

Meinen lieben Eltern

Aus dem Institut für  
Klinische und Experimentelle Pharmakologie  
der Friedrich Alexander Universität Erlangen-Nürnberg  
und  
dem Institut für  
Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
des Zentrums für Experimentelle Medizin  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. T. Eschenhagen

**Polymorphismen des *ABCC2*-Gens (*MRP2*) bei  
gesunden Kaukasiern**

D i s s e r t a t i o n  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Ralf Göres  
aus Burghausen  
Hamburg 2008

Als Dissertation angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am: 22.06.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:	Prof .T. Eschenhagen
Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:	Prof. K. Pantel
Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in:	Prof. H. Ehmke

**Inhaltsverzeichnis:**

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1	Transporter und Arzneistoffe	5
1.1.1	Passage von Permeationsbarrieren	5
1.1.2	Klassen von Arzneistofftransportern	5
1.1.3	Einfluss der Arzneistofftransporter auf die Pharmakotherapie	6
1.2	<i>ABCC2</i> Gen und Protein MRP2	7
1.2.1	Struktur des <i>ABCC2</i> Gens und des <i>ABCC2</i> Proteins	7
1.2.2	Lokalisation und Funktion	8
1.2.3	Substratspezifität von MRP2	9
1.2.4	Resistenz von Tumorgewebe gegenüber Chemotherapeutika	10
1.3	Genetische Polymorphismen von MRP2	10
1.3.1	Genetisch bedingte Unterschiede bei Arzneistofftransportern	10
1.3.2	Das Dubin-Johnson-Syndrom (DJS)	11
1.3.3	Polymorphismen im <i>ABCC2</i> -Gen	13
1.4	Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1	Patientenauswahl und Gewinnung der Proben	15
2.2	DNA-Extraktion	15
2.3	Quantifizierung der DNA	15
2.4	Standard-PCR	16
2.4.1	Theoretische Grundlagen	16
2.4.2	Versuchsdurchführung	16
2.5	Agarose-Gelelektrophorese	19
2.6	Single-strand Conformation Polymorphism (SSCP)-Analyse	19
2.6.1	Theoretische Grundlagen	19
2.6.2	Versuchsdurchführung	20
2.6.3	Optimierung	21
2.7	Silbernitratfärbung	21
2.8	DNA-Sequenzierung	22
2.8.1	Theoretische Grundlagen	22
2.8.2	Auswahl der Proben	23
2.8.3	Versuchsdurchführung	23
2.8.4	Aufreinigung der Produkte der Sequenzierungs-PCR	24
2.8.5	Probenauftrag	24

2.8.6	Auswertung der Sequenzen	25
2.9	Restriktionsverdau	25
2.9.1	Theoretischer Hintergrund	25
2.9.2	Versuchsdurchführung	25
2.10	Allelspezifische PCR	26
2.10.1	Theoretische Grundlagen	26
2.10.2	Versuchsdurchführung	28
2.11	Haplotypenanalyse	29
2.12	Reagenzienliste	30
2.13	Hilfsmittel und Geräte	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
3.1	Exon 1	32
3.2	Exon 2	34
3.3	Exon 3	35
3.4	Exon 4	35
3.5	Exon 5	35
3.6	Exon 6	36
3.7	Exon 7	37
3.8	Exon 8	37
3.9	Exon 9	38
3.10	Exon 10	38
3.11	Exon 11	40
3.12	Exon 12	40
3.13	Exon 13	41
3.14	Exon 14	41
3.15	Exon 15	42
3.16	Exon 16	42
3.17	Exon 17	43
3.18	Exon 18	44
3.19	Exon 19	45
3.20	Exon 20	46
3.21	Exon 21	46
3.22	Exon 22	48
3.23	Exon 23	49
3.24	Exon 24	49
3.25	Exon 25	51

3.26	Exon 26	51
3.27	Exon 27	52
3.28	Exon 28	53
3.29	Exon 29	55
3.30	Exon 30	57
3.31	Exon 31	58
3.32	Exon 32	59
3.33	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismen	61
3.34	Allelspezifische PCR	62
3.35	Haplotypenanalyse	63
3.36	Übersicht über alle in dieser Untersuchung beobachteten SNPs	65
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>67</b>
4.1	Zielsetzung der Arbeit und Zusammenfassung der Ergebnisse	67
4.2	Methodik	68
4.2.1	Mutationsscreening	68
4.2.2	Auswahl der Proben	70
4.2.3	Bestätigung durch RFLP oder Allel-spezifische PCR	70
4.3	Vom Genotyp zum Phänotyp	71
4.3.1	Mögliche Genvarianten und Lokalisation innerhalb eines Gens	71
4.3.2	Typ des Aminosäureaustausches und Funktion	72
4.3.3	Funktionelle Regionen des MRP2 Proteins	73
4.4	Synonyme Genvariationen ohne Aminosäureaustausch	74
4.5	Missense Mutationen	76
4.5.1	„Missense“ Mutationen in Bezug zur Molekularstruktur	76
4.5.2	Val417Ile	76
4.5.3	Leu927Arg	78
4.5.4	Arg1100Cys und Arg1100His	78
4.5.5	Cys1515Tyr	81
4.6	Intron SNPs	83
4.6.1	„Genes work better with introns“	83
4.6.2	Gefundene Intron-SNPs des ABCC2 Gens	85
4.7	Mutationen in der 5'-UTR	86
4.8	Haplotypenanalyse und Linkage Disequilibrium	88
4.9	Interethnische Differenzen	89
4.10	Bedeutung der Ergebnisse für die Praxis	90
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>92</b>

<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>109</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>111</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Transporter und Arzneistoffe

#### 1.1.1 Passage von Permeationsbarrieren

Ein zentrales Problem der Pharmakotherapie ist die unterschiedliche Wirkung derselben Dosis eines Arzneimittels bei verschiedenen Patienten. Dabei sind die Wirkung und mögliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu einem großen Anteil abhängig von der erreichten Konzentration eines Pharmakons am Wirkort. Als entscheidende Voraussetzung für das Erreichen des Wirkortes muss eine Substanz die Fähigkeit besitzen, biologische Oberflächenmembranen zu permeieren. Bei größeren hydrophilen Pharmaka, deren Membranpermeabilität gering ist, spielen membranständige Transportproteine eine entscheidende Rolle für die Aufnahme in den Organismus und in die Zellen. Die Pharmaka werden dabei an die Transporter gebunden und von diesen durch die Membran transloziert. Im Gegensatz zur rein passiven Diffusion kann dieser aktive Transport entgegen eines Konzentrationsgradienten erfolgen („bergauf“), wozu aus thermodynamischen Gründen Energiezufuhr nötig ist. Die Aktivität der Transporter unterliegt in der Regel einer Sättigung und weist häufig eine hohe strukturelle Spezifität auf (Dean et al. 2001; Forth und Henschler 2001; Schwab et al. 2003)

#### 1.1.2 Klassen von Arzneistofftransportern

Nach der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms wird die Anzahl von Genen, die für Transporter- und Carrier-Proteine kodieren, auf 500 bis 1200 geschätzt. Nur für einen Bruchteil dieser Proteine ist bislang beschrieben, dass sie zum transmembranären Transport von Arzneistoffen beitragen. Bei der Einteilung von Membrantransportern unterscheidet man, ob sie die Aufnahme ihrer Substrate in die Zelle oder den Efflux vermitteln. Als wichtigste Vertreter von Transportern, denen eine zelluläre Aufnahme von endogenen Stoffen und Arzneimitteln zugeschrieben wird, gelten die Mitglieder der „*solute carrier family*“ (SLC). Sie gehören zu den sekundär aktiven Transportern, wobei die Energie für den Symport oder Antiport ihrer Substrate aus dem elektrochemischen Potential intra- und extrazellulärer Moleküle stammt. Die Subgruppe SLC22 kodiert für die Transporterproteine „*organic anion transporters*“ (OATs) und „*organic cation transporters*“ (OCTs). Die Subgruppe SLC21 kodiert für die Transporterproteine „*organic anion transporting polypeptides*“ (OATPs), während man die „*peptide transporters*“ (PepTs) zur Untergruppe SLC15 zählt (Tirona und Kim 2002; Mizuno et al. 2003).

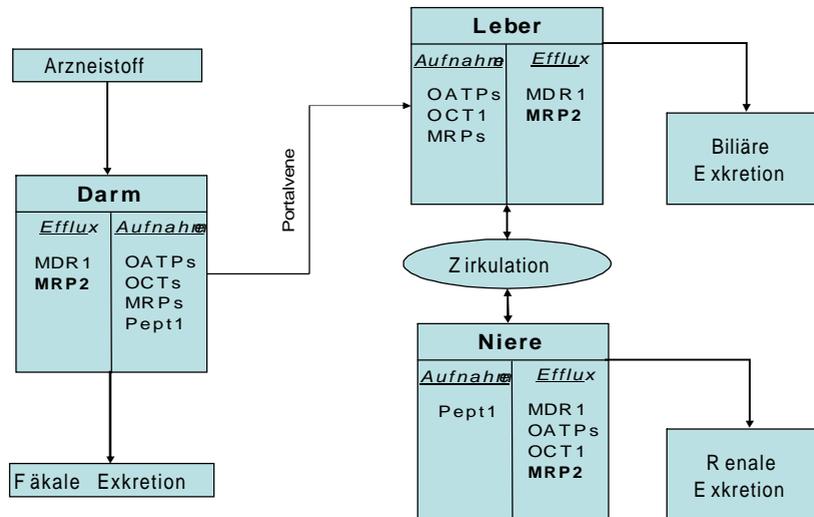
Eine sehr große Superfamilie transmembraner Transportproteine stellen die „*ATP-binding cassette proteins*“ (ABC-Transporter) dar, welche häufig einen Auswärtstransport von

Stoffen aus der Zelle bewirken. Als primär aktive Transporter nutzen sie die Energie der intrazellulären Hydrolyse von ATP unmittelbar zum Transport von zahlreichen Substraten durch biologische intra- oder extrazelluläre Membranen. Bisher konnten ungefähr 50 Mitglieder dieser ABC-Superfamilie identifiziert werden, welche basierend auf ihrer Aminosäurehomologie in 7 Subklassen unterteilt werden (*ABCA/ABC1*, *ABCB/MDR/TAP*, *ABCC/MRP/CFTR*, *ABCD/ALD*, *ABCE/OABP*, *ABCF/GCN20*, *ABCG/White*). Als wichtigste Vertreter Arzneimittel transportierender Proteine gelten die „*multidrug resistance proteins*“ (MDRs) der Unterfamilie *ABC-B* sowie die „*multidrug resistance associated proteins*“ (MRPs) der Unterfamilie *ABC-C* (Dean et al. 2001; Tirona und Kim 2002; Mizuno et al. 2003, Schwab et al 2003). Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das Transporterprotein MRP2 der Genfamilie *ABC-C*. Die Bezeichnungen *ABCC2*, *MRP2* und *cMOAT* (*canalicular multispecific organic anion transporter*) sind synonym. Der offizielle Genname ist *ABCC2*.

### 1.1.3 Einfluss der Arzneistofftransporter auf die Pharmakotherapie

Zusammen mit metabolisierenden Enzymen determinieren Transmembrantransporter die pharmakokinetischen Eigenschaften von Arzneistoffen. Die arzneimittelspezifische Resorption, Verteilung innerhalb des Organismus und Elimination in Urin und Galle ist in großem Maße abhängig von der Expression der jeweiligen Transportersubklassen innerhalb pharmakokinetisch relevanter Gewebe. Zusätzlich beeinflussen Unterschiede in der Substratspezifität und der maximalen Transportkapazität der Arzneistofftransporter die Pharmakokinetik der jeweiligen Arzneimittel. Somit bestimmen sie durch ihre Auswirkungen auf die Bioverfügbarkeit, die Verteilung innerhalb des Organismus und die Elimination die Konzentrationen von Pharmaka – und damit auch klinische Wirksamkeit sowie das Ausmaß unerwünschter konzentrationsabhängiger Arzneimittelwirkungen.

Die Transporter tragen als Komponente wichtiger Blut-Gewebe-Schranken zu einem effizienten Schutz sensitiver Gewebe vor Xenobiotika und endogenen Metaboliten bei. Zwar können dadurch einerseits toxische Wirkungen reduziert, jedoch auch die Passage von Arzneistoffen und somit das Erreichen therapeutischer Konzentrationen innerhalb so geschützter Gewebe verhindern werden. (Tirona und Kim 2002; Dietrich et al. 2003; Gerloff and Roots 2003; Lockhart et al. 2003; Mizuno et al. 2003; Nies et al. 2004).



**Abbildung 1.1:** Überblick über einige Arzneistofftransporter mit ihrer Hauptfunktion bei der Disposition von Arzneistoffen (in Anlehnung an Gerloff und Roots 2003).

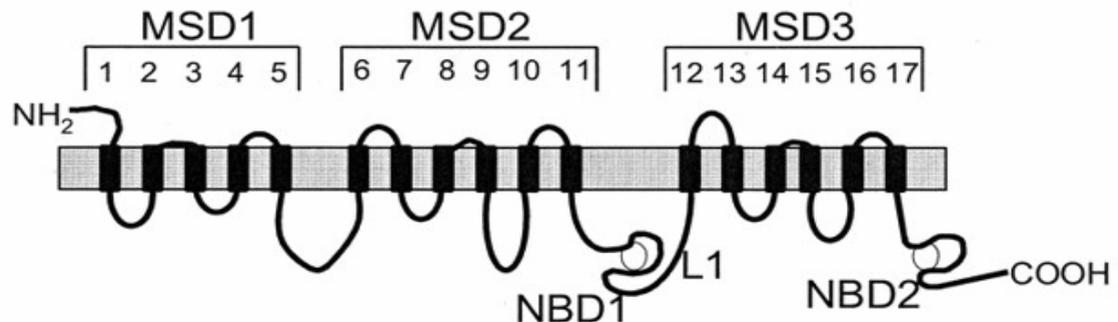
## 1.2 ABCC2 Gen und Protein MRP2

### 1.2.1 Struktur des ABCC2 Gens und des ABCC2 Proteins

Der hier untersuchte Arzneistofftransporter MRP2 gehört zur Subklasse MRP („*multidrug resistance associated proteins*“) der Genfamilie *ABC-C* und wurde 1996 zum ersten Mal kloniert (Büchler et al. 1996; Taniguchi et al. 1996). Das *ABCC2* Gen ist auf Chromosom 10q24 lokalisiert (Taniguchi et al. 1996). Es setzt sich aus 32 Exons zusammen und umspannt ca. 45 kb (Toh et al. 1999; Tsujii et al. 1999; Mor-Cohen et al. 2004; Referenzsequenzen: AL392107.1, NM\_000392).

Das membranständige Glykoprotein MRP2 enthält insgesamt 1545 Aminosäuren und besitzt eine Molekülmasse von ca. 190 kDa. Strukturell setzt es sich vermutlich aus 17 alpha-Helices (TM1 – TM17) zusammen, welche durch die Phospholipid-Doppelschicht der biologischen Membranen ziehen und drei Transmembran-Domänen („*membrane spanning domains*“, MSD1, 2 und 3) formen. Innerhalb des Zytoplasmas befinden sich zwei evolutiv stark konservierte Nukleotid-bindende Domänen (NBD1 und NBD2), die für die Bindung und Hydrolyse des ATP verantwortlich sind. Jeweils eine MSD und eine NBD bilden zwei homologe Hälften, die durch eine gering konservierte intrazelluläre Schleife miteinander verbunden sind („*linker region*“ L1). Dies stellt die typische Struktur („*core*“-Struktur) eines ABC-Transporters dar, die zusätzlich am Amino-Terminus durch die „*linker region*“ L0 mit der MSD1 verbunden ist. Während der Amino-Terminus (NH2)

extrazellulär lokalisiert ist, nimmt das Carboxy-Ende (COOH) aufgrund der ungeraden Anzahl transmembraner Abschnitte eine intrazelluläre Position ein (Borst et al. 1999; König et al. 1999; Gerk und Vore 2002; Kruh und Belinsky 2003)



**Abbildung 1.2:** Zweidimensionales Membrantopologie-Modell für MRP2 (Suzuki et al. 2002).

### 1.2.2 Lokalisation und Funktion

Der Transmembrantransporter MRP2, der vor seiner Klonierung als „*canalicular multispecific organic anion transporter*“ (cMOAT) bezeichnet wurde, wird stark in der apikalen (kanalikulären) Membran von Hepatozyten exprimiert (Keppler und König 1997). Dort transloziert das Protein ein breites Spektrum organischer Anionen gegen einen Konzentrationsgradienten von der Leber in die Galle und ist für die biliäre Ausscheidung seiner Substrate ausschlaggebend (Keppler et al. 1997; König et al. 1999; Suzuki et al. 2002).

Indem es eine intrazelluläre Akkumulation seiner Substrate verhindert, schützt es die Hepatozyten vor toxischen Einflüssen und trägt wesentlich zur biliären Elimination von Metaboliten und Xenobiotika bei (Mizuno et al. 2003). Daneben ist MRP2 auch an der renalen Ausscheidung einiger Stoffe beteiligt, was durch seine Expression in der apikalen Membran renaler Epithelzellen des proximalen Tubulus deutlich wird (Schaub et al. 1997 und 1999; Suzuki et al. 2002). Eine Induktion der renalen Expression des MRP2 bei Cholestase sowie die Zugehörigkeit der ausschließlich renal eliminierten p-Aminohippursäure (PAH) zu seinen Substraten deuten ebenfalls auf die physiologische Beteiligung bei der renalen Elimination hin (Leier et al. 2000; Suzuki et al. 2002).

Neben dem Vorkommen in Ausscheidungsorganen ist MRP2 in der apikalen Membran von Enterozyten lokalisiert (Fromm et al. 2000). Der Grad der Expression innerhalb des gastrointestinalen Traktes nimmt von proximal nach distal ab (Mottino et al. 2000). Durch die Beteiligung des MRP2 an der intestinalen Sekretion in das Darmlumen scheint es

einen limitierenden Einfluss auf die Resorption und die orale Bioverfügbarkeit z.B. von Xenobiotika auszuüben und trägt zum Schutz vor toxischen oder karzinogenen Substanzen bei (Suzuki et al. 2002; Dietrich et al. 2003, Gerloff and Roots 2003).

Eine ähnlich protektive Funktion erfüllt MRP2 auch durch seine Expression in der apikalen Membran kapillarer Endothelialzellen wichtiger Blut-Gewebe-Schranken (Tirona und Kim 2002). So schützt es mit seiner Expression in Synzytiotrophoblasten der Plazenta den Fetus durch einen Auswärtstransport potentiell toxischer Substanzen vor deren Akkumulation (St-Pierre et al. 2000; Tirona und Kim 2002). Auch eine Beteiligung an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke ist aufgrund der Expression in der luminalen Membran zerebraler Endothelzellen gesichert (Potschka et al. 2003; Nies et al. 2004).

### 1.2.3 Substratspezifität von MRP2

Die Substratspezifität des MRP2 umfasst ein breites Spektrum endogener und exogener organischer Anionen. Diese werden meist intrazellulär an Glutathion, Glukuronide oder Sulfate konjugiert und nachfolgend von MRP2 aus der Zelle transportiert. Dabei besitzt es vor allem mit der biliären Ausscheidung von konjugiertem Bilirubin in Form von Bilirubin-Mono- oder -Diglukuroniden eine entscheidende physiologische Relevanz (Kamisako et al. 1999). Daneben ist MRP2 für die biliäre Exkretion verschiedener Gallensäuren, die wiederum an Glukuronide oder Sulfate gekoppelt sein können, verantwortlich (Suzuki et al. 2002, Trauner und Boyer 2003). Aber auch nicht-konjugierte organische Anionen zählen zum Spektrum seiner Substrate, wobei dieser Transport vermutlich meist im Kotransport mit reduziertem Glutathion (GSH) erfolgt. Mit dem zellulären Efflux von sowohl reduziertem (GSH) als auch oxidiertem (GSSG) Glutathion scheint MRP2 außerdem eine Rolle bei der Regulation des intrazellulären Redoxstatus zu spielen. Indem es das Verhältnis von oxidiertem GSSG zu reduziertem GSH reguliert, könnte es zu einem zellulären Schutzmechanismus gegenüber oxidativem Stress beitragen (Paulusma et al. 1999).

Nach der MRP2-katalysierten Sekretion von Glutathion in die Gallenflüssigkeit liegt dieses Substrat dort in hohen Konzentrationen vor. Die resultierende hohe Osmolarität stellt die treibende Kraft für den Gallefluss dar (Paulusma et al. 1999; Suzuki et al. 2003; Trauner und Boyer 2003).

Neben physiologischen Substraten werden zahlreiche Arzneimittel von MRP2 aus der Zelle transportiert, wodurch es einen wesentlichen Einfluss auf deren pharmakokinetische Eigenschaften besitzen könnte (Borst et al. 1999; König 1999; Suzuki et al. 2002, Mizuno et al. 2003). Eliminationswege des Organismus sind häufig redundant angelegt, so dass sich z.B. durch eine überlappende Substratspezifität verschiedener Transporter

Kompensationsmechanismen bei Ausfall eines Weges ergeben können. Beispielsweise überlappen sich die Substrate von MRP2 und MRP4.

#### 1.2.4 Resistenz von Tumorgewebe gegenüber Chemotherapeutika

Neben der physiologischen Expression in gesunden Geweben konnte auch eine erhöhte Expression von MRP2 in verschiedenen Tumorgeweben nachgewiesen werden.

Zelllinien, in welche die *cDNA* des humanen MRP2 transfiziert wurde, zeigten sich vereinzelt resistent gegenüber Zytostatika. So könnte eine Überexpression von MRP2 innerhalb maligner Gewebe durch einen verstärkten Auswärtstransport zu einer erworbenen Resistenz („*multidrug resistance*“) der Tumorzellen gegenüber zahlreichen Chemotherapeutika beitragen, was eines der wesentlichen Probleme der Tumorthherapie darstellt (Taniguchi et al. 1996; König et al. 1999; Suzuki et al. 2002, Lockhart et al. 2003). Diese Hypothese wurde bei kolorektalen Karzinomen untermauert, in denen die *mRNA* Expression von MRP2 mit einer Resistenz gegenüber dem MRP2-Substrat Cisplatin korrelierte (Hinoshita et al. 2000). Für Methotrexat ist ebenfalls eine erworbene Resistenz von transfizierten Zellen eines Ovarialtumors berichtet worden (Masuda et al. 1997; Lockhart et al 2003). Allerdings sind die Erkenntnisse über die klinische Bedeutung erhöhter MRP2-Expression in Tumorzellen insgesamt noch gering.

### 1.3 Genetische Polymorphismen von MRP2

#### 1.3.1 Genetisch bedingte Unterschiede bei Arzneistofftransportern

Ziel der Pharmakotherapie ist es, eine maximale Wirksamkeit bei gleichzeitiger Minimierung der unerwünschten Arzneimittelwirkungen zu erreichen. Um eine Pharmakotherapie individuell optimieren zu können, müssen inter- und intraindividuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der Arzneimittel besser verstanden werden. Neben Arzneimittelinteraktionen spielen hier genetische Unterschiede in metabolisierenden Enzymsystemen und Arzneistofftransportern eine wesentliche Rolle. Sie können zu interindividuellen Unterschieden in der Funktion oder dem Expressionsniveau der betroffenen Proteine führen und die Wirksamkeit und Toxizität von Medikamenten entscheidend beeinflussen (Nebert 1999; Meyer 2000; Roses 2000; Suzuki et al. 2002; Goldstein et al. 2003).

Die häufigsten genetischen Variationen sind Veränderungen einzelner Basen, die man bei einer Häufigkeit =1% in der Normalbevölkerung als „*single nucleotide polymorphism*“ (SNPs) bezeichnet. Die Häufigkeit solcher Allelvarianten im Genom wird auf ca. 1 SNP pro 300 bis 1000 Basenpaare geschätzt (Stephens et al. 2001; Salisbury et al. 2003). Zunehmend werden auch Mutationen und SNPs in Arzneistofftransportern als Ursache

hereditärer Krankheiten bzw. pharmakokinetischer Unterschiede entdeckt (Suzuki et al. 2002; Tirona und Kim 2002; Mizuno et al. 2003). Beispielsweise beruht die Zystische Fibrose, die zu den häufigsten monogenen Erbkrankheiten zählt, auf einer durch Mutationen hervorgerufenen Dysfunktion eines ABC-Transporters (*ABCC7*, *CFTR*, „*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*“; Schmitt und Tampe 2002), der u.a. eine wesentliche Funktion als Chlorid-Kanal besitzt. Wie auch *MRP2* wird *CFTR* der C-Klasse der ABC-Moleküle zugerechnet.

Die Auswirkungen genetischer Polymorphismen auf die Arzneimitteldisposition lassen sich exemplarisch an dem Effluxtransporter P-Glykoprotein 170 (*ABCB1/MDR1*) veranschaulichen. Bei homozygotem Vorliegen des bei Kaukasiern selteneren Allels *c.3435T* (Exon 26) resultiert eine signifikant geringere Expression des P-Glykoproteins 170 (P-GP 170) in Dünndarm und Niere. Diese veränderte Expression führt durch einen verminderten Efflux zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit für Digoxin (Hoffmeyer 1999; Fromm und Eichelbaum 2002; Schwab et al. 2003). Der Polymorphismus ist nicht mit einer Veränderung der Aminosäuresequenz des Proteins assoziiert.

Auch kann eine genetische Heterogenität von Arzneistofftransportern durch Auswirkungen auf die Pharmakokinetik eine essentielle Rolle bei der Tumorthherapie spielen und eine Überexpression in malignen Geweben zu Resistenzen gegenüber zahlreichen Chemotherapeutika führen (König et al. 1999; Cascorbi et al. 2001; Fromm und Eichelbaum 2002). Beispielsweise zeigten klinische Studien eine Korrelation einer geringeren Expression des P-GP 170 mit einer besseren Prognose bei gastrointestinalen und hämatologischen Tumoren (Fromm und Eichelbaum 2002).

### 1.3.2 Das Dubin-Johnson-Syndrom (DJS)

Das Dubin-Johnson-Syndrom (DJS) wurde erstmals 1954 beschrieben und ist eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit (Dubin und Johnson 1954; OMIM #237500). Im Laufe der letzten Jahre konnten zahlreiche verschiedene Punktmutationen im *ABCC2* Gen als genetische Grundlage identifiziert werden.

Das Syndrom ist mit einer eingeschränkten biliären Elimination anionischer Konjugate assoziiert. Die intermittierend auftretende starke Verminderung der Ausscheidung von konjugiertem Bilirubin verursacht eine konjugierte Hyperbilirubinämie mit mildem Ikterus bei normaler Leberfunktion. Es entwickelt sich in den Hepatozyten eine intrazelluläre Anreicherung eines melanin-ähnlichen Pigments, so dass eine „schwarzbraune“ Verfärbung der Leber auftritt (König et al. 1999; Suzuki et al. 2002). Während Coproporphyrine, die Metaboliten des Bilirubins, nicht vermehrt nachweisbar sind, ist der prozentuale Anteil des Coproporphyrin-I Isomers bei Erkrankten im Urin auf >80% der

Gesamt-Coproporphyrine erhöht (normal <65%). Eine entsprechende, aber geringer ausgeprägte Verschiebung des Isomeren-Verhältnisses findet sich bei Konduktoren der Erkrankung. Das Isomeren-Verhältnis ist ein wichtiger differentialdiagnostischer Hinweis bei der Abgrenzung vom Rotor-Syndrom (Ben-Ezzer et al. 1971).

Tabelle 1.2 führt die bisher identifizierten Mutationen innerhalb des *ABCC2* Gens auf, die zum DJS führen (Gerk and Vore 2002; Suzuki et al. 2002; Tate et al. 2002; Tirona und Kim 2002; Mor-Cohen et al. 2005). Darunter befinden sich neben „*missense*“ und „*nonsense*“ Mutationen auch Deletions- und „*splice-site*“-Mutationen. Zusätzlich sind die Auswirkungen auf die Proteinstruktur sowie die Lokalisation innerhalb bestimmter funktioneller Bereiche des MRP2 dargestellt. Häufig ist bei Vorliegen der DJS-Mutationen das MRP2 Protein in Hepatozyten betroffener Individuen immunhistochemisch nicht mehr oder in verminderter Konzentration in der kanalikulären Membran nachweisbar. Dafür können verschiedene Ursachen, wie z.B. ein rascher Abbau der mutierten mRNA, eine fehlende Reifung des Proteins oder Auswirkungen auf die Proteinstruktur und –stabilität verantwortlich sein (Kartenbeck et al. 1996; Tirona und Kim 2002; Keitel et al. 2003). Einzig bei dem Aminosäureaustausch Arg1150His (Exon 25) ist ein vollständig gereiftes MRP2 an korrekter Lokalisation in der apikalen Membran exprimiert. Allerdings ist die Transportfunktion des Proteins beeinträchtigt (Mor-Cohen et al. 2001; Keitel et al. 2003).

Das Syndrom ist in Europa relativ selten, kommt aber bei einigen Ethnien häufiger vor. Die Häufigkeit wird bei iranischen Juden mit etwa 1:1300 angegeben. Wie bei anderen rezessiven Syndromen findet sich nicht selten eine Kosanguinität der Eltern von betroffenen Patienten. Das Syndrom ist insgesamt eine relativ milde Erkrankung, die außer einem intermittierenden Ikterus häufig keine wesentlichen anderen Symptome nach sich zieht. Der Ikterus kann durch Erkrankungen, aber auch durch die Gabe oraler Kontrazeptiva oder eine Schwangerschaft exazerbieren.

<b>cDNA Mutationen</b>	<b>Position</b>	<b>Effekt</b>	<b>Lokalisation</b>
<i>c.C298T</i>	Exon 3	Arg105X (Stop)	MSD 1
<i>c.A867+4G, 1012Del20</i>	Intron 8	Exon 8; Del20; Frameshift (Stop)	MSD 2
<i>c.A1271G</i>	Exon 10	Arg412Gly	MSD2
<i>c.T1815+2A, 1669Del147</i>	Intron 13	Exon 13 skipped; Del555-611	MSD 2
<i>c.T1967+2C, 1901Del67</i>	Intron 15	Exon 15 skipped; Del660-691	NBD 1
<i>c.G2026C</i>	Exon 16	Gly676Arg	NBD 1; Walker A
<i>c.G2125C</i>	Exon 17	Trp709Arg	NBD 1
<i>c.C2302T</i>	Exon 18	Arg768Trp	NBD 1; Walker C
<i>c.T2439+2C, 2272Del168</i>	Intron 18	Exon 18 skipped; Del758-818	NBD 1; Walker B und C
<i>c.C3196T</i>	Exon 23	Arg1066X (Stop)	MSD 3
<i>c.G3449A</i>	Exon 25	Arg1150His	MSD 3; TM15/TM16
<i>c.A3517T</i>	Exon 25	Ile1173Phe	MSD 3; TM15/TM16
<i>c.C3928T</i>	Exon 28	Arg1310X (Stop)	NBD 2
<i>c.A4145G</i>	Exon 29	Glu1382Arg	NBD 2
<i>c.4175Del6</i>	Exon 30	Arg1392Met1393del	NBD 2

**Tabelle 1.1:** Übersicht der *ABCC2*-Mutationen der *cDNA*, die zu einem Dubin-Johnson-Syndrom führen (Paulusma et al. 1997; Kajihara et al. 1998; Wada et al. 1998; Kagawa et al. 1999; Toh et al. 1999; Tsujii et al. 1999; Keitel et al. 2000; Mor-Cohen et al. 2001; Hashimoto et al. 2002; Tate et al. 2002; Keitel et al. 2003; Materna et al. 2003; Shoda et al. 2003, Hulot et al. 2005, Mor-Cohen et al. 2005). MSD: membranspannende Domäne; NBD: Nukleotid-bindende Domäne; TM: intrazelluläre Schleife.

### 1.3.3 Polymorphismen im *ABCC2*-Gen

Die Identifizierung von häufigen Polymorphismen im *ABCC2*-Gen ist eine entscheidende Voraussetzung, um genetisch bedingte interindividuelle Aktivitätsunterschiede des MRP2 Proteins und deren Auswirkungen auf die Pharmakokinetik zu untersuchen.

Bei einem Mutationsscreening innerhalb eines gesunden japanischen Bevölkerungskollektives ohne DJS wurden insgesamt fünf verschiedene genetische Varianten nachgewiesen. Dabei kamen die Allelvarianten *c.C-24T* der 5'-UTR, *c.G1249A* des Exon 10 und *c.C3972T* des Exon 28 jeweils relativ häufig vor. Ihre Allelfrequenzen betragen 18,8%, 12,5% bzw. 21,9%. Während *c.G1249A* zu einem Aminosäureaustausch Val nach Ile an Position 417 führt, verursacht der Basenaustausch *c.C3972T* des Exon 28 keine Änderung der Primärstruktur (Ile1324Ile). Der Polymorphismus *c.C-24T* der 5'-UTR ist naturgemäß nicht mit einer veränderten Aminosäuresequenz verbunden. Jeweils nur ein einziges heterozygotes Vorkommen innerhalb des Probandenkollektives (n=48) wurde für die SNPs *c.C2366T* (Exon 18, Ser789Phe) und *c.G4348A* (Exon 31, Ala1450Thr) beobachtet. Somit wiesen sie in dem untersuchten Kollektiv (n= 48; 96 Chromosomen) eine Allelfrequenz von ca. 1% auf (Ito et al. 2001).

Lokalisation	Varianten	Translation	Domäne
5'-UTR	c.C-24T	-	5'-UTR
Exon 10	c.G1249A	Val417Ile	MSD 2
Exon 18	c.C2366T	Ser789Phe	NBD 1
Exon 28	c.C3972T	Ile1324Ile	near NBD 2
Exon 31	c.G4348A	Ala1450Thr	NBD 2, Walker C

**Tabelle 1.2:** Darstellung der Polymorphismen innerhalb japanischen Probandenkollektives, welche nach bisherigen Erkenntnissen nicht mit dem Auftreten eines DJS verknüpft sind (Ito et al. 2001).

Bei einer weiteren Mutationsanalyse in der *DNA* von 72 Zelllinien, die aus menschlichen Tumoren etabliert wurden, konnten die häufig in der japanischen Bevölkerung nachgewiesenen Allelvarianten (c.C-24T, c.G1249A und c.C3972T) bestätigt werden. Von den übrigen, in den Zelllinien gefundenen Polymorphismen befinden sich vier innerhalb der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) und weitere 21 SNPs innerhalb kodierender Bereiche, von denen insgesamt 14 eine Veränderung der Aminosäuresequenz verursachten (Itoda et al. 2002; Suzuki et al. 2002).

#### 1.4 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit war die Identifizierung von Polymorphismen (SNPs) in den 32 Exons und flankierenden Intronabschnitten des *ABCC2* Gens bei 59 gesunden kaukasischen Probanden. Die Charakterisierung der Polymorphismen bei Kaukasiern wurde durchgeführt, da zwischen verschiedenen Ethnien häufig Unterschiede im Vorkommen von Polymorphismen bestehen und bislang lediglich Informationen zum Vorkommen von Polymorphismen bei Japanern verfügbar waren.

Die Detektion der Allelvarianten erfolgte mit einer Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP: „single-strand conformational polymorphism“) der PCR-Produkte mit anschließender Sequenzierung. Die Allelfrequenzen sollten ermittelt werden und die Allele auf Kopplungen zu Haplotypen untersucht werden. Die Ergebnisse stellten die Grundlage einer weiterführenden Studie der Arbeitsgruppe dar, welche die pharmakokinetischen Auswirkungen der SNPs bei Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie auf die Pharmakokinetik der Hochdosis-Therapie mit Methotrexat untersuchte.

## **2 Material und Methoden**

Die Studie wurde der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg zur Begutachtung vorgelegt und ihrer Durchführung ohne weitere Auflagen zugestimmt.

### **2.1 Patientenauswahl und Gewinnung der Proben**

Zur Gewinnung geeigneter DNA haben wir auf Blutproben gesunder kaukasischer Probanden zurückgegriffen, die bereits am Lehrstuhl für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg vorhanden waren. Insgesamt wurden in der Studie 59 nicht miteinander verwandte, kaukasische Probanden untersucht.

### **2.2 DNA-Extraktion**

Die Isolation der DNA erfolgte mit Hilfe des „QIAamp Blood Midi Kit“ (Qiagen, Hilden), der auf einer Silicat-Matrix basiert. Durch pH-Wert Änderungen und Veränderungen des Ethanolgehaltes der Pufferlösungen wurde die DNA nach Freisetzung aus den Zellkernen von Leukozyten zuerst an diese Matrix gebunden, um nach Aufreinigung wieder ausgewaschen zu werden.

