

...

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

**Untersuchungen zur Expression von ABC-Transportern im Rahmen zweier
Sepsismodelle der Maus**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

der medizinischen Fakultät

der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von:

Anna Victoria Buck

geboren am 11. Mai 1980

in Ostercappeln

Essen, 15.05.2008

Dekan: Prof. Dr. H.K. Kroemer
1. Gutachter: Prof. Dr. H. K. Kroemer
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Fromm
Tag der Disputation: 15.12.2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1. Einleitung	4
1.1 Definition, Diagnostik, Pathophysiologie und Therapie der Sepsis.....	4
1.2 Stofftransport über Membranen	7
1.3 Charakterisierung der untersuchten ABC-Transporter.....	9
1.4 P-Glykoprotein (MDR1a, ABCB1).....	10
1.5 Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2, cMOAT, ABCC2).....	11
1.6 Multidrug Resistance Protein 5 (MRP5, ABCC 5)	13
1.7 Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2, BCRP, MXR).....	14
1.8 ABC-Transporter in der Sepsis.....	16
1.9 Zielsetzung der Arbeit	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.2 Kits und Marker.....	20
2.1.3 Chemikalien/Reagenzien.....	20
2.1.4 Puffer/Lösungen	21
2.1.5 Enzyme	23
2.1.6 Antikörper.....	23
2.1.6.1 Primäre Antikörper.....	23
2.1.6.2 Sekundäre Antikörper.....	24
2.1.7 Plasmide	24
2.1.8 Bakterienstamm	24
2.1.9 Oligonukleotide/TaqMan®-Sonden	24
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Gewebeaufbereitung und Präparation der Gesamt-RNA	25
2.2.2 DNA-Extraktion aus Vollblut.....	25
2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	25
2.2.4 Gelelektrophorese.....	26
2.2.4.1 DNA-Gelelektrophorese.....	27
2.2.4.2 RNA-Gelelektrophorese	27

2.2.5	Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	28
2.2.6	cDNA-Quantifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
2.2.6.1	Konventionelle PCR.....	30
2.2.6.2	TaqMan [®] -PCR.....	31
2.2.7	Auswertung der TaqMan- Ergebnisse	34
2.2.7.1	Standardkurvenmethode	34
2.2.8	Primer- und Sondensynthese	35
2.2.9	Herstellung eines Standards.....	36
2.2.9.1	PCR.....	36
2.2.9.2	Aufreinigung der PCR.....	37
2.2.9.3	Ligation und Transformation des PCR-Produktes	38
2.2.9.4	Plasmidpräparation	40
2.2.9.5	Restriktionsanalyse der Plasmidkonstrukte.....	40
2.2.9.6	Herstellung der TaqMan-Standardkurve	41
2.2.10	Statistische Auswertung	41
2.2.11	Immunfluoreszenz	41
3.	Ergebnisse	43
3.1	RNA-Isolation	43
3.2	Primer- und Sondendesign	43
3.3	Standardklonierung.....	46
3.4	Gewebeverteilung.....	47
3.5	Ergebnisse der Immunfluoreszenz.....	51
3.6	Ergebnisse der mRNA-Expression in den verschiedenen Tiergruppen	53
3.6.1	mRNA-Ergebnisse von P-Glykoprotein.....	53
3.6.2	mRNA-Ergebnisse von mrp2	55
3.6.3	mRNA-Ergebnisse von mrp5	57
3.6.4	mRNA-Ergebnisse von BCRP1	59
4.	Diskussion.....	62
4.1	Gewebeverteilung.....	64
4.2	Verhalten der Transporter bei Sepsis.....	66
5.	Zusammenfassung.....	75
6.	Literaturverzeichnis.....	77

7. Anhang.....	81
7.1 Genomische Sequenz.....	81
7.1.1 mdr1a.....	81
7.1.2 mrp2.....	81
7.1.3 mrp5.....	81
7.1.4 BCRP1.....	81

Abkürzungsverzeichnis

A. ad inj	Aqua ad injectabilia
A. dest	Aqua dest
ABC	<i>ATP-Binding-Cassette</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
CARS	<i>compensatory anti-inflammatory response syndrome</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CMM	<i>TaqMan Master Mix</i>
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
EtBr	Ethidiumbromid
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FET	Fluoreszenzenergietransfer
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
MARS	<i>mixed antagonistic response syndrome</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MDR	<i>Multi-drug Resistance</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NBD	Nukleotid-bindende Domäne
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-κB</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
rRNA	Ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRS	<i>Systemic inflammatory response syndrome</i>
ssDNA	Einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin
TNF- α	Tumor nekrose Faktor α

TMD	Transmembranäre Domäne
Tris	Trishydroxy-methyl-amino-methan
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Maße und Einheiten

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm = 10^{-6} Gramm
µl	Mikroliter = 10^{-6} Liter
µM	Mikromolar = 10^{-6} Molar
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
cm ²	Quadratcentimeter
g	Normalbeschleunigung g_n (9,891 m/s ²)
h	Stunde
kB	Kilobasen = 10^3 Basenpaare
kD	Kilodalton = 10^3 Dalton
mg	Milligramm = 10^{-3} Gramm
ml	Milliliter = 10^{-3} Liter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm = 10^{-9} Gramm
nM	Nanomolar = 10^{-9} Molar
nm	Nanometer = 10^{-9} Meter
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
U	Unit
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen

1. Einleitung

Nach neusten Erhebungen erkranken in Deutschland pro Jahr 75.000 Einwohner an einer schweren Sepsis bzw. an einem septischen Schock und 79.000 an einer Sepsis. Trotz moderner Intensivmedizin stellen septische Erkrankungen die dritthäufigste Todesursache nach dem akuten Myokardinfarkt dar (Linde-Zwirble and Angus 2004). In Anbetracht der zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge gibt es viele verschiedene Interventionsmöglichkeiten der Intensivmedizin. Doch trotz dieser Therapieversuche stellte das Krankheitsbild Sepsis die Medizin immer noch vor schwerwiegende Probleme und ist somit von großer klinischer Relevanz.

1.1 Definition, Diagnostik, Pathophysiologie und Therapie der Sepsis

Vielfach werden die Begriffe „severe inflammatory host response“ (SIRS), Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock verwechselnd gebraucht. Sepsis, als systemische Entzündungsantwort auf eine Infektion, wird derzeit nach den Kriterien des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) definiert.

Tabelle 1-1 Diagnosekriterien von Sepsis, SIRS und schwere Sepsis

	Kriterium
<i>I</i>	<p><i>Nachweis der Infektion:</i></p> <p>Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis einer Infektion oder durch klinische Kriterien</p>
<i>II</i>	<p><i>Severe inflammatory host response (SIRS) (mindestens zwei Kriterien):</i></p> <p>Körpertemperatur > 38°C oder < 36°C</p> <p>Herzfrequenz > 90 Schläge pro Minute</p> <p>Atemfrequenz > 20 pro Minute oder PaCO₂ < 32 mmHg</p> <p>Leukozytenzahl > 12.000 Zellen/mm³ oder < 4.000 Zellen/mm³ oder > 10% unreife Zellen</p>
<i>III</i>	<p><i>Akute Organdysfunktion (mindestens ein Kriterium):</i></p> <p>Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delir</p>

Relative oder absolute Thrombozytopenie

Arterielle Hypoxämie

Renale Dysfunktion

Metabolische Azidose

Eine Sepsis liegt in den Fällen vor, wenn ein SIRS durch eine biologisch oder klinisch nachgewiesene Infektion verursacht ist, wenn also die Kriterien der Klasse I und II erfüllt sind. Für die Definition einer schweren Sepsis müssen die Kriterien aller drei Kategorien erfüllt sein. In diesem Zusammenhang definiert sich der septische Schock durch die Kriterien I und II, sowie für wenigstens eine Stunde ein systolischer arterieller Druck < 90 mmHg oder ein notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen, arteriellen Blutdruck > 90 mmHg zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumensubstitution und ist nicht durch andere Ursache zu erklären.

In der frühen Phase der Sepsis steht das SIRS bedingt durch eine Überaktivierung des angeborenen, nichtspezifischen Immunsystems und damit einhergehender intravaskulärer Volumendepletion, peripherer Vasodilatation, myokardialer Depression und Hyperkoagulabilität im Vordergrund. Dies führt im weiteren Verlauf zu Hypoperfusion des Gewebes und inadäquater Oxygenierung mit konsekutivem Multiorganversagen. Pathophysiologisch steht die Aktivierung von Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten im Vordergrund. Diese werden von den eindringenden Mikroorganismen über spezifische Oberflächenrezeptoren, wie CD14 und Mitgliedern der „Toll-like-Rezeptorfamilie“, aktiviert. Die systemische Stimulation der Monozyten/Makrophagen führt zu einer exzessiven Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), „macrophage migration inhibitory factor“ (MIF) und über die Ausschüttung des „high mobility group-1“ (HMG-1) zu einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen sowie zur Bildung von Sauerstoffradikalen. Eine besondere Rolle im generalisierten Entzündungsprozess spielt das Endothel. Es produziert in großen Mengen NO als vasoaktive Substanz, setzt Mediatoren frei und exprimiert Adhäsionsmoleküle, wodurch Granulozyten und Monozyten festgehalten werden. Dadurch kommt es zum Verlust der Zellintegrität des Endothels mit Permeabilitätsstörungen und Ödembildung (kapillares Leck) sowie zum Verlust der normalen Regulationsfähigkeit des Endothels mit Vasodilatation. Insgesamt verursachen die freigesetzten Mediatoren am Endothel und an den Organen eine Maldistribution des Blutflusses im Bereich der Mikrozirkulation mit

Störung der Verteilung von Sauerstoffbedarf und Sauerstoffversorgung, eine Permeabilitätsstörung des Endothels mit Ödembildung und eine direkte Schädigung der Zellfunktion und Zellstruktur durch zytotoxische Mediatoren bzw. auch eine endotoxisch-hypoxische Schädigung (Vgl. Abbildung 1-1). In der folgenden Phase kann es durch die Freisetzung antiinflammatorischer Faktoren wie dem Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10), dem Interleukin-1-Rezeptorantagonisten, Kortison und Adenosin, zu einer kompensatorischen antiinflammatorischen Gegenreaktion (CARS, „*compensatory anti-inflammatory response syndrome*“) kommen, die bei einem Überschüssen zu einer Immunsuppression oder Anergie führen kann. Sowohl SIRS- als auch CARS-Phasen können sich im weiteren Sepsisverlauf abwechseln, man spricht dann vom „*mixed antagonistic response syndrome*“ (MARS) (Vgl. Abbildung 1-2).

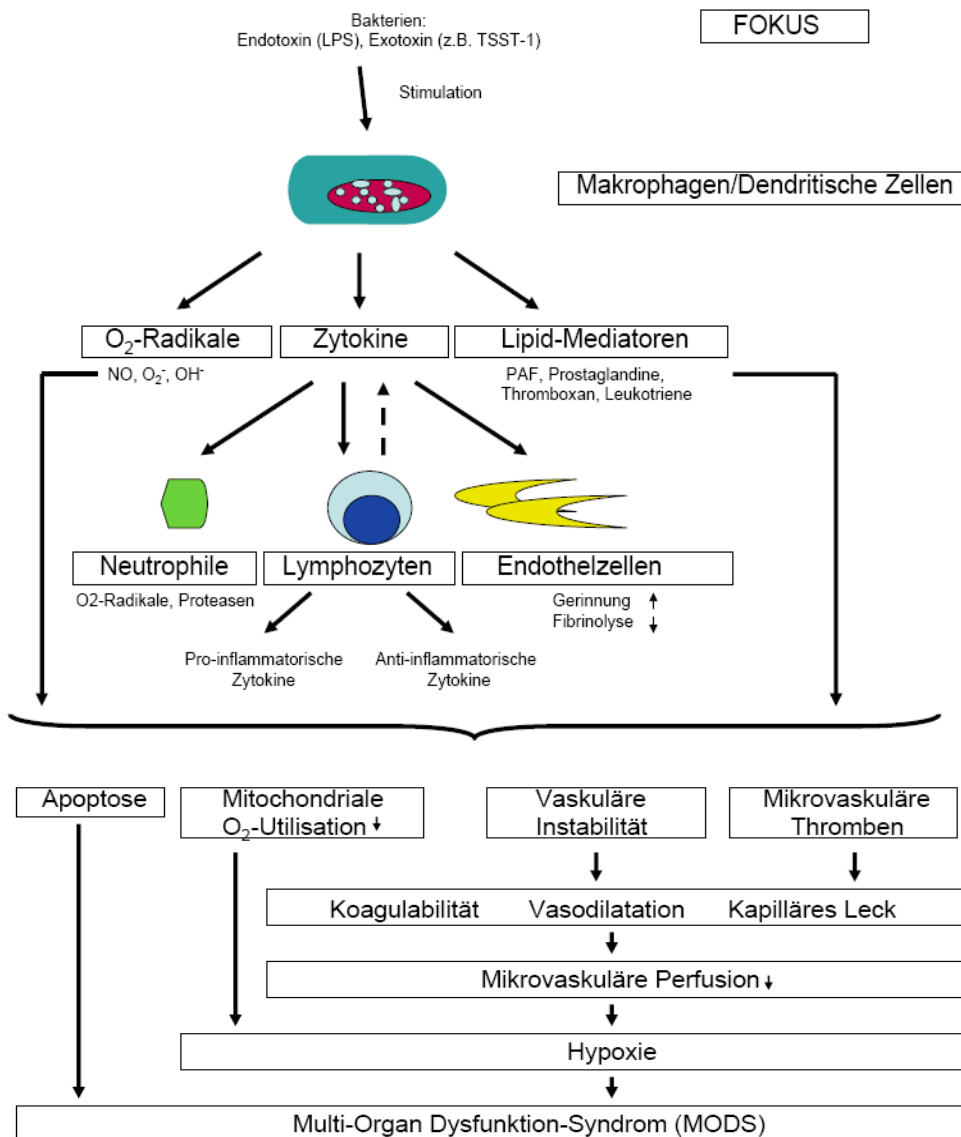


Abbildung 1-1 Pathophysiologie der Sepsis (Weigand, Bardenheuer et al. 2003)

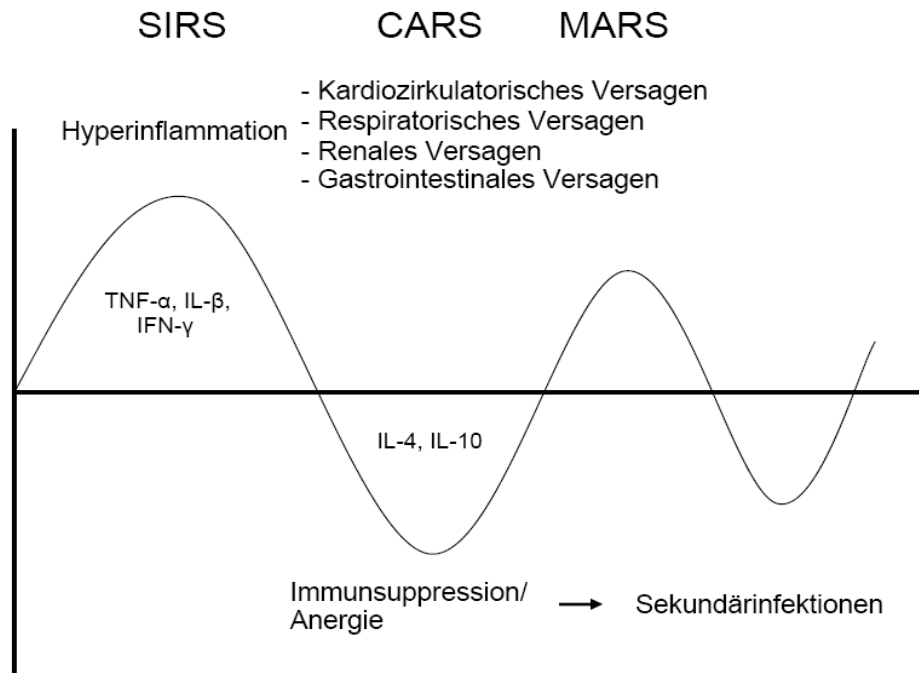


Abbildung 1-2 Dynamik eines septischen Verlaufs (Weigand, Bardenheuer et al. 2003)

Das klinische Management von septischen Patienten setzt sich im Wesentlichen aus vier Basissäulen zusammen. Dabei steht die Initiierung einer antimikrobiellen Therapie entweder im Rahmen einer kalkulierten oder auch gezielten Therapie im Vordergrund. Ist es möglich, einen Fokus zu identifizieren, ist dieser zu sanieren. Des Weiteren sind supportive Maßnahmen wie eine adäquate Volumentherapie, eine Katecholamintherapie bei Kreislaufinstabilität, sowie Prophylaxe von Thrombosen und gastrointestinalen Ulzera angeraten. Als vierter Bestandteil der Sepsistherapie sind dann noch spezielle Maßnahmen wie die Modulation des Gerinnungs- und Inflammationssystems z.B. die Gabe von Steroiden zu sehen. (Weigand, Bardenheuer et al. 2003)

1.2 *Stofftransport über Membranen*

Im Rahmen eines septischen Geschehens wird eine umfassende Arzneimitteltherapie im Sinne des oben genannten Säulen-Konzeptes der Sepsistherapie eingesetzt. In diesem Zusammenhang erfolgt nicht nur die Initialisierung einer adäquaten antimikrobiellen Therapie, sondern beispielsweise auch die Applikation von Hydrocortison. Dabei muss jeder exogene und endogene Stoff auf seinem Weg in und durch den Körper zahlreiche physiologische Barrieren überwinden. Diese Barrieren werden gebildet durch Epi- und Endothelien, die wiederum aus

einzelnen Zellen bestehen. Auf molekularer Ebene müssen die jeweiligen Substanzen daher vor allem die Plasmamembranen, hydrophobe Lipiddoppelschichten, überwinden, die eine sehr effektive Abgrenzung der Zellen zur Umgebung erlauben.

Generell kann die Überwindung der Membranen über zwei verschiedene Mechanismen erfolgen: durch passiven oder aktiven Transport. Zu den Hauptaufgaben dieser Vorgänge zählen die Ver- und Entsorgung der einzelnen Zellen mit Nährstoffen bzw. Metabolisierungsprodukten, der Ionen-transport und alle davon abgeleiteten Funktionen (Membranpotential, Signalweiterleitung, usw.). Aber auch zelltypspezifische Funktionen, wie beispielsweise die Aufnahme von Abbauprodukten in die Hepatozyten und deren Elimination in die Galle, Reabsorptionsvorgänge in der Niere und die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Darm gehören zu diesen Aufgaben.

Mechanismen des passiven Transportes, der energieunabhängig entlang eines Konzentrationsgradienten stattfindet, sind Diffusion und erleichterte Diffusion. Bei der Diffusion treten nichtpolare Moleküle durch die Membran. Im Rahmen der erleichterten Diffusion können auch hydrophile Teilchen und Ionen, mittels eines „Trägers“ die Membran passieren. Als „Träger“ dienen in solchen Fällen entweder Carrier-Proteine oder Ionenkanäle, die die gesamte Lipiddoppelschicht durchsetzen und über spezifische Bindungsstellen für ihre Substrate verfügen. Durch ihre limitierte Anzahl ist diese Form des Transportes jedoch sättigbar. Weiterhin gibt es den sekundär-aktiven Transport, bei dem ein Transport gegen einen Konzentrationsgradienten möglich ist, da der Transfer einer Substanz an den einer zweiten gekoppelt ist, für die wiederum ein Konzentrationsgefälle besteht. Bei diesem „Kosubstrat“ handelt es sich häufig um Natrium, da für dieses Ion ein elektrochemischer Gradient über die Zellmembran besteht, der zudem sehr effektiv aufrechterhalten wird. Bei den sekundär aktiven Transporten unterscheidet man wiederum den Symport, bei dem der zu transportierende Stoff in der gleichen Richtung beispielsweise des Natriumtransportes transportiert wird und den Antiport, bei dem der Transport entgegengesetzt erfolgt. Als Beispiel kann dabei die Glucoseaufnahme im Darm angeführt werden. Dabei wird die Glucose im Symport mit Natriumionen transportiert.

Der aktive Transport schließlich, dessen treibende Kraft der Verbrauch energiereicher Verbindungen ist, kann Substanzen direkt gegen einen Konzentrationsgradienten transportieren. Er ist, durch Aufrechterhaltung des Natriumgradienten mittels der Natrium-Kalium-ATPase, auch die treibende Kraft der sekundär-aktiven Transporte.

Die in dieser Arbeit untersuchten Transporter gehören in die Gruppe der primär-aktiven Transportmechanismen, d.h. diese Transporter beziehen die benötigte Energie aus der Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat. Da eine Gruppe von ATP-abhängigen Transportproteinen ein

bzw. zwei intrazelluläre ATP-Bindungsstellen aufweist, werden sie deshalb auch als *ATP-Binding-Cassette*(ABC)-Transportproteine bezeichnet.

1.3 Charakterisierung der untersuchten ABC-Transporter

ATP-Binding-Cassette-Transporter sind eine Gruppe von transmembranären Proteinen, die den primär-aktiven Transport von Substanzen gegen einen Konzentrationsgradienten vermitteln. ABC-Transporter sind sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten bekannt und für viele Transportprozesse in der Zelle unentbehrlich. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind 51 ABC-Transporter beim Menschen beschrieben. Einige besitzen die aus medizinischer Sicht problematische Eigenschaft durch vermehrte Elimination, Resistenzen gegenüber bestimmten Arzneimitteln z.B. Zytostatika zu erzeugen. Weiterhin sind einige bedeutende Erbkrankheiten auf genetische Varianten einzelner dieser Proteine zurückzuführen. Beispielhaft seien hier nur die Cystische Fibrose genannt, bei der ein Defekt im CFTR-Gen (Cystosis Fibrosis Transmembrane Conductant Regulator) zu einem defekten Chloridkanal (ABCC7) führt, oder das Dubin-Johnson-Syndrom, wobei ein defekter MRP2-Transporter (ABCC2) zu Störungen im Cholesteroll- und Gallensäuretransport führt (Dubin and Johnson 1954).

Auf Grundlage der Organisation der Transmembrandomänen und Homologien der Aminosäuresequenzen kann die Superfamilie der ABC-Transporter in sieben Familien (ABCA-ABCG) eingeteilt werden (Dean, Hamon et al. 2001). Die meisten ABC-Transporter besitzen zwei intrazellulären ATP-Bindungsstellen (NBD – *nucleotide binding domain*) und zwei Transmembrandomänen (TMD) mit jeweils sechs transmembranären α -Helices (Borst, Evers et al. 2000). Die Nukleotid-bindenden Domänen enthalten jeweils drei konservierte Sequenzen, die Walker A- und Walker B-Sequenz, die man in allen ATP-bindenden Proteinen findet, und die für die ABC-Transporter spezifische Domäne C. Das bekannteste Beispiele in diesem Zusammenhang ist sicherlich das Permeability-Glykoprotein (P-Glykoprotein, P-gp). Neben diesen „full“-Transportern, gibt es so genannte „half“-Transporter, die nur eine transmembranäre Domänen mit sechs α -Helices, und eine ATP-Bindungsstellen aufweisen. Um ihre Funktion ausüben zu können, müssen sie jedoch dimerisieren. Der bekannteste Vertreter dieser Familie ist das *breast cancer resistance protein* (BCRP/ABCG2).

Neben ihrer Rolle bei physiologischen/pathophysiologischen Vorgängen und Arzneimittelresistenz sind ABC-Transportproteine von pharmakokinetischem Interesse, da sie eine Erklärung liefern, wie ein Wirkstoff letztendlich in die Zelle gelangt oder aus ihr eliminiert wird. So ist beispielsweise P-gp in der Literatur als ein Transporter mit ubiquitärem Vorkommen

und breitem Substratspektrum beschrieben. Eine potenzielle Modulation der Transporterexpression von P-gp im Rahmen eines septischen Geschehens ist von großer klinischer Relevanz. Das Interesse an einer Regulation von MRP2 unter septischen Bedingungen basiert auf der hepatischen Lokalisation des Transporters. Die Leber als wichtiges Detoxifikationsorgan und das Auftreten eines septischen Leberversagens lassen die Leber zu einem zentralen Organ der Sepsis werden. MRP5 stellt einen Regulationsmechanismus der intrazellulären cGMP-Konzentration dar. cGMP als second messenger von NO weist bei physiologischen Vorgängen einen Einfluss auf die Kontraktilität einer Zelle auf, welches v.a. im Bezug auf glatte Gefäßmuskelzellen und das Myokard von Interesse ist. Kommt es im Rahmen einer Sepsis zu einer veränderten Expression von MRP5, kann dies konsekutiv zu veränderten intrazellulären cGMP-Spiegeln führen. Dem gegenüber steht der Transporter BCRP1, der aufgrund seines Auftretens als „Half“-Transporter, aber ähnlicher Funktionalität zu den bislang betrachteten Transportern, ausgewählt wurde.

1.4 *P-Glykoprotein (MDR1a, ABCB1)*

P-Glykoprotein (P-gp) ist ein phosphoryliertes und glykosyliertes Plasmamembranprotein aus der Gruppe der ABC-Transporter, welche in die Untergruppe der ABCB-Familie gehört. Die Erstbeschreibung erfolgte durch *Juliano et al* (Juliano and Ling 1976). Mittlerweile sind weitere nah verwandte Gene gefunden worden, die ebenfalls für P-gp bzw. P-gp-ähnliche Proteine kodieren, im Menschen Multi-Drug-Resistance 1 (MDR1) und MDR3, bei Nagern *mdr1a*, *mdr1b* und *mdr2* (Gottesman and Pastan 1993; Schinkel, Wagenaar et al. 1996). Diese wurden anhand von Sequenzhomologien in der 3'-untranslatierten Regionen der Gene in drei Klassen eingeteilt. (Bellamy 1996).

Tabelle 1-2 Nomenklatur der "multidrug resistance" Gene (Bellamy 1996)

	Klasse I	Klasse II	Klasse III
	resistenzvermittelnd		
Mensch	MDR1		MDR2 (MDR3)
Maus	<i>mdr1a</i> (<i>mdr3</i>)	<i>mdr1b</i> (<i>mdr1</i>)	<i>mdr2</i>
Hamster	<i>pgp1</i>	<i>pgp2</i>	<i>pgp3</i>
Ratte	<i>mdr1a</i> (<i>pgp1</i>)	<i>mdr1b</i> (<i>pgp2</i>)	<i>mdr2</i> (<i>pgp3</i>)

Eine Gruppe um *Thiebaut* identifizierte 1987 P-Glykoprotein in gesunden menschlichen Geweben wie Leber, Niere, Darm und Gehirn (Thiebaut, Tsuruo et al. 1987). Die in diesem Zusammenhang beschriebene Lokalisation im Bereich der Blut-Hirn-Schranke, in Gefäßendothelien, in Enterozyten und Hepatozyten und die polare Expression im Epithel legt eine Bedeutung dieses Transporters für die Pharmakokinetik von Arzneimitteln nahe.

P-Glykoprotein hat mit 1280 Aminosäuren ein Molekulargewicht von 190 kD. Es besteht, wie viele Mitglieder der ABC-Familie, aus zwei transmembranären Domänen (TMD), welche jeweils aus sechs transmembranären α -Helices und einer Nukleotidbindungsstelle (NBD) aufgebaut sind. Viele pharmakologisch wichtige Wirkstoffgruppen, wie Chemotherapeutika (z.B. Anthrazykline wie Doxorubizin, Daunorubizin oder Alkaloide wie Vincristin und Vinblastin), Immunsuppressiva (z.B. Ciclosporin A) und Arzneimittel mit kardialen Wirkungen (z.B. Digoxin und Talinolol) zählen zu P-gp-Substraten (Sakaeda, Nakamura et al. 2002). Auch die im Rahmen der Sepsis zum Einsatz kommenden Steroide z.B. Hydrocortison sind als Substrate des P-gp-vermittelten Transportes beschrieben (Yates, Chang et al. 2003).

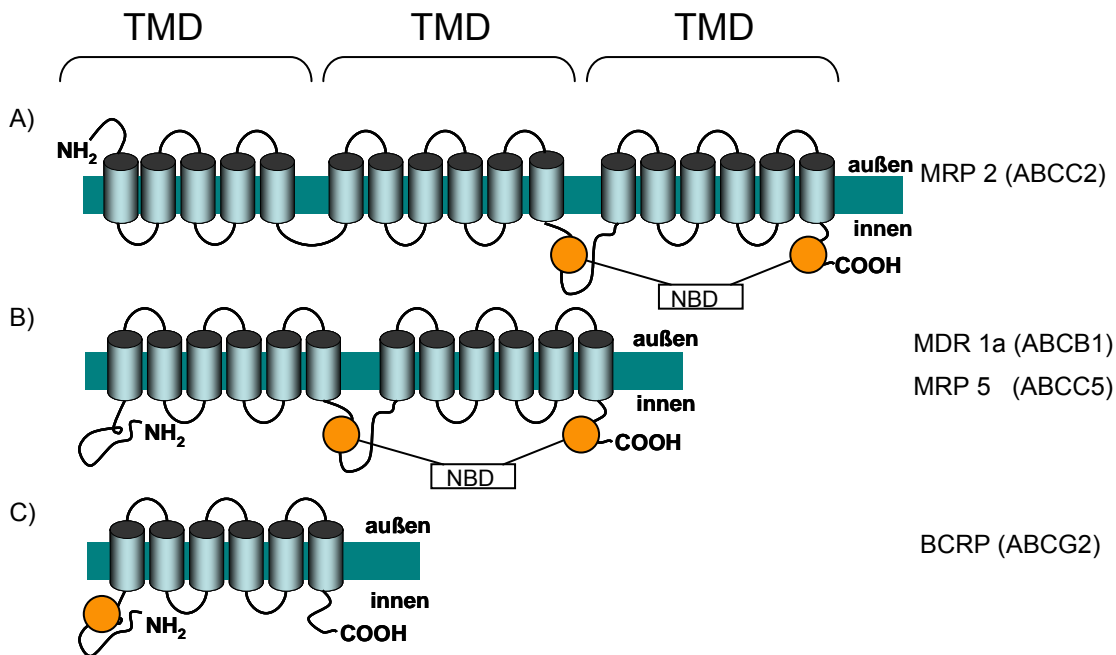


Abbildung 1-3 schematischer Aufbau der Transporter

1.5 Multidrug Resistance Protein 2 (MRP2, cMOAT, ABCC2)

Die ABCC-Familie bildet mit zwölf Mitgliedern die größte Gruppe der humanen ABC-Transporter, darunter das MRP1 bis MRP9 [ABCC 1-6, ABCC 10-12], die beiden regulatorischen Proteine SUR1 und 2 (Sulfonylurea Receptor) [ABCC8 und ABCC9] und das in der Pathogenese der cystischen Fibrose wichtige CFTR (Cystosis Fibrosis Transmembrane

Conductant Regulator) [ABCC7]. Während die MRP's Effluxtransporter im eigentlichen Sinne sind, handelt es sich bei SUR1 und 2 um regulatorische Untereinheiten von Kaliumkanälen und beim CFTR um einen Chloridkanal, der von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) reguliert wird.

