

PHARMAKOGENETIK DES ZYTOSTATIKUMS
MELPHALAN:
CHARAKTERISIERUNG DES MEMBRANTRANSPORTES

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Annett Kühne

aus Halberstadt

Göttingen 2008

D 7

Referent: PD Dr. W. Kramer

Korreferent: Prof. Dr. E. Wimmer

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2008

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Bedeutung der Pharmakogenetik	1
1.1.1	Arten genetischer Varianten	2
1.1.2	Beispiele klinisch relevanter genetischer Polymorphismen	3
1.2	Krebsentstehung	5
1.3	Klassifikation maligner hämatologischer Erkrankungen	6
1.3.1	Multiples Myelom	7
1.4	Möglichkeiten der Tumorthherapie	8
1.5	Konventionelle Chemotherapie	9
1.6	Resistenzmechanismen	10
1.7	Das Zytostatikum Melphalan	12
1.7.1	Therapie mit Melphalan	13
1.7.2	Pharmakokinetik von Melphalan	14
1.7.3	Biotransformation des Melphalans durch Glutathion-S-Transferasen	16
1.7.4	Transportmechanismen durch biologische Membranen	17
1.7.5	Membrantransport von Melphalan	18
1.8	Aufgabenstellung	21
2	MATERIAL	22
2.1	Chemikalien	22
2.2	Verbrauchsmaterialien	24
2.3	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme („Kits“)	25
2.4	Verwendete Zelllinien	26
2.5	Vektoren und Plasmide	27
2.6	Enzyme	27
2.7	Geräte	28
2.8	Software, Datenbanken, Sequenzen	29
3	METHODEN	30
3.1	Klinische Studie	30

3.1.1	Pharmakokinetik: Probennahme und Konzentrationsanalysen	31
3.2	Pharmakokinetische Berechnungen	31
3.2.1	Pharmakokinetische Modellanpassung	31
3.2.2	Populations-pharmakokinetisches Modell	32
3.3	Arbeiten mit DNA	34
3.3.1	DNA Isolierung	34
3.3.2	Lagerung von DNA	36
3.3.3	Quantifizierung von Nukleinsäure	36
3.3.4	Agarose Gelelektrophorese	37
3.3.5	Aufreinigung von DNA	38
3.3.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
3.3.7	Restriktionsanalyse	42
3.4	Methoden zur Genotypisierung	43
3.4.1	Sequenzierung	43
3.4.2	PCR-RFLP Technik	46
3.4.3	Primer-Extension Methode	47
3.4.4	Allelische Diskriminierung mittels Real-Time PCR	50
3.5	Arbeiten mit RNA	51
3.5.1	RNA Isolierung	51
3.5.2	Arbeiten mit der RNA	52
3.5.3	cDNA Synthese (reverse Transkription)	52
3.5.4	cRNA Synthese (<i>in vitro</i> -Transkription)	53
3.5.5	Quantitative PCR	53
3.6	Klonierung und Arbeiten mit Bakterien	57
3.6.1	Kulturmedium für Bakterien	57
3.6.2	Anzucht von Bakterien in Lösung	57
3.6.3	Anzucht von Bakterien auf Agarplatten	58
3.6.4	Herstellung von Glycerinkryokulturen	58
3.6.5	Dichtebestimmung von Bakterienlösungen	58
3.6.6	Präparation von elektrokompetenten Bakterien	58
3.6.7	Transformation durch Elektroporation	59
3.6.8	Kolonie-PCR	60
3.6.9	Klonierung von cDNA in Plasmide	60
3.7	Proteinbiochemische Methoden	65
3.7.1	Isolierung von Gesamtprotein	65
3.7.2	Konzentrationsbestimmung des Proteingehaltes	65
3.7.3	Herstellung von vertikalen SDS-Polyacrylamid-Minigelen	66
3.7.4	Elektrophorese	67
3.7.5	Nachweis von Proteinen im Western-Blot	68
3.7.6	Semidry-Transfer	68
3.7.7	Färbung	69
3.7.8	Immunchemischer Nachweis	69
3.8	Zellbiologie	71
3.8.1	Allgemeine Kulturbedingungen	71
3.8.2	Bestimmung der Zellzahl	72

