venen und Kapillaren nachweisbar ist [20]. Die Antikörper BXP-21 und BXP-34 werden von Maliepaard et al. bzw. Scheffer et al. als spezifisch für ABCG2 beschrieben. BXP-21 ist für die Immunhistochemie an Paraffin-fixierten Gewebeschnitten und für den Western Blot geeignet, BXP-34 hingegen ist nur für gefrorene Schnitte geeignet [19, 20]. Daher entschieden wir uns für BXP-21. Daneben existiert noch der Antikörper 87405 von Litman et al. [33], der nicht kommerziell verfügbar ist. Sie untersuchten ausschließlich Tumorzellen immunhistochemisch auf ihre ABCG2-Verteilung. Wir konnten ABCG2 mit BXP-21 in den Gefäßwänden im Herzmuskel nachweisen. Eine Anfärbung von Kardiomyozyten zeigte sich auch in unseren Proben nicht.

Real-time PCR-Untersuchungen an humanem Herzgewebe werden hier zum erstenmal beschrieben. Die Methode der real-time PCR zum Nachweis von ABCG2 wurde schon von Taipalensuu et al. [24] und van den Heuvel-Eibrink et al. [97] beschrieben. Sie untersuchten humanes Jejunum und intestinale, epitheliale Caco-2-Zellen (humane Kolon-Ca-Zelllinie) und akute Leukämiezellen. Wir verwendeten zum Nachweis von ABCG2 andere Primer und eine andere Sonde als Taipalensuu et al. und van den Heuvel-Eibrink et al. Es gelang auf mRNA-Ebene eine Erhöhung der ABCG2-Expression in den Proben mit ischämischer und mit dilatativer Kardiomyopathie zu zeigen, die trotz der kleinen Probenzahl (n=15) statistisch signifikant war (t-Test). In der Literatur sind bisher keine Expressionsänderungen für ABCG2 auf mRNA- und Proteinebene für Erkrankungen des Herzens beschrieben worden. Bei Patienten mit akuter Leukämie ist eine signifikante Erhöhung der ABCG2-Expression im Stadium des Rezidivs und des Nicht-Ansprechens auf Medikamente gegenüber Untersuchungen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung gefunden worden [97]. Die Patienten mit AML wurden mit Hochdosischemotherapie behandelt, die auch Anthrazykline beinhaltete [97]. Diese Therapie könnte zur Erhöhung der ABCG2-Expression in AML-Zellen im Stadium des Rezidivs und zum Nicht-Ansprechen auf Medikamente geführt haben. Mit dem Einsatz spezifischer ABCG2-Inhibitoren könnte die Medikamentenresistenz bei der AML überwunden werden. Van der Kolk et al. konnten die Ergebnisse von van den Heuvel-Eibrink et al. mit Durchflußzytometrie und den Antikörpern BXP-21 und BXP-34 in AML-Zellen auf Proteinebene nicht nachvollziehen [98]. Die Autoren machen die in beiden Studien niedrige Probenanzahl (n=20) für die Diskrepanz verantwortlich [98].

Der ABCG2-Transporter wurde von zwei Gruppen mit Immunhistochemie in der Zellmembran von Brustkrebszellen [18] und in Plasmozytom-, Ovarialkarzinom- und kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzellen [19] lokalisiert. Unter Einsatz des P-gp-Hemmers PSC833 [99] konnten Jonker et al. an polarisierten Epithelzelllinien den transmembranären Transport von Topotecan durch ABCG2 nachweisen [30]. Durch ihre Ergebnisse konnten sie für ABCG2 eine ähnliche Schutzfunktion gegenüber Medikamenten nachweisen, wie es vorher schon für P-gp als Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke, der Blut-Hoden-Schranke und der fetomaternalen

Plazentaschranke gelungen war [100]. Jonker et al. halten ABCG2 für einen Bestandteil der transmembranären Barriere im Synzytiotrophoblasten der Plazenta [30]. ABCG2 ist nachgewiesen worden in Kapillaren und Venen vieler Gewebe [20], so dass eine Schrankenfunktion auch dort angenommen werden kann. Durch unsere Ergebnisse der Immunhistochemie am Herzen, in denen wir ABCG2 in den kardialen Gefäßen lokalisierten, kann vermutet werden, dass das Transportprotein hier ebenso eine Schutzfunktion erfüllt und somit die unterschiedliche kardiotoxische Wirkung von Zytostatika zwischen den Individuen erklärt. In den Epithelien des Gastrointestinaltraktes wurde ABCG2 von Maliepaard et al. nachgewiesen [20]. Jonker et al. zeigten eine bessere orale Bioverfügbarkeit von Topotecan, Mitoxantron, Doxorubicin, und Daunorubicin durch Einsatz des P-gp- und ABCG2-Inhibitors GF120981 [30]. In klinischen Studien könnte versucht werden, mit Inhibitoren von P-gp und ABCG2 wie GF120981 oder mit spezifischen Inhibitoren für ABCG2 wie Fumitremorgin C [35, 41] und Ko143 [101] die orale Verfügbarkeit von Zytostatika zu verbessern. Die orale Bioverfügbarkeit auf diese Weise zu erhöhen, kann zur Akkumulation dieser Stoffe im Herzgewebe führen und die Kardiotoxizität verstärken.

ABCG2 zeigt einen Polymorphismus im Resistenzmuster gegenüber Medikamenten. Allen et al. benutzten in einer Studie Knock-out-Mäuse, die weder P-gp noch MRP1 exprimierten, um einen neuen resistenten Stamm gegen Topotecan, Mitoxantron oder Doxorubicin zu selektieren [29]. Jeder Mäusestamm überexprimierte ABCG2. Die Doxorubicin-selektierten Mäuse zeigten eine höhere Resistenz gegen Doxorubicin, Etoposid und Bisanren, als die mit Mitoxantron und Topotecan selektierten Mäuse. Robey et al. fanden Zelllinien, die ABCG2 enthielten, von denen einige Rhodamin 123 transportierten und andere nicht [35]. Diese verschiedenen Phänotypen werden durch Polymorphismen in der ABCG2-Gensequenz erklärt. Der Wildtyp kann Rhodamin 123 nicht transportieren und besitzt eine niedrige Resistenz gegen Anthrazykline und eine hohe Resistenz gegen Mitoxantron und Topotecan. Durch Austausch von Arginin gegen Glycin oder Threonin in der Aminosäuresequenz an Position 482 kann die mutierte Zelllinie Rhodamin 123 transportieren und es wird eine hohe Resistenz gegen Doxorubicin erzeugt [13, 14, 102]. Dieser Polymorphismus könnte, neben P-gp [103] die

interindividuell unterschiedliche Schädigung des Myokards durch Anthrazykline erklären. Untersuchungen am Herzen sind im Hinblick auf dieses Phänomen bisher nicht durchgeführt worden und wurden auch an unseren Proben bisher nicht vorgenommen.