Das MRP2 (ABCC2), zunächst auch aufgrund seiner Lokalisation in der kanalikulären Hepatozytenmembran als cMOAT (canalicular multispecific organic anion transporter) bezeichnet, hat hinsichtlich Struktur und Substratspektrum große Ähnlichkeit mit dem MRP1 (ABCC1), das nach dem P-gp als zweiter wichtiger Vertreter der Resistenz-vermittelnden ABC-Transporter identifiziert wurde (Cole, Bhardwaj et al. 1992). MRP2 ist ein aus 1545 Aminosäuren bestehendes Phosphoglykoprotein, dessen Gen auf dem Chromosom 10q24 kodiert ist. (Dean, Hamon et al. 2001) Topologisch ist der Transporter in drei transmembranäre Domänen (TMD) organisiert. Im Unterschied zu dem zuvor beschriebenen P-gp besitzt MRP2 zusätzlich am N-terminalen Ende fünf weitere transmembranäre α -Helices. Die TMD sind jeweils durch Verbindungsregionen miteinander verbunden, in dessen C-terminalen Bereich sich jeweils die ATP-Bindungsstellen befinden (Gerk and Vore 2002) (Vgl. Abbildung 1-3.). Bei Untersuchungen der subzellulären Lokalisation ist der Transporter in der kanalikulären Membran von Hepatozyten, aber auch in polaren Zellen anderer Gewebe, wie der Niere, der Gallenblase und des Intestinums zu finden. (Rost, König et al. 2001; Schaub, Kartenbeck et al. 1999; Mottino, Hoffman et al. 2000) Analysen der murinen Gewebeverteilung von *mrp2* zeigten ein Vorkommen des Transporters in Darm, Leber und Niere (Maher, Slitt et al. 2005).

MRP2 transportiert eine große Vielzahl von endogenen und xenobiotischen Verbindungen, wobei es sich vorrangig um amphiphile Anionen und lipophile Stoffe handelt, die mit Glutathion, Glukuroniden oder Sulfaten konjugiert sind. In der Literatur sind hierfür beispielsweise endogene Substrate wie das Glutathion-S-Konjugat von Leukotrien C₄ (Jedlitschky and Keppler 2002), Estradiol-17 β -, Bilirubin-Glukuronid und konjugierte Gallensalze beschrieben (Jedlitschky, Leier et al. 1997; Kamisako, Leier et al. 1999; Jedlitschky, Hoffmann et al. 2006). Als Substrate exogenen Ursprungs sind Methotrexat (Masuda, Iizuka et al. 1997), Temocaprilat (Ishizuka, Konno et al. 1997), Pravastatin (Yamazaki, Akiyama et al. 1997) und aus der Gruppe der Chemotherapeutika Vincristin, Etoposid, Doxorubizin und Topotecan nachgewiesen worden. Auch Antibiotika wie Ampicillin, Ceftriaxon und Grepafloxacin, die u.a. auch in der Sepsistherapie eingesetzt werden, werden vom MRP2 transportiert (Keppler, Cui et al. 1999; Jedlitschky, Hoffmann et al. 2006).

Die physiologische Bedeutung des MRP2 wird auch an GY/TR⁻ Wistar und Eisai Hyperbilirubinämie Ratten (EHBR) deutlich, die aufgrund von Mutationen kein MRP2

exprimieren und eine Hyperbilirubinämie aufweisen. Ein ähnliches Phänomen – das Dubin-Johnson-Syndrom - ist beim Menschen beobachtet worden. Patienten mit dieser autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung leiden ebenfalls an einer chronischen, direkten, konjugierten Hyperbilirubinämie aufgrund einer mangelnden Elimination von Bilirubinkonjugaten (Dubin and Johnson 1954; Sprinz and Nelson 1954). Bei der pathophysiologischen Untersuchung des Krankheitsbildes konnte gezeigt werden, dass das in der apikalen Membran von Hepatozyten lokalisierte MRP2 nicht funktionstüchtig ist. (Kitamura, Jansen et al. 1990; Mayer, Kartenbeck et al. 1995; Kartenbeck, Leuschner et al. 1996)

1.6 Multidrug Resistance Protein 5 (MRP5, ABCC 5)

Der MRP5-Transporter ist ebenfalls ein Mitglied des C-Zweiges der ABC-Transporterfamilie. Bereits 1996 wurde ein Teil der *MRP5*-Sequenz bei einer EST-Datenbankanalyse (Expressed Sequence Tags) von der Arbeitsgruppe um *Allikmets* gefunden. Sie legten die Zugehörigkeit zur humanen MRP-Familie fest (Allikmets, Gerrard et al. 1996). *Kool* et al. identifizierten 1997 ebenfalls in einer EST-Datenbankanalyse Sequenzen anderer, bis dahin unbekannter MRP-Mitglieder und nannten sie MRP3, MRP4 und MRP5. Außerdem klonierten sie den MRP5-Transporter aus humaner Leber und fetalem Gehirn. Mittels Sequenzanalysen wurde gezeigt, dass MRP5 eine dem ABC-Transporter homologe Struktur aus zwei Transmembrandomänen und zwei ATP-Bindungsstellen besitzt. Mit Blick auf eine mögliche Beteiligung dieser MRP am Phänomen der Multidrug Resistance wurde deren Expression in verschiedenen zytostatika-resistenten Tumorzelllinien untersucht. Dabei wurde MRP5 in fast jeder getesteten Zelllinie nachgewiesen, es gelang jedoch nicht einen Zusammenhang mit der jeweiligen Resistenz der Zelllinie festzustellen. (Kool, de Haas et al. 1997)

MRP5 ist ein transmembranäres Transportprotein, das sowohl beim Menschen wie auch in der Maus aus 1437 Aminosäuren besteht. Dabei sind 12 Transmembranhelices in zwei transmembranäre Domänen (TMD) organisiert mit jeweils einer Nukleotidbindungsregion. (Belinsky, Bain et al. 1998) (vgl. Abbildung 1-3) In einem Vergleich der humanen MRP5-Sequenz mit der Sequenz der Maus konnte gezeigt werden, dass die Proteine eine Homologie von 94,1% aufweisen. (Suzuki, Sasaki et al. 2000)

Die Arbeitsgruppe um *Kool* hat in humanen Geweben eine hohe Expression von MRP5 im Skelettmuskel und Gehirn gefunden. Ebenfalls gelang ihnen der Nachweis in Lunge, Niere, Milz, Nerven, Magen, Gallenblase, Kolon und Herz. (Kool, de Haas et al. 1997) Im Rahmen von Untersuchungen zur subzellulären Organisation konnte MRP5 vorwiegend in der basolateralen

Zellmembran identifiziert werden (Wijnholds, Mol et al. 2000). Ergebnisse der Gewebeanalyse vom murinen *mrp5* zeigten ebenfalls die höchsten Expressionslevel im Gehirn und Skelettmuskel (Maher, Slitt et al. 2005).

Funktionell ist das MRP5 wie schon das MRP2 und viele andere ABC-Transporter ein multispezifischer, ATP-abhängiger Anionentransporter. Zu seinen Substraten gehören u.a. Glutathion (GSH) und die entsprechenden Konjugate, sowie verschiedene Chemotherapeutika wie 6-Mercaptopurin, Thioguanin oder PMEA (9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenin). (Wijnholds, Mol et al. 2000) Des Weiteren transportiert MRP5 aber auch zyklische Nukleotide. So konnten *Jedlitschky et al.* zeigen, dass MRP5 sowohl cGMP als auch cAMP transportiert, wobei cGMP das affinere Substrat darstellt (K_m -Wert für cGMP beträgt $2,1\mu\text{M}$ verglichen mit $379\mu\text{M}$ für cAMP). Damit kommt dem MRP5 neben den Phosphodiesterasen eine potentielle Bedeutung bei der Regulation der intrazellulären cGMP-Spiegel zu. (Jedlitschky, Burchell et al. 2000) (Vgl. Abbildung 1-4) Demgegenüber stehen die Beobachtungen von *Wielinga et al.*, wobei MRP5 als einen Transporter mit geringer Affinität zu zyklischen Nukleotiden gesehen wurde. Sie schrieben dem Transporter insgesamt eher eine Ventilfunktion bei Überangebot von cGMP zu, z.B. bei erhöhter cGMP-Synthese und limitiertem Abbau durch die Phosphodiesterase. (Wielinga, van der Heijden et al. 2003)

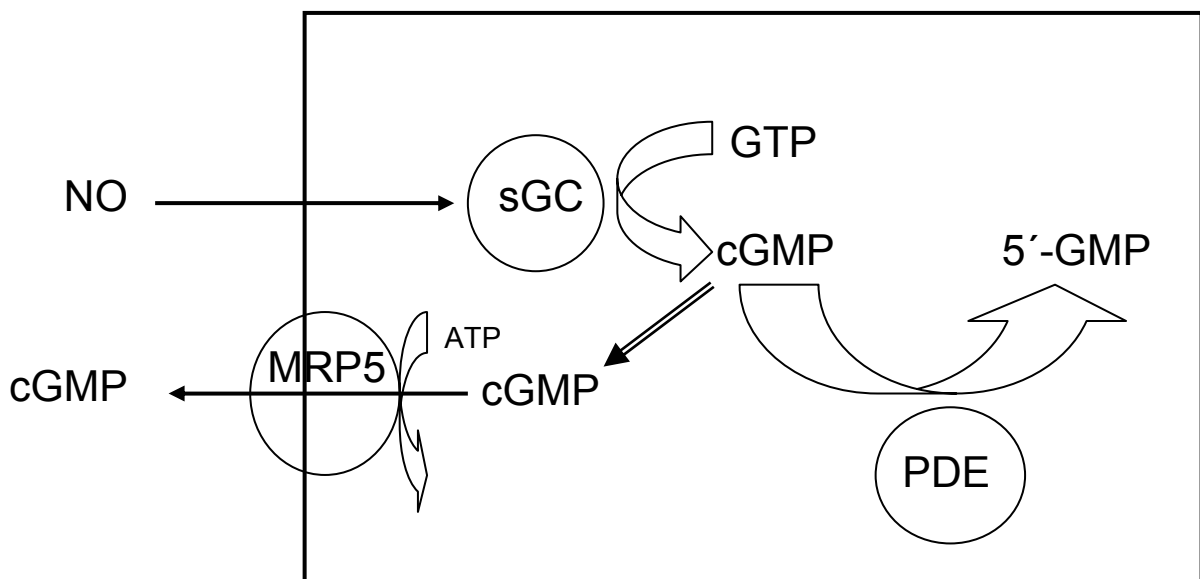


Abbildung 1-4 Regulation der cGMP-Konzentration nach Jedlitschky et al. (Jedlitschky, Burchell et al. 2000)

1.7 *Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2, BCRP, MXR)*

Das Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) ist ein Mitglied der ABCG-Familie. Seinen Namen verdankt es der Tatsache, dass es unter anderem zuerst in der Brustkrebszelllinie

MCF7/AdrVp gefunden wurde. *Doyle et al.* beobachteten, dass die Zellen trotz Zugabe von Verapamil, einem Inhibitor von P-gp (MDR1/ABCB1), eine Anthrazyklin-Resistenz aufwiesen. Der Verbrauch von energiereichen Verbindungen wurde in diesem Zusammenhang als Hinweis auf einen aktiven Transport gewertet. (*Doyle, Yang et al. 1998*) *Miyake et al.* veröffentlichten 1999 die Existenz eines von ihnen als MXR (Mitoxantron Resistenz Faktor) bezeichneten Proteins als Ursache für das schon damals bekannte Phänomen der ABC-Transporter-unabhängigen Resistenz gegenüber Mitoxantron und Daunorubizin in humanen Tumorzelllinien (*Miyake, Mickley et al. 1999*). In beiden Fällen handelte es sich um das später als BCRP/ABCG2 bezeichnete Transportprotein. Im Gegensatz zu den anderen bisher vorgestellten Transportern liegt die NBD hier am N-terminalen Ende der TMD. Eine weitere Besonderheit ist, dass dieser Transporter nur eine TMD mit sechs α -Helices besitzt („half transporter“), was sich auch in seinem geringeren Molekulargewicht von ca. 72 kD widerspiegelt. Es gilt mittlerweile als gesichert, dass zwei „half-Transporter“ zu einem „full-Transporter“ dimerisieren müssen, um als Transporter Funktionstüchtigkeit zu erlangen (*Knutsen, Rao et al. 2000*) (Vgl. Abbildung 1-3).

Das *ABCG2*-Gen, das für 655 Aminosäuren kodiert, überspannt mehr als 66 kB auf Chromosom 4q22 und besteht aus 16 Exons (*Bates, Robey et al. 2001; Litman, Druley et al. 2001*). In der Maus liegt die *BCRPI*-Sequenz auf Chromosom 6 und codiert ein aus 657 Aminosäuren bestehendes Protein. Bei einem Vergleich der menschlichen und murinen Aminosäuresequenz zeigten sich 81% Homologie, wobei die Transporter beider Spezies jedoch funktionell vergleichbar sind. (*Allen, Brinkhuis et al. 1999*)

Mittlerweile konnte BCRP in vielen Tumorzelllinien und gesunden Geweben nachgewiesen werden. So wiesen *Ross et al. 1999* BCRP sowohl in Zelllinien aus Mamma-, Kolon- und Magen-Karzinomen als auch im Fibrosarkom und Myelomzellen nach (*Ross, Yang et al. 1999; Haimeur, Conseil et al. 2004*). Im gleichen Jahr konnte BCRP auch in vielen von gesunden Geweben detektiert werden, u.a. an der apikalen Membran von Jejunum, Ileum und Kolon. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass dem Transporter eine limitierende Funktion in der peroralen Verfügbarkeit von Arzneimitteln durch einen auswärtsgerichteten Transport zurück in das Darmlumen zukommt. (*Maliapaard, Scheffer et al. 2001; Jonker, Smit et al. 2000*) *Maliapaard et al.* zeigten des Weiteren auch eine BCRP-Expression im Synzytiotrophoblasten, der Plazenta und der Leber. Bei Letzteren konnte der Transporter an der kanalikulären Membran lokalisiert werden und weist somit einen Zusammenhang zur hepatobiliären Exkretion auf. Weiterhin konnte BCRP im venösen und kapillaren Endothel als auch in hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden. In undifferenzierten Blutstammzellen zeigt sich BCRP als

Marker für die so genannte side population, die sich im Gegensatz zu Stammzellen CD34-negativ darstellt. (Maliapaard, Scheffer et al. 2001; Zhou, Schuetz et al. 2001; Scharenberg, Harkey et al. 2002)

Die subzelluläre Lokalisationsanalyse von BCRP ergab eine Lokalisation hauptsächlich in der Zellmembran, aber auch in der Membran von Zellkompartimenten wie Lysosomen, dem endoplasmatischen Retikulum und Mitochondrien.

Hinsichtlich des Substratspektrums weist BCRP eine große Ähnlichkeit zu dem oben beschriebenen P-Glykoprotein auf. So sind Topoisomerase I-Inhibitoren wie Topotecan, SN-38 (aktiver Metabolit von Irinotecan), 9-Aminocamptothecin (Maliapaard, van Gastelen et al. 2001), NB-506 und J-107088 (Komatani, Kotani et al. 2001), aber auch der selektive α_1 -Blocker Prazosin (Litman, Brangi et al. 2000) und Fluoreszenzfarbstoffe wie DMD-26 (Robey, Honjo et al. 2001) als Substrate beschrieben. Aber auch andere Arzneimittel wie Methotrexat und Antitumorbiotika wie Mitoxantron fallen in die Gruppe der BCRP-Substrate (Allen, Brinkhuis et al. 1999; Litman, Brangi et al. 2000; Kawabata, Oka et al. 2003). Aus diesem Substratspektrum ergibt sich, dass BCRP vordergründig an der Entwicklung von Resistenzen von Tumorzellen beteiligt ist.

1.8 ABC-Transporter in der Sepsis

Für eine Reihe von ABC-Transportern konnte gezeigt werden, dass ihr Expressionsniveau unter entzündlichen Bedingungen verändert ist. So veröffentlichten *Fernandez* et al. 2004 einen Überblick über die durch akute Inflammation ausgelösten Effekte auf die P-gp-Expression in Rattenhepatozyten. Dieser Effekt konnte in *In-vitro*-Versuchen auf die dabei freigesetzten proinflammatorischen Interleukine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-2 und IFN- γ) zurückgeführt werden. In Abhängigkeit des inflammationsauslösenden-Agens (LPS, Terpentin), der verwendeten Dosis, des betrachteten Organs und des Infektionsweges wurde dabei eine unterschiedliche Regulation des Transporters beobachtet. Insgesamt konnte aber eine Abnahme sowohl auf der Ebene der Expression als auch in Bezug auf die Transporter-Funktionalität in der Leber beobachtet werden. (Fernandez, Buyse et al. 2004)

Cherrington et al. zeigten 2004 eine veränderte Transporter-Expression für verschiedene ABC-Transporter im Rahmen einer LPS-induzierten Cholestase (Cherrington, Slitt et al. 2004). In diesem Zusammenhang ist die Gabe von LPS als Trigger für eine akute Entzündung anzusehen, bei der über eine veränderte Genexpression von sinusoidalen Aufnahme-Transportern (OATP) und kanalikulären Exkretions-Transportern (MRP2) ein reduzierter Natrium-abhängiger

Gallefluss ausgelöst wird (Lee and Boyer 2000). Dabei wurde beobachtet, dass nach LPS-Gabe die *mdr1a*-Konzentration nach 6h auf ca. 1/3 der Ausgangskonzentration abgesunken war und sich auf diesem Niveau für die restliche Versuchsdauer von insgesamt 16h hielt. Für *mrp2* war nach einem initialem Anstieg nach 1h ein deutlicher Abfall zu beobachten, wobei die Konzentration nach 12h nur noch bei ca. 15% der Ausgangskonzentration lag. Bei *mrp5* war eine größere zeitliche Dynamik zu sehen. So fiel die Transporter-Konzentration nach 3h auf ca. die Hälfte des Ausgangswertes, stieg aber im weiteren Zeitverlauf bis 12h wieder auf das Doppelte des zeitlichen Nullwertes an, bevor es bis zum Ende des Versuches (16h) erneut abfällt. (Cherrington, Slitt et al. 2004)

Ähnliche Ergebnisse wurden 2004 auch von *Donner* et al. publiziert, die ebenfalls das Verhalten der hepatischen ABC-Transporter im Rahmen einer LPS-induzierten Cholestase an Ratten untersuchten. Auch hier wurden die Daten in einem zeitlichen Verlauf betrachtet. Dabei konnte nach 12h eine signifikante Reduktion der *Mrp2*-Transporterexpression beobachtet werden. *Mrp5* wurde in einer signifikant erhöhten Konzentration nachgewiesen. (Donner, Warskulat et al. 2004)

1.9 Zielsetzung der Arbeit

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gelang der Nachweis der Expression, der Lokalisation und zum Teil auch der Funktion der ABC-Transportproteine P-gp, MRP2, MRP5 und BCRP im menschlichen Herzen wie auch in Rattenorganen, die durch verschiedene endogene und exogene Faktoren beeinflusst werden. Die Funktion der Transporter ist letztlich nicht komplett geklärt. Der Sepsis liegen zum größten Teil unverstandene pathophysiologische Vorgänge zugrunde. Die potentielle Einflussnahme der Arzneimitteltransporter im Rahmen einer Sepsistherapie könnten Erklärungsansätze darstellen, um ein unterschiedliches Therapieansprechen von Patienten beim klinischen Sepsismanagement zu erklären. Da das Krankheitsbild Sepsis v.a. eine Störung der Mikrozirkulation darstellt, interessieren wir uns zum Einem für eine differenzierte Regulation der einzelnen Transporter in verschiedenen Organen bei septischem Stimulus.

Auf der anderen Seite basiert, wie bereits oben erläutert, der Therapieansatz zur Kupierung einer Sepsis auf einem Säulenkonzept. Drei dieser Säulen werden v.a. durch die Gabe von Arzneimitteln gebildet, so dass dabei die angeführten Arzneimitteltransporter eine wichtige Einflussgröße darstellen. Insgesamt liegt daher die für das pathophysiologische Verständnis interessante und wichtige Frage nahe, ob auch eine systemische inflammatorische Gewebereaktion auf die Expression dieser Transportproteine Einfluss nimmt.

Im Rahme der vorliegenden Dissertation soll anhand der durchgeführten Experimente die Transporterexpression in den Organen Herz, Leber, Gehirn, Darm, Niere und Milz beleuchtet werden. Vor diesem Hintergrund habe ich mittels molekularbiologischer Methoden wie der quantitativen PCR und Immunfluoreszenz den Einfluss einer septischen Entzündungsreaktion auf die Expression der ABC-Transporter P-gp, mrp2, mrp5 und BCRP1 untersucht. In der Literatur werden im Wesentlichen zwei Versuchsmodelle unterschieden, um tierexperimentell pathophysiologische Veränderungen zu erzielen, die denen der Sepsis ähnlich sind. Im ersten Modell werden vitale Infektionserreger verwendet, die entweder von außen in den Organismus eingebracht oder innerhalb des Organismus freigesetzt werden. Demgegenüber existiert eine Vielzahl von Sepsismodellen, bei denen Endotoxine - Zellmembranbestandteil gram-negativer Bakterien - auf verschiedenen Applikationswegen in den Organismus eingebracht werden. In den Versuchen, die meiner Dissertation zugrunde liegen, wurden neben Kontrolltieren, solche mit einer „Colon-ascendens-stent-peritonitis“ Sepsis und einer durch intraperitoneale LPS-Gabe induzierten Sepsis verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 *Material*

2.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

ABI PRISM 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems, Weiterstadt
AGFA Cronos 5	AGFA, Mortsel, Belgien
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresekammer	Serva, Heidelberg
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Gradientencycler	Eppendorf, Hamburg
Heizblock	Grant QBT
Küvetten 220-1600 nm	Eppendorf, Hamburg
Lasermikroskop, konfokal	Innova
Magnetrührgerät MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1,0 R	Heraeus Instruments, Hanau
Mikrodismembrator	Braun, Melsungen
Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
Mikrowelle	Siemens, Deutschland
OptimaTMTL Ultracentrifuge	Beckman, München
Sterilbank Herasafe	Heraeus Instruments, Hanau
Stromversorgungsgerät Standard PowerPack	Biometra, Göttingen
Vortexer Reax top	Heidolph, Schwabach
Wasserbad, Typ 5A	Julabo, Seelbach
White/UV-Transilluminator	UniEquip, Martinsried
Zellkulturartikel	BD Falcon, Heidelberg
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Mikrodissmembranator	Braun, Melsungen

2.1.2 Kits und Marker

GFX™ Micro Plasmid Prep Kit	Amersham biosciences, Freiburg
peqGold 1 kB-DNA-Marker	Peqlab, Erlangen
peqGold 100 bp-DNA-Marker	Peqlab, Erlangen
Prestained SDS Molecular weight marker	Sigma, Deisenhofen
Qiagen® PCR Cloning Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Tissue DNA Kloning Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TaqMan® Reverse Transcription Reagents	Applied Biosystems Weiterstadt
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
TaqMan Core Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Gel Band Purification Kit	Amersham biosciences, Freiburg

2.1.3 Chemikalien/Reagenzien

A. ad inj	Braun, Melsungen
Agar	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
DAKO® Fluorescent Mounting Medium	Dako Corporation, Carpintera/USA
dNTP	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ethylendiaminetetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd (37 %)	Sigma, Deisenhofen
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FCS)	Seromed-Biochrom, Berlin
Glycin	Sigma, Deisenhofen
Hefeextrakt	Sigma, Deisenhofen
IPTG	Promega, Mannheim

Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Sigma, Deisenhofen
PBS-Dulbecco	Biochrom, Berlin
ROX	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Saccharose	Sigma, Deisenhofen
SigmaClean®	Sigma, Deisenhofen
Tissue Tek Gefriereinbettmedium	Leica Microsystems, Nussloch
Tetramethyl-ethylen-diamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
TOTO®3-Iodide	Molecular Probes, Göttingen
Trypton	Sigma, Deisenhofen
Tween	Sigma, Deisenhofen
Trishydroxymethylaminomethan(Tris)	Roth, Karlsruhe
X-Gal	Promega, Mannheim
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

2.1.4 Puffer/Lösungen

Curry Master Mix (CMM)	100 mM	KCl
	6 mM	MgCl ₂
	8 % (v/v)	Glycerol
	0,4 mM	dNTP
	2 % (v/v)	ROX
	25 U/ml	Platinum TaqPolymerase
DNA-Ladepuffer (10x)	0,25 M	EDTA
	25 %	Saccharose
	0,25 %	Bromphenolblau
	ad 100 ml	Aqua dest.

Ethidiumbromidlösung	10 mg ad 1 ml	Ethidiumbromid Aqua dest.
LB-Medium (1x)	1 % 0,5 % 1 % ad 1 l	Natriumchlorid Hefeextrakt Trypton pH 7,0 Aqua dest.
MOPS (10x)	100 mM 50 mM 10 mM	MOPS Natriumacetat EDTA pH 7,0; autoklaviert
MOPS (1x)	100 ml ad 1 l	10x MOPS Aqua dest.
RNA-Ladepuffer	500 µl 100 µl 160 µl 64 µl 9,9 µl ad 1 ml	Formamid 10 x MOPS 37 % Formaldehyd 0,1 % Bromphenolblau Ethidiumbromid Aqua dest.
Stopp-Puffer (10x)	0,2 mM 25% 0,25%	EDTA Saccharose Bromphenolblau Aqua dest.
TBE (1x)	110 mM 90 mM	Tris-HCl Borsäure

	2 mM	EDTA pH 8,0
	ad 1 l	Aqua dest.
TBS (10x)	80 g	Natriumchlorid
	2 g	Kaliumchlorid
	30 g	Tris
	ad 1 l	Aqua dest
		pH 7,4
TBST (1x)	400 µl	Tween 20
	100 ml	10 x TBS
	ad 1 l	Aqua dest.

2.1.5 Enzyme

DNase I	Sigma, Deisenhofen
EcoRI mit EcoRI-Puffer	NewEnglandBiolabs, Frankfurt/Main
Platinum TaqPolymerase	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim, Deutschland

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primäre Antikörper

Für den immunologischen Nachweis von mrp5 wurde das Antiserum AMF, das durch Immunisierung von Kaninchen mit den 14 C-terminalen Aminosäuren des mrp5 (AMFAAAENKVAVKG) gewonnen wurde, verwendet. Zur immunologischen Detektion von mrp2 wurde der polyklonale Antikörper EAG-15 eingesetzt, der durch die Immunisierung von Kaninchen mit der C-terminalen Aminosäuresequenz (1530-1541) von Ratten-mrp2 gewonnen wurde. Des Weiteren ist der monoklonale Antikörper anti-PECAM-1 verwendet worden, der spezifisch an Gefäßendothel bindet.

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Alexa Fluor [®] 488 goat anti-rat IgG	Molecular Probes/Mo Bi Tec, Göttingen
Alexa Fluor [®] 5688 goat anti-rat IgG	Molecular Probes/Mo Bi Tec, Göttingen
Alexa Fluor [®] 488 goat anti-rabbit IgG	Molecular Probes/Mo Bi Tec, Göttingen
Alexa Fluor [®] 568 goat anti-rabbit IgG	Molecular Probes/Mo Bi Tec, Göttingen

2.1.7 Plasmide

Zur Klonierung der PCR-Produkte wurde der linearisiert vorliegende Vektor pGEM[®]-T Easy der Firma Promega, Mannheim genutzt.

2.1.8 Bakterienstamm

Es wurden Solopack[®] Gold Supercompetent Cells (*E. coli*, Genotyp: Tetr Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]. \ddagger) verwendet.

2.1.9 Oligonukleotide/TaqMan[®]-Sonden

Die verwendeten Primer und FAM-markierten TaqMan Sonden wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) synthetisiert. (Vgl. Tabelle 3-1))

Für die Bestimmung der β_2 -Mikroglobulin-Expression wurde das Assays-on-Demand[™]-System Mm00437662_m1 (β_2 -Mikroglobulin) genutzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewebeaufbereitung und Präparation der Gesamt-RNA

Die nach der Entnahme im flüssigen Stickstoff schockgefrorenen Organe wurden mit einem Mikrodismembrator pulverisiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Von dem pulverisierten Gewebe wurden 30 mg zur RNA-Isolation verwendet. Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem *RNAeasy[®] Mini Kit* der Firma Qiagen. Dabei wurde das vom Hersteller empfohlene Standardprotokoll verwendet. Das Prinzip der Isolation beruht auf der Lyse der Zellen durch einen stark denaturierenden Guanidin-Isothiocyanat-haltigen Puffer und einer anschließenden Bindung der RNA an eine Silika-haltige Membran. Am Ende der Isolation wurde die Gesamt-RNA in 2x 20 μl RNasefreiem Wasser eluiert und bei -80°C gelagert.

2.2.2 DNA-Extraktion aus Vollblut

Zur Isolation der genomischen DNA stand murines Vollblut zur Verfügung. Dazu wurden die Proben unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Standardprotokolls mit dem *Tissue DNA-Extraction Kit[®]* bearbeitet. Die nach Lyse der Zellen freigesetzte genomische DNA wird dabei selektiv an Membranbestandteile gebunden. Nach Wasch-Zentrifugationen erfolgte die Elution der DNA. Das Eluat wird bei 4°C gelagert.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die photometrische Konzentrationsbestimmung basiert auf dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei 260 nm. Für die Absorption sind dabei die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Die Messung erfolgt in Küvetten, (Schichtdicke 1 cm).

Eine Lösung, die 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA enthält, besitzt unter diesen Bedingungen eine Absorption von 1 OD (optische Dichte). Dieser Wert dient als Referenz zur Bestimmung der Konzentration einer DNA-Lösung unbekannter Konzentration. Da die Extinktion von Makromolekülen im geordneten Zustand größer ist als im ungeordneten, gelten für RNA und einzelsträngige DNA andere Werte, dieses Phänomen wird als Hyperchromie bezeichnet.

1OD ₂₆₀ entspricht:	50 $\mu\text{g/dl}$	ds DNA
	33 $\mu\text{g/dl}$	ss DNA
	40 $\mu\text{g/dl}$	RNA

Der Konzentrationsberechnung liegt folgende Gleichung zugrunde:

$$C [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} * V * F$$

V : Verdünnungsfaktor

F : Multiplikationsfaktor

Für den Multiplikationsfaktor gelten folgende Werte:

ds DNA	50
RNA	40
ss DNA	33
Oligonukleotide	20

Bei der Messung wird gleichzeitig die Absorption bei der Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Aus dem Verhältnis der OD_{260} und der OD_{280} erhält man eine Aussage über die Proteinkontamination in der Lösung. Für eine saubere RNA-Probe liegt der optimale Quotient bei 2,0.

2.2.4 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese macht man sich die Wanderungseigenschaften der Nukleinsäuren im elektrischen Feld zu Nutze. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Nukleinsäuren in einem Gel mit definierter Porengröße ist abhängig von der Länge, der Ladung und der Sekundär- und Tertiärstruktur der Nukleinsäuren. Große DNA-Fragmente durchlaufen Agarosegele langsamer als kleine, da die Agaroseporen kleineren Fragmenten weniger Widerstand entgegensetzt. Für eine gute Auftrennung der Fragmente wählt man je nach zu erwartender Fragmentlänge verschiedene Agarosekonzentrationen (Tabelle 2-1).