3.8.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	72
3.8.4	Transiente Transfektionsmethoden	73
3.9	Transportmessungen in Zelllinien und Oozyten	75
3.9.1	Transport in adhärenent wachsenden Zellen	75
3.9.2	Transport in Suspensionszellen	76
3.9.3	Transport in Oozyten	77
3.10	Zytotoxizität und Apoptosemessungen	79
3.10.1	MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität	79
3.10.2	Bestimmung der Apoptose durch Messung der Caspase-3/7-Enzymaktivität	81
3.11	Analytische Methode	82
3.12	Statistische Auswertung	83
3.13	Kopplungsungleichgewicht und Haplotypenanalyse	86
4	ERGEBNISSE	88
4.1	Klinische Studie zur Melphalan Pharmakokinetik und -genetik	88
4.1.1	Patientendaten	88
4.1.2	Pharmakokinetik von Melphalan: Analyse nach dem 2-Schritt-Verfahren	89
4.1.3	Populations-pharmakokinetische Analyse	92
4.1.4	Populations-pharmakokinetische Parameter von Melphalan	93
4.1.5	Korrelation der Nebenwirkungen mit der Pharmakokinetik von Melphalan	95
4.2	Einfluss genetischer Polymorphismen auf Pharmakokinetik und Nebenwirkungen von Melphalan	98
4.2.1	Genetische Variabilität in LAT1 und LAT2	98
4.2.2	Genetische Kopplung und Haplotypenanalyse der LAT1 und LAT2 Polymorphismen	100
4.2.3	Häufigkeit der genotypisierten <i>tagging</i> SNPs im 4F2hc Gen	108
4.2.4	Beziehung zwischen Melphalan Pharmakokinetik und genetischen Polymorphismen in den Transportern LAT1-4F2hc und LAT2-4F2hc	108
4.2.5	Nebenwirkungen des Melphalans und genetische Polymorphismen in den Transportern LAT1-4F2hc und LAT2-4F2hc	109
4.2.6	Nebenwirkungen des Melphalans und genetische Polymorphismen in den Glutathion-S-Transferasen	109
4.3	Einfluss der Genetik auf die LAT1 und LAT2 Expression	111
4.4	Gewebespezifische Expression von LAT1 und LAT2	113
4.5	Charakterisierung des Membrantransportes von Melphalan	114
4.5.1	Zelllinienspezifische Expression von LAT1 und LAT2	114
4.5.2	Inhibition der Melphalan-Aufnahme in verschiedenen Zelllinien	115
4.5.3	Spezifische Herunterregulierung der Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2 mittels siRNA	119
4.5.4	Funktionelle Untersuchungen zur LAT1 Herunterregulierung	123
4.5.5	Expression von LAT1 und LAT2 in Oozyten	125

4.6	Einfluss der Expression von Influx- und Effluxtransportern in Tumorzelllinien auf die Zytotoxizität und intrazelluläre Akkumulation von Melphalan	127
4.6.1	Zellvitalitätsunterschiede nach der Behandlung mit Melphalan	128
4.6.2	Unterschiede in der Caspase-3/7-Enzymaktivität nach der Behandlung mit Melphalan	130
4.6.3	Unterschiede in der intrazellulären Akkumulation von Melphalan und Korrelation mit der Toxizität von Melphalan	132
4.6.4	Unterschiede in der Expression verschiedener Transporter in Tumorzelllinien	133
4.6.5	Korrelation der Genexpression mit der Zytotoxizität und dem Transport des Melphalans in Multiplen Myelom-Zelllinien	134
4.6.6	Zytotoxizität von Melphalan in Multiplen Myelom-Zelllinien bei Inkubation mit Transporter-spezifischen Inhibitoren	136
5	DISKUSSION	138
5.1	Pharmakokinetik von Melphalan	138
5.2	Populations-Pharmakokinetik von Melphalan	141
5.3	Korrelation der Nebenwirkungen mit der Pharmakokinetik von Melphalan	142
5.4	Bedeutung angeborener Unterschiede für die Krebstherapie mit Melphalan	143
5.4.1	Erworbene und erbliche Variabilität bei Melphalan	143
5.4.2	LAT1 und LAT2: Erbliche Variation	144
5.4.3	LAT1 und LAT2: Genotyp-Phänotyp-Analyse	145
5.4.4	Rolle der Polymorphismen in den Glutathion-S-Transferasen für die Nebenwirkungen des Melphalans	145
5.4.5	Assoziation genetischer Polymorphismen mit der LAT1- und LAT2- Expression	147
5.5	Charakterisierung des Membrantransportes von Melphalan	148
5.5.1	Inhibitionsexperimente	149
5.5.2	siRNA-Technik	151
5.5.3	Expression von LAT1 und LAT2 in <i>Xenopus</i> Oozyten	152
5.6	Bedeutung tumorspezifischer Unterschiede für die Krebstherapie mit Melphalan	154
5.6.1	Gewebespezifische Expression von LAT1, LAT2 und 4F2hc	154
5.6.2	Tumorzellenspezifische Expression verschiedener Transportsysteme	154
5.6.3	Zytotoxizität und intrazelluläre Akkumulation des Melphalans im Zusammenhang mit der Expression verschiedener Transportsysteme	156
5.7	Ausblick	158
6	ZUSAMMENFASSUNG	160
7	LITERATURVERZEICHNIS	162
8	DANKSAGUNG	173

