Die Bedeutung der ABC-Transportsysteme ABCB1 und Abcb11 in der Arzneimitteltherapie und bei cholestatischen Lebererkrankungen

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Klinische Pharmakologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. Thomas Gerloff
geboren am 11.10.1965 in Wolfsburg

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek
Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 12. Februar 2004

Gutachter:
1. Prof. Dr. med. R. Preiß
2. Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer

Diese Habilitationsschrift basiert auf dem Inhalt der nachfolgenden Veröffentlichungen:

Kullak-Ublick GA, Gerloff T, Hagenbuch B, Berr F, Meier PJ, Stieger B. Expression of a rat liver phosphatidylcholine translocator in Xenopus laevis oocytes. *Hepatology* 1996: 23, 1254-9.

Madon J, Eckhardt U, Gerloff T, Stieger B, Meier PJ. Functional expression of the rat liver canalicular isoform of the multidrug resistance-associated protein. *FEBS Lett* 1997: 406, 75-8.

Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 1998: 273, 10046-50.

Gerloff T, Meier PJ, Stieger B. Taurocholate induces preferential release of phosphatidylcholine from rat liver canalicular vesicles. *Liver* 1998: 18, 306-12.

Gerloff T, Geier A, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Matern S, Gartung C. Differential expression of basolateral and canalicular organic anion transporters during regeneration of rat liver. *Gastroenterology* 1999: 117, 1408-15.

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, Johne A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. 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* 2000: 97, 3473-8.

Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001: 69, 169-74.

Geier A, Kim SK, Gerloff T, Dietrich CG, Lammert F, Karpen SJ, Stieger B, Meier PJ, Matern S, Gartung C. Hepatobiliary organic anion transporters are differentially regulated in acute toxic liver injury induced by carbon tetrachloride. *J Hepatol* 2002: 37, 198-205.

Gerloff T, Geier A, Roots I, Meier PJ, Gartung C. Functional analysis of the rat bile salt export pump gene promoter. *Eur J Biochem* 2002: 269, 3495-503.

Johne A, Kopke K, Gerloff T, Mai I, Rietbrock S, Meisel C, Hoffmeyer S, Kerb R, Fromm MF, Brinkmann U, Eichelbaum M, Brockmoller J, Cascorbi I, Roots I. Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. *Clin Pharmacol Ther* 2002: 72, 584-94.

Gerloff T, Schaefer M, Johne A, Oselin K, Meisel C, Cascorbi I, Roots I. MDR1 genotypes do not influence the absorption of a single oral dose of 1 mg digoxin in healthy white males. *Br J Clin Pharmacol* 2002: 54, 610-6.

Geier A, Dietrich CG, Gerloff T, Haendly J, Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ, Matern S, Gartung C. Regulation of basolateral organic anion transporters in ethinylestradiol-induced cholestasis in the rat. *Biochim Biophys Acta* 2003: 1609, 87-94.

Meisel C, Gerloff T, Kirchheiner J, Mrozikiewicz PM, Niewinski P, Brockmoller J, Roots I. Implications of pharmacogenetics for individualizing drug treatment and for study design. *J Mol Med* 2003: 81, 154-67.

Inhalt

Seite

1. Einordnung des eigenen Arbeitsgebietes in den Stand der Forschung 6
1.1 Klassifizierung von Transmembrantransportern 7
1.2 ABC-Transporter und hereditäre oder erworbene Erkrankungen 8
1.3 Aufbau von ABC-Transport Proteinen und ABC-Gen Struktur 9
1.4 ABC-Transporter und Multiresistenz in der Krebstherapie 10
1.5 P-Glykoprotein (ABCB1) 12
1.5.1 Die Rolle des Pgp in der Arzneimitteltherapie 13
1.5.1.1 Die Funktion des Pgp an Blut- Gewebeschranken 14
1.5.1.2 Hepatobiliäre und intestinale Exkretionsfunktion 14
1.5.1.3 Intestinale Absorbtion und orale Bioverfügbarkeit 15
1.5.1.4 Exkretionsfunktion in der Niere 15
1.6 Hepatozelluläre Transportsysteme 15

2. Fragestellungen und Übersicht der eigenen Arbeiten 17
2.1 Auswirkungen von Polymorphismen des ABCB1 auf die Pharmakokinetik 18
2.1.1 Einleitung 18
2.1.2 Ergebnisse 20
2.1.2.1 Identifizierung und Häufigkeiten von Polymorphismen des ABCB1 20
2.1.2.2 Funktionelle Charakterisierung von Polymorphismen des ABCB1 22
2.1.2.2.1 Intestinale Expression des ABCB1 Transport Proteins 22
2.1.2.2.2 In vivo Transportaktivität des ABCB1 Transport Proteins 23
2.1.3 Diskussion 28
2.1.3.1 Lokalisation von ABCB1 SNPs und Einfluß auf das Carrier-Protein 28
2.1.3.2 Einfluß von ABCB1 SNPs auf die Pgp-Expression und -Funktion 30
2.2 Biliäre Exkretion von Gallensäuren und anderer gallepflichtiger Substanzen 32
2.2.1 Einleitung 32
2.2.2 Ergebnisse 33
2.2.2.1 Isolierung eines cDNA-Klons für Bsep (Abcb11) der Ratte 33
2.2.2.2 Funktionelle Charakterisierung und Proteinexpression des Abcb11 33
2.2.2.3 Genomische Klonierung und funktionelle Analyse des Abcb11 Promotors 36
2.2.2.4 Regulation hepatozellulärer Transportsysteme 40
2.2.3 Diskussion 43

2.2.3.1 Identifizierung des hepatozellulären Gallensäuren Exporters 43
2.2.3.2 Regulation hepatozellulärer Transporter in *in vitro* Assays und Tiermodellen 44
3. Zusammenfassung 46
Referenzen 48
Danksagung 55
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG 56

1. Einordnung des eigenen Arbeitsgebietes in den Stand der Forschung

Vor wenigen Jahren wurden Resorption, Verteilung und Ausscheidung von Arzneistoffen hauptsächlich als passive Vorgänge beschrieben, bei denen Moleküle vor allem per Diffusion biologischer Membranen in verschiedene Kompartimente gelangen (Avdeef, 2001). Dabei bestimmen vor allem die physikochemischen Eigenschaften Größe, Ladung, Lipidlöslichkeit und Flexibilität des Arzneistoffmoleküls die Passage von Zellmembranen. Entsprechend ist die Diffusionsgeschwindigkeit kleiner, lipophiler und flexibler Pharmaka schneller, als die großer, hydrophiler und starrer Substanzen. Die passive Diffusion von Molekülen durch Zellmembranen entlang eines Konzentrationsgradienten wird durch das Ficksche Gesetz beschrieben. Die Resorptionsprofile zahlreicher Arzneistoffe weisen jedoch unerwartet hohe oder niedrige Bioverfügbarkeiten auf, die durch passive Diffusion oder first-pass Metabolismus allein nicht erklärt werden konnten (Ayrton et al., 2001 ;Kruijtzer et al., 2002). Kürzlich erlangten Transmembran-Transporter zunehmende Aufmerksamkeit für ihre wichtige Rolle in der Pharmakokinetik. So konnte die Disposition einiger Arzneistoffe mit bis dahin nicht erklärbarer, nichtlinearer Kinetik auf aktive, Transporter-vermittelte Prozesse zurückgeführt werden.

Transporter sind in der Zellmembran verankerte Proteine, die an der transmembranären Passage von Nahrungsbestandteilen, aber auch Fremd- und Arzneistoffen beteiligt sind. Im Gastrointestinaltrakt, in der Leber und in den Tubuli der Niere sind eine Reihe von pharmakokinetisch bedeutsamen Membrantransportern lokalisiert (Abb. 1). Darüberhinaus sind Transporter wichtige Bestandteile von Blut-Gewebe Schranken, wie der Blut Hirn-, Blut Plazenta- und Blut Testis-Schranke (Cordon-Cardo et al. 1990; Rao et al., 1999). In diesen sensiblen Organen sorgen Transporter für eine effiziente Abwehr toxischer Substanzen, verhindern aber auch die Passage von Arzneistoffen. In Analogie zu den Phase I und Phase II Reaktionen des Arzneistoffmetabolismus werden aktive transmembranäre Transportprozesse zunehmend als Phase III Reaktionen bezeichnet.

Ein weiterer wichtiger pharmakologischer Aspekt aktiver Transport-Prozesse sind Wechselwirkungen, die auftreten können, wenn Substanzen um ein und denselben Transporter konkurrieren. Beispielsweise kommt es zu Interaktionen zwischen dem Herzglykosid Digoxin mit einer Reihe von Arzneistoffen, wie Chinidin, Propafenon, Verapamil, Clarithromycin und Ciclosporin A. Digoxin wird kaum metabolisiert, ist jedoch wie die anderen genannten Pharmaka ein gutes Transportsubstrat für Pgp. In *in vitro* Studien und im Tierversuch konnten diese und andere Pgp-bedingte Arzneistoff-Interaktionen gut dokumentiert werden (Yu, 1999).

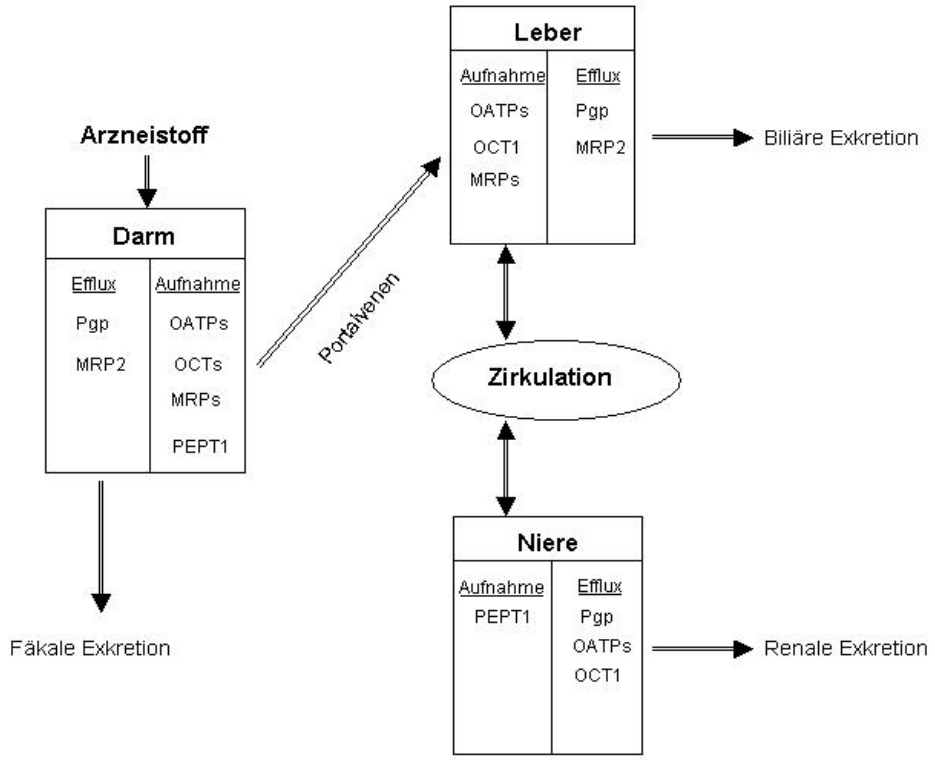

Abb. 1: Beteiligung von Membrantransportern an der Arzneimittel Disposition

1.1 Klassifizierung von Transmembrantransportern

Transporter Proteine gehen mit ihrem Substrat eine spezifische Bindung ein, ändern ihre Konformation und transferieren das gebundene Substrat durch biologische Membranen. Einige Transporter vermitteln lediglich die passive Membranpassage von Stoffen abwärts ihres Konzentrationsgradienten. Dieser Vorgang wird auch als erleichterte Diffusion bezeichnet. Aktive Membrantransporter sind immer dann erforderlich, wenn Substrate entgegen ihres Konzentrations- oder elektrochemischen-Gradienten „aufwärts“ transportiert werden müssen. Diese Transporter verbrauchen Energie, die ihnen entweder indirekt durch Ionengradienten oder direkt aus der Hydrolyse von ATP zur Verfügung gestellt wird. Bei erstgenannten Carrier-Systemen ist der Aufwärts-Transport eines Substrats gekoppelt mit einem Abwärts-Transport von Ionen, wie z.B. Na^+, H^+ oder -HCO_3^-. Je nach Richtung des Substrattransports in oder aus der Zelle heraus wird zwischen Aufnahme- (Uptake) und Ausscheidungstransportsystemen (Efflux) unterschieden. Aufnahme-Carrier vermitteln die Resorption zahlreicher Nährstoffe und endogener Substrate, wie Aminosäuren, Peptiden, Zuckern, Nukleosiden, Gal-

lensäuren und Vitaminen. Efflux-Carrier sind in exkretorischen Organen, wie Leber oder Niere lokalisiert, wo sie Ausscheidungsfunktionen übernehmen.

1.2 ABC-Transporter und hereditäre oder erworbene Erkrankungen

Viele ABC-Transporter Gene wurden ursprünglich durch positionelle Klonierung bei der Suche nach Ursachen hereditärer Erkrankungen entdeckt. Zur Zeit können 14 ABC-Transporter Gene mit vererbbaren Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Tabelle 1). Entsprechend den breitgestreuten Funktionen von ABC-Transportern variieren auch genetische Erkrankungen, die durch diese Carrier ausgelöst werden. Da ABC-Transporter Gene typischerweise für Strukturproteine kodieren, sind entsprechende genetische Defekte rezessiv oder X-chromosomal vererbbar und durch eine verminderte Funktion oder den völligen Verlust der Transport-Aktivität gekennzeichnet.

Tabelle 1: Krankheiten und Phänotypen, die durch genetische Veränderungen in ABC-Transporter Genen ausgelöst werden.

ABC-Transporter Gen	Hereditäre Erkrankung / Phänotyp	OMIM
ABCA1	Morbus Tangier, FHDLD	600046
ABCA4	Morbus Stargardt/FFM, RP, CRD, CD	248200
ABCB1	Ivermectin Empfindlichkeit	171050
ABCB2	Immunschwäche	170260
ABCB3	Immunschwäche	170261
ABCB4	PFIC3	171060
ABCB7	XLSA/A	300135
ABCB11	PFIC2	603201
ABCC2	Dubin-Johnson Syndrom	601107
ABCC6	Pseudoxanthoma elasticum	603234
ABCC7	Cystische Fibrose, CBAVD	602421
ABCC8	FPHHI	600509
ABCD1	ALD	300100
ABCG5	Sitosterolämie	605459
ABCG8	Sitosterolämie	605460

FHDLD, familiäre Hypoapoproteinämie; FFM, Fundus flavimaculatis; RP, Retinitis Pigmentosa 19; CRD, Zäpfchen/Stäbchen Dystrophie; AMD, altersabhängige makuläre Degeneration; PFIC, progressive familiäre intrahepatische Cholestase; ICP, intrahepatische Cholestase der Schwangerschaft; XLSA/A, X-chromosomale Sideroblastose und Anämie; CBAVD, kongenitale bilaterale Aplasie der Vasa deferentes; FPHHI, familiäre persistierende hyperinsulinämische Hypoglykämie in der Kindheit; ALD, Adrenoleukodystrophie.

Einige Mutationen in ABC-Transporter Genen sind letal. Die unbehandelte Zystische Fibrose (ABCC7/CFTR) veräuft in der Regel tödlich im ersten Lebensjahrzehnt. Der einzige embryonale Entwicklungsdefekt, der durch Mutationen in ABC Genen ausgelöst wird, ist die kongenitale Aplasie der Vasa deferentes. Die meisten ABC gene spielen daher keine Rolle bei der fetalen Entwicklung.

1.3 Aufbau von ABC-Transport Proteinen und ABC-Gen Struktur

Gene der „ATP-binding cassette“ (ABC) Transporter bilden die größte Familie innerhalb der transmembranären Proteine. ABC-Transporter binden und hydrolysieren ATP und nutzen die dabei freiwerdende Energie, um diverse Substrate durch biologische Membranen zu transferieren. Voraussetzung für die Zuordnung eines Proteins zur ABC-Familie ist die Nukleotidsequenz und der Aufbau der ATP-bindenden Domäne, auch „nucleotide binding folds“ (NBF) genannt. Die NBFs müssen charakteristische Motive, Walker A und B genannt, enthalten, die durch ungefähr 90-120 Aminosäuren voneinander getrennt sind. Darüberhinaus kommt in ABC-Proteinen noch ein zusätzliches Element vor, das sogenannte Signatur- oder C-Motiv, das sich unmittelbar stromaufwärts der Walker B Stelle befindet. Ein typischer, funktionell aktiver ABC-Transporter enthält zwei NBFs und zwei transmembranäre Domänen (TMs). Eine TM wird aus 6-11 transmembranären α-Helices gebildet, die für die Substratspezifität verantwortlich sind. Die NBFs sind im Zytoplasma lokalisiert und stellen die bei der Hydrolyse von ATP freiwerdende Energie für die Transportfunktion zur Verfügung. ABC-Carrier sind überwiegend unidirektional und befördern Substrate beim Eukaryoten hauptsächlich aus dem Zytoplasma nach extrazellulär.

Eukaryotische ABC-Gene kodieren entweder für einen vollständigen Transporter, der aus zwei TMs und zwei NBFs besteht, oder nur für einen Halbtransporter. Beim letztgenannten muß entweder ein Homodimer oder ein Heterodimer gebildet werden, um einen funktionell aktiven Transporter zu bilden. ABC-Gene sind breitgestreut in eukaryotischen Genomen und treten als hochkonservierte Gene in verschiedenen Spezies auf. Dies deutet darauf hin, dass ABC-Transporter schon zu Beginn der Entwicklung von Eukaryoten aufgetreten sind. Die Gene werden in Unterfamilien nach der Ähnlichkeit ihrer Genstruktur (Halbtransporter vs. vollständiger Transporter), Anordnung ihrer Domänen und Nukleotidsequenz Homologie eingeteilt. Bei Säugern sind sieben ABC-Subfamilien bekannt. Für menschliche und Maus ABC-Gene ist eine Standard Nomenklatur von der „Human Genome Organization“ (HUGO) entwi-

ckelt worden. Einzelheiten zum Schema dieser Nomenklatur sind unter: http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/abc.html zu finden.