Da über die Integrität von DNA und RNA durch die Messung der optischen Dichte keine Aussage gemacht werden kann, überprüft man diese ebenfalls mittels Gelelektrophorese.

Tabelle 2-1 Agarosekonzentration je nach zu erwartender Fragmentlänge

1 bis 30 kB	0,5%
0,8 bis 12 kB	0,7%
0,5 bis 7 kB	1,0%
0,4 bis 6 kB	1,2%
0,2 bis 3 kB	1,5%
0,1 bis 2 kB	2,0%

2.2.4.1 *DNA-Gelelektrophorese*

Bei der DNA-Gelelektrophorese wird Agarose durch mehrmaliges Aufkochen in 1xTris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) gelöst und auf einen Gelschlitten aufgetragen. Die Proben werden mit 1/10 ihres Volumens mit einem Saccharose-Laufpuffer (10 x Stopp) versetzt. Dadurch erhöht sich die Dichte der Proben gegenüber dem Laufpuffer und die DNA sinkt beim Auftragen in die Taschen. Die Proben werden dann im elektrischen Feld aufgetrennt. Aufgrund ihrer stark negativen Eigenladung wandern die Nukleinsäuren zur Anode. Zur optischen Auswertung des Gels kann die DNA durch Zugabe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiumbromid, EtBr) angefärbt werden. Durch ultraviolettes Licht (254-366 nm) kann dann vor allem das interkalierte EtBr zur Emission von sichtbarem Licht angeregt werden, welches mit einer Kamera aufgenommen werden kann. Zur Beurteilung der Größe der Fragmente wird ein Längenstandard (Marker) in dem Gel mitgeführt, der Fragmente mit genau definierten Größen enthält. Im Rahmen meiner Arbeit sind die 1kB- und 100bp-Leitern, die je nach zu erwartender Größe der Nukleinsäurefragmente ausgewählt wurden, verwendet worden.

2.2.4.2 *RNA-Gelelektrophorese*

Da bei der RNA-Konzentrationsmessung über die optische Dichte sowohl intakte als auch degradierte RNA in die Berechnung eingehen, wurde die Integrität in einem denaturierenden RNA-Gel überprüft. Die denaturierenden Bedingungen des Agarose-Gels gewährleisteten dabei

die Auflösung der Sekundärstruktur, so dass die Auftrennung ausschließlich durch das Molekulargewicht bestimmt wird.

Dazu wurde die RNA auf ein formaldehyd-haltiges Agarosegel aufgetragen. Formaldehyd löst dabei die Wasserstoffbrückenbindungen in der RNA auf, indem die Aldehydgruppen mit den Aminogruppen von Adenin, Guanin und Cytosin Schiffsche Basen ausbilden und schafft so die denaturierenden Bedingungen im Gel. Vor dem Auftragen wird die RNA darüber hinaus mit Formamid versetzt, was die Basenpaarungen innerhalb der RNA aufhebt und so erst eine Reaktion der Basen mit Formaldehyd ermöglicht.

Zur Vorbereitung eines 1 %igen denaturierenden Agarose-Gels (100 ml) wurden die Gelkammer und der Kamm durch eine 30minütige Inkubation mit einer 2 %igen Sigmaclean[®]-Lösung RNase-frei gemacht. Ein Gramm Agarose wurde in 90 ml RNase-freiem Wasser geschmolzen (Mikrowelle). Nach dem Abkühlen auf 50-60 °C wurden 10 ml 10x MOPS, Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) und 5 ml Formaldehyd (37 %) zugesetzt und das Gel gegossen.

Ein Aliquot der RNA-Probe wurde mit dem zweifachen Volumen des frisch angesetzten RNA-Ladepuffers versetzt, 10 min bei 65 C denaturiert und anschließend auf das 1 %ige, ethidiumbromidhaltige (0,5 µg/ml), denaturierende MOPS-Agarose-Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde ein Gemisch aus 3-Morpholino-1-propansulfonsäure (MOPS) und Natriumacetat verwendet.

Bei nicht degradierten RNA-Proben ist mit Banden bei 5 kB (28S rRNA) und 2 kB (18S rRNA) zu rechnen.

2.2.5 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Da RNA nicht als Matrize für die Polymerasekettenreaktion eingesetzt werden kann, muss sie zuvor in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Diese Reaktion wird als Reverse Transkription (RT) bezeichnet.

Da das die Reaktion katalysierende Enzym, eine reverse Transkriptase, wie die DNA Polymerase nicht frei an den Templatestrang binden kann, müssen dem Reaktionsansatz Primer zugesetzt werden. Dafür kommen drei verschiedene Arten Primer in Betracht: Oligo-dT-Primer aus 16-20 Thymidinen, zufällige Hexamerprimer (random hexamers) oder sequenzspezifische Primer. Oligo-dT-Primer binden an den Poly-A-Schwanz der mRNA, so dass der gesamte mRNA-Pool in cDNA umgeschrieben wird. Da mit Oligo-dT-Primer nur mRNA transkribiert werden, wäre bei den Experimenten eine Normalisierung auf die ribosomale 18S rRNA als *Housekeeping-Gen*

nicht möglich. Bei sequenzspezifischen Primern wiederum werden nur sehr spezifische RNA-Bereiche transkribiert und zudem ist eine Optimierung der Bedingungen erforderlich, damit eine hohe Effizienz der reversen Transkription erreicht wird. Random hexamer Primer schließlich sind Oligonukleotide, die alle möglichen Hexamerkombinationen der vier Basen enthalten und somit unspezifisch mit allen RNA Spezies hybridisieren können. Dadurch wird gewährleistet, dass nicht nur mRNA, sondern auch rRNA und tRNA revers transkribiert werden, was eine spätere Normalisierung der PCR-Ergebnisse auf die 18S rRNA als *Housekeeping*-Gen ermöglicht. Im Rahmen dieser Arbeit sind daher Random hexamer Primer verwendet worden. Das katalysierende Enzym kann entweder aus dem avian myoblastosis virus (AMV-RT) oder dem moloney murine leukemia virus (MMLV-RT) stammen, hier wurde die MMLV-RT verwendet.

Bei allen RT-Reaktionen wurden 200 ng RNA in einem 25 µl Ansatz eingesetzt, so dass jeweils, eine 100%ige Transkription vorausgesetzt, von 8 ng/µl cDNA ausgegangen werden konnte.

Tabelle 2-2 Pipettierschema der RT-Reaktion

Bestandteile	Volumen in µl	Endkonzentration
RT-Puffer (10x)	2,5	1x
MgCl ₂	5,5	5,5 mM
dNTP	5,0	500 µM
Hexamer Primer	1,25	2,5 µM
RNAse Inhibitor	0,5	0,4 U/µl
Reverse Transkriptase	0,75	1,25 U/µl
RNA+H ₂ O	9,6	8 ng/µl
Gesamtvolumen	25	

Die Reverse Transkription wurde im *Gradienten Cycler* der Firma Eppendorf durchgeführt und lief nach festem Temperaturschema ab, um einem optimalen Verlauf der Reaktion zu ermöglichen.

Tabelle 2-3 Temperaturverlauf der RT-Reaktion

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

In der Phase des Annealing bei 25°C lagern sich die Random hexamer Primer an die RNA. Im dann folgenden Schritt synthetisiert die Reverse Transkriptase die cDNA. Bei 95°C erfolgt dann die Inaktivierung des Enzyms.

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.6 cDNA-Quantifizierung mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.6.1 Konventionelle PCR

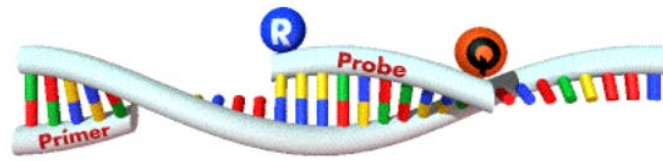
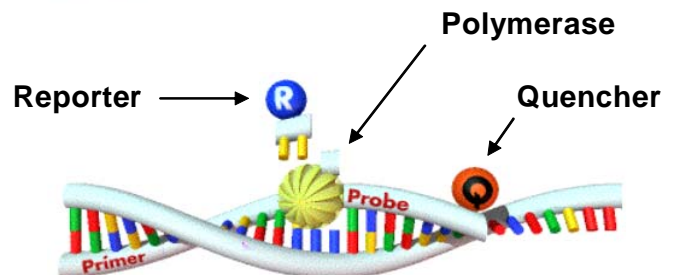
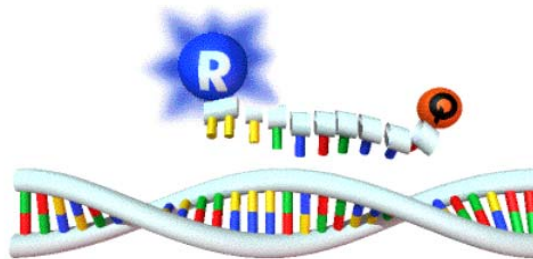
Die PCR beruht auf einem Zyklus, der ebenfalls in drei Schritte unterteilt werden kann. Der initialen Denaturierung zur Trennung der DNA-Stränge folgt die Anlagerung der Primer an die *single-stranded* DNA (ssDNA). Im dritten Schritt, der Elongation, werden die Primer durch eine DNA-Polymerase verlängert, so dass die DNA im Anschluss wieder doppelsträngig vorliegt. Durch mehrfache Wiederholung dieses Zyklus kommt es schließlich zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA-Menge.

Um nun eine DNA-/cDNA-Probe mittels PCR zu quantifizieren ist es notwendig, die Zyklenzahl der PCR so zu wählen, dass die Quantifizierung des PCR-Produktes im linearen Bereich der Amplifikationsreaktion erfolgt. Im Verlauf der PCR wird dies dadurch sichergestellt, dass mit dem PCR-Ansatz für unterschiedlich viele Zyklen eine Gelelektrophorese durchgeführt wird, um anschließend die Bandenstärken auszuwerten. Durch die Darstellung der Bandenintensität als Maß für die Amplifikatmenge in Abhängigkeit von der Zykluszahl ist es dann möglich, den Punkt zu ermitteln, an dem sich die PCR-Reaktion im linearen Bereich befindet. Anhand des so hinsichtlich der Zykluszahl optimierten PCR-Protokolls können dann auch unterschiedliche Expressionsniveaus in Proben bestimmt werden.

2.2.6.2 *TaqMan*[®]-PCR

Die *TaqMan*[®]-PCR läuft nach dem gleichen Prinzip einer normalen PCR-Reaktion ab. Allerdings kann bei dieser Methode auf die Optimierungsversuche und die anschließende Gelelektrophorese verzichtet werden, da es sich hier um eine real-time PCR handelt. Dies ermöglicht es, zu jedem Zeitpunkt der PCR die aktuelle Amplifikatmenge zu bestimmen, ohne dass die Reaktion gestoppt werden muss. Dies wird durch ein Fluoreszenzsignal realisiert, dessen Intensität von der gebildeten Amplifikatmenge abhängt und fortlaufend gemessen wird.

Aus diesem Grund wird den PCR-Primern eine Sonde zugesetzt. Diese besteht aus einem kurzen DNA-Fragment, dessen *Annealing*-Temperatur etwa 10°C über der der zugehörigen Primer liegt und dessen Bindungsstelle sich zwischen denen des Primerpaares befindet. Am 5'-Ende dieser Sonde ist ein Reporterfarbstoff gebunden, der chemisch Fluorochromen wie VIC oder FAM (6-Carboxyfluorescein) entspricht. Am 3'-Ende befindet sich ein so genannter Quencherfarbstoff (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin (TAMRA)). Bei einer intakten Sonde befinden sich Reporter und Quencher in direkter räumlicher Nähe, so dass das Fluoreszenzsignal des Reporters unterdrückt ist. Wird die Sonde jedoch gespalten, so werden Quencher und Reporter räumlich getrennt und ein Fluoreszenzsignal wird emittiert. Die Spaltung der Sonde erfolgt durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der TaqPolymerase bei der Elongation des PCR-Produktes. Daraufhin kann die Emission des Rezeptorsignals fluorometrisch gemessen werden.

Anlagerung der Sonde:**Polymerisation und Spaltung der Sonde:****Ende des Zyklus:****Abbildung 2-1** Prinzip der TaqMan[®] PCR

Das nach jedem Zyklus gemessene Signal wird im TaqMan[®] 7700 Sequence Detector (SDS) von ABI Prism[™] in allen 96 Ansätzen einer TaqMan[®] Platte detektiert und dabei gegen die Zykluszahl aufgetragen. (Vgl. Abbildung 2-2) Aus dieser Darstellung, *Amplification Plot*, kann der Reaktionsverlauf der einzelnen Ansätze verfolgt und eine Baseline definiert werden. Die innerhalb dieses Bereichs gemessenen Signale werden als Hintergrundaktivität definiert, bei der sich die PCR-Reaktionen aller Proben im linearen Bereich befinden. Der Zyklus, bei dem das Signal eines Ansatzes diesen Wert erreicht hat, wird als Schwellenzyklus bezeichnet (Threshold Cycle (C_T)) und die Linie dementsprechend als Schwelle (Threshold). Dabei bedeutet die Abnahme des C_T -Wertes um eine Einheit – eine annähernd 100%ige Effizienz der Reaktion vorausgesetzt – eine Verdopplung der Startkopienzahl.

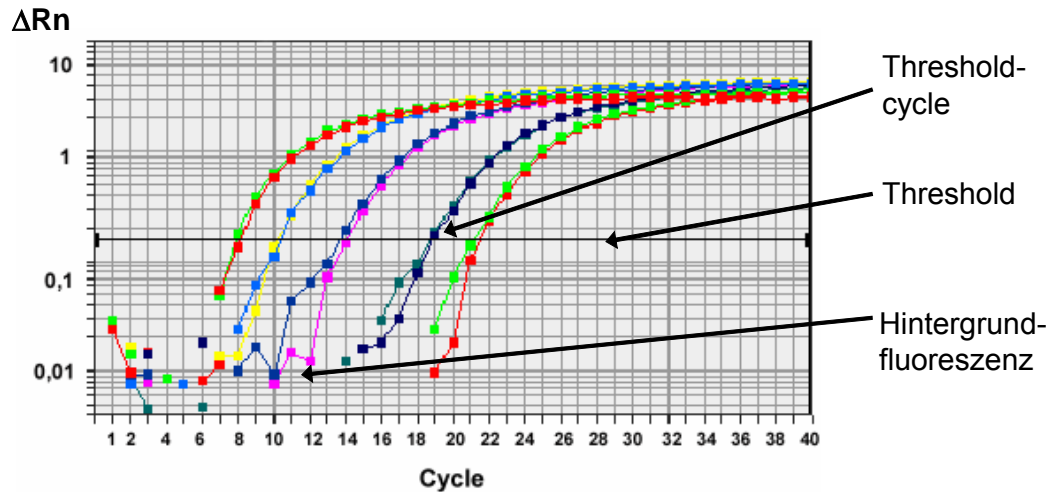


Abbildung 2-2 Halblogarithmische Darstellung einer Real-time Quantifizierung (Amplification Plot)

Die in dieser Arbeit durchgeführten TaqMan[®]-PCR wurde mit dem CurryMasterMix (CMM) durchgeführt. Dieser enthält als wichtigsten Bestandteil die TaqPolymerase, welche aus *Thermus aquaticus*, einem hitzestabilen Bakterienstamm isoliert wird. Das Enzym weist bei einem pH-Optimum von >8 sowohl eine 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität als auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität auf. Ihre DNA-Syntheserate liegt bei etwa 2800 Nukleotiden pro Minute. Außerdem enthält der CMM den Farbstoff ROX. Er dient aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaft der Ermittlung einer Grundextinktion des Ansatzes und somit einer initialen Angleichung der Proben untereinander.

Tabelle 2-4 Daten der verwendeten Farbstoffe

Farbstoff	Chemische Bezeichnung	Anregung [nm]	Emission [nm]
FAM	6-Carboxy-Flourescein	488	518
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin	488	602
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin	488	582

Zum CMM werden neben der cDNA die jeweiligen Primer und Sonden in folgender Konzentration zugegeben, wobei die in Tabelle 3-1 verwendeten Sequenzen zugrunde liegen.

Tabelle 2-5 Konzentration von Primer und Sonde

Substanzen	Konzentration im 10fach Mix	Endkonzentration
<i>Reverse</i> Primer	3 μ M	300 nM
<i>Forward</i> Primer	3 μ M	300 nM
Sonde	1 μ M	100 nM

Die Quantifizierung der RNA/cDNA in den Proben wurde nach folgendem Schema durchgeführt. (Vgl. Tabelle 2-6)

Tabelle 2-6 Pipettierschema der RT-Reaktion

Menge cDNA	Template	H ₂ O	CMM	Primer/ Sonde (10x)
8 ng	2,0 μ l	6,0 μ l	10,0 μ l	2,0 μ l

Das Temperaturprofil ist für alle durchgeführten TaqMan[®]-PCRs identisch, an zwei Vorinkubationsschritte von 2 min bei 50°C und 10 min bei 95°C, die unter anderem der Aktivierung der TaqPolymerase dienen, schließen sich 40 Zyklen mit 15 sekundigen Denaturierungsschritten bei 95°C und einminütigen Inkubationsphasen bei 60°C für *Annealing* und *Elongation* an.

2.2.7 Auswertung der TaqMan- Ergebnisse

Im TaqMan[®]-Verfahren wird für jeden Reaktionsansatz wie oben beschrieben ein C_T-Wert bestimmt. Um von diesem Zahlenwert auf eine absolute oder relative Kopienzahl zu kommen, gibt es zwei verschiedene Verfahren: die Standardkurvenmethode und die $\Delta\Delta$ C_T-Methode.

2.2.7.1 Standardkurvenmethode

Dabei wird bei jedem *TaqMan*-Lauf eine Verdünnungsreihe mit definierter Konzentration des zu messenden Gens (vgl. Kapitel 2.2.9) mitgeführt und dann die jeweilige Konzentration gegen den C_T-Wert aufgetragen. Anhand der sich aus diesen Daten ergebenden Standardkurve kann nun die Ausgangskonzentration der Proben bestimmt werden.

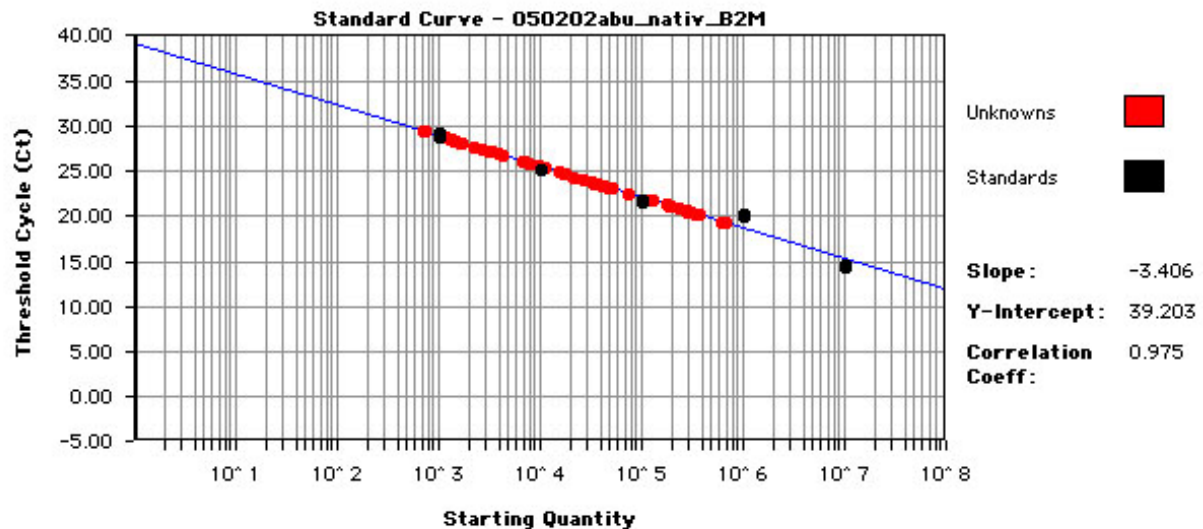


Abbildung 2-3 Exemplarische Standardkurve einer TaqMan® Quantifizierung (Auf der X-Achse ist die Quantität und auf der Y-Achse der C_T -Wert aufgetragen; schwarze Punkte repräsentieren die Standardproben und Rote die Organproben; die Gerade hat eine Steigung von -3,406 und einen Korrelationskoeffizienten von 0,975)

Die sich daraus ergebenden absoluten Kopienzahlen werden auf die Kopienzahl eines *Housekeeping*-Gens normalisiert, um so eventuelle Unterschiede in der eingesetzten cDNA-Menge auszugleichen.

Housekeeping-Gene kodieren Proteine, die für die Grundbedürfnisse einer jeden Zelle verantwortlich sind. Aufgrund dieser zugeschriebenen Funktion kann man davon ausgehen, dass *Housekeeping*-Gene in jeder Zelle exprimiert werden und nur geringen intra- und interindividuellen Schwankungen unterliegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *Housekeeping*-Gene 18S, GAPDH und β_2 -Mikroglobulin verwendet.

2.2.8 Primer- und Sondensynthese

Für die in dieser Arbeit verwendete Methodik, wurden Primerpaare benötigt, die die Exongrenzen überspannen. Damit wird gewährleistet, dass nur RNA bzw. cDNA amplifiziert wird und Verunreinigungen mit genomischer DNA nicht zusätzlich zu einem Fluoreszenzsignal führen. Zur Primer- und Sondensynthese wurden mit Blast 2 Sequences im Internet beim National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) zunächst die Exon- und Introngrenzen der zu untersuchenden Gene analysiert. Folgende mRNA-Sequenzen wurden dabei zugrunde gelegt:

Tabelle 2-7 Zugrunde liegende mRNA-Sequenzen der Transporter

Transporter	
mdr1a	NM_011076
mrp2	NM_013806
mrp5	AB019003
BCRP1	AF140218

Mit dem Programm PrimerExpress wurden dann unter Verwendung der mRNA-Sequenzen Primer und Sonden entworfen. (Tabelle 3-1)

2.2.9 Herstellung eines Standards

Zur absoluten Quantifizierung ist es nötig, für das Zielgen eine Standardkurve herzustellen, um damit dem gemessenen Signal eine Startkopienzahl zuzuordnen.

2.2.9.1 PCR

Zur Herstellung einer Standardreihe muss ein Gewebe ausgewählt werden, in dem das Zielgen bekanntlich oder mutmaßlich sehr stark exprimiert wird. Nach oben beschriebener RNA-Präparation und cDNA-Synthese erfolgt eine PCR, in der 400 ng cDNA eingesetzt wurden. Dabei ist der *TaqMan*[®] Core Kit verwendet und die PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt worden.

Tabelle 2-8 Pipettierschema für die Amplifizierung spezifischer Genfragmente

Substanzen	Volumen in μl
10 x TaqMan Puffer	5
MgCl ₂ (25mM)	11
dATP (10mM)	1
dCTP (10mM)	1
dGTP (10mM)	1
dTTP (10mM)	1
Forward Primer (20 μM)	1,5
Reverse Primer (20 μM)	1,5
Platinum TaqPolymerase	0,25
Aqua ad inj.	6,75
cDNA	10
Gesamtvolumen	25

Tabelle 2-9 Temperaturprofil

Prozess	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit	Zyklen
Aktivierung der Polymerase	95	10 Min	1
DNA-Doppelstrangauftrennung	95	15 Sec	45
Primer-Anlagerung/Elongation	60	1 Min	45

2.2.9.2 *Aufreinigung der PCR*

Das PCR-Produkt wurde nach der Standardanleitung zur Aufreinigung von DNA mittels des *QiaQuick[®] PCR Purification Kit* isoliert oder nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese aus

dem Gel ausgeschnitten und mit dem Standardprotokoll des *Gel Band Purification Kits* isoliert. Das gereinigte PCR-Produkt kann dann ggf. bei -20°C gelagert werden.

2.2.9.3 Ligation und Transformation des PCR-Produktes

Die aufgereinigten Fragmente wurden anschließend in den PCR Klonierungsvektor pGEM[®]-T Easy ligiert. Dafür wurde folgender Ligationsansatz hergestellt:

Tabelle 2-10 Ligationsansatz

Komponente	Volumen pro 10 µl-Ansatz
2x Ligations-Puffer	5,0 µl
pGEM [®] -T Easy Vektor (50 ng/µl)	1,0 µl
PCR-Produkt (gereinigt)	3,0 µl
T4-DNA-Ligase	1,0 µl
Aqua dest.	1,0 µl

Für den Ablauf der Ligation wurde der Ansatz für 12 – 16 h bei 4°C inkubiert. 2 µl dieses Ansatzes wurden dann für die Transformation zu 50 µl aufgetautem, ultrakompetenten *E.coli* XL10-Gold Bakterien gegeben und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz im Wärmeblock 90 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach einer weiteren zweiminütigen Inkubation auf Eis wurden dem Ansatz 250 µl LB-Medium zugesetzt und diese dann bei 37°C und 150 rpm für 90 Minuten geschüttelt.

200 µl dieses Transformationsansatzes wurden auf einer LB-Ampicillin-Agar-Platte ausplattiert, die 30 Minuten zuvor mit 35 µl 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) und 20 min vorher mit 20 µl 100 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) behandelt worden war. Die Agar-Platte wurde dann 12-16 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Plasmide sind doppelsträngige, zirkuläre DNA-Moleküle, die in Bakterien Träger zusätzlicher genetischer Informationen sind und diesen einen Überlebensvorteil bzw. Selektionsvorteil verschaffen. Modifizierte Plasmide werden in der Molekularbiologie als Vektoren verwendet. Durch die Aufnahme von Bakterien erhalten diese Informationsmechanismen, die im weiteren

Verlauf eine Unterscheidung zwischen Bakterien, die den Vektor aufgenommen haben und solchen, die den Vektor nicht aufgenommen haben, ermöglichen. Das Plasmid pGEM[®]-T Easy ist 3015 bp lang und mit der Restriktionsendonuclease EcoRV linearisiert worden. An den Schnittstellen wurde ein 3'-T-Überhang eingefügt, um eine Re-Ligation des Vektors zu verhindern und die Ligation von Fragmenten mit A-Überhängen zu ermöglichen.

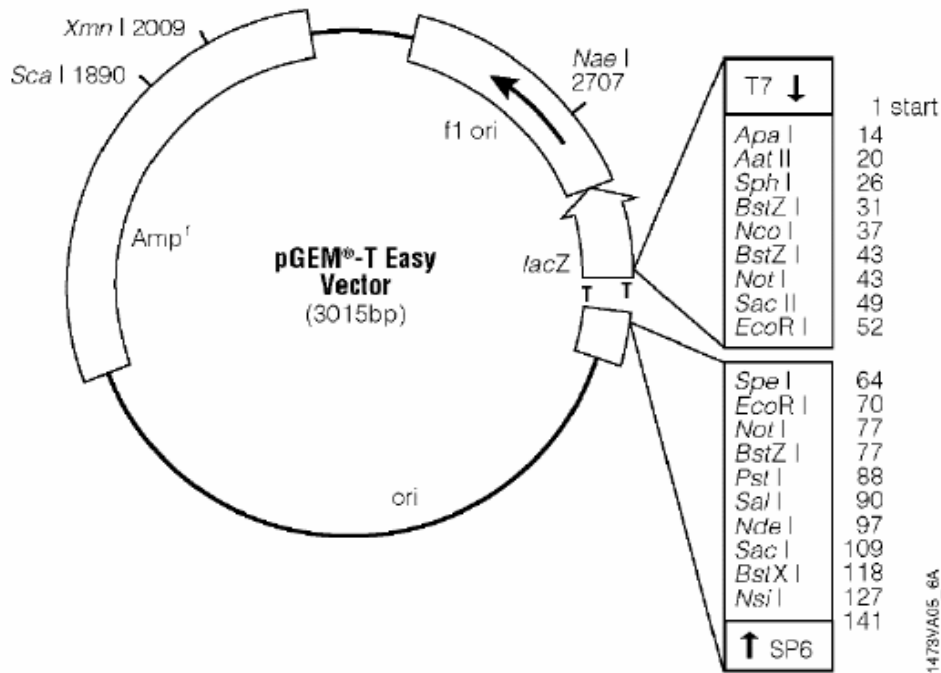


Abbildung 2-4 Struktur des pGEM[®]-T Easy Vektors

Das Ampicillinresistenz-Gen (Amp) im Vektor dient als Selektionsmarker und ermöglicht es den Bakterien auf ampicillinhaltigen Nährböden zu wachsen, die den Vektor aufgenommen haben. Des Weiteren enthält der Vektor ein *lacZ*-Gen innerhalb dessen sich die „multiple cloning site“ (MCS) befindet. Durch das Einklonieren eines Fragmentes in die MCS wird der Leserahmen des *lacZ*-Gens zerstört, so dass eine weitere Selektion der transformierten Bakterien hinsichtlich der Aufnahme eines Vektors mit eingebautem PCR-Produkt möglich ist. In diesen Fällen kommt es nicht zur Expression des *lacZ*-Gens und folglich wird die β -Galactosidase nicht exprimiert, wodurch diese Bakterien die chemische Verbindung 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) nicht zu einem blauen Farbstoff abbauen können. Diese Kolonien bleiben daher weiß, während Bakterien, die einen Vektor mit einem intakten *lacZ*-Gen aufgenommen haben, blau erscheinen. Die Galactosidasereaktion ist durch Isopropylthiogalactosid stimulierbar.

2.2.9.4 Plasmidpräparation

Im weiteren Verlauf wurden die weißen Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und in ein 15 ml Falcontube mit 2ml Ampicillin-haltigem (50 µg/ml) LB-Medium erneut für 12-16 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert, um so eine weitere Vermehrung der selektierten Klone zu erreichen.

Dann wurde die Plasmid-DNA aus den *E.coli* Bakterien nach der Standardanleitung für die Aufreinigung von DNA aus Bakterien des *GFX™Micro Plasmid Prep Kit* der Firma Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt.

2.2.9.5 Restriktionsanalyse der Plasmidkonstrukte

Zur Kontrolle, ob der Vektor pGEM®-T Easy das Insert enthält, wurde eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden Restriktionsendonukleasen verwendet. Hierbei handelt es sich um Enzyme bakteriellen Ursprungs, die Phosphatdiesterbindungen innerhalb des DNA-Doppelstranges anhand spezifischer Erkennungssequenzen spalten können.

Die Restriktion wurde hier mit dem Restriktionsenzym EcoR1, welches aus einem Resistenzfaktor (R) des *Escherichia Coli*-Stammes RY 13 isoliert wurde, durchgeführt. Der Restriktionsansatz (Zusammensetzung vgl. Tabelle 2-11) wurde dafür 3 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Bei der Spaltung mit EcoR1 entstehen als Spaltprodukte das Vektor-Fragment und, sofern innerhalb des einklonierten Fragments keine weitere EcoRI Schnittstelle liegt, ein weiteres Fragment in etwa der Größe des ursprünglichen PCR-Produkts. Mittels Gelelektrophorese kann der Restriktionsansatz dann aufgetrennt werden und die Größe der Spaltprodukte mit den erwarteten Größen verglichen werden.