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Gewicht/Volumen (engl.: <i>weight/volume</i>)
°C	Grad Celsius
µ-	mikro (1×10^{-6})
4F2hc	assoziiertes Glycoprotein (SLC3A2)
A	Ampere
ABC	ATP- <i>binding-cassette</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
ANOVA	engl.: Analysis of variance between groups
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AUC	Fläche unter der Kurve (engl.: <i>area under curve</i>)
bidest. H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>Bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i>)
Cl	Clearance
CML	chronisch myeloische Leukämie
CNV	<i>Copy number Variation</i>
C _T	<i>Cycle of threshold</i>
CYP450	Cytochrom-P450-Enzyme
d	Tage
d-	Desoxy-
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dd-	Didesoxy-
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
Del	Deletion
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	engl.: enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere (lat.: <i>et alii</i>)
FAM	6-Carboxyfluorescein
FKS	Fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal bovine serum</i>)
FRET	engl.: Fluorescence Resonance Energy Transfer
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$)

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
gDNA	genomische DNA
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grünfluoreszierendes Protein (engl.: green fluorescent protein)
GSH	Glutathion-Thiolgruppe
GST	Glutathion-S-Transferasen
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	<i>4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine-1-ethanesulfonic acid</i>
HL	Hodgkin-Lymphom
Ins	Insertion
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LAT1	L-Typ Aminosäuretransporter 1 (SLC7A5)
LAT2	L-Typ Aminosäuretransporter 2 (SLC7A8)
LB	Luria-Bertani Medium
LD	<i>linkage disequilibrium</i>
m	Milli (1×10^{-3})
M	Molarität
MAF	Minor Allelfrequenz
MDR1	<i>multidrug resistance</i> Transporter 1 (ABCB1)
MGB-DQ	<i>Minor groove binder-dark quencher</i>
min	Minute
mind.	Mindestens
MM	Multiples Myelom
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i>)
MRP1	<i>multidrug-resistance related Protein1</i> (ABCC1)
MW	arithmetischer Mittelwert
n	Anzahl
n-	nano (1×10^{-9})
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
Nr.	Nummer
nt	Nukleotid
OCT1	Transporter für organische Kationen 1 (SLC22A1)
OCT2	Transporter für organische Kationen 2 (SLC22A2)
OCT3	Transporter für organische Kationen 3 (SLC22A3)
OD	Optische Dichte
P	Signifikanzniveau
p-	pico (1×10^{-12})
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	pH-Wert negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionenkonzentration

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
RFLP	Restriktions-Fragmentlängen Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>rounds per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Medium 1640
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium-dodecylsulfate)
SEM	Standardfehler
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STABW	Standardabweichung
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAT1	T-Typ Aminosäuretransporter 1 (SLC16A10)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TEA ⁺	Tetraethylammoniumion
TEMED	N,N,N'NN'-Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-hydroxymethyl-aminomethan-EDTA-Puffer
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tSNP	<i>tagging single nucleotide polymorphism</i>
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit
VIC	6-Carboxyrhodamin
VNTRs	<i>Varying numbers of tandem repeats</i>
WHO	Weltgesundheitsbehörde (engl.: <i>World Health Organization</i>)
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Pharmakogenetik