Jeweils 2 ml EDTA-antikoaguliertes Vollblut wurden mit 200 µl QUIAGEN Protease-Stammlösung und 2,4 ml Lyse-Puffer AL (Qiagen, Hilden) in einem Zentrifugenröhrchen gründlich gemischt und 10 Minuten bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Nach Mischen mit 2 ml absolutem Ethanol wurden zunächst 3,3 ml der Lösung auf eine QIAamp Midi Säule pipettiert und 3 Minuten bei 3000 rpm und 18°C zentrifugiert. Mit der restlichen Lösung wurde nach Verwerfen des Zentrifugats analog verfahren.

Die Reinigung der Matrix von Proteinen erfolgte durch Auftragen von je 2 ml Waschpuffer AW 1 und AW 2 auf den Filter und je einer weiterer Zentrifugation. Um Reste von Ethanol zu verdampfen, wurde die Säule in einem Trockenschrank 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Die Säule wurde schließlich in ein weiteres Zentrifugenröhrchen platziert, ehe die DNA durch Zugabe von 300 µl *aqua ad injectabilia*, einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation von 5 Minuten bei 4000 rpm eluiert wurde. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt, um die Konzentration der DNA zu erhöhen. Die eluierte DNA wurde schließlich bei –20°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

### **2.3 Quantifizierung der DNA**

Die Konzentration der DNA in Lösung wurde durch spektrophotometrische Bestimmung

(SmartSpek 3000, BioRad GmbH, München) der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Bei 260 nm entspricht eine OD von 1 einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml. Zur Abschätzung der Reinheit der Präparation wurde zusätzlich die OD bei 280 nm gemessen. Der  $OD_{260}/OD_{280}$ -Quotient der Proben sollte im Bereich von 1,8 – 2,0 liegen. Zur Messung wurden 20 µl jeder Probe in 180 µl *aqua ad injectabilia* verdünnt. Gemessen wurde in Quarzküvetten. Die Menge an DNA errechnete sich nach folgender Formel:

$$\mu\text{g DNA/ml} = OD_{260\text{ nm}} \times 50\ \mu\text{g/ml} \times 10\ (\text{Verdünnungsfaktor})$$

## 2.4 Standard-PCR

### 2.4.1 Theoretische Grundlagen

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt die Amplifikation bestimmter Genbereiche *in vitro*. Die amplifizierte DNA dient dann als Ausgangsmaterial für gezielte Untersuchungen auf Polymorphismen. Das Verfahren beruht auf der Hybridisierung sequenzspezifischer Oligonukleotide (Primer) an eine Nukleinsäure-Matrize. Von deren 3'-Ende ausgehend synthetisiert eine DNA-Polymerase einen neuen DNA-Strang, dessen Größe durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Primers gezielt bestimmt werden kann. Eine zyklische Wiederholung dieses Vorganges führt zur exponentiellen Amplifizierung der Matrize. Wesentlich ist die Thermostabilität der DNA-Polymerase, die es erlaubt durch gezielte Einstellung der Temperaturen die Reaktion zu steuern.

### 2.4.2 Versuchsdurchführung

Zur Amplifizierung der jeweiligen Exons wurde eine standardisierte PCR mit dem unten genannten Reaktionsansatz (Tabelle 2.2) sowie optimierten Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Primersequenzen wurden so gewählt, dass die Amplifikate jeweils die veröffentlichten Exon-Intron-Grenzen aller 32 Exons des humanen *ABCC2* einschließen. (Taniguchi et al. 1996; Toh et al. 1999; Ito et al. 2001). Die Primersequenzen in 5'-3'-Richtung und die Größe der amplifizierten PCR-Produkte sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Die Primer wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

Exon	Primer (Forward), 5' – 3'	3'-Primer (Reverse) , 5' – 3'	Größe [bp]	Annealing [°C]
1	TTCCACTTTCTTTGATGA	TCTTGTTGGTGACCACCCTAA	210	52
2	AATGCATGTATGCAACAATCC	GCACCAAGGAATTAGAGTTCA	256	52
3	ATCCTCTTAACAGTGGTCTTT	TAAACAGGGCAGAAGTGGTAT	189	52
4	TCCTTCTCCCCTCAGTCTCTC	TCAACTTGATGCCATTTACTA	280	54
5	ATCATAGGCTTTAATCACAAG	ATGAGATGGGCATATTTAGAA	231	52
6	GTCCCATGAAGTTCCTGTCTC	GATCCAGCCAATCCAATACTC	148	58
7	GGGTCTCAGCCTGTGGTTCC	CGCTCACACAGACACTCAAGG	298	60
8	GGACACTGTTGTTTGGTTTTG	CAGAGGAGGCCCTGAAAGGAC	235	57
9	CCTTGGAGGCCTTATGGGTAT	GAGGGGATTTTCTTTGGTGAT	265	57
10	GGGTCCTAATTTCAATCCTTA	TATTCTTCTGGGTGACTTTTT	310	52
11	AGCCACAAAGTAGCAGTGAGG	TTACCCACAGAGAGCCACCTA	198	58
12	GGCAATCATGTGAGCTGTATT	AGATGCCAGCTAGTCTATCAA	271	58
13	AATGCTGCTTGGTCCCTTTTA	GCAGTGAGAATGCCGACCTAC	222	57
14	ATTCTTGAGATCCTTTGTGTC	TTGGGAAGCAAACCTTCCAAT	144	57
15	GGGACCTACATTGGACTAAAA	CAGTGAGAATGCTAAAGAACA	153	57
16	TCTCCTTCAAAGACATTCTCG	AGGCTTTTGCATTGGCATTCC	184	57
17	AACCCTGCGTTTCTGGAGGTG	CTTGAAGATCCCTTGTTATCC	260	57
18	GGAGTAGTGCTTAATATGAAT	CCCACCCACCTTTATATCTT	249	52
19	ACAGGGAAGATGGTGGACATA	TATCTTGTCCCAATCCTTCTT	263	57
20	GTGTCTCCCTAGTCCATGATG	AAAGCCCAGGAAGAAAAGAA	217	57
21	ACATCTGCTTGCAAGAAGACC	AACACCTCAAATGCTACTTTT	236	57
22	AAGCCTTAGGGAGTTCTACTA	CCAGACAGATTCGTAAGATGT	303	57
23	TGCATGGTGCTGACAAAACCTG	CACCACCTGACAGTTCTTGAG	218	60
24	TGGTGTATCTCTCCTAATCGT	AGAGAGGAAGGAAGGATGACT	225	59
25	ACTGGCTGATTCTTTACTTTT	CCACCGCTAATATCAAACATA	299	57
26	TGCGGCCCGATCAAGTCAAAC	AACCAAACCTCCAACCTTCAA	266	57
27	TTGGTTTCTGTGCCTATGATG	ATGTTGTTTTTGCCTTGTTCC	196	59
28	TGCTACCCTTCTCCTGTTCTA	ATCCAGGCCTTCCTTCACTCC	269	52
29	TGAATGCCCAGGCTAAATAAC	ACGGCATGTGCCCGAGTAAGT	263	57
30	CAACAGCCCCCTTGTCTTTTC	GCCCCCTCACATCCTCTCATT	249	60
31	AGGAGCTAACACATGGTTGCT	GGGTTAAGCCATCCGTGTCAA	272	52
32	CCTTGTTTCAGGGTAATGGTC	GTTTCATGGGTGTTCACTTATC	277	57

**Tabelle 2.1** Darstellung der zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide (nach Ito et al. 2001). Ebenso sind die Basenpaarlänge des amplifizierten PCR-Produktes sowie die experimentell ermittelte optimale „annealing“-Temperatur [°C] aufgeführt. Die Orientierung Forward bzw. Reverse bezieht sich auf den kodierenden Strang.

Der nachfolgende Reaktionsansatz (Tabelle 2.2) versteht sich als Ansatz für eine einzelne Probe, wobei für eine höhere Probenzahl  $n$  jeweils ein  $n$ -facher Ansatz berechnet wurde. Zur Verringerung von Pipettierfehlern wurden die Komponenten für den PCR-Ansatz mit Ausnahme des Templates (DNA-Lösung) für alle Proben in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß gemischt. Von dieser Gesamtlösung (*Master-Mix*) wurden pro Ansatz je 14  $\mu$ l entnommen und zusammen mit 1  $\mu$ l DNA-Edukt in ein PCR-Gefäß (Biozym TubePlates und Caps, Biozym, Hessisch Oldendorf) pipettiert. Die verwendeten PCR-Reagentien stammten von der Fa. PeqLab (Erlangen).

Reagenzien (Konzentrationen)	Volumen in [ $\mu$ l]
Aqua ad injectabilia	9,51
Puffer Y (10 x)	1,5
MgCl <sub>2</sub>	0,9
dNTP-Mix (2,5 mM)	1,5
Primer-Mix: 5'- und 3'-Primer (50 $\mu$ M)	0,24
Polymerase PeqLab (2,5 U/ $\mu$ l)	0,35
Summe	14
DNA-Template (50-100 ng)	1
Endvolumen	15

**Tabelle 2.2:** Reaktionsansatz zur Durchführung der PCR einer einzelnen DNA-Probe. Für mehrere Proben wurde ein mehrfacher Ansatz pipettiert und die DNA nach Herstellung des Mastermixes hinzugegeben.

Die PCR umfasst drei verschiedene Schritte, wobei der erste zu einer initialen Denaturierung der DNA-Doppelstränge führt. Im mehrmals durchlaufenen Amplifikationszyklus kommt es zur Hybridisierung der Primer und nachfolgend zu einer Verlängerung der Nukleotidketten im Temperaturoptimum der Polymerase. Eine abschließende Kettenverlängerung (*final extension*) beendet den PCR Vorgang.

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	7 min	1
Zyklische Amplifikation	95°C	30 sek	35
	Primer-Spezifisch	45 sek	
	72°C	1 min	
<i>Final extension</i>	72°C	7 min	1

**Tabelle 2.3:** Reaktionsbedingungen für die Amplifikation des *ABCC2*-Gens.

Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde zu Beginn mittels Temperaturgradienten-PCR für jedes einzelne Exon die optimale Temperatur der Amplifikation ermittelt, welche in Tabelle 2.1 einzeln als „*Annealing*“-Temperaturen aufgeführt sind. Die Optimierung dieses Parameters ist für die Spezifität der PCR unerlässlich, da zu niedrig gewählte Temperaturen zu einer unspezifischen Hybridisierung der Primer mit anderen Sequenzbereichen der Matrizen-DNA führen kann. Als Anhaltspunkt für die Bestimmung der „*annealing*“-Temperatur kann die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der Oligonukleotide dienen. Die „*annealing*“-Temperatur sollte ca. 5°C unter der Schmelz-Temperatur liegen.

Zur Kontrolle auf Verunreinigungen – insbesondere durch PCR-Produkte – wurden bei

jeder PCR-Durchführung Negativkontrollen mitgeführt. Diese enthielten H<sub>2</sub>O anstatt genomischer DNA. Eventuelle Verunreinigungen durch PCR-Produkte oder genomische DNA wurde auf diese Weise ausgeschlossen.

## **2.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Zum Nachweis der Größe des amplifizierten PCR-Produktes, zum Ausschluss eventueller Nebenprodukte und zur Prüfung der PCR-Bedingungen wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung von 2,5% Agarose-Gel wurden pro 100 ml 1x TAE jeweils 2,5 g DNA-Agarose (Peq Gold Universal-Agarose, PeqLab, Erlangen) durch mehrmaliges Aufkochen in der Mikrowelle bis zur Homogenität gelöst und anschließend 20 µl verdünnte Ethidiumbromidlösung (1:10) hinzugegeben. Das Ethidiumbromid im Agarose-Gel interkaliert in die DNA und ermöglicht unter Anregung mit UV-Licht die Visualisierung der fluoreszierenden Banden.

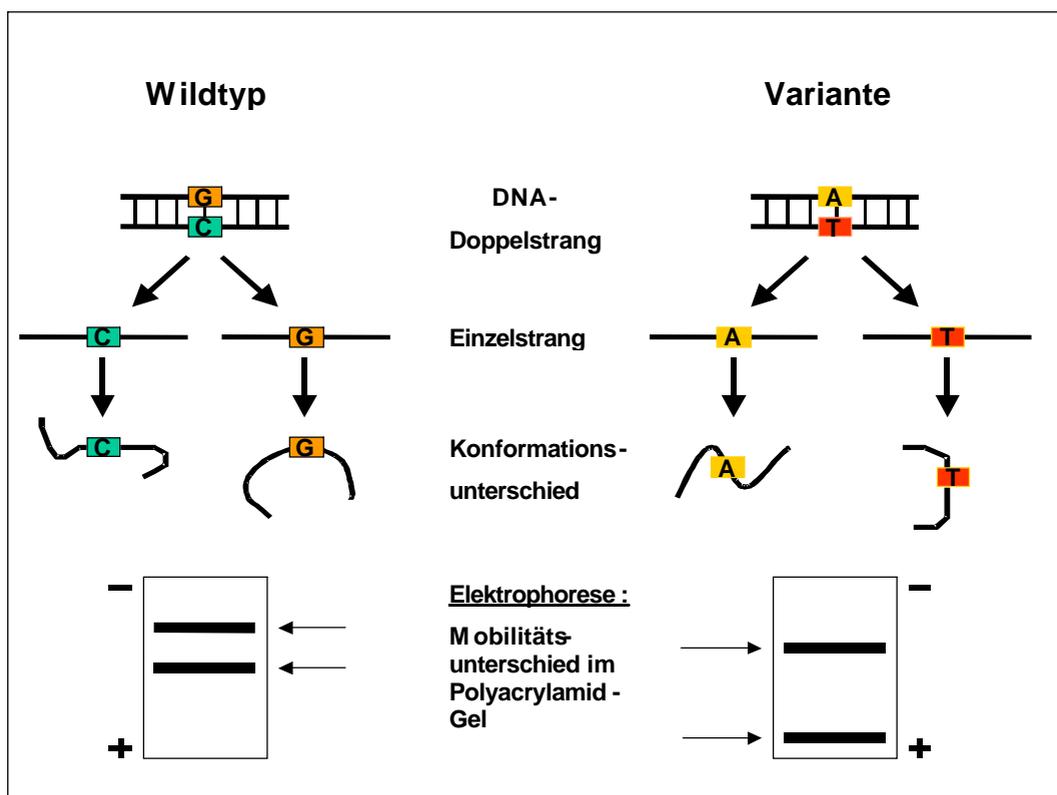
Es wurden 3 µl des Amplifikates zusammen mit 2 µl 6-fach Probenauftragspuffer und 7 µl *aqua ad injectabilia* (Endkonzentration des Puffers 1x) auf das Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die jeweilige Größe der PCR-Produkte wurde mittels eines 100 bp Größenstandards ermittelt und die Banden photographisch dokumentiert (Gel Doc 2000 Gel Documentation System, BioRad, München). Zur weiteren analytischen Verwendung der PCR-Produkte wurden die verbleibenden 12 µl nach Hinzufügen von 1 µl Glykogen (1 µg/µl; PeqLab, Erlangen) durch Zugabe des dreifachen Volumens von absolutem Alkohol ausgefällt. Nach 20 Minuten Inkubation bei -20 °C folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 15.000 rpm. Nach Absaugen des Überstandes und anschließendem Trocknen der ausgefällten DNA bei Raumtemperatur wurde das Produkt in 10 µl *aqua ad injectabilia* aufgelöst.

## **2.6 Single-strand Conformation Polymorphism (SSCP)-Analyse**

### **2.6.1 Theoretische Grundlagen**

Die elektrophoretische Trennung bei der SSCP-Analyse nutzt die unterschiedliche Mobilität der durch Denaturierung aufgetrennten Einzelstrang-DNA, welche abhängig von ihrer Nukleotidsequenz jeweils spezifische Konformationen annehmen. Bereits geringe Abweichungen der Sequenz können durch differierende räumliche Konformation zu unterschiedlichem Laufverhalten und somit einer elektrophoretischen Trennung innerhalb einer Gelmatrix führen. So kann sich durch eine Punktmutation ein neues, vom Wildtyp abweichendes Bandenmuster ergeben. Je größer der Einfluss einer genetischen Variation auf die Konformation des Einzelstranges ist, umso deutlicher wird ihr Nachweis.

Zur Anwendung kam bei der Elektrophorese ein nicht-denaturierendes, 6%iges Polyacrylamid-Gel in einem vertikalen Gelsystem von 1 mm Dicke. Durch Hitzedenaturierung in einem alkalischen, Formamid-haltigen Puffer wurden die Einzelstränge voneinander getrennt und durch schnelles Abkühlen auf Eis eine erneute Reassoziierung verhindert. Jeder Einzelstrang nimmt für ihn thermodynamisch günstige Strukturen an, wobei teil-komplementäre Regionen durch Rückfaltung interne doppelsträngige Helices bilden können, die durch einzelsträngige, Schleifen bildende Bereiche („loops“) verbunden sind.



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung der SSCP-Analyse. Die unterschiedlichen Mobilitätseigenschaften innerhalb eines nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gels beruhen auf Konformationsunterschieden innerhalb der Sekundärstruktur der DNA, die durch einen einzelnen Basenaustausch hervorgerufen werden können.

### 2.6.2 Versuchsdurchführung

Für alle SSCP-Gele wurde eine Protean II Elektrophorese-Einheit mit vertikalem Gelsystem der Firma Biorad verwendet, deren 35 x 43 cm große Glasplatten mit 70%igem Ethanol gereinigt wurden, um ein leichtes Ablösen der Gele zu gewährleisten. Als Gelmatrix wurde ein nicht-denaturierendes 6%iges Polyacrylamid-Gel mit einer Dicke von 1 mm gegossen. Dazu wurden 12 ml 40%iges Acrylamid (37,5:1; Endkonzentration 6%; Fa. Applichem, Darmstadt), 4 ml 10x TBE (Endkonzentration 0,5x) und 8 ml 50%iges

Glycerin (Endkonzentration 5%) mit 56 ml *aqua ad injectabilia* gründlich vermischt. Nach anschließender Zugabe der Polymerisations-Katalysatoren in Form von 300 µl 10%igem Ammoniumperoxodisulfat (APS, BioRad, München) und 20 µl Tetramethyl-Ethylen-Diamin (TEMED, Merck, Darmstadt) wurde das Gel zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen, der Probenauftragskamm eingebracht und nach erfolgter Polymerisation in die Pufferkammer überführt.

Zur Probenvorbereitung wurden 1,5 µl des durch Ethanol-Fällung aufgereinigten PCR-Produktes mit 13,5 µl Denaturierungspuffer (95%iges Formamid zur Denaturierung und je 0,025%iges Bromphenolblau und Xylencyanol zur Farbmarkierung) in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gründlich vermischt. Zur Denaturierung wurde die Probe bei 95°C für 5 Minuten in einem Thermoblock (Firma Eppendorf, Hamburg) erhitzt und anschließend umgehend auf Eis gestellt. Nach dem Auftragen der Proben in die Taschen des Gels wurden die Einzelstränge elektrophoretisch getrennt. Hierfür wurde eine konstante Spannung von 250 V (Powerpac3000, Biorad, München) für ca. 4-6 Stunden angelegt, bis die Probe etwa zu  $\frac{3}{4}$  ins Gel gelaufen war. Dies wurde mit dem im Denaturierungspuffer enthaltenen Farbmarker kontrolliert. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet.

### 2.6.3 Optimierung

Zur Optimierung der Elektrophorese-Bedingungen wurde sowohl das Verdünnungsverhältnis des Denaturierungspuffers als auch das Temperaturoptimum in vergleichenden Optimierungsschritten bestimmt. Um eine scharfe Bandendarstellung in der Silbernitratfärbung zu gewährleisten, sollten möglichst geringe Konzentrationen an DNA eingesetzt werden. Deshalb wurde in einer Verdünnungsreihe zunächst das optimale Verdünnungsverhältnis bestimmt, wozu zwei zufällig ausgewählte Proben in aufsteigendem Verdünnungsverhältnis auf ein Gel aufgetragen und gefärbt wurden. Dabei ergab die Verdünnung 1:10 in der Regel die schärfsten und deutlichsten Banden. Als Temperaturoptimum bei der Elektrophorese wurde 15°C ermittelt, weswegen stets eine Wasserkühlung an die Elektrophorese-Kammer angeschlossen wurde.

## 2.7 Silbernitratfärbung

Insbesondere zur Färbung von Einzelstrang-DNA ist die Silbernitratfärbung als eine sehr sensitive Methode etabliert (Russel et al. 1997). Das verwendete Färbeprotokoll umfasste mit Fixation, Färbung, Entwicklung, Anhalten der Entwicklung, abschließender Imprägnierung und Trocknung des Gels insgesamt sechs Arbeitsschritte. Nach Beendigung der Elektrophorese und Entfernung des Gelträgers aus der Pufferkammer stellte der erste Schritt die Fixierung der DNA im Gel dar. Dazu wurde eine Fixierlösung

aus 37,5 ml Ethanol, 12,5 ml Essigsäure und 200 ml Wasser in einer Glasschale in der Mikrowelle auf 50°C erhitzt. Anschließend wurde das Gel 45 Minuten lang in der warmen Fixierlösung gebadet, ehe es in 250 ml bidestilliertem Wasser 15 Minuten lang gewaschen wurde. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt.

Darauf folgte eine Inkubation in 200 ml 0,1%iger Silbernitratlösung, der 200 µl 37%iges Formaldehyd (Merck, Darmstadt) hinzugefügt worden waren. Darin wurde das Gel für 45 Minuten langsam bewegt und nachfolgend die Färbelösung entfernt. Im dritten Arbeitsgang wurde das Gel mit einer Entwicklerlösung aus 50 ml 10% Natriumcarbonatlösung ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 150 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bidest, 150 µl 3% Natrium-Thiosulfatlösung ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) und 200 µl 37%iger Formaldehydlösung entwickelt. Unter langsamer Bewegung konnte nach wenigen Minuten beobachtet werden, wie die DNA-Banden sichtbar wurden. Sobald die Banden deutlich und scharf zu erkennen waren, wurde die Entwicklung gestoppt. Zum Anhalten der Färbung bzw. zum Entsilbern wurde das Gel für 15 Minuten in 250 ml Stopplösung (2% Glycin, 0,5%  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) inkubiert. Im letzten Schritt wurde das Gel mit einer 10%igen Glycerol Lösung (25 ml Glycerol und 225 ml Aqua bidest.) imprägniert. Zum Trocknen wurde das Gel vorsichtig zwischen zwei wasserdurchlässige Cellophan-Folien in einen Geltrockner (BioRad, München) übertragen und unter Vakuum bei 80°C für zwei Stunden getrocknet. Zum Schutz vor Kontamination wurde das Gel im Trockner mit Saran-Wrap abgedeckt.

## **2.8 DNA-Sequenzierung**

### **2.8.1 Theoretische Grundlagen**

Grundlage der Sequenzierungsreaktion nach Sanger et al. (1977) ist das so genannte Didesoxynukleotidverfahren. Hierbei wird anhand der Matrizen-DNA der komplementäre Strang enzymatisch synthetisiert, wobei dabei von der 3'-Hydroxygruppe des Sequenzierprimers ausgegangen wird. Dem Reaktionsansatz zugefügte 2', 3'-Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) führen bei ihrem Einbau in die Matrix zu einem Kettenabbruch, da aufgrund ihrer fehlenden 3'-Hydroxygruppe keine weiteren Nukleotide angefügt werden können. Somit erhält man eine Mischung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Kettenlänge, deren 5'-Ende der Sequenzierungsprimer bildet, während das 3'-Ende jeweils aus dem 2', 3'-Didesoxynukleotidtriphosphat besteht. Die verwendeten Didesoxynukleotidtriphosphate weisen unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungen auf. Nach elektrophoretischer Trennung der Produkte kann so die Kettenabbruchbase nach Laseranregung durch Fluoreszenz bestimmt werden. Auf diese Weise wurde die Sequenz mit Hilfe eines vollautomatischen Sequenziergerätes (Applied

Biosystems, Darmstadt) bestimmt.

### 2.8.2 Auswahl der Proben

In der SSCP-Analyse von der Norm abweichende Bandenmuster wurden sequenziert, um eventuelle Polymorphismen detektieren zu können. Zum Vergleich der aberranten Strukturen mit der Wildtyp-Sequenz und zur Bestätigung einer korrekten Amplifikation der jeweiligen Exons wurden exemplarisch mehrere, zufällig ausgewählte Proben mit Wildtypmuster in der SSCP sequenziert und anschließend mit der veröffentlichten Sequenz (Referenzsequenzen AL392107.1 von genomischer DNA und NM\_000392 von cDNA) abgeglichen.

### 2.8.3 Versuchsdurchführung

Um bei der Durchführung der Sequenzierungsreaktion der ausgewählten Exons nur eine lineare Amplifikation mit ausschließlich einzelsträngigen Produkten zu erhalten, bedient man sich einer „azyklischen PCR“, die streng genommen eine zyklisch ablaufende Primer-Extensionsreaktion darstellt. Hierbei wurde jeweils nur ein einzelner Primer (5'- oder 3'-Primer) eingesetzt. Da bei der Amplifikation der Exons die Reagenzien und Reaktionsbedingungen optimal angepasst und die Amplifikate aufgereinigt wurden, konnten sie direkt in die anschließende Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden. Die Reaktionen wurden mit dem Sequenziermix „Big Dye“ (Firma ABI, Darmstadt) durchgeführt, welcher bereits dNTPs, mit Fluoreszenzfarbstoff markierte ddNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Puffer und Polymerase in den benötigten Konzentrationen enthält. Als Sequenzierungsprimer wurden die Oligonukleotide der Tabelle 2.1 verwendet.

Folgender Reaktionsansatz der Tabelle 2.4 stellte sich nach durchgeführten Verdünnungsreihen der zugegebenen Primer bzw. der DNA-Templates als optimal heraus. Der Reaktionsansatz versteht sich als Ansatz für eine Probe und wurde für eine höhere Probenzahl n entsprechend n-fach berechnet.

Reagenzien	Volumen [µl]
Premix (Big Dye) (10 µM)	2
5'- oder 3'-Primer (10 µM)	0,6
DNA-Template (200 ng)	1
Aqua ad injectabilia	6,4
Summe	15

**Tabelle 2.4:** Reaktionsansatz zur Sequenzierung einer DNA-Probe.

Folgende Einstellungen der PCR-Maschine (Robocycler, Stratagene) stellten sich als optimale Reaktionsbedingungen (Tabelle 2.5) heraus. Einem initialen

Denaturierungsschritt mit 96°C für 15 Sekunden folgt der 30 Mal wiederholte Hauptzyklus. Dieser beginnt mit einer Denaturierung bei 96°C für zehn Sekunden und einer Primerhybridisierung für fünf Sekunden bei der für jedes Exon spezifischen „annealing“-Temperatur (siehe Tabelle 2.1). Eine abschließende Kettenverlängerung bei 60°C für 4 Minuten dient der Anlagerung der dNTPs bzw. ddNTPs. Abschließend werden die Proben bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung gekühlt.

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	96°C	15 sek	1
Hauptzyklus	96°C	10 sek	30
	„annealing“-Temp.	5 sek	
	60°C	4 min	

**Tabelle 2.5:** Reaktionsbedingungen einer azyklischen Sequenzierungs-PCR.

#### 2.8.4 Aufreinigung der Produkte der Sequenzierungs-PCR

Nach erfolgter Reaktion wurde das Produkt einer Aufreinigung durch Ethanolfällung unterzogen. Zu 10 µl Sequenzier-Produkt wurden 90 µl *aqua ad injectabilia*, 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) sowie 0,5 µl Glykogen (Peqlab, Erlangen) als Schlepper hinzugegeben und zur Fällung mit 250 µl 96%igem Ethanol vermischt. Nach sorgfältigem Mischen wurden die Proben für 20 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend bei 15.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in einem zweiten Reinigungsschritt in 300 µl Ethanol (70%) aufgenommen, um den Salzgehalt und den Gehalt an nicht inkorporierten Nukleotiden weiter zu verringern. Wiederum wurden die Proben bei 4°C für 10 Minuten mit 15.000 rpm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Zur Entfernung eventuell vorhandener Ethanolreste wurde das verbleibende Pellet abschließend getrocknet, ehe es in 20 µl *aqua ad injectabilia* resuspendiert wurde.

#### 2.8.5 Probenauftrag

Zur vollautomatischen Darstellung der Sequenzen nach erfolgter azyklischer PCR wurde der „DNA sequenzer“ ABI PRISM 310 (ABI, Darmstadt) verwendet, welcher mittels Kapillarelektrophorese mit fluoreszenzspektrometrischer Detektion die fluoreszenzmarkierten ddNTPs in sequenzgetreuer Basenabfolge ermittelt und graphisch darstellt. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 2 min bei 95°C denaturiert, ehe sie umgehend auf Eis gekühlt und abschließend kräftig gemischt wurden. Die Sequenzierungen erfolgten in der Kinderklinik der Friedrich-Alexander Universität, Erlangen.

### 2.8.6 Auswertung der Sequenzen

Die ausgewählten Sequenzen, die in der SSCP-Analyse Abweichungen ergaben, wurden mit den Wildtyp-Sequenzen und der veröffentlichten Sequenz des MRP2 optisch abgeglichen, um eventuelle Polymorphismen feststellen zu können. Dabei ließ sich ein homozygoten Vorliegen eines Basenaustausches von einem heterozygoten durch entsprechende Abweichungen im Peak-Muster unterscheiden. Sämtliche Nukleotidpositionen werden im Folgenden immer auf das initiale Start Codon (ATG) der Translation bezogen, welches sich 247 bp in 3'-Richtung des Transkriptionsstarts befindet (Tanaka et al. 1999). Intronische Sequenzvariationen werden in ihrer relativen Position zur benachbarten Exongrenze angegeben.

## 2.9 Restriktionsverdau

### 2.9.1 Theoretischer Hintergrund

Zur Bestätigung gefundener Punktmutationen wurde eine Analyse von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) vorgenommen. Hierfür wurden entsprechend des Basenaustausches geeignete Restriktionsendonukleasen gesucht, die eine Differenzierung zwischen den Allelvarianten ermöglichten. Diese Unterscheidung basiert auf dem mutationsbedingten Vorhandensein oder Fehlen von Schnittstellen der jeweiligen Restriktionsenzyme. Die Bestimmung der Größe der Restriktionsfragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

### 2.9.2 Versuchsdurchführung

Als Grundlage des enzymatischen Verdau wurden die PCR-Produkte aus 2.4 verwendet. Diese wurden je nach Basenaustausch mit den passenden Restriktionsendonukleasen (Firma New England Biolabs, Frankfurt am Main) gemäß der vom Hersteller angegebenen, optimalen Reaktionsbedingungen geschnitten. Dabei wurden die Art des Puffers, die Temperaturoptima und die Inkubationszeit berücksichtigt, um den Aktivitätsgrad der Enzyme zu optimieren und somit einen möglichst vollständigen und spezifischen Verdau zu gewährleisten. Der exemplarisch für eine Enzymmenge von 5 U aufgeführte Reaktionsansatz (Tabelle 2.6) versteht sich als Ansatz für eine Probe. Für eine entsprechend höhere Probenzahl  $n$  wurde ein  $n$ -facher Ansatz berechnet. Bei höheren benötigten Enzymkonzentrationen ( $U/\mu l$ ) wurde die eingesetzte Enzymmenge entsprechend geändert und mit inverser Volumenänderung des *aqua ad injectabilia* ausgeglichen. Die eingesetzten PCR-Produkte sollten mindestens 200 ng DNA enthalten. Bei Proben mit DNA-Konzentrationen  $<50$  ng/ $\mu l$  wurden die eingesetzten Volumina von

gelöster DNA entsprechend erhöht.

PCR-DNA (~100 ng/μl)	~2 μl
Puffer (10x)	1,7 μl
Enzym (10 U/μl)	0,5 μl
Aqua ad injectabilia	12,8 μl
Summe	17 μl

**Tabelle 2.6:** Reaktionsansatz für Restriktionsenzymverdau

Die Reaktionsbedingungen der verwendeten Restriktionsendonukleasen zeigt Tabelle 2.7:

Enzym	Menge	Temperaturoptimum	Puffer
Bbs1	5 U	60°C	Puffer 2
Msp1	20 U	37°C	Puffer 2
Fsp1	5 U	37°C	Puffer 4
Fnu4H1	5 U	37°C	Puffer 4
BstU1	10 U	60°C	Puffer 2
Msl1	5 U	37°C	Puffer 2
Mnl1	5 U	37°C	Puffer 2
Aci1	10 U	37°C	Puffer 3
Pst1	5 U	37°C	Puffer 2
Hinf1	3 U	37°C	Puffer 4

**Tabelle 2.7:** Reaktionsbedingungen der Restriktionsendonukleasen zur Bestätigung der gefundenen Polymorphismen

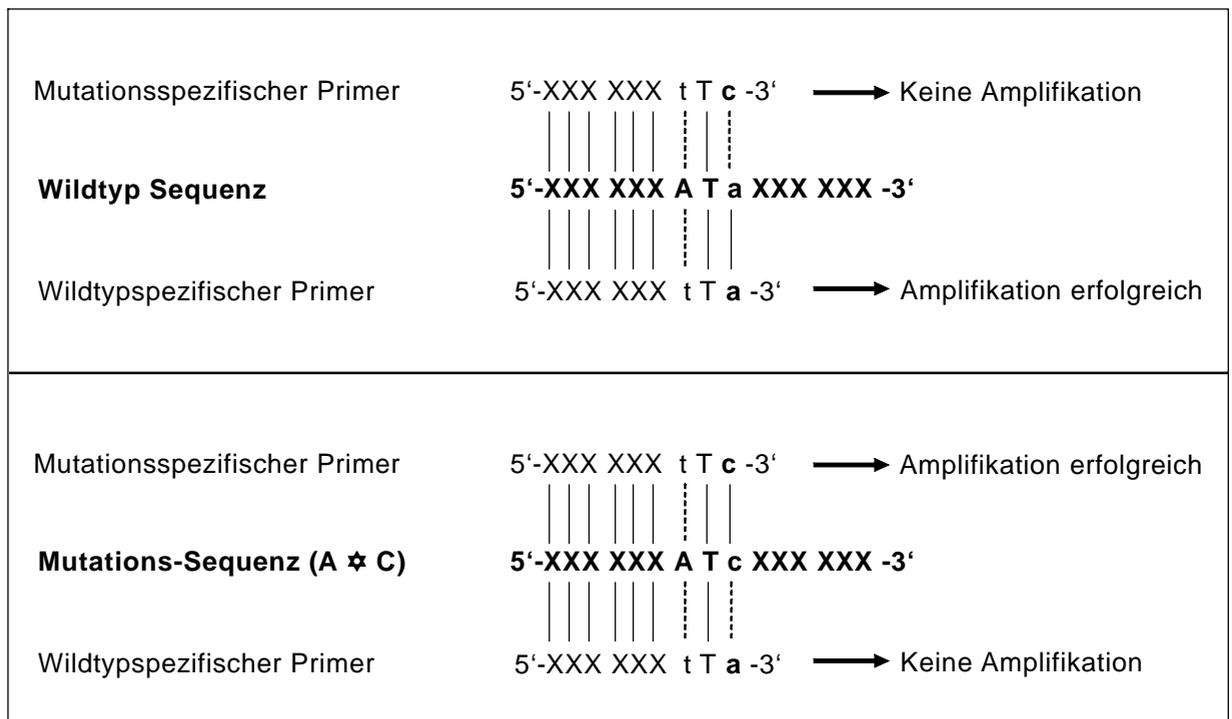
Nach erfolgter Inkubation für je 12 Stunden (bei 37°C im Brutschrank; bei 60°C im Thermocycler mit eingeschaltetem „Hotlid“) wurden die enzymatisch erzeugten Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese gemäß 2.5 visualisiert. Hierfür wurden auf ein 2,5%iges DNA-Agarose-Gel je 15 μl des Restriktionsansatz zusammen mit 3 μl Probenauftragspuffer (6x) vermischt und nach elektrophoretischer Trennung photographisch dokumentiert. Wiederum diente ein 100 bp Größenstandard zur Größenbestimmung der getrennten Fragmente.