Tabelle 2-11 Restriktionsansatz

Komponente	Volumen pro 20µl Ansatz
EcoR1	0,3 µl
10x Puffer für EcoR1	2,0 µl
H ₂ O	12,7 µl
Plasmid-DNA	5,0 µl

2.2.9.6 *Herstellung der TaqMan-Standardkurve*

Um in der *Real-Time* PCR die Startkopienzahl des Zielgens zu ermitteln, ist es notwendig, die Molarität des Standards zu kennen. Dazu wird die Konzentration der Plasmid-DNA photometrisch gemessen und kann, da Fragmentlänge und Vektorgröße bekannt sind, in die Stoffmenge umgerechnet werden. Es wird davon ausgegangen, dass ein Basenpaar durchschnittlich eine molare Masse von 660 g/mol besitzt.

Das Plasmid wurde zunächst auf 10^{10} Kopien des Zielgens/2 μ l eingestellt. Durch eine 1:10-Verdünnungsreihe wurde dann eine Standardkurve hergestellt, die 10^{10} bis 10^2 Kopien des jeweiligen Zielgens enthielt.

2.2.10 **Statistische Auswertung**

Die mittels ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (SDS) von Applied Biosystems aufgenommenen Daten wurden nach der Standardkurvenmethode ausgewertet. Dabei wurden die Berechnungen und graphischen Darstellungen mit den Programmen Microsoft Excel und SPSS durchgeführt. Die vergleichende statistische Auswertung von jeweils zwei Tiergruppen erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test.

2.2.11 **Immunfluoreszenz**

Mit der Immunfluoreszenz können in Gewebeschnitten mittels spezifischer Antikörper Proteine/Antigene erkannt und sublokalisiert werden. Dabei wird das Prinzip der indirekten Immunfärbung angewendet, bei der primäre, gegen das Zielprotein gerichtete Antikörper, durch einen Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper detektiert werden. Nach Anregung über einen monochromatischen Laser emittiert das Fluorochrom ein Fluoreszenzsignal, das im konfokalen Lasermikroskop mittels Kamera detektiert werden kann.

Zur gleichzeitigen Darstellung von verschiedenen Proteinen ist der Einsatz unterschiedlich markierter Antikörper nötig. Zunächst werden dabei die Präparate mit den beiden Primärantikörpern inkubiert, die zur späteren spezifischen Detektion mittels Sekundärantikörper möglichst aus unterschiedlichen Spezies stammen sollten. Die Sekundärantikörper sind jeweils gegen eine der Spezies gerichtet, in der der erste Antikörper erzeugt wurde und zur Differenzierung unterschiedlich markiert. Auf diese Weise ist eine Doppelfärbung möglich, die es erlaubt die Lokalisation der beiden Antigene zueinander zu zeigen. Da in der Regel negative Zellen bei der Fluoreszenzanregung nicht zu erkennen sind, wurden alle Zellen durch eine

Kerngegenfärbung mit dem interkalierenden Farbstoff TOTO[®]-3 Iodid (im DAKO[®]-Eindeckelmedium) (1:500) dargestellt.

Für die Färbungen wurden nach der Organentnahme von allen Tieren Teile aus Herz, Leber, Gehirn, Darm, Niere und Milz entnommen und in *Tissue-Tek-Gefriereinbettmedium* eingebettet. Der gesamte Block wurde dann in flüssigem Stickstoff bei -176°C schockgefroren und bei -80°C gelagert. Mit Hilfe eines Kryotoms konnten danach Gewebeschnitte der verschiedenen Organe mit der Stärke 5 µm auf einen Objektträger aufgezogen werden. Nach zweistündiger Trocknung der Schnitte auf einer Heizplatte bei 36°C, erfolgte die Fixierung in Aceton für 10 Minuten bei -20°C. Nach vier fünfminütigen Waschschrinen in PBS, erfolgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit 5% FCS in PBS für 30 Minuten. Anschließend wurden 50 µl des primären Antikörpers bzw. des Antikörpergemisches auf die Schnitte gegeben und über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde der ungebundene Anteil der Antikörper durch drei Waschschrine in PBS entfernt. Bevor die Inkubation mit dem Sekundäntikörper bzw. den -antikörpern erfolgte, wurde erneut mit 5% FCS in PBS blockiert. Die Inkubation erfolgte dann für 2 Stunden bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss. Danach wurden die Gewebeschnitte erneut mit PBS gewaschen, einige Minuten im Dunkeln luftgetrocknet und mit DAKO[®] Fluorescent Mounting Medium, dem der fluoreszierende Kernfarbstoff TOTO[®]-3 Iodid in der Verdünnung 1:500 zugesetzt war, unter einem Deckgläschen eingebettet. Die Auswertung erfolgte am konfokalen laserscanning Fluoreszenzmikroskop.

Tabelle 2-12 Antikörperkonzentrationen

Antikörper	Konzentration
AMF (Anti-MRP5)	1:50
EAG-15 (Anti-MRP2)	1:50
PECAM-1	1:100
Alexa Fluor [®] 488 goat anti-rat IgG	1:200
Alexa Fluor [®] 568 goat anti-rat IgG	1:200
Alexa Fluor [®] 568 goat anti-rabbit IgG	1:200
Alexa Fluor [®] 568 goat anti-rabbit IgG	1:200

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Gewebe von 15 Mäusen untersucht, wobei die Tiere in drei Gruppen mit jeweils fünf Tieren eingeteilt waren. In der ersten Gruppe wurde 18 Stunden vor der Organentnahme eine Sepsis im Sinne einer Colon-ascendens-stent-Peritonitis (CASP) induziert. Dabei erfolgte 10 mm proximal der Ileocoecalklappe die Insertion eines 16-gauge Stents. Bevor die Operation mit dem Verschluss des Tieres wieder beendet wurde, erfolgte zur Kontrolle des Stents die digitale Ausmeltung von Stuhl über den Stent in das Peritoneum. Bei der zweiten Gruppe erfolgte die Organentnahme 18 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 8 µg/g Lipopolysaccharid (LPS). Die nativen Tiere der dritten Gruppe dienten als Kontrollgruppe. Von jedem Tier wurden Herz, Leber, Gehirn, Darm, Niere und Milz entnommen und direkt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

3.1 RNA-Isolation

Nach Pulverisierung der Gewebe im Mikrodissmembranator wurde die Gesamt-RNA mittels *RNeasy Mini Kit* extrahiert. Zur Bestimmung der mRNA-Expression der Zielgene ist die Reinheit und Integrität der RNA eine wichtige Voraussetzung. Dies wurde mittels einer denaturierenden Agarosegelelektrophorese überprüft, wobei 1 µg RNA aufgetragen wurde. Bei der Auswertung des Gels konnten in allen Proben, die für eukaryotische Zellen typischen zwei Banden (18S und 28S RNA) nachgewiesen werden.

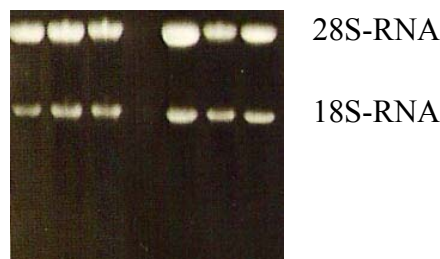


Abbildung 3-1 RNA-Gel (von links nach rechts sind jeweils drei Herz- (nativ, CASP und LPS) und Leberproben aufgetragen)

3.2 Primer- und Sondendesign

Für die Untersuchung der mRNA-Expression der ABC-Transporter mussten zunächst die entsprechenden TaqMan[®]-Assays aufgebaut werden. Nach Analyse der Exon-Intron-Grenzen des jeweiligen Gens, wurden mit dem Programm *Primer Express* Primer- und SONDENSEQUENZEN

für die ABC-Transporter bestimmt (vgl. Tabelle 3-1). Dabei waren neben der intronüberspannenden Lage der Primer, eine annähernd gleiche Annealing-Temperatur der Primer, sowie eine gegenüber den Primern um etwa 5-10°C erhöhte Schmelztemperatur der Sonde die zugrunde gelegten Auswahlkriterien. Für jeden Transporter wurden dann zunächst zwei der ausgewählten Primerpaare mittels PCR unter den Bedingungen der TaqMan®-PCR getestet. Dabei wurde jeweils cDNA aus muriner Leber, Herz und Gehirn, sowie genomische DNA und Aqua dest. als Template verwendet. Die Auswertung erfolgte anschließend mit Hilfe eines 3%-Agarosegels. Dabei zeigte sich, dass die jeweiligen Primerpaare der betrachteten Transporter nur in den Proben mit cDNA reagierten und in den Ansätzen mit genomischer DNA und Aqua dest. keine Amplifikation erfolgte (vgl. Abbildung 3-2). Damit konnte die Spezifität der Primerpaare des jeweiligen Transporters für cDNA gezeigt werden. Die Wahl des letztendlich verwendeten Assays erfolgte aufgrund der Unterschiede in der Bandenstärke, welche eine unterschiedliche PCR-Effizienz repräsentieren, wobei jeweils das Primerpaar ausgewählt wurde, das die stärkere Bande und damit auch die größere Effizienz aufwies.

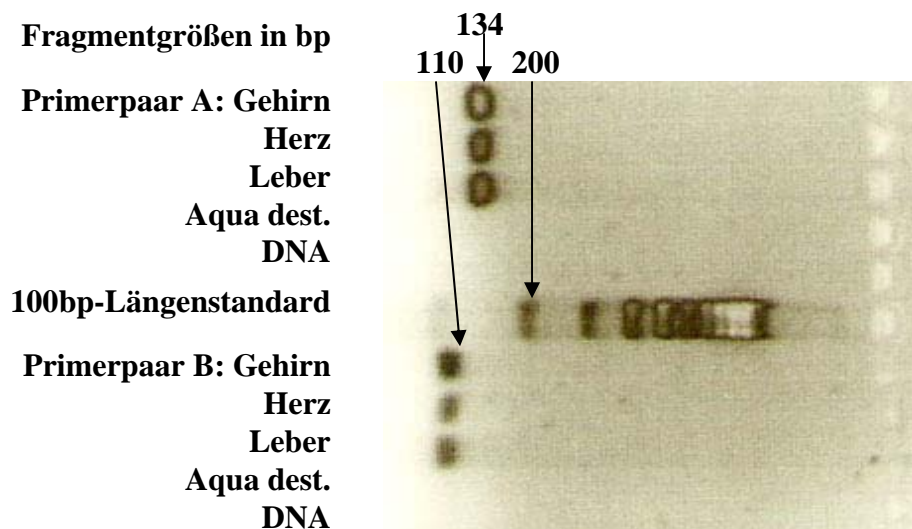


Abbildung 3-2 Agarosegel (3%) Funktionsprüfung der ausgesuchten Primer für den ABC-Transporter mrp5

Aufgrund dieser Vorversuche wurden folgende Primersequenzen und die dazugehörigen Sonden ausgewählt:

Tabelle 3-1 Primer- und Sondensequenzen

Primer/Sonde	Sequenz
P-gp-forward	5'-TgCAAgtgTAaggAAACgTCTCTAAAA-3'
P-gp-reverse	5'-CTATgAgCACACCAgCACCA-3'
P-gp-Probe	5'-6FAM-AAgAAATgACCACgTACgCCTACTATTACACCg-TAMRA-3'
mrp2-forward	5'-CCATTggACTgCACgACCTT-3'
mrp2-reverse	5'-AgATCTCCTCATCCgAgTATTTgTTg-3'
mrp2-Probe	5'-6FAM-AgggAgACTgACCATCATTCCCCAgg- TAMRA-3'
mrp5-forward	5'-AAATgTATgCCTgggTCAAAGC-3'
mrp5-reverse	5'-TggCgATCACTACCACAATAgg-3'
mrp5-Probe	5'-6FAM-AAAAAATCCgAgAggAggAACgTCggATA- TAMRA-3'
BCRP1-forward	5'-TCgCAgAAggAgATgTgTTgAgT-3'
BCRP1-reverse	5'-ATAgCATTAAggCCAaggTTTCATg-3'
BCRP1-Probe	5'-6FAM-CACATCACCTATCgAgTgAAAgtAAAgtgggT-TAMRA-3'

Die genaue Position der Primer und Sonden ist in Tabelle 3-2 dargestellt.

Tabelle 3-2 Lokalisation der Primer und Sonden

	Forward Primer	Reverse Primer	Sonde
Sequenz auf der mRNA von P-gp	von 370 bis 396 bp	von 485 bis 506 bp	von 450 bis 483 bp
Exon auf der mRNA von P-gp	Chromosom 5 Exon 4	Chromosom 5 Exon 5	Chromosom 5 Exon 5
Sequenz auf der mRNA von mrp2	von 4094 bis 4114 bp	von 4188 bis 4213 bp	von 4116 bis 4142 bp
Exon auf der mRNA von mrp2	Chromosom 19 Exon 29	Chromosom 19 Exon 30	Chromosom 19 Exon 29/30
Sequenz auf der mRNA von mrp5	von 1256 bis 1277 bp	von 1370 bis 1390 bp	von 1295 bis 1324 bp
Exon auf der mRNA von mrp5	Chromosom 16 Exon 8	Chromosom 16 Exon 9	Chromosom 16 Exon 8/9
Sequenz auf der mRNA von BCRP1	von 111 bis 133 bp	von 225 bis 249 bp	von 140 bis 174 bp
Exon auf der mRNA von BCRP1	Chromosom 6 Exon 1	Chromosom 6 Exon 1	Chromosom 6 Exon 2

3.3 *Standardklonierung*

Zur Bestimmung der mRNA (cDNA)-Quantitäten der untersuchten Transporter wurden Proben mitgeführt, in denen die zu amplifizierende Region in definierter Konzentration im Rahmen von Plasmid-DNA enthalten ist („Standardproben“). Diese Vorgehensweise wird auch als Standardkurvenmethode bezeichnet und erlaubt eine absolute Quantifizierung, da so Rückschlüsse vom gemessenen Signal auf die eingesetzte Kopienzahl möglich sind (vgl. Abbildung 3-4). Zur Herstellung dieser Standards wurde das jeweilige TaqMan[®]-PCR-Produkt in das Plasmid pGEM[®]-T Easy kloniert. Die Überprüfung der Klonierung erfolgte neben der Blau-Weiß-Selektion durch eine Kontrollspaltung mittels der Endonuklease EcoR1. Die Restriktionsprodukte wurden auf einem 3%-igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Fragmentgröße mittels eines 100bp-Längenstandards bestimmt. Für alle klonierten PCR-Produkte konnten die erwarteten Fragmentlängen detektiert werden. In Abbildung 3-3 ist exemplarisch das Ergebnis des Kontrollverbaus für das mrp5 dargestellt, dabei ist in der unteren

Bahn der 100bp- Längenstandard und in der oberen das mrp5-Restriktionsprodukt aufgetragen. Die zu erwartende Länge von 134bp für mrp5 konnte so bestätigt werden.

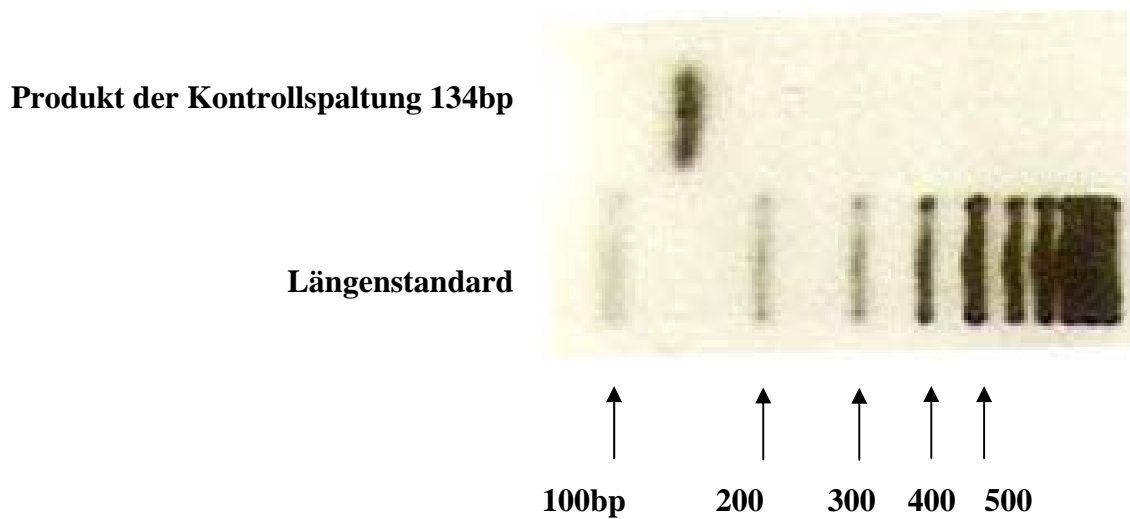


Abbildung 3-3 Agarosegel (3%) zur Kontrolle der Fragmentlänge von mrp5: Die im Kontrollverdau sichtbare Bande zeigt die erwartete Fragmentlänge für mrp5 von 134bp, die Bande des Vektors ist aufgrund ihrer Größe nur wenige Millimeter im Gel gelaufen und auf der Abbildung nicht zu sehen.

3.4 Gewebeverteilung

Nach der Isolation der RNA aus den schockgefrorenen Organen, erfolgte die Umschreibung in komplementäre DNA (cDNA). Zur Analyse der Gewebeverteilung der *mdr1a*, *mrp2*, *mrp5* und *BCRP1* mRNA-Expression sowie des Referenzgens β_2 -Mikroglobulin erfolgte die Quantifizierung der nativen Proben mittels realtime-PCR. Die Ergebnisse wurden mit der Standardkurvenmethode analysiert, dabei wurde bei jedem untersuchten Gen die entsprechende Standardkurve mitgeführt, um die Startkopienzahl der einzelnen Proben errechnen zu können. Die erhaltenen Werte wurden auf die Expression von β_2 -Mikroglobulin normalisiert.

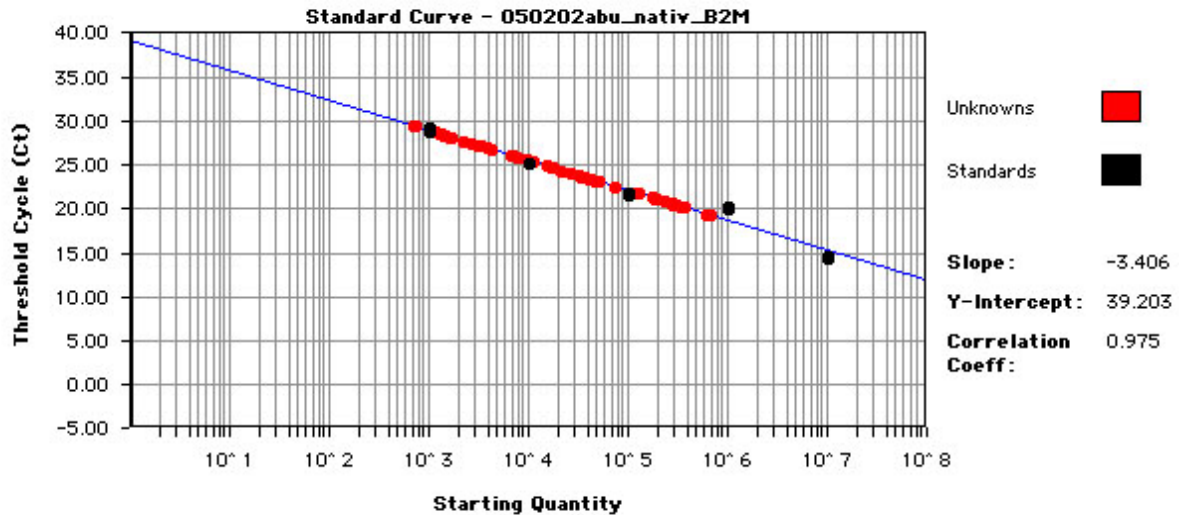


Abbildung 3-4 Standardkurve exemplarisch für β_2 -Mikroglobulin

Wie in Abbildung 3-5 dargestellt, konnte die höchste mRNA-Expression des P-Glykoproteins im Darm nachgewiesen werden, sie ist verglichen mit der Leber um den Faktor 1200 erhöht. Ebenfalls auf die Leber bezogen sind erhöhte P-gp-Level im Gehirn (100x) und in der Milz (80x) zu sehen. Insgesamt gesehen, zeigt die Leber unter den verglichenen Geweben die geringste P-gp-Expression.

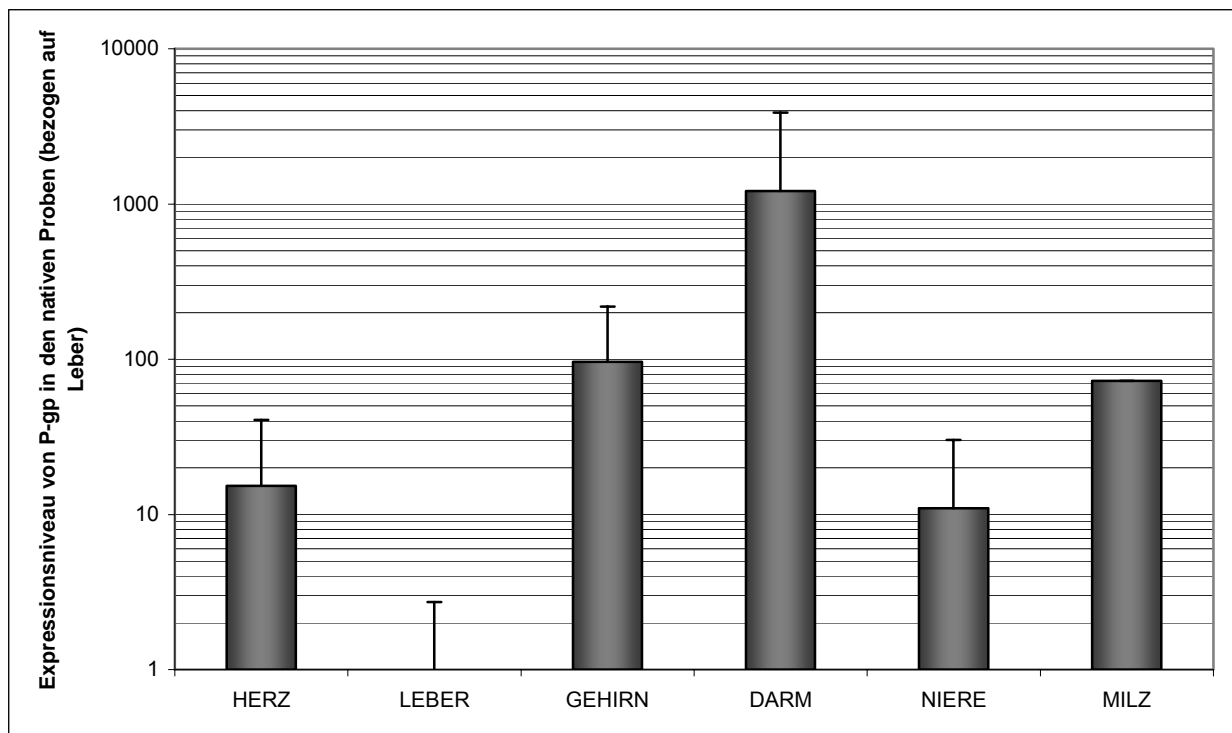


Abbildung 3-5 Gewebeverteilung von P-gp: mittels Standardkurvenmethode wurde für jedes Gewebe aus fünf nativen Proben der Mittelwert ermittelt, dabei wurden die einzelnen C_T -Werte auf das *Housekeeping*-Gen β_2 -Mikroglobulin normalisiert und die Leber als Referenzorgan gewählt.

Abbildung 3-6 zeigt die Verteilung von mrp2 in den nativen Proben. Dabei ist auffällig, dass die mRNA-Expression dieses Transporters in Herz, Gehirn und Milz wesentlich geringer ist als in der Leber. Beispielsweise konnte mrp2 in der Milz nur noch mit ca. 5% der Leberkonzentration detektiert werden. Die höchsten Expressionslevel von mrp2 wurden im Darm und in der Niere gefunden. Im Vergleich mit der Leber wurde im Darm eine um den Faktor 20 erhöhte Konzentration von mrp2 nachgewiesen.

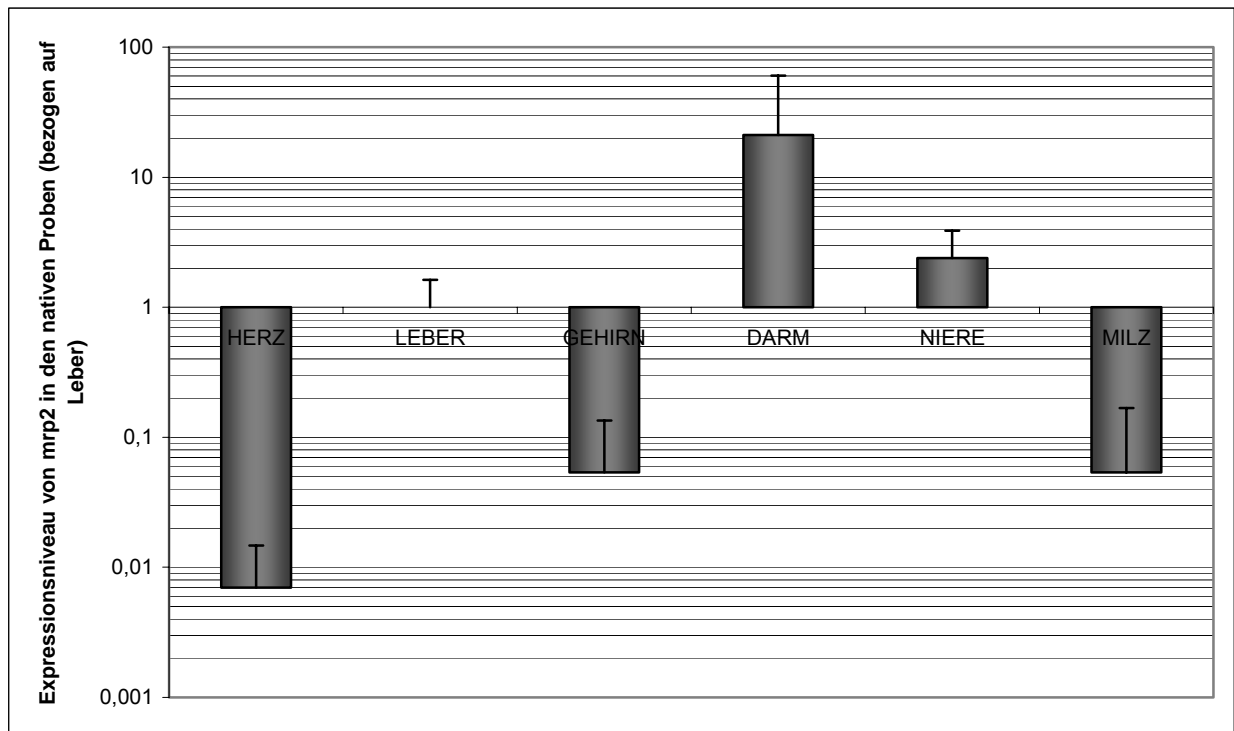


Abbildung 3-6 Gewebeverteilung von mrp2: Auswertung der Mittelwerte (n=5) mittels Standardkurvenmethode für jedes Gewebe, dabei wurden die jeweiligen Werte auf die entsprechenden Ergebnisse der β_2 -Mikroglobulin-Messungen bezogen und das mrp2-Expressionsniveau der Leber als Referenzpunkt verwendet.

Für mrp5 konnte gezeigt werden, dass es in allen untersuchten Organen exprimiert ist, wobei das geringste Niveau in der Leber gefunden wurde. Herz und Niere exprimieren den Transporter 20- bzw. 50-fach stärker als die Leber. Auch im Gehirn und im Darm war gegenüber der Leber eine deutliche Erhöhung der Expression nachzuweisen. In der Milz konnte für mrp5 eine ca. 600-fach höhere mRNA-Expression gemessen werden. (Vgl. Abbildung 3-7)

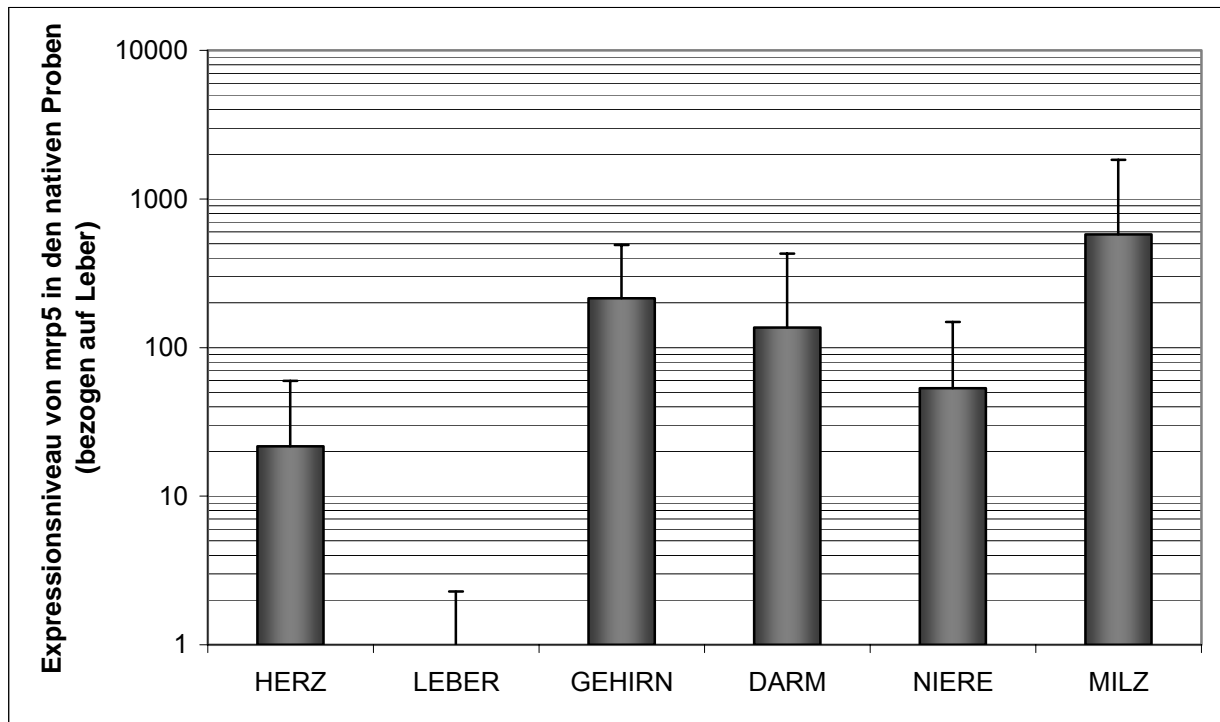


Abbildung 3-7 Gewebeverteilung von mrp5: Die in der Abbildung dargestellten Graphen ergeben sich aus der Auswertung der Mittelwerte (n=5) mit der Standardkurvenmethode, wobei die Ergebnisse der Expressionsmessung in der Leber als Referenz benutzt wurden und die Einzelmessungen auf β_2 -Mikroglobulin normalisiert wurden.