Neben der Medikamentenresistenz und der Barrierefunktion zwischen Kompartimenten im menschlichen Körper ist keine weitere physiologische Funktion von ABCG2 in der Literatur beschrieben. Neuere Erkenntnisse vermuten einen Zusammenhang zwischen ABCG2 und der Blutzellreifung. Zhou et al. beobachteten bei unreifen Blutstammzellen der Maus einen Auswärtstransport des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst 33342, mit dem diese für die FACS-Analyse angefärbt werden sollten [27]. Sie fanden ABCG2 stark exprimiert in diesen undifferenzierten hämatopoetischen Stammzellen („side population“ - SP). Diese SP-Zellen sind in der Lage, das Knochenmark wieder zu besiedeln. Die Stammzellen verlieren während ihrer Reifung den ABCG2-Transporter. Zellen mit einer künstlichen Überexpression von ABCG2 vergrößern die SP-Population und zeigen keine Ausreifung der hämatopoetischen Stammzellen. Deshalb vermuten die Autoren, ABCG2 könne einen endogenen, bisher unbekanntem Metaboliten, der für die Ausreifung wichtig ist, transportieren. Auch an AML-Zellen konnte eine Korrelation von ABCG2-Expression in unreifen und reifen Zellen hergestellt werden. Unreife AML-Zellen zeigen eine hohe Expression von ABCG2, während mit zunehmender Ausreifung dieser Zellen die ABCG2-Expression abnimmt [98].

4.2 MRP5

Diese Arbeit zeigt die Expression und Lokalisation des ABC-Transporters MRP5 (ABCC5) in humanem Herzgewebe auf mRNA- und Proteinebene. Andere Arbeitsgruppen haben bisher die Expression von MRP5 im Herzen mit PCR und Northern Blot nachgewiesen. Kool et al. haben MRP5 mit einer *RNAse Protection PCR* in Herzgewebe auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Das Protein wiesen sie aus Zelllysaten mittels Immunoblot nach [63]. Als quantitative Aussagen gaben sie an, Skelettmuskel und Gehirn hätten die höchste und Herzgewebe eine mittlere Expression an MRP5. Auch Belinsky et al. sprechen in ihrer *RNA-Blot-Analyse* von mittleren Konzentrationen für Herzgewebe [65]. McAleer et al. wiesen MRP5 mittels Western Blot nach, quantitative

Aussagen machten sie nicht [66]. In unseren 15 linksventrikulären und 52 rechtsaurikulären Herzproben konnte MRP5 sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Die Antikörper M₅I-1 und M₅II-54 für den Nachweis von MRP5 sind von Scheffer et al. aus der Ratte gewonnen worden und sind zur immunhistochemischen Untersuchung von gefrorenen Gewebeschnitten, für den Western Blot und die FACS-Analyse geeignet [72]. Für die Untersuchung von Paraffin-fixiertem Gewebe erwiesen sie sich als unbrauchbar. Der von uns verwendete Kaninchen-Antikörper AMF ist gegen das C-terminale Ende von MRP5 gerichtet [47]. Wir konnten MRP5 in den glatten Muskelzellen der Gefäßwände, in den Kardiomyozyten und den Gefäßendothelzellen nachweisen. Nies et al. wiesen MRP5 in den glatten Muskelzellen des Urogenitaltraktes nach [68]. Untersuchungen zur Lokalisation von MRP5 im Herzen sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Die Spezifität des Antikörpers war von Nies et al. in vorhergehenden Experimenten nachgewiesen worden [68].

Die physiologische und pathophysiologische Rolle von MRP5 ist bis heute nicht genau geklärt. Am interessantesten, vor allem für die Bedeutung von MRP5 im Herzen, ist die Entdeckung von Jedlitschky et al., dass MRP5 eine ATP-abhängige Pumpe für zyklische Nukleotide ist, mit hoher Affinität für cGMP und mit niedriger für cAMP [47]. Als second-messenger von NO (Stickstoffmonoxid) führt cGMP am Ende einer intrazellulären Signalkaskade zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur der Endothelien kardialer Gefäße [78-80]. Stickstoffmonoxid (NO) wird durch NO-Synthetasen (NOs) aus L-Arginin oder durch Zufuhr von Nitraten in der Endothelzelle freigesetzt. In der glatten Gefäßmuskulatur oder den Kardiomyozyten aktiviert es die Guanylylzyklase (GC), die aus Guanosintriphosphat (GTP) den second messenger zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) synthetisiert. cGMP seinerseits aktiviert Proteinkinasen (PKs), cAMP-abhängige Phosphodiesterasen (PDEs) und Ionenkanäle. Auf diese Weise werden der intrazelluläre Kalziumspiegel und die Sensibilität des kontraktiven Systems in der Zelle gesenkt [78]. Über diese Wege kann cGMP die Erschlaffung kontraktiver Zellen einleiten. Der intrazelluläre cGMP-Spiegel wird durch Abbau von cGMP zu Guanosinmonophosphat (GMP) oder über die Pumpfunktion des MRP5-Transporters aus der Zelle erniedrigt. (siehe Abb. 4.1)

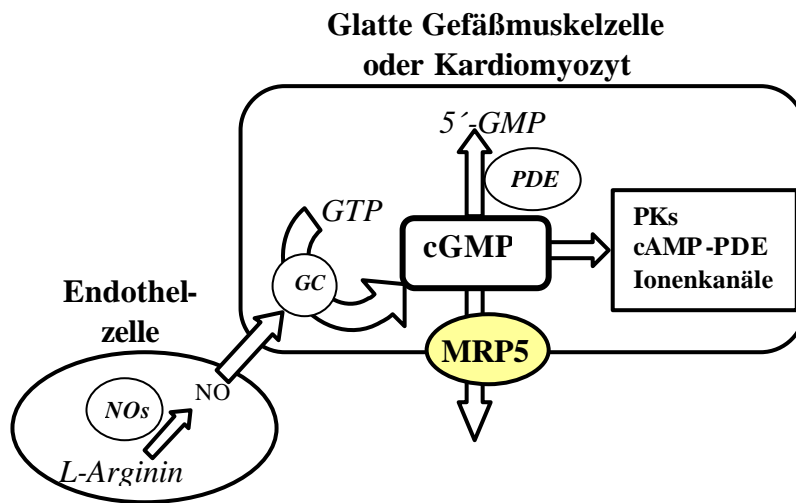


Abbildung 4.1 Schematische Signaltransduktion von NO zu cGMP, Dazert et al. [104]

Der Transport von cGMP über die Zellmembran aus der Zelle wurde schon von verschiedenen Arbeitsgruppen in ganz unterschiedlichen Zellen beschrieben, wie den Nierenepithelien [105], den Hepatozyten [106], Epithel- und Fibroblastenzelllinien [107] und Erythrozyten [108]. Nitrate, die in der Therapie der Angina pectoris eingesetzt werden, erhöhen den NO und nachfolgend den cGMP-Spiegel. Sie bewirken auf diesem Weg eine koronare Vasodilatation [81]. MRP5 kann deshalb eine neue therapeutische Angriffsfläche in der Therapie der Angina pectoris bieten. Die beschriebenen MRP5-Inhibitoren, wie die Urikosurika Sulfinpyrazon [67] und Probenecid [47], können neue Therapieoptionen eröffnen. Sie sind jedoch nicht selektiv für MRP5, sondern Inhibitoren von Transportern organischer Anionen. Von den Phosphodiesterasehemmern (z.B. Sildenafil), die neben der Phosphodiesterasehemmung als MRP5-Hemmer beschrieben sind [47], sollte als neue Therapie Abstand genommen werden. Bei gleichzeitiger Gabe von Nitraten und Phosphodiesterasehemmern treten gefährliche Blutdruckabfälle auf [109]. Es bleibt somit die Aufgabe, einen selektiven MRP5-Inhibitor zu finden.