Tabelle 2: Klassifikation wichtiger Mitglieder des ABC-Transporter-Systems

Familie	Mitglied	Frühere Bezeichnung	Transport Funktion
ABCA	ABCA1	ABC1	Cholesterin Efflux
	ABCA2	ABC2	Arzneimittel Resistenz
	ABCA3	ABC3	Wahrscheinlich Surfactant Sekretion
	ABCA4	ABCR	N-Retinylidiene-PE Efflux
ABCB	ABCB1	MDR1	Zytostatika-Multiresistenz, Arznei- und Fremdstoff Efflux
	ABCB2,3	TAP1,2	Peptid Transport, Antigen Präsentation
	ABCB4	MDR3	Phosphatidylcholin Flippase
	ABCB11	BSEP (SPGP)	Gallensäuren Transport
ABCC	ABCC1,3	MRP1,3	Arzneimittel Resistenz
	ABCC2	MRP2	Biliärer Efflux von konjugierten organischen Anionen
	ABCC4,5	MRP4,5	Nukleosid Transport
	ABCC7	CFTR	Chlorid Kanal
	ABCC8	SUR	Sulfonylharnstoff Rezeptor
ABCD	ABCD1	ALD	Regulation des "Very light chain" Fettsäuren Transports
ABCE	ABCE1	OABP, RNS4I	Oligoadenylat Bindungsprotein
ABCF	ABCF1	ABC50	
ABCG	ABCG1	ABC8, White	Wahrscheinlich Cholesterin Transport
	ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	Arzneimittel Resistenz, Fremdstoff- und Toxinefflux
	ABCG5	White 3	Steroltransport
	ABCG8		Steroltransport

1.4 ABC-Transporter und Multiresistenz in der Krebstherapie

Zellen können gegen toxische Substanzen resistent werden. Zu den Mechanismen, die eine Resistenz auslösen, gehören die verminderte Aufnahme, die verstärkte Entgiftung und die erhöhte Ausscheidung von Toxinen. Darüberhinaus kann es zu einer Modifizierung von Zielproteinen kommen. Meistens führt die Kombination dieser Mechanismen zur sogenannten Multiresistenz (multidrug resistance „MDR"), in der die Zelle nicht nur gegenüber der ur-

sprünglichen Substanz, sondern zusätzlich gegenüber einer Vielzahl von Zytostatika resistent ist. Dieses Phänomen limitiert den Erfolg einer Tumor-Chemotherapie empfindlich und führt außerdem zur Instabilität des Genoms und Verlust der Zellzyklus-Kontrolle der betroffenen Zellen, was die weitere Therapie zusätzlich erschwert. Mindestens 6 ABC-Transporter sind mit dem zellulären Export von Arzneistoffen assoziiert und spielen deshalb eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der MDR. Drei ABC-Gene werden fast regelmäßig in multiresistenten Tumorzellen exprimiert: ABCB1/MDR1/Pgp, ABCC1/MRP1 und ABCG2/MXR/BCRP.

Tabelle 3: ABC-Transporter assoziiert mit Arzneimittelresistenz.

Gen	Substrat	Inhibitor
ABCB1	Colchicin, Doxorubicin, Etoposid, Adriamycin, Vinblastin, Digoxin, Saquinavir, Paclitaxel	Verapamil, PSC833, GG918, V-104
ABCC1	Doxorubicin, Daunorubicin, Vincristin, Etoposid, Colchicin	Cyclosporin A, V-104
ABCC2	Vinblastin, Sulfinpyrazon	
ABCC3	Methotrexate, Etoposid	
ABCC4	Nukleosid-Monophosphate	
ABCC5	Nukleosid-Monophosphate	
ABCG2	Mitoxantron, Topotekan, Doxorubicin, Daunorubicin,	Fumitremorgin C

Umfangreiche Untersuchungen sind durchgeführt worden, mit dem Ziel die Entwicklung der MDR in der Tumortherapie zu verhindern. Dabei wurden zahlreiche Inhibitoren der wichtigsten ABC-Transporter entwickelt. Die parallele Gabe von Inhibitoren führte jedoch meistens zu einer erhöhten allgemeinen Toxizität der Zytostatika, da ABC-Transporter wichtige physiologische Bestandteile von Blut- Gewebeschranken sind. So konnten erhöhte ZNS-Nebenwirkungen von Tumortherapeutika mit der Inhibition von an der Blut- Hirnschranke exprimiertem Pgp in Verbindung gebracht werden (Tanigawara, 2000). Dadurch sind Dosislimitierungen der Zytostatika notwendig geworden, die für die Tumorsuppression nicht vorteilhaft waren. Neuere Untersuchungen ergaben jedoch hochspezifische Inhibitoren mit hoher Affinität zu ABCB1, die kaum zu unerwünschten Reaktionen führten oder das Zytostatika-Schema beeinflussten.

1.5 P-Glykoprotein (ABCB1)

P-Glykoprotein wurde vor knapp 30 Jahren von Juliano und Ling entdeckt und ist der zur Zeit am besten untersuchte ABC-Transporter überhaupt. Seine herausragendste Eigenschaft ist ein extrem breites Substratspektrum, das sich durch eine Vielfalt molekularer Strukturen auszeichnet. Unter den Transportsubstraten finden sich zahlreiche Arzneistoffe, die in unterschiedlichen Indikationen Anwendung finden (Tabelle 4). Eine Reihe von Zytostatika werden durch Pgp transportiert, weswegen dieser Carrier auch ursprünglich als wichtiger Auslöser der MDR identifiziert wurde. Es gibt nur wenige gemeinsame Strukturmerkmale, die Transportsubstrate des Pgp aufweisen. Pgp-Substrate sind in der Regel organische Moleküle mit einem Molekulargewicht von unter 200 Da bis fast 1900 Da. Die molekulare Struktur enthält häufig aromatische Gruppen, aber nicht-aromatische lineare oder zirkuläre Substrate werden ebenfalls transportiert. Die meisten Moleküle, die gut transportiert werden, sind nicht geladen oder schwache Basen. Es gibt jedoch auch saure Substanzen, wie Methotrexat oder Phenytoin, die ebenfalls Transportsubstrate von Pgp sind, wenn auch nur schwache. Allen Pgp-Substraten gemeinsam ist jedoch ihr amphipathischer Charakter. Dies könnte mit dem Transport-Mechanismus zusammenhängen, der für Pgp postuliert wurde. Danach inserieren die Substrate zuerst in der inneren Hälfte der Zytoplasmamembran und werden anschließend entweder durch Pgp in die äußere Hemimembran „geflippt“ oder direkt in den Extrazellulärraum transferriert (Borst P und Elferink RO, 2002). Nur amphipathische Moleküle haben die geeigneten physikochemischen Eigenschaften, um in biologischen Membranen zu inserieren.

Tabelle 4: Arzneistoffe, die durch P-glycoprotein transportiert werden.

Kategorie	Arzneistoff	Kategorie	Arzneistoff
Zytostatika	Actinomycin D	β-Blocker	Bunitrolol
	Daunorubicin		Celiprolol
	Doxorubicin		Talinolol
	Doxetaxel	ZNS Pharmaka	Fluphenazin
	Irinotecan		Perphenazin
	Mitomycin C		Phenoxazin
	Mitoxantron		Phenytoin
	Paclitaxel	H_1 Antihistaminika	Fexofenadin
	Tamoxifen		Terfenadin
	Tenoposid	H_2 Antihistaminika	Cimetidin
	Topotecan		Ranitidin
	Vinblastin	HIV Proteaseinhibitoren	Amprenavir
	Vincristin		Indinavir
Antibiotika	Cefazolin		Nelfinavir
	Cefoperazon		Ritonavir
	Erythromycin		Saquinavir
	Levofloxacin	Immunsuppressiva	Cyclosporin A
	Sparfloxacin		Tacrolimus
Antiemetika	Domperidon	CSE-Hemmer	Atorvastatin
	Ondansetron		Lovastatin
Herz Pharmaka	Amiodaron	Morphine	Morphium
	Digitoxin		Loperamid
	Digoxin	Steroide	Aldosteron
	Propafenon		Dexamethason
	Chinidin		Hydrocortison
Ca^{2+}-Kanal-Blocker	Diltiazem	Andere	Colchicin
	Mibefradil		Debrisoquin
	Nicardipin		Losartan
	Verapamil		Sestamibi

1.5.1 Die Rolle des Pgp in der Arzneimitteltherapie

Pgp ist hauptsächlich am apikalen Pol epithelialer Zellen lokalisiert. Deshalb ist der Transport von Pgp-Substraten von basolateral nach apikal gerichtet. Dies kann für Arzneimittel, die von Pgp transportiert werden, weitreichende Konsequenzen bezüglich der Aufnahme, Verteilung und Elimination haben. Viele dieser pharmakologischen Aspekte wurden zuerst an soge-

nannten Knockout-Mäusen, die defizient für die Maus Homologe Mdr1a und/oder Mdr1b des menschlichen Pgp waren, ermittelt (Kwei et al., 1999; Polli et al., 1999).

1.5.1.1 Die Funktion des Pgp an Blut- Gewebeschranken

Viele Arzneimittel oder Fremdstoffe können Blut- Gewebeschranken nicht oder nur schwer überwinden. Dadurch werden sensible Organe und Strukturen, wie z.B. das ZNS, Testes, Fetus und periphere Neurone vor Toxinen geschützt.

Endotheliale Zellen in den Kapillaren des ZNS sind durch sogenannte Tight-Junctions eng miteinander verbunden. Deshalb können Substanzen, die nicht klein genug sind, um durch den Interzellularraum zu diffundieren, nur durch Passage der Endothelzellen in das umgebende Hirngewebe gelangen. Da die meisten Pgp-Substrate ziemlich hydrophob sind, können sie prinzipiell durch passive Diffusion die endothelialen Zellmembranen überwinden und so im ZNS akkumulieren. In der luminalen (apikalen), d.h. dem Blut zugewandten Seite, befinden sich jedoch zahlreiche Pgp Transporter (Tanigawara, 2000). Somit können Substrate, die in die Endothelzellen von der Blutseite aus gelangen, sofort wieder in das kapilläre Lumen zurückgepumpt werden. Durch diesen Mechanismus wird der Nettofluß von Substraten in das ZNS sehr gering gehalten. Fehlt das Pgp an der Blut- Hirnschranke, wie z.B. bei Mdr1a Knockout-Mäusen, so kann die Konzentration von Pgp-Substraten im ZNS das 10- bis 100-fache gegenüber Kontrolltieren betragen. In Analogie zur Blut- Hirnschranke ist die Expression und Funktion des Pgp an den anderen Blut- Gewebeschranken zu sehen. Erwähnt werden sollte noch, das Pgp nicht der einzige ABC-Transporter ist, der am Aufbau dieser Diffusionsbarrieren beteiligt ist. Auch MRP1, BCRP und möglicherweise MRP2 sind wichtige Bestandteile der Blut- Gewebeschranken.

1.5.1.2 Hepatobiliäre und intestinale Exkretionsfunktion

Sowohl die kanalikuläre Membran von Hepatozyten, als auch die apikale (villöse) Membran intestinaler Epithelzellen des Dünn- und Dickdarms enthalten große Mengen von Pgp. Dort können Arzneistoffe, die Substrate von Pgp sind, effizient von der Leber in die Galle bzw. vom Darm über die Faeces ausgeschieden werden. Letzgenannter Vorgang wird von einigen Autoren auch im Gegensatz zur Absorbtion als sogenannte Exsorbtion bezeichnet. In Untersuchungen an Pgp Knockout-Mäusen wurden sowohl die biliäre als auch die intestinale Exkretionsfunktion des Pgp verifiziert. Die Clearance intravenös applizierter Arzneistoffe war in Kontrolltieren schneller und vollständiger, als in Pgp-defizienten Tieren.

1.5.1.3 Intestinale Absorbtion und orale Bioverfügbarkeit

Die hohe intestinale Expression von Pgp führt zu einer verminderten oralen Bioverfügbarkeit von Arznei- und Fremdstoffen, die Transportsubstrate von Pgp sind. Dies konnte in Pgp Knockout-Mäusen erstmals an der erhöhten Passage des Anti-Tumormittels Paclitaxel im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eindrücklich demonstriert werden (Stephens, 2002). Weitere Untersuchungen mit zahlreichen anderen Arzneistoffen konnten die Barriere- Funktion des Pgp für die intestinal Resorption verifizieren. Für einige Arzneistoffe, die nur einen engen therapeutischen Bereich aufweisen, wie z.B. Ciclosporin A, könnte die intestinale Pgp-Funktion ein ernsthaftes Problem darstellen. Aus diesem Grunde ist es für die pharmazeutische Industrie von großem Interesse, zu prüfen, ob ein Arzneistoff in der Entwicklung ein Transportsubstrat von Pgp ist.

1.5.1.4 Exkretionsfunktion in der Niere

Obwohl Pgp in großer Menge in den apikalen (luminalen) Membranen der proximalen Tubuli der Niere exprimiert wird ist seine Rolle bei der renalen Clearance von Arznei- und Fremdstoffen nicht eindeutig klar. Eigentlich sollte Pgp zur Exkretion von Substraten vom Blutplasma in den Urin beitragen. Die meisten pharmakologischen Untersuchungen an Pgp Knockout-Mäusen ergaben jedoch keine eindeutigen Belege für diese Funktion. In einigen Studien führte die Abwesenheit von Pgp sogar zu einer verstärkten renalen Exkretion und Clearance von Arzneistoffen, über dessen Ursachen bisher nur spekuliert wird. Angesichts der belegbaren Exkretionsfunktion von Pgp in anderen Organen und Geweben wird jedoch vermutet, dass Pgp in der Niere eine ähnliche Funktion übernehmen sollte. Weitere Untersuchungen werden diese Frage klären müssen.

1.6 Hepatozelluläre Transportsysteme

Die Leberzelle ist eine polarisierte epitheliale Zelle, deren basolaterale (sinusoidale) und apikale (kanalikuläre) Plasmamembrandomäne durch „tight junctions“ voneinander getrennt sind. Zur Erhaltung des enterohepatischen Kreislaufs sind aktive Carrier-Systeme nötig, die durch ihre polare Anordnung an der Zytoplasmamembran einen vektoriellen Transport von Gallensäuren und anderen gallepflichtigen Substanzen vom portalen Blut in das Gallengangsystem aufrechterhalten. Die Aufnahme biliärer Substrate in die Leberzelle wird durch basolateral lokalisierte Transport-Systeme vermittelt, die mit dem portalen Blut über Fenestrae sinusoidaler Endothelien und den Disseschen Raum in Kontakt stehen. Zu den basolateralen Carriern gehören das hochaffine Na^+-abhängige Gallensäure Aufnahme System NTCP/Ntcp und

eine Familie von multispezifischen oranischen Anionen Transportern OATP/Oatp, die neben der Na^+-unabhängigen Aufnahme von Gallensäuren noch eine Reihe weiterer Substrate in den Hepatozyten befördern. Nach Aufnahme in die Hepatozyten gelangen Gallensäuren und andere cholephile Substrate via Diffusion durch das Zytoplasma, oder über intrazelluläre Membranvesikel an den kanalikulären Pol. Die kanalikuläre Membrandomäne ist der exkretorische Abschnitt der Hepatozytenmembran und bildet die Begrenzung der Gallenkanalikuli. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gallesekretion wird durch kanalikuläre Carrier-Systeme vermittelt, die Substrate gegen einen großen Konzentrationsgradienten transportieren. Die Energie für diesen steilen Aufwärtstransport beziehen diese Transporter durch die Hydrolyse von ATP. Aus diesem Grunde gehören die kanalikulären Transmembrantransporter fast ausschließlich zur ABC Familie.

2. Fragestellungen und Übersicht der eigenen Arbeiten

Nachdem sowohl Untersuchungen *in vitro*, als auch *in vivo* an Tieren und in klinischen Studien am Menschen gezeigt haben, dass Pgp eine entscheidende Rolle in der Pharmakokinetik einiger Arzneistoffe spielt (Tanigawara, 2000), stellte sich die Frage, inwieweit genetische Polymorphismen im MDR1 für die interindividuelle Variabilität von Pharmaka, die Transportsubstrate des Pgp sind, eine Bedeutung haben. Ziel der Arbeiten war deshalb, zunächst Polymorphismen des MDR1-Gens zu identifizieren und anschließend zu prüfen, ob es eine Assoziation genetischer Polymorphismen des Pgp mit den Plasmaspiegeln von Arzneistoffen gibt.

Da bis dato lediglich die natürlich vorkommenden Polymorphismen im Exon 21 und Intron 12 bekannt waren, musste zur Beantwortung der ersten Fragestellung zunächst das MDR1-Gen (ABCB1) systematisch auf genetische Polymorphismen untersucht werden (Hoffmeyer, *et al.*, 2000). In derselben Studie wurde auch eine mögliche Assoziation der ermittelten Polymorphismen mit der intestinalen Pgp Expression und der oralen Bioverfügbarkeit der Modellsubstanz Digoxin analysiert. Die Screening-Methode zur Identifizierung von ABCB1-Polymorphismen basierte auf der sogenannten „High-Throughput“ Sequenzierung und eignet sich deshalb aus Kostengründen und Gründen der Schnelligkeit nicht für die Genotypisierung großer Probanden-Kollektive für umfangreiche Genotyp/Phänotyp Korrelations-Untersuchungen. Deshalb wurden in einem zweiten Schritt für die wichtigsten MDR1-Polymorphismen PCR-RFLP Assays entwickelt und die Genotyp- und Allelfrequenzen in einer großen Stichprobe gesunder kaukasischer Freiwilliger von n=460 Probanden ermittelt (Cascorbi *et al.*, 2001). Zur Überprüfung der funktionellen Relevanz der häufigen und an sensiblen regulatorischen Abschnitten des ABCB1-Gens vorkommenden genetischen Varianten wurden zwei klinische Studien durchgeführt. Die erste Untersuchung ergab keine Abhängigkeit der Resorptionskinetik nach einmaliger Gabe von 1 mg Digoxin mit ABCB1-Genotypen (Gerloff *et al.*, 2002). In der zweiten Studie wurden Haplotypen der partiell miteinander verbundenen ABCB1-Polymorphismen in Exon 21 2677 und Exon 26 3435 gebildet (Johne *et al.*, 2002) und auf ihren Einfluß auf die Steady-State Kinetik von 0,25 mg oral applizierten Digoxins untersucht. Der Haplotyp <12> (2677G/3435T) war mit hohen Digoxin-Plasmaspiegeln assoziiert, wohingegen bei den Haplotypen <11> (2677G/3435C) und <22> (2677T/3435T) niedrige Digoxin-Plasmakonzentrationen zu verzeichnen waren.