## 2.10 Allelspezifische PCR

### 2.10.1 Theoretische Grundlagen

Verbleibende Mutationen, die nicht mit einem Restriktionsenzymverdau bestätigt werden konnten, wurden mit einer allelspezifischen PCR nachgewiesen. Das Prinzip der allelspezifischen Amplifikation beruht auf dafür speziell gestalteten Oligonukleotiden, deren Nukleotid am 3'-Ende jeweils der Position der nachzuweisenden Variante entspricht. Zur Differenzierung von Wildtyp und Variante macht man sich folgende Besonderheit zu nutze: Eine singuläre Basenabweichung der Oligonukleotidsequenz von

der Sequenz der Matrizen-DNA hat auf eine Amplifikation nur einen geringen negativen Einfluss. Kommt es jedoch zu zusätzlichen Basenfehlbindungen, so kann dies eine effiziente Primerhybridisierung und damit auch Amplifikation verhindern. Um diese Bedingungen zu erfüllen, müssen zwei gleichgerichtete Oligonukleotide die Base der Wildtypsequenz respektive die ausgetauschte Base der Variante an ihrem 3'-Ende enthalten. Zusätzlich wird jeweils die drittletzte Base komplementär verändert, wodurch je nach Vorliegen von Wildtypsequenz oder varianter Sequenz ein oder zwei „*mismatches*“ entstehen. Kommt es zur Abweichung nur einer Base ist eine Amplifikation möglich, während die PCR bei Vorliegen von zwei Fehlpaarungen im Idealfall kein Produkt ergibt.



**Abbildung 2.2:** Schematische Darstellung einer allelspezifischen PCR. Je nach spezifischer Primersequenz erfolgt bei Divergenz von zwei Nukleotiden keine Amplifikation. Dadurch kann eine variante Sequenz von der Wildtyp-Sequenz unterschieden werden.

Je nach Position der Variante innerhalb des Exons wurden hierfür entweder der upstream oder downstream-Primer verwendet, um durch eine ausreichende Kettenlänge des Amplifikats eine problemlose PCR und Analyse zu gewährleisten. Tabelle 2.8 verdeutlicht, wie eine eindeutige Differenzierung des Genotyps ermöglicht wird (Amplifikation erfolgreich: „+“; keine Amplifikation erfolgt: „-“).

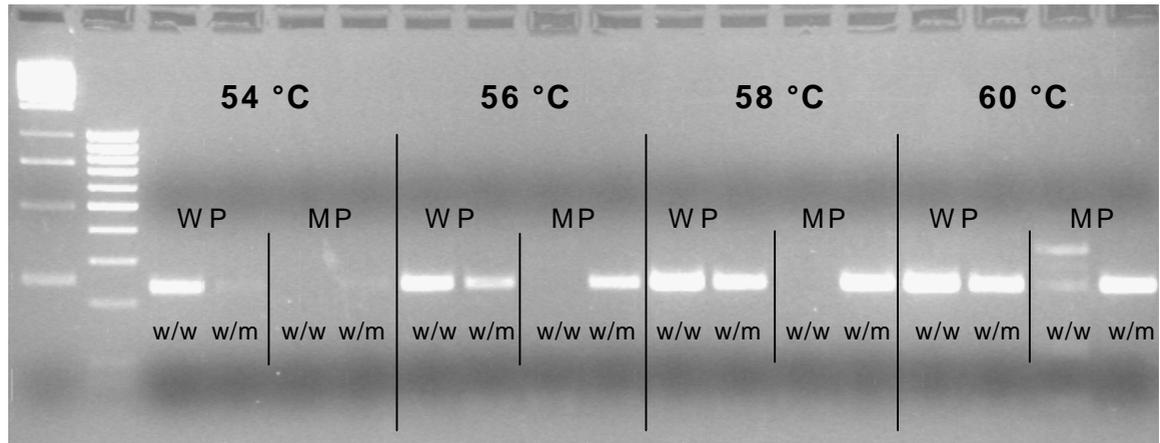
	Wildtyp-Primer	Variations-spezifischer Primer
Homozygot Wildtyp	+	–
Heterozygot	+	+
Homozygot Variant	–	+

**Tabelle 2.8:** Schematische Darstellung der Bestimmung eines Genotyps je nach Ergebnis der allelspezifischen PCR

### 2.10.2 Versuchsdurchführung

Die allelspezifische PCR wurde für die jeweiligen Exons gemäß 2.4 mit identischem Reaktionsansatz, Zyklusbedingungen und „annealing“-Temperaturen (Tabellen 2.2 und 2.3) durchgeführt. Die Ergebnisse der PCR wurden, wie in 2.5 beschrieben, auf einem 2,5%igen Agarose-Gel beurteilt und zur Differenzierung ein 100 bp Größenstandard verwendet. Für jede zu bestätigende Mutation waren zur Differenzierung des Genotyps je zwei parallele PCR-Reaktionen mit den allelspezifischen Primern notwendig. Als jeweils dazu gegenläufige Primer dienten die bereits in 2.4 zur Anwendung gekommenen Oligonukleotide (Tabelle 2.1). Die allelspezifischen Oligonukleotide sind im Ergebnisteil unter 3.34 (Tabelle 3.3) aufgeführt.

Die optimalen „annealing“-Temperaturen wurden für jeden Polymorphismus empirisch durch eine Temperaturgradienten-PCR ermittelt und sind ebenfalls in Tabelle 3.3 aufgeführt. Abbildung 2.3 zeigt exemplarisch die Ergebnisse einer Temperaturgradienten-PCR für je eine homozygote Wildtyp-DNA (w/w) und einen heterozygote DNA (w/m), die jeweils mit Wildtyp-spezifischen (WP) und Mutations-spezifischen Primern (MP) amplifiziert wurden.



**Abbildung 2.3:** Exemplarische Darstellung einer Temperaturgradienten-PCR mit optimaler „annealing“-Temperatur bei 58°C. Sowohl Wildtyp-DNA (w/w) als auch heterozygote DNA (w/m) werden mit Wildtyp-spezifischem Primer (WP) erfolgreich amplifiziert, während keine Amplifikation des Wildtyps (w/w) mit dem Mutations-spezifischen Primer (MP) erfolgt.

### 2.11 Haplotypenanalyse

Jeweils ein einzelner Strang des diploiden Chromosomensatzes wird in ein Protein übersetzt. Somit ist ein Genotyp, der allein durch SNPs charakterisiert wird, zur Vorhersage des Phänotyps u.U. nur bedingt aussagekräftig, da die SNPs bei Heterozygotie nicht eindeutig den einzelnen Allelen der homologen Chromosomen zuzuordnen sind. Deswegen ist es sinnvoll, die Haplotypen eines Gens zu identifizieren. Es handelt sich dabei um eine allelspezifische Kombination mehrerer Polymorphismen, die in einem bestimmten DNA-Abschnitt entlang eines einzelnen Chromosoms gemeinsam auftreten und gekoppelt vererbt werden. Der Grad der Kopplung wird mit dem Begriff „*linkage disequilibrium*“ (LD; Kopplungsungleichgewicht) bezeichnet (Stephens et al. 2001; Botstein und Risch 2003; Olivier 2003). Nur bei Auftreten einer Rekombination der DNA-Stränge beider homologer Chromosomen kann die Kopplung aufgehoben werden und der Grad der Kopplung sinkt. Je größer die Distanz zweier Genorte und je älter der DNA-Abschnitt sind, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination (Salisbury et al. 2003).

Die Haplotypenanalyse wird in der Regel durch statistische Methoden durchgeführt, da eine Amplifikation eines gesamten Allels unter Einschluss der Introns aufgrund der Größe des Abschnitts auf der DNA häufig nicht möglich ist. Diese Situation lag auch bei der vorliegenden Untersuchung vor, da das *ABCC2*-Gen 45 kB umspannt und dementsprechend eine direkte Amplifikation eines vollständigen Allels nicht leicht möglich ist. In der vorliegenden Arbeit wurde das frei zugängliche Programm Arlequin (Schneider

et al. 2001; <http://lgb.unige.ch/arlequin/> ) verwendet. Das Programm errechnet die Wahrscheinlichkeit ausgehend von der Nullhypothese einer nicht-bestehenden Kopplung zweier Marker und reduziert die theoretisch möglichen Kombinationen auf die kleinste Zahl von Haplotypen, die die beobachteten Markerkombinationen erklären.

## 2.12 Reagenzienliste

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE):

324g Tris Base, 165g Borsäure und 120ml EDTA(0,5M; pH 8,0) ad 3l aqua bidest. gelöst (Endkonzentration 10x), zum Gebrauch meist 1:20 mit aqua bidest. verdünnt (Endkonzentration 0,5x)

10% Ammoniumperoxodisulfat (APS):

0,2g Ammoniumperoxodisulfat ad 2ml H<sub>2</sub>O

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (Endkonzentration 1x):

242g Tris-Base, 37,2 g Na<sub>2</sub>EDTA \*2H<sub>2</sub>O und 57,1 ml konzentrierte Essigsäure in 1L aqua bidest gelöst (pH 8,5; Konzentration 50x), zum Gebrauch 1:50 mit aqua bidest verdünnt

Ethidiumbromid-Stammlösung:

10 mg (1 Tablette) in 1ml aqua ad injectabilia gelöst; Gebrauchslösung: 1:10 mit *aqua ad injectabilia* verdünnt

Probenauftragspuffer für DNA Agarose-Gelelektrophorese:

50 mg Bromphenolblau, 25 mg Xylencyanol und 37,8 g Glycerin (30%) in 100 ml aqua bidest. gelöst und steril filtriert (Endkonzentration 6x).

Stammlösungen für die Silbernitratfärbung:

Färben:

2% Silbernitrat Lösung:

2 g AgNO<sub>3</sub> ad 100 ml *aqua ad injectabilia*

Entwickeln:

10%ige Natriumcarbonat Lösung:

50 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ad 500 ml *aqua ad injectabilia*

3%ige Natriumthiosulfat Lösung:

7,5 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ad 250 ml *aqua ad injectabilia*

Stopp-Lösung:

20 g Glycin und 5 g Na<sub>2</sub>EDTA ad 1 l *aqua ad injectabilia*

SSCP-Denaturierungs- und Probenauftragspuffer:

9,5 ml Formamid (95%) und 100 µl NaOH (10 mM) zur Denaturierung, 2,5 mg Bromphenolblau (0,025%) und 2,5 mg Xylencyanol (0,025%) zur Farbmarkierung ad 10 ml mit *aqua ad injectabilia*.

### **2.13 Hilfsmittel und Geräte**

Elektrophoresekammern/ -blotkammern

(Mini Trans-Blot Cell)

Bio-Rad, München

Elektrophorese-Kammern und Zubehör:

Elektrophorese-Spannungsgeräte (Power Pac 300)

Bio-Rad, München

Gel Doc 2000 Gel Documentation System

Bio-Rad Laboratories GmbH,  
München

Kolbenhubpipetten

Eppendorf, Hamburg

MicroAmp optical tubes und caps

Applied Biosystems, Weiterstadt

DNA Thermal Cycler

Perkin Elmer

Photometer (Smart Spec 3000)

Bio-Rad, München

Pipetten

Sarstedt, Nümbrecht

Pipettierhilfen (Easypet)

Eppendorf, Hamburg

Quarzglasküvetten

Hellma, Mühlheim

Reaktionsgefäße

Sarstedt, Nümbrecht

Rollmischer (Assistent RM 5)

Glaswarenfabrik Karl Hecht KG  
"Assistent", Sondheim/Rhön

Thermoblöcke (Thermomixer compact)

Eppendorf, Hamburg

USF Reinstwassersystem

USF Deutschland, Ransbach-  
Baumbach

Vortexer (Vortex-Genie 2)

Scientific Industries, Bohemia,  
USA

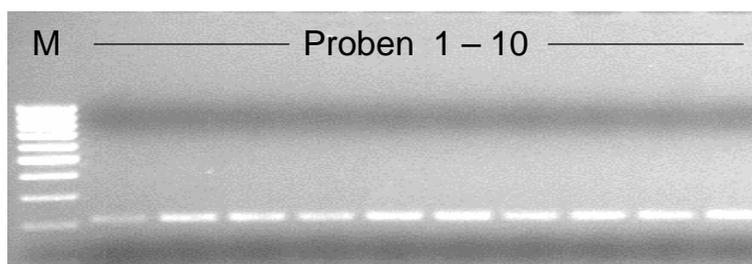
Zentrifugenröhrchen

Sarstedt, Nümbrecht

### 3 Ergebnisse

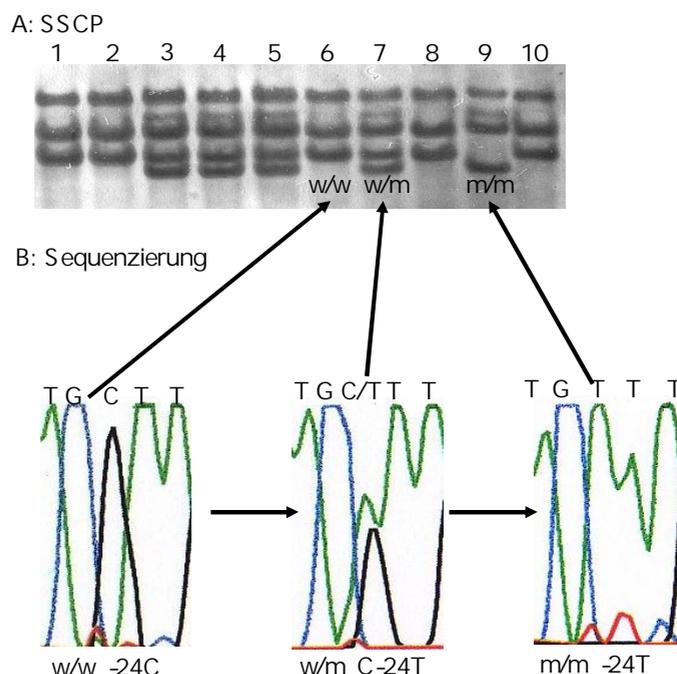
#### 3.1 Exon 1

Die Amplifizierung des Exon 1 wurde mit den unter 2.4 genannten Oligonukleotiden und standardisierten PCR-Bedingungen bei einer optimalen „*annealing*“-Temperatur von 52°C durchgeführt. In der nachfolgend gezeigten Abbildung 3.1 der Agarose-Gelelektrophorese bestätigt der aufgetragene 100 bp Größenstandard (M) die Länge des PCR-Produktes von 210 Basenpaaren und liefert keinen Hinweis auf das Vorliegen von Nebenprodukten.



**Abbildung 3.1:** Darstellung der PCR-Produkte des Exon 1 mit einer Größe von 210 bp, Amplifikation bei 52°C .

Bei Vergleich der unterschiedlichen Banden der SSCP-Analyse gemäß 2.6 zeigten sich zwei verschiedene Bandenmuster, die den Verdacht auf einen Polymorphismus nahe legten. Abbildung 3.2 A zeigt die zwei unterschiedlichen Bandenmuster, die einzeln oder in Kombination vorliegen. Die Kombination beider Bandenmuster spricht für einen heterozygoten Genotyp mit einem Wildtyp- und einem selteneren Allel, während ein einzeln vorkommendes Muster auf eine Homozygotie hindeutet. Das nur einmal vorkommende Bandenmuster in der vorletzten Spur (m/m) ist mit dem homozygoten Vorliegen des selteneren Allels vereinbar. Anhand der auffallenden Bandenstrukturen in der SSCP-Analytik wurden mehrere Proben exemplarisch sequenziert und gegen die Wildtyp-Sequenz abgeglichen. Durch Analyse der unterschiedlichen Peak-Muster der Sequenzen konnte das Vorliegen der Variante c.-24T, welche in der 5'-UTR lokalisiert ist, in jeweils heterozygotem und homozygotem Genotyp bestätigt werden (Abbildung 3.2 B). Dabei konnte das seltener vorkommende Bandenmuster der gefundenen Variante zugeordnet werden.



**Abbildung 3.2 A:** SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exon 1 mit zwei unterschiedlichen Bandenmustern, die sich bei Vorliegen einer Homozygotie jeweils einzeln (homozygot Wildtyp *c.-24C* w/w bzw. homozygot *c.-24T* m/m auf Spur 9) zeigen. Die Kombination beider Bandenmuster entspricht dem Vorliegen eines heterozygoten Genotyps *c.-24C/-24T* (w/m). **B:** Exemplarische Darstellung der Sequenzen des SNPs *c.C-24T* des Exon 1. Die unterschiedlichen Allele konnten den Bandenmustern der SSCP-Analyse zugeordnet werden.

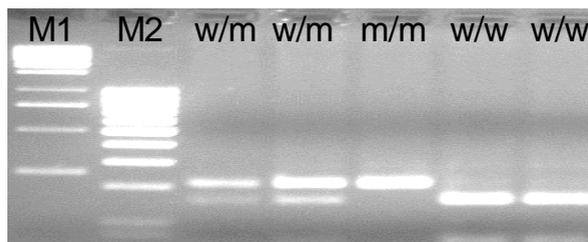
Innerhalb des Kollektivs der 59 Patienten ergaben sich folgende Genotyp-Häufigkeiten:

Homozygot <i>c.-24C/-24C</i>	38	64%
Heterozygot <i>c.-24C/-24T</i>	20	33%
Homozygot <i>c.-24T/-24T</i>	1	1%

Daraus errechnet sich eine Allelfrequenz der selteneren Variante *c.-24T* von 18,6%, im Vergleich zur Normalsequenz *c.-24C* von 81,4%.

Zur Bestätigung des Polymorphismus wurde eine Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse durchgeführt, die auch für spätere, groß angelegte Polymorphismus-Untersuchungen ein schnelles und zuverlässiges Screening auf das seltenere Allel *c.-24T* ermöglicht. Als geeignete Restriktionsendonuklease wurde das Enzym Bbs1 verwendet, welches bei 60°C sein Aktivitätsoptimum besitzt (schnittspezifische Details siehe Tabelle 3.1). Die enzymatisch erzeugten Fragmente

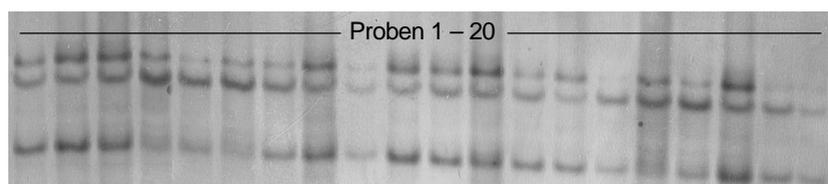
bestanden aufgrund einer Schnittstelle in der Wildtyp-Sequenz aus 60 bzw. 150 Basenpaaren, während bei dem Allel *c.-24T* das PCR-Produkt ungeschnitten (210 bp) erhalten bleibt. Abbildung 3.3 zeigt das Agarose-Gel eines solchen Enzymverdaus. Der Wildtyp (*w/w*) weist einen vollständigen Verdau auf, während die einzige Probe mit homozygotem Vorliegen des selteneren Allels *c.-24T* (*m/m*) ausschließlich das 210 bp Fragment zeigt.



**Abbildung 3.3:** Darstellung der PCR-Produkte des Exon 1 nach Verdau mit Restriktionsendonuklease Bbs1. Bei homozygotem Vorliegen des *c.-24T*-Allels (*m/m*) liegt bei fehlender Schnittstelle des Enzyms nur unverdautes PCR-Produkt vor (Größe: 210 bp), während bei Heterozygotie (*w/m*) je ein unverdautes Allel (210 bp) sowie die geschnittenen Fragmente (Größen: 60 und 150 bp) auf dem Agarose-Gel nachweisbar sind. Bei Homozygotie für das Wildtyp-Allel (*w/w*) werden die PCR-Produkte vollständig geschnitten.

### 3.2 Exon 2

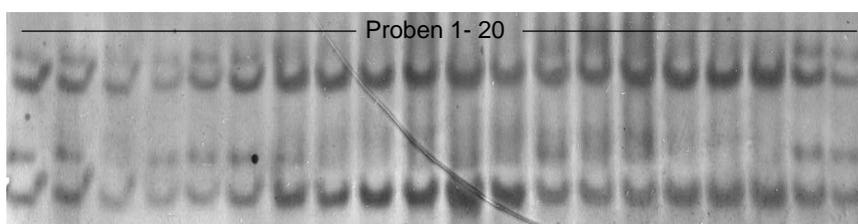
Die PCR wurde mit den in Tabelle 2.1 genannten Oligonukleotiden und einer optimalen „annealing“-Temperatur von 52°C durchgeführt. Die Amplifikation ergab das zu erwartende Produkt mit einer Größe von 256 bp. Dabei ist das gesamte Exon 2 im Amplifikat enthalten und wird in 5'-Richtung durch 39 Nukleotide des Introns 1 sowie in 3'-Richtung durch 43 Nukleotide des Introns 2 ergänzt. Die SSCP-Analyse zeigte keine aberranten Banden (Abbildung 3.4). Exemplarisch sequenzierte Produkte wurden mit der veröffentlichten Sequenz des MRP2 abgeglichen und bestätigten eine korrekte Amplifikation des Exons 2. Abweichungen von der publizierten Normalsequenz wurden nicht gefunden.



**Abbildung 3.4:** SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exons 2. Aberrante Banden wurden nicht beobachtet, so dass sich kein Anhalt für das Vorliegen von Polymorphismen ergab.

### 3.3 Exon 3

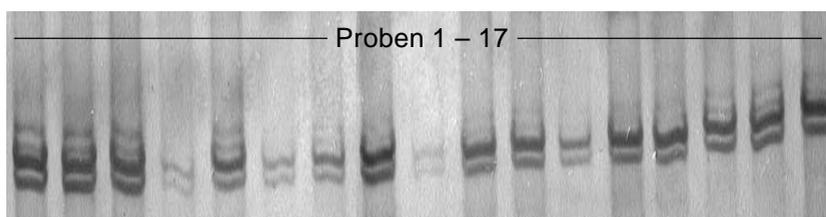
Die Länge des Amplifikats beträgt 189 bp. Während das Exon aus 126 Basenpaaren besteht, enthalten die 5'- und 3'- Enden jeweils 33 bzw. 30 Nukleotide der flankierenden Introns. Die Amplifikation erfolgte bei standardisierten Zyklerbedingungen und einer „annealing“-Temperatur von 52°C problemlos und bei der SSCP-Analyse zeigten sich keine abweichenden Banden (Abbildung 3.5). Zum Nachweis einer fehlerlosen Amplifikation des gesuchten Exons wurden einige zufällig ausgewählte Proben sequenziert, wobei der Vergleich mit der veröffentlichten Sequenz eine vollständige Kongruenz ergab.



**Abbildung 3.5:** SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exons 3

### 3.4 Exon 4

Die erfolgreich amplifizierte Produkte des Exons 4 schienen keine Unterschiede in der Konformation der Einzelstränge aufzuweisen, da die in der SSCP-Analytik dargestellten Bandenmuster keine Verschiedenartigkeit zeigten. Die Sequenz des 280 bp großen Produktes war mit den veröffentlichten Originalsequenzen übereinstimmend. Folgende exemplarisch gezeigte Bandenmuster der SSCP-Analyse in Abbildung 3.6 erweckten nicht den Verdacht eines Polymorphismus.

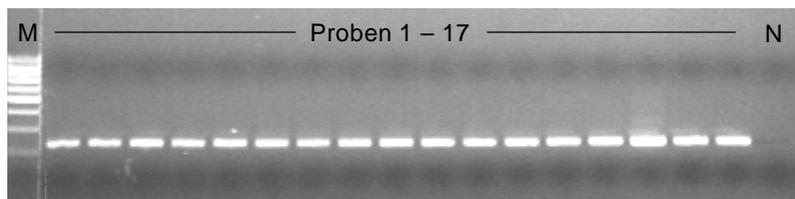


**Abbildung 3.6:** Homogenes Bandenmuster bei SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exons 4 ohne Hinweise auf unterschiedliche konformationsbedingte Mobilitätseigenschaften der Einzelstränge.

### 3.5 Exon 5

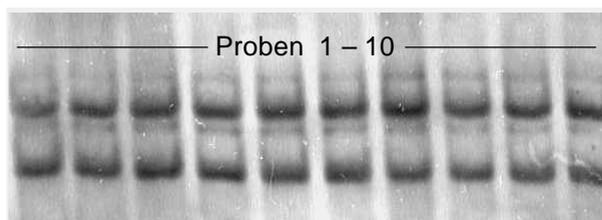
Das in Abbildung 3.7 abgebildete Agarose-Gel bestätigt eine erfolgreiche Amplifikation des Exons 5. Das Exon ist mit 108 Nukleotiden vollständig im Produkt enthalten und wurde zusammen mit 96 Nukleotiden in 5'-Richtung sowie 27 Nukleotiden in 3'-Richtung

amplifiziert.



**Abbildung 3.7:** Die Agarose-Gelelektrophorese zeigt das 231 bp große Amplifikat. Eine Negativ-Kontrolle (N) ohne eingesetzte DNA auf der letzten Spur ergibt keine positive Amplifikation, wodurch Verunreinigungen ausgeschlossen werden konnten.

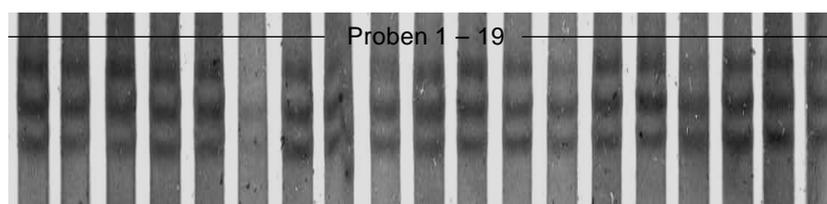
In der SSCP-Analyse zeigten sich keine Unterschiede des Bandenmusters (Abbildung 3.8). Somit ergaben sich bei identischen Mobilitätseigenschaften für Exon 5 keine Hinweise auf das Vorliegen divergenter Einzelstrang-Konformationen, denen ein Polymorphismus zugrunde liegen könnte. Exemplarische Sequenzierungen bestätigten eine korrekte Amplifikation und ergaben keine Divergenz zur Referenzsequenz.



**Abbildung 3.8:** Homogene Darstellung der Banden in der SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exon 5 ohne Hinweise auf unterschiedliche Einzelstrang-Konformationen.

### 3.6 Exon 6

Das 148 bp große Amplifikat schließt die 56 bp des Exons 6 vollständig ein und enthält weiterhin 58 bp des Introns 5 sowie 32 bp des Introns 6. Das erwartete Amplifikat wurde in einer Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen. In den Bandenmustern der durchgeführten SSCP-Analyse zeigten sich keinerlei Auffälligkeiten. Auch eine Sequenzierung des Amplifikats ergab keine Abweichungen von der veröffentlichten Originalsequenz.



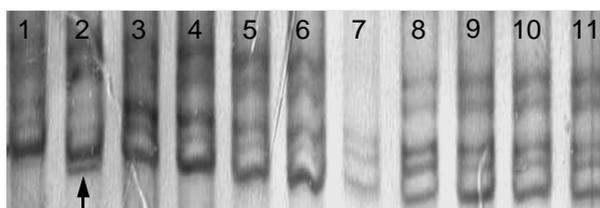
**Abbildung 3.9:** SSCP-Analyse der Amplifikate des Exons 6 ohne Hinweis auf aberrante Bandenmuster.

### 3.7 Exon 7

Nach erfolgreich durchgeführter Amplifikation wurden die 298 bp großen Produkte mit SSCP-Analyse auf eventuelle Konformationsunterschiede untersucht. Bei der Elektrophorese zeigten wenige Bandenstrukturen verdächtige Abweichungen (siehe Abbildung 3.10), die auf einen Basenaustausch hindeuteten, allerdings nicht eindeutig reproduziert werden konnten. Durch den Abgleich der Sequenzen suspekter Proben mit der Wildtyp-Sequenz wurde ein Basenaustausch ausgeschlossen.

Struktur des Amplifikats:

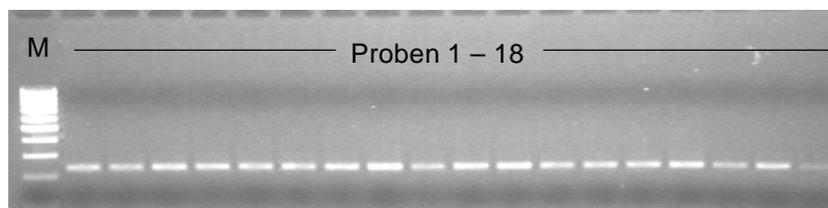
5'-Intron 6 -----	Exon 7 -----	Intron 7-3'
33 bp	235 bp	30 bp



**Abbildung 3.10:** Im Bandenmuster der SSCP-Analyse zeigt sich in der zweiten Spur eine zusätzliche untere Bande. In den sonstigen Proben ist diese Bande allenfalls angedeutet zu erahnen. Jedoch ließ sich in der Sequenzierung keine Abweichung der Basenabfolge nachweisen.

### 3.8 Exon 8

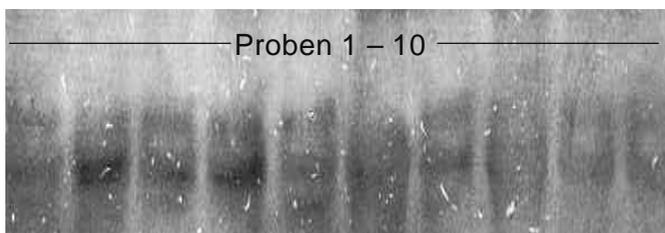
Das amplifizierte Produkt umfasst 235 Basenpaare, was mit folgend gezeigter Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung 3.11) bestätigt wurde. Die Exon-Intron-Grenzen sind in dem Amplifikat enthalten, wobei sich flankierend je 28 bp des Introns 7 sowie 43 bp des Introns 8 an das Exon anschließen.



**Abbildung 3.11:** Darstellung der Amplifikate des Exons 8 mit einer Basenpaarlänge von 235 bp.

Die anschließende SSCP-Analyse zeigte keine eindeutig divergenten Bandenmuster in der Polyacrylamid-Gel Elektrophorese. Wenige Proben ließen sich bei wiederholt

schlechter Abbildungsqualität nicht eindeutig zuordnen und wurden zum Ausschluss von Mutationen sequenziert.



**Abbildung 3.12:** SSCP-Analyse der PCR-Produkte mit schlechter Abbildungsqualität trotz zahlreicher Optimierungsschritte. Die Proben mit fraglich aberrantem Bandenmuster wurden sequenziert, wobei sich allerdings kein Nachweis von Punktmutationen ergab.

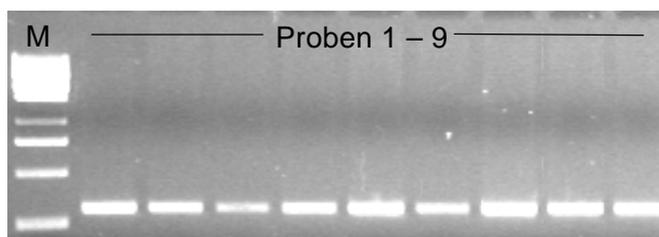
Die Sequenzen auffälliger Proben sowie einiger zufällig ausgewählter Proben mit normalem Bandenmuster ergaben keine Abweichungen im Vergleich zur Originalsequenz, womit Polymorphismen des Exon 8 nicht nachgewiesen werden konnte.

### 3.9 Exon 9

Die 265 bp großen Amplifikate zeigten bei der elektrophoretischen Trennung der SSCP-Analyse keine divergierenden Bandenmuster und lieferten keinen Hinweis auf das Vorliegen eines Polymorphismus im Exon 9. In anschließender Sequenzierung wurde eine korrekte Amplifikation bestätigt und eine vollständige Übereinstimmung des Amplifikats mit der Originalsequenz bewiesen.

### 3.10 Exon 10

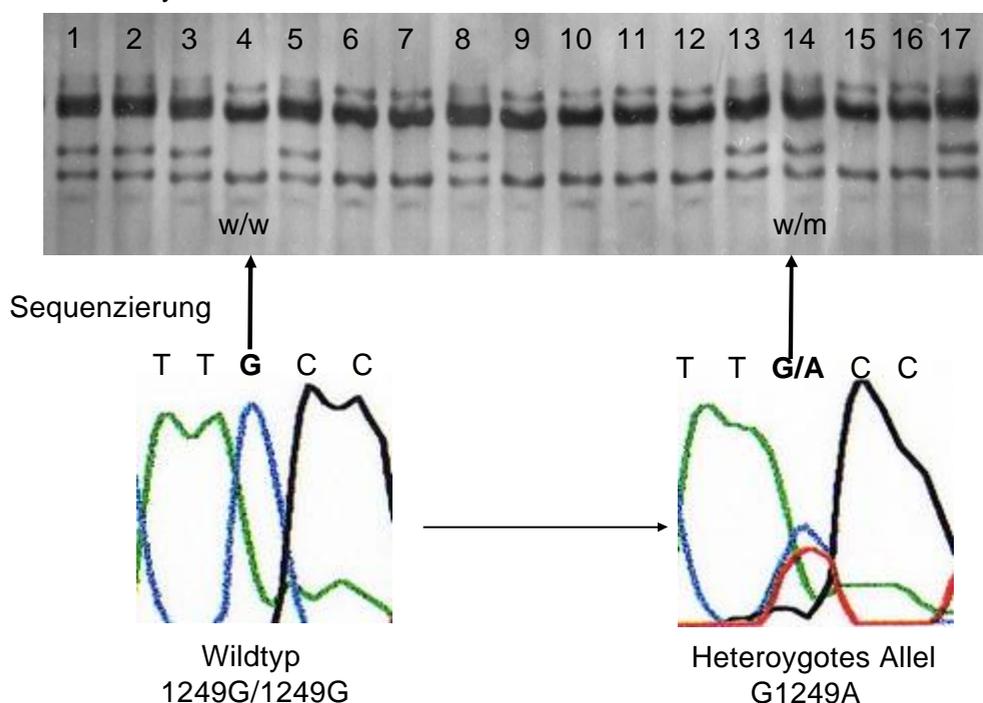
Die Amplifikation des Exons 10 wurde mit den unter 2.4 genannten Primern und der optimalen „annealing“-Temperatur von 52°C durchgeführt. In Abbildung 3.13 der Agarose-Gelelektrophorese lässt sich anhand des Größenstandard die Länge des PCR-Produktes von 310 Basenpaaren bestätigen. Das Exon ist mit seinen 255 bp vollständig im Amplifikat enthalten, während es von je 28 bp bzw. 27 bp Intronsequenzen jeweils 5'- bzw. 3'-flankierend begleitet wird.



**Abbildung 3.13:** Nachweis der PCR-Produkte des Exons 10 mit einer Basenpaarlänge von 310 bp.

Bei der SSCP-Analyse der Amplifikate zeigten sich zwei eindeutig divergierende Bandenmuster, welche sich auf zwei unterschiedliche Allele zurückführen ließen (Abbildung 3.14 A). Durch Sequenzierung der Proben mit aberrantem Bandenmuster ließ sich dem seltener vorkommenden Bandenmuster der Basenaustausch *c.G1249A* zuordnen, der jeweils als homozygoter Wildtyp (w/w) oder heterozygoter Genotyp (w/m) vorlag (Abbildung 3.14 B). Ein homozygoter Vorliegen der selteneren Allelvariante konnte in dem Probandenkollektiv nicht nachgewiesen werden. Der gefundene Basenaustausch *c.G1249A* liegt innerhalb des kodierenden Bereiches von Exon 10 und ist mit einem Aminosäureaustausch assoziiert. An Position 417 kommt es zu einem Austausch von Valin nach Isoleucin (Val417Ile).

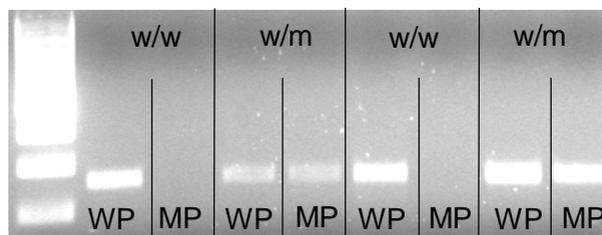
### SSCP-Analyse



**Abbildung 3.14:** SSCP-Analyse und Sequenzierung der PCR-Produkte des Exons 10. Die SSCP-Analyse zeigt unterschiedliche Bandenmuster des Exons 10, die auf einen Polymorphismus hindeuten. Die beiden vorkommenden Bandenstrukturen liegen dabei gehäuft in Kombination vor, was auf einen heterozygoten Genotyp (w/m) mit je einem Wildtyp-Allel und einem selteneren Allel zurückzuführen ist. Hingegen deutet ein einzeln auftretendes Bandenmuster auf w/w-Homozygotie hin. Die Sequenzierung der Proben mit aberrantem Bandenmuster zeigte einen Basenaustausch *c.G1249A*.