Die in Abbildung 3-8 dargestellten Ergebnisse zur Expression von BCRP1 zeigen, dass auch BCRP1 in allen untersuchten Organen exprimiert wird. Die geringste Expression wurde dabei in der Leber gemessen. Im Vergleich zu diesem Gewebe ist die Expression im Gehirn und im Herz um den Faktor 5, in der Milz um 13, im Darm um 30 und in der Niere um den Faktor 50 erhöht.

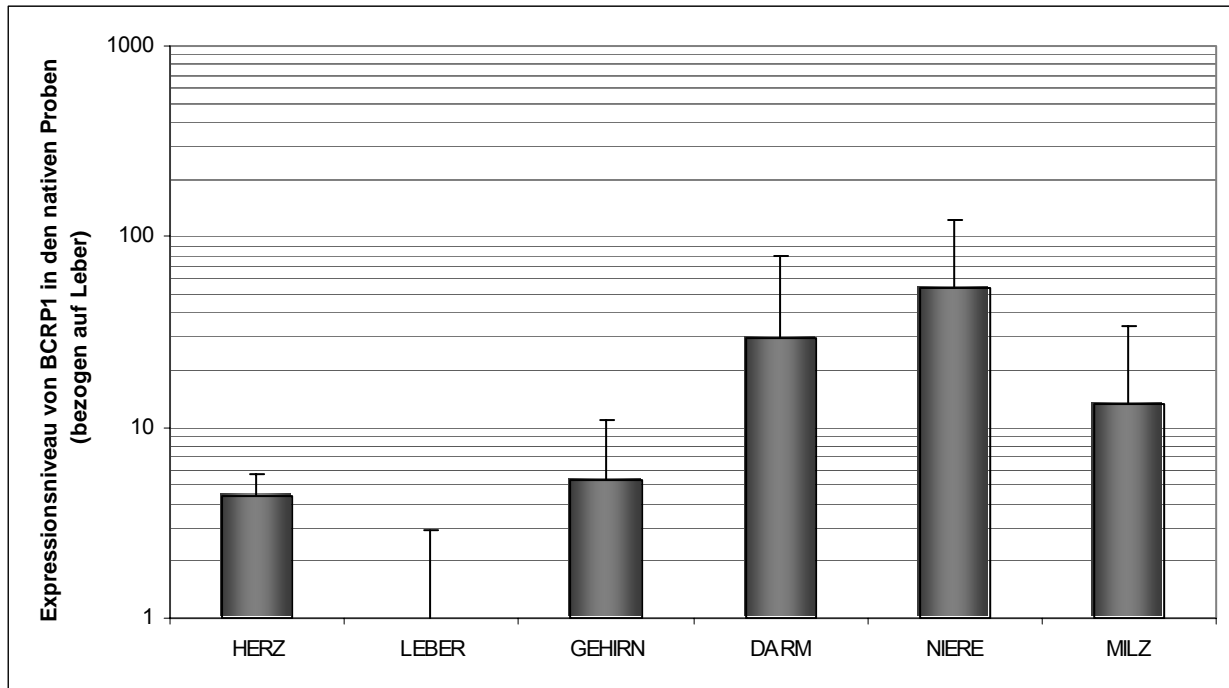


Abbildung 3-8 Gewebeverteilung von BCRP1: im Rahmen der Berechnung der dargestellten Ergebnisse wurde in einem ersten Schritt das gemessene BCRP1-Expressionsniveau in den einzelnen Proben gegen β_2 -Mikroglobulin normalisiert. Nach der Mittelwertbildung (n=5) in den einzelnen Organen erfolgte die Auswertung mittels Standardkurvenmethode, wobei die Leberergebnisse zur internen Kalibrierung zu Verfügung standen.

3.5 Ergebnisse der Immunfluoreszenz

Zur Klärung der Lokalisation einiger Transporter erfolgte die Färbung mittels Immunfluoreszenz. Die mit Aceton fixierten Kryoschnitte wurden gewaschen und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie auf die Expression von mrp2 und mrp5 untersucht. Dabei wurden zum Teil Kolokalisations-Färbungen mit dem Adhäsionsmolekül CD31 durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten dabei Schnitte, die nur mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert wurden. Zur Färbung des Zellkerns wurde der interkalierende Kernfarbstoff TOTO[®]-3-iodid verwendet.

Wie in Abbildung 3-9 dargestellt, konnte mrp2 in der Leber v.a. im Bereich der Gallenwege lokalisiert werden, während sich im Darm eher eine diffuse Färbung ergab, die nicht eindeutig Strukturen zugeordnet werden konnte. Damit konnte der Transporter v.a. in den Organen mit relevantem Gewebevorkommen nachgewiesen werden und eine Betrachtung der anderen Organe

wurde nicht durchgeführt. Mrp5 dagegen wurde vor allem im Bereich kardialer Gefäße lokalisiert, in den anderen gefärbten Organen ergab sich ein unspezifisches Färbemuster, so dass keine definitiven Aussagen hinsichtlich der Lokalisation möglich waren.

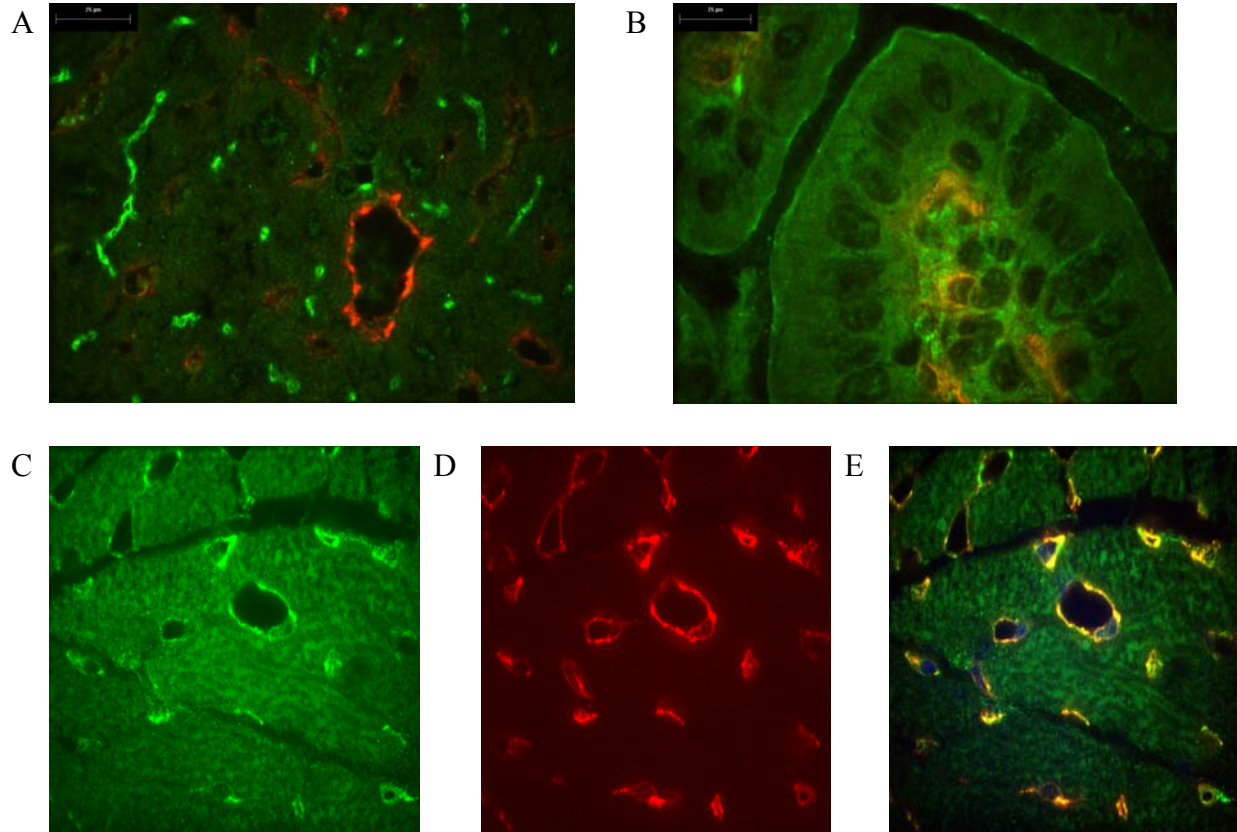


Abbildung 3-9 Immunfluoreszenzbilder: A) mrp2-Färbung in der Leber, dabei ist das Endothel der Gefäße rot und mrp2 in den Gallenwegen grün gefärbt. B) zeigt die Färbung von mrp2 im Darm, wobei der Transporter grün dargestellt ist. In C) ist eine Färbung des Transporters mrp5 (grün) im Herz dargestellt. Der Abbildungsteil D) zeigt eine Färbung des gleichen Gewebeschnittes mit einem Endothel-markierenden Antikörper PECAM. In E) ist dann die Kolokalisation dargestellt. Sowohl der Transporter mrp5 als auch das Endothel sind fluoreszierend dargestellt.

3.6 Ergebnisse der mRNA-Expression in den verschiedenen Tiergruppen

Zur Quantifizierung der Expression von *mdr1a*, *mrp2*, *mrp5* und *BCRP1* sowie des Housekeeping-Gen β_2 -Mikroglobulin wurde in den Proben aller drei Gruppen eine Realtime-PCR durchgeführt. Die mRNA-Untersuchungen zeigten große interindividuelle Unterschiede in der Expression der einzelnen Gene. Im Folgenden werden die ermittelten Daten in Boxplot-Analysen dargestellt. Dabei stehen vor allem Unterschiede im Expressionsniveau der verschiedenen Transporter hinsichtlich septischer und nativer Bedingungen im Mittelpunkt, aber auch Aussagen über das Expressionsverhalten in verschiedenen Sepsismodellen können dabei getroffen werden.

3.6.1 mRNA-Ergebnisse von P-Glykoprotein

Bei Analyse der CASP-Proben wurde eine Zunahme der Expression von P-gp im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen. Dies war in der Leber auch statistisch signifikant. In den LPS-Proben zeigte sich im Vergleich zu den nativen Kontrollen für die meisten der untersuchten Organe keine signifikante Änderung des Expressionsniveaus.

Beim Vergleich der Sepsismodelle zeigte sich jedoch eine signifikante Abnahme im P-gp-Expressionsniveau in der Milz nach Induktion der Sepsis durch LPS-Gabe. (Vgl. Abbildung 3-10)

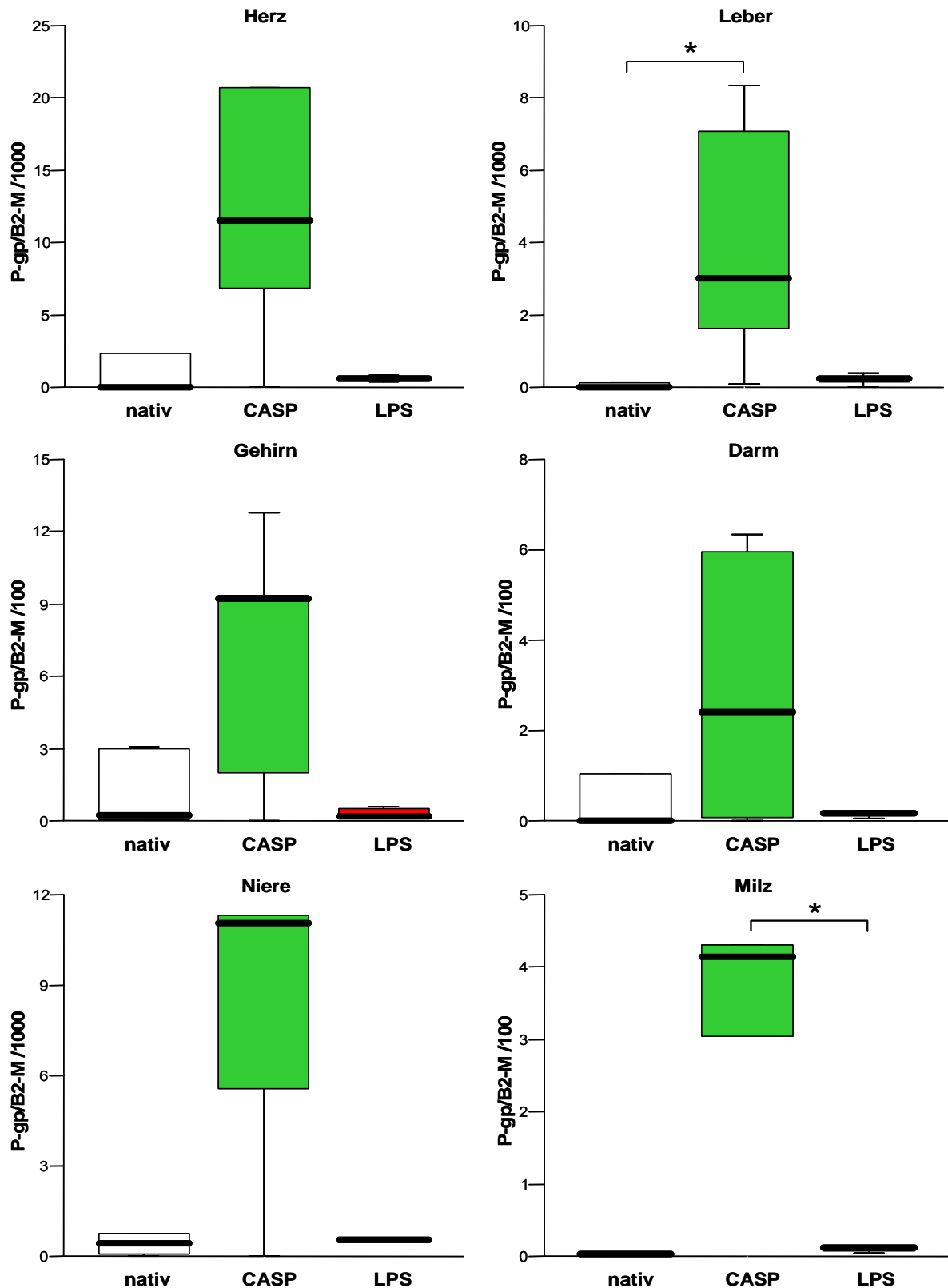


Abbildung 3-10 In der Abbildung sind die Ergebnisse der P-gp-Expressionsanalysen in den verschiedenen Tiergruppen dargestellt, wobei auf der Ordinate das relative Expressionsniveau von P-gp dargestellt ist. Die Ergebnisse für die verschiedenen Organe werden in einzelnen Diagrammen gezeigt, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Tiergruppen zu ermöglichen. Die mit „*“ gekennzeichneten Daten ergaben einen statistisch signifikanten Unterschied (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$).

3.6.2 mRNA-Ergebnisse von mrp2

Wie im Abschnitt Gewebeverteilung (vgl. Kapitel 3.4) bereits erwähnt, war der Transporter mrp2 zwar in allen untersuchten Geweben exprimiert, aber nur in den Organen Leber, Darm und Niere in nennenswertem Umfang. In den Organen Herz und Milz war eine Expressionszunahme von mrp2 in den Proben der CASP-Gruppe zu beobachten, die jedoch nicht signifikant war. Ansonsten nahm das Expressionsniveau in den übrigen Organen ab. In Leber und Darm handelte es sich dabei um eine statistisch signifikante Abnahme.

Auch die Proben der LPS-Gruppe wiesen in allen untersuchten Organen eine deutliche, in allen Fällen signifikante Abnahme der Expression, z.T. auf ein nicht mehr nachweisbares Niveau, auf. Diese verminderte mrp2 Expression innerhalb der LPS-Gruppe trat nicht nur im Vergleich mit den Kontrolltieren sondern auch im Vergleich zum CASP Modell auf. (Vgl. Abbildung 3-11)

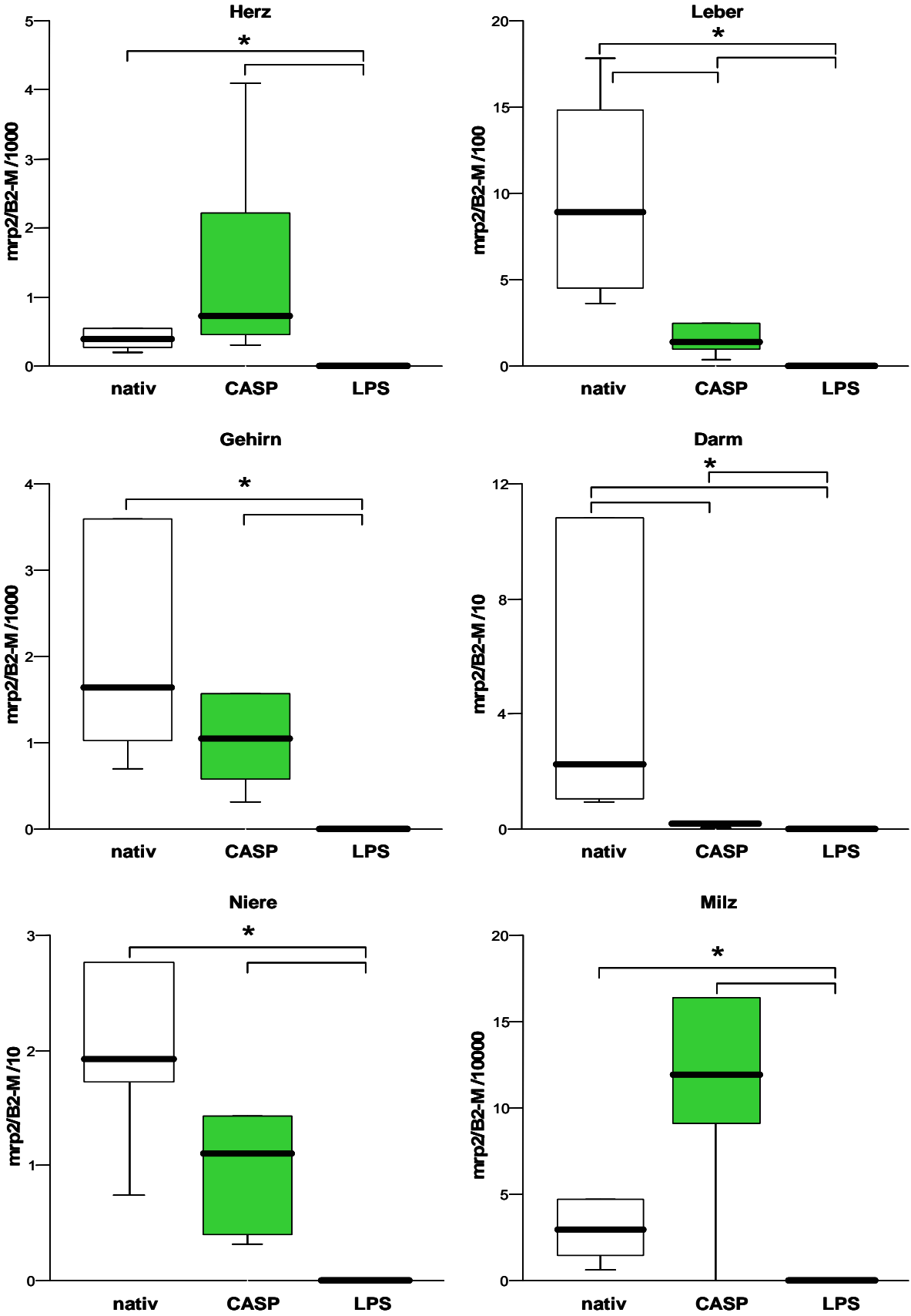


Abbildung 3-11 Darstellung der mmp2-Expressionsanalysen in den verschiedenen Tiergruppen (weiß=nativ, grün=CASP, rot=LPS). Die einzelnen Ergebnisse sind je nach Organ getrennt dargestellt, wobei auf der Ordinate das relative Expressionsniveau dargestellt ist. Die mit „*“ gekennzeichneten Ergebnisse sind statistisch signifikant.

3.6.3 mRNA-Ergebnisse von mrp5

Bei Betrachtung der mrp5-Expression ergab der Vergleich der Mittelwerte zwischen der Kontrollgruppe und der CASP-Gruppe vor allen in der Leber eine signifikante Zunahme der Expression von mrp5. Der Vergleich zwischen Kontroll- und LPS-Gruppe zeigt allerdings nur geringfügige Änderungen des Expressionsniveaus. Allein die Veränderungen in der Milz ließen eine signifikant niedrigere Expression erkennen.

Beim Vergleich der Sepsismodelle untereinander war mrp5 in allen untersuchten Organen in den LPS-Proben auf einem signifikant niedrigeren Niveau exprimiert, als in den Proben, die aus Tieren stammen, die eine CASP-Sepsis hatten. Einzig im Darm war dies nicht der Fall, hier fand sich zwar ebenfalls eine Expressionsabnahme, jedoch war diese nicht signifikant. (Vgl. Abbildung 3-12)

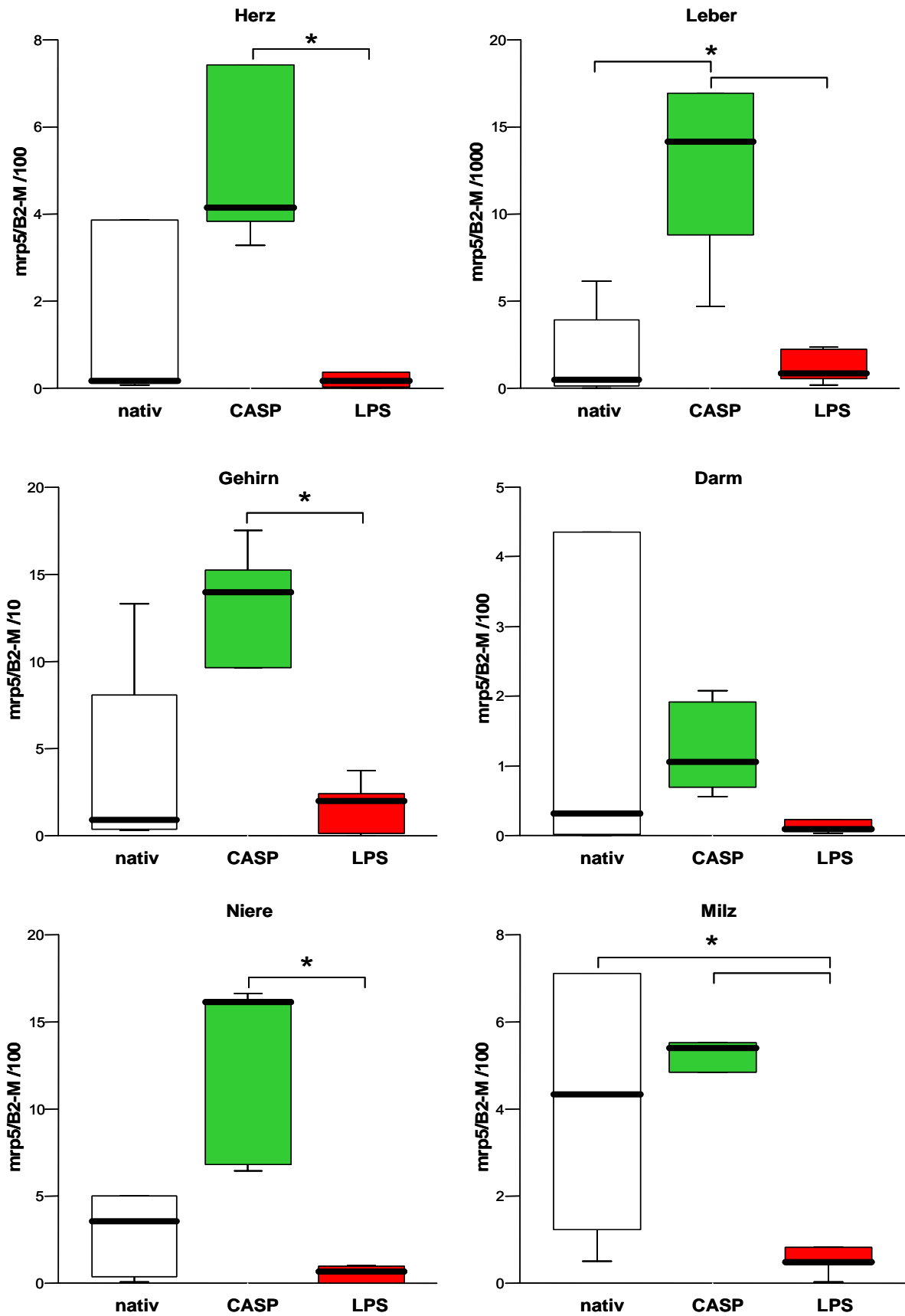


Abbildung 3-12 Dargestellt sind die Ergebnisse der mrp5-Expressionsanalysen, wobei die verschiedenen Gewebe in einzelnen Diagrammen repräsentiert sind. Dabei stellen die mit „*“-markierten Ergebnisse statistisch signifikante Änderungen des Expressionsniveaus dar.

3.6.4 mRNA-Ergebnisse von BCRP1

Auch BCRP1 war nur auf einem sehr geringen Niveau exprimiert, insbesondere in der Leber war der Transporter nur vereinzelt nachweisbar. Insgesamt ließen sich im Vergleich der Tiergruppen keine generellen Expressionsveränderungen erkennen. In der Leber und im Gehirn konnte bei beiden Sepsismodellen eine Expressionszunahme des Transporters detektiert werden, während die Expression im Darm, in der Niere und in der Milz eher abnahm. Dabei ergab sich für die Milz nach Prüfung mittels Mann-Whitney U-Test bei $p < 0,05$ eine signifikante Abnahme in beiden Sepsismodellen. In den Herzproben wurde ein gegenläufiges Verhalten der BCRP1-Expression zwischen den beiden Modellen detektiert. Die Organe aus den CASP-Tieren zeigten eine leichte Abnahme, die der LPS-Tiere eine Zunahme der BCRP1-Expression. (Vgl. Abbildung 3-13)

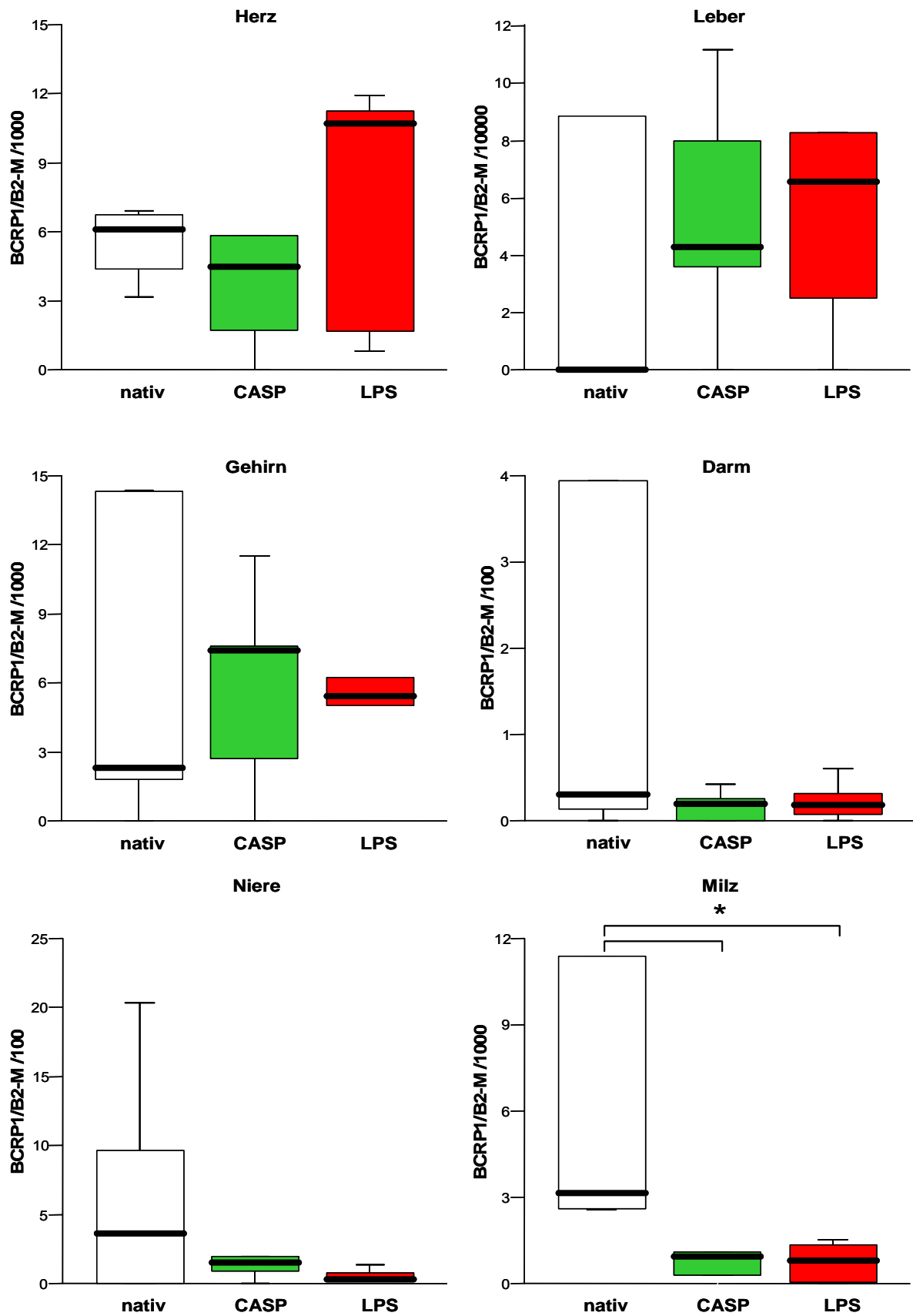


Abbildung 3-13 Analyse der BCRP1-Expressionslevel in den drei verschiedenen Tiergruppen (weiß=nativ, grün=CASP, rot=LPS). Die mit „*“-gekennzeichneten Proben sind statistisch signifikant beim Vergleich der Tiergruppe, in denen eine Sepsis ausgelöst wurde, zu denen, der nativen Kontrollgruppe.

Tabelle 3-3 Zusammenfassung der Ergebnisse

		CASP gegenüber nativ	LPS gegenüber nativ	LPS gegenüber CASP
P-gp	Herz	↑	↔	↓
	Leber	↑↑	↔	↓
	Gehirn	↑	↔	↓
	Darm	↑	↔	↓
	Niere	↑	↔	↓
	Milz	↑	↔	↓↓
mrp2	Herz	↑	↓↓	↓↓
	Leber	↓↓	↓↓	↓↓
	Gehirn	↓	↓↓	↓↓
	Darm	↓↓	↓↓	↓↓
	Niere	↓	↓↓	↓↓
	Milz	↑	↓↓	↓↓
mrp5	Herz	↑	↔	↓↓
	Leber	↑↑	↑	↓↓
	Gehirn	↑	↑	↓↓
	Darm	↑	↔	↓
	Niere	↑	↓	↓↓
	Milz	↑	↓↓	↓↓
BCRP1	Herz	↓	↑	↑
	Leber	↑	↑	↑
	Gehirn	↑	↑	↓
	Darm	↓	↓	↔
	Niere	↓	↓	↓
	Milz	↓↓	↓↓	↔

In der oben dargestellten Tabelle (Tabelle 3-3) sind die Ergebnisse des Vergleichs der Tiergruppen zusammengefasst. ↔ symbolisiert ein annähernd gleich bleibendes Verhalten, wohingegen ↓ eine Expressionsabnahme und ↑ eine Steigerung der Expression darstellen. Die Zeichen ↓↓ bzw. ↑↑ stellen signifikante Veränderungen im Expressionsniveau dar.