Der zweite Schwerpunkt der Forschungsarbeit erstreckte sich auf die biliäre Exkretion organischer Anionen, unter besonderer Berücksichtigung monovalenter Gallensäuren, da diese

mehr als 90% der gelösten Bestandteile der Galle ausmachen. Der Mechanismus der Exkretion monovalenter Gallensäuren war weitgehend unbekannt. Es wurde jedoch vermutet, dass ein Transportprotein aus der Familie der ABC-Carrier Gallensäuren aus dem Hepatozyten in die Kanalikuli des Gallengangssystems pumpt. Voraussetzung für weitere Studien war deshalb die Identifizierung, molekulare Klonierung und funktionelle Charakterisierung dieses Carriers (Gerloff T *et al.*, 1998), der schließlich als „bile salt exporting peptide“ (Bsep, Abcb11) bezeichnet wurde. Der zweitwichtigste kanalikuläre Gallensäurenexporter ist das sogenannte hepatozelluläre „multidrug resistance related peptide“, Mrp2/cMoat (AbcC2). Die Funktion dieses Carriers, als Exkretionspumpe für konjugierte Gallensäuren wurde in einem eukaryoten Expressionssystem in Cos2-Zellen untersucht (Madon J, *et al.*, 1997).

Unter den pathophysiologischen Bedingungen des verminderten Galleflusses, der sogenannten Cholestase, kommt es zu weitreichenden Änderungen der Transkriptionellen- und Posttranskriptionellen-Regulation der an der Galleexkretion beteiligten Transport-Proteine (Gerloff T *et al.*, 1999; Geier A *et al.*, 2002; Geier A *et al.*, 2003a; Geier A *et al.*, 2003b). Dabei folgt die Expression hepatozellulärer Carrier-Proteine einem nahezu uniformen Muster: Die Proteinmasse basolateral lokalisierter Transporter wird vermindert, wohingegen die der kanalikulär lokalisierten Carrier unverändert bleibt, bzw. sogar heraufreguliert wird. Dieses Expressionsmuster dient dem Schutz der Leberzelle vor einer Akkumulation toxischer Bestandteile der Galle, indem deren Aufnahme aus dem sinusoidalen Blut reduziert und die Exkretion in die Galle erhöht wird. Möglichkeiten der transkriptionellen Regulation des wichtigsten Gallensäurenexporters Bsep wurden an regulatorischen Elementen seiner 5’-untranslatierten Nukleotidsequenz, des Promotors, untersucht (Gerloff T *et al.*, 2002). In dieser Studie zeigte sich, dass sowohl Gallensäuren, als Liganden des sogenannten Farnesyl-X-Rezeptor (FXR), als auch Arzneistoffe, über noch unbekannte Rezeptoren, die transkriptionelle Regulation des Bsep beinflussen. Die Auswertung der letzteren Regulationsmechanismen dient dem Verständnis der Medikamenten-induzierten Cholestase.

2.1 Auswirkungen von Polymorphismen des ABCB1 auf die Pharmakokinetik

2.1.1 Einleitung

Zu den Transportsubstraten von Pgp gehören zahlreiche Arzneistoffe. Deshalb können sowohl die Transportaktivität, als auch der Expressionsgrad des Carriers-Proteins die Arzneimitteltherapie entscheident beeinflussen. Beispielsweise verursachen hohe Transportaktivitäten und Expressionsgrade von Pgp in der Tumor-Therapie eine Resistenz von Krebszellen gegen

diverse Zytostatika (Borst P und Elferink RO, 2002). Aber auch in normalen Geweben kann jede Veränderung der Transportfunktion von ABCB1 die Arzneimitteltherapie beeinflussen.

Polymorphismen im ABCB1-Gen können die Expression des Carriers verändern. Die Menge des exprimierten Transportproteins beinflußt die Transportkapazität eines Carriers. Dies wird besonders deutlich bei der Induktion von Pgp durch z.B. das Antibiotikum Rifampicin. Die Bioverfügbarkeit des Herzglykosids Digoxin war nach Vorbehandlung mit Rifampicin wesentlich geringer als die der nichtbehandelten Kontrollgruppe (Greiner *et al.,* 1999). Die Rifampicin-Behandlung führte zu einer signifikant höheren Expression von Pgp im oberen Dünndarmepithel und damit zu einer erhöhten intestinalen Efflux-Aktivität von Digoxin. Regulatorische Elemente innerhalb des ABCB1-Gens, in denen Polymorphismen die Pgp-Expression verändern könnten, sind der Promotor, aber auch Enhancermotive. Darüberhinaus können Änderungen der Protein-Expression auch durch strukturelle Unterschiede im Genom, wie z.B. im Chromatin-Aufbau, in der Methylierung oder Azetylierung der DNA, begründet sein, die nicht nur direkt auf das ABCB1-Gen wirken, sondern das genetische Umfeld von ABCB1 ebenfalls beeinflussen. Polymorphismen, die über diese Mechanismen indirekt die Expression eines Proteins verändern, sind jedoch nur schwer kausal zu charakterisieren, da der zugrunde liegende molekulare Mechanismus nicht leicht nachgewiesen werden kann. Dennoch lassen sich diese Polymorphismen aufgrund der linearen Organisation des menschlichen Genoms auf den Chromosomen als Marker für z.B. unterschiedliche Expressionsgrade im ABCB1-Gen verwenden.

Die Transport-Aktivität ist durch die Effizienz und Substratspezifität eines Carrier-Proteins gekennzeichnet und wird allgemein durch die Konzentration eines Substrats bei halbmaximaler Transportgeschwindigkeit, K_m, ausgedrückt. Polymorphismen, die zu Aminosäureaustauschen führen, können die Aktivität eines Transport-Proteins verändern. Vor dem systematischen Screening des ABCB1-Gens waren zwei natürlich vorkommende Polymorphismen bekannt (Mickley *et al.*, 1998), die möglicherweise zu klinischen Auswirkungen führten. Tatsächlich konnte durch gezielte Mutagenese des ABCB1-Gens gezeigt werden, dass Aminosäureaustausche in bestimmten Domänen zu deutlichen Veränderungen der Pgp Transportaktivität führen (Ambudkar *et al.*, 1999; Ramachandra *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1996). Es liegt nahe, dass Aminosäureaustausche, verursacht durch natürlich vorkommende Polymorphismen ähnliche Auswirkungen auf die Funktion von Pgp haben könnten.

2.1.2 Ergebnisse

2.1.2.1 Identifizierung und Häufigkeiten von Polymorphismen des ABCB1

Zunächst wurden alle 28 Exons, die 5'-untranslatierte Region des Kernpromotors und intronische Sequenzen im Bereich der Exon-Intron Grenzen des ABCB1-Gens systematisch auf genetische Polymorphismen untersucht (Fa. Epidauros, Bernried). Dazu wurden die entsprechenden Genabschnitte aus DNA-Proben von 28 Individuen mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Nukleotidsequenzen wurden auf Abweichungen gegenüber der in der GenBank veröffentlichten Referenzsequenz (AC002457; AC005068) analysiert. Für selten auftretende Abweichungen wurden DNA-Proben von bis zu 188 Individuuen untersucht.

Insgesamt konnten 15 Polymorphismen in Form von Einzelbasenaustauschen, sogenannten „single nucleotide polymorphisms" (SNPs) festgestellt werden (Abb. 2). Von diesen veränderten 12 die Aminosäuresequenz des Pgp nicht. Sieben Polymorphismen waren auf die Introns 4, 6, 12, 16 und 17 nahe der Exon-Intron Grenze verteilt. Drei exonische Polymorphismen, eine in Exon 12 und zwei in Exon 26, befanden sich in der sogenannten „wobble" Position, in der aufgrund des degenerierten genetischen Codes verschiedene Basen an der dritten Stelle des Codon-Triplets für die gleiche Aminosäure kodieren. Ein nichtkodierender Basenaustausch, der in ca. 11.2% heterozygoter Individuen vorkam, befand sich direkt vor der ATG Startstelle für die Translation. Polymorphismen, die zu Veränderungen der Aminosäuresequenz führten konnten in den Exons 2, 5 und 11 nachgewiesen werden. Der kodierende SNP in Exon 2 verursachte einen Asn-21-Asp Austausch und trat mit einer Häufigkeit von 17.6% heterozygoter und 0.5% homozygoter Individuen innerhalb der Stichprobe auf. Die Frequenz heterozygoter Träger des SNPs in Exon 5, der zum Phe-103-Leu Austausch führte war 1.2%, wohingegen der dritte kodierende Polymorphismus in Exon 11 (Ser-400-Asn) bei 12.9% heterozygoter Individuen auftrat. Mögliche Haplotypen durch Kombination der identifizierten SNPs ließen sich durch Sequenzierung allein nicht sicher nachweisen. Es gab Hinweise, dass der SNP in Intron 6 mit einem SNP in Exon 12 verbunden war. Weitere miteinander verbundene Polymorphismen konnten nicht abgeleitet werden.

Die weitere Untersuchung zur Ermittlung der Allel-Häufigkeiten von ABCB1 SNPs wurde in einer großen Stichprobe von n=461 Individuen deutscher Herkunft vorgenommen (Cascorbi *et al.*, 2001). In die Studie wurden SNPs eingeschlossen, die in der Voruntersuchung eine hohe Allelfrequenz aufwiesen, die zu Aminosäureaustauschen führten oder die in der Promotorregion des ABCB1 lagen. Darüberhinaus wurde nach noch unbekannten SNPs gesucht. Zur Identifizierung der Einzelbasen-Austausche wurden PCR-basierende RFLP-Assay entwickelt,

die in zukünftigen Assoziationsstudien als schnelle und kosteneffiziente Methode der Genotypisierung dienen sollten.

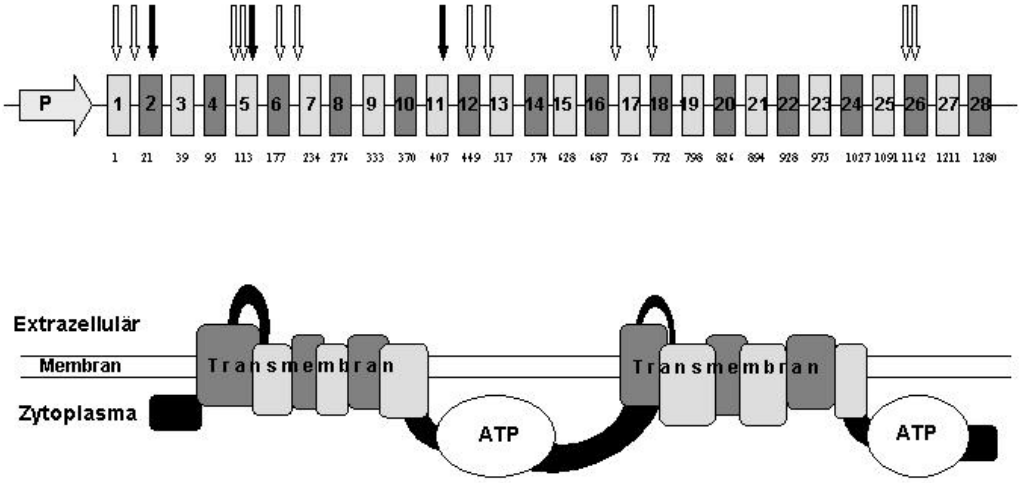

Abb. 2: Verteilung der ermittelten SNPs auf dem ABCB1 Gen

Insgesamt 5 Aminosäure-austauschende SNPs konnten in der Stichprobe ermittelt werden. Der Polymorphismus in Exon 2 (A61G), der zum Austausch von Asn21Asp führt, trat mit einer Allelfrequenz von 11,2 % auf. Es gab lediglich 4 Individuen in der Untersuchungsgruppe, die homozygot für diesen Einzelbasenaustausch waren. Der SNP G1199A (Ser400Asn) hatte eine Allel-Häufigkeit von 5,5 %. Interessanterweise konnten an der selben Stelle in Exon 21, cDNA-Position 2677 insgesamt drei Nukleotid-Varianten nachgewiesen werden: G, T und A. Dieser Befund einer sogenannten Triple-Mutation war bisher unbekannt. Die daraus resultierenden Codons der Position 893 traten mit einer Häufigkeit von GCT (Ala) 56,5 %, TCT (Ser) 41,6 % und ACT (Thr) 1,9 % auf. Bis auf homozygote Träger des A-Allels in Exon 21 2677 konnten alle Kombinationen der Triple-Mutation beobachtet werden. Mittels denaturierender HPLC wurde ein weiterer, bisher unbekannter Polymorphismus entdeckt, der zum Aminosäure-Austausch Gln1107Pro führte und im Exon 26 3320A>C lokalisiert war. Zwei Individuen waren heterozygote Träger dieses seltenen SNPs. Der in der Voruntersuchung beschriebene kodierende Polymorphismus in Exon 5 (Phe103Leu) trat in dieser großen Stichprobe nicht auf. Die häufigsten, wenn auch nicht-kodierenden, genetischen ABCB1-

Varianten waren C1236T im Exon 12, mit einer Allel-Häufigkeit von 41,0 % und C3435T in Exon 26, mit einer Frequenz von 53,9 %. Zu den intronischen Polymorphismen, die mit hoher Frequenz auftraten, gehörten C/T in Exon 6 + 139 (37,2 %) und T/A in Exon 17-76 (46,2 %).

Tabelle 5: Häufigkeiten genetischer Varianten des ABCB1 in 461 deutschen Freiwilligen

Ort	Position	Allel	Effekt	Allel Frequenz (%)	Genotyp	Genotyp Frequenz (%)
Intron 1	Exon 2-1	G	Initiation der	91.0	G/G	82.0
		A	Translation?	9.0	G/A	18.0
					A/A	0.0
Exon 2	cDNA 61	A	21 Asn	88.8	A/A	78.5
		G	21 Asp	11.2	A/G	20.6
					G/G	0.9
Intron 6	Exon 6+139	C		62.8	C/C	39.0
		T		37.2	C/T	47.5
					T/T	13.4
Exon 11	cDNA 1199	G	400 Ser	94.5	G/G	88.9
		A	400 Asn	5.5	G/A	11.1
					A/A	0.0
Exon 12	cDNA 1236	C	Wobble	59.0	C/C	34.4
		T		41.0	C/T	49.2
					T/T	16.4
Intron 12	Exon 12+44	C		95.1	C/C	90.2
		T		4.9	C/T	9.8
					T/T	0.0
Intron 16	Exon 17-76	T		53.8	T/T	28.4
		A		46.2	T/A	50.8
					A/A	20.8
Exon 21	cDNA 2677	G	893 Ala	56.5	G/G	30.9
		T	893 Ser	41.6	G/T	49.2
		A	893 Thr	1.9	T/T	16.1
					G/A	2.0
					T/A	1.8
					A/A	0.0
Exon 26	cDNA 3396	C	Wobble	99.7	C/C	99.5
		T		0.3	C/T	0.5
					T/T	0.0
Exon 26	cDNA 3421	T	1141 Ser	99.7	T/T	n.a.
		A	1141 Thr	0.3	T/A	n.a.
					A/A	n.a.
Exon 26	cDNA 3435	C	Wobble	46.1	C/C	20.8
		T		53.9	C/T	50.5
					T/T	28.6

2.1.2.2 Funktionelle Charakterisierung von Polymorphismen des ABCB1

2.1.2.2.1 Intestinale Expression des ABCB1 Transport Proteins

Zur Kärung der Frage, ob ABCB1 Polymorphismen die intestinale Expression des ABCB1-Transport Proteins P-glykoprotein (Pgp) beeinflussen, wurden Biopsie-Material und Zellpreparationen aus dem Duodenum von Probanden und Patienten des Dr. Margarete Fi-

scher-Bosch Instituts für Klinische Pharmakologie in Stuttgart mittels Immunhistochemie und Western-Blot Analyse quantifiziert. Die Expression des Carrier Proteins wurde auf die des intestinalen Markerproteins Villin normalisiert (Hoffmeyer *et al.*, 2000).

Die Pgp Expression homozygoter Träger des T-Allels in Exon 26 3435 war im Vergleich zum C/C Genotyp mindestens um den Faktor 2 vermindert (Abbildung 3). Heterozygote Individuen dieses Allels wiesen eine intermediäre Pgp Expression auf. Die Maximale Pgp Expression in der Gruppe homozygoter Träger des C-Allels im Exon 26 3435 war um mehr als das 65-fache höher als die minimale Pgp Expression in der Gruppe homozygoter T/T Träger.