Zur Bestätigung der gefundenen Mutation und zu ihrer eindeutigen Zuordnung zur jeweiligen Bandenstruktur der SSCP-Analyse kam eine allelspezifische PCR zur Anwendung, da sich kein geeignetes Restriktionsenzym finden ließ. Dieses Verfahren sollte für die nachfolgende funktionelle Studie ein Screening auf das gefundene seltene

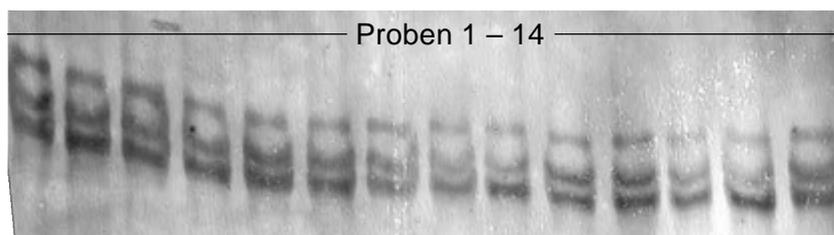
Allele von pädiatrischen Patienten mit MTX-Hochdosistherapie erlauben. Die allelspezifischen Forward-Primer sind in Tabelle 3.3 aufgeführt, wobei die Reaktionsbedingungen mit einer optimalen „annealing“-Temperatur von 59°C bereits unter 2.10 genannt wurden. Das Amplifikat umfasst 261 Basenpaare.



**Abbildung 3.15:** Zwei nebeneinander liegende Banden (261 bp) entsprechen einer Probe des Probandenkollektives, wobei die PCR jeweils mit Wildtyp-spezifischem (WP) sowie Mutations-spezifischem (MP) Primer durchgeführt wurde. Bei einem heterozygoten Genotyp (w/m) kommt es mit beiden eingesetzten Primern zu einer Amplifikation. Hingegen führt das homozygote Vorliegen der Wildtyp-Sequenz (w/w) ausschließlich mit dem Wildtyp-spezifischen Primer zu einer Amplifikation.

### 3.11 Exon 11

Das 198 Basenpaar umfassende Amplifikat beinhaltet am 5'-Ende 96 Nukleotide des Introns 10 sowie am 3'-Ende 36 Nukleotide des Introns 11. Der kodierende Bereich des Exons 11 ist mit seinen 66 bp vollständig in dem Amplifikat enthalten. Bei der elektrophoretischen Trennung des Produktes zeigten sich keine Divergenzen der Bandenmuster. Abbildung 3.16 zeigt exemplarisch ein mit Silber gefärbtes Polyacrylamid-Gel, welches ausschließlich identische Bandenmuster aufweist.

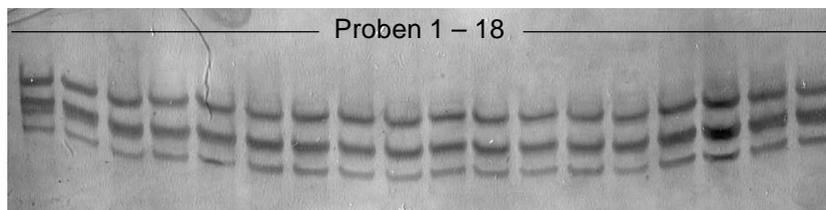


**Abbildung 3.16:** Darstellung ausschließlich identischer Bandenmuster der SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exon 11

### 3.12 Exon 12

Nach erfolgreicher Amplifikation konnte in der SSCP-Analyse kein unterschiedliches Bandenmuster erkannt werden. Die 271 Basenpaare des Amplifikats schließen die Intron-Exon Grenzen ein, wobei die angrenzenden Abschnitte der flankierenden Introns jeweils 38 respektive 95 Basenpaare umfassen. Das Polyacrylamid-Gel der Abbildung 3.17 zeigt ausschließlich gleichmäßige Bandenmuster und liefert keinen Hinweis auf das Vorliegen

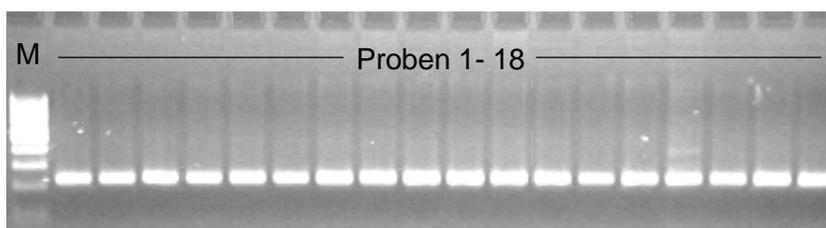
eines Polymorphismus. Die Sequenzierung exemplarischer Proben ergab eine vollständige Übereinstimmung der Basenabfolge mit der Referenzsequenz.



**Abbildung 3.17:** SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exons 12 ohne Hinweise auf ein unterschiedliches Mobilitätsverhalten der Einzelstränge

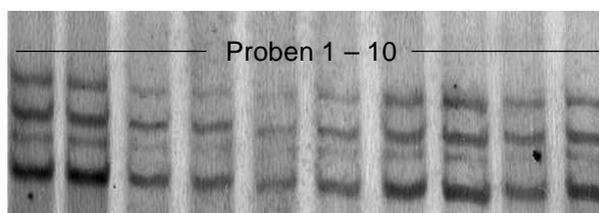
### 3.13 Exon 13

Das in Abbildung 3.18 gezeigte Agarose-Gel zeigte die erwarteten 222 bp großen PCR-Produkte. Das Exon ist mit 147 Nukleotiden vollständig im Produkt enthalten und wurde zusammen mit den flankierenden Intronsequenzen (54 Nukleotide in 5'-Richtung; 21 Nukleotide in 3'-Richtung) amplifiziert.



**Abbildung 3.18:** Darstellung des Amplifikates des Exon 13 mit einer Basenpaarlänge von 222 bp

Die Abbildung 3.19 des mit Silber gefärbten, 6%igen Polyacrylamid-Gels zeigt keine Unterschiede in den Bandenstrukturen. Durch Abgleichen der Sequenzen mehrerer exemplarischer Proben mit der veröffentlichten Originalsequenz konnte eine korrekte Amplifikation des Exons bestätigt werden.



**Abbildung 3.19:** Fehlende Konformitätsunterschiede der PCR-Produkte des Exons 13 bei identischer Bandenstruktur in einer SSCP-Analyse

### 3.14 Exon 14

Mit den unter 2.4 genannten Oligonukleotiden wurde die PCR für das Exon 14

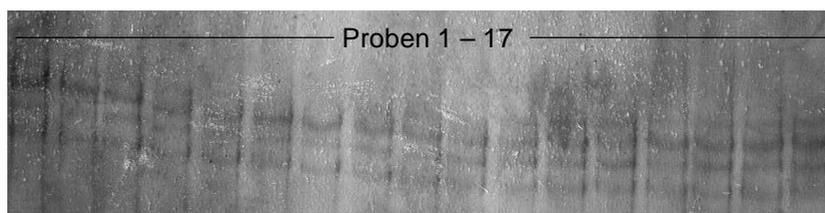
durchgeführt. Anschließend wurden die 144 bp großen Amplifikate unter nicht denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch getrennt. Eine in Abbildung 3.20 dargestellte SSCP-Analyse zeigt keine divergierenden Bandenmuster und liefert keinen Hinweis auf das Vorliegen eines Polymorphismus im Exon 14. In anschließender Sequenzierung wurde eine korrekte Amplifikation bestätigt und eine Übereinstimmung des Amplifikats mit der Originalsequenz nachgewiesen. Das Amplifikat beinhaltet: 30 bp des Introns 13, 85 bp des Exons 14 und 28 bp des Introns 14.



**Abbildung 3.20:** Regelmäßige Bandenstruktur einer exemplarischen SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exon 14 ohne Hinweise auf das Vorliegen eines Polymorphismus

### 3.15 Exon 15

Die Polymorphismus-Untersuchung des Exon 15 wurde in Standardtechnik durchgeführt. Das Wanderungsverhalten der amplifizierten Proben in einer Polyacrylamid-Gelmatrix war einheitlich, so dass sich kein Hinweis auf das Vorliegen von Polymorphismen ergab. Auch die anschließende Sequenzierung bestätigte die Übereinstimmung des Amplifikates mit der Originalsequenz. Das Produkt, welches die 67 Basenpaare des kodierenden Bereiches des Exon 15 vollständig beinhaltet, hat insgesamt eine Größe von 153 Basenpaaren.



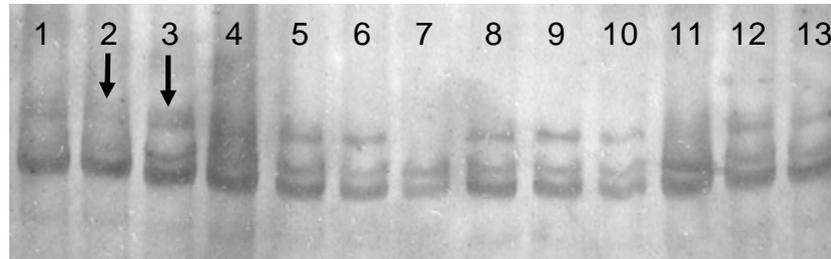
**Abbildung 3.21:** Silber-gefärbtes SSCP-Gel als Beispiel der einheitlichen Bandenstrukturen des PCR-Produktes des Exon 15

### 3.16 Exon 16

Das Amplifikat der PCR umfasst 184 Basenpaare und setzt sich aus 29 bp des Introns 15, 127 bp des Exons 16 und 28 bp des Introns 16 zusammen.

Die SSCP-Analyse ließ neben dem eigentlichen Bandenmuster eine weitere Struktur erahnen, die allerdings nicht stabil reproduzierbar war und sich nicht eindeutig einzelnen Proben zuordnen ließ. Es handelt sich dabei um eine in Abbildung 3.22 zu sehende

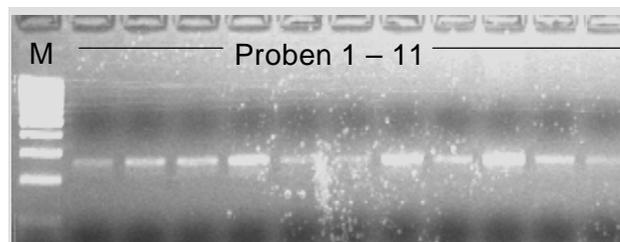
zusätzliche obere Bande (↓), die sich zumeist nur auf den äußeren Spuren zeigte. Eine entsprechend getroffene Auswahl mehrerer Proben wurde sequenziert und mit der Originalsequenz abgeglichen. Jedoch ließ sich kein Basenaustausch in den verdächtigen Proben eruieren und alle Amplifikate stimmten mit der Originalsequenz überein.



**Abbildung 3.22:** Eine angedeutete zusätzliche obere Bande (↓) in der SSCP-Analyse des Exon 16 ließ sich nicht auf einen mutationsbedingten Konformationsunterschied der Einzelstränge zurückführen. Bei der Sequenzierung ergaben sich keine Unterschiede der Proben mit aberranten Bandenmuster im Vergleich zur Originalsequenz.

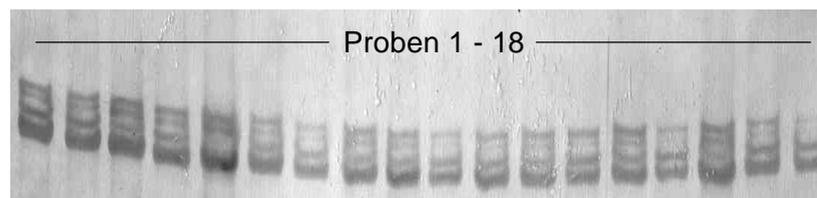
### 3.17 Exon 17

Das Exon 17 ist mit 177 Nukleotiden vollständig im Amplifikat enthalten und wurde zusammen mit 55 Nukleotiden des Introns 16 sowie 28 Nukleotiden des Introns 17 amplifiziert.



**Abbildung 3.23:** Gelelektrophorese des Exons 17 PCR-Produktes (260 bp).

In Abbildung 3.24 des mit Silber gefärbten, 6%igen Polyacrylamid-Gels sieht man sehr gleichmäßige und scharfe Banden, die ausnahmslos ein gleichförmiges Wanderungsverhalten besaßen. Somit ergibt sich aufgrund fehlender Unterschiede in der Konformation der Einzelstränge kein Hinweis auf das Vorliegen eines Polymorphismus.



**Abbildung 3.24** SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exon 17 ohne Hinweis auf das Vorliegen von Polymorphismen

Bei mehreren zufällig ausgewählten Sequenzen wurde eine korrekte Amplifikation bestätigt und es zeigten sich keine Abweichungen von der Referenzsequenz.

### 3.18 Exon 18

Das Amplifikat beinhaltet den kodierenden Bereich mit 168 Basenpaaren und wird am 5'-Ende von 36 Nukleotiden sowie am 3'-Ende von 44 Nukleotiden flankiert. Die Agarose-Gelelektrophorese bestätigte die korrekte Amplifikation, ehe die Produkte auf Konformationsunterschiede untersucht wurden. In der SSCP ergab sich bei gleichförmigen Bandenstrukturen aller Proben kein Hinweis auf das Vorliegen eines Polymorphismus, was in Abbildung 3.25 exemplarisch dargestellt ist. Die Sequenzierung ergab keine Abweichungen von der Originalsequenz und bestätigte eine korrekte Amplifikation.

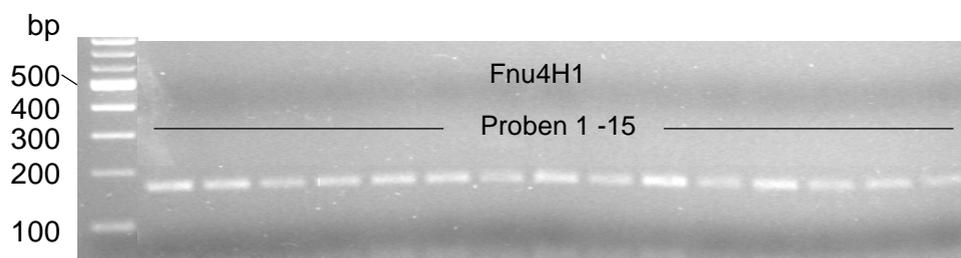


**Abbildung 3.25** Gleichförmige Bandenstrukturen der SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exons 18 ohne Hinweis auf durch Polymorphismen bedingte Konformationsunterschiede

In einer Studie von Ito et al. (2001), die eine Polymorphismus Untersuchung innerhalb eines japanischen Patientenkollektives durchführte, wurden für das Exon 18 jeweils der Basenaustausch *c.C2302T* (Arg768Trp) und *c.C2366T* (Ser789Phe) beschrieben. Sie waren in 48 untersuchten Proben je einmal gefunden worden und wiesen somit eine Allelfrequenz von ca. 1% auf (Ito et al. 2001). Zum definitiven Ausschluss des Vorliegens dieser Mutationen in unserem Probandenkollektiv wurde eine Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP) durchgeführt. Die geeigneten Restriktionsendonukleasen sind in Tabelle 3.2 samt ihrer schnittspezifischen Eigenschaften aufgeführt.

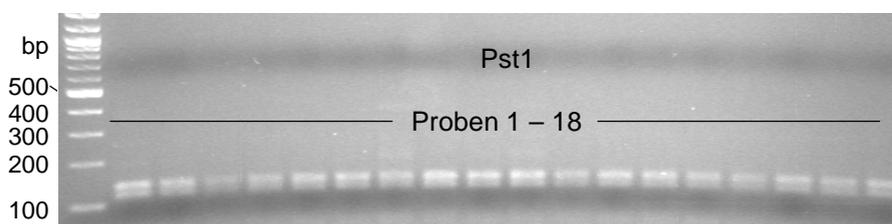
Der Ausschluss des Basenaustausches *c.C2302T* wurde mit der Restriktionsendonuklease Fnu4H1 erbracht, welche bei Vorliegen des selteneren Allels *c.2302T* keine Schnittstelle besitzt. Sämtliche Proben unseres Probandenkollektives wurden durch Fnu4H1 vollständig verdaut. Somit konnte das Vorliegen des selteneren Allels *c.2302T* innerhalb unseres Patientenkollektives ausgeschlossen werden. Abbildung

3.26 zeigt die vollständig geschnittenen Fragmente mit einer Länge von je 184 und 65 bp. Die 64 bp Banden kommen nur angedeutet zur Darstellung.



**Abbildung 3.26:** Vollständiger Enzymverdaug der PCR-Produkte des Exon 18 durch die Restriktionsendonuklease Fnu4H1. Die resultierenden Fragmente sind 184 und 65 bp groß. Die 64 bp Banden kommen nur angedeutet zur Darstellung. Bei Vorliegen der *c.2302T*-Variante verbliebe das PCR-Produkt (248 bp) ungeschnitten.

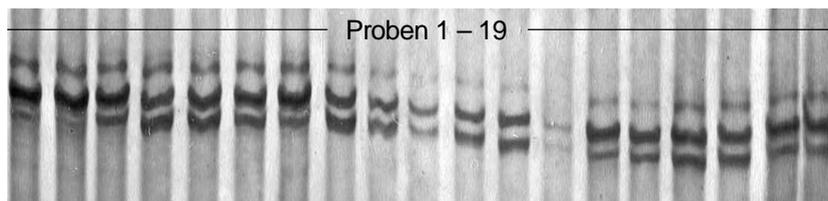
Das Enzym Pst1 wurde zum Ausschluss der Allelvariante *c.2366T* verwendet. Das Enzym besitzt eine Schnittstelle ausschließlich in der Wildtyp-Sequenz *c.2366C* und erzeugt zwei Restriktionsfragmente mit einer Größe von 113 bzw. 136 bp. Hingegen würde bei Vorliegen des Allels *c.2366T* aufgrund der fehlenden Schnittstelle das ungeschnittene PCR-Produkt (249 bp) vorliegen.



**Abbildung 3.27** PCR-RFLP zum Nachweis des *c.C2366T* Polymorphismus. Die Analyse zeigte nach Pst1-Verdaug ausschließlich Proben, bei denen Fragmente mit einer Basenpaarlänge von 113 bzw. 135 bp vorlagen. Da alle eingesetzten Produkte vollständig geschnitten wurden, konnte das Vorliegen von *c.2366T*-Allelen ausgeschlossen.

### 3.19 Exon 19

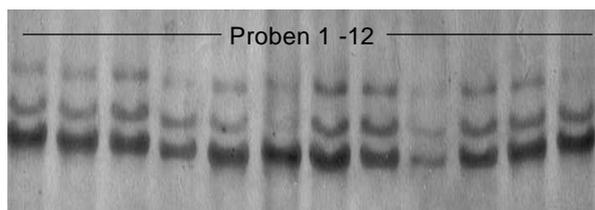
Nach erfolgreicher Amplifikation von Exon 19 konnte in der SSCP-Analyse kein unterschiedliches Bandenmuster erkannt werden. Die 263 Basenpaare des Amplifikats schließen die Exon-Intron-Grenzen mit ein, wobei die flankierenden Abschnitte der Introns 18 bzw. 19 jeweils 55 respektive 28 Basenpaare umfassen. Das Polyacrylamid-Gel der Abbildung 3.28 zeigt ausschließlich gleichmäßige Banden und liefert keinen Hinweis auf das eventuelle Vorliegen eines Polymorphismus. Bei mehreren zufällig ausgewählten Proben wiesen die Sequenzen keine Abweichungen von der Referenzsequenz auf.



**Abbildung 3.28:** Gleichmäßiges Bandenmuster bei der SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exons 19 ohne Hinweise auf Mutationen.

### 3.20 Exon 20

Die denaturierten Einzelstränge der amplifizierten Proben des Exon 20 zeigten in der Polyacrylamid-Gelmatrix ein einheitliches Wanderungsverhalten mit gleichförmigem Bandenmuster, das nicht auf das Vorliegen von Polymorphismen hindeutete. Exemplarisch sequenzierte Proben bestätigten eine fehlerlose Amplifikation des PCR-Produktes. Das Amplifikat, welches die 127 Basenpaare des kodierenden Bereiches vollständig beinhaltet, hat insgesamt eine Größe von 217 Basenpaaren.

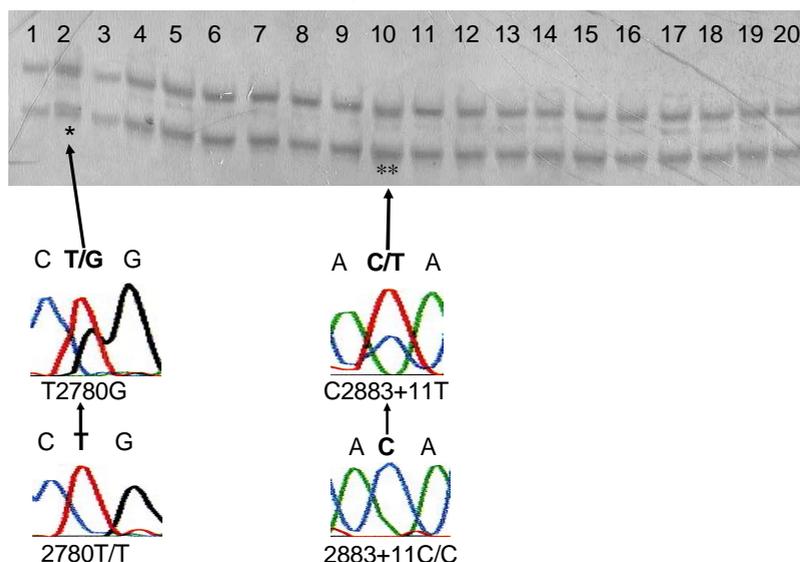


**Abbildung 3.29** zeigt exemplarisch ein mit Silber gefärbtes SSCP-Gel der Exon 20 PCR-Produkte, bei dem sich keine divergierenden Bandenmuster nachweisen ließen.

### 3.21 Exon 21

Unter standardisierten PCR-Bedingungen verlief die Amplifikation des 236 bp großen Produktes problemlos. Die Größe des kodierenden Abschnittes beträgt 135 bp und befindet sich innerhalb des Amplifikats. Die Untersuchung auf Konformationsunterschiede zeigte zwei von der Normstruktur abweichende zusätzliche Bandenmuster. In der SSCP-Analyse der Abbildung 3.30 weist die Probe (\*) auf Spur 2 eine zusätzliche Bande oberhalb der normalen unteren Bande auf. Hingegen befindet sich eine zusätzliche aberrante Bande in Probe (\*\*) auf Spur 10 unterhalb der Normalstruktur. Das Vorliegen dieser zwei divergenten Bandenmuster, die jeweils zusammen mit der normalen Bandenstruktur vorkommen, ließ das Vorliegen von zwei unterschiedlichen heterozygoten Genotypen vermuten, die je ein Wildtyp-Allel und ein selteneres Allel enthalten.

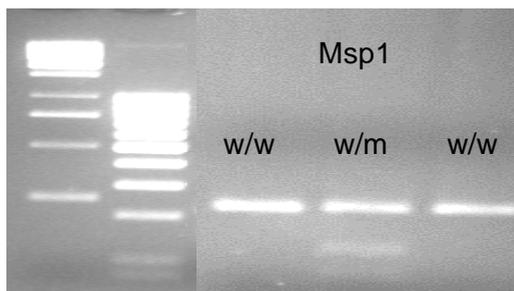
## SSCP-Analyse und Sequenzierung



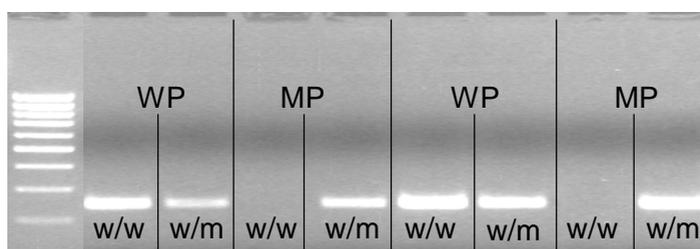
**Abbildung 3.30:** Die SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exon 21 weist auf Spur 2 (\*) sowie auf Spur 10 (\*\*) zwei jeweils verschiedene zusätzliche Bandenmuster auf, die zusammen mit dem normalen Bandenmuster auftreten. Dies lässt auf zwei unterschiedliche Allelvarianten schließen, die jeweils zu einem Konformationsunterschied der Einzelstränge führen. Durch die dargestellte Sequenzierung konnten die heterozygoten Genotypen *c.2780T/c.2780G* sowie *c.2883+11C/c.2883+11T* als Ursache für das unterschiedliche Laufverhalten der Einzelstränge eruiert werden.

Der Basenaustausch *c. T2780G* führt zu einem Aminosäureaustausch Leucin nach Arginin, Leu927Arg. Der Basenaustausch C nach T an Position *c.2883+11* befindet sich innerhalb des Introns 22 und geht nicht mit einem Aminosäureaustausch einher. Da innerhalb unseres Probandenkollektives beide Punktmutationen jeweils nur einmal in heterozygoter Form auftraten, ergibt sich für beide Polymorphismen in dem untersuchten Kollektiv eine Allelfrequenz von ca. 1%.

Die Bestätigung der Mutation *c. T2780G* konnte mittels Restriktionsenzymverdau durchgeführt werden. Eine Schnittstelle des Enzyms Msp1 (Tabelle 3.1) liegt nur bei Auftreten der Variante *c.2780G* vor und teilt in diesem Fall das Amplifikat in zwei Fragmente mit je 95 bzw. 141 bp. *c.2780G*-Allele werden nicht geschnitten (236 bp; Abbildung 3.31). Für den Basenaustausch *c. C2883+11T* ließ sich keine geeignete Restriktionsendonuklease finden, weswegen die Bestätigung des SNPs durch eine allelspezifische PCR erfolgte (Abbildung 3.32).



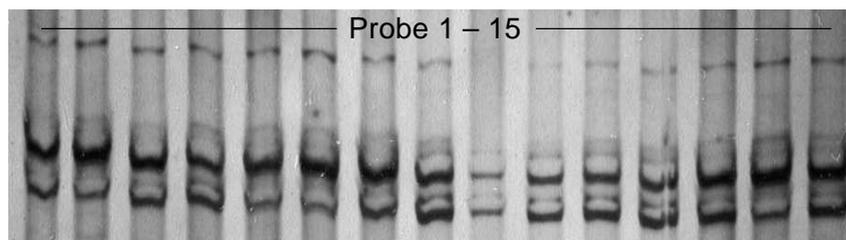
**Abbildung 3.31:** Msp1-Verdau des Exon 21 PCR-Produktes. Auf der mittleren Spur zeigt sich zusätzlich zum ungeschnittenen *c.2780T*-Allel das geschnittene *c.2780G*-Allel mit Fragmenten von 95 bzw. 141 bp Länge. Die zwei zur Kontrolle aufgetragenen Proben mit homozygotem *c.2780T/T*-Genotyp (*w/w*) wurden bei fehlender Schnittstelle nicht geschnitten und liegen ausschließlich als ungeschnittenes Amplifikat (236 bp) vor.



**Abbildung 3.32:** Allelspezifische PCR des Exon 21. Dabei wurde jeweils eine homozygote Wildtyp-DNA *c.2883+11C/2883+11C* (*w/w*) und die heterozygote DNA (*c.2883+11C/2883+11T*; *w/m*) mit den allelspezifischen Primern in die PCR eingesetzt. Die jeweils Wildtyp-spezifischen (WP) und Mutations-spezifischen Primer (MP) sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Während bei homozygotem Genotyp (*w/w*) nur mit dem Wildtyp-spezifischen Primern (WP) eine Amplifikation gelang, führten bei Vorliegen eines heterozygoten Genotyps (*w/m*) beide allelspezifischen Primer zu einer Amplifikation.

### 3.22 Exon 22

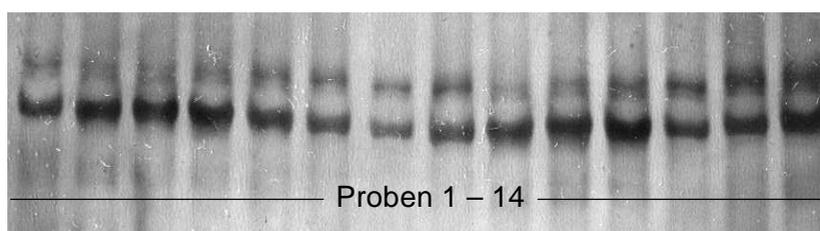
Die erfolgreich amplifizierte Produkte wiesen keine Unterschiede in der Konformation der Einzelstränge auf, da die in der SSCP-Analytik dargestellten Bandenmuster keine Verschiedenartigkeit zeigten (Abbildung 3.33). Die Sequenz des 305 bp großen Produktes war mit den veröffentlichten Originalsequenzen übereinstimmend. Das Amplifikat umspannte 45 bp des Introns 21, die 220 bp des Exons 22 und 40 flankierende Basenpaare des Introns 22.



**Abbildung 3.33:** SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exon 22 mit homogenem Bandenmuster ohne Hinweis auf einen Polymorphismus.

### 3.23 Exon 23

Das Amplifikat umfasst 218 bp und beinhaltet die 155 bp des kodierenden Bereiches sowie je 34 und 29 Basenpaare der 5'- bzw. 3'-flankierenden Intronsequenzen. Die SSCP-Analyse ergab bei gleichförmigem Bandenmuster keine Hinweise auf das Vorliegen eines Polymorphismus (Abbildung 3.34). Durch anschließende Sequenzierung wurde eine korrekte Amplifikation bestätigt. Auch in dieser Analyse ergab sich kein Anhalt für das Vorliegen eines Polymorphismus.



**Abbildung 3.34:** SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exon 23. Es fanden sich keine aberranten Bandenmuster als Hinweis auf einen Konformationsunterschied.

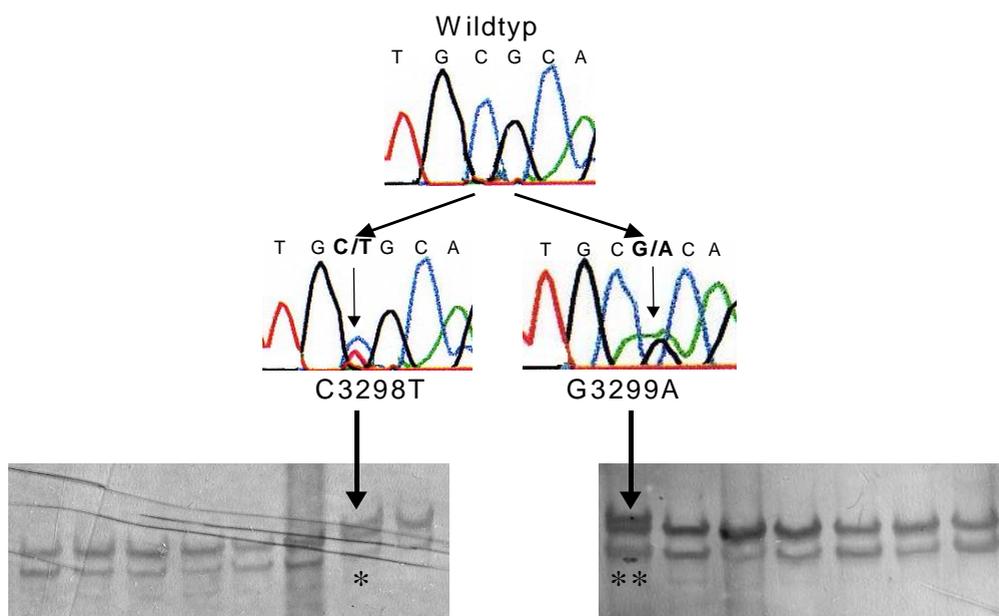
### 3.24 Exon 24

Das Amplifikat umfasst 225 Basenpaare (29 bp des Introns 23, 156 bp des Exons 24 und 40 bp des Introns 24).

Bei der Einzelstranganalyse der Abbildung 3.35 zeigten sich bei den markierten Proben (\*) und (\*\*) divergente Bandenstrukturen, die auf das heterozygote Vorliegen eines varianten Allels hinwiesen. Die Sequenzierung bestätigte für beide abweichenden Proben (\*) und (\*\*) jeweils das Vorliegen einer Punktmutation. Der unterschiedliche Basenaustausch liegt interessanterweise an benachbarter Position vor und stellt sich wie folgt dar:

Für Probe (\*) wurde der Basenaustausch *c.C3298T* nachgewiesen, der durch seine Lokalisation innerhalb des kodierenden Bereiches des Exon 24 zu dem

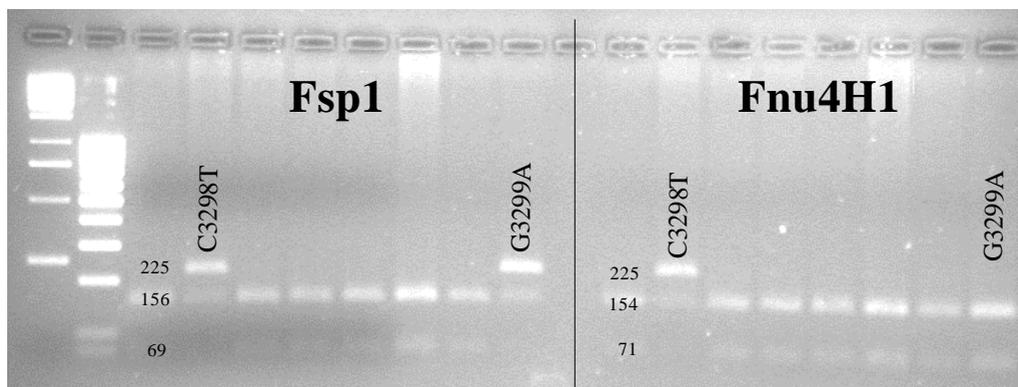
Aminosäureaustausch Arginin nach Cystein an Position 1100 (Arg1100Cys) führt. Die genetische Veränderung der Probe (\*\*\*) befindet sich an benachbarter Position *c.3299* und führt ebenfalls zu einem Aminosäureaustausch des Arginin an Position 1100. Dabei geht der Basenaustausch *c.G3299A* mit einem Aminosäureaustausch nach Histidin einher (Arg1100His). Das Vorliegen je eines gefundenen heterozygoten Genotyps innerhalb des Probandenkollektives ergibt eine Allelfrequenz von 1% des selteneren Allels.



**Abbildung 3.35:** SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exon 24. Bei zwei Proben (\*) und (\*\*) innerhalb des Patientenkollektives wurden abweichende Bandenstrukturen nachgewiesen. Die Sequenzierung der Amplifikate bestätigte das Vorliegen von zwei unterschiedlichen Punktmutationen, die sich an benachbarter Position innerhalb des kodierenden Bereiches des Exon 24 befinden. Es handelt sich dabei um den Basenaustausch *c.C3298T* sowie *c.G3299A*, die zu einem unterschiedlichen Austausch des Arginin an Position 1100 führen (Arg1100Cys respektive Arg1100His).

Die Bestätigung beider SNPs erfolgte durch einen Restriktionslängenpolymorphismus. Da die beiden gefundenen Polymorphismen jeweils zu einem Austausch benachbarter Basen führen, kann mit der Restriktionsendonuklease *Fsp1* das Vorliegen einer der beiden Mutationen detektiert werden. Sowohl bei *c.C3298T* als auch *c.G3299A* verliert die amplifizierte Sequenz ihre einzige Schnittstelle und liegt unfragmentiert mit einer Größe von 225 bp vor. Bei Heterozygotie kann neben den geschnittenen Fragmenten (69 bzw. 156 bp) der Wildtyp-Sequenz zusätzlich der ungeschnittene Anteil mit 225 bp nachgewiesen werden. Zur Differenzierung zwischen den beiden Veränderungsmöglichkeiten wurde ein weiterer Enzymverdau mit der Endonuklease *Fnu4H1* durchgeführt. Das *c.3298T*-Allel enthält keine *Fnu4H1*-Schnittstelle, so dass das

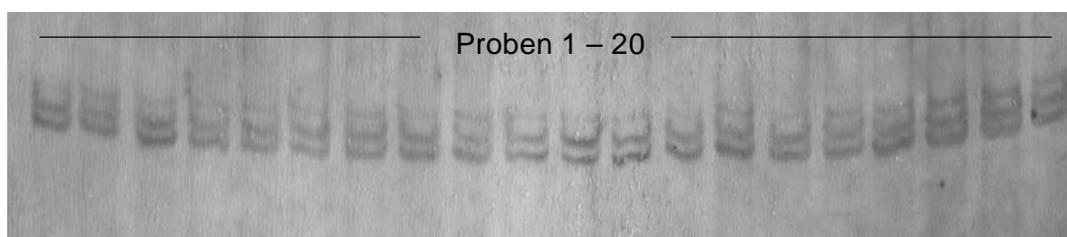
PCR-Produkt von 225 bp nicht geschnitten wird. Demgegenüber werden sowohl die Wildtyp-Allele als auch das 3299A-Allel durch Fnu4H1 geschnitten (Abbildung 3.36).



**Abbildung 3.36:** RFLP-Analyse zum Nachweis der Varianten *c.3298T* und *c.3299A*. Beide Varianten führen zu einem Verlust der Fsp1-Schnittstelle im Amplifikat. Das Auftreten von unfragmentierten (225 bp) neben geschnittenen Allelen (156 bp und 69 bp) weist auf das Vorliegen einer Heterozygotie für einen der beiden SNPs hin. Zur weiteren Differenzierung erfolgte eine enzymatischer Verdau mit Fnu4H1. Ausschließlich durch den Basenaustausch *c.C3298→T* geht diese Schnittstelle verloren, so dass eine zusätzliche Bande (225 bp) nachzuweisen ist. Im Gegensatz dazu wird das Allel mit dem Basenaustausch *c.G3299→A* durch Fnu4H vollständig verdaut (154 bp und 71 bp).