Wir fanden MRP5 in den Kardiomyozyten, wo es eine Rolle bei dem Phänomen der Präkonditionierung gegenüber Ischämie am Herzmuskel spielen könnte. Durch kleinste Infarkte in der Endstrombahn der Koronargefäße steigt die Toleranz des Myokards

gegenüber prolongierten Ischämiezuständen [90, 110]. Neben anderen Faktoren spielt NO eine bedeutende Rolle bei dieser Präkonditionierung [91, 111, 112]. Durch kurze Ischämien wird Bradikinin in den Koronarien des minder perfundierten Bereiches ausgeschüttet. Es aktiviert in den Kardiomyozyten die NO-Synthese und erhöht den intrazellulären cGMP-Spiegel. Der Kalziumeinstrom durch Kalziumkanäle vom L-Typ wird vermindert [113]. Daneben wird die Phosphodiesterase Typ 2 (PDE2) aktiviert. Sie ist cGMP-abhängig. Durch diese beiden Mechanismen wird der Sauerstoffverbrauch der Kardiomyozyten gesenkt und der Herzmuskel präkonditioniert für die Toleranz von Ischämien [111, 112, 114]. Die Phosphodiesterase Typ 5 (PDE5) sorgt maßgeblich für den Abbau von cGMP zu GMP. Sie wird durch Sildenafil, welches zur Therapie der erektilen Dysfunktion beim Mann eingesetzt wird, gehemmt. Wallis et al. konnten zeigen, dass die PDE5 in den kardialen glatten Muskelzellen der Gefäßendothelien vorkommt, jedoch in den Kardiomyozyten fehlt [115]. Es wird vermutet, der Auswärtstransport von cGMP über die Membran der Kardiomyozyten ist der Hauptweg zur Senkung des intrazellulären cGMP-Spiegels im Herzmuskel. In unseren 5 Proben von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie konnten wir eine Expression von MRP5 mit starker interindividueller Schwankung zeigen. Von der Arbeitsgruppe Dazert et al. konnte in unserem Labor auf Proteinebene mittels Immunoblot und Immunhistochemie ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau des MRP5-Transporters gezeigt werden [104]. Diese Ergebnisse scheinen unabhängig von der Pharmakotherapie der Patienten zu sein, da keine Unterschiede in der Medikamenteneinnahme bei Patienten mit dilatativer (DCM) und ischämischer Kardiomyopathie (ICM) vorliegen. Gegen die medikamentöse Beeinflussung der MRP5-Expression sprechen auch die Ergebnisse der 52 aurikulären Herzproben. Sie zeigten interindividuell starke Schwankungen, aber bezüglich des Vergleichs von behandelten und nicht behandelten Patienten mit Medikamenten zur KHK-Therapie zeigte sich keine Veränderung in der Expression von MRP5. Die erhöhte Expression von MRP5 wird auf die Präkonditionierung des Myokards bei kurzzeitigen Ischämien durch erhöhte cGMP-Spiegel zurück geführt. Wegen der kleinen Probenzahl (n=15) und der starken interindividuellen Schwankungen sollten Studien an größeren Populationen durchgeführt

werden. Möglich erscheint eine medikamentöse Beeinflussung der kardialen MRP5-Transporter, um die Präkonditionierung des Myokards zu verbessern.

Auch bei der dilatativen Kardiomyopathie könnte die MRP5-Expression eine Rolle spielen. Maeda et al. und Wollert et al. zeigten, dass NO die Hypertrophie über die Signalkaskade mit cGMP verhindern kann [116, 117]. Hier könnte man wiederum mit Medikamenten, die MRP5-Expression beeinflussen, eingreifen, um die Herzhypertrophie zu behandeln. Auch in den Proben mit DCM konnte das Vorhandensein von MRP5 auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Signifikante Veränderungen der Expression von MRP5 konnten für die dilatative Kardiomyopathie auf Proteinebene von Dazert et al. [104] nicht gezeigt werden. Bisher sind keine Veränderungen der MRP5-Expression bei Krankheiten beschrieben, auch zeigen die von Wijnholds et al. gezüchteten MRP5-Knock-out Mäuse keinen auffälligen Phänotyp [67].

Neben dem cGMP-Transport ist MRP5 erstmals als Resistenzmechanismus in der Zytostatikatherapie maligner Erkrankungen aufgefallen [64]. MRP5 transportiert neben den zyklischen Nukleotiden auch organische Anionen [66]. Wijnholds et al. haben gezeigt, dass MRP5 eine Resistenz gegen Nukleotidanaloga verursachen kann [67]. Die Purinanaloga 6-Mercaptopurin und Thioguanin werden zur Therapie von Malignomen eingesetzt. Sie sind neben dem Anti-HIV-Medikament PMEA Substrate von MRP5. Resistenz gegen Thiopurine ist meistens durch Veränderungen der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase oder andere Enzyme der Purin-Wiederverwertungsreaktion („Salvage-Reaktion“) bedingt, jedoch ist auch eine verminderte zelluläre Akkumulation beschrieben worden [118, 119], die durch MRP5 verursacht sein könnte. Mutationen der reversen Transkriptase des HI-Virus verursachen meist Resistenzen in der medikamentösen HIV-Therapie mit PMEA [120]. Es muss aber angenommen werden, dass auch Pumpenmechanismen über die Zellmembran verantwortlich sind für die Medikamentenresistenz [121]. Dieses könnte über einen MRP5-Transporter geschehen [122]. Für MRP4 ist diese Funktion der Resistenz gegen PMEA von Schuetz et al. beschrieben worden [69]. Formen der Resistenz und Schrankenfunktion durch ABC-Transporter sind in der Literatur vielfach beschrieben worden. So ist der ABC-Transporter P-Glykoprotein, als Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke und Blut-Hoden-Schranke und in

ausscheidungsaktiven Organen wie der Leber und der Niere beschrieben worden [100, 123, 124]. Daneben wird eine Schrankenfunktion am Herzen vermutet [103]. MRP5 könnte ein weiterer ABC-Transporter mit dieser Funktion sein.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse in Zusammenhang mit den bisher veröffentlichten Funktionen von ABCG2 und MRP5 geben Hinweise auf die Rolle der beiden ABC-Transporter in humanem Herzgewebe. In größeren Untersuchungen muss untersucht werden, ob eine pharmakologische Beeinflussung von ABCG2 und MRP5 zu einer Relevanz in der klinischen Anwendung führen kann.

5 Zusammenfassung

ATP-abhängige Transporter spielen eine wichtige Rolle beim Transport von endogenen und exogenen Stoffen durch Zellmembranen. Die ATP-Transporter ABCG2 und MRP5 wurden in *Medikamenten-resistenten* Tumorzelllinien entdeckt. Später konnten sie auch in gesundem Gewebe nachgewiesen werden. Sie transportieren ganz unterschiedliche Stoffe, die keiner einheitlichen Gruppe angehören.