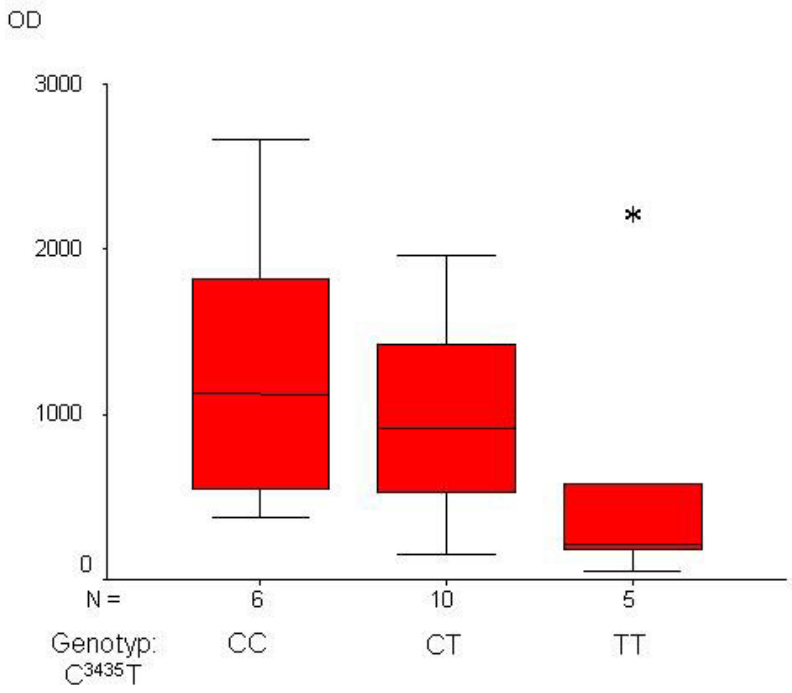

Abb. 3: Intestinale Pgp Expression in Abhängigkeit vom ABCB1 Exon 26 3435 Genotyp

2.1.2.2.2 In vivo Transportaktivität des ABCB1 Transport Proteins

Zunächst wurde in einer kleinen Stichprobe von 8 gesunden Freiwilligen die *in vivo* Transportaktivität des Pgp nach Induktion mit Rifampicin ermittelt. Dazu wurde der Zeitverlauf der Plasmaspiegel des Herzglykosids Digoxin nach oraler Gabe von 1 mg bestimmt. Da Digoxin fast ausschließlich unverändert eliminiert wird, also keiner nennenswerten Metabolisierung unterliegt, ist es als Modellsubstrat zur Bestimmung der *in vivo* Pgp Transportaktivität geeignet. Darüberhinaus ergab ein Vergleich der intestinalen Pgp Expression mit der Plasmakonzentration von Digoxin nach oraler Gabe einen inversen Zusammenhang zwischen der expri-

mierten Pgp Menge und der Digoxin Resorption (Hoffmeyer *et al.*, 2000). Die Untersuchung der Stichprobe zeigte, dass Träger des T-Allels in Exon 26 3435 die höchsten Digoxin-Plasmaspiegel nach Rifampicin Induktion aufwiesen, wohingegen bei Individuen mit C/C Genotyp signifikant niedrigere Spiegel gemessen wurden (Abbildung 4). Dementsprechend war die Digoxin-Plasmakonzentration nach Rifampicin Induktion in einem homozygoten Träger für das T-Allel 4-fach höher als die minimal gemessene Konzentration eines homozygoten C-Allel Trägers.

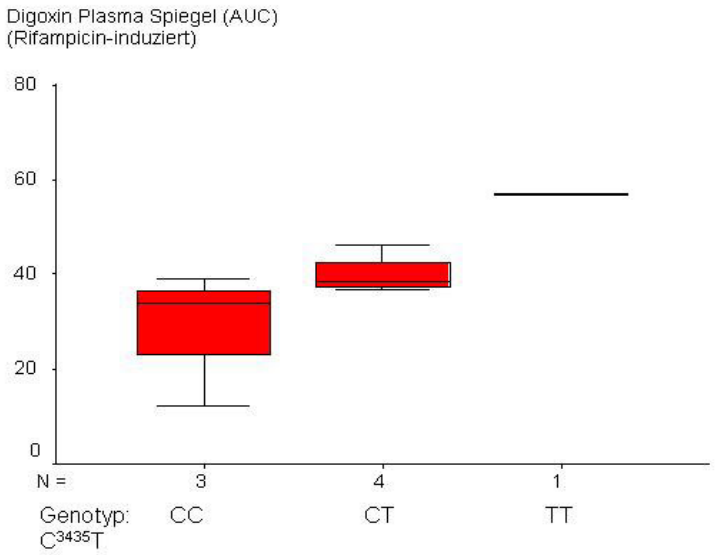

Abb. 4: Digoxin-Plasmaspiegel (AUC) in Abhängigkeit vom ABCB1 Genotyp im Exon 26 3435

In einer größeren Studie an 50 gesunden Freiwilligen sollte der Gendosiseffekt der ABCB1 Exon 26 3435 Allele auf die Resorption von 1 mg oral verabreichten Digoxins untersucht werden, ohne vorherige Induktion mit Rifampicin (Gerloff *et al.*, 2002a). In der Studie wurden außerdem sechs weitere Polymorphismen des ABCB1 Gens untersucht, die entweder mit einer Allel Häufigkeit von mindestens 10 % auftraten (Exon 6+139C>T, Exon 17-76T>A), zu Aminosäureaustauschen führten (61A>G, 1199G>A, 2677G>T>A) oder in regulatorischen Elementen der Transkription lokalisiert waren (Exon 2-1G>A). Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass Unterschiede im pharmakokinetischen Profil zwischen den verschiedenen Genotypen vor allem während der Frühphase der Resorption auftraten und am besten durch die Plasmakonzentrations-Zeitkurve (AUC) innerhalb der ersten Stunden nach oraler Gabe von Arzneistoffen widergegeben wird. Da die Zeit bis zur Plasmaspitzenkonzentration t_{max} für

Digoxin eine breite Streuung zwischen 0,5 bis 3 h aufwies, wurde als Parameter der Resorption die AUC von 0 bis 4 h, AUC(0,4) festgelegt. In der Stichprobe konnten nach einer Einmaldosis von 1 mg Digoxin keine Unterschiede in der Resorptionskinetik zwischen den untersuchten ABCB1 Polymorphismen festgestellt werden (Abbildung 5).

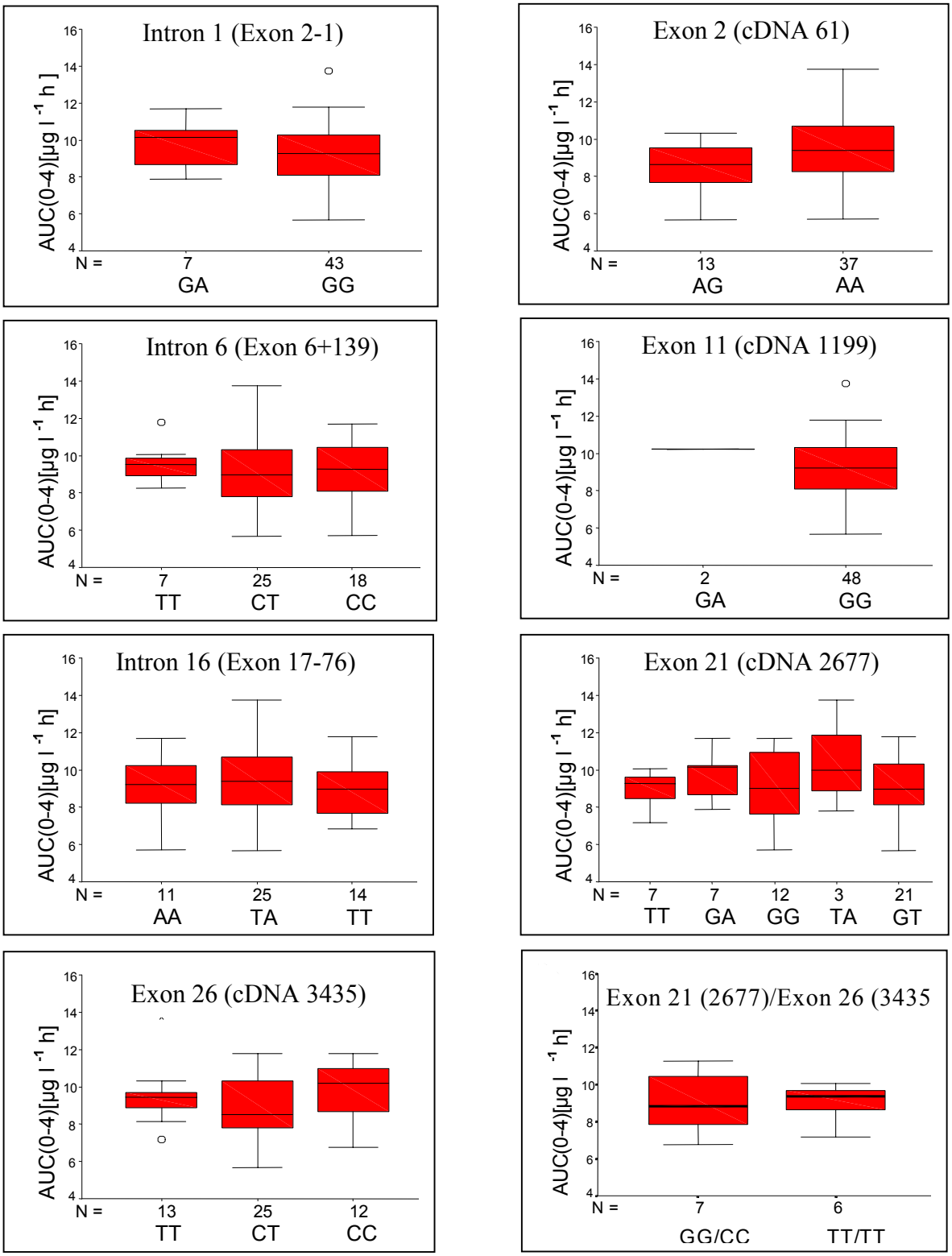

Abb. 5: Digoxin Kinetik nach oraler Einmaldosis von 1 mg

Sowohl die AUC(0,4), als auch die Plasmaspitzenspiegel C_{max} und der Parameter t_{max} ließen nicht auf eine Korrelation mit einer Genotyp-Gruppe schließen. Auch die Normalisierung der Daten auf das ideale Körpergewicht, um den Einfluß interindividueller Unterschiede zu eliminieren ergab keinen Zusammenhang zwischen Genotyp und Digoxin-Resorptionskinetik. Es fiel jedoch eine breite Streuung der Daten innerhalb der Genotyp Gruppen auf.

In der dritten Studie wurde die funktionelle Relevanz der Allele des Exon 26 3435 allein und in Kombination mit Allelen des Exon 21 2677 zu sogenannten Haplotypen geprüft (Johne *et al.*, 2002). Gesunde Freiwillige wurden entsprechend ihres ABCB1 Exon 26 3435 Genotyps in drei Untersuchungsgruppen zu je 8 Personen aufgeteilt. Jede Gruppe enthielt 8 Individuen, die entweder den CC-Wildtyp aufwiesen, homozygot für das T-Allel waren, oder als heterozygote CT-Genotypen identifiziert wurden. Der Verlauf der Digoxin-Resorption wurde im Fließgleichgewicht (Steady-State) erhoben, d.h. über einen Zeitraum von 4 Tagen erhielten die Probanden 0,25 mg des Arzneistoffs als einmalige, orale Tagesdosis, bevor am Tag 5 nach erneuter Einnahme die kinetischen Parameter AUC(0,4), C_{max} und t_{max} ermittelt wurden. Darüberhinaus wurde die renale Exkretion des Digoxins im Sammelurin bestimmt. Die primären Digoxin-Resorptionsparameter AUC(0,4) und C_{max} wiesen signifikante Unterschiede zwischen den CC-, CT- und TT-Trägern im Exon 26 3435 auf (Tabelle 6).

Tabelle 6: Parameter der Digoxin-Steady-State Kinetik in Abhängigkeit vom ABCB1 Exon 26 3435C>T Genotyp

	CC (n=8)	CT (n=8)	TT (n=8)	p	Veränderung (%)
C_{max} (µg/L)	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,5	2,1 ± 0,5	0,043	24
T_{max} (h)	1,0 (0,5-1,5)	1,5 (0,5-2,0)	0,8 (0,5-1,5)	0,46	-20
AUC(0-4) (µg*h/L)	4,6 ± 0,7	4,9 ± 1,1	5,6 ± 0,9	0,42	22
AUC(0-24) (µg*h/L)	15,5 ± 2,5	17,6 ± 3,7	18,3 ± 4,1	NS	18
C_{trough}	0,44 ± 0,07	0,60 ± 0,19	0,60 ± 0,16	0,035	36

Die mittleren Digoxin-Plasmakonzentrationen waren am höchsten in der 3435TT Gruppe. Auch die Resorptionsgeschwindigkeit, ausgedrückt durch den Parameter t_{max} war kürzer in der Gruppe der TT-Träger, verglichen mit dem CC-Wildtyp. Die Digoxin Resorption war

offensichtlich am schnellsten im TT-Genotyp. Die Kinetischen Parameter des Steady-States wiesen ähnliche Unterschiede in den drei untersuchten Genotyp-Gruppen auf. Die AUC(0,24) war am höchsten im TT-Genotyp, obwohl sich für diese Beobachtung keine statistische Signifikanz ergab. Die Digoxin-Talspiegel C_{trough} wiesen in homozygoten T-Allelträgern um 36 % höhere Werte auf, als in Individuen mit CC-Genotyp. In der Gruppe des heterozygoten CT-Genotyps lagen die Werte der meisten erhobenen kinetischen Parameter zwischen denen aus der Gruppe der CC- und TT-Individuen.

Die Analyse der ABCB1-Genotypen aller Individuen aus der Stichprobe ergab miteinander zu sogenannten Haplotypen verbundene Allele. Besonders Kombinationen von Allelen des Exon 21 2677 und Exon 26 3435 waren bei den häufig vorkommenden Haplotypen vertreten. Die möglichen Allelkombinationen dieser beiden Genloci und die daraus resultierenden Genotypen sind in Abbildung 6 aufgeführt.

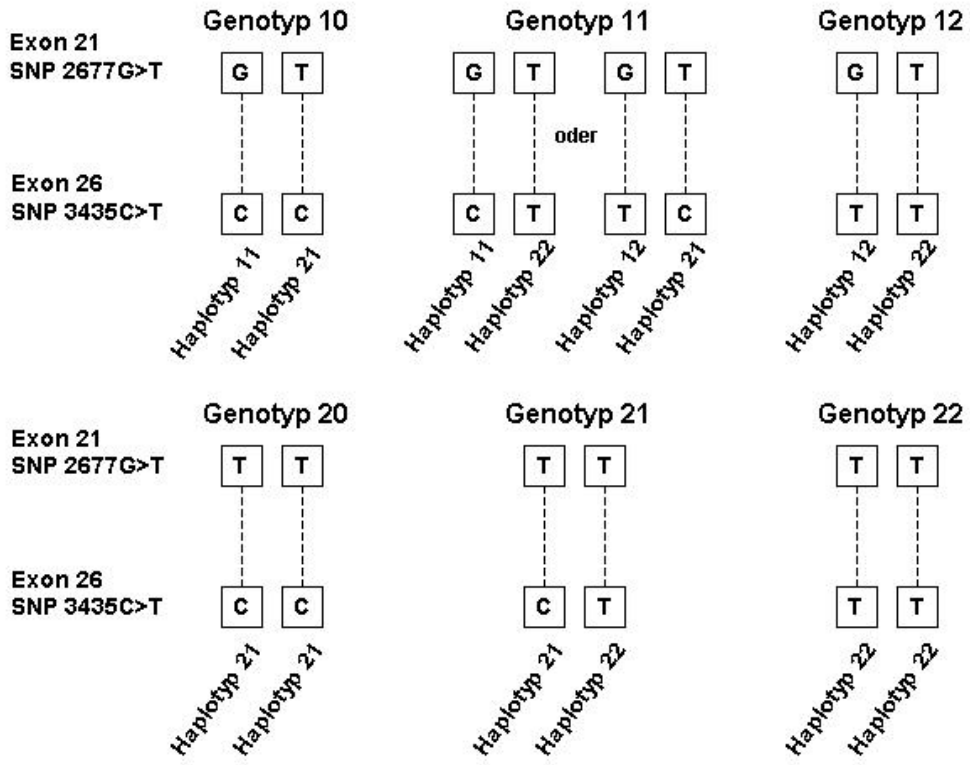

Abb. 6: Haplotypen aus den miteinander verbundenen SNPs in Exon 21 2677 und Exon 26 3435

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluß der Exon 21 2677/ Exon 26 3435 Haplotypen auf die Digoxin-Steady-State Kinetik untersucht. In der Gruppe Probanden, die mindestens einen Haplotyp 12 (2677G/3435T) aufwiesen, konnten signifikant höhere Werte für die

AUC(0,4) und die Plasmaspitzenkonzentration C_{max} ermittelt werden, als in Individuen, bei denen dieser Haplotypen nicht vorkam (Tabelle 7). Träger des Haplotyps 11 (2677G/3435C) hatten signifikant niedrigere Werte für die AUC(0,4) als Nicht-Träger.

Tabelle 7: Kinetische Parameter nach Haplotypen der verbundenen ABCB1 SNPs im Exon 21 2677 und Exon 26 3435.

	C_{max} (µg/L)	T_{max} (h)	AUC(0-4) (µg*h/L)	AUC(0-24) (µg*h/L)	C_{trough} (µg/L)
Haplotype 11					
Träger (n = 16)	1,7 ± 0,4	1,0 (0,5-2,0)	4,7 ± 0,9	16,5 ± 3,2	0,52 ± 0,16
Nichtträger (n = 8)	2,1 ± 0,4	0,8 (0,5-1,5)	5,6 ±0,9	18,3 ± 4,1	0,59 ± 0,16
p	0,011	NS	0,013	NS	NS
Haplotype 12					
Träger (n = 7)	2,1 ± 0,4	1,0 (0,5-1,5)	5,7 ± 0,9	18,7 ± 4,2	0,59 ±0,18
Nichtträger (n = 17)	1,8 ± 0,4	1,0 (0,5-2,0)	4,8 ± 0,9	16,5 ± 3,2	0,52 ±0,16
P	0,24	NS	0,009	NS	NS
Haplotype 22					
Träger (n = 15)	2,0 ± 0,5	1,0 (0,5-2,0)	5,3 ± 1,1	18,0 ± 3,9	0,60 ± 0,18
Nichtträger (n = 9)	1,7 ± 0,2	1,0 (0,5-1,5)	4,6 ± 0,7	15,6 ± 2,4	0,45 ± 0,08
P	NS	NS	NS	NS	0,025

2.1.3 Diskussion

2.1.3.1 Lokalisation von ABCB1 SNPs und Einfluß auf das Carrier-Protein

Die Untersuchungen des ABCB1-Gens ergaben einen hochpolymorphen Charakter (Hoffmeyer *et al.*, 2000; Cascorbi *et al.*, 2001). Die meisten der ermittelten Polymorphismen waren allerdings intronisch oder stumm, d.h. die Aminosäuresequenz des Pgp wurde nicht verändert. Bemerkenswerter Weise traten SNP's, die zu Aminosäure-Austauschen führten bis auf einen Ala893Ser Polymorphismus auch nur selten auf. ABCB1 gehört als Mitglied der ABC-Transmembrantransporter zu einer der ältesten Proteinfamilien (Borst und Elferink 2002), deren Gene im Laufe der Evolution konserviert wurden. Offensichtlich besteht ein Selektionsdruck, der die Proteinstruktur des Pgp weitgehend erhält und damit dessen physiologische Funktion als Barriere- und Detoxifizierungs-Mechanismus sichert.