### 3.25 Exon 25

Die amplifizierten Proben des Exon 25 zeigten in einer Polyacrylamid-Gelmatrix - wie exemplarisch in Abbildung 3.37 dargestellt - ausschließlich einheitliche Bandenmuster, die nicht auf das Vorliegen eines Polymorphismus hindeuteten. Das Amplifikat, welches die 200 Basenpaare des kodierenden Bereiches vollständig beinhaltet, hat insgesamt eine Größe von 299 Basenpaaren. Die Sequenz der Amplifikats entsprach bei den exemplarisch untersuchten Proben der veröffentlichten Originalsequenz.

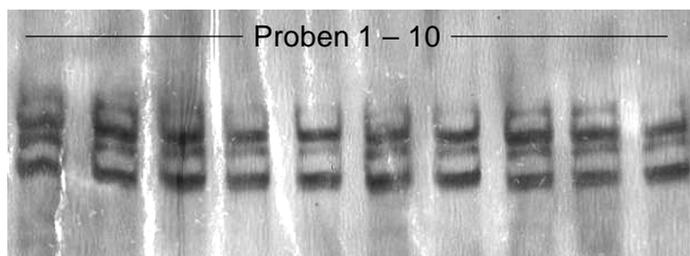


**Abbildung 3.37:** SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exons 25.

### 3.26 Exon 26

Die Basenpaarlänge des Amplifikats beträgt 266 Basenpaare. Während das Exon hierbei 127 Basenpaare umfasst, bestehen die 5'- und 3'-Enden aus jeweils 111 bzw. 28

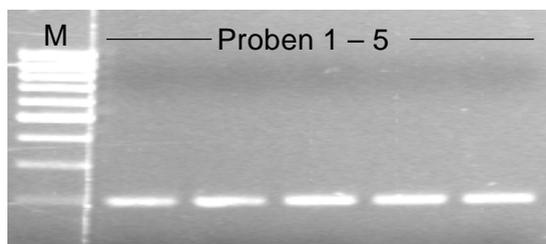
Nukleotiden der flankierenden Introns. Die Amplifikation erfolgte bei standardisierten Zyklusbedingungen und einer „*annealing*“-Temperatur von 57°C problemlos, jedoch waren in der SSCP-Analyse keine abweichenden Banden sichtbar. Zum Nachweis einer fehlerlosen Amplifikation des gesuchten Exons wurden einige ausgewählte Proben sequenziert, wobei der Vergleich mit der Referenzsequenz eine vollständige Kongruenz ergab.



**Abbildung 3.38:** SSCP-Analyse des Exons 26. Es ergab sich kein Hinweis auf genetische Polymorphismen.

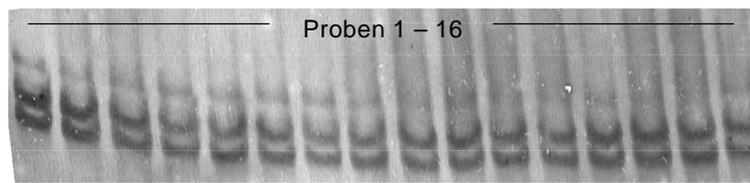
### 3.27 Exon 27

Das in Abbildung 3.39 abgebildete Agarose-Gel bestätigt eine erfolgreiche Amplifikation. Das Exon 27 ist mit 102 Nukleotiden vollständig im Amplifikat enthalten und wurde zusammen mit 48 Nukleotiden in 5'-Richtung sowie 45 Nukleotiden in 3'-Richtung amplifiziert.



**Abbildung 3.39:** Die Gelelektrophorese bestätigt eine erfolgreiche Amplifikation des PCR-Produktes (Basenpaarlänge 195 bp), welches neben flankierenden Intronsequenzen die 102 Basenpaare des Exon 27 enthält.

Die Abbildung 3.40 der mit Silbernitrat gefärbten Einzelstranganalyse zeigt gleichmäßige und scharfe Banden, die ausnahmslos ein gleichförmiges Wanderungsverhalten besitzen. Somit ergab sich aufgrund fehlender Unterschiede in der Konformation kein Hinweis auf das Vorliegen eines Polymorphismus, was in durchgeführten exemplarischen Sequenzierungen bestätigt wurde.



**Abbildung 3.40:** SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exons 27.

### 3.28 Exon 28

Die Amplifizierung verlief bei den unter 2.4 genannten Reaktionsbedingungen problemlos. Das Produkt umfasste 269 Basenpaare und beinhaltete 98 bp aus dem Intron 27, 144 bp des Exons 28 und 27 bp des Introns 28.

Die Einzelstranganalyse zeigte mit mehreren verschiedenen Bandenmustern ein polymorphes Bild (Abbildung 3.41). Eine selektive Sequenzierung auffälliger Proben bestätigte das Vorliegen von zwei unterschiedlichen Punktmutationen. Der Basenaustausch *c.A3844-73G* befindet sich im Intron 27 und wird somit nicht translatiert. Der zweite gefundene Polymorphismus *c.C3972T* befindet sich zwar innerhalb des kodierenden Bereiches des Exon 28, führt jedoch als stummer Polymorphismus ebenfalls nicht zu einem Aminosäureaustausch an Position 1324 (Ile1324Ile).

Folgende Häufigkeiten der unterschiedlichen Genotypen wurden innerhalb des Patientenkollektives festgestellt:

Homozygot <i>c.3844-73A /c.3844-73A</i>	53	90%
Heterozygot <i>c.3844-73A /c.3844-73G</i>	6	10%
Homozygot <i>c.3844-73G /c.3844-73G</i>	0	0%

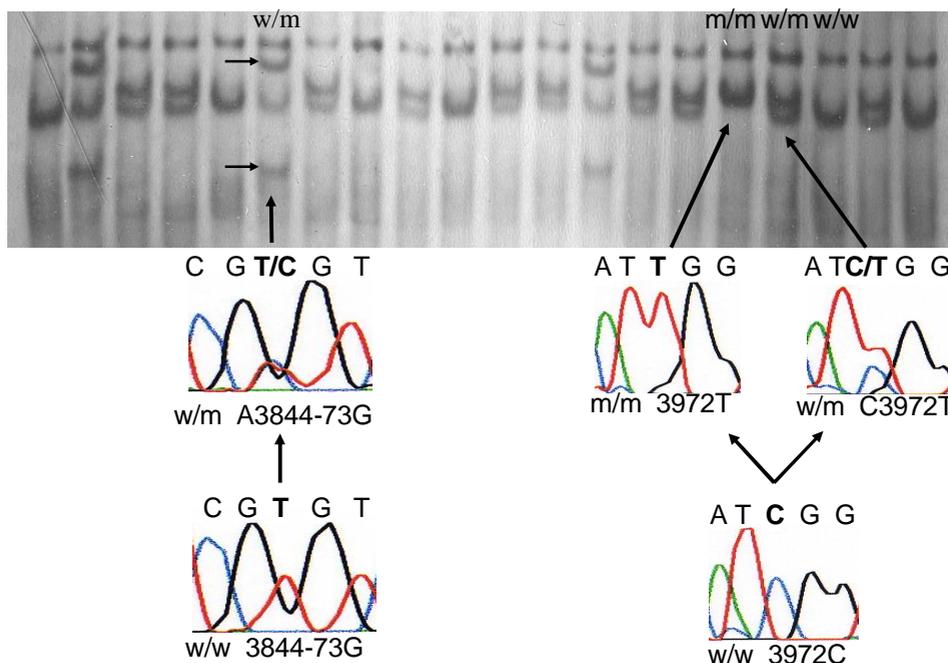
Daraus errechnet sich eine Allelfrequenz des selteneren Allels *c.3844-73G* von ca. 5%.

Analog die Darstellung des Polymorphismus *c.C3972T*:

Homozygot <i>c.3972C /c.3972C</i>	32	54%
Heterozygot <i>c.3972C /c.3972T</i>	22	38%
Homozygot <i>c.3972T /c.3972T</i>	5	8%

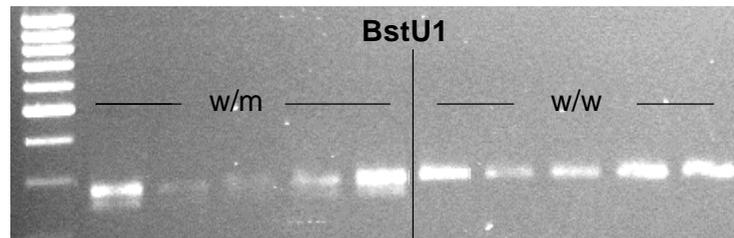
Die Allelfrequenz des selteneren Allels *c.3972T* beträgt hierbei 35,6%.

Mit der Kenntnis der jeweiligen Genotypen lassen sich retrospektiv die in Abbildung 3.41 dargestellten Banden jeweils entsprechenden Allelen zuordnen. Ein homozygotes Vorliegen des Wildtyp-Allels ist mit (w/w) gekennzeichnet. Weiterhin lässt sich bei Vorliegen der Variante *c.3972C* eine zusätzliche Bande darstellen. Diese Mutation kann dabei heterozygot oder homozygot vorliegen, was die verschiedenen beobachteten Bandenmuster erklärt. Bei der Variante *A3844-73G* lassen sich bei heterozygotem Vorliegen zusätzlich zum Wildtyp-Allel zwei weitere Banden (→) erkennen.



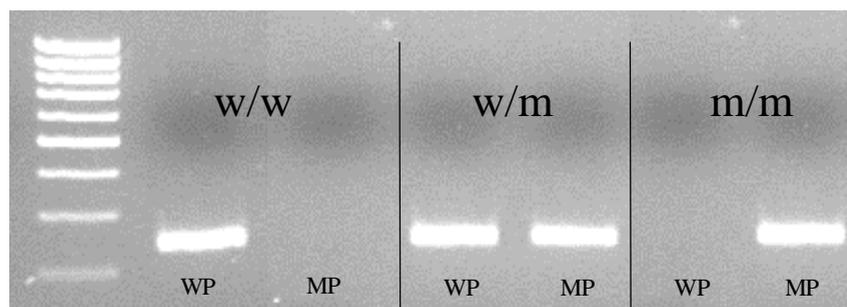
**Abbildung 3.41:** Die SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exons 28 zeigt ein polymorphes Bandenmuster. Dabei zeigen sich im Vergleich zum homozygoten Wildtyp (w/w) zusätzliche Bandenstrukturen bei heterozygotem Vorliegen eines varianten Allels (w/m) *c.C3972T* bzw. *c.A3844-73G*. Bei homozygotem Vorkommen (m/m) des selteneren Allels *c.3972T* fehlt die Wildtyp-spezifische untere Bande.

Die Bestätigung der Mutation *c.A3844-73G* wurde mit dem Restriktionsenzym BstU1 durchgeführt, dessen schnittspezifische Details in Tabelle 3.1 aufgeführt sind. In Abbildung 3.42 wurden die PCR-Produkte bei Homozygotie für das Wildtyp-Allel (w/w) durch das Fehlen einer Schnittstelle nicht von dem Restriktionsenzym BstU1 geschnitten und liegen somit in einer Größe von 269 bp vor. Hingegen wird das seltenere Allel Mutations-spezifisch fragmentiert, weshalb sich bei Heterozygotie (w/m) zusätzlich ein 243 bp großes Fragment erkennen lässt. Das kleinere Fragment des Restriktionsverdaus (26 bp) lässt sich nicht auf diesem Agarose-Gel darstellen.



**Abbildung 3.42:** PCR-RFLP zum Nachweis des *c.A3844-73G* Polymorphismus Die Restriktionsendonuklease *BstU1* besitzt innerhalb der Wildtyp-Sequenz keine Schnittstelle, weswegen bei sich bei Proben mit homozygotem Vorliegen von *c.3844-73A* Allelen (*w/w*) nur das unverdaute PCR-Produkt (269 bp) nachweisen lässt. Bei Heterozygotie trennt sich bei der Agarose-Gelelektrophorese zusätzlich ein 243 bp großes Fragment ab.

Die Bestätigung des Polymorphismus *c.C3972T* wurde hingegen mit einer allelspezifischen PCR durchgeführt. Die Primer, die zur Detektion der Mutation verwendet wurden, sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.



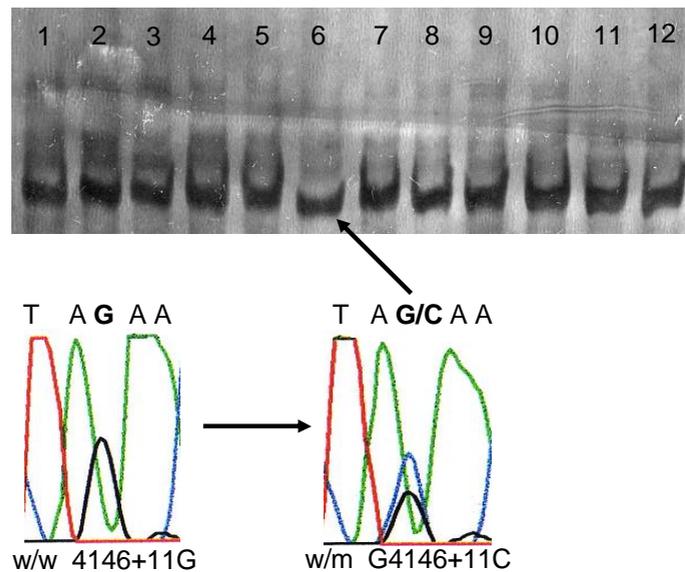
**Abbildung 3.43** Allelspezifische PCR zur Bestimmung der Allelvariante *c.C3972T*. Jeweils ein homozygoter Wildtyp (*w/w*), ein heterozygoter Genotyp (*w/m*) sowie eine homozygote Variante des mutierten Allels (*m/m*) sind auf dem Polyacrylamid-Gel aufgetragen und dabei je einmal mit dem Wildtyp-spezifischen Primer (WP) bzw. mit dem Mutations-spezifischen Primer (MP) in die PCR eingesetzt worden. Jeweils bei der homozygoten Allelstruktur entsteht mit dem konträren Primer kein Produkt, während bei Heterozygotie mit beiden Primern eine Amplifikation erfolgreich ist.

### 3.29 Exon 29

Das Amplifikat umfasst 263 Basenpaare und beinhaltet 74 bp des Introns 28, Exon 29 (159 bp) und 33 bp des Introns 29.

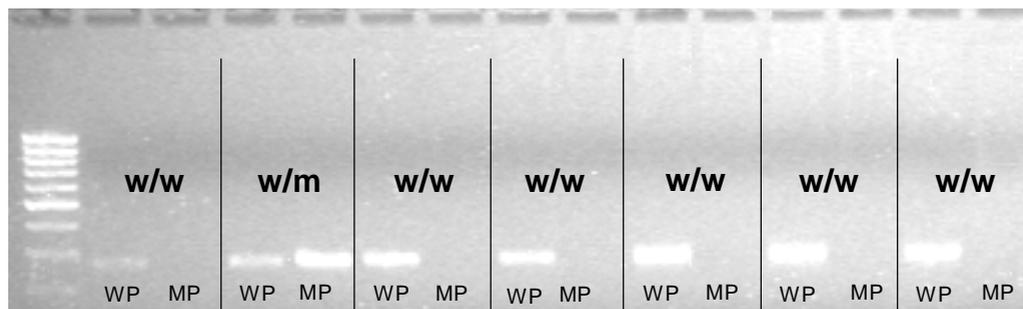
Die Abbildungsqualität des mit Silbernitrat gefärbten Polyacrylamid-Gel ist nicht sehr gut, da das Amplifikat trotz durchgeführter Optimierungsschritte nur schwer spezifische Konformationen innerhalb der Gelmatrix anzunehmen schien. Die in Abbildung 3.44 markierte Probe zeigte in der SSCP-Analyse ein geringfügig abweichendes

Bandenmuster und wurde zum Nachweis eines eventuellen Polymorphismus sequenziert. Dabei ließ sich die dargestellte Punktmutation *c.G4146+11C* mit dem divergenten Bandenmuster in Korrelation bringen. Dieser Basenaustausch befindet sich in der 3'-flankierenden Intronstruktur und führt folglich nicht zu einem Aminosäureaustausch. Die Allelfrequenz errechnet sich bei insgesamt sechs heterozygot vorliegenden Allelen mit ~5%.



**Abbildung 3.44:** Die SSCP-Analyse der PCR-Produkte des Exons 29 zeigt divergierende Bandenstrukturen. Eine Sequenzierung auffälliger Proben ergab das Vorliegen des Polymorphismus *c.G4146+11C* als Ursache für die konformationsbedingten Mobilitätsunterschiede in der Einzelstranganalyse.

Eine Bestätigung der gefundenen Mutation wurde mit einer allelspezifischen PCR erbracht (Abbildung 3.45). Hierbei wurden aufgrund der schwierigen Interpretation der SSCP-Analyse sämtliche Proben des Patientenkollektivs erneut auf die gefundene Mutation untersucht. In der Abbildung wurden die DNA-Proben jeweils mit Wildtyp-spezifischem Primer (WP) sowie Mutations-spezifischem Primer (MP) in die Reaktion eingesetzt. Ausschließlich bei heterozygotem Vorliegen des selteneren *c.4146+11C* Allels (w/m) ist die Amplifikation mit beiden Primern positiv. Alle weiteren Proben sind homozygot vorliegende Wildtyp-Allele (w/w), da sie nur mit dem Wildtyp-spezifischen Primer ein Amplifikat ergaben.



**Abbildung 3.45** Allelspezifische PCR zum Nachweis des *c.G4146+11C* Polymorphismus im Amplifikat des Exon 29. Dabei zeigt sich bei Vorliegen eines heterozygoten Genotyps (w/m) eine erfolgreiche Amplifikation sowohl mit dem Mutations-spezifischen Primer (MP) als auch mit dem Wildtyp-spezifischen Primer (WP). Bei Proben, die homozygot für das Wildtyp-Allel (*c.4146+11G*) sind, bleibt eine Amplifikation bei Verwendung des *c.4146+11C*-spezifischen Primers aus.

### 3.30 Exon 30

Das Amplifikat umfasst 249 Basenpaare und umfasste neben dem Exon 30 (167 bp), 29 bp des Introns 28 und 53 bp des Introns 30.

Innerhalb der kodierenden Struktur wurde bei Exon 30 die stumme Punktmutation *c.G4290T* nachgewiesen, die nicht zum Austausch der an Position 1430 befindlichen Aminosäure Valin führt (Val1430Val). Den Hinweis auf diesen Polymorphismus erbrachten geringfügig abweichende Bandenmuster in der SSCP-Analyse. Die in Abbildung 3.46 dargestellte Sequenz zeigt exemplarisch ein entsprechendes Peak-Muster für eine heterozygote Probe.



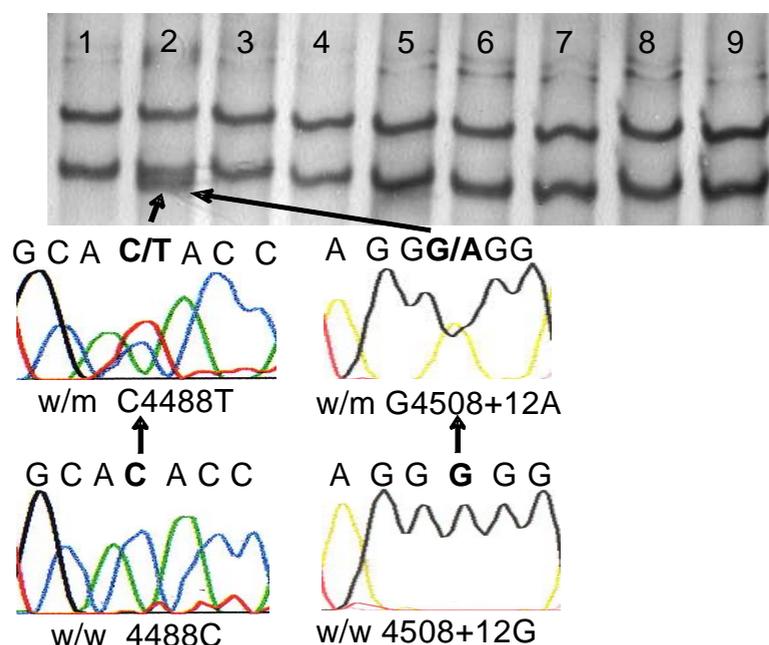
**Abbildung 3.46** zeigt die Sequenzierung bei heterozygotem Vorliegen der *c.G4290T*-Variante.

Zur Bestätigung der gefundenen Mutation wurde eine allelspezifische PCR angewendet. Bei nicht eindeutiger Differenzierbarkeit der Bandenstrukturen innerhalb der SSCP-Analyse wurden sämtliche Proben des Patientenkollektivs auf das Vorliegen dieser Mutation untersucht. Dabei konnte bei 6 Proben das heterozygote Vorliegen des selteneren Allels nachgewiesen werden, was einer Allelfrequenz von ~5% entspricht.

### 3.31 Exon 31

Das Amplifikat umfasst 272 Basenpaare. Das PCR-Produkt enthielt 35 bp des Introns 30, das Exon 31 (195 bp) und 42 bp des Introns 31.

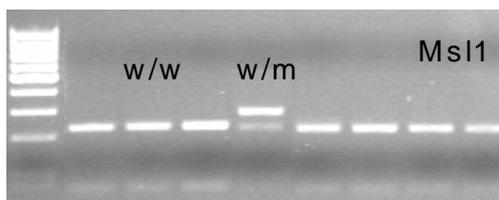
Die Einzelstranguntersuchung des Amplifikats zeigte die in Abbildung 3.47 dargestellten Abweichungen in der Bandenstruktur. Durch eine selektive Sequenzierung der auffallenden Proben konnten den divergierenden Bandenmustern jeweils zwei genetische Veränderungen zugeordnet werden, die stets gemeinsam auftraten. Die Sequenzierungen zeigen die jeweils heterozygot vorliegenden Allele der Varianten *c.4488T* sowie *c.4508+12A*.



**Abbildung 3.47:** SSCP-Analyse und Sequenzierung der PCR-Produkte des Exon 31. Die Probe 2 weist eine zusätzliche untere Bande auf. Die Sequenzierung bestätigte das heterozygote Vorliegen von zwei SNPs als Ursache für die unterschiedlichen Laufeigenschaften der Einzelstränge. Dabei lagen die beiden Punktmutationen *c.C4488T* sowie *c.G4508+12A* stets gemeinsam vor, so dass sich bereits vor der Haplotypenanalyse ein Hinweis auf die Kopplung dieser Polymorphismen ergab.

Der Basenaustausch *c.C4488T* befindet sich innerhalb des Exons 31. Das betroffene Triplet kodiert für Histidin an Position 1496. Der Basenaustausch führt nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz (His1496His). Der stets gemeinsam mit der *c.4488T*-Variation vorkommende Basenaustausch G nach A liegt innerhalb der 3'-flankierenden Sequenz in Intron 31 an Position *c.4508+12* (*G4508+12A*). Die Allelfrequenz beträgt bei dem Vorliegen von sechs heterozygoten Varianten der miteinander kombinierten mutierten Allele ~5%.

Beide Veränderungen wurden mit den in Tabelle 3.1 genannten Restriktionsendonukleasen bestätigt. Für *c.C4488T* wurde das Enzym Msl1 verwendet, welches innerhalb des *c.4488T*-Allels keine Schnittstelle besitzt. Dementsprechend zeigt sich bei Heterozygotie eine Bande auf der Höhe des ungeschnittenen PCR-Produkts (272 bp). Das Wildtyp-Allel *c.4488C* (w/w) wird in die enzymatisch geschnittenen Fragmente mit 214 bzw. 58 Basenpaaren elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 3.48).

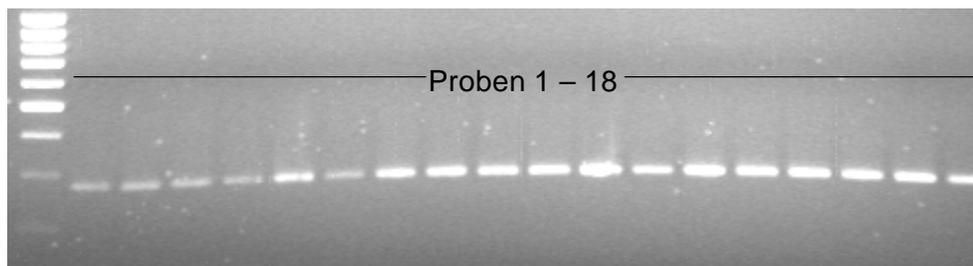


**Abbildung 3.48:** Nachweis des *c.C4488T*-Polymorphismus durch RFLP. Die Restriktionsendonuklease Msl1 verliert bei Vorliegen von *c.4488T* seine Schnittstelle innerhalb des PCR-Produktes. Somit lassen sich bei heterozygotem Genotyp (w/m) sowohl das ungeschnittene PCR-Produkt (272 bp) als auch die Fragmente des verdauten *c.4488C*-Allels (214 bp und 58 bp) nachweisen.

Bei der Variation *c.G4508+12A* befindet sich eine zusätzliche Schnittstelle der Endonuklease Mnl1 nur innerhalb des mutierten Allels und teilt das Amplifikat enzymatisch in jeweils Fragmente der Basenpaarlängen von 27, 39, 53, 61 und 82. Demgegenüber besitzt das Wildtyp-Allel (*c.4508+12 G*) eine Schnittstelle weniger (Fragmentgrößen 37, 53, 61 und 121 bp). Durch gelelektrophoretische Trennung der einzelnen Fragmente ließ sich auch dieser Polymorphismus nachweisen.

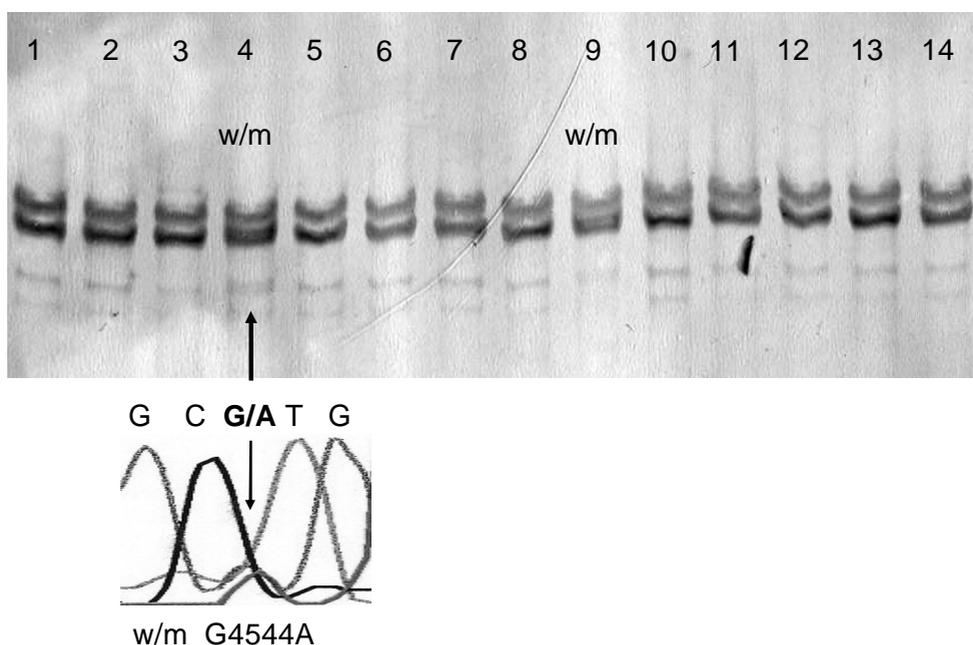
### 3.32 Exon 32

In der Abbildung 3.49 der Agarose-Gelelektrophorese lässt sich anhand des Größenstandards die Länge des PCR-Produktes von 277 Basenpaaren bestätigen. Das Exon ist mit seinen 130 bp vollständig im Amplifikat enthalten und endet als letzte kodierende Sequenz mit dem Stopp-Codon TAG. Es wird zusätzlich von je 11 bp bzw. 136 bp jeweils 5'- bzw. 3'- flankierend begleitet.



**Abbildung 3.49:** Darstellung einer Gelelektrophorese zum Nachweis einer erfolgreichen Amplifikation (277 bp) des Exon 32, welches mit 130 bp vollständig in dem PCR-Produkt enthalten ist.

Die SSCP-Analyse des Exon 32 (Abbildung 3.50) lässt auf den mit (w/m) gekennzeichneten Spuren gering divergierende Bandenmuster der unteren doppelt zur Darstellung kommenden Bande erahnen. Bei der Sequenzierung ließ sich dem selteneren Bandenmuster ein *c.G4544A* Polymorphismus innerhalb des kodierenden Bereiches des Exon 32 zuordnen. Durch Sequenzierung konnte ein heterozygoter Genotyp bestätigt werden und das seltener vorkommende Bandenmuster der selteneren *c.4544A* Variante zugeordnet werden. An Position 1515 kommt es durch den Basenaustausch zu einem Austausch von Cystein nach Tyrosin (Cys1515Tyr).



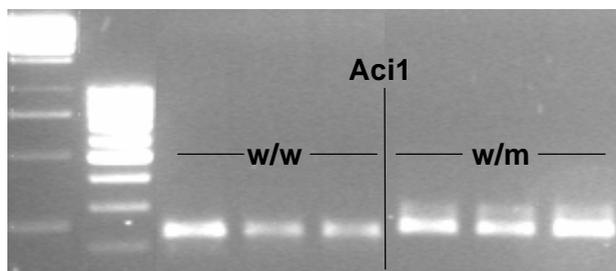
**Abbildung 3.50:** SSCP und Sequenzanalyse des Exon 32-PCR Produkts. Die Einzelstranganalyse des Exon 32 weist auf das Vorliegen eines Polymorphismus hin, da sich eine zusätzliche Bandenstruktur auf den Spuren 4 und 9 nachweisen lässt. Die Sequenzierung zeigte das heterozygote Vorliegen des selteneren *c.4544A*-Allels als Ursache für die unterschiedliche Motilität der Einzelstränge.

Folgende Häufigkeiten des Genotyps wurden innerhalb des Patientenkollektives festgestellt:

Homozygot <i>c.4544G /c.4544G</i>	53
Heterozygot <i>c.4544G /c.4544A</i>	6
Homozygot <i>c.4544A /c.4544A</i>	0

Daraus errechnet sich eine Allelfrequenz des *c.4544A*-Allels von ~5%.

Zur Bestätigung der gefundenen Mutationen und zu deren eindeutiger Zuordnung zu der jeweiligen Bandenstruktur der SSCP-Analyse wurde das Restriktionsenzym *Aci1* verwendet. Dieses weist innerhalb des varianten Allels *c.4544A* keine Schnittstelle auf. Somit zeigt sich bei Vorliegen eines heterozygoten Genotyps ein zusätzliches ungeschnittenes Fragment einer Basenpaarlänge von 277 bp wie in Abbildung 3.51 dargestellt. Im Vergleich dazu werden bei *c.4544G/G* Genotyp die PCR-Produkte vollständig geschnitten (230 bp und 47 bp). Das kleinere Fragment mit 47 bp ist aufgrund seiner geringen Größe nicht sichtbar.



**Abbildung 3.51:** Nachweis des *c.G4544A* Polymorphismus durch PCR-RFLP mit dem Enzym *Aci1*. Das Wildtyp-Allel *c.4544G* wird durch *Aci1* geschnitten, nicht jedoch das seltenere *c.4544A*-Allel. Die Proben 3 bis 6 sind heterozygot für die *c.4544A* Variante.

### 3.33 Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismen

Tabelle 3.1 zeigt die verwendeten Restriktionsendonukleasen, welche zur Bestätigung der gefundenen genetischen Varianten dienen. Weiterhin dargestellt sind die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sowie die erwarteten Restriktionsfragmente bei Vorliegen einer Wildtyp- bzw. einer aberranten Sequenz.

Polymorphismus	Restriktions-Endonukleasen	Erkennungs-Sequenz	Restriktionsfragmente (bp)	
			Wildtyp	Selteneres Allel
C-24T	Bbs1	gaagac	<b>60; 150</b>	<b>210</b>
T2780G	Msp1	c/cgg	<b>236</b>	<b>95; 141</b>
C3298T	Fsp1	tgc/gca	<b>69; 156</b>	<b>225</b>
	Fnu4H1	gc/agc	<b>225</b>	<b>71-154</b>
G3299A	Fsp1	tgc/gca	<b>69; 156</b>	<b>225</b>
	Fnu4H1	gc/agc	<b>71; 154</b>	<b>225</b>
A3844-73G	BstU1	cg/cg	<b>269</b>	<b>243; 26</b>
C4488T	Msl1	caynn/nnrtg	<b>214; 58</b>	<b>272</b>
G4508+12A	Mnl1	cctc bzw. gagg	37; 61; 53; <b>121</b>	27; 61; 53; <b>82; 39</b>
G4544A	Aci1	Ccgc bzw. ggcg	<b>47; 230</b>	<b>277</b>

**Tabelle 3.1:** Darstellung aller verwendeten Restriktionsendonukleasen mit jeweils spezifischer Erkennungssequenz. Fragmente, die sich in ihrer Länge zwischen der Wildtyp-Sequenz und der varianten Sequenz unterscheiden, sind fett hervorgehoben.

In einer Polymorphismus-Untersuchung des *ABCC2-/MRP2*-Genes innerhalb eines japanischen Patientenkollektives (Ito et al. 2001) sind mehrere Mutationen vorbeschrieben. Um innerhalb des kaukasischen Patientenkollektives potentielle falsch-negative SSCP-Analysen hinsichtlich dieser Mutationen definitiv auszuschließen, wurden hierfür RFLPs verwendet.

Mutation	Restriktions-Endonukleasen	Erkennungs-Sequenz	Restriktionsfragmente (bp)	
			Wildtyp	Mutation
C2302T	Fnu4H1	gc/agc	65; 184	249
C2366T	Pst1	ctgca/g	113; 136	249
G4348A	Hinf1	g/antc	272	69; 203

**Tabelle 3.2** Restriktionsendonukleasen und ihrer schnittspezifischen Details, die zum Ausschluss falsch-negativer SSCP-Ergebnisse zum Nachweis bereits bekannter SNPs verwendet wurden (Ito et al. 2001).

### 3.34 Allelspezifische PCR

Bei den für die allelspezifische PCR gestalteten Primern der Tabelle 3.3 ist das durch Mutation veränderte 3'-Ende durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Im Vergleich zur Referenzsequenz des *MRP2* wurde jeweils die drittletzte Base komplementär ausgetauscht, um die Allel-Spezifität der Amplifikation zu erhöhen. Die jeweils dazu gegenläufigen Oligonukleotide sind bereits unter 2.4 in Tabelle 2.1 aufgeführt.

	Wildtyp-Primer (WP) Polymorphismus Mutations-spezifischer Primer (MP)	<i>Common</i> -Primer
Exon 10	WP ...GGAGTACAGC G G1249A ...GGAGTACACC G/A MP ...GGAGTACAGC a	TATTCTTCTGGGTGACTTTTT
Intron 21	WP ...ACTTTTCTCT G C2883+11T ...ACTTTTCTGT G/A MP ...ACTTTTCTCT a	ACATCTGCTTGCAAGAAGACC
Exon 28	WP ...CCATGCTAGC G C3972T ...CCATGCTACC G/A MP ...CCATGCTAGC a	TGCTACCCTTCTCCTGTTCTA
Intron 29	WP ...GAGTAAGAT G G4146+11C ...GAGTAAGTT C/G MP ...GAGTAAGAT g	TGAATGCCCAGGCTAAATAAC
Exon 30	WP ...CAGCCTCTCT C G4290T ...CAGCCTCTGT C/A MP ...CAGCCTCTCT a	TGAATGCCCAGGCTAAATAAC

**Tabelle 3.3:** Verwendete Primer für Allel-spezifische PCRs. Die Base der selteneren Variante ist im Primer durch einen Kleinbuchstaben kenntlich gemacht. Die zusätzliche veränderte Base der drittletzten Position ist durch Unterstreichung hervorgehoben.

### 3.35 Haplotypenanalyse

Die beobachteten genetischen Variationen wurden auf das Vorliegen von Kopplungsungleichgewichten hin untersucht. Dabei fiel bereits bei der ersten Durchsicht der erhaltenen Genotypisierungsergebnisse auf, dass die Polymorphismen *c.A3844-73G*, *c.G4146+11C*, *c.G4508+12A*, *c.G4290T*, *c.C4488T* und *c.G4544A* stets gekoppelt erschienen. Bei Vorliegen der seltenen Variante an einer der variablen Stellen lagen auch die anderen Stellen in der selteneren Allelvariante vor.