Nur wenige Medikamente wirken bei allen Patienten und es ist oft nicht vorherzusehen, ob ein Medikament bei einem Patienten nicht, gut oder sogar zu stark wirkt. Ähnliches gilt auch für viele Arzneimittelnebenwirkungen, deren Auftreten beim individuellen Patienten oft nicht vorausgesagt werden kann. Diese interindividuelle Variabilität in der Arzneimittelwirkung kann nur teilweise durch Einflussfaktoren wie Nieren- und Leberfunktion, Alter, Geschlecht, Komedikation und Lebensstil zufriedenstellend erklärt werden. Vielfach ist die individuelle Reaktion aber unerklärt und hier gilt die aktuelle Forschung genetischer Faktoren, die die Unterschiede im Ansprechen und die interindividuellen Schwankungen in der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik erklären könnten. Diese genetischen Faktoren werden in den Forschungsfeldern der Pharmakogenetik und Pharmakogenomik untersucht. Die Pharmakogenetik beschäftigt sich vorwiegend mit einzelnen Genen und ihren Effekten, wobei sich die Pharmakogenomik mit der Funktion und Interaktion aller Gene des Genoms auseinandersetzt. Die Bedeutung der Pharmakogenetik und -genomik zeigt sich sowohl bei der Identifizierung spezifischer Gene, die mit Erkrankungen assoziiert sind, als auch bei der Identifizierung polymorpher Gene, die die Wirkung bzw. Nebenwirkungen entscheidend beeinflussen. Ein Ziel der Pharmakogenetik ist durch Erstellung genetischer Profile für jeden Patienten eine individualisierte Therapie anzubieten, um mit einer optimalen Dosis des Arzneimittels das Ansprechen von Tumorgewebe auf eine Standardtherapie zu gewährleisten (Evans and McLeod, 2003). Ein weiteres Ziel ist die Entwicklung von Medikamenten, die nicht von genetischer Variabilität betroffen sind. Und schließlich erwartet man aus der Analyse der natürlichen genetischen Variabilität des Menschen grundlegende Erkenntnisse zur Evolution des Lebens sowie zur Funktion des Genoms. Es gibt in nicht wenigen Genen natürlicherweise auftretende Varianten die zum Funktionsverlust oder zu erheblichen Funktionsänderungen der Genprodukte führen und die Analyse der jeweiligen Konsequenzen kann sehr wichtige Rückschlüsse auf die Funktion des jeweiligen Gens erlauben.

1.1.1 Arten genetischer Varianten

Im Genom des Menschen treten unterschiedliche Arten erblicher Variationen auf. Dazu gehören Einzelnukleotidaustausche, Deletionen und Insertionen zwischen 1 und 1000 Nukleotiden, Mikro- und Minisatelliten (VNTRs, *variable number of tandem repeats*) mit tandem-artiger Wiederholung von Sequenzen zwischen 2 und einigen Hundert Basenpaaren sowie Deletionen oder Multiplikationen von DNA-Segmenten größer als 1 kb (CNV, *copy number variation*). Man spricht bei Sequenzvarianten von Polymorphismen, wenn sie mit mehr als einem Prozent in einer Population auftreten, ansonsten werden sie als seltene Variation oder Mutationen bezeichnet. Dabei ist die Terminologie nicht ganz einheitlich, einige Autoren bevorzugen den Begriff „Mutationen“ für diejenigen Varianten, die im Laufe des Lebens eines Organismus neu auftreten, z.B. in bösartigen Tumoren. Die häufigsten Sequenzvarianten sind Einzelnukleotidaustausche (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*). Nach der Sequenzierung des menschlichen Genoms im Rahmen des Human Genom Projekts wurde die Anzahl der SNPs auf ca. 12 Millionen geschätzt (HapMapConsortium, 2005). Deletionen und Insertionen treten mit einer Häufigkeit von unter 1 Million auf und VNTRs sind mit einer Häufigkeit von ca. 500.000 im menschlichen Genom vertreten.

Je nach Position der Varianten im Gen kommt es zu unterschiedlichen funktionellen Effekten. Polymorphismen im Promotorbereich oder nichtkodierenden Bereichen eines Gens können die Genexpression beeinflussen. Alle Polymorphismen innerhalb des Transkriptionsstartpunktes und dem 3'-Ende des Transkriptes können einen Einfluss auf das *splicing* haben. Liegt ein Polymorphismus in dem kodierenden Bereich eines Gens kommt es entweder zu einem nicht-synonymen oder synonymen Aminosäureaustausch. Bei einer synonymen Aminosäuresubstitution kann die mRNA-Stabilität, das *splicing* oder die Translationseffizienz beeinflusst werden. Nicht-synonyme Aminosäuresubstitutionen können einen Effekt auf die Protein-Aktivität, -Stabilität oder -Interaktionen haben, indem z.B. *nonsense* Mutationen durch ein Stopcodon bedingt zu einem Abbruch der Translation führen oder *frame shift* Mutationen eine Verschiebung des Leserasters und damit unterschiedliche Aminosäurekodierungen verursachen. Für die meisten SNPs im kodierenden Bereich, so genannte stille (*silent*) Mutationen fehlt jedoch bisher der direkte Beweis, welche funktionellen Effekte sie auslösen. Über Haplotypanalyse bzw. Kopplungsungleichgewichte (*linkage disequilibrium*) können SNPs als wichtige genetische Marker für andere gegebenenfalls noch nicht bekannte Polymorphismen identifiziert werden, die den Phänotyp beeinflussen.