Unter den identifizierten Polymorphismen waren 4 von besonderem Interesse, 3 davon führten zu Aminosäureaustauschen und einer befand sich in unmittelbarer Nachbarschaft der

Transkriptionsstartstelle. Durch den ersten kodierenden SNP in Exon 2 wurde im Pgp an der Position 21 Asn durch Asp ersetzt. Dadurch kam es an dieser Position zu einer Verschiebung der Nettoladung, wodurch das Carrier-Protein einen mehr sauren Charakter erhielt. Der SNP in Exon 2 war nahe dem N-Terminus des Proteins gelegen. Mutationsanalysen konnten jedoch bisher keine größere Bedeutung dieser Region für die Pgp-Transportfunktion nachweisen. Dennoch kann die funktionelle Relevanz dieses SNPs nicht ausgeschlossen werden. Eine weitere Veränderung des Proteins trat bei einem SNP im Exon 5 auf und führte zu einem Austausch von Phenylalanin mit Leuzin an Position 103. Diese Proteinveränderung betraf einen extrazellulären Bereich des Pgp, kurz vor der zweiten Transmembran-Domäne. Die Position dieses Exon 5 Polymorphismus lag in unmittelbarer Nachbarschaft von Glykosilierungsstellen. In einer weiteren Untersuchung an einer großen Stichprobe konnte dieser seltene SNP, der bei 2 heterozygoten Trägern auftrat, nicht identifiziert werden. Auch durch eine nochmalige Sequenzierung der beiden DNA-Proben konnte der Polymorphismus nicht reproduziert werden, so dass bei der ersten Untersuchung möglicherweise ein Sequenzierartefakt vorlag. Ein SNP im Exon 11 führte zum Austausch von Serin mit Asparagin an Position 400. Dadurch kam es in der Seitenkette an dieser Stelle des Proteins zu einer signifikanten Veränderung der Molekülgröße und möglicherweise auch zu einer Ladungsänderung in Abhängigkeit vom pH und von isoelektrischen Kräfte in der Umgebung der Proteinstruktur. Der Polymorphismus betraf eine Region auf der zytoplasmatischen Seite des Proteins, unmittelbar vor der ersten ATP-Bindungsstelle. Intakte ATP-Domänen sind jedoch eine außerordentlich wichtige Voraussetzung für die Transportfunktion des Pgp, weswegen die funktionelle Untersuchung dieses SNPs von großem Interesse war. Im Exon 21 2677 konnte eine sogenannte Triple-Mutation identifiziert werden, d.h. an diesem Genort kam es zu dem seltenen Phänomen von 3 Varianten mit den Nukleotiden G, T oder A. Dadurch waren im Protein in der zweiten Transmembrandomäne an Position 893 die Aminosäuren Ala, Ser oder Thr möglich. Der Exon 21 2677 Polymorphismus war mit dem stummen, nichtkodierenden SNP in Exon 26 3435C>T verbunden.

Das ABCB1-Gen erstreckt sich über 28 Exons, wobei die cDNA 3843 Basenpaare enthält. Geht man davon aus, das im Genom durchnittlich alle 1000 Basenpaare ein SNP auftritt, so können im ABCB1-Gen mindestens 38 SNPs erwartet werden. Bisher wurden in den hier beschriebenen Arbeiten und in weiteren Studien insgesamt 20 SNPs ermittelt (Hoffmeyer *et al.*, 2000; Cascorbi *et al.*, 2001; Mickley *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2001). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass noch weitere, wenn auch seltenere ABCB1 Varianten entdeckt werden.

2.1.3.2 Einfluß von ABCB1 SNPs auf die Pgp-Expression und -Funktion

Die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von genetischen ABCB1-Varianten und die Entwicklung von diagnostischen Tests, mit deren Hilfe ABCB1-Genotypen in Patienten ermittelt werden, könnte die Arzneimitteltherapie mit Substanzen, die Transportsubstrate von Pgp sind, verbessern. Der erste ABCB1-Polymorphismus, für den ein Zusammenhang zwischen der Transportcharakteristik, dem Expressionsgrad des Pgp Carrier-Proteins und dem ABCB1-Genotyp nachgewiesen werden konnte, war ein stummer SNP im Exon 26 3435C>T. Homozygote Träger des C-Allels hatten im Vergleich zum TT-Genotyp eine 2-fach höhere Pgp Expressionrate im Dünndarm. Eine ähnliche, wenn auch nicht signifikante Assoziation zwischen dem Exon 26 3435C>T Genotyp und der Pgp Expression konnte in 100 menschlichen Plazentaproben beobachtet werden (Tanabe *et al.*, 2001). Darüberhinaus ergab sich in dieser Untersuchung ein weiterer möglicher Zusammenhang zwischen der Pgp Expression und dem ABCB1-SNP im Exon 21 2677. Auch ein SNP im Exon 1b –129 erwies sich als signifikanter Parameter für die Pgp Proteinmenge in der Plazenta, mit den höchsten Expressionsgraden in homozygoten Trägern des T-Allels im Vergleich zum CT-Genotyp. Ein weiterer, indirekter Parameter für die Expression eines Proteins, ist die transkriptionelle Aktivität seines Gens, gemessen am spezifischen Steady-State mRNA-Gehalt. Die ABCB1 mRNA Konzentrationen in peripheren mononukleären Blutzellen von 31 gesunden Freiwilligen waren im Trend, wenngleich nicht signifikant, vom Genotyp in Exon 26 3435 abhängig, ähnlich wie schon für den Pgp Gehalt im Dünndarm beobachtet (CC>CT>TT) (Hitzl *et al.*, 2001). Diese Daten wurden durch eine Untersuchung der ABCB1 mRNA Konzentration und des Pgp Protein Gehalts in peripheren Blutmonozyten von 59 HIV Patienten unterstützt, die die höchsten Werte in der Exon 26 3435CC Gruppe ergab, gefolgt von signifikant niedrigeren Werten beim CT- und TT-Genotyp.

Der Einfluß von ABCB1 Polymorphismen auf die Pharmakokinetik von Arzneistoffen zeigte sich bereits in ersten Untersuchungen. Entsprechend der niedrigeren Pgp Expression im Dünndarm von Individuen mit Exon 26 3435TT Genotyp lagen die Digoxin Plasma Konzentrationen im Steady State und nach vorheriger Rifampicin Induktion höher als bei homozygoten Trägern des C-Allels. Dieser pharmakogenetische Effekt wurde durch die Beobachtung eines niedrigeren Rhodamin-123 Efflux aus $CD56^+$ Zellen von 3435TT Individuen im Vergleich zu CC Trägern bestätigt (Hitzl *et al.*, 2001). Da beide Studien nur eine begrenzte Stichprobengröße aufwiesen, sollten die Befunde in einer größeren Untersuchung verifiziert und nach weiteren Effekten durch andere ABCB1-Polymorphismen gesucht werden (Gerloff *et al.*, 2002a). Im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen ergab sich jedoch keine Differenzie-

rung der kinetischen Parameter AUC(0,4), C_{max} und t_{max} innerhalb der untersuchten Genotyp-Kombinationen nach oraler Gabe von 1 mg Digoxin. Die Diskrepanz der Ergebnisse erklärt sich teilweise aus dem unterschiedlichen experimentellen Aufbau der Studien. Nur in der initialen Untersuchung wurde die Digoxin-Kinetik nach Rifampicin Induktion ermittelt. Die Steigerung des intestinalen Pgp Gehalts durch Rifampicin Vorbehandlung war signifikant größer bei Trägern des Exon 26 3435 CC Genotyps, als bei homozygoten Individuen für das T Allel. Die Induktion des Pgp könnte deshalb eine wichtige Voraussetzung für die ABCB1 Exon 26 3435C>T abhängige Modulation der Kinetik von Arzneistoffen sein. Darüberhinaus scheint die Dosis bei der Ausprägung pharmakogenetischer Effekte durch Transportergene eine Rolle zu spielen. Die Transportkapazität von Pgp ist abhängig von der Menge exprimierten Carrier-Proteins in epithelialen Zellen. Übersteigt die lokale Arzneimittelkonzentration im Darmlumen die maximale Sekretionskapazität des Pgp, so wird die weitere Resorption lediglich von passiver Diffusion und/oder von Aufnahme-Transportern geprägt. Carrier aus der Familie der organischen Anionen Transporter OATP sind als Aufnahmesysteme von amphipathischen Arzneistoffen, einschließlich Digoxin identifiziert worden (Kullak-Ublick *et al.,* 2001). Die Lokalisation von OATPs in der basolateralen Membran von Hepatozyten und in apikalen Membranen von Enterozyten lässt auf eine Beteiligung dieses Transportsystems bei der Digoxin Aufnahme schließen. Deshalb könnten sowohl die passive Diffusion, als auch OATP-Carrier die pharmakokinetischen Effekte von ABCB1 Polymorphismen drastisch verringern, nachdem eine bestimmte Maximaldosis überschritten wurde. Durch Protein-Induktion des Pgp Transporters, beispielsweise mit Rifampicin, kann diese Dosis in höhere Bereiche verschoben werden. Die orale Gabe von 1 mg Digoxin könnte die Schwelle der Substratsättigung des Pgp Carriers überschritten haben und deshalb maßgeblich zu einer Maskierung möglicher pharmakogenetischer Effekte von ABCB1 Polymorphismen beigetragen haben.

Weitere Studien ergaben teils widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Einflusses dieses Polymorphismus auf die Pharmakokinetik von Arzneistoffen, die durch Pgp transportiert werden. Die auf MDR1-Haplotypen basierende Auswertung der partiell miteinander verbundenen SNPs in Exon 21 (2677) und Exon 26 (3435) konnte jedoch divergierende Ergebnisse, die aus Studien mit Einzel-SNP-Analysen stammten, erklären (Johne *et al.,* 2002). Der Haplotyp <12> (2677G/3435T) war mit hohen Digoxin-Plasmaspiegeln assoziiert, wohingegen bei den Haplotypen <11> (2677G/3435C) und <22> (2677T/3435T) niedrige Digoxin-Plasmakonzentrationen zu verzeichnen waren. Zukünftige Studien werden demzufolge nicht mehr nur die Wirkung einzelner SNPs, sondern deren Kombination in Haplotypen untersu-

chen. In Analogie zu der Bezeichnung „schlechter Metabolisierer“ (poor metabolizer) aus der Pharmakogenetik des CYP2D6-Arzneistoffmetabolismus könnten künftig auf der Basis des MDR1 Haplotyps <12> Individuen als „schlechte Arznei- und Fremdstofftransporter“ (poor transporter) identifiziert werden. Träger dieses Haplotyps wären in besonderer Weise UAWs von Medikamenten ausgesetzt, die Transportsubstrate von Pgp sind.

Ein wichtiges Beispiel für die klinische Anwendbarkeit der Kenntnisse über die pharmakokinetische Bedeutung von MDR1-Genotypen zeichnet sich in der antiviralen Therapie der HIV-Infektion ab (Fellay *et al.,* 2002). Dort werden Protease-Inhibitoren eingesetzt, die als Transportsubstrate des Pgps bekannt sind und deshalb eine geringe orale Bioverfügbarkeit und begrenzte Penetration zu therapeutisch relevanten Zielen aufweisen. Eine Studie an 120 antiviral behandelten Patienten ergab eine Korrelation zwischen dem MDR1 Genotyp in Exon 26 (3435) und der $CD4^+$ Zellzahl. Träger des T/T-Genotyps wiesen ein besseres Ansprechen auf die antivirale Therapie auf, mit höheren Anstiegen der $CD4^+$ Zellzahlen, als Patienten mit C/T oder C/C Genotyp.

2.2 Biliäre Exkretion von Gallensäuren und anderer gallepflichtiger Substanzen

2.2.1 Einleitung

Die Produktion von Galle ist eine lebenswichtige Funktion der Leber in Wirbeltieren (Oude Elferink *et al.,* 1995). Die Gallesekretion wird durch eine kontinuierliche Exkretion von Gallensäuren und anderer osmotisch aktiver Substanzen über den kanalikulären (apikalen) Pol der Hepatozyten aufrechterhalten. Der gallensäure-abhängige Gallefluß bildet die Haupttriebkraft für die Exkretionsfunktion der Leber und ist deshalb notwendig für eine intakte hepatische Clearance endogener Stoffe und Xenobiotika. Untersuchungen an isolierten Membranvesikeln aus der Leber von Ratten und dem Menschen ergaben, dass der kanalikuläre Transport monovalenter Gallensäuren ein ATP-abhängiger Prozeß ist (Stieger *et al.,* 1992). Die molekulare Identität dieses primär aktiven kanalikulären Gallensäuren-Carriers war jedoch trotz seiner funktionellen Charakterisierung in Membranvesikeln lange Zeit nicht bekannt. Als möglicher Kandidat für den Gallensäurenexporter wurde die kanalikuläre Ekto-ATPase angenommen (Suchy *et al.,* 1997). Andere Arbeiten zeigten jedoch, dass dieser Transporter wahrscheinlich aus der Proteinfamilie der ABC-Transmembrantransporter stammte (Brown *et al.,* 1995). Tatsächlich konnte ein ATP-abhängiger Transporter für Gallensäuren in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert und kloniert werden (Ortiz DF *et al.,* 1997). Dieser Carrier mit der Bezeichnung BAT1 gehört zur ABCC Subfamilie der ABC Transporter und ist mit dem ABCC2-Gen (MRP2/cMOAT) eng verwandt. ABCC2 ist in der kanalikulären Membran

von Hepatozyten lokalisiert und transportiert eine Reihe divalenter amphipatischer anionischer Konjugate. Primäre Gallensäuren, wie Taurocholat oder Glykocholat sind jedoch nicht im breiten Substratspektrum von ABCC2 enthalten (Madon *et al.,* 1997).

Die Regulation der Proteinexpression von hepatozellulären Carrier-Systemen spielt eine wichtige Rolle für die Produktion von Galle in der gesunden und krankhaft veränderten Leber. Das Hauptziel dieser Regulationsvorgänge ist, eine intrazelluläre Akkumulation von toxischen Gallensäuren und anderer gallepflichtiger Substanzen zu vermeiden und den kontinuierlichen Gallefluß aufrechtzuerhalten. Tiermodelle der Cholestase, wie z.B. die Gallengangsligatur oder partielle Hepatektomie von Ratten, sind neben *in vitro* Promotor-Analysen besonders geeignet, um Mechanismen der Regulation von Transporter-Proteinen zu untersuchen.

2.2.2 Ergebnisse

2.2.2.1 Isolierung eines cDNA-Klons für Bsep (Abcb11) der Ratte

Ein cDNA-Klon, der den kompletten Leserahmen (open reading frame, ORF) des Bsep Gens der Ratte enthielt (Abcb11), wurde in cDNA-Bibliotheken identifiziert und isoliert (GenBank U69487) (Gerloff *et al.,* 1998). Die Nukleotidsequenzierung ergab einen cDNA-Klon von 5036 Basen Länge, der für ein Polypeptid von 1321 Aminosäuren kodierte. Insgesamt 4 N-Glykosilierungsstellen, die sich in der ersten extrazellulären Schleife des Abcb11 Carriers befanden und die typischen Merkmale von ABC-Transportern, wie Walker A, B und ABC-Family Signature konnten bei der Strukturanalyse ermittelt werden. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von Abcb11 mit anderen Vertretern der ABC-Transporter Familie ergab Übereinstimmungen (Similarities) von 69% mit Abcb1 (Maus), 71 % mit Abcb2 (Ratte), 70% mit Abcb3 (Ratte), 69% mit ABCC1 (Mensch), 51% mit Abcc2 (Ratte) und 48% mit Abcc7 (Maus). Anhand dieser Daten ließ sich Abcb11 in die Abcb-Subfamilie der ABC-Transporter einordnen.

2.2.2.2 Funktionelle Charakterisierung und Proteinexpression des Abcb11

Die Funktion von Abcb11 wurde zunächst in *Xenopus laevis* Oozyten und später in SF9 Insektenzellen getestet. Abcb11 cRNA-injizierte Oozyten wiesen eine im Vergleich zu Wasser- und Abcc2 cRNA-injizierten Oozyten etwa 1,5 – fache Steigerung des [^{3}H] Taurocholat Efflux auf (Abbildung 7A). Aufgrund technischer Hindernisse wurden die kinetische Parameter K_m und V_{max} in Abcb11 exprimierenden Insektenzellen bestimmt. In Membranvesikeln aus Abcb11 cDNA-infizierten SF9 Insektenzellen konnte im Gegensatz zu Vesikelpräparationen aus Kontrollzellen, die mit dem Wildtypvirus, einem β-Galaktosidase cDNA-

enthaltenden Virus oder nicht infiziert waren, eine deutliche ATP-abhängige [^{3}H] Taurocholat Aufnahme beobachtet werden (Abbildung 7B). Der Abcb11-vermittelte ATP-abhängige Taurocholattransport war sättigbar und ergab einen K_m – Wert von ~5,3 µM (Abbildung 7C).

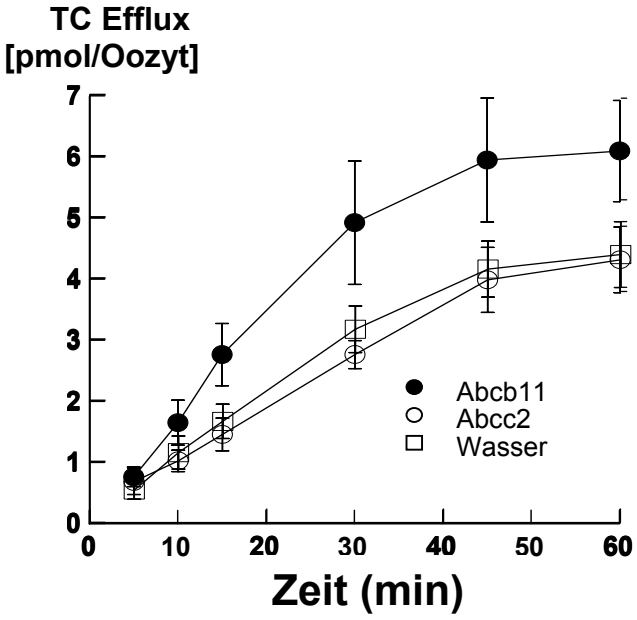

Abbildung 7A: Taurocholat Efflux aus Abcb11 cRNA injizierten *Xenopus laevis* Oozyten.