Weiterhin konnte ein schwächeres Kopplungsungleichgewicht zwischen den Allelvarianten *c.C-24T* (5'-UTR, Exon 1) und *c.C3924T* (Ile1324Ile, Exon 28) nachgewiesen werden.

Polymorphismus	C-24T	G1249A	T2780G	C2883+11T	C3298T	G3299A	A3844-73G	C3972T	G4146+11C	G4290T	C4488T	G4508+12A	G4544A
C-24T								+					
G1249A													
T2780G													
C2883+11T													
C3298T													
G3299A													
A3844-73G								(+)	++	++	++	++	++
C3972T	+						(+)		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
G4146+11C							++	(+)		++	++	++	++
G4290T							++	(+)	++		++	++	++
C4488T							++	(+)	++	++		++	++
G4508+12A							++	(+)	++	++	++		++
G4544A							++	(+)	++	++	++	++	

**Tabelle 3.4** Darstellung der Kopplungsungleichgewichte zwischen den verschiedenen Polymorphismen. (+):  $p=0.05$ ; +:  $p=0.01$ ; ++:  $p=0.0001$ .

Die Kopplungsungleichgewichte erreichten in der mit dem Programm Arlequin durchgeführten Analyse einen unkorrigierten p-Wert von 0.01 für die Kopplung zwischen *c.C-24T* (5'-UTR, Exon 1) und *c.C3924T* (Ile1324Ile). Demgegenüber war die Kopplung zwischen *c.A3844-73G*, *c.G4146+11C*, *c.G4508+12A*, *c.G4290T*, *c.C4488T* und *c.G4544A* hochsignifikant ( $p<0.0001$ ). Unter dem Vorbehalt des multiplen Testens ist diese Kopplung als sicher anzunehmen. Die Kopplung zwischen dem letztgenannten Haplotyp und *c.C3972T* war grenzwertig signifikant ( $p=0.019$ ). Die Kopplung der anderen Polymorphismen bedarf der Überprüfung in einem größeren Kollektiv.

Haplotyp	C-24T	G1249A	T2780G	C2883+11T	C3298T	G3299A	A3844-73G	C3972T	G4146+11C	G4290T	C4488T	G4508+12A	G4544A	Häufigkeit
1	C	A	T	C	C	G	A	C	G	G	C	G	G	0.072
2	C	A	T	C	C	G	A	T	G	G	C	G	G	0.032
3	C	A	T	C	C	G	G	C	C	T	T	A	A	0.013
4	C	A	T	C	T	G	A	C	G	G	C	G	G	0.008
5	C	G	G	C	C	G	A	T	G	G	C	G	G	0.008
6	C	G	T	C	C	G	A	C	G	G	C	G	G	0.486
7	C	G	T	C	C	G	A	T	G	G	C	G	G	0.162
8	C	G	T	C	C	G	G	C	C	T	T	A	A	0.019
9	C	G	T	T	C	G	G	C	C	T	T	A	A	0.008
10	T	A	T	C	C	G	A	C	G	G	C	G	G	0.025
11	T	A	T	C	C	G	A	T	G	G	C	G	G	0.033
12	T	G	T	C	C	A	G	C	C	T	T	A	A	0.008
13	T	G	T	C	C	G	A	T	G	G	C	G	G	0.119

**Tabelle 3.5:** Darstellung der Frequenzen der vorhergesagten Haplotypen. Die beobachtete Genotypverteilung der SNPs kann durch 13 Haplotypen vollständig erklärt werden. Theoretisch wären bei dreizehn dichotomen Marken  $2^{13} = 8192$  Kombinationen denkbar.

### 3.36 Übersicht über alle in dieser Untersuchung beobachteten SNPs

In Tabelle 3.6 sind sämtliche in dieser Untersuchung beobachteten SNPs des MRP2 aufgeführt.

	SNP rs No.	DNA Sequenz	vorhergesagter Aminosäure- Austausch	Genotyp			Allelfrequenz w
				w/w	w/r	r/r	
Exon 1	c.C-24T rs717620	GAAGAGTCTT <b>C/T</b> GTTCCAGACG	–	38	20	1	0,81
Exon 10	c.G1249A rs2273697	GGAGTACACC <b>G/A</b> TTGGAGAAAC	Val417Ile	37	22	0	0,81
Exon 21	c.T2780G –	CTGAAGTCCC <b>T/G</b> GAGAACTCC	Leu927Arg	58	1	0	0,99
Intron 21	c.C2883+11T –	GTGAACACCA <b>C/T</b> ACAGAAAAGT	–	58	1	0	0,99
Exon 24	c.C3298T –	TCAGTCCTTG <b>C/T</b> GCAGCTGGATT	Arg1100Cys	58	1	0	0,99
Exon 24	c.G3299A –	CAGTCCTTGC <b>G/A</b> CAGCTGGATT	Arg1100His	58	1	0	0,99
Intron 27	c.A3844-73G –	GTTCTATGAC <b>A/G</b> CGAGTCCTGG	–	53	6	0	0,95
Exon 28	c.C3972T rs3740066	CTTGTGACAT <b>C/T</b> GGTAGCATGG	Ile1324Ile	22	32	5	0,64
Intron 29	c.G4146+11C rs8187703	GTGAGCTCTA <b>G/C</b> AACTTACTCG	–	53	6	0	0,95
Exon 30	c.G4290T rs7904678	CCCACGAAGT <b>G/T</b> ACAGAGGCTG	Val431Val	53	6	0	0,95
Exon 31	c.C4488T rs8187707	ACAGGCTGCA <b>C/T</b> ACCATCATGG	His1496His	53	6	0	0,95
Intron 31	c.G4508+12A rs8187708	TGAGTGTAGG <b>G/A</b> GGACAGGGCT	–	53	6	0	0,95
Exon 32	c.G4544A rs8187710	ATTATAGAGT <b>G/A</b> CGGCAGCCCT	Cys1515Tyr	53	6	0	0,95

**Tabelle 3.6:** Übersicht über die beobachteten genetischen Varianten des *ABCC2*-Gens innerhalb des untersuchten Kollektives gesunder Kaukasier (59 Probanden) mit ihren vorhergesagten Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz und der Häufigkeit des Wildtyp-Allels. Für bereits in der SNP-Datenbank erfasste Polymorphismen sind die jeweiligen rs-Nummern angegeben. w=Wildtyp-Allel; r= selteneres Allel (r= *rare*).

Keiner der beobachteten Polymorphismen stellt nach bisherigen Kenntnissen ein für das Dubin-Johnson Syndrom ursächliche Variante dar (Siehe bitte die Übersicht in der Einleitung, Seite 13. Tabelle 1.1).

## 4 Diskussion

### 4.1 Zielsetzung der Arbeit und Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Funktion und Lokalisation des membranständigen Transporterproteins MRP2 spiegeln seine Rolle beim Schutz des Organismus vor Xenobiotika wider. Die Rolle besteht neben der biliären und renalen Exkretion seiner Substrate auch in einer Begrenzung ihrer Bioverfügbarkeit sowie einem Schutz sensibler Gewebe vor deren Anreicherung. MRP2 könnte die Absorption, Verteilung und Elimination eines breiten Spektrums von Arzneimitteln beeinflussen und entscheidende Einflüsse auf deren pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften ausüben. Wie für zahlreiche Transporter ist die Relevanz, die das MRP2-Protein für die Kinetik von Pharmaka besitzt, noch weitgehend unbekannt.

Genetische Polymorphismen können zu interindividuellen Aktivitätsunterschieden von Arzneistofftransportern führen. Die dadurch hervorgerufenen Unterschiede in der Pharmakokinetik und Arzneimitteldisposition könnten die Wirksamkeit und unerwünschten Arzneimittelwirkungen entscheidend beeinflussen. Häufig werden interethnische Unterschiede in der Allelfrequenz von SNPs beobachtet. Im Hinblick auf eine individuell optimal angepasste Arzneimitteltherapie kann die Kenntnis vorhandener Allelvarianten und ihrer phänotypischen Auswirkungen von wesentlicher Bedeutung sein.

Als Grundlage für weiterführende funktionelle Studien, welche die phänotypischen Auswirkungen genetischer Varianten des MRP2 untersuchten, wurden in dieser Studie innerhalb eines kaukasischen Probandenkollektives nach Polymorphismen in Exons und flankierenden Intronabschnitten des *ABCC2* Gens gesucht. In diesem aus 59 Probanden bestehenden Kollektiv (118 Chromosomen) konnten 13 verschiedene Polymorphismen detektiert werden. Dabei konnte das Auftreten von drei Allelvarianten, die auch in der japanischen Bevölkerung mit einer hohen Allelfrequenz beschrieben wurden, in dieser Studie bestätigt werden. Es handelt sich dabei um c.C-24T der 5'-UTR des Exon 1, um den Aminosäureaustausch Valin nach Arginin an Position 417 (c.G1249A) sowie um eine stumme Variation (Ile1324Ile) innerhalb des Exons 28 (c.C3972T). Das Vorkommen einiger seltener Allelvarianten, die in einer Arbeit an japanischen Probanden mit einer Frequenz von ca. 1% detektiert worden sind, wurden mit spezifischen Methoden ausgeschlossen (Ito et al. 2001; Suzuki et al. 2002).

Vier gefundene Variationen befinden sich in nicht-kodierenden, flankierenden Intronregionen (c.C2883+11T, Intron 21; c.A3844-73G, Intron 27; c.G4146+11C, Intron 29;

*c.G4508+12A*, Intron 31). Zwei der gefundenen Polymorphismen sind zwar innerhalb kodierender Bereiche lokalisiert, führen jedoch nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz (Exon 30: *c.G4290T*, Val1430Val; Exon 31: *c.C4488T*, His1496His). Hingegen gehen die Allelvarianten *c.T2780G* (Exon 21, Leu927Arg) und *c.G4544A* (Exon 32, Cys1515Tyr) jeweils mit einem Aminosäureaustausch einher. Die beiden genetischen Varianten, die sich innerhalb des Exon 24 an zwei benachbarten Basenpositionen befinden, betreffen das gleiche Triplet, das in der Wildtyp-cDNA für Arginin kodiert. Beide Varianten sind in der Literatur zuvor nicht beschrieben worden. Bei Vorliegen der Variante *c.3298T* wird das Arginin durch ein Cystein ersetzt (Arg1100Cys). Die Variation *c.3299A* führt zu einem Austausch nach Histidin (Arg1100His).

## 4.2 Methodik

### 4.2.1 Mutationsscreening

Die SSCP-Analyse (single-strand conformation polymorphism) stellt eine relativ einfache Methode zur Detektion von Mutationen innerhalb amplifizierter PCR Produkte dar (Orita et al. 1989). Die durch Denaturierung getrennten Einzelstränge reassoziieren unter nicht-denaturierenden Bedingungen und nehmen eine thermodynamisch günstige, sekundäre Konformation an. Dabei formen die Stränge abhängig von ihrer Sequenz jeweils unterschiedliche dreidimensionale Strukturen, was zu unterschiedlichen Laufeigenschaften und elektrophoretischer Trennung der beiden Einzelstränge führt (Sheffield et al. 1993). Die Sequenzabhängigkeit der komplexen dreidimensionalen Strukturen ist auf Wasserstoffbindungen zwischen einzelnen Basenpaaren und auf die Reassoziation kurzer komplementärer Abschnitte, die intramolekulare Schleifen bilden können, zurückzuführen (Paccoud et al. 1998; Strachan und Reed 2004). Somit kann bereits die Veränderung einzelner Basenpaare eine unterschiedliche Konformation und entsprechend unterschiedliche Mobilitätseigenschaften in der Elektrophorese bewirken. Allerdings ist es unmöglich, die Art der Konformationsänderung und somit das elektrophoretische Wanderungsverhalten vorherzusagen. Auch kann ein einzelner Basenaustausch mehrere unterschiedliche Konformationen hervorrufen, da unterschiedliche thermodynamisch ähnlich stabile Konformationen vorliegen können (Hayashi et al. 1993; Sheffield et al. 1993).

Die SSCP stellt vor allem für kurze DNA Fragmente eine sensitive Methode zur Detektion von Mutationen dar. Die Abhängigkeit der Sensitivität von der Länge beruht laut Sheffield et al. (1993) auf der Fähigkeit kleiner DNA Fragmente, stabile Sekundärstrukturen einzugehen, die sich dann auch in einer Änderung der Mobilität niederschlagen. Für

Fragmente unter 200 bp können Mutationen mit = 90%iger Sicherheit nachgewiesen werden, während die Nachweisgrenze mit steigender Moleküllänge sinkt und bei 400 bp noch bei ca. 80% liegt (Sarkar et al. 1992; Hayashi et al. 1993, Sheffield et al. 1993, Jordanova et al. 1997).

Neben der Länge beeinflussen auch die Sequenzeigenschaften des amplifizierten DNA-Fragmentes und die Art der Mutation die Sensitivität der SSCP. Dabei ist laut Sheffield et al. (1993) weniger die Art des Basenaustausches (Transition versus Transversion) als vielmehr die Position der Mutation innerhalb des PCR-Produktes entscheidend. Zusätzlich scheinen auch die flankierenden Regionen der Mutation Einfluss auf die Sensitivität der Detektion zu nehmen. Indem sie sich zusammen mit der Mutation an der Ausbildung der Sekundärstruktur beteiligen, beeinflussen sie die Sensitivität der SSCP (Sheffield et al. 1993). Darüber hinaus spielt die chemische Zusammensetzung der Sequenz eine wichtige Rolle. So kommt es bei einem hohen GC-Gehalt des PCR-Produkts häufig zu einer geringeren mutationsbedingten Konformationsänderung als bei einem hohen AT-Gehalt des DNA-Fragmentes. Diese sequenzabhängigen Unterschiede der Sekundärstruktur sind durch stärkere Bindung und entsprechend höheren Schmelzpunkt des stabileren GC-reichen Fragmentes zu erklären. Diese höhere Stabilität geht mit einem Rückgang der Sensitivität bei der SSCP-Analyse einher (Glavac et al. 1993).

Außerdem können versuchsspezifische Parameter, wie Temperatur, Ionenstärke des Puffers, pH Wert und denaturierende Bestandteile des Gels, Auswirkungen auf die Konformation der DNA besitzen, die innerhalb der Gelmatrix angenommen wird (Glavac et al. 1993; Spinardi et al. 1993; Kaczanowski et al. 2001). Aber auch die elektrophoretische Mobilität kann durch unterschiedliche Parameter, wie die Eigenschaften der Gelmatrix beeinflusst werden (Savov et al. 1992; Glavac et al. 1993).

In dem durchgeführten Screening des *ABCC2* Gens variierte die Länge der amplifizierten DNA Fragmente zwischen 144 und 310 bp. Die Länge der Moleküle wurde entsprechend gewählt, um eine gute Sensitivität zu erreichen. Um zunächst eine vollständige Denaturierung der DNA zu gewährleisten, wurden die PCR Produkte in einem Formamidhaltigen Puffer durch Hitze (90 °C für 5 min) denaturiert (Paccoud et al. 1998). Eine sofortige Reassoziaton der Einzelstränge wurde durch sofortiges Abkühlen auf Eis verhindert. Um eine Reproduzierbarkeit und Analyse durch standardisierten Vergleich einzelner Bandenmuster zu gewährleisten, wurden konstante Versuchsbedingungen eingehalten, die in vorhergehenden Optimierungsschritten bestimmt wurden. So zeigte sich für die einzelnen Exons die schärfste Auftrennung der Banden bei einer konstanten

Temperatur von 15°C, was durch eine Wasserkühlung gewährleistet wurde. Dadurch konnte außerdem eine zu starke Erwärmung des Gels verhindert werden, die eine Verminderung der Sensitivität hätte bewirken können (Kaczanowsky et al. 2001). Als Gelmatrix wurde ein nicht-denaturierendes, 6%iges Polyacrylamid-Gel zur optimalen Separation der Einzelstränge verwendet (Glavac et al. 1993). Die Ionenstärke des Laufpuffers 0,5 X TBE erwies sich als optimal für eine scharfe Bandentrennung bei konstanter Spannung von 250 V (Spinardi et al. 1991). Die Zugabe neutraler Bestandteile in das Polyacrylamid-Gel in Form von 5% Glycerol ergab in vergleichenden Optimierungsschritten ebenfalls die schärfste Bandentrennung. Dies entspricht den Ergebnissen von Spinardi et al. (1991), die für einen 5%igen Glycerolgehalt des Gels eine Verbesserung der Sensitivität zeigten (Spinardi et al. 1991; Glavac et al. 1993). Hayashi et al. (1993) merkte an, dass einige Allelvarianten erst unter speziellen Bedingungen mit Glycerol detektiert werden können.

Zur Visualisierung der Einzelstrangbanden wurde die Methode der Silbernitratfärbung verwendet. Sie stellt für DNA eine relativ schnelle, einfache und wenig kostenintensive Methode dar (Bosari et al. 1995). Zudem ist es laut der Studie von Russel et al. (1997) im Vergleich zu fluoreszierenden Färbungen (Ethidiumbromid oder SYBR Green®) zum Nachweis von Einzelstrang-DNA (ssDNA) die sensitivste Methode. Gerade bei der geringen Basenpaarlänge der DNA Fragmente, die für die SSCP benötigt werden, zeigt die Reduktion von Silberionen eine Überlegenheit (Russel et al. 1997).

#### 4.2.2 Auswahl der Proben

Obwohl durch Optimierung sämtlicher genannter Faktoren die Sensitivität der SSCP bei der Detektion von Mutationen sehr hoch ist, sind falsch-negative Ergebnisse durch ähnliche Konformation von Wildtyp und Mutante mit unzureichender elektrophoretischer Trennung nicht vollkommen auszuschließen. Daher wurden auch Proben sequenziert, deren Bandenmuster nur geringe Abweichungen vom Normal-Bandenmuster aufwiesen. Beispielsweise zeigten die Bandenmuster der SSCP Analyse von Exon 29 und 30 nur geringfügige Unterschiede des konformationsbedingten Laufverhaltens, was sich jedoch in der anschließenden Sequenzierung tatsächlich auf einen Polymorphismus zurückführen ließ.

#### 4.2.3 Bestätigung durch RFLP oder Allel-spezifische PCR

Eine Bestätigung der gefundenen SNPs nach Sequenzierung erfolgte mit einem Restriktionsenzym-Verdau oder durch allel-spezifische PCR.

In vielen Fällen konnte eine Differenzierung der Allele durch Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus erfolgen. Die Endonukleasen wurden so gewählt, dass möglichst eindeutig differenzierbare Fragmente der DNA erhalten wurden. Dabei konnte bei heterozygotem Genotyp teilweise eine unterschiedliche Signalstärke der einzelnen Fragmente festgestellt werden. Dieses Phänomen lässt sich auf unterschiedliche Effizienz der Amplifikation der beiden Allele zurückführen. Die divergierende räumliche Struktur der Allele kann zu unterschiedlicher Effizienz der Amplifikation während der PCR und damit zu allel-spezifischen Amplifikationsunterschieden führen. Bei Fehlen einer allel-spezifischen nativen Schnittstelle konnte naturgemäß keine einfache RFLP-Analyse durchgeführt werden. In diesen Situationen wurde eine allel-spezifische PCR zur Bestätigung verwendet. Die allel-spezifischen PCRs lieferten auf dem verwendeten PCR-Gerät robuste und gut reproduzierbare Ergebnisse. Nur ausnahmsweise war eine weitere Optimierung der Primer notwendig. Der verwendete Cycler zeichnet sich durch einen raschen Temperaturwechsel zwischen den verschiedenen Abschnitten der PCR aus, da die Probe mechanisch zwischen den konstant temperierten Blöcken bewegt wird. Damit fallen die langsamen Temperaturveränderungen weg, die bei der Verwendung von Peltier-Elementen vorliegen würden. Dies dürfte zur Spezifität der allel-spezifischen Amplifikation beigetragen haben.

### **4.3 Vom Genotyp zum Phänotyp**

#### **4.3.1 Mögliche Genvarianten und Lokalisation innerhalb eines Gens**

Ob eine Genvariante auch Auswirkungen auf den Phänotyp besitzt, lässt sich letztendlich nur durch Studien bezüglich der Expression und Funktion des Genproduktes eindeutig klären. Allerdings kann die Lokalisation der Genvariante innerhalb der DNA gewisse Rückschlüsse auf mögliche phänotypische Auswirkungen geben. Etwa 90% der bislang bekannten Mutationen, die hereditären Krankheiten zugrunde liegen, befinden sich innerhalb kodierender DNA-Abschnitte (cSNP), was deren funktionelle Relevanz unterstreicht. Allerdings muss einschränkend hinzugefügt werden, dass zunehmend auch Mutationen in Introns für Erkrankungen verantwortlich gemacht werden können. Bislang dürften pathogene Mutationen in Introns auch aus experimentellen Gründen eher unterrepräsentiert sein. Introns sind häufig sehr groß, so dass die Untersuchung aufwändiger und teurer ist, als die Analyse von Exons und flankierenden Intronabschnitten mit den enthaltenen Splice-Donor- und Akzeptor-Stellen. Auch lassen sich die Konsequenzen von intronischen Mutationen auf die Rate der Transkription oder Veränderungen des Splicings bislang schlecht vorhersagen, so dass funktionelle Analysen

notwendig sind. Demgegenüber kann in der Regel angenommen werden, dass sich die Veränderungen der kodierenden Abschnitte in Form von vorhersagbaren Aminosäureaustauschen manifestieren. Allerdings müssen zusätzliche Effekte auf das Splicing mit beachtet werden. Durch direkte Änderung der Aminosäuresequenz („*non-synonymous mutations*“) können sie die Expression und Funktion beeinflussen. Während „*in-frame*“ Mutationen („*missense*“ und „*nonsense*“ Mutationen) mit 59% die häufigste pathogenetische Ursache hereditärer Krankheiten sind, stellen „*frameshift*“ Mutationen (Deletionsmutationen mit 22% und Insertions- /Duplikationsmutationen mit 7%) einen geringeren Anteil dar (Botstein und Risch 2003). In der Regel sind „*frameshift*“-Mutationen mit einem gravierender veränderten Phänotyp verbunden. Beispielsweise ist die schwere Form der X-chromosomal vererbten progressiven Muskeldystrophie (Typ Duchenne) auf eine „*frameshift*“ Genvariante zurückzuführen, während der milden Variante (Typ Becker) eine „*in-frame*“ Variante am selben Genlocus zugrunde liegt (Miller und Kumar 2001; Botstein und Risch 2003). Aber auch synonyme Genvarianten innerhalb kodierender Bereiche, die nicht mit einer direkten Änderung der Aminosäuresequenz einhergehen („*synonymous mutations*“), können durch regulatorische Mechanismen pathogenetische Konsequenzen hervorrufen (Maquat 2001; Strachan und Reed 2004). Innerhalb nicht-kodierender Regionen besitzen vor allem Intronsequenzen in unmittelbarer Nähe des Exons wichtige Funktionen. Dabei spielen vor allem die Erkennungssequenzen der „*splice sites*“, wie die Dinukleotide (GT und AG) an den Enden der Introns, eine wichtige Rolle bei dem Spleißen der mRNA. Aber auch Mutationen in nicht-kodierenden mRNA Regionen (5′-/3′-UTR; „5′-/3′-*untranslated region*“) können den Phänotyp durch Auswirkungen auf das Transkriptionsniveau oder die Stabilität der mRNA beeinflussen (Nebert 1999; Strachan und Reed 2004). In seltenen Fällen können selbst flankierende Sequenzen außerhalb eines Gens Angriffspunkt einer krankheitsverursachenden Mutation sein (Nebert 1999). Jedoch lassen sich Veränderungen in „*splice sites*“ sowie Splice- oder Transkriptionenhancern nicht sicher *in silico* vorhersagen (Botstein und Risch 2003; Strachan und Reed 2004). Aufgrund der Größe der Introns sind pathogenetische Veränderungen in Intronabschnitten grundsätzlich aufwendiger zu identifizieren, zumal sie in der Regel funktionell auf komplexe Weise untersucht werden müssen.

#### 4.3.2 Typ des Aminosäureaustausches und Funktion

Inwieweit nicht-synonyme Genvarianten letztendlich Auswirkungen auf die Funktion oder Expression des Proteins besitzen, hängt neben der genannten Lokalisation auch von der Art des Aminosäureaustausches ab. Zur Einteilung der Schwere eines Aminosäureaustausches bedient man sich der „Grantham Skala“. Deren Klassifikation in

konservierte, radikale und „nonsense“ Mutationen, beruht vor allem auf Unterschieden in der Polarität und des Volumens sowie der Zusammensetzung der Aminosäureseitenketten (Grantham 1974; Miller und Kumar 2001). Es existiert ein Zusammenhang zwischen der steigenden physiko-biochemischen Divergenz der ausgetauschten Aminosäure und der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer funktionellen oder klinischen Auswirkung auf den Phänotyp (Miller und Kumar 2001). Beispielsweise besitzen ein radikaler Aminosäureaustausch und eine „nonsense“ Mutation im Vergleich zu einer konservierten Mutation eine drei- bzw. neunfach höhere Wahrscheinlichkeit, pathologische Auswirkungen auf den Phänotyp hervorzurufen (Botstein und Risch 2003).

#### 4.3.3 Funktionelle Regionen des MRP2 Proteins

Aus evolutionsbiologischer Sicht unterliegen genetische Variationen in funktionell relevanten Regionen durch ihren Einfluss auf den Phänotyp einem höheren Selektionsdruck (Strachan und Reed 2004) als Varianten, die kaum Einfluss auf die Funktion eines Proteins haben. Je stärker also eine Proteinsequenz im Laufe der Evolution erhalten geblieben ist, umso wahrscheinlicher ist ihre Bedeutung für die Funktion des Proteins (Stephens et al. 2001; Salisbury et al. 2003). So führen genetische Variationen stark konservierter Aminosäuren mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu funktionellen oder klinischen Auswirkungen. Ebenso korreliert die Schwere der phänotypischen Veränderungen mit dem Grad der Konservierung der ausgetauschten Aminosäure (Miller und Kumar 2001; Botstein und Risch 2003).

Zu den am stärksten konservierten Strukturen der ABC-Transporter Familie zählen die Nukleotid-bindenden Domänen („*nucleotide binding domains*“; NBDs). Sie enthalten drei ausgesprochen stark konservierte Bereiche (Walker A, B, und C Motive), die in allen ABC-Transportern gefunden werden und für diese charakteristisch sind. Das Walker C-Motiv stellt die so genannte Signatur der ABC-Transporter Familie dar und unterscheidet sie von anderen ATP-bindenden Proteinen. Indem die NBDs die durch Bindung und Hydrolyse von ATP gewonnene Energie übertragen, besitzen sie entscheidende Bedeutung für die Transportaktivität des Proteins. Somit können Sequenzänderungen in diesen Abschnitten gravierende Funktionseinbußen bedingen (Hyde et al. 1990; Dean et al. 2001; Gerk und Vore 2002; Kruh und Belinsky 2003; Schwab et al. 2003). Die Mutationsanalyse bei Patienten mit DJS zeigt für fast alle gefundenen direkten Mutationen der Kodiersequenz eine Lokalisation innerhalb der ATP-bindenden Domänen (NBDs) oder ihren benachbarten Regionen (Toh et al. 1999). Interessanterweise befinden sich auch bei Patienten mit zystischer Fibrose ~80% der genetischen Variationen ebenso in der ABC-

Region und verursachen dabei eine schwere Form dieser Krankheit (Toh et al. 1999; Dean et al. 2001). Diesen Ergebnissen stehen einige gefundene Allelvarianten gegenüber, die trotz ihrer Lokalisation innerhalb einer ATP-bindenden Region nicht zu einem DJS führen. So befindet sich die bei einem japanischen Patientenkollektiv nachgewiesene Mutation *c.G4348A* (Ala1450Thr) mit einer Allelfrequenz von 1% sogar innerhalb des Walker C Motivs der NBD2, ohne die Funktion des Proteins pathologisch zu beeinträchtigen. Auch die Allelvariante *c.C2366T* (Ser789Phe) ist trotz ihrer Lokalisation innerhalb der NBD1 bislang nicht als ursächlich für das DJS beschrieben worden (Ito et al. 2001; Suzuki et al. 2002).

Neben den NBDs zählen auch die Membran-spannenden Domänen („*membrane spanning domains*“, MSD) des *ABCC2/MRP2* zu den stark konservierten Bereichen von ABC-Transporterproteinen. Sie sind für die Substraterkennung und -spezifität bedeutsam und besitzen Einfluss auf die Transportaktivität (Toh et al. 1999; Ryu et al. 2000; Konno et al. 2003). Analysen des P-GP 170 (MDR1) weisen ebenfalls auf diese funktionelle Bedeutung hin (Schwab et al. 2003). Jedoch konnte auch für andere Bereiche außerhalb der MSD, wie beispielsweise intra- oder extrazelluläre Loops oder ATP bindende Domänen, ein Einfluss auf die Substraterkennung gezeigt werden (Dean et al. 2001; Gerk und Vore 2002; Schwab et al. 2003; Kruh und Belinsky 2003).

#### **4.4 Synonyme Genvariationen ohne Aminosäureaustausch**

Drei der gefundenen Genvarianten innerhalb der kodierenden Sequenz gehen nicht mit einem Aminosäureaustausch einher. Bei allen drei SNPs *c.C3972T* (Exon 28, Ile1324Ile; rs3740066), *c.G4290T* (Exon 30, Val1430Val; rs7904678) und *c.C4488T* (Exon 31, His1496His; rs8187707) befindet sich der Basenaustausch an der dritten Position („*wobble-position*“) des kodierenden Basentriplets, was aufgrund der Degeneration des genetischen Codes häufig nicht zu einem Unterschied in der Translation führt. Bei der Variation *c.G4290T* liegt eine Transversion von einer Purinbase zu einer Pyrimidinbase zugrunde. Im Gegensatz dazu wird bei *c.C3972T* und *c.C4488T* eine Pyrimidinbase C durch eine weitere Pyrimidinbase T ersetzt (Transition). Alle drei Variationen sind im carboxyterminalen, zytoplasmatischen Bereich des Gens lokalisiert.

Zwar verändern synonyme Genvarianten nicht unmittelbar die Aminosäuresequenz des Proteins, jedoch können sie an phänotypischen Veränderungen beteiligt sein. Beispielsweise ist beim P-GP 170 der bisher einzige Polymorphismus, der aufgrund einer signifikanten Verringerung der Expression und Funktion des Proteins die intestinale Resorption und Elimination beeinträchtigt, ebenfalls eine synonyme Genvariation ohne

Aminosäureaustausch (c.C3435T; Ile1145Ile). Bei Vorliegen des homozygoten Genotyps c.3435T/c.3435T, der mit 28,6% häufig vorkommt, konnte nach oraler Applikation von Digoxin eine signifikant höhere Plasmakonzentration im Vergleich zum c.3435C/c.3435C Genotyp nachgewiesen werden (Hoffmeyer et al. 2000; Cascorbi et al. 2001). Der molekulare Mechanismus, der dem Phänomen zugrunde liegt, ist umstritten. Eine mögliche Ursache ist ein starkes „*linkage disequilibrium*“ mit einer bisher nicht identifizierten Veränderung, die in der Promoter oder einer Enhancer-Region lokalisiert sein könnte (Schwab et al. 2003). Als Ursache ist aber auch ein Einfluss auf die RNA-Halbwertszeit in Betracht gezogen worden (Wang et al 2005).

Auch könnte der Polymorphismus die Konformation der RNA beeinflussen und auf diese Weise Einfluss auf die Translationseffizienz besitzen (Shen et al 1999; Schwab et al. 2003). Die Gruppe von Gottesman zeigte in Zusammenhang mit dem c.3435T-Allel des *MDR1*-Gens durch Expression von verschiedenen Varianten der cDNA, dass es zu einer unterschiedlichen Funktionalität des Proteins unter bestimmten experimentellen Bedingungen kam (Kimchi-Sarfaty et al 2007). Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass es durch die Benutzung des beim Menschen seltener verwendeten Ile-Triplets (ATT) des c.3435T-Allels es zu einer veränderten kotranslationellen Faltung des Proteins mit einer nachfolgenden Funktionsveränderung kommt. Dieser neue Mechanismus auf dem synonyme Mutationen die Funktion eines Proteins beeinflussen bedarf sicher weiterer Überprüfung. Hier ist insbesondere das *MDR1*-Protein als besonders kritisch anzusehen, da mehrere biochemische Charakteristika dieses Proteins von den Charakteristika klassischer ABC-Transporter abweichen: die Substratspezifität dieses Moleküls ist ungewöhnlich breit und der ATP-Verbrauch weitgehend vom Transportvorgang entkoppelt (konstitutive ATPase-Aktivität). Darüber hinaus ist die Transport-Kinetik häufig nicht sättigbar, was auf einen Prozess hindeutet, der signifikant von einer Michaelis-Menten Kinetik abweicht (siehe Übersicht in Roepe PD, 2000)

Abhängig von ihrer Lokalisation innerhalb bestimmter regulierender Exonsequenzen (ESE: „*exonic splicing enhancer*“; ESS: „*exonic splicing silencer*“), die durch Interaktion mit modulierenden Proteinen für das korrekte Spleißen der mRNA notwendig sind, können SNPs ebenso unabhängig von ihrer Aminosäuresequenz diesen Prozess entscheidend beeinflussen (Maquat 2001). Auch könnten sie durch das Entstehen neuer „*splice sites*“ („*cryptic splice sites*“) das Spleißen und entsprechend die RNA Sequenz entscheidend verändern (Strachan und Reed 2004).

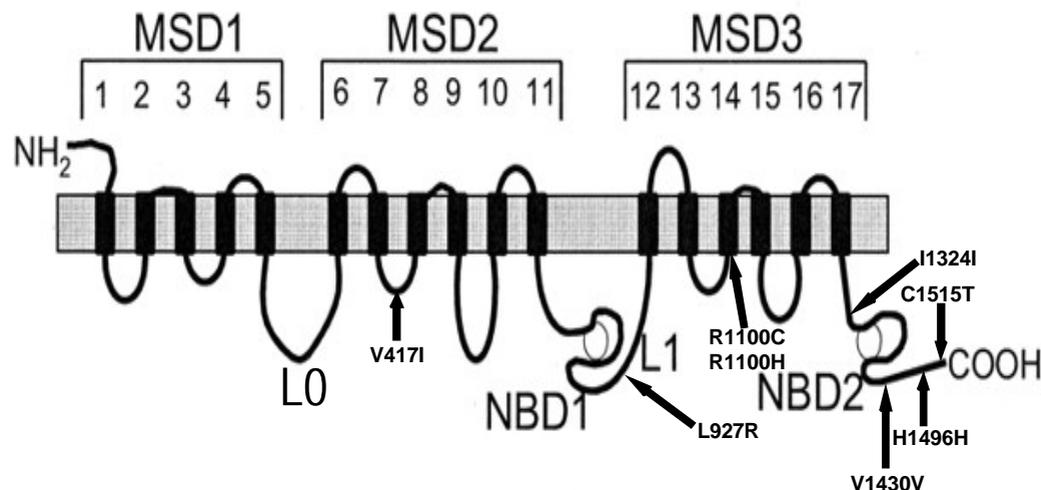
Interessanterweise konnte bei den gefundenen synonymen Genvarianten c.G4290T

(Ile1324Ile) und *c.C4488T* (His1496His) des *MRP2*, die jeweils mit einer Allelfrequenz von 5% vorkamen, ein Kopplungsungleichgewicht mit mehreren anderen genetischen Varianten festgestellt werden. Die Aminosäure Isoleucin an Position p.1324 (Exon 28) befindet sich in einem phylogenetisch hochkonservierten Bereich. Grundsätzlich stellt Isoleucin eine selten vorkommende Aminosäure innerhalb des menschlichen Proteoms dar (Schwab et al. 2003). Jedoch muss in weiterführenden funktionellen Studien in Kombination mit der Analyse der Haplotypen untersucht werden, inwieweit diese Genvarianten mit Änderungen des Phänotyps einhergehen.

#### 4.5 Missense Mutationen

##### 4.5.1 „Missense“ Mutationen in Bezug zur Molekularstruktur

In Abbildung 4.1 sind alle in dieser Untersuchung gefundenen synonymen und „missense“-Mutationen in Bezug zur Proteinstruktur graphisch dargestellt. Die funktionelle Bedeutung der jeweiligen Bereiche spielt eine große Rolle bei den möglichen Auswirkungen der genetischen Variationen auf den Phänotyp.