ABCG2 transportiert unter anderem Medikamente, die in der Therapie maligner Erkrankungen eingesetzt werden und eine ausgesprochene Kardiotoxizität besitzen. MRP5 transportiert als Substrat zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), welches bei der Relaxation glatter Muskelzellen kardialer Gefäße eine große Rolle spielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von ABCG2 und MRP5 an 15 Proben humanen Ventrikelmyokards und 52 Proben humanen Vorhofgewebes von Patienten mit koronarer Herzkrankheit untersucht. Von den 15 Proben humanen Ventrikelmyokards waren fünf von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM), fünf von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie (ICM) und fünf von herzgesunden Patienten. Mittels real-time-RT-PCR wurde ABCG2- bzw. MRP5-mRNA in allen Proben nachgewiesen. Zum einen wurde mittels ausgewählter Primer eine ABCG2- bzw. MRP5-cDNA-Sequenz auf dem *TaqMan*[®] von *Applied Biosystems* vervielfältigt und anschließend statistisch ausgewertet. Zum anderen wurde ABCG2 bzw. MRP5 mit den monoklonalen Antikörpern BXP-21 bzw. AFM immunhistochemisch dargestellt. ABCG2 wurde außerdem mittels Immunfluoreszenz dargestellt.

Die Expression von ABCG2 und MRP5 konnte in allen Proben humanen Herzgewebes mittels real-time PCR und Immunhistochemie / Immunfluoreszenz gezeigt werden. Hinsichtlich der Expression konnte für die mRNA von ABCG2 eine signifikante Erhöhung ($p = 0,05$) bei DCM und ICM gegenüber gesundem Gewebe gezeigt werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse weisen auf eine mögliche Beteiligung der ATP-Transporter ABCG2 und MRP5 an Transportprozessen am Herzen hin. Die Interaktionen von Pharmaka und die individuell unterschiedlichen Wirkungen am Herzen bei der Pharmakotherapie können durch diese Arbeit besser verstanden werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Borst, P. and R.O. Elferink, *Mammalian abc transporters in health and disease*. Annu Rev Biochem, 2002. 71: p. 537-92.
2. Dean, M., A. Rzhetsky, and R. Allikmets, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily*. Genome Res, 2001. 11(7): p. 1156-66.
3. Ewart, G.D. and A.J. Howells, *ABC transporters involved in transport of eye pigment precursors in Drosophila melanogaster*. Methods Enzymol, 1998. 292: p. 213-24.
4. Croop, J.M., et al., *Isolation and characterization of a mammalian homolog of the Drosophila white gene*. Gene, 1997. 185(1): p. 77-85.
5. Mickley, L., et al., *An ATP-binding cassette gene (ABCG3) closely related to the multidrug transporter ABCG2 (MXR/ABCP) has an unusual ATP-binding domain*. Mamm Genome, 2001. 12(1): p. 86-8.
6. Berge, K.E., et al., *Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters*. Science, 2000. 290(5497): p. 1771-5.
7. Schmitz, G., T. Langmann, and S. Heimerl, *Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism*. J Lipid Res, 2001. 42(10): p. 1513-20.
8. Chen, Y.N., et al., *Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein*. J Biol Chem, 1990. 265(17): p. 10073-80.
9. Doyle, L.A., et al., *A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(26): p. 15665-70.
10. Allikmets, R., et al., *A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance*. Cancer Res, 1998. 58(23): p. 5337-9.
11. Miyake, K., et al., *Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes*. Cancer Res, 1999. 59(1): p. 8-13.
12. Bailey-Dell, K.J., et al., *Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene*. Biochim Biophys Acta, 2001. 1520(3): p. 234-41.
13. Honjo, Y., et al., *Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells*. Cancer Res, 2001. 61(18): p. 6635-9.
14. Allen, J.D., S.C. Jackson, and A.H. Schinkel, *A mutation hot spot in the Bcrp1 (Abcg2) multidrug transporter in mouse cell lines selected for Doxorubicin resistance*. Cancer Res, 2002. 62(8): p. 2294-9.
15. Allen, J.D. and A.H. Schinkel, *Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*. Mol Cancer Ther, 2002. 1(6): p. 427-34.
16. Townsend, A. and J. Trowsdale, *The transporters associated with antigen presentation*. Semin Cell Biol, 1993. 4(1): p. 53-61.

17. Litman, T., et al., *From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance*. Cell Mol Life Sci, 2001. 58(7): p. 931-59.
18. Rocchi, E., et al., *The product of the ABC half-transporter gene ABCG2 (BCRP/MXR/ABCP) is expressed in the plasma membrane*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 271(1): p. 42-6.
19. Scheffer, G.L., et al., *Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines*. Cancer Res, 2000. 60(10): p. 2589-93.
20. Maliepaard, M., et al., *Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues*. Cancer Res, 2001. 61(8): p. 3458-64.
21. Ross, D.D., et al., *Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines*. J Natl Cancer Inst, 1999. 91(5): p. 429-33.
22. Hazlehurst, L.A., et al., *Multiple mechanisms confer drug resistance to mitoxantrone in the human 8226 myeloma cell line*. Cancer Res, 1999. 59(5): p. 1021-8.
23. Sargent, J.M., et al., *Breast cancer resistance protein expression and resistance to daunorubicin in blast cells from patients with acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2001. 115(2): p. 257-62.
24. Taipalensuu, J., et al., *Correlation of gene expression of ten drug efflux proteins of the ATP-binding cassette transporter family in normal human jejunum and in human intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. 299(1): p. 164-70.
25. Maliepaard, M., et al., *Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line*. Cancer Res, 1999. 59(18): p. 4559-63.
26. Nakatomi, K., et al., *Transport of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by breast cancer resistance protein ABCG2 in human lung cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. 288(4): p. 827-32.
27. Zhou, S., et al., *The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype*. Nat Med, 2001. 7(9): p. 1028-34.
28. Bunting, K.D., *ABC Transporters as Phenotypic Markers and Functional Regulators of Stem Cells*. Stem Cells, 2002. 20(1): p. 11-20.
29. Allen, J.D., et al., *The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin*. Cancer Res, 1999. 59(17): p. 4237-41.
30. Jonker, J.W., et al., *Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan*. J Natl Cancer Inst, 2000. 92(20): p. 1651-6.
31. Schriml, L.M. and M. Dean, *Identification of 18 mouse ABC genes and characterization of the ABC superfamily in Mus musculus*. Genomics, 2000. 64(1): p. 24-31.