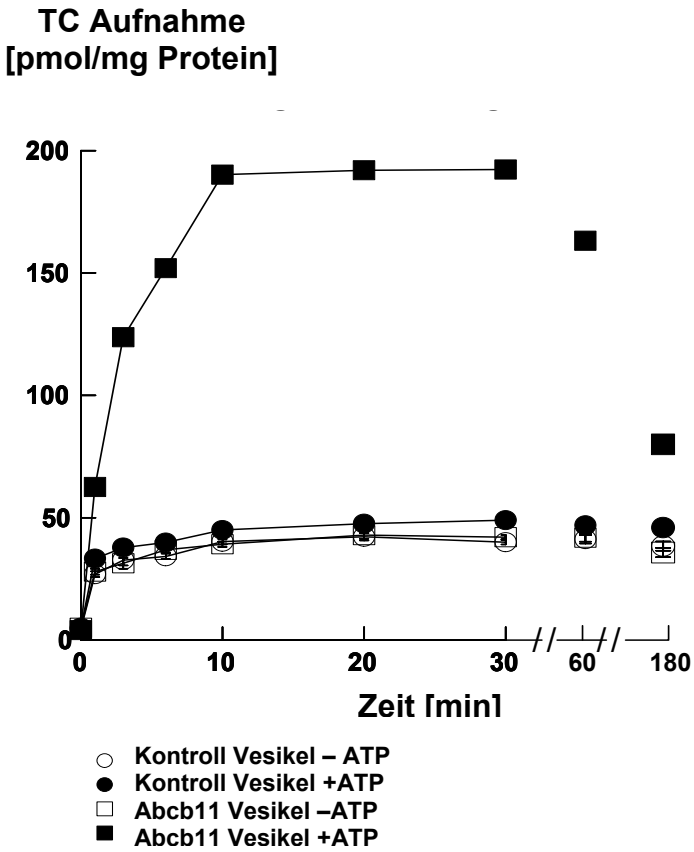

Abbildung 7B: Taurocholat Aufnahme in Abcb11 exprimierenden Sf9 Insektenzellvesikeln.

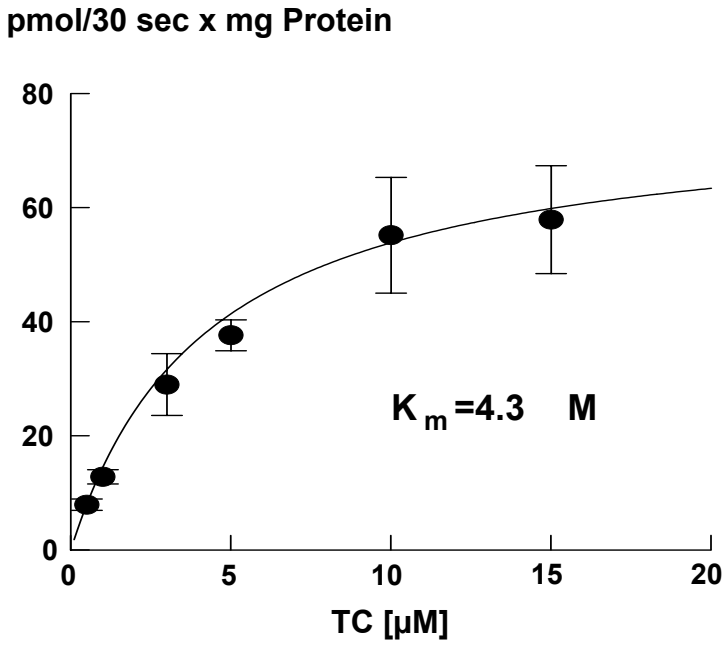

Abbildung 7C: Konzentrations Abhängigkeit der initialen Aufnahme von Taurocholat in Membranvesikel aus Abcb11 exprimierenden SF9 Insektenzellen

Wurde ATP gegen andere Nukleotide (UTP, CTP, GTP), ATP-Degradationsprodukte (ADP, AMP, Adenosin), oder nichthydrolysierbare ATP-Analoga (Adenosine-5'-[γ-thio]Triphosphat, Adenosin-5'-[β,γ-imido]Triphosphat) ausgetauscht, so war nur ein geringer oder kein Abcb11-vermittelter Taurocholattransport zu verzeichnen. Darüberhinaus konnte der ATP-abhängige Taurocholattransport durch Zugabe von Vanadat in Konzentrationen zwischen 5 µM und 10 µM auf 32% bis 63% der Ausgangsaktivität inhibiert werden. Der Vergleich der initialen ATP-abhängigen Aufnahme verschiedener Gallensäuren in Abcb11-exprimierenden SF9 Zellmembran Vesikeln und kanalikulären Membranvesikeln der Leberzelle ergab die größten Transportraten für Taurochenodeoxycholat, gefolgt von Tauroursodeoxycholat und Taurocholat in beiden Vesikel-Präparationen. Im Gegensatz dazu wurden die Gallensäuren Glykocholat und Cholat in kanalikuläre Vesikel weniger effizient und in Abcb11-exprimierende SF9 Vesikel gar nicht transportiert.

Um den Zusammenhang zwischen der Transportaktivität und der Abcb11 Proteinexpression in SF9 Zellen zu zeigen, wurde im Kaninchen ein polyklonales Antiserum gegen 13 C-terminale Aminosäuren von Abcb11 gewonnen. Im Western-Blot konnte mit dem Antiserum eine maßgebliche Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 140 kDa in Vesikeln von

Abcb11 cDNA -transfizierten SF9 Zellen detektiert werden. In Kontrollvesikeln fand sich keine entsprechende Proteinbande. In kanalikulären Membranvesikeln der Leberzelle konnte im Gegensatz zu basolateralen Vesikeln eine Proteinbande mit einem etwas höheren Molekulargewicht von 160 kDa identifiziert werden. Die Northern-Blot Analyse mit mRNAs aus verschiedenen Geweben der Ratte ergab, dass Abcb11 hauptsächlich in der Leber exprimiert wird. Abcb11 Transkripte konnten auch in niederen Wirbeltieren, wie Maus, Huhn und Schildkröte nachgewiesen werden. Immunhistochemische Untersuchungen in der Rattenleber zeigten, dass Abcb11 in den Mikrovilli biliärer Kanalikuli periportaler und perivenöser Hepatozyten lokalisiert ist. An der basolateralen Zytoplasmamembran von Leberzellen war Abcb11 nicht zu finden.

2.2.2.3 Genomische Klonierung und funktionelle Analyse des Abcb11 Promotors

Mittels PCR-Screening wurden aus einer Ratten P1 genomischen DNA Bibliothek mehrere Klone isoliert (Gerloff *et al.,* 2002b). Insgesamt 2488 Nukleotide stromaufwärts vom 5'-Ende der Abcb11 cDNA wurden sequenziert. Die Transkriptionsstartstelle wurde mittels 5'RACE und S1 Nuklease Assay ermittelt und als Nukleotid +1 in der Abcb11 Promotor Sequenz bezeichnet. Die komplette Nukleotidsequenz des Abcb11 Promotors wurde in der GenBank und EMBL Datenbank unter der Zugangsnummer AF452071 abgelegt.

Vergleichende Sequenzuntersuchungen der 5'-flankierenden Region des Abcb11 Gens mit Konsensus-Elementen aus der TRANSFAC 4.0 Datenbank (MATINSPEKTOR v2.1) ergaben eine Reihe von Bindungsstellen für in der Leber angereicherte und ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktoren. Beispielsweise konnten multiple Konsensus Elemente für den in der Leber angereicherten Transkriptionsfaktor HNF3β ermittelt werden. Es gab jedoch nur eine Bindungsstelle für HNF1 und keine für HNF4. Interessanterweise fanden sich 2 Konsensus Motive für den FXR/9-cis-Retinolsäure Rezeptor bei den Nukleotiden –64 und –473. Diese Motive bestehen aus zwei invertierten Wiederholungen (inverted repeats), die durch 1 Nukleotid getrennt sind (IR-1) und konnten kürzlich als wichtige Elemente der transkriptionellen Regulation durch Gallensäuren identifiziert werden.

Die 5' Deletionsanalyse der Promotorregion des Abcb11 Gens in transfizierten HepG2 Zellen zeigte einen bimodalen Verlauf der Promotoraktivität (Abbildung 12). Wurde die Region zwischen den Nukleotiden –1453 und –800 entfernt, sank die Promotoraktivität auf 90% der Aktivität des längsten gemessenen Konstrukts. Die weitere Deletion bis zum Nukleotid –187 steigerte jedoch die Aktivität auf eine Maximum von 170%. Beim Nukleotid –126 war nahezu das gleiche Niveau wie beim längsten Konstrukt p-1453 zu verzeichnen. Wurde die

Deletion bis Nukleotid –27 erweitert, fiel die Aktivität auf Werte, die mit einem Konstrukt ohne Promotor oder mit einem Promotor in inverser Orientierung ermittelt wurden. Das Konstrukt vom Nukleotid –126 bis +80 wurde somit als das minimale Element identifiziert, dass die volle Promotoraktivität vermittelt.

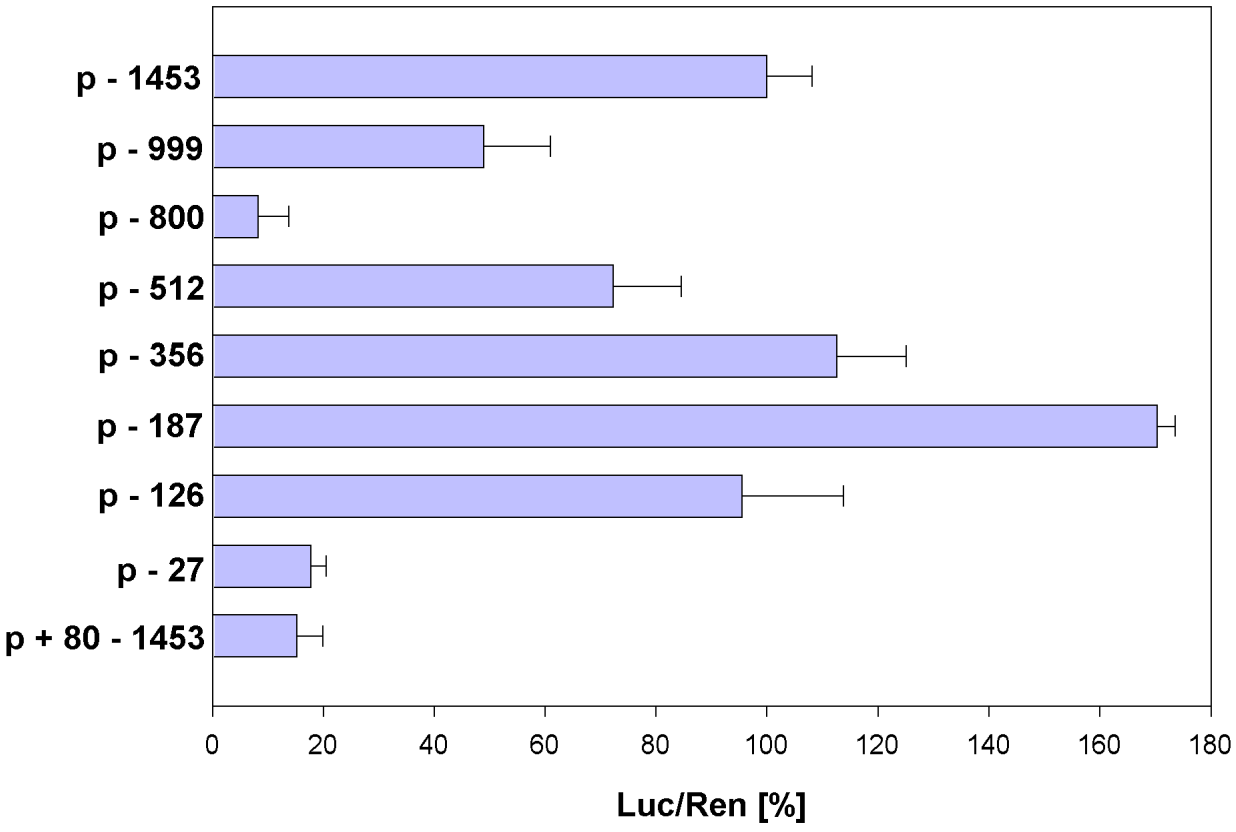

Abbildung 12: Deletionsanalyse der Abcb11 5'-flankierenden Region

Die gewebespezifische Promotoraktivität des Abcb11 Gens wurde durch Transfektion der Reportergen Konstukte p-1453, p-187, p-126 und p+80-1453 in HepG2 Zellen und in verschiedenen nichthepatische Zelllinien untersucht (Abbildung 13). Im Gegensatz zu HepG2 Zellen konnte mit den getesteten Konstukten keine Reportergenaktivität in NIH 3T3 oder MDCK Zellen beobachtet werden. In CaCo2 Zellen war nur eine sehr geringe Aktivität zu verzeichnen. Sowohl das längste, als auch das minimale Promotorelement des Abcb11 Gens konnten eine leberspezifische Reporterexpression vermitteln.

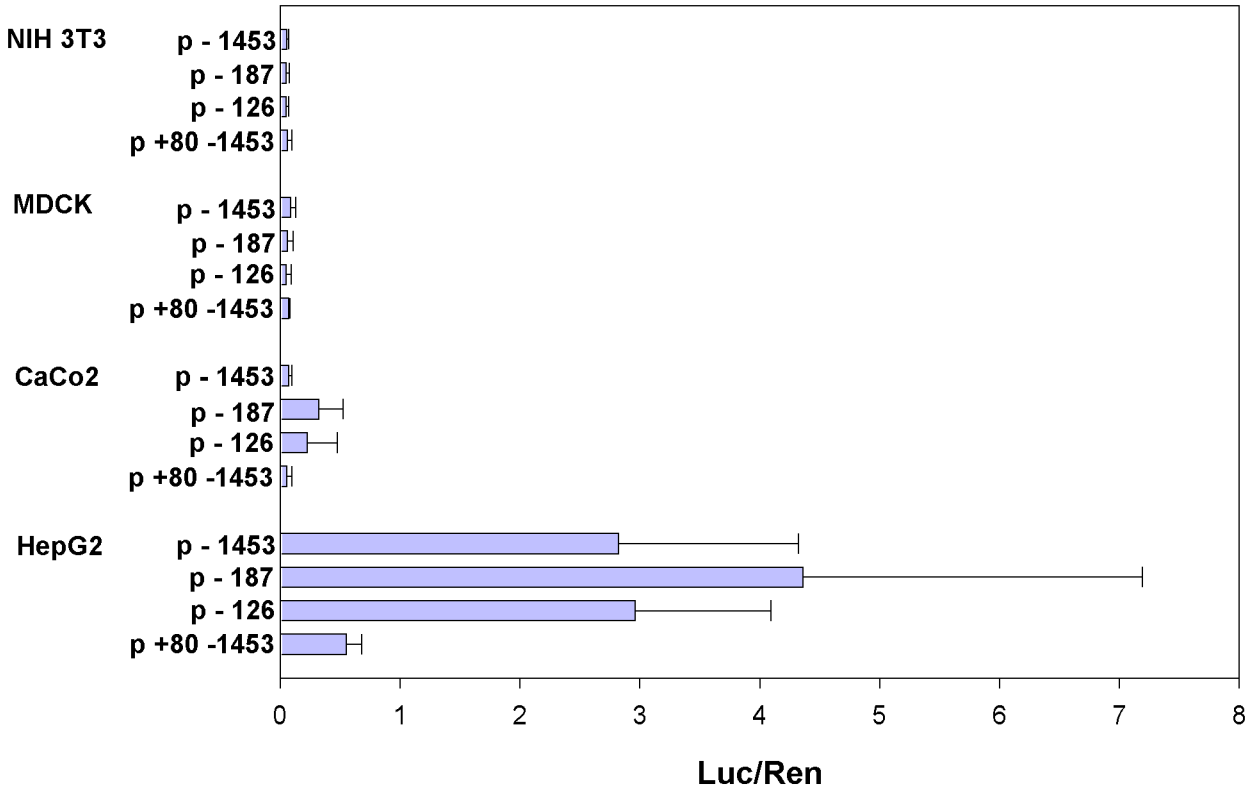

Abbildung 13: Promotoraktivität des Abcb11 Gens in verschiedenen Zelllinien

Die Abcb11 Promotoraktivität war Gallensäure-abhängig. Die Transkription des minimalen (p-126) (Abbildung 14) und des längsten (p-1453) Reportergenkonstrukts konnte durch fast alle untersuchten Gallensäuren stimuliert werden. Lediglich die Taurin konjugierten Gallensäuren Taurocholat und Tauroursocholat hatten keinen Effekt auf die Abcb11 Reporteraktivität. Die stärkste Stimulation konnte durch die primäre Gallensäure Chenodeoxycholat (CDCA) in p-126 transfizierten Zellen erreicht werden. Diese CDCA vermittelte Steigerung der Abcb11 Promotoraktivität war für beide Reportergenkonstrukte dosisabhängig. Schwächere Stimulationen konnten mit den sekundären Gallensäuren Deoxycholat und Litocholat beobachtet werden. Die geringste Steigerung der Abcb11 Promotoraktivität ergab sich mit den dihydroxylierten Gallensäuren Taurodeoxycholat und Taurochenodeoxycholat. Die gezielte Mutagenese des FXRE-Motivs, das unmittelbar stromaufwärts der TATA-Box gelegen war führte zu einem kompletten Verlust der CDCA-Stimulierbarkeit des minimalen Abcb11

Promotors (p-126) in HepG2 Zellen (Abbildung 15). Die Interaktion dieses funktionell aktiven FXRE mit seinem Rezeptor FXR konnte in Bindungsstudien mittels Gelelektrophorese Retardationsassays nachgewiesen werden.