4. Diskussion

Sepsis ist ein Krankheitsbild von großer klinischer Relevanz, das uns im klinischen Alltag immer wieder vor große Probleme stellt. Auf der einen Seite sind die zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge größtenteils unverstanden und auf der anderen Seite beobachtet man große interindividuelle Unterschiede im Erfolg verschiedener Therapieansätze. Da die Funktion und klinische Relevanz von Arzneimitteltransportern letztlich noch nicht umfassend geklärt ist, können diese unter Umständen Stellglieder darstellen, die Einfluss auf Therapie und Prognose einzelner Patienten nehmen können. Ziel meiner Arbeit war daher der Vergleich des Expressionsverhaltens der pharmakologisch wichtigen ABC-Transporter P-gp, mrp2, BCRP1 und mrp5 in verschiedenen Organen septischer und nativer Mäuse.

Da in der Literatur verschiedene Modelle zur experimentellen Induktion einer Sepsis beschrieben sind, sollen in dieser Arbeit auch mögliche Unterschiede einer LPS-induzierten Sepsis im Vergleich zur CASP-Sepsis untersucht werden. Während bei dem letztgenannten Modell die Sepsis durch eine induzierte Peritonitis (Implantation eines Stents im Bereich des Colon ascendens) ausgelöst wird, erfolgt die Induktion der LPS-Sepsis durch intraperitoneale LPS-Injektion. Die LPS-Dosis (8µg/g LPS) sowie die Stentgröße (16-gauge) wurden so ausgewählt, dass von der Entwicklung eines septischen Schocks, der von den Tieren für mindestens 10 Stunden überlebt wurde, auszugehen war. Dieses Zeitintervall wurde gewählt, um transkriptionelle Effekte messen zu können. Zur Kontrolle dienten jeweils unbehandelte Tiere.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden grundsätzlich zwei Sepsis-auslösende Versuchsanordnungen unterschieden. Zum einen werden vitale Infektionserreger verwendet, die entweder von außen in den Organismus eingebracht oder innerhalb des Organismus freigesetzt werden. Dabei lassen sich wiederum vier Unterkategorien einteilen. In der ersten Gruppe wird durch die Induktion einer Weichteilinfektion (z.B. im Rahmen eines Abszessgeschehens) ein Sepsisfokus gebildet. In der zweiten Gruppe wird durch die Implantation von Faeces oder lebenden Erregern in die freie Bauchhöhle der septische Zustand ausgelöst. (Browne and Leslie 1976) Damit wird das klinische Bild einer Peritonitis, eine der häufigsten Sepsisursachen, simuliert. Beide Modelle zeichnen sich durch einen protrahierten Krankheitsverlauf aus und beginnen oft wie beim Menschen mit einer hyperdynamen Phase. In der dritten Gruppe erfolgt eine parenterale Applikation von Bakterien, häufig wird *Escherichia coli* verwendet. Als Modell der vierten Gruppe ist das CLP-Modell (*cecal ligation and puncture*) zu nennen. Bei dem von

Wichterman et al. 1980 erstmals beschriebenen Modell wird durch Darmperforation eine Peritonitissymptomatik ausgelöst (*Wichterman, Baue et al.* 1980). In die gleiche Gruppe ist das CASP-Modell (*colon ascendens stent peritonitis*) einzuordnen, bei dem der Darm nicht nur punktiert wird, sondern es durch Einlage eines Stents zu einem kontinuierlichen Übertreten von Faeces aus dem Darm in den Peritonealraum kommt. Nach *Maier et al.* simuliert das CLP-Modell einen septischen Krankheitsverlauf auf Grundlage eines Abszess-ähnlichen Geschehens am Caecum, wohingegen im CASP-Modell eine diffuse Peritonitis ausgelöst wird (*Maier, Traeger et al.* 2004). Die mit beiden Modellen verbundene längere Anwartzeit ist dem klinischen Verlauf sehr ähnlich. Demgegenüber steht jedoch die schlechte Quantifizierbarkeit der genauen Dosis und der Art der Sepsis-auslösenden Mikroorganismen, die zu einem bestimmten Zeitpunkt aus dem Darmlumen in die Bauchhöhle übertreten.

Weiterhin existiert eine Vielzahl von Sepsismodellen, bei denen Endotoxine – Bestandteile von Zellmembranen gram-negativer Bakterien - auf verschiedenen Applikationswegen in den Organismus eingebracht werden. Hierbei ist hinsichtlich des klinischen Verlaufs der Applikationsweg (intravenös, intraperitoneal) sowie die Applikationszeit (bolusartig, kontinuierlich) entscheidend. Vom klinischen Bild unterscheidet sich die intraperitoneale Gabe nicht wesentlich von den oben genannten intraperitonealen Infektionsmodellen. Bei den so genannten Bolusmodellen wird einmalig eine bestimmte Menge LPS intravenös oder intraperitoneal injiziert. Dabei können durch die Variation der Dosierung klinische Symptome einer Sepsis oder eines schweren septischen Schocks hervorgerufen werden. Insgesamt ist zwar die Art der Inflammationsreaktion nach LPS-Bolusgabe mit der klinischen Situation vergleichbar, nicht jedoch die Gesamtkinetik des Entzündungsprozesses. Bei diesem Modell kommt es lediglich zu einer transienten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, beispielsweise ist der TNF- α Spiegel nur bis 3h nach Endotoxinapplikation erhöht (*Shalaby, Waage et al.* 1989). Demgegenüber steht nach CLP die Induktion einer persistierenden Infektion und damit verbundener andauernder Ausschüttung von Cytokinen gemäß MARS. Letzteres bewirkt eine deutlich bessere Simulation der klinischen Situation einer enterogenen Sepsis (*Wichterman, Baue et al.* 1980). Während die Vorteile der LPS-Applikation in der technischen Einfachheit bei der Durchführung (zumindest bei den Bolusmodellen) und der besseren Quantifizierbarkeit liegen, ist jedoch seit langem bekannt, dass gravierende pathophysiologische Unterschiede zwischen der experimentellen Endotoxinämie und der gramnegativen Sepsis beim Menschen bestehen. So können insbesondere bestimmte Eigenschaften lebender Bakterien, vor allem die Fähigkeit zur lokalen Expansion unter geeigneten Bedingungen, durch die Injektion von LPS nicht imitiert werden. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass bei den

Endotoxin-Modellen die Sepsis nicht durch ein vollwertiges Bakterium, sondern lediglich durch einen „Bakterienbestandteil“ ausgelöst wird. (Waisbren 1964) Somit fehlen den LPS-Modellen wichtige Aspekte hinsichtlich der Übertragbarkeit gewonnener Erkenntnisse auf die humane Sepsis. Außerdem sind Sensitivitätsunterschiede verschiedener Tierspezies gegenüber dem Endotoxin und verschiedenen Versuchsdesigns zu beachten. (Fink, Antonsson et al. 1991; Deitch, Ma et al. 1989; Schneider, Friderichs et al. 1990) Neben der differenzierten Vor- und Nachteile der Sepsismodelle, ist aufgrund von unterschiedlichen Ansatzpunkten und damit verbundenen verschiedenen Sepsis-auslösenden Bakterien in den verschiedenen Modellen eine potentiell unterschiedliche Regulation möglich, so dass im Rahmen meiner Dissertation für eine vergleichende Analyse, sowohl Tiere einer CASP-Sepsis als auch einer LPS-Sepsis untersucht wurden.

4.1 Gewebeverteilung

Es ist bekannt, dass die betrachteten ABC-Transporter nicht in allen untersuchten Organen gleich stark exprimiert sind. Beispielsweise wird mrp2 v.a. in der Leber exprimiert, was auch durch die Funktion dieses Transporters, als Effluxmechanismus von Glukuroniden in die Galle, nahe gelegt wird. Im Folgenden möchte ich daher zunächst auf die physiologische Gewebeverteilung der einzelnen Transporter eingehen und vor dem Hintergrund bereits publizierter Arbeiten diskutieren.

Angefangen mit dem P-gp konnte die höchste Expression im Darm gefolgt von Niere und Gehirn festgestellt werden, während in der Leber vergleichsweise niedrige Konzentrationen gemessen wurden. Aus der Literatur sind in Nagetieren drei verschiedene P-gp-Varianten mit einer unterschiedlichen Gewebeverteilung bekannt. Im Falle der Maus werden die für das P-gp kodierenden Gene mit mdr1a, mdr1b und mdr2 bezeichnet, wobei ich mich nur mit der Expression des mdr1a, das funktionell dem humanen P-gp am nächsten steht, beschäftigt habe (Bellamy 1996). Hier zeigten *Silverman et al.* 1995 eine ähnliche Gewebeverteilung. Sie konnten den Transporter v.a. in differenzierten Zellen der Darmmukosa, proximalen Nierentubuli, Milz, Leber, Pankreas, Nebennierenrinde, Lunge und Gehirn nachweisen (Silverman and Thorgeirsson 1995; Silverman and Schrenk 1997).

Das mrp2 betreffend möchte ich mich auf die Ergebnisse aus Leber, Darm und Niere konzentrieren, da nur in diesen Organen eine signifikante Expression nachweisbar war. Dabei stellte sich die höchste mrp2-Konzentration im Darm dar. *Maher et al.* publizierten 2005 ebenfalls die höchste Expression von mrp2 im Gastrointestinaltrakt, gefolgt von Niere und

Leber. Im Rahmen ihrer Untersuchungen konnten sie das Vorkommen des Transporters im GI-Trakt noch näher spezifizieren. Dabei wies das Duodenum vor Jejunum und Ileum die höchste Expression auf, während im Bereich des Kolons nur minimale Mengen gefunden wurden. (Maher, Slitt et al. 2005) Die hier durchgeführten Untersuchungen zur hepatischen mrp2 Expression bestätigen diese Arbeit und zeigen das Protein zudem v.a. im Bereich der Gallenkanalikuli lokalisiert, was ebenfalls mit bereits publizierten Arbeiten übereinstimmt (Keppler and König 1997; Kool, de Haas et al. 1997; Cherrington, Hartley et al. 2002).

Tanaka et al. wiesen 2005 in der Maus die höchste Konzentration von BCRP1 in der Niere nach und zeigten es außerdem in Leber, Ileum und Skrotum. Es ist weiterhin bekannt, dass das murine BCRP1 in männlichen Tieren hepatisch verstärkt exprimiert ist, wofür Testosteron als ursächlich identifiziert werden konnte (Tanaka, Slitt et al. 2005). Im Rahmen meiner Experimente konnte ich die höchste Konzentration von BCRP1 im Herz, gefolgt von Darm, Niere und Milz nachweisen. Am geringsten war der Transporter in Gehirn und Leber exprimiert. Dies ist mit Blick auf die Leber ein Widerspruch zu der oben erwähnten Studie. Eine mögliche Erklärung hierfür mag in der Nichtberücksichtigung des Geschlechtes im Rahmen unserer Versuche liegen. Zum anderen konnten quantitative Unterschiede der BCRP1-Expression in verschiedenen Organabschnitten nachgewiesen werden. So zeigten *Gutmann* et al. 2005 für den humanen Gastrointestinaltrakt eine Abnahme der BCRP1-Expression vom Duodenum zum Rektum. Dabei wies das Rektum nur noch etwa 50% der Konzentration des Duodenums auf. (Gutmann, Hruz et al. 2005) Bei meinen Versuchen erfolgte keine Betrachtung hinsichtlich der verschiedenen intestinalen Substrukturen, sondern es wurde ausschließlich Dickdarm entnommen, der insgesamt den Expressionsanalysen zugeführt wurde. Kritisch anzumerken im Zusammenhang mit der Betrachtung der physiologischen Gewebeverteilung von BCRP1 ist aber auch eine Expression des Transporters im Endothel von Venen und Kapillaren, was konsekutiv ebenfalls zu einem Nachweis des Transporters in allen untersuchten Organen führt (Maliepaard, Scheffer et al. 2001). Da auch P-gp im Endothel von Gefäßen nachweisbar ist, ist die gleiche Kausalität auch im Bezug auf diesen ABC-Transporter anzuwenden. (Georges, Bradley et al. 1990) Insgesamt ist die auch von mir detektierte hohe Expression von BCRP1 im Darm ein Hinweis auf die protektive Bedeutung des Transporters, da durch den Auswärtstransport der Xenobiotika die intestinale Absorption limitiert wird. (Enokizono, Kusuhara et al. 2007)

Meine Analysen der Gewebeverteilung von mrp5 in der Maus zeigten das höchste Vorkommen des Transporters im Darm gefolgt von Milz und Gehirn, aber auch in Herz und Niere konnte mrp5 gemessen werden. Die geringste mrp5-Expression war in der Leber festzustellen. Die Arbeitsgruppe um *Maher* kam zu ähnlichen Ergebnissen, auch hier zeigte sich die höchste

Expression von mrp5 im Darm und Gehirn, während dieser ABC-Transporter in der Leber am geringsten exprimiert war (Maher, Slitt et al. 2005).

4.2 Verhalten der Transporter bei Sepsis

Nach Durchführung der beschriebenen Sepsisinduktionen war bei den untersuchten ABC-Transportern in den verschiedenen Modellen eine veränderte, allerdings nicht immer gleichsinnige, Expression feststellbar. P-gp wies beispielsweise im CASP-Sepsismodell in allen betrachteten Organen, besonders jedoch in Herz, Niere, Gehirn und Leber eine deutliche Expressionszunahme im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Allerdings war dieser Unterschied einzig in der Leber signifikant. Demgegenüber fiel die Induktion im LPS-Modell sehr gering aus. Die Tatsache, dass die Transporter in den Sepsismodellen nicht gleichsinnig reguliert sind, wird im Verlauf der Diskussion mehrfach auffallen. Häufig sind im Rahmen der CASP-Sepsis die Transporter induziert, wohingegen nach LPS-Gabe eher eine Abnahme der Expression beobachtet wurde. Beide Methoden sind, wie bereits oben erwähnt, anerkannte Modelle zur Sepsisinduktion, allerdings ist in diesen Studien nie eine vergleichende Analyse der Transporterexpression durchgeführt worden.

Im Rahmen einer 1998 von Vos et al. durchgeführten Expressionsanalyse von P-gp konnte gezeigt werden, dass die mdr1b-Spiegel in Rattenhepatozyten 6 bis 48 Stunden nach LPS-Exposition anstiegen, während die Expression von mdr1a unverändert blieb (Vos, Hooiveld et al. 1998). Demgegenüber stehen die Beobachtungen von Goralski et al., die 2003 in Rattenhepatozyten 6 Stunden nach intravenöser Applikation von LPS eine deutliche Abnahme der mdr1a-Expression und eine Zunahme der mdr1b-Expression beobachten konnten. Nach insgesamt 24 Stunden kehrten jedoch beide Expressionslevel wieder zu ihrem Ausgangsniveau zurück. (Goralski, Hartmann et al. 2003) Insgesamt sind die pathophysiologischen Vorgänge einer Sepsis v.a. in einer vermehrten Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokinen wie Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) begründet. Zur genaueren Klärung der durch LPS-ausgelösten inflammatorischen Mechanismen erfolgten *In-vitro*-Versuche mit verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen. Dabei wurde in Rattenhepatozyten gezeigt, dass die gesteigerte P-gp-Proteinexpression vorrangig durch eine Induktion der mdr1b-Genexpression bedingt ist, wobei TNF- α als das regulierende Zytokin identifiziert werden konnte. (Hirsch-Ernst, Ziemann et al. 1998) Zu dieser Beobachtung passt auch der Umstand, dass bei vorheriger Gabe von Pentoxyfyllin, einem TNF- α -Inhibitor, keine P-gp Regulation zu erkennen war. (Ando, Nishio et al. 2001) Demgegenüber stehen die Beobachtungen von Sukhai et al., die in weiteren

In-vitro-Versuchen mit Rattenhepatozyten eine Abnahme der *mdr1a*- und *mdr1b*-Spiegel nach 24-stündiger Inkubation mit IL-6, als pro-inflammatorisches Zytokin, beobachteten. Die gleiche Arbeitsgruppe zeigten dabei auch eine Reduktion des Rhodamin 123-Efflux, als funktionellen Ausdruck der verminderten *mdr1a*-Genexpression (Sukhai, Yong et al. 2001; Sukhai, Yong et al. 2000). Des Weiteren zeigten Akazawa et al. in Rattenhepatozyten nach einer IFN- γ -Behandlung im Verlauf ebenfalls eine Abnahme der P-gp-Funktionalität. Allerdings konnten sie dabei auf Proteinebene mittels Western Blot-Analysen eine Zunahme des detektierten Proteins beobachten, so dass insgesamt Rückschlüsse des Expressionsverhaltens von Genen auf die Transporterfunktionalität als schwierig erörtert wurden. (Akazawa, Kawaguchi et al. 2002) Fernandez et al. gab 2004 einen Überblick über den Einfluss von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen auf die P-gp-Expression. Dabei zeigten die Ergebnisse eine äußerst komplexe Regulation dieses Transporters durch eine Entzündungsreaktion im Allgemeinen und einzelne Entzündungsmediatoren im Besonderen, wobei auffällig war, dass die jeweils beobachteten Regulationen nicht immer in die gleiche Richtung gehen. (Fernandez, Buyse et al. 2004) Es wurden allerdings nicht nur die Effekte einzelner Zytokine auf die Transporterexpression untersucht, sondern auch die Freisetzung der Zytokine selbst nach Sepsis-Induktion durch LPS oder Terpentin. Hier konnte für das LPS vor allem ein Anstieg von IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α und IFN- γ beobachtet werden, während die Terpentin-Methode nur zu einem Anstieg von IL-1 β und IL-6 führte. Terpentin ist in der Literatur als ein starkes abakterielles Entzündungsmittel beschrieben, welches eine starke abakterielle Entzündungsreaktion hervorruft (Scotte, Hiron et al. 1996). Vergleichbare Daten im Rahmen einer CASP-Sepsis liegen aktuell nicht vor.

Im Rahmen der Diskussion des veränderten Expressionsniveaus der untersuchten Transporter ist allerdings eine Interpretation schwierig, da die Regulationsvorgänge nach Sepsisinduktion einem zeitlich dynamischen Prozess unterliegen. Durch den undulierenden Verlauf der Zytokinausschüttung im Rahmen der Hyperinflammation bzw. Anergie kommt es zu einem wechselnden Zytokinprofil, welches konsekutiv zu einer veränderten Transporterregulation je nach Sepsisstadium führt. So berichteten Cherrington et al. bereits 2004 von einer mehrphasigen Regulation der Transporter P-gp, *mrp2* und *mrp5* nach LPS-Gabe. Bei *mrp5* beispielsweise folgt auf eine initiale Hemmung zunächst eine Normalisierung bis Steigerung der *mrp5* Expression, die aber im Folgenden wieder abnimmt. (Cherrington, Slitt et al. 2004) Zu ähnlichen Ergebnissen kamen 2004 Donner et al.: Sie untersuchten ebenfalls die Expression basolateraler MRP's, wie *mrp2* und *mrp5*, in Rattenhepatozyten nach LPS-Applikation im zeitlichen Verlauf (Donner, Warskulat et al. 2004).

In der Literatur stellen sowohl CASP als auch LPS anerkannte Induktionsmodelle einer Sepsis dar, insgesamt ist allerdings nicht anzunehmen, dass sich die Transporterexpression während der LPS- und CASP-induzierten Sepsis in gleicher Weise verändern. Eine beispielhafte Betrachtung der Latenzzeiten in den verschiedenen Sepsismodellen verdeutlicht dieses. Während es nach LPS-Gabe ziemlich rasch zu dem klinischen Bild einer Sepsis kommt, ist die Anwarthezeit im Rahmen einer CASP-Sepsis wesentlich länger. Demgegenüber stehen die Vorteile der CASP-Sepsis, die vor allem darin liegen, dass dieses Modell die pathophysiologischen Vorgänge des klinischen Verlaufs einer (humanen) Sepsis deutlich besser abbildet als eine LPS-induzierte Sepsis. Nachteilig sind zudem die geringe Identifizier- und Quantifizierbarkeit des auslösenden Agens, sowie der schwer einzuschätzende zeitliche Ablauf der Sepsis zu bewerten. Um zumindest dem letztem Punkt Rechnung zu tragen und um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Sepsismodellen zu erreichen, ist es sicherlich in Folgeversuchen sinnvoll, eine Korrelation zwischen den zum Zeitpunkt der Organentnahme bestehenden Zytokinspiegeln und dem Expressionsniveau der ABC-Transporter zu erarbeiten. Dabei würde sich IL-6 anbieten, welches auch in der Klinik als Sepsisparameter Anwendung findet.

Im Rahmen meiner Versuche konnte eine Zunahme der P-gp-Expression in allen untersuchten Organen nach CASP-Sepsis beobachtet werden. Da meinen Experimenten zur Untersuchung der P-gp-Expression das *mdr1a*-Gen zugrunde lag, ist diese gegenüber den von Vos et al. publizierten Daten abweichend, die nach LPS-Applikation nur einen Anstieg der *mdr1b*-Expression beobachteten, hingegen die *mdr1a*-Spiegel unverändert blieben (Vos, Hooiveld et al. 1998). Am ehesten sind diese Beobachtungen auf eine im Rahmen der Sepsis verändertes Zytokinprofil zurückzuführen (Fernandez, Buyse et al. 2004). Unter physiologischen Bedingungen ist P-Glykoprotein auf der luminalen Seite der Enterozyten des Dün- und Dickdarms lokalisiert. Dabei transportiert es Arzneimittel, die aus dem Darm in die Zelle aufgenommen wurden, zurück in das Darmlumen. Die dadurch entstehende funktionelle Absorptionsbarriere behindert die orale Absorption von Arzneimitteln. Durch Hemmstoffe des P-gp-vermittelten Transportes, wie zum Beispiel Verapamil, kann dieses Hindernis überwunden werden, Induktoren hingegen verstärken diesen Effekt. Nimmt man aufgrund der beobachteten Expressionszunahme eine gesteigerte Funktonalität von P-gp an, führt dies zu einem vermehrten Substrattransport, obwohl diese Korrelation in der Literatur uneinheitlich beschrieben ist (Akazawa, Kawaguchi et al. 2002). Durch den vermehrten intestinalen und hepatischen Auswärtstransport von P-gp-Substraten wie beispielsweise Sparfloxacin kommt es unter septischen Bedingungen zu einer deutlich geringeren Bioverfügbarkeit von oral applizierten Arzneimitteln und letztlich bedeutet dies ein Therapieversagen, da trotz regulärer Dosierung, am

Zielort keine therapeutische Dosis erreicht wird. Ähnliche Beobachtungen wurden auch im Rahmen des M. Crohn und der Colitis ulcerosa publiziert. *Farrell et al.* zeigten 2000 eine erhöhte P-gp-Expression in der Dickdarmmukosa und in Lymphozyten bei bestehender chronisch entzündlicher Darmerkrankung. Dabei wurde die erhöhte Transporterexpression in Zusammenhang mit Therapieresistenz für Steroide gesetzt, da aufgrund der beobachteten Expressionszunahme eine geringere Bioverfügbarkeit der Steroide festgestellt wurde. (Farrell, Murphy et al. 2000)

Ein interessantes Beispiel bietet auch das im Rahmen der Sepsis eingesetzte Hydrocortison, das in der Literatur sowohl als P-gp-Substrat und –Induktor beschrieben ist (Siegmond, Cascorbi et al. 2003). Hydrocortison ist ein wichtiger Bestandteil der adjuvanten Sepsistherapie, da es in niedrigen Dosierungen die Letalität von septischen Patienten signifikant reduziert. Dies beruht zum einen darauf, dass Hydrocortison als klassisches Stresshormon der Nebennierenrinde etwa 150 Gene kontrolliert. Ein großer Anteil dieser Gene kodieren wiederum für inflammatorische Peptide (z.B. Zytokine), die in der Sepsis den dramatischen Verlauf der Entzündungsprozesse initiieren und dirigieren. Auf der anderen Seite reduziert Hydrocortison die Therapiedauer von vasopressiv wirkenden Katecholaminen signifikant, indem es mutmaßlich zu einer verbesserten Wirkung α -adrenerg wirksamer Katecholamine an der Gefäßmuskelzelle in der Situation eines septischen Schocks führt. Obwohl Hydrocortison dabei v.a. intravenös appliziert wird, ist zwar die Beeinflussung der enteralen Absorption zu vernachlässigen, dennoch kann möglicherweise die organspezifische Lokalisation von P-gp die Bioverfügbarkeit der Substrate beeinflussen. Da Hydrocortison sowohl Substrat als auch Induktor von P-gp ist, würde es, unter der von mir beobachteten gesteigerten P-gp-Expression nach einer CASP-Sepsis, zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von Hydrocortison im Herz oder im Gehirn führen. Aber auch andere P-gp-Substrate wie Amiodaron, Nifedipin, Diltiazem und Carvediol, als kardial wirksame Arzneimittel, hätten unter septischen Bedingungen eine verminderte kardiale Bioverfügbarkeit. Eine mögliche Interaktion würde sich aber auch bei der Therapie mit mehreren P-gp-Substraten ergeben. Bei gleichzeitiger Therapie von Sparfloxacin und beispielsweise Digitalis, aufgrund einer kardialen Vorerkrankung, kommt es zu einer Konkurrenz um den durch P-gp-vermittelten Auswärtstransport. Im folgenden Verlauf könnte es nicht nur zu einer Beeinflussung der eingeleiteten antimikrobiellen Therapie, sondern auch zu einer Beeinträchtigung der Digitalis-Spiegel kommen. Die daraus resultierenden erhöhten intrazellulären Spiegel würden zu einem verstärkten Nebenwirkungsprofil der verwendeten Arzneimittel führen. Dieses Beispiel ist noch auf weitere Medikamente auszuweiten, die ebenfalls als P-gp-Substrate beschrieben sind, wie beispielsweise Verapamil, Amiodaron, Carvediol und Talinolol (Kim 2002). Auch eine

vorbestehende antikonvulsive Therapie mit Carbamazepin würde die Bioverfügbarkeit von im Rahmen eines septischen Geschehens verabreichten P-gp-Substraten beeinflussen. In der Literatur ist Carbamazepin als Induktor des über P-gp-vermittelten Transportes beschrieben und sorgt somit für einen noch weiter gesteigerten Auswärtstransport der Substrate z.B. aus den Astrozyten, da P-gp als Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke einen protektiven Effekt auf das ZNS-Gewebe darstellt. (Siegmond, Cascorbi et al. 2003) Aufgrund meiner durchgeführten Expressionsanalysen würde es bei einer Sepsis zu einem ausgeprägterem P-gp-vermittelten Transport kommen, welcher in der Synopsis der Ergebnisse zu einer möglichen veränderten Bioverfügbarkeit von P-gp-Substraten führen kann.

Mrp2 zeigt im Vergleich der Sepsismodelle sowohl in den CASP-Proben als auch in den LPS-Proben gegenüber den nativen Proben eine verminderte Expression. Dies Verhalten ist vor allem im Vergleich von LPS-Proben mit nativen Proben auffällig, hier ist die Transporterexpression teilweise nicht mehr nachweisbar. Die Regulation ist in allen untersuchten Organen statistisch signifikant. Auch in den Tieren der CASP-Gruppe ist dies Verhalten zu beobachten, allerdings in abgeschwächter Form. Eine Ausnahme bildet hier jedoch die Milz, in der es nach CASP-Sepsis zu einer Expressionszunahme kommt.

Im weiteren Verlauf der Diskussion möchte ich mich auf die Organe beschränken, in denen der Transporter auch in einer nennenswerten Ausgangsexpression vorhanden ist: Leber, Darm und Niere. Das von mir beobachtete Verhalten der Transporterexpression ist bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden. So konnten *Donner* et al. eine Abnahme des hepatischen mrp2 nach LPS-Gabe in der Ratte beobachten (Donner, Warskulat et al. 2004). *Kim* et al. zeigten eine deutliche Reduktion der Transporter Ntcp (einem Natrium-abhängigen Gallensäuretransporter) und Mrp2 in der Leber nach coecaler Ligatur mit nachfolgender Punktion zur Sepsisinduktion. Dabei wurde die Reduktion der Transporterexpression als Mitursache für die Entwicklung einer Hyperbilirubinämie im Rahmen einer Sepsis diskutiert. Hierzu passt auch die ebenfalls beobachtete kompensatorische Induktion der Transporter MRP3 und MRP4 in der sinusoidalen Membran. (Kim, Chen et al. 2000) Der Rückgang der hepatischen mrp2-Expression könne dabei auch durch einen globalen Leberzelluntergang im Zusammenhang mit dem auftretenden Multiorganversagen bedingt und damit sekundärer Natur sein, wobei die gesteigerte Expression von MRP3 und MRP4 dabei nicht zu erklären wäre. Der in diesem Zusammenhang auftretende generelle Funktionsverlust der Leberzellen ist dabei ebenfalls mit einer Hyperbilirubinämie assoziiert. Diese ist aber im Gegensatz zur vorher beschriebenen direkten Hyperbilirubinämie eine indirekte Hyperbilirubinämie. Zur Differentialdiagnostik der Hyperbilirubinämie ist auch das zeitliche Auftreten des Ikterus von Bedeutung. *Donner* et al. und

auch *Cherrington* et al. konnte eine signifikante Abnahme des hepatischen mrp2-Transporters bereits nach 6 Stunden beobachten (Donner, Warskulat et al. 2004; Cherrington, Slitt et al. 2004). Im klinischen Alltag stellt das Leberversagen ein spätes Ereignis (7-20 Tage nach den ersten Zeichen einer Infektion) des Multiorganversagens dar. Im Verlauf kommt es zu einem späten Anstieg des Bilirubins, der Transaminasen und der alkalischen Phosphatase als Zeichen der Leberzellschädigung. In neueren Untersuchungen konnte allerdings gezeigt werden, dass die Leberfunktionsstörung sehr früh nach Einsetzen der Sepsis auftritt. (Wang, Ba et al. 1991) Die Reduktion des mrp2 in der Niere kann wahrscheinlich ebenfalls in den Kontext des Nierenversagens im Rahmen eines Multiorganversagens eingeordnet werden. Auch dabei kommt es bei einer Funktionsstörung der Nierenzellen zu der nachgewiesenen Expressionsabnahme des Transporters. Der gleiche Sachverhalt ist auch eine mögliche Erklärung für den Rückgang der BCRP1-Expression in der Niere.

Insgesamt weisen allerdings die nativen Proben hinsichtlich der BCRP1-Expression eine erhebliche interindividuelle Variabilität auf, so dass eine Interpretation im Vergleich zu septischen Bedingungen schwierig ist. Bei der Mittelwertbetrachtung fällt des Weiteren in Leber und Gehirn eine Expressionszunahme in beiden Modellen auf, während es außer in der Niere noch in Darm und Milz jeweils zu einer Abnahme der Expression gegenüber den nativen Proben kommt. Demgegenüber zeigt sich im Herzen eine gegensätzliche Regulation, die LPS-Proben zeigen eine gesteigerte Expression, die CASP-Proben eine verminderte Expression von BCRP1. Wobei diese Unterschiede einzig in der Milz statistisch signifikant sind.