32. Scharenberg, C.W., M.A. Harkey, and B. Torok-Storb, *The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors*. *Blood*, 2002. 99(2): p. 507-12.
33. Litman, T., et al., *The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2)*. *J Cell Sci*, 2000. 113(Pt 11): p. 2011-21.
34. Maliepaard, M., et al., *Circumvention of breast cancer resistance protein (BCRP)-mediated resistance to camptothecins in vitro using non-substrate drugs or the BCRP inhibitor GF120918*. *Clin Cancer Res*, 2001. 7(4): p. 935-41.
35. Robey, R.W., et al., *Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells*. *Clin Cancer Res*, 2001. 7(1): p. 145-52.
36. Perego, P., et al., *A novel 7-modified camptothecin analog overcomes breast cancer resistance protein-associated resistance in a mitoxantrone-selected colon carcinoma cell line*. *Cancer Res*, 2001. 61(16): p. 6034-7.
37. Komatani, H., et al., *Identification of breast cancer resistant protein/mitoxantrone resistance/placenta-specific, ATP-binding cassette transporter as a transporter of NB-506 and J-107088, topoisomerase I inhibitors with an indolocarbazole structure*. *Cancer Res*, 2001. 61(7): p. 2827-32.
38. Diah, S.K., et al., *Resistance to mitoxantrone in multidrug-resistant MCF7 breast cancer cells: evaluation of mitoxantrone transport and the role of multidrug resistance protein family proteins*. *Cancer Res*, 2001. 61(14): p. 5461-7.
39. Robey, R.W., et al., *A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2)*. *Biochim Biophys Acta*, 2001. 1512(2): p. 171-82.
40. Kim, M., et al., *The Multidrug Resistance Transporter ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein 1) Effluxes Hoechst 33342 and Is Overexpressed in Hematopoietic Stem Cells*. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(1): p. 22-28.
41. Rabindran, S.K., et al., *Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C*. *Cancer Res*, 1998. 58(24): p. 5850-8.
42. Erlichman, C., et al., *The HER tyrosine kinase inhibitor CII033 enhances cytotoxicity of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and topotecan by inhibiting breast cancer resistance protein-mediated drug efflux*. *Cancer Res*, 2001. 61(2): p. 739-48.
43. Imai, Y., et al., *Estrone and 17beta-estradiol reverse breast cancer resistance protein-mediated multidrug resistance*. *Jpn J Cancer Res*, 2002. 93(3): p. 231-5.
44. Schlegel, S.K., W.; List A. F., *Breast cancer resistance protein (BCRP) associated drug export and p53 inactivation impact flavopiridol (FLA) antitumor activity*. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 1999. 40: p. Abstr. 4415.
45. Ozvegy, C., et al., *Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. 285(1): p. 111-7.
46. Jedlitschky, G., et al., *Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump*. *Cancer Res*, 1996. 56(5): p. 988-94.

47. Jedlitschky, G., B. Burchell, and D. Keppler, *The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides*. J Biol Chem, 2000. 275(39): p. 30069-74.
48. Borst, P., et al., *A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins*. J Natl Cancer Inst, 2000. 92(16): p. 1295-302.
49. König, J., et al., *Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance*. Biochim Biophys Acta, 1999. 1461(2): p. 377-94.
50. Evers, R., et al., *Drug export activity of the human canalicular multispecific organic anion transporter in polarized kidney MDCK cells expressing cMOAT (MRP2) cDNA*. J Clin Invest, 1998. 101(7): p. 1310-9.
51. Paulusma, C.C., et al., *Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene*. Science, 1996. 271(5252): p. 1126-8.
52. König, J., et al., *Characterization of the human multidrug resistance protein isoform MRP3 localized to the basolateral hepatocyte membrane*. Hepatology, 1999. 29(4): p. 1156-63.
53. Chen, Z.S., K. Lee, and G.D. Kruh, *Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine*. J Biol Chem, 2001. 276(36): p. 33747-54.
54. Lai, L. and T.M. Tan, *Role of glutathione in the multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4)-mediated efflux of cAMP and resistance to purine analogues*. Biochem J, 2002. 361(Pt 3): p. 497-503.
55. Kool, M., et al., *Expression of human MRP6, a homologue of the multidrug resistance protein gene MRP1, in tissues and cancer cells*. Cancer Res, 1999. 59(1): p. 175-82.
56. Ringpfeil, F., et al., *Pseudoxanthoma elasticum: mutations in the MRP6 gene encoding a transmembrane ATP-binding cassette (ABC) transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(11): p. 6001-6.
57. Hopper, E., et al., *Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily*. Cancer Lett, 2001. 162(2): p. 181-91.
58. Tammur, J., et al., *Two new genes from the human ATP-binding cassette transporter superfamily, ABCC11 and ABCC12, tandemly duplicated on chromosome 16q12*. Gene, 2001. 273(1): p. 89-96.
59. Aguilar-Bryan, L., et al., *Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion*. Science, 1995. 268(5209): p. 423-6.
60. Thomas, P.M., et al., *Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy*. Science, 1995. 268(5209): p. 426-9.
61. Rommens, J.M., et al., *Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping*. Science, 1989. 245(4922): p. 1059-65.
62. Allikmets, R., et al., *Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database*. Hum Mol Genet, 1996. 5(10): p. 1649-55.

63. Kool, M., et al., *Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines.* Cancer Res, 1997. 57(16): p. 3537-47.
64. Suzuki, T., et al., *cDNA cloning of a short type of multidrug resistance protein homologue, SMRP, from a human lung cancer cell line.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. 238(3): p. 790-4.
65. Belinsky, M.G., et al., *Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins.* J Natl Cancer Inst, 1998. 90(22): p. 1735-41.
66. McAleer, M.A., et al., *pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells.* J Biol Chem, 1999. 274(33): p. 23541-8.
67. Wijnholds, J., et al., *Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(13): p. 7476-81.
68. Nies, A.T., et al., *Immunolocalization of multidrug resistance protein 5 in the human genitourinary system.* J Urol, 2002. 167(5): p. 2271-5.
69. Schuetz, J.D., et al., *MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs.* Nat Med, 1999. 5(9): p. 1048-51.
70. Yoshida, M., et al., *Induction of MRP5 and SMRP mRNA by adriamycin exposure and its overexpression in human lung cancer cells resistant to adriamycin.* Int J Cancer, 2001. 94(3): p. 432-7.
71. Oguri, T., et al., *Increased expression of the MRP5 gene is associated with exposure to platinum drugs in lung cancer.* Int J Cancer, 2000. 86(1): p. 95-100.
72. Scheffer, G.L., et al., *Specific detection of multidrug resistance proteins MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, and MDR3 P-glycoprotein with a panel of monoclonal antibodies.* Cancer Res, 2000. 60(18): p. 5269-77.
73. Schiebler, T.S., W.; Arnold, G., *13.2.2 Herz (Cor).* Anatomie, 1999. 8. Auflage: p. S. 516-523.
74. Berliner, J.A., et al., *Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics.* Circulation, 1995. 91(9): p. 2488-96.
75. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Atherosclerosis. Scavenging for receptors.* Nature, 1990. 343(6258): p. 508-9.
76. Benditt, E.P. and J.M. Benditt, *Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. 70(6): p. 1753-6.
77. Spaulding, C. and S. Weber, *Scandinavian simvastatin study (4S).* Lancet, 1994. 344(8939-8940): p. 1766; discussion 1767-8.
78. Carvajal, J.A., et al., *Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation.* J Cell Physiol, 2000. 184(3): p. 409-20.
79. Moncada, S., R.M. Palmer, and E.A. Higgs, *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.* Pharmacol Rev, 1991. 43(2): p. 109-42.
80. Warren, J.B., F. Pons, and A.J. Brady, *Nitric oxide biology: implications for cardiovascular therapeutics.* Cardiovasc Res, 1994. 28(1): p. 25-30.