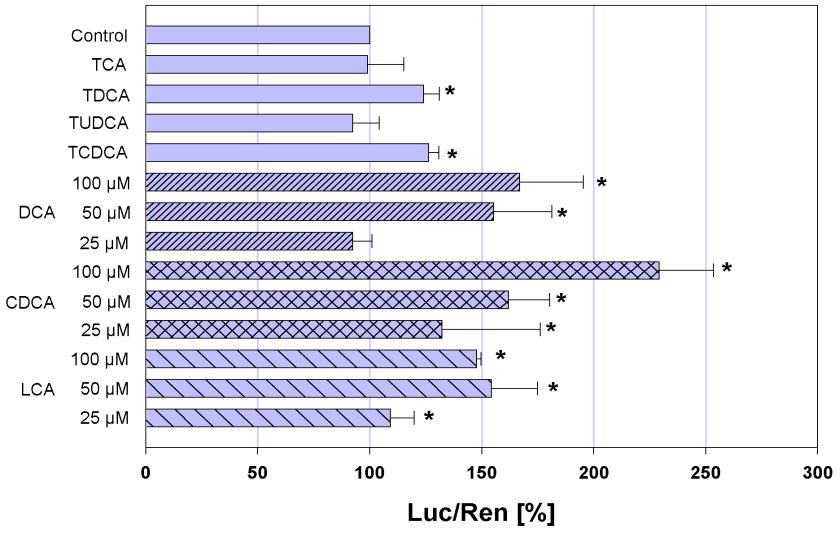

Abbildung 14: Aktivität des minimalen Abcb11 Promotors in Abhängigkeit von verschiedenen Gallensäuren

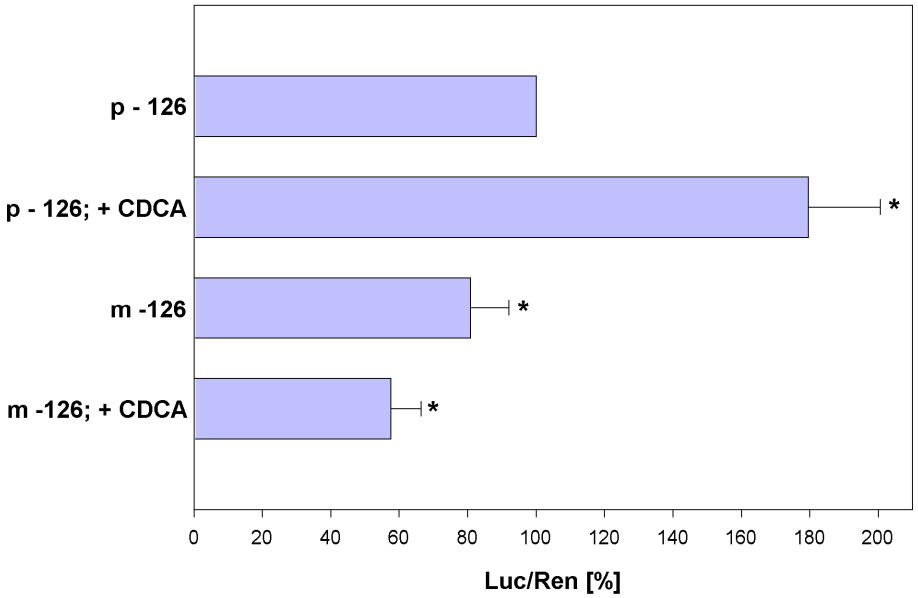

Abbildung 15: Mutationsanalyse des proximalen FXRE

Der Einfluß verschiedener Pharmaka auf die transkriptionelle Regulation des Abcb11 Gens wurde in Transfektions-Experimenten mit dem längsten Reportergen Konstrukt p-1453 in HepG2 Zellen getestet. Die Promotoraktivität wurde signifikant durch Rifampicin (77 ± 7%) und β-Estradiol (77 ± 6%) verringert (Abbildung 16). Im Gegensatz dazu führte der Östrogen Antagonist Tamoxifen zu einer Induktion der Abcb11 Promotor Aktivität (134 ± 15%). Die Steroide Dexamethason und Hydrocortison, sowie das Narkotikum Phenobarbital ergaben keinen signifikanten Einfluß auf die Reportergen Aktivität.

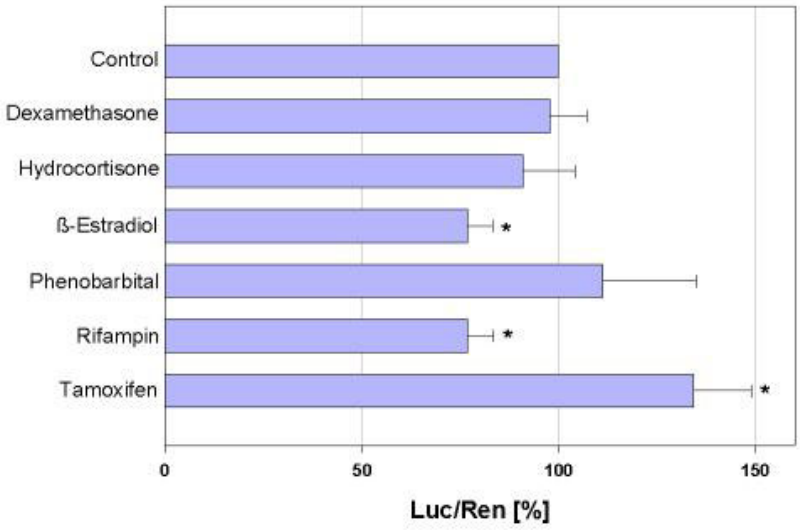

Abbildung 16: Einfluß von Arzneistoffen auf die Abcb11 Promotoraktivität

2.2.2.4 Regulation hepatozellulärer Transportsysteme

Der Hauptteil der Studien zur Regulation von Transportsystemen der Leberzelle wurde *in vivo* an Tiermodellen der Cholestase und toxischen Leberschädigung durchgeführt. Dazu wurden Ratten entweder einer 2/3 Leberresektion (partielle Hepatektomie) (Gerloff *et al.,*1999), einer Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff (Geier *et al.,* 2002), oder einer Östrogen-induzierten Cholestase zugeführt (Geier *et al.,* 2003a).

Die partielle Hepatektomie ist ein gut etabliertes Modell für die Leberregeneration. Zahlreiche Leberschädigungen, wie sie z.B. bei der viralen Hepatitis oder anderen Noxen auftreten, führen zu einer Wiederherstellung der funktionellen Leberzellmasse durch Leberregeneration. Unmittelbar nach 2/3 Resektion der Rattenleber treten die verbleibenden Leberzellen synchron in die Proliferative Phase des Zellzyklus ein, ohne dass es zu Entzündungsreaktionen oder Nekrosen kommt. Nach 10 – 14 Tagen ist die ursprüngliche Lebermasse wieder erreicht (Karran *et al.,* 1974). Während der Leberregeneration kommt es zu einer transienten Cholestase mit vermindertem Gallefluß und erhöhten Serum Gallensäure-Konzentrationen. Um zu prüfen, ob die Proteinexpression von hepatozellulären Transportern während der cholestatischen Phase der Leberregeneration verändert wird, wurden die Proteinmassen basolateraler (Ntcp, Oatp1, Oatp2) und kanalikulärer (Abcb11, Abcc2) Carrier-Systeme untersucht. Im Vergleich zu Kontrolltieren war die Proteinexpression der basolateralen Transporter Ntcp, Oatp1 und Oatp2 bereits 24 h nach partieller Hepatektomie vermindert. Während die Proteinexpression des Ntcp und Oatp1 Carrier Systems nach 7 Tagen wieder ihre Ausgangswerte erreichte, benötigte Oatp2 14 Tage für seine Wiederherstellung. Die Regulation kanalikulärer Carrier verhielt sich jedoch gegensätzlich zu der basolateraler Transporter. Die Proteinexpression der Abcc2 und Abcb11 Transporter wurde rasch nach 2/3 Hepatektomie hochreguliert und kehrte schließlich nach 4 Tagen auf ihre Ausgangswerte zurück. Um Hinweise zu erhalten, ob die Proteinexpression der Transporter sich in ihrer Genexpression widerspiegelt, wurde zusätzlich der mRNA-Gehalt der Carrier ermittelt. Analog der Proteinexpression konnte eine Verminderung des mRNA Gehalts basolateraler Transporter festgestellt werden. Die schnellste und stärkste Abwärtsregulation wurde bei der Ntcp mRNA beobachtet. Der mRNA Gehalt der beiden kanalikulären Effluxtransporter Abcc2 und Abcb11 wurde nach partieller Hepatektomie heraufreguliert.

Bei der toxischen Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff kommt es primär nicht zu einer Cholestase, sondern zu einer akuten reversiblen Nekrose zentrilobulärer (Zone 3) Hepatozyten mit nachfolgender Leberregeneration (Tsukamoto *et al.,* 1990). Als Folge der toxischen Schädigung werden Kupferzellen stimuliert (Edwards *et al.,* 1993), die eine Reihe von Zytokinen, wie z.B. TNFα freisetzen, und damit eine Entzündungsreaktion auslösen. Wie bei der partiellen Leberresektion konnte nach Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung eine Verminderung des hepatozellulären mRNA-Gehalts basolateraler Transporter festgestellt werden. Die stärkste Abwärtsregulation war bei der Ntcp-mRNA zu beobachten, die in logarithmischem Zusammenhang mit dem Ausmaß der Leberschädigung stand (ALT-Serumspiegel). Der Oatp1 und Oatp2 mRNA Gehalt war auch vermindert, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei

der Ntcp mRNA. Keine Abwärtsregulation war bei der Oatp4 mRNA zu verzeichnen. Der Oatp4 mRNA-Gehalt blieb über den gesamten Beobachtungszeitraum von 72 h unverändert. Die Verminderung spezifischer mRNAs basolateraler Transporter war nach 72 h vollständig reversibel. Kanalikuläre hepatozelluläre Transportsysteme, wie Abcb11, Abcc2 und Ekto-ATPase zeigten keine Änderungen ihrer mRNA-Gehalte bis zu 72 h nach Tetrachlorkohlenstoff-Gabe. Die Untersuchung der Proteinexpression ergab interessanterweise lediglich eine Reduktion der Protein-Masse für Ntcp und Oatp4. Weder für Oatp1, Oatp2 und die Na^+, K^+-ATPase, noch für Abcb11 und Abcc2 war eine signifikante Veränderung der Proteinmasse zu verzeichnen. Der Einfluß der Tetrachlorkohlenstoff-Behandlung auf die Gentranskription der basolateralen Transporter Ntcp, Oatp1 und Oatp2 wurde mittels „Nuclear runoff" Assay untersucht. Im Vergleich zu den Kontrolltieren war die transkriptionelle Aktivität aller drei Carrier-Gene nahezu vollständig herunterreguliert. Demgegenüber waren die nukleären RNA-Gehalte von Oatp4 und den Kontrollgenen GAPDH und β-Aktin unverändert in Kontrolltieren und Tetrachlorkohlenstoff-behandelten Ratten. Mögliche Transkriptionsfaktoren, die dieses Genexpressionsmuster hepatozellulärer Transporter erklären könnten, wurden in Bindungsstudien mit Hilfe von Gelretardations-Assays geprüft. Es ergab sich eine nach Tetrachlorkohlenstoff-Gabe verminderte Bindung von HNF1 und C/EBP an entsprechende Konsensus-Elemente des Ntcp-Promotors. Dagegen war die Bindungsaktivität von AP-1 nach Behandlung stark erhöht. Darüberhinaus konnte in Lebern behandelter Tiere eine deutliche mRNA-Induktion der proinflammatorischen Zytokine TNFα, IL-10 und IL-12p40 festgestellt werden.

Die Östrogen-induzierte Cholestase ist eine wichtige klinische Entität und kann als Folge der Einnahme östrogenhaltiger Kontrazeptiva (Schreiber und Simon, 1983) oder im Verlauf einer Schwangerschaft (Germain *et al.,* 2002) beobachtet werden. Die Pathophysiologie dieser Cholestase ist jedoch bislang kaum untersucht, insbesondere die Transkriptionelle Regulation hepatozellulärer Transporter ist unbekannt. Deshalb wurde die Expression basolateraler Carrier der Leberzelle in Ratten nach Behandlung mit Ethinylöstradiol (5 mg/kg KG) ermittelt. Darüberhinaus wurden die Bindungsaktivitäten bekannter aktivierender Transkriptionsfaktoren für Oatps und den Ntcp in Gel-Retardationsassays analysiert. Die Protein Massen aller untersuchten basolateralen Oatps (1, 2 und 4) waren nach Östrogenbehandlung auf 30-40% des Niveaus der Kontrolltiere vermindert. Die Proteinexpression des Ntcp fiel sogar um 70-80% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollratten. Der mRNA-Gehalt von Oatp1 und Oatp2 verringerte sich im Gegensatz zur unveränderten Oatp4 mRNA ebenfalls um 40-90% gegen-

über den Kontrollwerten. Die Bindungsaktivität der Transkriptionsfaktoren HNF1, C/EBPα und PXR war während der Cholestase ebenfalls herabgesetzt.

2.2.3 Diskussion

2.2.3.1 Identifizierung des hepatozellulären Gallensäuren Exporters

Die kanalikuläre Sekretion von Gallensäuren ist ein ATP-abhängiger Prozess (Brown *et al.,* 1995). In unserer Studie konnte die Identität der kanalikulären Gallensäuren Export Pumpe erstmals durch die Klonierung und funktionelle Charakterisierung eines cDNA Klons für Bsep (Abcb11) der Ratte ermittelt werden (Gerloff *et al.,* 1998). Abcb11 gehört zur Familie der ABC Transporter, besteht aus 1321 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 160 kDa und ist aus zweimal sechs Transmembransegmenten, mit je einer Nukleotidbindungsstelle aufgebaut. Der Vergleich dieses Carrier Proteins mit der Aminosäuresequenz weiterer ABC Transporter der Ratte ergibt eine Identität von 49% mit Abcb 1b (Mdr1b) und 48% mit Abcb4 (Mdr2). Die Transportfunktion des Abcb11 konnte in Membranvesikeln aus SF9 Insektenzellen, die mit Abcb11 der Ratte transfiziert waren charakterisiert werden. Die K_m Werte für monoanionische Gallensäuren von Abcb11 lagen zwischen 2 und 5 μM und sind damit gut vergleichbar mit K_m Werten von 2 bis 6 μM für ATP-abhängigen Transport monoanionischer Gallensäuren in isolierte kanalikuläre Membranvesikel der Leberzelle (Stieger *et al.,* 1992). Im Zusammenhang mit Resultaten aus cis-Inhibitionsstudien (Stieger *et al.,* 2000) weisen diese Befunde darauf hin, dass Abcb11 die wichtigste Exportpumpe für Gallensäuren in der Leber ist. Diese Annahme wurde durch die Identifizierung des humanen ABCB11 Gens mittels positioneller Klonierung aus Patienten mit familiärer progressiver intrahepatischer Cholestase Typ 2 (PFIC2), einer vererbbaren fortschreitenden Lebererkrankung mit niedrigen γ-Glutamyltransferase Serumspiegeln, gestützt (Strautnieks *et al.,* 1998). Patienten mit dieser Erkrankung wiesen Mutationen im ABCB11 Gen auf, die zu einem Verlust der kanalikulären ABCB11 Expression führte, die mit einer sehr stark verminderten biliären Gallensäure Sekretion auf weniger als 1% der von gesunden Individuen einherging (Jansen *et al.,* 1999). Überraschender Weise konnte in Abcb11 Knockout Mäusen, die durch eine Wachstumsverzögerung, Steatosis der Leber und milde Cholestase gekennzeichnet sind, nur ein leicht reduzierter Gallefluß beobachtet werden (Wang *et al.,* 2001). Die kanalikuläre Sekretion von Taurocholat ist in Abcb11-defizienten Mäusen komplett blockiert. Dennoch sezernieren diese Mäuse Muricholsäure und eine bisher nicht bekannte tetrahydroxylierte Gallensäure. Diese Beobachtungen könnten auf einen noch unbekannten, zusätzlichen kanalikulären Gallensäure Carrier in der Mausleber hinweisen. Es wäre auch möglich, dass sich die Zusammensetzung des Gallen-

säurepools in Abcb11 Knockout Mäusen zu konjugierten dianionischen Gallensäuren verändert, die gut durch den kanalikulären Abcc2 Carrier in die Galle transportiert werden (Madon *et al.,* 1997).

2.2.3.2 Regulation hepatozellulärer Transporter in *in vitro* Assays und Tiermodellen

Die Kapazität bzw. die maximale Transportrate kanalikulärer Gallensäureexporter kann an verschiedene metabolische und pathophysiologische Situationen angepasst werden. Dabei spielt die funktionelle Expression des Transportproteins, die durch transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen reguliert werden kann, eine entscheidende Rolle. Voraussetzung für das Verständnis der transkriptionellen Kontrolle der ATP-abhängigen Export Pumpe monoanionischer Gallensäuren ist die systematische Analyse seiner Promotorregion. Dazu haben wir die 5'-flankierende Region des Abcb11 Gens der Ratte identifiziert und seine regulatorische Aktivität in verschiedenen Zelllinien charakterisiert (Gerloff *et al.,* 2002b). Vergleichende Untersuchungen der Nukleotidsequenz des Abcb11 Promotors ergaben Konsensus Motive für in der Leber angereicherte und ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktoren. Die Deletionsanalyse der 5'-flankierenden Region des Abcb11 Gens zeigte einen bimodalen Verlauf der Reportergenaktivität und gab damit einen Hinweis auf eine mögliche Bindungsstelle für einen Repressor der Transkription zwischen den Nukleotiden –800 und -512. Die Abcb11 Promotorfunktion war begrenzt auf die aus Hepatozyten gewonnenen HepG2 Zellen. Diese Beobachtung erklärt die leberspezifische Expression des Abcb11 Carriers (Gerloff *et al.,* 1998). Auf dem Abcb11 Promotor fand sich jedoch lediglich eine Bindungsstelle für HNF3-β aus der Reihe klassischer, in der Leber angereicherter Transkriptionsfaktoren, die eine leberspezifische Genexpression vermitteln. Insbesondere für den Faktor HNF1α, der für die leberspezifische Transkription der basolateralen Transportsysteme Ntcp (Karpen *et al.,* 1996) und OATP-C (Jung *et al.,* 2001) und anderer Gene, wie Cytochrome P450 (Padgham *et al.,* 1993), Albumin und α_1-Antitrypsin (Courtois *et al.,* 1987) außerordentlich wichtig ist, fand sich kein Konsensus Motiv in der minimalen Abcb11 Promotorsequenz.