**Abbildung 4.1:** Darstellung der in dieser Arbeit gefundenen Polymorphismen der Kodierregion.

##### 4.5.2 Val417Ile

Dem Basenaustausch G nach A an Position *c.1249* liegt eine Transition der ersten Base des kodierenden Triplets zugrunde (*c.G1249A*, rs2273697), was zu einem konservativen Aminosäureaustausch Valin nach Isoleucin an Position 417 führt. Dies ist die häufigste Möglichkeit eines Aminosäureaustausches (Collins 1994) und stellt in den seltensten

Fällen die pathogenetische Grundlage einer hereditären Krankheit dar (Miller und Kumar 2001). Dabei wird die chemische Eigenschaft bis auf die Einführung eines neuen Chiralitätszentrums in der Seitenkette des Isoleucins kaum verändert. Beide Aminosäuren besitzen hydrophobe Eigenschaften mit gleichem isoelektrischem Punkt sowie annähernd identischer Masse (Strachan und Reed 2004). Mit einer Allelfrequenz von 18,6% des selteneren Allels (*c.1249A*) ist dieser Polymorphismus relativ häufig. Innerhalb des japanischen Probandenkollektivs wurde die Frequenz des *c.1249A*-Allels mit 12,5% bestimmt (Ito, S et al 2001).

Der Aminosäureaustausch Val417Ile ist in der intrazellulären Schleife zwischen der siebten und achten transmembranen Domäne (TM7 und TM8) in der zweiten Membranspannenden Domäne (MSD2) lokalisiert (Ryu et al. 2000). Für diese Region wird eine funktionelle Rolle bei der Substrataffinität und der Transportaktivität postuliert (Ryu S et al. 2000; Konno et al. 2003, Hulot et al. 2005). Die von Hulot et al. (2005) beschriebene Mutation *c.A1271G* befindet sich in unmittelbarer Nähe ebenso innerhalb der MSD2. Diese Mutation geht mit einem Aminosäureaustausch Arg412Gly einher. Bei Heterozygotie *c.1271A/1271G* resultiert ein Dubin-Johnson-Carrier Status. Letzterer ist mit diskreten biochemischen Auffälligkeiten verknüpft (s.u.). In einer funktionellen Studie mit transfizierten Zellen geht der Aminosäureaustausch Arg412Gly mit dem Verlust des transmembranen Transports von Methotrexat einher. Dies ist bei regelrechter Expression und Lokalisation innerhalb der zytoplasmatischen Membran auf eine Dysfunktion des MRP2 Proteins zurückzuführen (Hulot et al 2005). Diese Mutation wurde bei einem Patienten mit einem malignen Lymphom entdeckt, der einer Hochdosis-Therapie mit Methotrexat unterzogen worden war. Der Patient wies eine ausgesprochen deutliche Verlangsamung der MTX-Ausscheidung auf. Der Patient entwickelte in Folge der veränderten Kinetik von Methotrexat ein akutes Nierenversagen, das sowohl durch Dialyse wie auch durch Gabe des MTX-inaktivierenden Enzyms Carboxypeptidase bekämpft werden musste (Hulot et al. 2005). Nachdem der Patient sich erholt hatte, wurde eine Genotypisierung des *ABCC2*-Gens vorgenommen und die oben beschriebene Mutation gefunden. Biochemisch wurden die Charakteristika eines DJS-Carrierstatus gefunden, der durch eine Isomerenverschiebung im Coproporphyrin-I/Coprohorphyrin-III-Verhältnis charakterisiert ist. Die Mutation wurde bislang bei keinem Patienten mit einem manifesten DJS beobachtet.

Zwar scheint die Lokalisation in einer intrazellulären Schleife keinen direkten Einfluss auf die Substratbindung auszuüben, doch geht man davon aus, dass sie eine wesentliche Rolle bei der Konformation und der Stabilität der Transmembrandomänen besitzen

können. Beispielsweise ist die Mutation Arg1150His, welche das DJS hervorruft, innerhalb eines intrazellulären Loops zwischen TM15 und TM16 lokalisiert und führt trotz normaler Expression an korrekter Lokalisation zum vollständigen Verlust der Transportaktivität des MRP2 (Mor-Cohen et al. 2001; Suzuki et al. 2002; Keitel et al 2003).

#### 4.5.3 Leu927Arg

Die nicht in der Literatur vorbeschriebene Transversion *c.T2780G* des Exon 21 erfolgt an der zweiten Position des Basentriplets CTG. Ein Basenaustausch an dieser Position verursacht stets einen Aminosäureaustausch („*non-synonymous*“) und verändert meist auch den chemischen Charakter der betroffenen Aminosäure (Strachan und Reed 2004). So führt die seltenere Genvariante zu einem Austausch der hydrophoben Aminosäure Leucin durch die hydrophil basische Aminosäure Arginin an Position 927. Gemäß der Skala nach Grantham führt dieser Austausch zu keiner gravierenden chemischen Veränderung und ist als relativ konservativ zu betrachten (Grantham 1974). Auch stellt er nur in seltenen Fällen die Ursache einer hereditären Krankheit dar (Miller und Kumar 2001). Die Mutation ist in 3'-Richtung in unmittelbarer Nähe zur ersten ATP bindenden Domäne (NBD1) lokalisiert. Dieser relativ gering konservierte Bereich innerhalb des Zytoplasmas wird als Linker Region (L1) bezeichnet und sorgt für die Kommunikation zwischen der NH<sub>2</sub>-proximalen Nukleotid bindenden Domäne (NBD1) und der COOH-terminalen Membran spannenden Domäne (MSD3). Funktionelle Untersuchungen an dem nahe verwandten MRP1 weisen drauf hin, dass diese Region weder für den aktiven Transport noch für eine mögliche Interaktion der beiden NBDs zwingend erforderlich ist (Gao et al. 1998; Konno et al. 2003; Kruh und Belinsky 2003). Inwieweit diese Region die Affinität der NBDs zu ATP oder die katalytische Aktivität beeinflussen kann, muss in weiteren Studien geklärt werden.

#### 4.5.4 Arg1100Cys und Arg1100His

Bei der SSCP-Analyse des Exon 24 konnten zwei verschiedene Allele nachgewiesen werden, die bisher noch nicht beschrieben worden waren. Dabei befinden sich die beiden Transitionen *c.C3298T* und *c.G3299A* jeweils an der ersten bzw. zweiten Position desselben Basentriplets und führen zu unterschiedlichem Aminosäureaustausch des Arginin an Position p.1100. Während der Polymorphismus *c.C3299T* mit dem Austausch nach Cystein (Arg1100Cys) eher eine radikale chemische Veränderung bewirkt, ersetzt der Basenaustausch *c.G3299A* die hydrophil basische Aminosäure Arginin durch Histidin (Arg1100His). Diese beiden Aminosäuren besitzen ähnliche chemische Eigenschaften, weshalb es sich gemäß der Grantham Skala eher um einen konservativen Austausch

handelt (Grantham 1974; Miller und Kumar 2001). Innerhalb der untersuchten 118 Allele konnten diese genetischen Varianten jeweils einmal nachgewiesen werden und besitzen eine Allelfrequenz von 1%. Eine Computer unterstützte Vorhersage (NetPhos 2,0 Server) möglicher Phosphorylierungsstellen des MRP2 ergibt für das an Position p.1101 lokalisierte Serin einen relativ geringen prädiktiven Wert von 0,48. Die beiden unmittelbar benachbarten Polymorphismen üben einen konträren Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens dieser Phosphorylierungsstelle aus. Während der prädiktive Wert für Arg1100Cys auf 0,04 abnimmt, steigt für Arg1100His die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Vorhersage auf 0,8. Diese Beobachtung könnte zu dem Entstehen einer neuen Phosphorylierungsstelle führen. Auch die Position nahe dem Zytoplasma der transmembranen Aminosäure würde die Möglichkeit einer Phosphorylierung eröffnen.

#### *4.5.4.1 Funktionelle Relevanz transmembraner Regionen*

Die kationische Aminosäure Arginin befindet sich innerhalb der 14ten transmembranen Helix (TM14) der dritten Membran spannenden Domäne (MSD3) (Ryu et al. 2000). Die besondere Bedeutung transmembraner Regionen für die Interaktion mit ihren Substraten und deren Transport ist bei den Transporterproteinen P-GP 170 und MRP1 beschrieben. Auch für MRP2 besitzen gerade konserviert erhaltene kationische Aminosäuren innerhalb oder in unmittelbarer Nähe transmembraner Helices der MSD2 und MSD3 eine wesentliche Bedeutung bei der Erkennung und dem Transport anionischer Substrate (Gerk und Vore 2002; Cai et al. 2003; Konno et al. 2003; Kruh und Belinsky 2003). Genvarianten mit veränderter Ladung ergeben sowohl Unterschiede in der Transportaktivität (Ryu et al. 2000) als auch in der Substratspezifität (Ito, K und Oleschuk 2001; Ito, K und Suzuki 2001) des MRP2. Gerade die Lokalisation des Arg1100 unmittelbar an der zytoplasmatischen Seite der transmembranen Helix (TM14) scheint eine wichtige Voraussetzung für die Interaktion mit Substraten darzustellen (Ito, K und Oleschuk 2001).

#### *4.5.4.2 Beteiligung des Arg1100 an der Substratspezifität*

Bei einem gezielten Austausch des Arginin an Position p.1100 durch Alanin zeigte sich eine regelrechte Expression und Lokalisation des humanen MRP2. Auch die Transportaktivität für Glutathion Konjugate war bei diesem Aminosäureaustausch nicht verändert (Ryu et al. 2000). In der Studie von Ito, K und Suzuki (2001) hingegen führte der Austausch der äquivalenten Aminosäure in dem MRP2 der Ratte (Arg1096) zu entscheidenden Änderungen der Substratspezifität. Dabei wurde Arginin jeweils durch die

neutralen Aminosäuren Leucin und Methionin oder durch die basische Aminosäure Lysin ersetzt (Arg1096Leu, Arg1096Met, Arg1096Lys). Alle drei Genvarianten wiesen die erworbene Fähigkeit auf, ATP-abhängig Taurocholate (TC) zu transportieren. Diese Moleküle gehören eigentlich nicht zum physiologischen Substratspektrum des MRP2. Die Transportaktivität bei physiologischen, konjugierten Substraten blieb davon unbeeinflusst (Akita et al. 2000; Ito, K und Suzuki 2001).

Gezielte Mutationsanalysen der analogen Aminosäureposition (Leu1084) des MRP3, das im Gegensatz zu MRP2 monovalente Gallensäuren (Taurocholate, Cholate und Glykocholatan) als Substrate durch die basolaterale Membran transportiert, ergaben Hinweise auf die Grundlagen der unterschiedlichen Substratspezifität dieser ABC-Transporter. So scheint die kationische Ladung in der transmembranen alpha-Helix des MRP2 (Arg1096) einen Transport von TC zu verhindern, während die neutrale Ladung an korrespondierender Position des MRP3 (Leu1084) eine Voraussetzung für diesen Transport darzustellen scheint. Denn nur ein Austausch des Leucin durch eine basische (Lysin), nicht aber durch ebenfalls neutrale Aminosäuren (Valin und Methionin), führte zu einem Verlust der MRP3 Transportaktivität für TC und Glucuronid Konjugate. Somit stellt der Einfluss der positiven Ladung des Arginins auf die Konformation des Proteins eine Ursache für die unterschiedliche Substratspezifität und Transportaktivität dar. Zusätzlich scheinen die umgebenden Aminosäuren bei der Transportaktivität beteiligt zu sein. Denn eine erworbene Transportfähigkeit des MRP2 für TC konnte auch festgestellt werden, obwohl ein Aminosäureaustausch vorlag, bei dem die kationischen Eigenschaften (Arginin nach Lysin an Position 1096) beibehalten wurden (Ito, K und Suzuki 2001).

Allerdings entspricht der erworbene interaktive Bereich der TC nicht der Interaktionsstelle der physiologischen Substrate des MRP2. Bereits die Tatsache, dass TC einen stimulatorischen Effekt auf den Transport des Wildtyp-MRP2 besitzen, deutet auf das Vorliegen einer zusätzlichen Interaktionsstelle für TC hin (Zelcer et al. 2003). Diese Hypothese wird unterstützt von der Beobachtung, dass TC bei den genannten Genvarianten (Arg1096Leu, Arg1096Lys, Arg1096Met) den Transport der physiologischen Substrate hemmen, während umgekehrt die physiologischen Substrate den erworbenen, MRP2 vermittelten Transport der TC stimulieren. Eine mögliche Erklärung für den molekularen Mechanismus dieser mutationsbedingten Interaktionsunterschiede ist das Vorliegen einer modulatorischen (allosterischen) Region des MRP2 (Ito, K und Oleschuk 2001; Ito, K und Suzuki 2001; Zelcer et al. 2003), wie dies bereits für das P-Glykoprotein 170 beschrieben worden ist (Dey et al. 1999). Zelcer et al. (2003) beschreiben neben dem Bereich, der für den Transport der Substrate verantwortlich ist („Substrate-Site“, „S-site“),

das Vorliegen einer zweiten allosterischen Bindungsstelle für Liganden des MRP2, die regulierend auf den Transport einwirken kann („Modulatory Site“, „M-site“). Indem Taurocholat als Modulator an diese allosterische Region bindet, induziert es eine strukturelle Veränderung, die gemäß dem „*induced fit*“-Modell zu einer besseren Interaktion der Substrate mit der „S-site“ führen kann. Zwar stellt es selbst kein Substrat des Wildtyp-MRP2 dar, doch scheint es in höheren Konzentrationen um die Substratbindungsstelle („S-site“) zu konkurrieren. Inwieweit Taurocholat selbst von MRP2 transportiert wird, hängt von seinen Interaktionen mit der Substrat bindenden Region („S-site“) ab (Zelcer et al. 2003). Genau darauf scheint die untersuchte kationische Aminosäure (Arg1096) des MRP2 der Ratte gravierenden Einfluss zu besitzen (Ito, K und Suzuki 2001).

Welche Konsequenzen letztendlich die gefundenen Veränderungen der äquivalenten kationischen Aminosäure des humanen MRP2 (Arg1100) auf die Substratspezifität und Transportaktivität besitzt, muss in funktionellen Studien untersucht werden. Von den gefundenen Mutationen könnte der radikale Aminosäureaustausch Arginin nach Cystein (Arg1100Cys) am ehesten zu funktionellen Auswirkungen auf die Substratspezifität führen, da die kationischen Eigenschaften mit dem ambivalenten Cystein an dieser Position verloren gehen. Mögliche Disulfidbrücken-Bindungen des Cysteins könnten entfernte Teile des Proteins kovalent miteinander verbinden und somit einen Einfluss auf die Tertiärstruktur des Proteins besitzen (Strachan und Reed 2004). Im Gegensatz dazu bleiben bei dem konservativen Austausch des Arginins durch das ebenfalls kationische Histidin die hydrophilen und basischen Eigenschaften erhalten. Jedoch könnten neu aufgetretene aromatische Wechselwirkungen von Histidin Einfluss auf die Substratspezifität nehmen. Entsprechende Wechselwirkungen scheinen eine ausschlaggebende Bedeutung für die Konformation der Substrat-bindenden Region und damit die Substratspezifität und Transportaktivität von ABC-Transportern zu besitzen (Ito, K und Oleschuk 2001).

#### 4.5.5 Cys1515Tyr

Die Transition von Guanin nach Adenosin an Position *c.4544* (*c.G4544A*, rs#8187710) führt zu einem radikalen Aminosäureaustausch von Cystein nach Tyrosin an Position p.1515 des MRP2 Proteins (Cys1515Tyr). Innerhalb des Probandenkollektivs wurden sechs Probanden mit heterozygotem Vorliegen dieser Allelvariante nachgewiesen, was einer Allelfrequenz von 5% entspricht. Dabei ändert sich gemäß der Grantham Skala die chemische Eigenschaft der Aminosäure entscheidend, was mit höherer

Wahrscheinlichkeit zu einer Änderung des Phänotyps führt (Grantham et al. 1974; Miller und Kumar 2001; Botstein und Risch 2003). Aus evolutorischer Sicht ist Cystein eine sehr stark konservierte Aminosäure, welche von allen Aminosäuren die geringste Mutabilität und Variabilität zwischen unterschiedlichen Spezies besitzt. Der Austausch von Cystein scheint also einem starken Selektionsdruck zu unterliegen und mit höherer Wahrscheinlichkeit zu pathologischen funktionellen Konsequenzen zu führen. Durch die Möglichkeit als einzige Aminosäure untereinander Disulfidbrücken-Bindungen einzugehen, ist Cystein entscheidend an der strukturellen Konformation des Proteins beteiligt und kann nur selten ohne funktionelle Konsequenzen durch eine andere Aminosäure ersetzt werden (Collin und Jukes 1994; Strachan und Reed 2004). Die Einführung eines aromatischen Ringes mit dem chemisch stark divergierenden Tyrosin könnte durch aromatische Wechselwirkungen innerhalb des Moleküls zu Auswirkungen auf die Tertiärstruktur führen (Ito, K und Oleschuk 2001). Darüber hinaus kann Tyrosin als Substrat von Tyrosinkinase im Protein phosphoryliert werden, jedoch ergibt die Computer unterstützte Vorhersage nur einen geringen prädikativen Wert (0,11) für das Tyr1515 als Phosphorylierungsstelle (NetPhos 2,0 Server). Interessanterweise befindet sich bei den phylogenetisch nächsten Verwandten des MRP2, nämlich MRP1, MRP3 und MRP4 an der Position 1515 ein Tyrosin in der Wildtyp-Proteinsequenz. Einzig MRP2 besitzt dort ein Cystein als physiologisch vorkommende Aminosäure.

#### 4.5.5.1 Funktionelle Relevanz der Carboxy-terminalen Aminosäuresequenz

Bei Aussagen über mögliche funktionelle Auswirkungen des radikalen Aminosäureaustausches Cys1515Tyr muss vor allem die zytoplasmatische Position am stark konservierten Carboxy-terminalen Ende des Proteins und dessen funktionelle Bedeutung in Betracht gezogen werden. Während gerade konserviert erhaltene Aminosäuren des Carboxy-terminalen Drittels für den Vorgang der Bindung und des Transportes von Substraten notwendig sind (Stride et al. 1999; Konno et al. 2003), spielt dieser Bereich des Proteins vor allem bei der korrekten Lokalisation des MRP2 innerhalb polarisierter Zellen eine wichtige Rolle (Suzuki et al. 2002; Konno et al. 2003; Kruh und Belinsky 2003; Mizuno et al. 2003). Dabei bindet ein Signalprotein PDZ-K1 an die letzten drei Aminosäuren Thr-Lys-Phe (TKF) des Carboxyl-Endes, die so genannte „*PDZ-interacting domain*“ (Kocher et al. 1999; Hegedus et al. 2003). Die Interaktion mit dem Signalprotein scheint für eine korrekte subzelluläre Lokalisation des Proteins in der apikalen Membran epithelialer Zellen verantwortlich zu sein ( „*molecular targeting signal*“; Harris et al. 2001; Hegedus et al. 2003). Laut Harris et al. 2001 führt bereits ein Fehlen

der letzten drei Aminosäuren (TKF, „*PDZ-interacting domain*“) zu einer basolateralen Lokalisation des MRP2 innerhalb der Plasmamembran. Hingegen verhinderte bei Nies et al. 2002 erst ein Entfernen der 15 Carboxy-terminalen Aminosäuren eine korrekte apikale Lokalisation des Proteins innerhalb polarisierter Zellen. Konno et al. zeigten 2003 die Notwendigkeit der 45 Carboxy-terminalen Aminosäuren bei der Verankerung des MRP2 in der Membran. Dies scheint für dessen subzelluläre Position in der Plasmamembran notwendig zu sein, jedoch keine Bedeutung für eine apikale Lokalisation zu besitzen (Konno et al. 2003). Inwieweit zusätzlich der Einfluss dieser Region auf die Konformation und Stabilisation des Proteins nach Freiwerden aus dem endoplasmatischen Retikulum verantwortlich sind, muss noch geklärt werden (Nies et al. 2002; Suzuki et al. 2002; Kruh und Belinsky 2003).

Eine weitere Voraussetzung für eine korrekte Lokalisation des MRP2 scheint Radixin (Rdx) als Protein des Zytoskelett der Plasmamembran darzustellen. Diese Hypothese ergab sich aus Untersuchungen Rdx-negativer („*knock-out*“) Mäuse, bei denen eine verringerte Expression des MRP2 in der apikalen Membran der Hepatozyten sowie eine konjugierte Hyperbilirubinämie festgestellt wurden. Die Funktion des Rdx besteht in der Verbindung von Aktinfilamenten mit integralen Membrantransportern. Für die direkte Interaktion mit dem MRP2 ist wiederum das zytoplasmatische Carboxy-terminale Ende des Proteins eine entscheidende Voraussetzung (Kikuchi et al. 2002; Mizuno et al. 2003).

Inwieweit der gefundene radikale Aminosäureaustausch (Cys1515Tyr) am Carboxy-terminalen Ende schließlich funktionelle Auswirkungen auf die korrekte Lokalisation oder den Transport seiner Substrate besitzt, muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

## **4.6 Intron SNPs**

### **4.6.1 „Genes work better with introns“**

Mit dieser Aussage von Wissenschaftlern, die sich mit der „*in vitro*“-Expression von eukaryoten Genen beschäftigen, wird die physiologische Relevanz der Introns angedeutet. Mattick et al 1994 bezeichnete Intron-RNA (iRNA) als funktionelle Introns. Zwar führt ein Basenaustausch innerhalb nicht-kodierender DNA Sequenzen nicht direkt zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz eines Proteins, jedoch können auch genetische Veränderungen in Introns gravierende Auswirkungen auf den Phänotyp hervorrufen. Eine wichtige funktionelle Bedeutung besitzen Introns durch ihren Einfluss auf die Regulation der Genexpression. Bestimmte Bereiche in Introns können als Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren eine „*enhancer*“ Funktion erfüllen und so die

Transkriptionsaktivität beeinflussen. Neben diesen regulatorischen Einflüssen auf ihr eigenes Gen („*cis-acting*“) können Abschnitte von Intron-RNA mit anderen Genen, RNA oder Proteinen interagieren („*trans-acting*“) und somit selbst als flexible Regulationsfaktoren die Transkription oder Translation anderer Bereiche modifizieren. Darüber hinaus befinden sich innerhalb der Introns mehrere kodierende Bereiche. Dabei kodieren sie entweder für einen unabhängigen Promoter, der die Transkription kontrolliert, oder sie stellen nach ihrer Transkription eine eigenständige RNA (snRNAs oder snoRNAs) im Nukleus der Zelle dar, der regulatorische Funktionen zugeschrieben werden können (ISIS: Intron Sequenz Information System <http://www.isis.bit.uq.edu.au>).

Durch Auswirkungen auf den Vorgang des Spleißens der mRNA können SNPs in Introns zu einer unterschiedlichen RNA-Sequenz führen und so den Phänotyp beeinflussen. Indem sie die spezifischen Sequenzabschnitte ändern, die für eine regelrechte Trennung von Exon und Intron benötigt werden, können sie zu dem Verlust eines Exons („*exon skipping*“) oder zum Beibehalten eines Introns („*intron retention*“) führen. Ebenso kann eine neue „*splice site*“ („*cryptic splice site*“) aktiviert werden oder eine Nukleotidsequenz entstehen. (Nakai et al 1994, Mor-Cohen et al. 2005). Das Model von Green et al. 1991 beschreibt dabei die Konkurrenz potentieller „*splice sites*“ der pre-mRNA um das Binden von „*splicing*“-Faktoren und die Generierung von Spleißosomen (Green MP 1991, MorCohen et al. 2005).

Insgesamt vier Mutationen des *ABCC2*, die durch Funktions- und Expressionsverlust des MRP2 Proteins das DJS hervorrufen, befinden sich innerhalb der „*splice donor sites*“. Bei sämtlichen Deletionen kann MRP2 in der Leber immunhistochemisch nicht mehr nachgewiesen werden (Tate et al. 2002). Dabei betreffen die Polymorphismen *c.T1815+2A*, *c.T1967+2C* und *c.C1967+2T* jeweils die zweite Thymidin-Base einer Donor *GT*-Dinukleotid-Sequenz und führen durch Einfluss auf das Spleißen zu einer Deletion der gesamten nachfolgenden Exons (Kajihara 1998; Wada et al. 1998; Toh et al. 1999; Tate et al. 2002). Beispielsweise verursacht *c.T1815+2A* innerhalb der zweiten Membranspannenden Domäne (MSD2) eine Deletion des gesamten Exon 13 (*1669Del147*), die 147 Basenpaare umfasst (Toh et al. 1999). Durch die Deletion des Exon 18 (*2272Del168*) bei der Mutation *c.T2439+2C* kommt es zum Verlust der stark konservierten Bereiche Walker B und Walker C innerhalb der ersten ATP bindenden Domäne (NBD1) (Toh et al. 1999; Tate et al. 2002). Zu den Erkennungssequenzen für die Enzyme des Spleißvorgangs gehören aber neben der „*splice acceptor site*“ (*AG*-Dinukleotide) am 5´-Anfang bzw. der „*splice donor site*“ (*GT*-Dinukleotide) am 3´-Ende eines Introns auch der Polypyrimidin-Trakt und die Verzweigungs-Sequenz in der Nähe des 3´-Endes des

Introns. Mutationen in diesen intronischen Abschnitten können an der Entstehung hereditärer Erkrankungen beteiligt sein. So sind beispielsweise die Mutationen, die zur Neurofibromatose Typ 1 führen, meist Mutationen, die das Splicing der Transkripte verändern (Ars E. et al Hum Mol Genet. 2000)

Die Mutation des Intron 8 (c.A867+4G, 1012Del20), welche ursächlich für das DJS identifiziert wurde, führt durch verändertes Spleißen zu unterschiedlichen aberranten Produkten, die durch eine Exon-Deletion und durch einen „frameshift“ mit einem vorzeitigen Transkriptionsstop charakterisiert sind (Krawczak et al. 1992; Mor-Cohen et al. 2005). Dies ist nicht nur auf die Veränderung einer bestehenden „*splice site*“, sondern auch auf das Entstehen einer neuen „*splice site*“ („*cryptic splice site*“) zurückzuführen (Mor-Cohen et al. 2005).

Croft et al 1999 konnten die enorme Bedeutung des „*alternative splicing*“ bei der Regulation der Genexpression zeigen. Indem je nach Zelle, Gewebe, Entwicklungsstufe oder unter divergierenden physiologischen Bedingungen aus einem Gen viele unterschiedliche mRNA- und Protein- Isoformen hervorgebracht werden können, stellt das „*alternative splicing*“ einen essentiellen Mechanismus dar, die genetische Komplexität zu erhöhen und funktionell divergierende Proteine und Genprodukte aus dem gleichen Gen hervorzubringen (Croft et al. 2000; ISIS: Intron Sequenz Information System <http://www.isis.bit.uq.edu.au>). Introns spielen dabei auf unterschiedlichste Weise eine wichtige Rolle und können durch SNPs in ihrer Funktion beeinflusst werden. Beispielsweise können sie Bindungsstellen für SR-Proteine beinhalten, welche das „*alternative splicing*“ lenken. Auch können Intron-Sequenzen bei entstehenden Spleißvarianten selbst Bestandteil eines kodierenden Bereiches und somit des Proteins werden (Lopez et al. 1998; ISIS: Intron Sequenz Information System <http://www.isis.bit.uq.edu.au>).

#### 4.6.2 Gefundene Intron-SNPs des ABCC2 Gens

Von den detektierten Genvarianten befinden sich vier Stück innerhalb nicht-kodierender Intronsequenzen. Der Basenaustausch c.C2883+11T flankiert das Exon 21 in 3´-Richtung und besitzt bei einmaligem Vorkommen innerhalb des Patientenkollektives eine Allelfrequenz von 1%. Die weiteren SNPs innerhalb nicht-kodierender Bereiche sind c.A3844-73G im Intron 27, c.G4146+11C im Intron 29 und c.G4508+12A des Introns 31 und befinden sich somit in unmittelbarer Nähe zur „*splice donor site*“. Diese räumliche Beziehung mit der „*splice site*“ Nukleotidsequenz kann die Aktivierung einer „*cryptic splice site*“ hervorrufen, jedoch kann keine Aussage über die notwendige Homologie mit der

„*splice site*“-Nukleotidsequenz getroffen werden (Krawczak et al. 1992; Nakai et al. 1994; Mor-Cohen et al. 2005). Diese drei Intron SNPs traten ausschließlich zusammen mit den beiden synonymen Genvarianten *c.C4290T* (Val1430Val) und *c.C4488T* (His1496His) sowie mit der nicht-synonymen Allelvariante *c.G4544A* (Cys1515Tyr) jeweils in heterozygoter Form auf. Die Allelfrequenz dieser SNPs beträgt 5% und eine durchgeführte Haplotypenanalyse wird unter 4.8 geschildert. Gerade die SNPs der Introns 27 (*c.A3844-73G*) und 29 (*c.G4146+11C*) flankieren funktionell relevante Exons, die für die NBD2 kodieren. Beispielsweise verhindert eine benachbarte Mutation *c.A4145G*, welche den Aminosäureaustausch Gln1382Arg in der NBD2 hervorruft, die Substrat-induzierte ATP Hydrolyse des MRP2 in der Leber und ist eine der Mutationen, die ursächlich für das DJS sein können (Toh et al. 1999; Hahimoto et al. 2002).

#### 4.7 Mutationen in der 5'-UTR

Bei der Frage nach interindividuellen Unterschieden des MRP2 muss auch die Regulation der Genexpression auf Transkriptionsebene in Betracht gezogen werden. Dabei sind die regulatorischen Elemente, welche die Voraussetzung für eine basale Expression des MRP2 darstellen („*promoter*“) und häufig auch durch Induktion bzw. Suppression eine Anpassung an physiologische oder pathologische Begebenheiten ermöglichen, meist in 5'-Richtung des Translationsstarts lokalisiert. Entsprechend können SNPs innerhalb dieser Regionen für Unterschiede in der Expression des MRP2 verantwortlich sein (Strachan und Reed 2004).

Die Transition *c.C-24T* (rs717620) innerhalb des Exon 1 ist 24 bp stromaufwärts des Startcodons lokalisiert und befindet sich in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR). Der Transkriptionsstart befindet sich -247 bp stromaufwärts des initialen Translationscodons (Tanaka et al. 1999). Insbesondere die Region bis 80 bp 5'-stromaufwärts scheint einen wichtigen Einfluss auf die Transkription zu besitzen. Tanaka et al. 1999 konnten in einer Promoteranalyse bei Deletion des Bereiches Delta +80 bp einen fast vollständigen Verlust der Expression des Proteins nachweisen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass sich die genetische Variante *c.C-24T* innerhalb der Promotor-Region zu befinden scheint.

Unter den bisher identifizierten Promoter-Abschnitten, die für eine Expression von MRP2 notwendig erscheinen, befinden sich vor allem Bindungsstellen für allgemeine und Leber-spezifische Transkriptionsfaktoren. Zu diesen regulatorischen Elementen zählt eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor *C/EBPbeta* („CCAAT-enhancer binding protein beta“), die in der 5'-flankierenden Region an Position -603bp bis -590bp lokalisiert ist. Bestimmte Sequenzen in der 5'-UTR des Exons 1 zeigen sich für die Bindung der

Transkriptionsfaktoren „*USF-like*“ („*upstream stimulatory factor*“) an Position -204 bis -194 bp sowie „*hepatic nuclear factors*“ *HNF1* (-159 bis -146 bp) und „*HNF3beta*“ (-67 bis -54 bp) verantwortlich (Strachan und Reed 2004; Tanaka et al. 1999; Stöckel et al. 2000; Kauffmann et al. 2001; Suzuki et al. 2002; Dietrich et al. 2003). Eine Möglichkeit, die Transkription von MRP2 zu stimulieren, besteht in der Aktivierung transkriptionell wirksamer nukleärer Rezeptoren mit dem MRP2-Promoter. Verschiedenste Substanzen, wie z.B. Phenobarbital, Rifampicin, Clotrimazol, Dexamethason oder Gallensäuren, können als Liganden die nukleären Rezeptoren FXR („*farnesoid X-activated receptor*“), PXR („*pregnane X-activated receptor*“) und CAR („*constitutive androstane receptor*“) aktivieren, welche durch Bindung an die 5'-flankierende Region eine gesteigerte Expression der mRNA induzieren. Die korrespondierende Sequenz (ER-8), an welche die Liganden-aktivierten Transkriptionsfaktoren binden, konnte bei der Ratte -440 bp stromaufwärts nachgewiesen werden (Kast et al. 2002; Suzuki et al. 2002; Mizuno et al. 2003).

Somit scheint der SNP *c.C-24T* mit den wichtigsten bisher identifizierten Sequenzen, die für die regulatorische Transkriptionskontrolle verantwortlich sind, nicht in unmittelbarer räumlicher Beziehung zu stehen und somit keinen direkten Einfluss auf die Regulation der Expression zu besitzen. Dies geht mit einer Studie von Moriya et al. 2002 einher, in der ein Effekt der Mutation *c.C-24T* ohne Einfluss auf das Expressionsniveau der MRP2-RNA in duodenalen Enterozyten war. Dabei ließen sich zwischen dem heterozygoten Genotyp (*c.-24C/-24T*) und dem homozygoten Vorkommen des häufigeren (*c.-24C/-24C*) bzw. des selteneren Allels (*c.-24T/-24T*) keine signifikanten Unterschiede des Expressionslevels der mRNA nachweisen (Moriya et al. 2002).

Hinsichtlich einer funktionellen Auswirkung ließ sich ein Einfluss bei Heterozygotie *c-24C/-24T* auf die Pharmakokinetik von Methotrexat nachweisen. In der nachfolgenden Studie von Rau et al. (2006), die pädiatrische Patienten mit Hochdosis-MTX-Therapie auf die hier genannten Polymorphismen untersucht hatte, konnte 36 - 48 Stunden nach Beginn der Infusion eine zweifach erhöhte Plasmakonzentration von MTX bei weiblichen Trägern der heterozygoten Allelvariante *c.-24C/-24T* nachgewiesen werden. Die erhöhten Plasmakonzentrationen waren nach der pharmakokinetischen Analyse am ehesten auf eine eingeschränkte renale Exkretion zurückzuführen und gingen mit der Notwendigkeit einer Intensivierung der Folsäure-Therapie einher. Die Vorhersage einer verminderten renalen Expression der MRP2-RNA wurde in einer nahezu zeitgleich publizierten Analyse der Gruppe von Cascorbi sowohl auf der RNA-Ebene als auch Proteinebene bestätigt (Haenisch S et al 2006).

Das seltenere Allel ist mit einer Allelfrequenz von 18,6% des selteneren Allels häufig. Bereits bei Polymorphismusanalysen innerhalb des japanischen Probandenkollektives (18,8%) sowie in den japanischen Zelllinien (17,6%) wurde diese Mutation mit ähnlicher Allelfrequenz detektiert und weist somit keine interethnische Differenzen auf (Ito, S et al. 2001; Itoda et al. 2002).

#### **4.8 Haplotypenanalyse und Linkage Disequilibrium**

Die Verteilung der gefundenen SNPs anhand der Frequenz ihres selteneren Allels war der normalen Verteilung von SNPs innerhalb des humanen Genoms identisch. Eine Allelfrequenz von weniger als 5% zeigten sich bei zehn der insgesamt 13 detektierten SNPs (~70% aller SNPs), was mit einer repräsentativen Studie von Salisbury et al. 2003 übereinstimmt, bei der insgesamt 71% aller SNPs eine Allelfrequenz der seltenen Allele unter 5% aufwiesen.

Die statistische Auswertung ergab Kopplungen einzelner Allele. Mit einem  $\chi^2$  Wert von 8,9 und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,003 konnte ein *Linkage Disequilibrium* zwischen den Allelvarianten *c.C-24T* (5'-UTR, Exon 1) und *c.C3924T* (Ile1324Ile, Exon 28) werden. Die Kopplung dieser beiden Mutationen wurde auch in der Studie von Itoda et al 2002 in Zelllinien von chirurgisch entfernten Lebertumoren detektiert, während innerhalb eines japanischen Patientenkollektives nicht über diese Assoziation berichtet wurde (Ito, S et al. 2001; Itoda et al. 2002). Diese Kopplung bedarf also einer weiteren Überprüfung an einem größeren Kollektiv. Mit einer Allelfrequenz von 18,6% bzw. 35,6% besitzen beide selten vorkommenden Allele eine hohe Frequenz.