Im Rahmen der pathophysiologischen Vorgänge einer Sepsis kommt es zu einer Hypoxie der peripheren Gewebe. *Krishnamurthy* et al. zeigten 2005 eine verstärkte BCRP1-Expression unter hypoxischen Bedingungen, damit es im Verlauf einer Hypoxie nicht zu einer Akkumulation von BCRP1-Substraten wie z.B. Porphyrinen kommt (Krishnamurthy and Schuetz 2005). Das Gehirn ist bekannterweise das Organ, das hinsichtlich hypoxischen Bedingungen am sensibelsten reagiert. Im Rahmen meiner Experimente konnte ich eine Zunahme der BCRP1-Expression im Gehirn beobachten. Diese Zunahme ist möglicherweise durch die sepsisbedingte Hypoxie begründet und dient als kompensatorischer Schutzmechanismus des Gewebes gegenüber Akkumulation von BCRP1-Substraten, um dadurch mögliche Toxizitäten zu vermeiden.

Im klinischen Alltag stellt das Krankheitsbild Sepsis eine gefürchtete Komplikation von immundefizienten Patienten, z.B. bei aktueller Chemotherapie dar. Durch die beobachtete Expressionsabnahme des Transporters mrp2 kommt es zu einer verstärkten intrazellulären Akkumulation von einigen Chemotherapeutika, die als mrp2-Substrate beschrieben sind. Als Beispiele sind dabei die Vincaalkaloide Vincristin und Vinblastin, das Alkylanz Cisplatin, sowie

Methotrexat zu nennen (Jedlitschky, Hoffmann et al. 2006). Die intrazelluläre Akkumulation von diesen Arzneimitteln könnte zu gesteigerten toxischen Nebenwirkungen führen. So könnte es im Rahmen der Expressionsabnahme in der Niere zu einer Akkumulation von Cisplatin, für welches ausgeprägte nephrotoxische Nebenwirkungen beschrieben sind, kommen. Betrachtet man allerdings in diesem Kontext die Expression von P-gp und BCRP1, fällt unter septischen Bedingungen überwiegend eine Expressionszunahme auf. Insgesamt könnte diese Zunahme als Kompensationsmechanismus gewertet werden, da die oben genannten mrp2-Substrate auch als P-gp- oder BCRP1-Substrate beschrieben sind.

Mrp5 zeigt in den von mir durchgeführten quantitativen Analysen ein uneinheitliches Expressionsverhalten im Vergleich der beiden Sepsismodelle. Die Proben, die eine CASP-Sepsis durchlaufen haben, zeigen in allen untersuchten Organen eine, allerdings nicht signifikante, Expressionszunahme des Transporters. In den LPS-Proben läßt sich in Herz und Leber keine Veränderung detektieren, während im Gehirn eine geringe Zunahme von mrp5 zu sehen ist, wobei auch hier eine sehr starke interindividuelle Varianz vorliegt. Im Darm, der Niere und der Milz kommt es hingegen zu einer Expressionsabnahme von mrp5, wobei diese in der Milz auch statistisch signifikant ist. Funktionell ist mrp5 neben seiner Funktion als Effluxtransporter für Arzneimittel vor allem als Exportpumpe für zyklische Nukleotide (cAMP, cGMP) interessant und stellt damit neben den Phosphodiesterasen einen weiteren Mechanismus zur intrazellulären Regulation dieser *second messengers* dar. Aus diesem Grund könnte eine Regulation der MRP5 Expression hinsichtlich vasodilatativer Effekte und einer myokardialen Depression, die beide u.a. über die NO-cGMP-Schiene reguliert werden, von Interesse sein. (Senzaki, Smith et al. 2001)

Der quantitative Anteil von mrp5 an der intrazellulären cGMP-Homeostase ist bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Eine Reihe von Forschungsgruppen haben sich bisher auf die cGMP-Hydrolyse durch Phosphodiesterasen, v.a. PDE5, als Hauptabbauweg von cGMP konzentriert (Das, Xi et al. 2005). Jedlitschky et al. zeigten 2000 in Zellkulturversuchen, dass die PDE5-Inhibition nicht nur die intrazelluläre cGMP-Konzentration erhöht, sondern es ebenfalls zu einer Erhöhung der extrazellulären Konzentration kommt. Dies ließ einen erheblichen cGMP-Auswärtstransport vermuten, der sich ebenfalls durch PDE-Inhibitoren beeinflussen ließ. Im weiteren Verlauf wurde dabei der Transporter mrp5 identifiziert. (Jedlitschky, Burchell et al. 2000) Im Zusammenhang mit vaskulärer Kontraktilität konnte gezeigt werden, dass das funktionelle Ausschalten von mrp5 in pialen Arteriolen zu einer Relaxation von Gefäßen führt (Xu, Gavriluyk et al. 2004). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass eine potentielle Regulation des Transporters mrp5 in Geweben eine funktionelle Relevanz hat.

In den Herzproben sieht man nach Induktion einer LPS-Sepsis ein annähernd quantitativ gleich bleibendes Verhalten von *mrp5*, wohingegen es nach Induktion einer CASP-Sepsis zu einer Expressionszunahme kommt. Im Zusammenhang mit einem septischen Krankheitsverlauf tritt häufig eine kardiale Dysfunktion auf. Dies kann zum einen in einer gesteigerten Apoptose und zum anderen in einer verminderten mitochondrialen O₂-Utilisation begründet sein. Auf der anderen Seite kann aber auch eine veränderte *mrp5*-Expression als mögliche Erklärung in Betracht kommen. Nachdem *Kumar et al.* einen Einfluss von NO und cGMP auf die Funktion von kontraktile Zellen wie Kardiomyozyten und Gefäßmuskelzellen beobachteten (*Kumar, Brar et al. 1999*), zeigten *Senzaki et al. 2001*, dass erhöhte cGMP-Spiegel, die auf einer verminderten PDE-5-Expression basieren, mit verminderter kardialer Kontraktilität im Sinne eines Herzversagens assoziiert sind (*Senzaki, Smith et al. 2001*). Legt man diese Beobachtungen für eine potentielle Einflussnahme von *mrp5* auf den cGMP-Stoffwechsel bzw. der kardialen Kontraktilität zugrunde, so konnten *Meissner et al. 2007* eine Expressionsabnahme von MRP5 in Herzmuskelzellen nach LPS-Endotoxämie und multibakteriellen peritonealem Schock beobachten, was möglicherweise zu einer verminderten kardialen Funktion im Rahmen des septischen Herzversagens auf dem Boden von erhöhten intrazellulären cGMP-Spiegeln. (*Meissner, Kessler et al. 2007*). Im Rahmen meiner Experimente kam es in den Herzproben bei LPS- bzw. CASP-Sepsis zu einem gleich bleibenden Verhalten bzw. zu einer Zunahme des Transportervorkommens. Somit kann ich die von *Meissner et al.* gemachten Beobachtungen nicht bestätigen. Vor dem Hintergrund der Annahme, dass die veränderte kardiale Funktion auch durch veränderte cGMP-Spiegel begründet ist, ist anzumerken, dass ein verminderter Abtransport oder auch ein reduzierter Abbau nur eine Möglichkeit darstellen, um erhöhte intrazelluläre cGMP-Konzentrationen zu erreichen. Daneben kann auch eine gesteigerte cGMP-Synthese in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein. *Kumar et al.* konnten in *In-vitro*-Versuchen an kardialen Monozyten nachweisen, dass im Rahmen der kardialen Depression bei einem septischen Schock die endogene Synthese von cGMP, sowie dessen Ausgangspunkt NO durch proinflammatorische Zytokine beeinflussbar sind (*Kumar, Brar et al. 1999*). In der Summation der Ergebnisse ergeben sich bei kardialer Depression im Rahmen einer Sepsis Hinweise auf erhöhte cGMP-Spiegel, wobei die Funktion von *mrp5* bislang unklar ist.

Auf Grundlage der Ergebnisse meiner Experimente ist in der Synopsis, eine differenzierte Beeinflussung der Transporterexpression im Rahmen eines septischen Geschehens zu erkennen. Bei der schon von anderen Autoren beobachteten zeitlichen Dynamik des Transporterverhaltens nach Sepsisinduktion ist es allerdings nur eingeschränkt möglich, absolute Aussagen zu treffen, da im Rahmen meiner Dissertation nur eine zeitliche Angabe ausgewertet wurde. Des Weiteren

sind in Folgeversuchen auch Funktionalitätsanalysen der Transporter anzuschließen, um die veränderte Expression mit der Funktion zu korrelieren, und im Folgenden gezielte Aussagen hinsichtlich der veränderten Arzneimitteltherapie bei einer Sepsis machen zu können. Letztlich bleibt die Funktion und Relevanz der Transporter unklar.

5. Zusammenfassung

Sepsis ist ein Krankheitsbild mit ausgeprägter klinischer Relevanz, das im klinischen Alltag immer wieder große Probleme aufwirft. Zum einen sind die zugrunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge im Wesentlichen unverstanden und zum anderen sind große interindividuelle Unterschiede im Erfolg verschiedener Therapieansätze zu beobachten. Die Funktion und Relevanz von Arzneimitteltransportern ist letztlich unklar und unter Umständen stellen sie Einflussgrößen dar, die sich auf Therapie und Prognose einzelner Patienten auswirken können. Des Weiteren muss aufgrund der Vielzahl der parallel verwendeten Wirkstoffe von einem großen Interaktionspotential der verwendeten Substanzen ausgegangen werden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Frage eruiert, ob eine systemische Entzündungsreaktion die Expression dieser Transportproteine beeinflusst. Dafür standen Proben zweier unterschiedlicher Sepsismodelle zur Verfügung, die mittels quantitativer PCR und Immunfluoreszenz auf die Expression der pharmakologisch wichtigen ABC-Transporter P-gp, mrp2, BCRP1 und mrp5 in verschiedenen Organen untersucht wurden.

Bis auf das mrp2, das nur in Darm, Niere und Leber detektiert werden konnte, konnten alle untersuchten Transporter in den betrachteten Organen auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Diese Befunde wurden teilweise mittels Immunfluoreszenz-Untersuchungen bestätigt. So konnte beispielsweise die kanalikuläre Lokalisation des mrp2 bestätigt und MRP5, wie schon für das humane Herz beschrieben, in den Kardiomyozyten und Endothelzellen lokalisiert werden.

Der Vergleich der Sepsismodelle und der nativen Proben zeigt ein uneinheitliches Bild: Hier wurden in den meisten Fällen erhöhte Expressionsspiegel für die CASP-Sepsis beobachtet, wohingegen es beim LPS-Modell vorrangig zu einer Abnahme kam. Lediglich mrp2, das in beiden Modellen vermindert exprimiert war, bildete hier eine Ausnahme. Diese sehr differierenden Ergebnisse sind dabei sehr wahrscheinlich im Versuchdesign begründet. Aufgrund der unterschiedlichen Applikationsverfahren ist beispielsweise mit verschiedenen Anwartzeiten und einem differierenden Zytokinprofil zu rechnen, wodurch die voneinander abweichenden Effekte hinsichtlich der Transporterexpression zu erklären wären.

Betrachtet man die Ergebnisse im Einzelnen, so zeigt sich für P-gp nur im CASP-Sepsismodell eine signifikante Expressionsänderung. Die hier beobachtete gesteigerte Transporterexpression könnte durch eine Verminderung der lokalen und systemischen Verfügbarkeit von P-gp Substraten auch funktionelle Bedeutung haben. Die ebenfalls gemessene BCRP1 Expression unterlag insgesamt erheblichen Schwankungen, so dass hier keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden konnten. Für BCRP1 konnte lediglich im Gehirn während beiden Sepsisanordnungen

eine deutlich erhöhte Expression festgestellt werden. Vor dem Hintergrund einer möglichen cerebralen Hypoxie im Rahmen der Sepsis, könnte die Zunahme als kompensatorischer Schutzmechanismus vor Akkumulation von BCRP1-Substraten, wie beispielsweise Porphyrinen, interpretiert werden. Die cGMP/cAMP-Effluxpumpe mrp5 zeigt schließlich in allen Organen der CASP-Gruppe ebenfalls eine Expressionszunahme, während es im LPS-Modell in Darm, Niere und Milz zu einer Expressionsabnahme kommt. Es wird diskutiert, ob der Transporter an der Regulation der intrazellulären Konzentration der *second messengers* cAMP und cGMP beteiligt ist, was im Hinblick auf eine sepsisbedingte Vasodilatation und myokardiale Depression, die beide u.a. über den NO-cGMP-Signaltransduktionsweg reguliert werden, von Interesse wäre. Im Rahmen der Experimente kam es in den Herzproben bei LPS- bzw. CASP-Sepsis zu einem gleich bleibenden Verhalten bzw. zu einer Zunahme des Transportervorkommens, so dass letztlich keine sichere Korrelation zwischen den pathophysiologischen Veränderungen im Rahmen einer Sepsis und der Funktion von mrp5 gestellt werden kann.

Zusammenfassend kann man eine Beeinflussung der Transporter durch ein septisches Geschehen ausmachen, wobei die klinische Relevanz und Funktion der Transporter durch weitere Analysen zu klären bleibt.

6. Literaturverzeichnis

- Akazawa, Y., H. Kawaguchi, et al. (2002). "Effect of interferons on P-glycoprotein-mediated rhodamine-123 efflux in cultured rat hepatocytes." J Pharm Sci **91**(10): 2110-5.
- Allen, J. D., R. F. Brinkhuis, et al. (1999). "The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin." Cancer Res **59**(17): 4237-41.
- Allikmets, R., B. Gerrard, et al. (1996). "Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database." Hum Mol Genet **5**(10): 1649-55.
- Ando, H., Y. Nishio, et al. (2001). "Effect of endotoxin on P-glycoprotein-mediated biliary and renal excretion of rhodamine-123 in rats." Antimicrob Agents Chemother **45**(12): 3462-7.
- Bates, S. E., R. Robey, et al. (2001). "The role of half-transporters in multidrug resistance." J Bioenerg Biomembr **33**(6): 503-11.
- Belinsky, M. G., L. J. Bain, et al. (1998). "Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins." J Natl Cancer Inst **90**(22): 1735-41.
- Bellamy, W. T. (1996). "P-glycoproteins and multidrug resistance." Annu Rev Pharmacol Toxicol **36**: 161-83.
- Borst, P., R. Evers, et al. (2000). "A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins." J Natl Cancer Inst **92**(16): 1295-302.
- Browne, M. K. and G. B. Leslie (1976). "Animal models of peritonitis." Surg Gynecol Obstet **143**(5): 738-40.
- Cherrington, N. J., D. P. Hartley, et al. (2002). "Organ distribution of multidrug resistance proteins 1, 2, and 3 (Mrp1, 2, and 3) mRNA and hepatic induction of Mrp3 by constitutive androstane receptor activators in rats." J Pharmacol Exp Ther **300**(1): 97-104.
- Cherrington, N. J., A. L. Slitt, et al. (2004). "Lipopolysaccharide-mediated regulation of hepatic transporter mRNA levels in rats." Drug Metab Dispos **32**(7): 734-41.
- Cole, S. P., G. Bhardwaj, et al. (1992). "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line." Science **258**(5088): 1650-4.
- Das, A., L. Xi, et al. (2005). "Phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil preconditions adult cardiac myocytes against necrosis and apoptosis. Essential role of nitric oxide signaling." J Biol Chem **280**(13): 12944-55.
- Dean, M., Y. Hamon, et al. (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." J Lipid Res **42**(7): 1007-17.
- Deitch, E. A., L. Ma, et al. (1989). "Inhibition of endotoxin-induced bacterial translocation in mice." J Clin Invest **84**(1): 36-42.
- Donner, M. G., U. Warskulat, et al. (2004). "Enhanced expression of basolateral multidrug resistance protein isoforms Mrp3 and Mrp5 in rat liver by LPS." Biol Chem **385**(3-4): 331-9.
- Doyle, L. A., W. Yang, et al. (1998). "A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(26): 15665-70.
- Dubin, I. N. and F. B. Johnson (1954). "Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells; a new clinicopathologic entity with a report of 12 cases." Medicine (Baltimore) **33**(3): 155-97.
- Enokizono, J., H. Kusuhara, et al. (2007). "Regional expression and activity of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in mouse intestine: overlapping distribution with sulfotransferases." Drug Metab Dispos **35**(6): 922-8.

- Farrell, R. J., A. Murphy, et al. (2000). "High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy." Gastroenterology **118**(2): 279-88.
- Fernandez, C., M. Buyse, et al. (2004). "Influence of the pro-inflammatory cytokines on P-glycoprotein expression and functionality." J Pharm Pharm Sci **7**(3): 359-71.
- Fink, M. P., J. B. Antonsson, et al. (1991). "Increased intestinal permeability in endotoxic pigs. Mesenteric hypoperfusion as an etiologic factor." Arch Surg **126**(2): 211-8.
- Georges, E., G. Bradley, et al. (1990). "Detection of P-glycoprotein isoforms by gene-specific monoclonal antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(1): 152-6.
- Gerk, P. M. and M. Vore (2002). "Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition." J Pharmacol Exp Ther **302**(2): 407-15.
- Goralski, K. B., G. Hartmann, et al. (2003). "Downregulation of mdr1a expression in the brain and liver during CNS inflammation alters the in vivo disposition of digoxin." Br J Pharmacol **139**(1): 35-48.
- Gottesman, M. M. and I. Pastan (1993). "Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter." Annu Rev Biochem **62**: 385-427.
- Gutmann, H., P. Hruz, et al. (2005). "Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract." Biochem Pharmacol **70**(5): 695-9.
- Haimeur, A., G. Conseil, et al. (2004). "The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation." Curr Drug Metab **5**(1): 21-53.
- Hirsch-Ernst, K. I., C. Ziemann, et al. (1998). "Induction of mdr1b mRNA and P-glycoprotein expression by tumor necrosis factor alpha in primary rat hepatocyte cultures." J Cell Physiol **176**(3): 506-15.
- Ishizuka, H., K. Konno, et al. (1997). "Temocaprilat, a novel angiotensin-converting enzyme inhibitor, is excreted in bile via an ATP-dependent active transporter (cMOAT) that is deficient in Eisai hyperbilirubinemic mutant rats (EHBR)." J Pharmacol Exp Ther **280**(3): 1304-11.
- Jedlitschky, G., B. Burchell, et al. (2000). "The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides." J Biol Chem **275**(39): 30069-74.
- Jedlitschky, G., U. Hoffmann, et al. (2006). "Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition." Expert Opin Drug Metab Toxicol **2**(3): 351-66.
- Jedlitschky, G. and D. Keppler (2002). "Transport of leukotriene C4 and structurally related conjugates." Vitam Horm **64**: 153-84.
- Jedlitschky, G., I. Leier, et al. (1997). "ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2." Biochem J **327** (Pt 1): 305-10.
- Jonker, J. W., J. W. Smit, et al. (2000). "Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan." J Natl Cancer Inst **92**(20): 1651-6.
- Juliano, R. L. and V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-62.
- Kamisako, T., I. Leier, et al. (1999). "Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2." Hepatology **30**(2): 485-90.
- Kartenbeck, J., U. Leuschner, et al. (1996). "Absence of the canalicular isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome." Hepatology **23**(5): 1061-6.

- Kawabata, S., M. Oka, et al. (2003). "Expression and functional analyses of breast cancer resistance protein in lung cancer." Clin Cancer Res **9**(8): 3052-7.
- Keppler, D., Y. Cui, et al. (1999). "Export pumps for anionic conjugates encoded by MRP genes." Adv Enzyme Regul **39**: 237-46.
- Keppler, D. and J. Konig (1997). "Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver." Faseb J **11**(7): 509-16.
- Kim, P. K., J. Chen, et al. (2000). "Intraabdominal sepsis down-regulates transcription of sodium taurocholate cotransporter and multidrug resistance-associated protein in rats." Shock **14**(2): 176-81.
- Kim, R. B. (2002). "Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers." Drug Metab Rev **34**(1-2): 47-54.
- Kitamura, T., P. Jansen, et al. (1990). "Defective ATP-dependent bile canalicular transport of organic anions in mutant (TR-) rats with conjugated hyperbilirubinemia." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(9): 3557-61.
- Knutsen, T., V. K. Rao, et al. (2000). "Amplification of 4q21-q22 and the MXR gene in independently derived mitoxantrone-resistant cell lines." Genes Chromosomes Cancer **27**(1): 110-6.
- Komatani, H., H. Kotani, et al. (2001). "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 **61**(7): 2827-32.
- Kool, M., M. de Haas, et al. (1997). "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 **57**(16): 3537-47.
- Krishnamurthy, P. and J. D. Schuetz (2005). "The ABC transporter Abcg2/Bcrp: role in hypoxia mediated survival." Biomaterials **18**(4): 349-58.
- Kumar, A., R. Brar, et al. (1999). "Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility." Am J Physiol **276**(1 Pt 2): R265-76.
- Lee, J. and J. L. Boyer (2000). "Molecular alterations in hepatocyte transport mechanisms in acquired cholestatic liver disorders." Semin Liver Dis **20**(3): 373-84.
- Linde-Zwirble, W. T. and D. C. Angus (2004). "Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society." Crit Care **8**(4): 222-6.
- Litman, T., M. Brangi, et al. (2000). "The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2)." J Cell Sci **113** (Pt **11**): 2011-21.
- Litman, T., T. E. Druley, et al. (2001). "From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance." Cell Mol Life Sci **58**(7): 931-59.
- Maher, J. M., A. L. Slitt, et al. (2005). "Tissue distribution and hepatic and renal ontogeny of the multidrug resistance-associated protein (Mrp) family in mice." Drug Metab Dispos **33**(7): 947-55.
- Maier, S., T. Traeger, et al. (2004). "Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis." Shock **21**(6): 505-11.
- Maliepaard, M., G. L. Scheffer, et al. (2001). "Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues." Cancer Res **61**(8): 3458-64.

- Maliapaard, M., M. A. van Gastelen, et al. (2001). "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 **7**(4): 935-41.
- Masuda, M., Y. Iizuka, et al. (1997). "Methotrexate is excreted into the bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats." Cancer Res **57**(16): 3506-10.
- Mayer, R., J. Kartenbeck, et al. (1995). "Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes." J Cell Biol **131**(1): 137-50.
- Meissner, K., W. Kessler, et al. (2007). "Sepsis affects cardiac expression of multidrug resistance protein 5 (MRP5, ABCC5), an ABC-type CGMP export pump." Shock **28**(5): 564-9.
- Miyake, K., L. Mickley, et al. (1999). "Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes." Cancer Res **59**(1): 8-13.
- Mottino, A. D., T. Hoffman, et al. (2000). "Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine." J Pharmacol Exp Ther **293**(3): 717-23.
- Robey, R. W., Y. Honjo, et al. (2001). "A functional assay for detection of the mitoxantrone resistance protein, MXR (ABCG2)." Biochim Biophys Acta **1512**(2): 171-82.
- Ross, D. D., W. Yang, et al. (1999). "Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines." J Natl Cancer Inst **91**(5): 429-33.
- Rost, D., J. Konig, et al. (2001). "Expression and localization of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human gallbladder epithelia." Gastroenterology **121**(5): 1203-8.
- Sakaeda, T., T. Nakamura, et al. (2002). "MDR1 genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics." Biol Pharm Bull **25**(11): 1391-400.
- Scharenberg, C. W., M. A. Harkey, et al. (2002). "The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors." Blood **99**(2): 507-12.
- Schaub, T. P., J. Kartenbeck, et al. (1999). "Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma." J Am Soc Nephrol **10**(6): 1159-69.
- Schinkel, A. H., E. Wagenaar, et al. (1996). "P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs." J Clin Invest **97**(11): 2517-24.
- Schneider, J., E. Friderichs, et al. (1990). "Effects of recombinant human superoxide dismutase on increased lung vascular permeability and respiratory disorder in endotoxemic rats." Circ Shock **30**(2): 97-106.
- Scotte, M., M. Hiron, et al. (1996). "Differential expression of cytokine genes in monocytes, peritoneal macrophages and liver following endotoxin- or turpentine-induced inflammation in rat." Cytokine **8**(2): 115-20.
- Senzaki, H., C. J. Smith, et al. (2001). "Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure." Faseb J **15**(10): 1718-26.
- Shalaby, M. R., A. Waage, et al. (1989). "Endotoxin, tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo." Clin Immunol Immunopathol **53**(3): 488-98.
- Siegmund, W., I. Cascorbi, et al. (2003). "[Significance of drug transporter for the internal medicine clinic]." Internist (Berl) **44**(2): 219-26.
- Silverman, J. A. and D. Schrenk (1997). "Hepatic canalicular membrane 4: expression of the multidrug resistance genes in the liver." Faseb J **11**(5): 308-13.
- Silverman, J. A. and S. S. Thorgeirsson (1995). "Regulation and function of the multidrug resistance genes in liver." Prog Liver Dis **13**: 101-23.

- Sprinz, H. and R. S. Nelson (1954). "Persistent non-hemolytic hyperbilirubinemia associated with lipochrome-like pigment in liver cells: report of four cases." Ann Intern Med **41**(5): 952-62.
- Sukhai, M., A. Yong, et al. (2000). "Inflammation and interleukin-6 mediate reductions in the hepatic expression and transcription of the *mdr1a* and *mdr1b* Genes." Mol Cell Biol Res Commun **4**(4): 248-56.
- Sukhai, M., A. Yong, et al. (2001). "Decreased expression of P-glycoprotein in interleukin-1beta and interleukin-6 treated rat hepatocytes." Inflamm Res **50**(7): 362-70.
- Suzuki, T., H. Sasaki, et al. (2000). "Detailed structural analysis on both human MRP5 and mouse *mrp5* transcripts." Gene **242**(1-2): 167-73.
- Tanaka, Y., A. L. Slitt, et al. (2005). "Tissue distribution and hormonal regulation of the breast cancer resistance protein (*Bcrp/Abcg2*) in rats and mice." Biochem Biophys Res Commun **326**(1): 181-7.
- Thiebaut, F., T. Tsuruo, et al. (1987). "Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(21): 7735-8.
- Vos, T. A., G. J. Hooiveld, et al. (1998). "Up-regulation of the multidrug resistance genes, *Mrp1* and *Mdr1b*, and down-regulation of the organic anion transporter, *Mrp2*, and the bile salt transporter, *Spgp*, in endotoxemic rat liver." Hepatology **28**(6): 1637-44.
- Waisbren, B. A. (1964). "Gram-Negative Shock and Endotoxin Shock." Am J Med **36**: 819-24.
- Wang, P., Z. F. Ba, et al. (1991). "Hepatic extraction of indocyanine green is depressed early in sepsis despite increased hepatic blood flow and cardiac output." Arch Surg **126**(2): 219-24.
- Weigand, M. A., H. J. Bardenheuer, et al. (2003). "[Clinical management of patients with sepsis]." Anaesthesist **52**(1): 3-22.
- Wichterman, K. A., A. E. Baue, et al. (1980). "Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal." J Surg Res **29**(2): 189-201.
- Wielinga, P. R., I. van der Heijden, et al. (2003). "Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells." J Biol Chem **278**(20): 17664-71.
- Wijnholds, J., C. A. Mol, et al. (2000). "Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7476-81.
- Xu, H. L., V. Gavriluk, et al. (2004). "Regulation of rat pial arteriolar smooth muscle relaxation in vivo through multidrug resistance protein 5-mediated cGMP efflux." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(5): H2020-7.
- Yamazaki, M., S. Akiyama, et al. (1997). "Biliary excretion of pravastatin in rats: contribution of the excretion pathway mediated by canalicular multispecific organic anion transporter." Drug Metab Dispos **25**(10): 1123-9.
- Yates, C. R., C. Chang, et al. (2003). "Structural determinants of P-glycoprotein-mediated transport of glucocorticoids." Pharm Res **20**(11): 1794-803.
- Zhou, S., J. D. Schuetz, et al. (2001). "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 **7**(9): 1028-34.

7. Anhang

7.1 Genomische Sequenz

Im Folgenden sind die genomischen Sequenzen der untersuchten Transporter dargestellt. Dabei sind die Lage der Primer blau und die der Sonde grün markiert.