81. Parker, J.D. and J.O. Parker, *Nitrate therapy for stable angina pectoris*. N Engl J Med, 1998. 338(8): p. 520-31.
82. Grobecker, H., [*Calcium antagonists. Pharmacology and clinical pharmacology*]. Med Monatsschr Pharm, 1994. 17(5): p. 130-9.
83. Collins, R., et al., *Aspirin, heparin, and fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 1997. 336(12): p. 847-60.
84. Bottiger, B.W. and F. Fleischer, [*Medical therapy for coronary heart disease. Perioperative relevance*]. Anaesthesist, 1994. 43(11): p. 699-717.
85. Prichard, B.N., *Pharmacological and clinical aspects of drug therapy in coronary heart disease: clinical aspects of therapy with beta-adrenoceptor antagonists*. Z Kardiol, 1990. 79(Suppl 3): p. 99-103.
86. Braunwald, E.S., Andrew P., *Ischämische Herzerkrankung*. Harrisons Innere Medizin, 1999. Band 1([Dt.] Uebers. der 14. [amerikan.] Aufl. / Hrsg. Anthony S. Fauci; Tinsley Randolph Harrison): p. S. 1611 - 1622.
87. Richardson, P., et al., *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies*. Circulation, 1996. 93(5): p. 841-2.
88. Wynne J., B.E., *The cardiomyopathies and myocarditides*. Heart Disease A Textbook of Cardiovascular Medicine, 2001(6th edition, Braunwald E.(ed.) Philadelphia, WB Saunders Company): p. 1751-1783.
89. Braunwald, E.W., Joshua, *Kardiomyopathie und Myokarditiden*. Harrisons Innere Medizin, 1999. Band 1([Dt.] Uebers. der 14. [amerikan.] Aufl. / Hrsg. Anthony S. Fauci; Tinsley Randolph Harrison): p. 1568 - 1575.
90. Murry, C.E., R.B. Jennings, and K.A. Reimer, *Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium*. Circulation, 1986. 74(5): p. 1124-36.
91. Nandagopal, K., T.M. Dawson, and V.L. Dawson, *Critical role for nitric oxide signaling in cardiac and neuronal ischemic preconditioning and tolerance*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. 297(2): p. 474-8.
92. Von Hoff, DD. and M. Layard, *Risk factors for development of daunorubicin cardiotoxicity*. Cancer Treat Rep, 1981. 65(Suppl 4): p. 19-23.
93. Beck, W.T., et al., *Effects of indole alkaloids on multidrug resistance and labeling of P-glycoprotein by a photoaffinity analog of vinblastine*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. 153(3): p. 959-66.
94. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. 51(Pt 1): p. 263-73.
95. Schild, D.T.A., *7700 SDS Workshop Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie*. 1998(Vers. 2.1).
96. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. 25(2): p. 169-93.
97. van den Heuvel-Eibrink, M.M., et al., *Increased expression of the breast cancer resistance protein (BCRP) in relapsed or refractory acute myeloid leukemia (AML)*. Leukemia, 2002. 16(5): p. 833-9.

98. van der Kolk, D.M., et al., *Expression and activity of breast cancer resistance protein (BCRP) in de novo and relapsed acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2002. 99(10): p. 3763-70.
99. Cayre, A., et al., *In vitro detection of the MDR phenotype in rat myocardium: use of PCR, [3H]daunomycin and MDR reversing agents*. *Anticancer Drugs*, 1996. 7(8): p. 833-7.
100. Schinkel, A.H., *The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins*. *Semin Cancer Biol*, 1997. 8(3): p. 161-70.
101. Allen, J.D.v.L., A.; Lakhai, J. M.; Van der Valk, M.; van Tellingen, O.; Reid, G.; Schellens, J. H. M.; Koomen, G. J.; Schinkel, A. H., *Potent and Specific Inhibition of the Breast Cancer Resistance Protein Multidrug Transporter in Vitro and in Mouse Intestine by a Novel Analogue of Fumitremorgin C*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2002. Vol.1(April 2002): p. 417-425.
102. Brangi, M., et al., *Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells*. *Cancer Res*, 1999. 59(23): p. 5938-46.
103. Meissner, K., et al., *Expression and localization of P-glycoprotein in human heart: effects of cardiomyopathy*. *J Histochem Cytochem*, 2002. 50(10): p. 1351-6.
104. Dazert, P., et al., *Expression and Localization of the Multidrug Resistance Protein (MRP5/ABCC5), a Cellular Export Pump for Cyclic Nucleotides, in Human Heart*. submitted.
105. Woods, M. and M.D. Houslay, *Desensitization of atriopeptin stimulated accumulation and extrusion of cyclic GMP from a kidney epithelial cell line (MDCK)*. *Biochem Pharmacol*, 1991. 41(3): p. 385-94.
106. Billiar, T.R., et al., *Association between synthesis and release of cGMP and nitric oxide biosynthesis by hepatocytes*. *Am J Physiol*, 1992. 262(4 Pt 1): p. C1077-82.
107. Patel, M.J., et al., *Secretion of cyclic GMP by cultured epithelial and fibroblast cell lines in response to nitric oxide*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995. 273(1): p. 16-25.
108. Sager, G., et al., *Export of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) from human erythrocytes characterized by inside-out membrane vesicles*. *Scand J Clin Lab Invest*, 1996. 56(4): p. 289-93.
109. Ishikura, F., et al., *Effects of sildenafil citrate (Viagra) combined with nitrate on the heart*. *Circulation*, 2000. 102(20): p. 2516-21.
110. Yellon, D.M., et al., *Ischaemic preconditioning: present position and future directions*. *Cardiovasc Res*, 1998. 37(1): p. 21-33.
111. Parratt, J.R., *Possibilities for the pharmacological exploitation of ischaemic preconditioning*. *J Mol Cell Cardiol*, 1995. 27(4): p. 991-1000.
112. Rakhit, R.D., et al., *Nitric oxide-induced cardioprotection in cultured rat ventricular myocytes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. 278(4): p. H1211-7.
113. Gallo, M.P., et al., *Regulation of cardiac calcium current by NO and cGMP-modulating agents*. *Pflugers Arch*, 2001. 441(5): p. 621-8.
114. Keef, K.D., J.R. Hume, and J. Zhong, *Regulation of cardiac and smooth muscle Ca(2+) channels (Ca(V)1.2a,b) by protein kinases*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. 281(6): p. C1743-56.