Die Regulation hepatozellulärer Transporter folgt dem Ziel, die intrazelluläre Anreicherung toxischer Gallensäuren zu verhindern und den Gallefluß für eine intakte biliäre Clearance aufrecht zu erhalten. Dementsprechend ergab sich aus unseren Untersuchungen an Tiermodellen der experimentellen Cholestase und Leberschädigung eine verminderte Expression der meisten basolateralen Aufnahmetransporter, wohingegen die Protein Masse der kanalikulären Efflux Pumpen unverändert blieb oder sogar heraufreguliert wurde. Die in der Leber angerei-

cherten Transkriptionsfaktoren HNF1α und C/EBPα scheinen für die verminderte Transkription der mRNA der basolateralen Carrier Ntcp und OATPs eine wichtige Rolle zu spielen.

Die Beobachtung, dass Gallensäuren der wichtigste Ligand des Farnesyl X-Rezeptors (FXR) sind (Makishima *et al.,* 1999), legte eine Beteiligung dieses nukleären Rezeptors an Regulationsvorgängen der biliären Homeostase nahe. Tatsächlich konnte in Studien an FXR Knockout Mäusen, die mit Cholsäure gefüttert wurden, die essentielle Beteiligung dieses nukleären Rezeptors auf die Ntcp und Abcb11 Expression gezeigt werden (Sinal *et al.,* 2000). FXR bildet nach Bindung von Gallensäuren mit dem Retinoid X-Rezeptor (RXRα) ein Heterodimer, dass mit hoher Affinität am sogenannten „inverted repeat response element" (IR-1), einem Konsensus Motiv aus zwei durch ein Nukleotid getrennten Hexameren, bindet. Die Interaktion von FXR mit einem IR-1 Element innerhalb der 5'-flankierenden Region des menschlichen ABCB11 Gens konnte kürzlich bestätigt werden (Ananthanarayanan *et al.,* 2001). Im Abcb11 Promotor der Ratte konnten wir zwei IR-1 Konsensus Motive nachweisen, von denen das proximale bei der Gallensäure-vermittelten negativen Rückkopplung auf die Abcb11 Transkription eine bedeutende Rolle spielte (Gerloff *et al.,* 2002b). Darüberhinaus scheint das proximale IR-1 Element auch zur basalen Abcb11 Aktivität beizutragen.

Auch Arzneistoffe waren in unseren Studien in der Lage, die Transkription des Gallensäurenexporters Abcb11 zu modulieren. Dies ist deshalb von Bedeutung, da dieser Carrier den wichtigsten Mechanismus zum Erhalt des biliären Galleflusses aufrecht erhält. Ohne eine intakte Gallesekretion ist auch die hepatische Clearance von Arzneistoffen nicht gewährleistet. Die Medikamenten-induzierte Cholestase ist ein häufiges Phänomen in der Pharmatherapie. Da β-Estradiol und Rifampin die Abcb11 Promotoraktivität inhibierten (Gerloff et al. 2002b) sind diese Arzneistoffe potentiell in der Lage, eine Cholestase durch verminderte Expression des wichtigsten hepatischen Gallensäuren Exporters auszulösen. Signaltransduktionswege, die in diesem Fall zur Suppression des Abcb11 Promotors führten, sind Gegenstand weiterer Untersuchungen. Für Östrogene sind intrazelluläre Rezeptoren bekannt, die eine entsprechende Modulation der Promotoraktivitäten bewirken können.

3. Zusammenfassung

ABC Transporter stellen die größte Familie von Transmembranproteinen dar. Sie hydrolysieren ATP und nutzen die dabei freiwerdende Energie, um ein breites Spektrum von Substraten durch biologische Membranen zu transportieren. Genetische Veränderungen in ABC Transportern sind die Ursache zahlreicher hereditärer Erkrankungen, wie z.B. der Zystischen Fibrose, Retinadegeneration oder Cholesterin- und Gallensäuren-Transportstörungen.

Pharmakokinetische Untersuchungen ergaben, dass ABC Transporter auch an der Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung vieler Arzneistoffe mitwirken. Es lag deshalb nahe, die Beteiligung von Mitgliedern dieser Proteinfamilie an pharmakogenetischen Effekten zu prüfen. P-Glykoprotein, das Genprodukt des MDR1 (ABCB1) war der am besten charakterisierte Transporter für Arzneistoffe mit einem sehr breiten Substratspektrum. Deshalb war das Ziel der hier präsentierten Studien, zunächst genetische ABCB1 Polymorphismen zu identifizieren und anschließend ihren Einfluß auf die Pharmakokinetik des Pgp Modellsubstrats Digoxin zu untersuchen.

Es konnte gezeigt werden, dass ABCB1 zahlreiche Polymorphismen in Form von Einzelbasenaustauschen (SNPs) enthält. Die meisten SNPs waren intronisch oder stumm, d.h. sie veränderten die Aminosäuresequenz des Carrier Proteins nicht. Darüberhinaus waren die Allelfrequenzen kodierender Polymorphismen wesentlich geringer, als die der nichtkodierenden. Ein stummer SNP im Exon 26 3435C>T führte im Vergleich zum Wildtyp zu einer geringeren intestinalen Pgp Expression bei homozygoten Trägern und entsprechend zu einer höheren Bioverfügbarkeit und schnelleren Absorption von Digoxin. Die Zuordnung pharmakokinetischer Profile von Digoxin zu Haplotypen aus den miteinander verbundenen SNPs in Exon 21 2677 und Exon 26 3435 konnte den pharmakogenetischen Effekt dieser ABCB1 Polymorphismen erhärten. Nach Gabe einer orale Einzeldosis von 1 mg Digoxin waren keine Unterschiede zwischen den ABCB1 Genotypen sichtbar. Wahrscheinlich lag diese Dosis oberhalb des Transportmaximums von Pgp, wodurch die weitere Resorption lediglich von der Diffusion oder von anderen Transport Systemen abhängig war.

Die weiteren hier aufgeführten Untersuchungen hatten das Ziel den kanalikulären ATP-abhängigen Gallensäuren Exporter der Leberzelle zu identifizieren und seine Transportcharakteristik und transkriptionelle Regulation zu beschreiben. Die biliäre Exportpumpe für monoanionische Gallensäuren ist ein Glykoprotein von 160 kDa, gehört ebenfalls zur Familie der ABC Transporter und weist eine hohe Affinität zu Gallensäuren auf (K_m Taurocholat ≈ 4,3 µM). Die 5'-flankierende Region des Abcb11 Gens wurde kloniert und der minimale Promotor in Transfektionsassays charakterisiert. Der Abcb11 Promotor hatte eine leberzellspezifi-

sche Aktivität und enthielt ein proximales FXRE Motiv, das funktionell durch Gallensäuren stimuliert werden konnte. Durch Arzneistoffe war die Promotoraktivität modulierbar, was bei der medikamenten-induzierten Leberschädigung von Bedeutung sein könnte.

In den untersuchten Tiermodellen der Cholestase und toxischen Leberschädigung konnte ein nahezu uniformes Muster adaptiver Regulation basolateraler und kanalikulärer (apikaler) Transporter der Leberzelle beobachtet werden. Während die Proteinexpression basolateral lokalisierter Aufnahme-Transportsysteme Ntcp und Oatps vermindert wurden, blieb die Proteinmasse kanalikulärer Carrier (Bsep, Mrp2) entweder unverändert oder wurde sogar hochreguliert. Dieses Regulationsmuster dient der Vermeidung hoher Konzentrationen toxischer Gallensäuren im Hepatozyten. Die Interaktion der Transkriptionsfaktoren HNF1 und C/EBPα mit Genen basolateraler Transporter scheint bei diesen adaptiven Regulationsvorgängen eine große Rolle zu spielen.

Referenzen

Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1999;39:361-98.

Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. J Biol Chem 2001;276:28857-28865.

Avdeef A. Physicochemical profiling (solubility, permeability and charge state). Curr Top Med Chem 2001;1:277-351.

Ayrton A, Morgan P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. Xenobiotica 2001;31:469-97.

Borst P, Oude Elferink R. Mammalian ABC transporters in health and disease. Annu Rev Biochem 2002; 71:537-92.

Brown RS Jr, Lomri N, DeVoss J, Rahmaoui CM, Xie MH, Hua T, Lidofsky SD, Scharschmidt BF. Enhanced secretion of glycocholic acid in a specially adapted cell line is associated with overexpression of apparently novel ATP-binding cassette proteins. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:5421-5.

Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Roots I. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. Clin Pharmacol Ther 2001;69:169-74.

Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, Melamed MR. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. J Histochem Cytochem 1990;38:1277-87.

Courtois G, Morgan JG, Campbell LA, Fourel G, Crabtree GR. Interaction of a liver-specific nuclear factor with the fibrinogen and alpha 1-antitrypsin promoters. Science 1987;238:688-92.

Edwards MJ, Keller BJ, Kauffman FC, Thurman RG. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 1993;119:275-9.

Fellay J, Marzolini C, Meaden ER, Back DJ, Buclin T, Chave J-P, Decosterd LA, Furrer H, Opravil M, Pantaleo G, Retelska D, Ruiz L, Schinkel AH, Vernazza P, Eap CB, Telenti A. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. Lancet 2002;359:30-36.

Geier A, Kim SK, Gerloff T, Dietrich CG, Lammert F, Karpen SJ, Stieger B, Meier PJ, Matern S, Gartung C. Hepatobiliary organic anion transporters are differentially regulated in acute toxic liver injury induced by carbon tetrachloride. J Hepatol 2002;37:198-205.

Geier A, Dietrich CG, Gerloff T, Haendly J, Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ, Matern S, Gartung C. Regulation of basolateral organic anion transporters in ethinylestradiol-induced cholestasis in the rat. Biochim Biophys Acta 2003a;1609:87-94.

Geier A, Dietrich CG, Voigt S, Kim SK, Gerloff T, Kullak-Ublick GA, Lorenzen J, Matern S, Gartung C. Effects of proinflammatory cytokines on rat organic anion transporters during toxic liver injury and cholestasis. Hepatology 2003b (in press).

Gerloff T, Schaefer M, Johne A, Oselin K, Meisel C, Cascorbi I, Roots I. MDR 1 genotypes do not influence the absorption of a single oral dose of 1 mg digoxin in healthy white males. Br J Clin Pharmacol 2002a;54:610-6.

Gerloff T, Geier A, Roots I, Meier PJ, Gartung C. Functional analysis of the rat bile salt export pump gene promoter. Eur J Biochem 2002b;269:3495-503.

Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF, Meier PJ. The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. J Biol Chem 1998;273:10046-50.

Gerloff T, Geier A, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Matern S, Gartung C. Differential expression of basolateral and canalicular organic anion transporters during regeneration of rat liver. Gastroenterology 1999;117:1408-15.

Germain AM, Carvajal JA, Glasinovic JC, Kato CS, Williamson C. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: in intriguing pregnancy-specific disorder. J Soc Gynecol Inverstig 2002;9:10-4.

Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, Kreichgauer HP, von Richter O, Zundler J, Kroemer HK. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. J Clin Invest 1999;104:147-153.

Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schaeffeler E, Fischer J, Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from $CD56^+$ natural killer cells. Pharmacogenetics 2001;11:1-6.

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, Johne A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. 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 2000;97:3473-8.

Jansen PL, Strautnieks SS, Jacquemin E, Hadchouel M, Sokal EM, Hooiveld GJ, Koning JH, De Jager-Krikken A, Kuipers F, Stellaard F, Bijleveld CM, Gouw A, Van Goor H, Thompson RJ, Muller M. Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. Gastroenterology 1999;117:1370-79.

Johne A, Kopke K, Gerloff T, Mai I, Rietbrock S, Meisel C, Hoffmeyer S, Kerb R, Fromm MF, Brinkmann U, Eichelbaum M, Brockmoller J, Cascorbi I, Roots I. Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. Clin Pharmacol Ther 2002;72:584-94.

Jung D, Hagenbuch B, Gresh L, Pontoglio M, Meier PJ, Kullak-Ublick GA. Characterization of the human OATP-C (SLC21A6) gene promoter and regulation of liver specific OATP genes by hepatocyte nuclear factor 1 alpha. J Biol Chem 2001;276:37206-14.

Karpen SJ, Sun AQ, Kudish B, Hagenbuch B, Meier PJ, Ananthanarayanan M, Suchy FJ. Multiple factors regulate the rat liver basolateral sodium-dependent bile acid cotransporter gene promoter. J Biol Chem 1996;271:15211-21.

Karran SJ, Leach KG, Blumgart LH. Assessment of liver regeneration in the rat using the gamma camera. J Nucl Med 1974;15:10-16.

Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, Taylor A, Xie HG, McKinsey J, Zhou S, Lan LB, Schuetz JD, Schuetz EG, Wilkinson GR. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. Clin Pharmacol Ther 2001;70:189-199.

Kruijtzer CM, Beijnen JH, Schellens JH. Improvement of oral drug treatment by temporary inhibition of drug transporters and/or cytochrome P450 in the gastrointestinal tract and liver: an overview. Oncologist 2002;7:516-30.

Kullak-Ublick GA, Ismair MG, Stieger B, et al. Organic Anion-Transporting Polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. Gastro-enterology 2001;120:525-33.

Kwei GY, Alvaro RF, Chen Q, Jenkins HJ, Hop CE, Keohane CA, LY VT, Strauss JR, Wang RW, Wang Z, Pippert TR, Umbenhauer DR. Drug Metab Dispos 1999;27:581-7.

Madon J, Eckhardt U, Gerloff T, Stieger B, Meier PJ. Functional expression of the rat liver canalicular isoform of the multidrug resistance-associated protein. FEBS Lett 1997;406:75-8.

Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. Science 1999;284:1362-5.

Mickley LA, Lee JS, Weng Z, Zhan Z, Alvarez M, Wilson W, Bates SE, Fojo T. Genetic polymorphisms in MDR-1: a tool for examining allelic expression in normal cells, unselected and drug-selected cell lines, and human tumors. Blood 1998;91:1749-56.

Muller M, Bakos E, Welker E, Varadi A, Germann UA, Gottesman MM, Morse BS, Roninson IB, Sarkadi B. Altered drug-stimulated ATPase activity in mutants of the multidrug resistance protein. J Biol Chem 1996;271:1877-83.

Ortiz DF, St. Pierre MV, Abdulmessih A, Arias IM. A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid transport. J Biol Chem 1997;272:15358-65.

Oude Elferink RP, Meijer DK, Kuipers F, Jansen PL, Groen AK, Grotthuis GM. Hepatobiliary secretion of organic compounds; molecular mechanisms of membrane transport. Biochim Biophys Acta 1995;1241:215-68.

Padgham CR, Boyle CC, Wang XJ, Raleigh SM, Wright MC, Paine AJ. Alteration of transcription factor mRNAs during the isolation and culture of rat hepatocytes suggests the activation of a prolifarative mode underlies their dedifferentiation. Biochem Biophys Res Commun 1993;197:599-605.

Polli JW, Jarrett JL, Studenberg SD, Humphreys JE, Dennis SW, Brouwer KR, Woolley JL. Role of P-glykoprotein on the CNS disposition of amprenavir (141W94), an HIV protease inhibitor. Pharm Res 1999;18:1206-12.

Ramachandra M, Ambudkar SV, Gottesman MM, Pastan I, Hrycyna CA. Fundtional characterization of a glycine 185-to-valine substitution in human P-glycoprotein by using a vaccinia-based transient expression system. Mol Biol Cell 1996;7:1485-98.

Rao VV, Dahlheimer JL, Bardgett ME et al. Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:3900-3905.

Schreiber AJ, Simon FR. Estrogen-induced cholestasis: clues to pathogenesis and treatment. Hepatology 1983;3:607-613.

Sinal CJ, Tohkin M, Miayta M, Ward JM, Lambert G, Gonzales FJ. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. Cell 2000;102:731-744.

Stephens RH, O'Neill CA, Bennett J, Humphrey M, Henry B, Rowland M, Warhurst G. Resolution of P-glycoprotein effects on drug permeability using intestinal tissues from mdr1a (-/-) mice. Br J Pharmacol 2002;135:2038-46.

Stieger B, O'Neill B, Meier PJ. ATP-dependent bile-salt transport in canalicular rat liver plasma-membrane vesicles. Biochem J 1992;284:67-74.

Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA, Meier PJ. Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump of rat liver. Gastroenterology 2000;118:422-30.

Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagawalla AF, Nemeth A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM, Thompson RJ. A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. Nat Genet 1998;20:233-8.

Suchy FJ, Sippel CJ, Ananthanarayanan M. Bile acid transport across the hepatocyte canalicular membrane. FASEB J 1997;11:199-205.

Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, Takahashi M, Kurata Y, Kigawa J, Higuchi S, Terakawa N, Otsubo K. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. J Pharmacol Exp Ther 2001;297:1137-1143.

Tanigawara Y. Role of P-glycoprotein in drug disposition. Ther Drug Monit 2000; 22: 137-40.

Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. Semin Liver Dis 1990;10:56-65.

Wang R, Salem M, Yousef IM, Tuchweber B, Lam P, Childs SJ, Helgason CD, Ackerley C, Phillips MJ, Ling V. Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice results in nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98:2011-16.

Yu DK. The contribution of P-glycoprotein to pharmacokinetic drug-drug interactions. J Clin Pharmacol 1999;39:1203-1211.

Danksagung

Mein Dank gilt allen Mitgliedern der jeweiligen Arbeitsgruppen, in denen ich mitwirken durfte und die durch zahlreiche Diskussionen und kollegiale Zusammenarbeit meinen wissenschaftlichen Werdegang geprägt haben.

In besonderem Maße möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Ivar Roots, Direktor des Instituts für Klinische Pharmakologie der Charité Berlin für seine große Unterstützung und sein wissenschaftliches und menschliches Vorbild danken.

Mein ausdrücklicher Dank gilt auch Prof. Dr. Peter Meier-Abt (Zürich), Prof. Dr. Dipl. Biochem. Siegfried Matern (Aachen), PD Dr. Carsten Gartung (Aachen) und Dr. Andreas Geier (Aachen).

Von Herzen möchte ich auch meiner Ehefrau Annegret Gerloff und meinen Eltern für ihre Unterstützung danken.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;

- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

....

Datum Unterschrift