Neben dem *Linkage Disequilibrium* dieser beiden häufigen Allele, die innerhalb des Gens einen weiten Abstand zueinander aufweisen, konnte eine hochsignifikante Kopplung polymorpher Allele im 3'-Bereich des *ABCC2*-Gens festgestellt werden. Bereits in der SSCP-Analyse und der anschließenden Sequenzierung konnte in 6 verschiedenen Proben jeweils das gleichzeitig vorkommende, heterozygote Auftreten verschiedener SNPs beobachtet werden, die eine Allelfrequenz von 5,1% besitzen. Mit einem  $\chi^2$ -Wert von 46,2 und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von <0,00001 bestätigte sich die signifikante Kopplung sechs unterschiedlicher Allele der Exons 28 bis 32 in der statistischen Auswertung der Befunde. Dazu gehören die Intron SNPs *c.A3844-73G*, *c.G4146+11C* und *c.G4508+12A*, die beiden stummen Mutationen kodierender Bereiche *c.G4290T* (Val1430Val) und *c.C4488T* (His1496His) sowie die Mutation *c.G4544A*, die an Position 1515 mit dem Aminosäureaustausch Cystein nach Tyrosin einhergeht. Zusätzlich könnte dieser eindeutige Haplotyp mit der stillen Mutation *c.C3972T* (Ile1324Ile) assoziiert sein

( $\chi^2=6,4$ , unkorrigierter p-Wert=0,01). Die übrigen SNPs, wie beispielsweise die in Exon 10 lokalisierten Varianten (G1249A), zeigen keine Kopplung mit anderen Allelen.

#### 4.9 Interethnische Differenzen

Innerhalb unseres Bevölkerungskollektives zeigt sich der Genlocus c.C3972T (Ile1324Ile) stark polymorph und weist mit 35,6% eine sehr hohe Frequenz des selteneren Allels auf. In einer analog durchgeführten Studie innerhalb eines japanischen Bevölkerungskollektives wurde die identische Mutation Ile1324Ile mit einer Allelfrequenz von 21,9% detektiert, was eine interethnische Differenz dieser Genvariante widerspiegelt (Ito, S et al. 2001).

Die hohe Allelfrequenz kann aus verschiedenen Sichtweisen bezüglich ihrer funktionellen Auswirkungen diskutiert werden. Einerseits kann eine fehlende funktionelle Relevanz dieser stillen Mutation eine hohe Allelfrequenz erklären, indem sich bei fehlendem Selektionsdruck eine ausschließlich statistische Verteilung ergibt (Cargill et al. 1999; Pfof et al. 2000). Dafür könnte auch der transitorische Basenaustausch (C nach T) sprechen, der den Basencharakter nicht verändert. Er stellt einen einfacheren chemischen Reaktionsschritt als die Transversion dar und führt überwiegend zu einem konservierten Aminosäureaustausch (Strachan und Reed 1999). Obwohl Transitionen nur ein Drittel aller möglichen Basenaustausche darstellen, kommen sie mit insgesamt 71% viel häufiger vor als Transversionen (29%) (Stephens et al 2001; Botstein und Risch 2003; Salisbury et al. 2003).

Allerdings kann das häufige Auftreten des selteneren Allels auch als ein Hinweis auf einen Selektionsvorteil gedeutet werden, der zur Verbreitung dieser Mutation innerhalb einer Population geführt hat. Als evolutionstheoretisches Beispiel interethnischer Differenzen kann das ABC-Transporterprotein P-GP 170 genannt werden, bei dem die Frequenz des homozygot mutierten Genotyps c.3435TT bei Afrikanern mit maximal 6% weit unter der Frequenz von Kaukasiern mit durchschnittlich 28,6% liegt. Als Hintergrund wird bei Afrikanern ein Selektionsvorteil durch das homozygote Auftreten des häufigeren c.3435C-Allels vermutet, welches mit einer höheren Expression des P-GP 170 einhergeht. Diese Hypothese wird unterstützt durch die positiven Auswirkungen des P-GP 170 auf die körpereigene Abwehr gegenüber Bakterien und Viren. Somit könnte eine höhere Expression des homozygoten Genotyps c.3435CC einen Schutz gegenüber gastrointestinalen Infektionen darstellen, die in tropischen Gebieten endemisch sind (Cascorbi et al 2001; Schwab et al. 2003).

Interethnische Differenzen von Arzneistofftransportern müssen im klinischen Alltag aufgrund ihrer Auswirkungen auf die Arzneimitteldisposition beachtet werden. Dies lässt sich bei P-GP 170 exemplarisch anhand seiner Substrate Cyclosporin und Tacrolimus veranschaulichen, deren Pharmakokinetik in wesentlichem Ausmaß von der Expression des P-GP 170 in Dünndarm und Niere und CYP3A4 abhängig ist. So zeigte sich für Afrikaner eine signifikant geringere orale Bioverfügbarkeit von Cyclosporin im Vergleich zu einem kaukasischen Patientenkollektiv, was sich durch eine höhere intestinale Expression bei Vorliegen des homozygoten Genotyps *c.3435CC* erklären lässt. Auch bei der Ausscheidung von Cyclosporin und Tacrolimus ergaben sich signifikante interethnische Unterschiede. In diesem Zusammenhang zeigte sich in mehreren Studien nach einer Nierentransplantation ein schlechteres Ergebnis der schwarzen Bevölkerung im Vergleich zu Kaukasiern, obwohl die immunsuppressive Therapie mit Cyclosporin und Tacrolimus identisch war (Schwab et al. 2003).

#### **4.10 Bedeutung der Ergebnisse für die Praxis**

Die beobachteten häufigen und sehr häufigen Polymorphismen sind nicht mit dem Auftreten des Dubin-Johnson-Syndroms assoziiert. Dieses rezessive Syndrom ist bei Kaukasiern ausgesprochen selten, was mit diesen Ergebnissen in Einklang steht. Die meisten Dubin-Johnson-Patienten sind kosanguin, so dass in der Regel eine Homozygotie für Null-Allele vorliegt. Allerdings scheint der Effekt auf die Elimination von Pharmaka u.U. einen anderen Genotyp-Phänotyp-Zusammenhang aufzuweisen. Die Untersuchung von Hulot et al. (2005) des *ABCC2*-Genotyps eines erwachsenen Patienten, der unter einer hochdosierten Methotrexat-Therapie eine schwere Ausscheidungsstörung entwickelte, war heterozygot für die Mutation *c.A1271G* (Arg412Gly). Das andere Allel zeigte im Kodierbereich eine Wildtyp-Konfiguration und in der 5'-UTR die *c.-24T*-Variante (Hulot et al 2005). Diese Befunde legen nahe, dass hinsichtlich der Methotrexat-Ausscheidung ein kodominanter oder dominanter Effekt von Null-Allelen vorliegt. Die von Hulot et al beschriebene Variante reiht sich in eine Reihe seltener Polymorphismen ein, die mit einem nicht-synonymen Aminosäureaustausch verbunden sind. Die Allel-Häufigkeit dieser Varianten liegt unter 1%, so dass sie formal keine Polymorphismen in engerem Sinne darstellen. Diese Varianten werden nur bei detaillierter Analyse der Kodierregionen, wie sie auch in dieser Arbeit vorgenommen wurde, entdeckt. Wenn das heterozygote Vorliegen seltener *ABCC2*-Null-Allele zu einer schweren Ausscheidungsstörung führen kann, so ist u.U. eine Untersuchung des Verhältnisses von Coproporphyrin I zu Coproporphyrin III einfacher durchzuführen als eine detaillierte genetische Untersuchung aller 32 Exons. Hinzu kommt, dass durch

---

diesen Test auch Null-Varianten, die durch z.B. durch Splice-Defekte verursacht werden, mit erfasst werden dürften. In nachfolgenden Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des *c.-24T*-Allels und einer Methotrexat-Ausscheidungsverzögerung festgestellt werden.

## 5 Zusammenfassung

**Hintergrund und Ziele:** Polymorphismen in Transportermolekülen können wesentlich zur interindividuellen Variabilität der Pharmakokinetik beitragen. In diesem Projekt sollten die Polymorphismen im *ABCC2*-Gen bei gesunden Kaukasiern bestimmt werden, um die Grundlage für nachfolgende Untersuchungen zur Bedeutung dieser Polymorphismen für die Pharmakokinetik von hochdosiertem Methotrexat zu schaffen.

**Methoden:** Es wurden alle 32 Exons mit flankierenden Intronabschnitten des *ABCC2*-Gens durch PCR amplifiziert und durch Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCP) auf das Vorliegen von Polymorphismen untersucht. Ausgangsmaterial war aus Leukozyten gewonnene genomische DNA 59 nicht miteinander verwandter, gesunder Kaukasier. Alle PCR-Produkte mit abweichenden Bandenmustern und einige Normalproben wurden direkt sequenziert. Die gefundenen Polymorphismen wurden durch geeignete Restriktionsfragment-Polymorphismen oder allel-spezifische PCR bestätigt.

**Ergebnisse:** Bei Kaukasiern wurden im *ABCC2*-Gen drei häufige Polymorphismen mit Allelfrequenzen des selteneren Allels von >15% gefunden (c.C-24T; c.G1249A, Val417Ile; c.C3972T, Ile1324Ile). Daneben wurden 6 seltene Polymorphismen mit einer Allelfrequenz von ca. 5% sowie 4 sehr seltene Polymorphismen mit einer Allelfrequenz von weniger als 1% beobachtet. Sechs Polymorphismen bildeten einen gekoppelten Haplotyp, bei zwei weiteren Polymorphismen bedarf die Kopplung einer weiteren Untersuchung.

### **Schlussfolgerungen:**

Null-Mutationen, die bei homozygotem Vorliegen mit einem Dubin-Johnson-Syndrom assoziiert sind, wurden nicht beobachtet. Das häufige c.-24T-Allel konnte in zwei nachfolgenden Arbeiten als funktionell bedeutsam für die renale MRP2-Expression gesichert werden.

Die beobachteten selteneren Polymorphismen sind aus pharmakogenetischer Sicht beachtenswert, da sie bei einer Analytik, die sich auf die häufigen Varianten beschränkt, nicht mit erfasst werden. Wenn diese seltenen Varianten zu einer funktionellen Beeinträchtigung der Transportfunktion des MRP2-Proteins führen, könnten sie im Rahmen eines Screenings vermutlich leichter durch eine Bestimmung des Coproporphyrin I/Coproporphyrin III-Isomerenverhältnis erfasst werden. Ob heterozygote Null-Mutationen im *ABCC2*-Gen notwendig oder hinreichend sind, um eine schwere Ausscheidungsstörung von Methotrexat und anderen Pharmaka zu bewirken, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

## Veröffentlichungen

Rau T, Erney B, **Göres R**, Eschenhagen T, Beck J, Langer T (2006) High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukaemia: Impact of *ABCC2* polymorphism on plasma concentration. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 80(5):468-76

**6 Abkürzungsverzeichnis**

Für SI-Einheiten wurden die international gültigen Abkürzungen verwendet.

ABC	ATP-binding cassette proteins
bp	Basenpaare
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cMOAT	canalicular multispecific organic anion transporter
DJS	Dubin-Johnson-Syndrom
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotid-5'-triphosphat
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
LD	linkage disequilibrium, Kopplungsungleichgewicht
MDRs	multidrug resistance proteins
MRPs	multidrug resistance associated proteins
mRNA	messenger RNA
MSD	membrane spanning domains
n	Anzahl der Proben
NBD	Nukleotid-bindende Domänen
OATPs	organic anion transporting polypeptides
OATs	organic anion transporters
OCTs	organic cation transporters
OD	optische Dichte
PepTs	peptide transporters
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P-GP 170	P-Glykoprotein 170
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Umdrehungen pro Minute
SLC	solute carrier family
SNPs	single nucleotide polymorphism
SSCP	Single strand conformation polymorphism
TEMED	Tetramethyl-Ethylen-Diamin
TM	alpha-Helices, intrazelluläre transmembranäre Schleifen
5'-UTR	5' - untranslatierte Region

## 7 Literaturverzeichnis

Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H, Sugiyama Y (2001) Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta*. 1511:7-16

Altenberg GA (2004) Structure of multidrug-resistance proteins of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*. 4:53-62

Bakos E, Evers R, Szakacs G, Tusnady GE, Welker E, Szabo K, de Haas M, van Deemter L, Borst P, Varadi A, Sarkadi B (1998) Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J Biol Chem*. 273:32167-75

Ben-Ezzer J, Rimington C, Shani M, Seligsohn U, Sheba C, Szeinberg A (1971) Abnormal excretion of the isomer of urinary coproporphyrin by patients with the Dubin-Johnson syndrome in Israel. *Clin Sci* 40:17-30

Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (1999) The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta*. 1461:347-57

Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J (2000) A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*. 92:1295-302

Bosari S, Marchetti A, Buttitta F, Graziani D, Borsani G, Loda M, Bevilacqua G, Coggi G (1995) Detection of p53 mutations by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) gel electrophoresis. A comparative study of radioactive and nonradioactive silver-stained SSCP analysis. *Diagn Mol Pathol*. 4:249-55

Botstein D, Risch N (2003) Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet*, 33 Suppl:228-37

Buchler M, Konig J, Brom M, Kartenbeck J, Spring H, Horie T, Keppler D. (1996) cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem*. 271:15091-8.

Cai SY, Soroka CJ, Ballatori N, Boyer JL (2003) Molecular characterization of a multidrug resistance-associated protein, Mrp2, from the little skate. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.284:R125-30

Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP,

- Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES. (1999) Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet.* 22:231-8
- Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. (2001) Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 69:169-74
- Collins DW, Jukes TH (1994) Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence. *Genomics.* 20:386-96.
- Croft L, Schandorff S, Clark F, Burrage K, Arctander P, Mattick JS (2000) ISIS, the intron information system, reveals the high frequency of alternative splicing in the human genome. *Nat Genet.* 24:340-1
- Dean M, Hamon Y, Chimini G (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res.* 42:7-17.
- Dey S, Hafkemeyer P, Pastan I, Gottesman MM (1999) A single amino acid residue contributes to distinct mechanisms of inhibition of the human multidrug transporter by stereoisomers of the dopamine receptor antagonist flupentixol. *Biochemistry.* 38:6630-9
- Dietrich CG, Geier A, Oude Elferink RP (2003) ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut.* 52:1788-95.
- Dubin IN, Johnson FB (1954) Chronic idiopathic jaundice with unidentified pigment in liver cells: a new clinicopathology entity with report of 12 cases. *Medicine* 33:155-179
- Evers R, de Haas M, Sparidans R, Beijnen J, Wielinga PR, Lankelma J, Borst P (2000) Vinblastine and sulfinpyrazone export by the multidrug resistance protein MRP2 is associated with glutathione export. *Br J Cancer.* 83:375-83
- Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K (2001) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* Urban&Fischer Verlag, München. 8.Auflage
- Fromm M, Eichelbaum M (2002) *The Pharmacogenomics of human P-Glycoprotein in Pharmacogenomics, the search for individualized therapies,* Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002
- Fromm MF, Kauffmann HM, Fritz P, Burk O, Kroemer HK, Warzok RW, Eichelbaum M, Siegmund W, Schrenk D (2000) The effect of rifampin treatment on intestinal expression

of human MRP transporters. *Am J Pathol.* 157:1575-80

Gao M, Yamazaki M, Loe DW, Westlake CJ, Grant CE, Cole SP, Deeley RG (1998) Multidrug resistance protein. Identification of regions required for active transport of leukotriene C4. *J Biol Chem.* 273:10733-40

Gerk PM, Vore M (2002) Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J Pharmacol Exp Ther.* 302:407-15.

Gerloff T, Roots I (2003) Pharmacogenetic implications of transmembrane transporters for the uptake, distribution and excretion of drugs. *Dtsch Med Wochenschr.* 128:2431-6

Glavac D, Dean M (1993) Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat.* 2:404-14

Goldstein DB, Tate SK, Sisodiya SM (2003) Pharmacogenetics goes genomic. *Nat Rev Genet.* 4:937-47.

Grantham R (1974) Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185:862-864

Green MR (1991) Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing. *Annu Rev Cell Biol* 7:559-99

Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E, Wruck CJ, Dazert P, Siegmund S, Kroemer HK, Warzok RW and Cascorbi I, (2006) Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *The Pharmacogenomics Journal* 56–65

Harris MJ, Kuwano M, Webb M, Board PG (2001) Identification of the apical membrane-targeting signal of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/MOAT). *J Biol Chem.* 276:20876-81

Hashimoto K, Uchiumi T, Konno T, Ebihara T, Nakamura T, Wada M, Sakisaka S, Maniwa F, Amachi T, Ueda K, Kuwano M (2002) Trafficking and functional defects by mutations of the ATP-binding domains in MRP2 in patients with Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 36:1236-45

Hayashi K, Yandell DW (1993) How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat.* 2:338-46

Hegedus T, Sessler T, Scott R, Thelin W, Bakos E, Varadi A, Szabo K, Homolya L, Milgram SL, Sarkadi B. (2003) C-terminal phosphorylation of MRP2 modulates its

- interaction with PDZ proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 302:454-61
- Hinoshita E, Uchiumi T, Taguchi K, Kinukawa N, Tsuneyoshi M, Maehara Y, Sugimachi K, Kuwano M. (2000) Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinomas. *Clin Cancer Res.* 6:2401-7
- Hipfner DR, Almquist KC, Leslie EM, Gerlach JH, Grant CE, Deeley RG, Cole SP (1997) Membrane topology of the multidrug resistance protein (MRP). A study of glycosylation-site mutants reveals an extracytosolic NH<sub>2</sub> terminus. *J Biol Chem.* 272:23623-30
- Hipfner DR, Mao Q, Qiu W, Leslie EM, Gao M, Deeley RG, Cole SP (1999) Monoclonal antibodies that inhibit the transport function of the 190-kDa multidrug resistance protein, MRP. Localization of their epitopes to the nucleotide-binding domains of the protein. *J Biol Chem.* 274:15420-6
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. (1999) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:3473-8
- Hulot JS, Villard E, Maguy A, Morel V, Mir L, Tostivint I, William-Falgaos D, Fernandez C, Hatem S, Deray G, Komajda M, Leblond V, Lechat P (2005) A mutation in the drug transporter gene ABCC2 associated with impaired methotrexat elimination. *Pharmacogenetics and Genomics* 15:277-285
- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature.* 346:362-5.
- Ito K, Oleschuk CJ, Westlake C, Vasa MZ, Deeley RG, Cole SP (2001) Mutation of Trp1254 in the multispecific organic anion transporter, multidrug resistance protein 2 (MRP2) (ABCC2), alters substrate specificity and results in loss of methotrexate transport activity. *J Biol Chem.* 276:38108-14
- Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y (2001) Charged amino acids in the transmembrane domains are involved in the determination of the substrate specificity of rat Mrp2. *Mol Pharmacol.* 59:1077-85

- Ito K, Suzuki H, Sugiyama Y (2001) Single amino acid substitution of rat MRP2 results in acquired transport activity for taurocholate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281:G1034-43.
- Ito S, Ieiri I, Tanabe M, Suzuki A, Higuchi S, Otsubo K (2001) Polymorphism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects. *Pharmacogenetics.* 11:175-84
- Itoda M, Saito Y, Soyama A, Saeki M, Murayama N, Ishida S, Sai K, Nagano M, Suzuki H, Sugiyama Y, Ozawa S, Sawada Ji J (2002) Polymorphisms in the ABCC2 (cMOAT/MRP2) gene found in 72 established cell lines derived from Japanese individuals: an association between single nucleotide polymorphisms in the 5'-untranslated region and exon 28. *Drug Metab Dispos.* 30:363-4.
- Jensen L, Wall A, Cook M, Hoess K, Thorn C, Whitehead A, Mitchell L (2004) A common *ABCC2* Promoter Polymorphism is not a determinant of the risk of spina bifida. *Birth defects research* 70:396-399
- John Hopkins University, OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man. #237500 Dubin-Johnson Syndrome; DJS
- Jordanova A, Kalaydjieva L, Savov A, Claustres M, Schwarz M, Estivill X, Angelicheva D, Haworth A, Casals T, Kremensky I (1997) SSCP analysis: a blind sensitivity trial. *Hum Mutat.* 10:65-70
- Kaczanowski R, Trzeciak L, Kucharczyk K (2001) Multitemperature single-strand conformation polymorphism. *Electrophoresis* 22:3539-45
- Kagawa T, Sato M, Hosoi K, Uchiyama J, Nishizaki Y, Watanabe N, Inagaki Y, Kimura M, Matsuzaki S. (1999) Absence of R1066X mutation in six Japanese patients with Dubin-Johnson syndrome. *Biochem Mol Biol Int.* 47:639-44.
- Kajihara S, Hisatomi A, Mizuta T, Hara T, Ozaki I, Wada I, Yamamoto K (1998) A splice mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes Dubin-Johnson syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 253:454-7
- Kamisako T, Leier I, Cui Y, Konig J, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J, Keppler D (1999) Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2. *Hepatology* 30:485-90
- Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, Keppler D (1996) Absence of the canalicular

isoform of the MRP gene-encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 23:1061-6.

Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, Tontonoz P, Kliewer S, Willson TM, Edwards PA. (2002) Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem.* 277:2908-15

Kauffmann HM, Vorderstemann B, Schrenk D (2001) Basal expression of the rat, but not of the human, multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene is mediated by CBF/NF-Y and Sp1 promoter-binding sites. *Toxicology.* 167:25-35

Keitel V, Kartenbeck J, Nies AT, Spring H, Brom M, Keppler D. (2000) Impaired protein maturation of the conjugate export pump multidrug resistance protein 2 as a consequence of a deletion mutation in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 32:1317-28.

Keitel V, Nies AT, Brom M, Hummel-Eisenbeiss J, Spring H, Keppler D (2003) A common Dubin-Johnson syndrome mutation impairs protein maturation and transport activity of MRP2 (ABCC2). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 284:G165-74

Keppler D, König J (1997) Hepatic canalicular membrane 5: Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *FASEB J.* 11:509-16

Keppler D, König J, Buchler M. (1997) The canalicular multidrug resistance protein, cMRP/MRP2, a novel conjugate export pump expressed in the apical membrane of hepatocytes. *Adv Enzyme Regul.* 37:321-33.

Kikuchi S, Hata M, Fukumoto K, Yamane Y, Matsui T, Tamura A, Yonemura S, Yamagishi H, Keppler D, Tsukita S, Tsukita S (2002) Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes. *Nat Genet.* 31:320-5

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

Kocher O, Comella N, Gilchrist A, Pal R, Tognazzi K, Brown LF, Knoll JH (1999) PDZK1, a novel PDZ domain-containing protein up-regulated in carcinomas and mapped to chromosome 1q21, interacts with cMOAT (MRP2), the multidrug resistance-associated protein. *Lab Invest.* 79:1161-70

- Konig J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D (1999) Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 1461:377-94
- Konno T, Ebihara T, Hisaeda K, Uchiumi T, Nakamura T, Shirakusa T, Kuwano M, Wada M (2003) Identification of domains participating in the substrate specificity and subcellular localization of the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *J Biol Chem.* 278:22908-17
- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: cause and consequences. *Hum Genet* 90:41-54
- Kruh GD, Belinsky MG (2003) The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene.* 22:7537-52.
- Leier I, Hummel-Eisenbeiss J, Cui Y, Keppler D (2000) ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2. *Kidney Int.* 57:1636-42
- Lockhart AC, Tirona RG, Kim RB (2003) Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in cancer and chemotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2:685-98.
- Lopez, Javier (1998) Alternative Splicing of pre-mRNA: Developmental Consequences and Mechanisms of Regulation. *Annual Review of Genetics.* 32:279-305
- Machida I, Inagaki Y, Suzuki S, Hayashi H, Wakusawa S. (2004) Mutation analysis of the multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. *Hepatol Res.* 30:86-90.
- Maquat LE (2001) The power of point mutations. *Nat Genet.* 27:5-6.
- Markoff A, Savov A, Vladimirov V, Bogdanova N, Kremensky I, Ganey V. (1997) Optimization of single-strand conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol. *Clin Chem.* 43:30-3.
- Masuda M, Iizuka Y, Yamazaki M, Nishigaki R, Kato Y, Ni'inuma K, Suzuki H, Sugiyama Y (1997) Methotrexate is excreted into the bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats. *Cancer Res.* 57:3506-10
- Materna V, Lage H (2003) Homozygous mutation Arg768Trp in the ABC-transporter encoding gene MRP2/cMOAT/ABCC2 causes Dubin-Johnson syndrome in a Caucasian

patient. *J Hum Genet.* 48:484-6.

Mattick JS (1994) Introns: evolution and function. *Curr Opin Genet Dev.* 4:823-31

Mattick JS (2004) The regulatory architecture of the human genome. *Asia Pac J Clin Nutr.* 13(Suppl):S14

Meyer U (2000) Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 356:1667-71

Miller MP, Kumar S (2001) Understanding human disease mutations through the use of interspecific genetic variation. *Hum Mol Genet.* 10:2319-28

Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y (2003) Impact of drug transporter studies on drug discovery and development *Pharmacol Rev.* 55:425-61

Mor-Cohen R, Zivelin A, Rosenberg N, Shani M, Muallem S, Seligsohn U. (2001) Identification and functional analysis of two novel mutations in the multidrug resistance protein 2 gene in Israeli patients with Dubin-Johnson syndrome. *J Biol Chem.* 276:36923-30.

Mor-Cohen R, Zivelin A, Rosenberg N, Goldberg I, Seligsohn U (2005) A novel ancestral splicing mutation in the multidrug resistance protein 2 gene causes Dubin-Johnson syndrome in Ashkenazi Jewish patients. *Hepatology Research* 31:104-111.

Moriya Y, Nakamura T, Horinouchi M, Sakaeda T, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, Gotoh A, Fujimoto S, Matsuo M, Kasuga M, Okumura K (2002) Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Biol Pharm Bull.* 25:1356-9.

Mottino AD, Hoffman T, Jennes L, Vore M (2000) Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther.* 293:717-23

Nakai K, Hirushi S (1994) Construction of a novel database containing aberrant splicing mutations of mammalian genes. *Gene* 141:171-177

Nebert DW (1999) Pharmacogenetics and pharmacogenomics: why is this relevant to the clinical geneticist? *Clin Genet.* 56:247-58

Nies AT, Jedlitschky G, Konig J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitt HP, Keppler D (2004) Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience.* 129:349-60

Nies AT, Konig J, Cui Y, Brom M, Spring H, Keppler D (2002) Structural requirements for

the apical sorting of human multidrug resistance protein 2 (ABCC2). *Eur J Biochem.* 269:1866-76

Olivier M (2003) *Physiol Genomics* 13:3-9

Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:2766-70

Paccoud B, Bourguignon J, Diarra-Mehrpour M, Martin JP, Sesboue R (1998) Transverse formamide gradients as a simple and easy way to optimise DNA single-strand conformation polymorphism analysis. *Nucleic Acids Res.* 26:2245-6.

Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ, Scheffer GL, ter Borg F, Scheper RJ, Tytgat GN, Borst P, Baas F, Oude Elferink RP. (1997) A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology.* 25:1539-42.

Paulusma CC, van Geer MA, Evers R, Heijn M, Ottenhoff R, Borst P, Oude Elferink RP (1999) Canalicular multispecific organic anion transporter/multidrug resistance protein 2 mediates low-affinity transport of reduced glutathione. *Biochem J.* 338:393-401

Pfost D, Boyce-Jacino M, Grant D (2000) A SNPshot: pharmacogenetics and the future of drug therapy. *Trends Biotechnol.* Aug;18(8):334-8

Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W (2003) Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood-brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. *J Pharmacol Exp Ther.*306:124-31

Rau T, Erney B, Göres R, Eschenhagen T, Beck J, Langer T (2006) High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukaemia: Impact of *ABCC2* polymorphism on plasma concentration. *Clin Pharmacol Ther.* 80:468-76

Roepe PD (2000) What is the precise role of human MDR 1 protein in chemotherapeutic drug resistance? *Curr Pharm Des.* 6:241-60.

Ryu S, Kawabe T, Nada S, Yamaguchi A (2000) Identification of basic residues involved in drug export function of human multidrug resistance-associated protein 2. *J Biol Chem.* 275:39617-24

Salisbury BA, Pungliya M, Choi JY, Jiang R, Sun XJ, Stephens JC (2003) SNP and haplotype variation in the human genome. *Mutat Res.* 526:53-61.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:5463-7.
- Sarkar G, Yoon HS, Sommer SS (1992) Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Res.* 20:871-8.
- Savov A, Angelicheva D, Jordanova A, Eigel A, Kalaydjieva L (1992) High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Res.* 20:6741-2
- Schaub TP, Kartenbeck J, Konig J, Spring H, Dorsam J, Staehler G, Storkel S, Thon WF, Keppler D (1999) Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol.* 10:1159-69
- Schaub TP, Kartenbeck J, Konig J, Vogel O, Witzgall R, Kriz W, Keppler D (1997) Expression of the conjugate export pump encoded by the *mrp2* gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol.* 8:1213-21
- Schmitt L, Tampe R (2002) Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol.* 12:754-60
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. <http://lgb.unige.ch/arlequin/>
- Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF (2003) Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 43:285-307
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics.* 16:325-32
- Shen LX, Basilion JP, Stanton VP Jr (1999) Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:7871-6
- Shoda J, Suzuki H, Sugiyama Y (2003) Novel mutations identified in the human multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2) gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. *Hepato Res.* 27:323-326
- Spinardi L, Mazars R, Theillet C (1991) Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res.* 19:4009

- Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE, Jiang R, Messer CJ, Chew A, Han JH, Duan J, Carr JL, Lee MS, Koshy B, Kumar AM, Zhang G, Newell WR, Windemuth A, Xu C, Kalbfleisch TS, Shaner SL, Arnold K, Schulz V, Drysdale CM, Nandabalan K, Judson RS, Ruano G, Vovis GF (2001) Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science*. 293:489-93.
- Stockel B, Konig J, Nies AT, Cui Y, Brom M, Keppler D (2000) Characterization of the 5'-flanking region of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene and its regulation in comparison with the multidrug resistance protein 3 (MRP3) gene. *Eur J Biochem*. 267:1347-58
- Stothard JR, Frame IA, Miles MA (1997) An evaluation of four staining methods for the detection of DNA in non-denaturing polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 253:262-4
- St-Pierre MV, Serrano MA, Macias RI, Dubs U, Hoehli M, Lauper U, Meier PJ, Marin JJ (2000) Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 279:R1495-503
- Strachan, Tom and Reed, Andrew P. (2004) *Human Molecular Genetics 2*. 2nd edition, Oxford, UK
- Stride BD, Cole SP, Deeley RG (1999) Localization of a substrate specificity domain in the multidrug resistance protein. *J Biol Chem*. 274:22877-83
- Suzuki H, Sugiyama Y (2002) Single nucleotide polymorphisms in multidrug resistance associated protein 2 (MRP2/ABCC2): its impact on drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev*, 54:1311-31.
- Tanaka T, Uchiumi T, Hinoshita E, Inokuchi A, Toh S, Wada M, Takano H, Kohno K, Kuwano M (1999) The human multidrug resistance protein 2 gene: functional characterization of the 5'-flanking region and expression in hepatic cells. *Hepatology*. 30:1507-12
- Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, Kagotani K, Okumura K, Akiyama S, Kuwano M (1996) A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res*. 56:4124-9
- Tate G, Li M, Suzuki T, Mitsuya T. (2002) A new mutation of the ATP-binding cassette, sub-family C, member 2 (ABCC2) gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. *Genes Genet Syst*. 77:117-21.

Tirona RG, Kim R (2002) Pharmacogenomics of drug transporters in Pharmacogenomics, the search for individualized therapies, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002

Toh S, Wada M, Uchiumi T, Inokuchi A, Makino Y, Horie Y, Adachi Y, Sakisaka S, Kuwano M. (1999) Genomic structure of the canalicular multispecific organic anion-transporter gene (MRP2/cMOAT) and mutations in the ATP-binding-cassette region in Dubin-Johnson syndrome. *Am J Hum Genet.* 64:739-46.

Trauner M, Boyer JL (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.* 83:633-71

Tsuji H, Konig J, Rost D, Stockel B, Leuschner U, Keppler D. (1999) Exon-intron organization of the human multidrug-resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterology* 117:653-60.

Wada M, Toh S, Taniguchi K, Nakamura T, Uchiumi T, Kohno K, Yoshida I, Kimura A, Sakisaka S, Adachi Y, Kuwano M. (1998) Mutations in the canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene, a novel ABC transporter, in patients with hyperbilirubinemia II/Dubin-Johnson syndrome. *Hum Mol Genet.* 7:203-7.

Wakusawa S, Machida I, Suzuki S, Hayashi H, Yano M, Yoshioka K. (2003) Identification of a novel 2026G-->C mutation of the MRP2 gene in a Japanese patient with Dubin-Johnson syndrome. *J Hum Genet.* 48:425-9.

Zelcer N, Huisman MT, Reid G, Wielinga P, Breedveld P, Kuil A, Knipscheer P, Schellens JH, Schinkel AH, Borst P (2003) Evidence for two interacting ligand binding sites in human multidrug resistance protein 2 (ATP binding cassette C2). *J Biol Chem.* 278:23538-44

## 8 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen für die Möglichkeit diese Doktorarbeit unter seiner wissenschaftlichen Leitung durchzuführen sowie für seine stets freundliche Hilfsbereitschaft und seine sehr gute fachliche Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Thomas Rau für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und der praktischen Anleitung während meiner Doktorarbeit. Dank seiner geduldigen Unterstützung und seinem fundierten Fachwissen wies er mir bei der Durchführung der Experimente und der Erstellung der Dissertation stets den richtigen Weg. Über die professionelle Zusammenarbeit hinaus schätze ich vor allem die dadurch entstandene Freundschaft.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen-Nürnberg und dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Zentrums für Experimentelle Medizin Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf danke ich herzlich für ihre Unterstützung und die freundschaftliche und reibungslose Zusammenarbeit. Ich hoffe, dass einige der hier entstandenen Freundschaften lange anhalten werden.

Schlussendlich danke ich meinen Eltern besonders herzlich, die mich nicht nur während meiner gesamten Ausbildung so sehr unterstützt haben und ohne die all das Erreichte niemals möglich gewesen wäre.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Göres  
 Vorname: Ralf  
 Geburtsdatum/ -ort: 25.08.1975, Burghausen  
 Anschrift: Dollmannstr. 19, 81541 München  
 Tel.: 089-624 22 628, Mobil: 0176-8212 9133  
[ralfgoeres@gmx.de](mailto:ralfgoeres@gmx.de)  
 Familienstand: Ledig

**Veröffentlichung:** Rau T, Erney B, Göres R, Eschenhagen T, Beck J, Langer T (2006) High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukaemia: Impact of *ABCC2* polymorphism on plasma concentration. Clin Pharmacol Ther. 80:468-76

### Berufliche Tätigkeiten:

Seit 04/2005 Assistenzarzt zur Weiterbildung Internist und Kardiologe  
 Klinik für Innere Medizin, Klinikum Dritter Orden, München-Nymphenburg  
 01-10/2008 Humanitärer Einsatz bei Ärzte ohne Grenzen („Medecins sans frontieres“)  
 Nord-Darfur, Sudan  
 10-12/2007 Freiwillige Tätigkeit als Assistenzarzt der Kinderheilkunde  
 Department of paediatrics, Frere Hospital, East London, Südafrika

### Hochschulbildung:

10/2004 Abschluss des Medizinstudiums Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, Gesamtnote 1,6  
 04/2003 2.Staatsexamen, FAU Erlangen-Nürnberg  
 04/2000 1.Staatsexamen, FAU Erlangen-Nürnberg  
 04/1999 Physikum, FAU Erlangen-Nürnberg

### Klinische Weiterbildung

01/2007 Fortbildung Internistische Intensivmedizin, St. Joseph Krankenhaus, Regensburg  
 03/2007 Fortbildung Notfallmedizin, Bayerische Landesärztekammer, Berchtesgaden  
 04/2007 Fortbildung Sonographie-Grundkurs, Klinikum Perlach, München

### Klinische Praktika:

12/2003 – 03/2004 Chirurgie, Hospital Regional, Trujillo, Peru  
 08/2003 – 11/2003 Dermatologie, Universitätsspital Zürich  
 04/2003 – 07/2003 Innere Medizin, Gastro-Enterologie, Endokrinologie, Pulmologie, Medizinische Klinik 1, FAU Erlangen-Nürnberg  
 09/2001 Famulatur in Klinische Pharmakologie, Institut für Klinische Pharmakologie, FAU Erlangen-Nürnberg  
 03/2001 Famulatur in Chirurgie, Darwin, Australien

---

12/2000 Famulatur in Innere Medizin, Intensivstation, Hospital Militar Santiago de Chile

04/2000 Famulatur Innere Medizin, Kardiologie, Waldkrankenhaus, Erlangen

**Schulbildung:**

1986-1995 Aventinus-Gymnasium, Burghausen  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Gesamtdurchschnitt 1,6

**Zivildienst:**

09/1995 – 10/1996 Rettungsdiensthelfer, Rotes-Kreuz Kreisverband Altötting

**Sprachen:** Englisch und Spanisch verhandlungssicher

10/2000 - 12/2000 Spanischkurs an Goethe-Institut, Santiago de Chile

München, 30.12.2008

Ralf Göres

**10 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: ..... Ort, Datum: .....