115. Wallis, R.M., et al., *Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro*. Am J Cardiol, 1999. 83(5A): p. 3C-12C.
116. Wollert, K.F., B.; Gambaryan, S.; Smolenski, A.; Heineke, J.; Butt, E.; Trautwein, C.; Lohmann, SM.; Drexler, H., *Gene transfer of cGMP-dependent protein kinase I enhances the antihypertrophic effects of nitric oxide in cardiomyocytes*. Hypertension, 2002. 39(1): p. 87-92.
117. Maeda, Y.I., U.; Oya, K.; Shimpō, M.; Ueno, S.; Urabe, M.; Kume, A.; Monahan, J.; Ozawa, K.; Shimada, K., *Adeno-associated virus-mediated transfer of endothelial nitric oxide synthase gene inhibits protein synthesis of rat ventricular cardiomyocytes*. Cardiovasc Drugs Ther, 2001. 15(1): p. 19-24.
118. Bemis, V., et al., *6-thioguanine resistance in a human colon carcinoma cell line with unaltered levels of hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase activity*. Int J Cancer, 1999. 82(4): p. 556-61.
119. Baskin, F. and R.N. Rosenberg, *Decreased 6-mercaptopurine retention by two resistant variants of mouse neuroblastoma with normal hypoxanthine-guanine-phospho- ribosyltransferase activities*. J Pharmacol Exp Ther, 1975. 193(1): p. 293-300.
120. Balzarini, J., *Suppression of resistance to drugs targeted to human immunodeficiency virus reverse transcriptase by combination therapy*. Biochem Pharmacol, 1999. 58(1): p. 1-27.
121. Finzi, D. and R.F. Siliciano, *Viral dynamics in HIV-1 infection*. Cell, 1998. 93(5): p. 665-71.
122. Wielinga, P.R., et al., *Thiopurine metabolism and identification of the thiopurine metabolites transported by MRP4 and MRP5 overexpressed in human embryonic kidney cells*. Mol Pharmacol, 2002. 62(6): p. 1321-31.
123. Thiebaut, F., et al., *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(21): p. 7735-8.
124. Cordon-Cardo, C., et al., *Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues*. J Histochem Cytochem, 1990. 38(9): p. 1277-87.

7 Anhang

Nachfolgend ist die mRNA-Sequenz von ABCG2 (AN-Nr.: AF098951) und MRP5 (AN-Nr.: AF146074) dargestellt. Die Primer sind rot unterlegt und die Sonden blau.

mRNA-Sequenz von ABCG2 (AN-Nr.: AF098951):

```

1  gggaggaggc agcctgtgga ggaactgggt aggatntagc aacgcaccgt gcacatgctt
61  ggtggtcttg ttaagtggaa actgctgctt tagagtttgt ttggaaggctc cgggtgactc
121 atcccaacat ttacatcctt aattgttaaa gcgctgcctc cgagcgcacg catcctgaga
181 tcctgagcct ttggttaaga ccgagctcta ttaagctgaa aagataaaaa ctctccagat
241 gtcttccagt aatgtcgaag tttttatccc agtgtcacia ggaaacacca atggcttccc
301 cgcgacagct tccaatgacc tgaaggcatt tactgaagga gctgtgttaa gttttcataa
361 catctgctat cgagtaaaac tgaagagtgg ctttctacct tgtcgaaaac cagttgagaa
421 agaaatatta tcgaatatca atgggatcat gaaacctggc ctcaacgcca tcctgggacc
481 cacaggtgga ggcaaatctt cgttattaga tgtcttagct gcaaggaaaag atccaagtgg
541 attatctgga gatgttctga taaatggagc accgcgacct gccaatttca aatgtaattc
601 aggttacgtg gtacaagatg atgttgtgat gggcactctg acggtgagag aaaacttaca
661 gttctcagca gctcttcggc ttgcaacaac tatgacgaat catgaaaaaa acgaaaggat
721 taacagggtc attcaagagt taggtctgga taaagtggca gactccaagg ttggaactca
781 gtttatccgt ggtgtgtctg gaggagaaag aaaaaggact agtataggaa tggagcttat
841 cactgatcct tccatcttgt tcttggatga gcctacaact ggcttagact caagcacagc
901 aaatgctgtc cttttgctcc tgaaaaggat gtctaagcag ggacgaacaa tcatcttctc
961 cattcatcag cctcgatatt ccatcttcaa gttgtttgat agcctcacct tattggcctc
1021 aggaagactt atgttccacg ggectgctca ggaggccttg ggatactttg aatcagctgg
1081 ttatcactgt gaggcctata ataacctgc agacttcttc ttggacatca ttaatggaga
1141 ttccactgct gtggcattaa acagagaaga agactttaa gccacagaga tcatagagcc
1201 ttccaagcag gataagccac tcatagaaaa attagcggag atttatgtca actcctcctt
1261 ctacaaagag acaaaagctg aattacatca actttccggg ggtgagaaga agaagaagat
1321 cacagtcttc aaggagatca gctacaccac ctcttctgt catcaactca gatgggttcc
1381 caagcgttca ttcaaaaact tgctgggtaa tccccaggcc tctatagctc agatattgtt
1441 cacagtcgta ctgggactgg ttataggtgc catttacttt gggctaaaaa atgattctac
1501 tggaatccag aacagagctg gggttctctt ctctctgacg accaaccagt gtttcagcag
1561 tgtttcagcc gtggaactct ttgtggtaga gaagaagctc ttcatacatg aatacatcag
1621 cggatactac agagtgtcat cttatttctt tggaaaactg ttatctgatt tattaccat
                                         <-----
1681 gacgatgta ccaagtatta tatttacctg tatagtgtac ttcatgtag gattgaagcc
-----forward Primer-----> <-----Sonde---
1741 aaaggcagat gccttcttcg ttatgatggt tacccttatg atgggtggctt attcagccag
-----> <-----reverse Primer--
1801 ttccatggca ctggccatag cagcaggtca gagtgtgggt tctgtagcaa cacttctcat
----->

1861 gaccatctgt tttgtgttta tgatgatttt ttcaggtctg ttggtcaatc tcacaaccat
1921 tgcacatctg ctgtcatggc ttcagtactt cagcattcca cgatatggat ttacggcttt
1981 gcagcataat gaatTTTTGG gacaaaactt ctgccaggga ctcaatgcaa caggaaacaa
2041 tccttgtaac tatgcaacat gtactggcga agaataattg gtaaagcagg gcacgatctt
2101 ctaccctggg ggcttgtgga agaatcacgt ggccttggct tgtatgattg ttatTTTctt
2161 cacaattgcc tacctgaaat tgTTatTTct taaaaaata tctTaaattt cccctTaat
2221 cagtatgatt taccctcaca taaaaagaa gcactttgat tgaagtattc aatcaagttt
2281 ttttgttgtt ttctgttccc ttgccatcac actgttgcac agcagcaatt gttttaaaga
2341 gatacatttt tagaaatcac acaaaactga atTaaacatg aaagaaccca aaaaaaaga
2401 taccactcag cataatga