7.1.1 *mdr1a*

```

1  acagtggaac agcgggtttcc aggagctgct ggtcccatct tccaaggctc tgctcaactc
61  agagccgctt cttccaaagt ctacatcttg gtggactttg cagaggaaac cgggagtaga
121  gacacgtgag gccgtgatgg aacttgaaga ggaccttaag ggaagagcag acaagaactt
181  ctcaaagatg ggcaaaaaga gtaaaaagga gaagaaagaa aagaaaccag cagtcaagtgt
241  gcttacaatg tttcgttatg caggttggct agacaggttg tacatgctgg tgggaactct
301  ggctgctatt atccatggag tggcgctccc acttatgatg ctgatctttg gtgacatgac
361  agatagcttt gcaagtgtag gaaacgtctc taaaacagt actaatatga gtgaggccga
421  taaaagagcc atgtttgcca aactggagga agaaatgacc acgtacgct actattacac
481  cgggattggt gctgggtgtc tcatagttgc ctacatccag gtttcatttt ggtgcctggc
541  agctggaaga cagatacaca agatcaggca gaagtttttt catgctataa tgaatcagga
601  gataggctgg tttgatgtgc atgacgttgg ggagctcaac acccggtcca cagatgatgt
661  ttccaaaatt aatgaaggaa ttggtgacaa aatcggaatg ttcttccagg caatggcaac
721  attttttggg ggttttataa taggatttac ccgtggctgg aagctaacc tttgtatttt
781  ggccatcagc cctgttcttg gactgtcagc tggtatattg gcaaagatat tgtcttcatt
841  tactgataag gaactccatg cttatgcaaa agctggagca gttgctgaag aagtcttagc
901  agccatcaga actgtgattg cgtttggagg acaaaagaag gaacttgaaa ggtacaataa
961  caacttgga gaagctaaaa ggctggggat aaagaaagct atcacggcca acatctccat
1021  ggggtgcagct tttctcctta tctatgcac atagctctg gcattctgg atgggacttc
1081  cttggctc atc tccaaagaat actctattgg acaagtgctc actgtcttct tttccgtgtt
1141  aattggagca ttcagtgttg gacaggcatc tccaaatatt gaagccttcg ccaatgcacg
1201  aggagcagct tatgaagtct tcaaaataat tgataataag cccagtatag acagcttctc
1261  aaagagtggg cacaaaccag acaacataca aggaaatctg gaatttaaga atattcaactt
1321  cagttaccca tctcgaaaag aagttcagat cttgaagggc ctcaatctga aggtgaagag
1381  cggacagacg gtggccctgg ttggcaacag tggctgtgga aaaagcaciaa ctgtccagct
1441  gatgcaaagg ctctacgacc ccctagatgg catggtcagt atcgacggac aggacatcag
1501  aacctcaat gtgaggtatc tgaggagatc cattgggtgtg gtgagtcagg aacctgtgtc
1561  gtttgccacc acgatcgccg agaacattcg ctatggccga gaagatgca ccatgtatga
1621  gattgagaaa gctgtcaagg aagccaatgc ctatgacttc atcatgaaac tccccacca
1681  atttgacacc ctggttgggtg agagaggggc gcacgtgagt gggggacaga aacagagaat
1741  cgccattgcc cgggccctgg tccgcaatcc caagatcctt ttggtggacg aggccacctc
1801  agccctggat acagaaagtg aagctgtggg tcaggccgca ctggataagg ctagagaagg
1861  cgggaccacc attgtgatag ctcatcgctt gtctaccggt cgtaatgctg acgtcattgc
1921  tggttttgat ggtgggtgtca ttgtggagca aggaaatcat gatgagctca tgagagaaaa
1981  gggcatttac ttcaaacttg tcatgacaca gacagcagga aatgaaattg aattaggaaa
2041  tgaagcttgt aaatctaagg atgaaattga taatttagac atgtcttcaa aagattcagg
2101  atccagtcta ataagaagaa gatcaactcg caaaagcatc tgtggaccac atgaccaaga
2161  caggaagctt agtaccaaaag aggccttggg tgaagatgta cctccagctt ccttttggcg
2221  gatcctgaag ttgaattcaa ctgaatggcc ttattttgtg gttgggtatat tctgtgccat
2281  aataaatgga ggcttacagc cagcattctc cgtaatatatt tcaaaagtty taggggtttt
2341  tacaatggg ggccccctg aaaccacagc gcagaacagc aacttgtttt ccttgggtgtt
2401  tctgatcctt gggatcattt ctttcattac attttttctt cagggttca catttggcaa
2461  agctggagag atcctcacca agcgactccg atacatgggt ttcaaatcca tgctgagaca
2521  ggatgtgagc tggtttgatg accctaaaaa caccaccgga gcaactgacca ccaggctcgc
2581  caacgatgct gctcaagtga aaggggctac agggcttagg ctgtctgtga ttttccagaa
2641  catagcaaat cttgggacag gaatcatcat atccctaate tatggctggc aactaacact
2701  tttactctta gcaattgtac ccatcattgc gatagctgga gtgggtgaaa tgaaaaatgtt

```

2761 gtctggacaa gcaactgaaag ataagaagga actagaaggt tctggaaaga ttgctacgga
 2821 agcaattgaa aacttccgca ctggtgtctc tttgactcgg gagcagaagt ttgaaaccat
 2881 gtatgccag agcttgacaga taccatacag aaatgcatg aagaaagcac acgtgtttgg
 2941 gatcacgttc tccttcaccc aggccatgat gtatTTTTct tatgctgctt gtttccgggt
 3001 cgggtgcctac ttgggtgacac aacaactcat gacttttgaa aatgttctgt tagtattctc
 3061 agctattgtc tttgggtgcca tggcagtggg gcaggtcagt tcattcgtc ctgactatgc
 3121 gaaagcaaca gtgtcagcat cccacatcat caggatcatt gagaaaacc ccgagattga
 3181 cagctacagc acgcaaggcc taaagccgaa tatgttgaa ggaaatgtgc aatttagtgg
 3241 agtcgtgttc aactatccca cccgaccag catcccagt cttcaggggc tgagccttga
 3301 ggtgaagaag ggccagagc tggccctggt gggcagcagt ggtgcggga agagcacagt
 3361 ggtccagctg ctcgagcgt tctacgacc catggctgga tcagtgttc tagatgcaa
 3421 agaaataaag caactgaatg tccagtggct ccgagcacag ctgggcattg tgtccaaga
 3481 gccattctc tttgactgca gcatcgaga gaacattgcc tacggagaca acagccgggt
 3541 cgtgtcttat gaggagattg tgagggcagc caaggaggcc aacatccacc agttcatcga
 3601 ctgctacct gataaataca acaccagagt aggagacaaa ggcaactcagc tgtcgggtgg
 3661 gcagaagcag cgcactgcca tgcacgcgc cctcgtcaga cagcctcaca ttttacttct
 3721 ggacgaagca acatcagctc tggatacaga aagtgaaga gttgtccagg aagcgtgga
 3781 caaagccagg gaaggccgca cctgcattgt gatcgtcac cgctgtcca ccatccagaa
 3841 cgcggacttg atcgtggtga ttcagaacgg caaggcaag gagcacggca cccaccagca
 3901 gctgctggcg cagaagggca tctacttctc aatggtcagt gtgcaggctg gagcaagcg
 3961 ctcatgaact gtgacatgt aagatgttaa gtatTTTTat tgtttgtatt catatatggt
 4021 gtttaatacca agtcaaaagg aaaacactta ctaaaatagc cagttatcta ttttctgcca
 4081 cagtggaaag catttagttt ggttttagagt cttcagaggc tttgtaatta aaaaaacaaa
 4141 aatagataca gcatcaaatg gagattaatg ctttaaatg cactataaaa tttataaaaag
 4201 ggttaaaagt gaatgtttga taatatatac ttttatttat actttctcat ttgtaactat
 4261 aactgatattc tgcttaacaa attatgtatg tatcaaaaat tactgaaatg tttgtataaa
 4321 gtatatatag tgaactgag cattcatatt tttgagttat tttgtcaaa tgcattgcaa
 4381 attatatatt gtcccaactg ggatattgta cataatttta gccttaaaa aacagtccat
 4441 tactgggggg agggggcacc actctatggg caaagtgtta ctcagacatg ggcacctgag
 4501 ttcagatccc taccacctaa gtaagcagac aagggtggtt gtttttgtaa tgcagtgct
 4561 agaggcagaa aagacagatc ctgcaggctc agtggctggc caaacagcct agccaacata
 4621 gcgcttcca ggttcagtga gaaaacttgt ctcaaaaatc agagggaaaa gcaaatgagg
 4681 tgtcagccat gtgcaactcat gcaaatgcca tacatgcaga agtatgtgca cacacacgca
 4741 cacattaacc aacgactagc aaggaaaatg aagggtgata agaggggtgg gactgggaca
 4801 aaggagggta cctggatgaa tatgactgaa ggacgttatg tacacatatg aaaacgtcgt
 4861 actgaaactc actacaatgt atacttaata tattgctaata aaaatatatt taaaagaaaa
 4921 aaat

7.1.2 mrp2

1 atggacgaat tctgcaactc tactttttgg aatctctcat tattgaaaag tccggaagcc
 61 gacctgcctc tttgttttga acaaactggt cttgtgtgga tcccttggg ctttctttgg
 121 ttctgggccc cttggcaact ttacagaata tacagatcca ggaccaagag atttgctata
 181 actaaattct accttgccaa gcagggtgtc gttgtgtgtc ttcttatttt agcagccata
 241 gacctgtctc ttgcaactc agaagatact ggacaagcca caattcctcc tgttaaatat
 301 acaaatccaa ttctctacct atgcaactgg ctctggtgtg tggatgcca acactgcagg
 361 caatgctgta tacagaagaa ttcttgggtc ctgtccatgt tctggattct ctctctatta
 421 tgtggcatat tccagtttca gactctgata cgagcactcc tgcaggatag caagtccaac
 481 atggcctatt cctgcctggt cttcgtctcc tatggttcc agattgtcat tttgatcctt
 541 tcagcctttt cagaatcaag cgactcaaca cacgccccat cagctacagc ttcatttctg
 601 agtagcgtta cgtttagttg gtatgacagc actgttctga aaggttacaa gcatccattg
 661 acaatagaag atgtgtggga tattgaagaa aatcttaaa ccaagtcaact caccagcaag
 721 ttaagacga tcatgacaaa ggacctgcag aaagccaggc aggtcttca gaggcggctg
 781 aagaagtccc agcagagccc tgagggccc tcaacaggat tgaccaagaa gcagagttag
 841 agccaagatg tccttgtcct ggaagacgcg aaaaagaaga aaaaagaatc tgaggccacc
 901 aaagactttc ccaaatcctg gttgggtgaa gctctcttca aaacgttcta cgtggtgatc
 961 ctgaagtcat ttattctgaa attagcacat gatattcttt tgtttctgaa tcctcagctg
 1021 ctgaaatctc tcattggctt cgtgaaagac cctgactcat atccgtgggt tggatatatc
 1081 tatgcaatcc taatgttctc tgtgactctc atccagtctt tcttcttca gtgtatttt
 1141 caattttggt ttgtgttggg aatgactgta cggacaacca tcatagcttc cgtatataaa

1201 gaagcattga ccctatccaa cttggctagg aggcagtaca cgattggaga gacggtgaac
1261 ttgatgtctg tagattccca gaagctaata gacgtgacca actacatata cttgcyggtg
1321 tccagtgttt tacagattgc tttgtccatt ttcttctgtt ggagagagtt gggaccttcg
1381 attttagcag gtgttgggct tatggttctc ctgggtcccag ttaatggcgt cctggctacc
1441 aagatcagga aaattcaggt ccagaatatg aagaataaag acaaacgctt aaaaatcatg
1501 aatgagattc ttagtgggat taagatcctg aaatactttg cctgggaacc ttcttttaa
1561 gagcaagtga acagcattcg gaagaaagaa ctcaggaact tgctgcgctt cagccagctg
1621 cagacgattt tgattttcat cttacaccta actccaacc tggtgtccgt gatcacattt
1681 tctgtttacg tcttgggtga tagtcaaaat gttttgaacg cggagaaggc tttcacctcc
1741 atcacctctc tcaatatcct gcgctttcct ctggccatgc ttcccattgt gatctcttca
1801 gtcattccag ccagcgtctc tgtagaccg ctggagcagt acctgggaag cगतगतctg
1861 gacttgtctg ccattcgcca tgtctgccat tttgataaag ctgtgcagt ctcagaagcc
1921 tcttttactt gggaccggga cttggaagcc acaatccaag atgtgaacct ggacataaaa
1981 ccaggccaac tgggtggctgt ggtgggact gtaggctctg ggaagtctc tttgatata
2041 gccatgctgg gagaaatgga gaatgtccat gggcatatca ccatcaaggg ctccatagcc
2101 tacgtccctc agcagtctg gattcagaat gggaccatca aagataacat cctgtttggg
2161 tcagaatacg atgaaaagaa gtaccagcga gttatcgaag cgtgcgctc cctccagac
2221 ttggaaatgt tgcctggagg agacatggct gagatcggag agaagggtat aaatctcagt
2281 ggcggtcaga agcatcgagt cagcctggcc cgggccacct atcaagatgc agacatctat
2341 attctagacg acccctgtc ggtgtgggac actcacgtgg gaaaacacat tttcaacaag
2401 gttgtgggcc ccaatggcct gctgagcggc aagactcggg tcttggttac acatggcatt
2461 cacttccttc cccaagtgga tgagattgtc gttctgggga aaggcaccat cttagagaag
2521 ggatcctata gtgacctgat ggacaagaaa ggagtgttcg ctaagaactg gaagacattc
2581 atgaagcatt cgggacctga aggagaggct acagtcgata acgacagtga ggaagaggat
2641 ggtgactgtg ggctgatccc aactgtggag gaaattcctg acgatgcagc ttcttgacc
2701 atgagaaggg agaacagcct tcgccgaaca ctgagccgca gctctaggct cggcagcagg
2761 cgtgggaagt ccctcaaaag ctcttgaaa attaaaagtg tgaatgcctt gaataagaag
2821 gaggaagttag tgaaggaca aaaactaatt aagaaggaat ttgtggaaac tgggaaggtg
2881 aagttctcca tctacctgaa atatctgcag gcggtaggat ggtgtccct gctctcatc
2941 gtcattctct acgtattgaa ctatgtggct tttattggca ctaacctctg gctgagtgtc
3001 tggaccagtg actctgaaaa acagaatggg accgacaatt caccttctca gagggacatg
3061 agaatcgggg tctttggagc tctgggaata gcacaaggta tatttttctg tagttcaagt
3121 ctatggagta tatatgcttg cagaaatgca tccaaaactt tgcacaggca gctgttaacc
3181 aacattctcc gcgcacccat gagttttttt gacacaactc ccacaggccg gattgtgaac
3241 agatttgccg gggatatttc tacgggtggc gacacactcc cccagacttt gcgaagctgg
3301 ctgctgtgtt tcttcggcat agttagcact ctctgatga tctgcatggc caccctcatc
3361 ttcattcatca tcatcatccc tctcagcatt ctctatgtat ctgtgcagg gttttatgtg
3421 gctacatccc gccagctgag acggctggat tctgtcacca aatctccgat ctattctcac
3481 tttagtgaga ctgtctctgg tttgcctgtt attcgggctt ttgagcacca gcagagattt
3541 ctagcaaaaa gtgagaagca gattgacacc aaccagaaat gcgtcttttc ctggattacc
3601 tccaaccggt ggcttgccat tcgcctggag ctggttggaa acctgattgt cttctgctcg
3661 gccttgcttc tggttattta taagaattcc ttaaccgggg aactgtggg ctttgttctg
3721 tccaacgccc tcaacatcac acaaaccctg aactggctag tgaggatgac gtcagaagta
3781 gagaccaaca tcgtggctgt tgagcgaata aatgaataca taaatgtgga taatgaggcg
3841 ccgtgggtga ccgacaagaa gcctccggca gattggccca aaaaaggta gatccagttc
3901 aacaactatc aagtgcggta tcggccggag ctggatctgg tctgaaaagg gattacttgt
3961 aacatcaaga gcaccgagaa ggtcgggtgt gtgggcagga ccggagctgg aaaatcatcc
4021 ctcacaaact gcctcttcag aatcttagag tctgcagggt gccagatcat cattgatggg
4081 attgatattg cctccattgg actgcacgac cttcgaggga gactgaccat cattccccag
4141 gacccccattt tgttctctgg gaatctgagg atgaatctcg accctttcaa caaatactcg
4201 gatgaggaga tctggagggc cctggaattg gctcatctca aatcctttgt ggctggcctg
4261 caacttgggt tgctccatga agtgacagag ggcggtgaca acctgagcat agggcagagg
4321 cagctcctat gcctgggtag ggcctgtgct cgaaaatcca aatcctgggt cctggacgaa
4381 gccacagccg cagtggatct agagacggat agcctcattc agacgaccat ccggaacgag
4441 ttctcccagt gcacggctcat cactatcgca cacaggctgc acaccatcat ggacagtgc
4501 aaggtaatgg tcttagacag cggcaagatt gttgaatacg gcagtcctga agaactgctg
4561 tccaatatgg gtcccttcta cttgatggcc aaggaagccg gcattgaaag tgtgaaccac
4621 acggagctct agcagtgtct cctggctagc ggactagaag aacatttctt agttactttt
4681 gttcttgtga ctgtgtcata ggggcacaga tacacagttt gttgctgttg ctcaggttgg
4741 cctcaaactc taaggctcaa gcaatctctg gtctcaacca ccctgtaaaa aaatacactt
4801 aaaagggtat cataaataaa tacttaata aatagtatca ggtaccttan aaaaatccaca

4861 actgaactgg gganataact cggttgtaa ggtgcttgcc ttgaaaacgt gaggtccga
 4921 tttgatccct aaaacccct tattatcatt ttttttaaag tacgggcata gttgtccatg
 4981 ataacagttt gantgttgna cagccaaaag taatcatgtc ctnggggta gactaatngc
 5041 ananaaacag gcanacanaa ggggaaggaa ggtaagtngg ctnaccnccc aaaaatanac
 5101 anaaanacna aaccgcacgc cgcccgaang gaaaaaagga agaaaaggaag gggaaaaaaa
 5161 cacagcncac cacanacaac agcangccng ttaactatgg caaaaaana ggcaaacnac
 5221 anacngcagg cgggtaaaat

7.1.3 mrp5

1 ttcggagagg gccgctataa aggcttgttt tgctcagggt cccgatgttcg cgagcgtgcc
 61 cgggctgttt gctctcgtgt ggggaggctg ggggtgcagaa tttctgaagt gaaaggagga
 121 gtctgcaccc tggctcctctg tgtggtgaag atgaaagata ttgacatggg aaaagaatat
 181 atcatcccca gccctgggta cagaagtgac agggacagaa gcgctgtacc agggcaacac
 241 agagacccc aggaaccag gttccggaga acaagatcgt tggaaatgcca agatgctctc
 301 gaaacagcag cccgagttga ggggctttcc ctggatatct ctgtgcattc tcatctccaa
 361 attctggacg aggagcattc taagggaaaa taccaccatg gtttaagtgt cctgaagccc
 421 ttccggacca ctaccaagca ccagcaccca gtggacaatg ctggactttt ctctacatg
 481 accttttcat ggctctctcc tctggcccga gtggttcaca agaaggggga gctgttaatg
 541 gaggatgtgt ggcctttgtc caagtatgag tcttctgatg tgaactgcag aagactagag
 601 agactgtggc aagaagagct gaatgaagtt gggccagacg ctgcttccct gcgaagggtt
 661 gtgtggatct tctgccgcac caggctcatc ctgtccatcg tgtgcctgat gatcacgcag
 721 ctggctggct tcagtggacc agccttcatg gtgaaacacc tcttgagta taccaggca
 781 acagagtcta acctgcagtg cagcttgttg ttagtgctgg gcctcctcct gacggaaatc
 841 gtgcggtctt ggctcgcttg actgacttgg gcattgaatt accgaaccgg tgtccgcttg
 901 cggggggcca tcctaaccat ggcatttaag aagatcctta agttaaagaa cattaagagag
 961 aatccctgg gtgagctcat caacatttgc tccaacgatg ggcagagaaat gtttgaggca
 1021 gcagccgctg gcagcctgct ggctggagga cctggtggtg ccatcttggg catgatttat
 1081 aatgtaatca tcttaggacc cacgggcttc ctgggatcag cggtttttat cctcttttat
 1141 ccagcaatga tgttcgtgtc acggctaact gcataattca ggagaaagcg tgtagctgcc
 1201 acagatgagg gtgtccagaa gatgaatgaa gttcttacct acattaaatt catta**aaatg**
 1261 **atgctgagg** **tcaaagcgtt** tctcagtggt gtgc**aaaaaa** **tccgagagga** **ggaacgtcgg**
 1321 **atattggaga** aagccgggta ctttcagagc ctactggtg gagtggctcc **tattgtgta**
 1381 **gtgatcgcca** gtgtggtgac gttctcgtt cacatgacct tgggcttcca tctgactgcy
 1441 gcacaggcct tcacagtggg gactgtcttc aattccatga cttttgcttt gaaagtaaca
 1501 ccattctcag tgaagtccct ctctgaagca tcagtggctg ttgacagatt taagagtgtg
 1561 tttctaattg aagaggttca catgataaag aacaaaccgg ccagtcctca catcaagata
 1621 gagatgaaaa atgccacctt ggcattgggac tctcccact ccagtataca gaactcgccc
 1681 aagctgaccc ccaaaatgaa aaaagacaag agggctacca ggggcaagaa agagaagtcg
 1741 aggcagctgc aacacactga gcaccaggcg gtgctggcag aacagaaagg acacctctc
 1801 ctggacagcg acgagcggcc cagcccggaa gaggaagaag gcaagcagat ccacacaggg
 1861 agcctgcgcc tgcagaggac actgtacaac attgacttag aaattgaaga gggcaaacctg
 1921 gttggaatct gcggcagtggt ggggaagtgga aaaacctctc tcgtttcagc catttttaggc
 1981 cagatgacgc ttttggaggg cagcattgcc gtcagtggga cctttgctta tgtggcccaa
 2041 caggcctgga ttctcaatgc cactctgaga gacaacattc tctttgggaa ggaatttgat
 2101 gaagagagat acaactcagt gctgaatagc tgctgcctgc ggctgactt ggccattctc
 2161 cccaacagcg acctgactga gattggagag cgaggagcca acctgagtgg tggacagcgc
 2221 cagagaatca gccttgctag agccttgtag agtgatagaa gcactacat cctggatgac
 2281 cccctcagtg ccttagatgc ccatgtggg aaccacatct tcaacagtgc tatccggaag
 2341 gcctcaagt ctaagacggt tctgtttgtt acacaccagt tacagtatct ggtcgattgt
 2401 gatgaggtga tcttcatgaa ggaaggctgt atcacagaga gaggtagcca tggagagctg
 2461 atgaacttaa atggggatta cgctacgatt ttaataaacc tgttgctggg agagacacc
 2521 ccagttgaga ttaattcgaa aaaggaagct actggttcac aaaaatcaca agacaagggc
 2581 cctaagccag ggtcagtgaa gaaggagaag gcggtgaagt cggaggaagg gcagcttgtg
 2641 cagggtggagg agaaagggca aggttctgtg ccttggctcag tctactgggt ctacatccag
 2701 gctgcagggg gcccttggc tttcctggtc atcatggtcc tcttcatgct gaatgtgggc
 2761 agcactgcct tcagcacctg gtggcttagc tactggatca agcaaggaag cgggaacagc
 2821 acagtgtatc aaggaacag aagcttcgtg agtgacagca tgaaggacaa cccttcatg
 2881 cagtactacg ccagcatcta cgccctctcc atggcagtca tgctgatctt gaaagccatt
 2941 cgaggagttg tcttctgcaa gggcacactg agagcctcct cccggctcca tgatgagcta

3001 ttccgaagga tccttaggag ccccatgaag ttttttgata ctacccaac aggaaggatt
 3061 ctcaacaggt tttccaaaga catggatgaa gtggatgtgc ggctgccgtt ccaggctgag
 3121 atgtttatcc agaatgtaat cctgggtgtc ttctgtgttg gaatgattgc tggagtcttc
 3181 ccatggttcc tcgtggcggt ggggcctctc ctcatcctct tctcacttct ccacattgtc
 3241 tccagggtcc tgattcgtga gctaaagcgg ttggacaata tcacgcagtc tcttttctc
 3301 tcccacatca cgtctagcat tcagggcctg gccaccatcc atgcctacaa caaaaggcag
 3361 gagtttttac acaggtatca ggagctcctg gatgacaacc aggcctcctt tttcctgttc
 3421 acctgtgcaa tgaggtggct gccagtgccg ctggacatca tcagcattgc cttgattacc
 3481 agcactggcc tgatgattgt ctcaggcatg gccagatccc tttcagccta tgcggggctt
 3541 gccatttctc acgctgtgca gtttaattga ctattccagt tcaccgtcag actggcatcg
 3601 gagacagaag cacggttcac ttccgtggag aggatcaacc actatatcaa gactctctct
 3661 ttggaagcac ctgccagaat caagaacaag gctcctcccc atgactggcc ccaggagggg
 3721 gaagtaacct ttgagaatgc agaaatgaga taccgggaaa atctcctctt ggtccttaag
 3781 aaagtgtcct tcacatcaa gcccaaggaa aagataggca ttgtgggacg aacagggtca
 3841 gggaaagtcc ctttggggat ggccctcttc cgtctgggtg agctatctgg aggctgcatc
 3901 aagattgatg gaataagaat cagtgcacac ggctggccg acctccgaag caaactggcc
 3961 atcattctctc aggagccagt gctgttcagt ggcactgtca gatcaaacct ggaccctttc
 4021 aaccagtaca cggaaagacca gatctgggat gctctagaga gaacgcacat gaaggaatgt
 4081 attgcccagc tacctctgaa acttgagtct gaagtaatgg agaacgggga caacttctct
 4141 gttggggaac ggcagctggt gtgcatagca agagccctgc tgcgtcactg taagattctg
 4201 attttagatg aagctacagc cgctatggac acagagacag acttactgat ccaggagacc
 4261 atccgggaag catttgccga ctgcaccatg ctgaccattg cccatcgcct gcacacagtt
 4321 ctgggctctg acaggatcat ggtgctggcc cagggacagg tgggtggagt tgacacccca
 4381 tcggtccttc tgtctaata cagttcaaga ttctatgcca tgtttgctgc tgcagagaac
 4441 aaggtggctg tcaagggctg agtccctccg tccctgaagt ctcttctca gagcattgcc
 4501 attctcttcc tggtttgggc cctcatctct gtctgctga aacttcgcct ttcccagttt
 4561 tatctctcac acaaccattc aggattagct gtgtgtttca cttttaagga aagtcattt
 4621 ttgattattg tatttattcc ctattcactt aaatgaaatt tagttttgt tcttaattgc
 4681 actcttaaga ggttcagggg accattacta taaatgttat cagtggccta taatgaagct
 4741 ttatatgtgt agctatgtct atatataatt ctgtacatag cctatattta cagtaaaatg
 4801 taagcggccc ggaattctca gggctcctgc tttcctgtct tgggtgtagc tgctgtttat
 4861 gttagagcag tgggcaaagc cagccccac ccagctctgct cccagtgctc catgcttcag
 4921 gttcctgagg ctggctgcca cagagttgtc gagttccctg gccagctggt tcccagcccc
 4981 agggctccact gctgctgttg taggtggcat tttcatttgc ctgaccccaa ggctccagag
 5041 ctgagcaaca gggctcagga tgggtggggtc cgttcttctc cactttagtc tctctgcaa
 5101 agtctgcacc caccctcag cagctcttgc taatcagtg ctcacactgg tgtagaagtt
 5161 ttttgtactg taaagagacc tacctcaggt tgctgattgc tgtgtggttt ggtgcgctct
 5221 tgcagacccc cttgtgctct ggggctcgta gcttgggtgg gtgtggttgc cactgtcacc
 5281 agtcgagtg tccagcgtcg atgtcgtgac caactagaca ttctgtcgcc ttagcatggt
 5341 tgctaaatac cttataaaag caaaaatatg aaaaagtgaa taaaattatt ttggattttg

7.1.4 BCRP1

1 aaaggcataa atcctaaaga tgtcttccag taatgaccac gtgtagtac caatgtcgca
 61 gagaaacaac aacggccttc ctaggatgaa ctccagagcc gttaggacgc **tcgcagaagg**
 121 **agatgtgttg** **agttttcatc** **acatcaccta** **tcgagtgaaa** **gtaaagagtg** **ggtttctagt**
 181 ccggaaaaca gttgagaaag aaatactatc agatatcaat gggat**catga** **aacctggcct**
 241 **taatgctatt** ctgggaccca caggcggagg caagtcttcg ttgctagatg tcttagcagc
 301 aaggaaagat ccaaagggat tatctggaga tgttttgata aatggagcag ctcaacctgc
 361 ccatttcaaa tgcgttccag gttatgtggt tcaagatgac gttgtgatgg gcaacctgac
 421 agtgagagaa aacttacagt tctcagcagc tcttcgactt ccaacaacta tgaagaatca
 481 tgaaaaaaat gaacggatta acacaatcat taaagagtta ggtctggaaa aagtagcaga
 541 ttctaaggte ggaactcagt ttatccgtgg catctctgga ggagaaaagaa aaaggacaag
 601 catagggatg gagctgatca ctgacccttc catcctcttc ctggatgagc ccacgactgg
 661 tttggactca agcacagcga atgctgtcct tttgctcctg aaaaggatgt ctaaacaggg
 721 tcgaacaatc atcttctcca ttcacagcc tcggatttcc atctttaagt tgtttgacag
 781 cctcacctta ctggcttccg ggaaactcgt gttccatggg ccagcacaga aggcttggg
 841 gtactttgca tcagcaggtt accactgtga gccctacaac aacctgcggt attttttctc
 901 tgatgtcatc aatggagatt cttctgctgt gatgttaaat agagaggaac aagacaatga
 961 agcaacaag actgaagagc cttccaaggg agagaagcca gtaatagaaa atttatctga

1021 gttttatatac aactctgcca tctatggaga aacaaaagct gaattagatc aacttccagg
1081 agctcaggaa aagaaaggaa catcggcctt caaagagcca gtctatgtta cctctttctg
1141 tcaccagctc cgatggattg ccagggcgtc atttaaaaac ttgctcggga accctcaagc
1201 ttctgttgct cagttaattg ttacagtcac actggggctt attattgggtg ccatttactt
1261 tgatctgaaa tatgatgccg ctggaatgca aaatagagct ggagttttgt ttttcctgac
1321 taccaaccag tgtttttcca gtgtgtcagc tgtggagctg ttcgtagtgg agaagaaact
1381 cttcatacat gagtacatca gtggatatta cagagtgtct tcttacttct ttggaaaggt
1441 gatgtctgat ttactcccca tgaggttctt gccaaagtgtt atattcactt gtatattata
1501 cttcatgtta ggactgaaga agacgggtgga tgcttttttc atcatgatgt ttacccttat
1561 aatgggtggct tatacggcca gttccatggc actggccata gccacaggcc aaagtgtggt
1621 gtctgtagca acacttctca tgacaatcgc ttttgatatt atgatgctct tttctggcct
1681 cttggtgaat ctcagaacca ttgggccttg gctgtcctgg cttcagtact ttagcattcc
1741 tcgatatggc ttcacagctt tgcagtataa tgaattcttg ggacaagagt tttgtccagg
1801 attcaatgta acggacaaca gcacttgtgt taacagctat gcaatatgta ctggtaacga
1861 gtacttgata aatcagggca tcgaactgtc acctggggga ctgtggaaga atcatgtggc
1921 cctggcttgt atgattatta tcttctcac aattgcctac ctgaaattgt tgtttcttaa
1981 aaagtattct taatttcccc tttaacggac tattaattgt actcc

Eidesstattlich Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe und dass ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet 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: Essen, 15.05.2008

Unterschrift:

Lebenslauf

Name: Anna Victoria Buck

Geburtsdatum: 11.05.1980

Geburtsort: Ostercappeln

1986-1999	Grundschule, Orientierungsschule und Gymnasium Bad Essen
08/1999	Allgemeine Hochschulreife
11/1999-10/2000	Tätigkeit in der Praxis Dr. Seleman, Pädiatrie, Bad Essen,
10/2000-11/2006	Medizinstudium an der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
09/2003	Ärztliche Vorprüfung
08/2003	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2005	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2005- 09/2006	Praktisches Jahr: 1. Chirurgie Kantonsspital Luzern, Schweiz 2. Innere Medizin Royal Adelaide Hospital, Adelaide, Australien 3. Pädiatrie Universitätskinderklinik Greifswald
11/2006	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/2006 bis dato	Tätigkeit als Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin, St. Elisabeth-Krankenhaus, Essen

Essen, 15.05.2008

Danksagung

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

Bei Herrn Dr. Konrad Meissner und Herrn Dr. Markus Grube bedanke ich mich für die wissenschaftliche Betreuung und die unermüdliche Bereitschaft, Fragen zu diskutieren und Denkanstöße zu geben.

Bei Herrn Dr. Matthias Gratz und Frau Dr. Kathleen Köck bedanke ich mich für die Fürsprache und Hilfsbereitschaft in jeglicher Problemsituation.

Frau Sonnenberger und Frau Uecker danke ich für die Tipps und die Hilfe bei der praktischen Laborarbeit.

Herrn Dr. Tobias Traeger und Herrn Dr. Wolfram Kessler danke ich für die Bereitstellung der Proben.

Allen Post-Doc's, Doktoranden und Diplomanden am Institut für Pharmakologie möchte ich Dank sagen für die Anregungen bei meinen Versuchen, die heitere Atmosphäre im Labor und die nicht nur wissenschaftlichen Erfahrungen.

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