```

mRNA-Sequenz von mrp5 (AN-Nr.: AF146074):

```

1 gggagatgag gtgggaggat tgcttgagcc caggagttca agaccagccc ggggcaacat
61 agtgaacccc tgtctgtaca aaaataaatc tcgggagcgt ggttgagcgg ctggcgcggt
121 tgtcctggag caggggcgca ggaattctga tgtgaaacta acagtctgtg agccctggaa
181 cctccactca gagaagatga aggatatcga cataggaaaa gagtatatca tccccagtcc
241 tgggtataga agtgtgaggg agagaaccag cacttctggg acgcacagag accgtgaaga
301 ttccaagttc aggagaactc gaccgttgga atgccaaagat gccttggaaa cagcagcccg
361 agccgagggc ctctctcttg atgcctccat gcattctcag ctcagaatcc tggatgagga
421 gcatcccaag ggaaagtacc atcatggcct gagtgctctg aagcccatcc ggactacttc
481 caaacaccag caccagtgga acaatgctgg gcttttttcc tgtatgactt tttcgtggct
541 ttcttctctg gcccggtgag cccacaagaa gggggagctc tcaatggaag acgtgtggtc
601 tctgtccaag cagagtcctt ctgacgtgaa ctgcagaaga ctagagagac tgtggcaaga
661 agagctgaat gaagttgggc cagacgtgac ttcctgcga agggttgtgt ggatcttctg
721 ccgaccaggg ctcatcctgt ccatcgtgtg cctgatgatc acgcagctgg ctggcttcag
781 tggaccagcc ttcattggtg aacacctctt ggagtatacc caggcaacag agtctaacct
841 gcagtacagc ttgttgtagg tgctgggcct cctcctgacg gaaatcgtgc ggtcttggtc
901 gcttgactg acttgggcgt tgaattaccg aaccgggtgc cgcttgcggg gggccatcct
961 aaccatggca ttttaagaaga tccttaagtt aaagaacatt aaagagaaat ccctgggtga
1021 gctcatcaac atttgctcca acgatgggca gagaatgttt gaggcagcag ccgttggcag
1081 cctgctggct ggaggaccgg ttgttgccat cttaggcatg atttataatg taattattct
1141 gggaccaaca ggcttcctgg gatcagctgt ttttatcctc ttttaccag caatgatggt
1201 tgcacacagg ctcacagcat atttcaggag aaaatgcgtg gccgccacgg atgaacgtgt
1261 ccagaagatg aatgaagttc ttacttacat taaatztatc aaaatgtatg cctgggtcaa
1321 agcattttct cagagtgttc agaaaatccg cgaggaggag cgtcggatat tggaaaaagc
1381 cgggtacttc cagagcatca ctgtgggtgt ggctccatt gtggtggtga ttgccagcgt
1441 ggtgaccttc tctgttcata tgaccctggg cttcgatctg acagcagcac aggctttcac
1501 agtggtgaca gtcttcaatt ccatgacttt tgctttgaaa gtaacaccgt tttcagtaaa
1561 gtccctctca gaagcctcag ttgctgttga cagatttaag agtttgtttc taatggaaga
1621 ggttcacatg ataaagaaca aaccagccag tcctcacatc aagatagaga tgaaaaatgc
1681 caccttgcca tgggactcct cccactccag tatccagaac tcgcccagc tgaccccaa
1741 aatgaaaaaa gacaagaggg cttccagggg caagaaagag aaggtgaggg agctgcagcg
1801 cactgagcat caggcgggtc tggcagagca gaaaggccac ctctcctgg acagtacga
1861 gcggcccagt cccgaagagg aagaaggcaa gcacatccac ctgggcccacc tgcgcttaca
1921 gaggacactg cacagcgtcg atctggagat ccaagagggg aaactgggtg gaatctgagg
1981 cagtgtggga agtggaaaaa cctctctcat ttcagccatt ttaggccaga tgacgcttct
2041 agagggcagc attgcaatca gtggaacctt cgcttatgtg gcccagcagg cctggatcct
2101 caatgctact ctgagagaca acatcctggt tgggaaggaa tatgatgaag aaagatacaa
2161 ctctgtgctg aacagctgct gcctgaggcc tgacctggcc attcttccca gcagcgacct
2221 gacggagatt ggagagcag gagccaacct gagcgggtgg cagcgcagga ggatcagcct
2281 tgcccgggcc ttgtatagtg acaggagcat ctacatcctg gacgaccccc tcagtgcctt
2341 agatgcccac gtgggcaacc acatcttcaa tagtgctatc cggaaacatc tcaagtcaa
2401 gacagttctg tttgttacct accagttaca gtacctggtt gactgtgatg aagtgatctt
2461 catgaaagag ggctgtatta cggaaagagg caccatgag gaactgatga atttaaattg
2521 tgactatgct accatthttt ataacctggt gctgggagag acaccgccag ttgagatcaa
2581 ttcaaaaaag gaaaccagtg gttcacagaa gaagtcaaaa gacaagggtc ctaaaacagg
2641 atcagtaaag aaggaaaaag cagtaaagcc agaggaaggg cagcttgtgc agctggaaga
2701 gaaagggcag ggttcagtgc cctggtcagt atatggtgtc tacatccagg ctgctggggg
2761 ccccttgcca ttcctgggta ttatggccct tttcatgctg aatgtaggca gcaccgctt
2821 cagcacctgg tggttgagtt actggatcaa gcaaggaagc gggaacacca ctgtgactcg
2881 agggaacgag acctcgggtg gtgacagcat gaaggacaat cctcatatgc agtactatgc
2941 cagcatctac gccctctcca tggcagtcac gctgatcctg aaagccattc gaggagtgtg
3001 ctttgtcaag ggcacgctgc gagcttctct cgggctgcat gacgagcttt tccgaaggat
3061 ccttcaagc cctatgaagt tttttgacac gacccccaca gggaggattc tcaacaggtt

```


Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

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

Datum: Greifswald, den 07. Februar 2003

Unterschrift

Lebenslauf

Name: Björn-Niklas Heydrich

Geburtstag: 06. Dezember 1975 in Lübeck

Schulischer Werdegang:

1982 - 1986 Kaland Grundschule Lübeck

1986 - 1995 Johanneum zu Lübeck

17.06.1995 Allgemeine Hochschulreife

Beruflicher Werdegang:

08/1995 – 08/1996 Zivildienst auf der hämatologisch-onkologischen Station der Medizinischen Universität zu Lübeck

seit 10/96 Medizinstudium an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität in Greifswald

23.09.1998 Physikum

31.08.1999 1. Staatsexamen

18.09.2001 2. Staatsexamen

Famulaturen:

Praxis für Chirurgie, Lübeck

Klinik für Innere Medizin, Hämatologie/Onkologie, am Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart

Klinik für Innere Medizin, Kardiologie, Greifswald

Klinik für Innere Medizin, Hämatologie/Onkologie, Greifswald

Praktisches Jahr:

15.04.2002 – 14.03.2003

1. Tertial: Chirurgische Klinik, Kantonsspital Winterthur, Schweiz

Klinik für Chirurgie, Traumatologie, Greifswald

2. Tertial: Klinik für Innere Medizin, Pulmonologie, Greifswald

3. Tertial: Klinik für Radiologie, Greifswald

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kroemer für die Vergabe dieses interessanten Themas und die immer aufmunternden Anregungen und Ratschläge.

Bei Frau Dr. Jedlitschky und Herrn Dr. Sperker bedanke ich mich für die wissenschaftliche Betreuung und die unermüdliche Bereitschaft, Fragen zu diskutieren und Denkanstöße zu geben.

Bei Frau Kalb, Frau Uecker und Frau Brüggmann bedanke ich mich für die Tipps und die Hilfe bei den praktischen Laborarbeiten.

Frau Dr. Vogelgesang und Frau Dr. Kunert-Keil am Institut für Pathologie danke ich für die Aufarbeitung der immunhistochemischen Proben.

Allen Doktoranden und Diplomanden am Institut für Pharmakologie möchte ich Dank sagen für die Anregungen bei meinen Versuchen und die fröhliche Atmosphäre im Labor.

Meinen Eltern danke ich für die liebevolle Unterstützung in allen Phasen meines Studiums und vor allem während der Anfertigung meiner Dissertation.