1.1.2 Beispiele klinisch relevanter genetischer Polymorphismen

Zur Beschreibung der angeborenen Unterschiede im therapeutischen Ansprechen von Arzneistoffen, wurde der Begriff „Pharmakogenetik“ erstmals von dem Humangenetiker Friedrich Vogel im Jahre 1956 geprägt (Vogel, 1956). Die Erforschung der Pharmakogenetik basiert auf klinischen Beobachtungen wie sie erstmals bei afro-amerikanischen Männern mit einer schweren hämolytischen Krise nach der Behandlung mit dem Antimalariamittel Primaquin dokumentiert worden sind. Diese starken Nebenwirkungen beruhten auf einem X-chromosomal vererbten Defekt der Gucoose-6-Phosphat Dehydrogenase (Alving et al., 1956; Beutler, 1969). Über 140 Mutationen wurden bisher in diesem Gen analysiert, wobei die meisten SNPs im kodierenden Bereich über einen Aminosäureaustausch zu einer Abnahme der Enzymaktivität führen.

Mehr als die Hälfte aller Medikamente werden im menschlichen oder tierischen Organismus metabolisch umgewandelt. Viele der dabei beteiligten Enzyme weisen funktionelle genetische Polymorphismen auf, die zu einem Spektrum zwischen vollständigem Fehlen der Enzymaktivität und hochgradig erhöhter Enzymaktivität führen können (Eichelbaum et al., 2006). Metabolisierungsprozesse werden in so genannte Phase-I- und -II-Reaktionen unterteilt. Typische Phase-I-Reaktionen sind die Oxidation, die Reduktion und die Hydrolyse, während Phase-II-Reaktionen Kopplungsreaktionen wie die Sulfatierungen, die Glukuronidierungen oder die Azetylierungen umfassen (siehe Abbildung 1.1). Die wichtigsten Enzyme für den Phase-I-Metabolismus gehören zur Familie der Cytochrom-P450-Enzyme (CYP450). Es existieren mehr als 30 CYP450 Enzyme im Menschen, von denen fast alle genetische Varianten aufweisen, die bei vielen dieser Enzyme zu funktionellen Veränderungen führen (Ingelman-Sundberg et al., 1999; Evans and Johnson, 2001). Dabei gehört das Enzym CYP2D6 zu den am besten pharmakogenetisch charakterisierten CYP450 Isoformen. Genetische Polymorphismen in diesem Enzym führen zu klinisch relevanten Unterschieden im pharmakokinetischen Profil von Arzneimitteln, die über CYP2D6 inaktiviert werden. Dazu gehören eine Vielzahl von Antidepressiva, Neuroleptika sowie einige Antiarrhythmika (Charlier et al., 2003; Kirchheiner et al., 2004). Klinisch kann man verschiedene Phänotypen wie schnelle, langsame und sehr schnelle Metabolisierer unterteilen, deren Häufigkeit in Abhängigkeit von der Zugehörigkeit zu einer bestimmten ethnischen Gruppe variiert (Johansson et al., 1993; Sachse et al., 1997). Ein bekanntes Beispiel für ein polymorph exprimiertes Phase-II-Enzym ist die Thiopurin-Methyl-Transferase (TPMT) (Weinshilboum and Sladek, 1980). Die TPMT ist an der metabolischen Inaktivierung der in der Therapie maligner

Tumoren und bestimmter Autoimmunerkrankungen eingesetzten Antimetabolite Mercaptopurin und Azathioprin beteiligt. Eine Minderfunktion der TPMT ist dabei mit einer erhöhten Toxizität dieser Zytostatika assoziiert. Für Kinder mit akuter lymphoblastischer Leukämie erwies sich andererseits eine geringere TPMT-Aktivität als Vorteil bezogen auf das ereignisfreie Überleben nach der Therapie mit Mercaptopurin (Relling et al., 1999).

Betrachtet man eine einzelne Zelle gibt es insgesamt 4 Prozesse, die die Pharmakokinetik eines Arzneistoffes beeinflussen. Man unterscheidet den Influxtransport, Phase-I-Metabolismus (oxidative und reduktive Reaktionen), Phase-II-Metabolismus (Konjugationsreaktionen) und den Effluxtransport (siehe Abbildung 1.1).

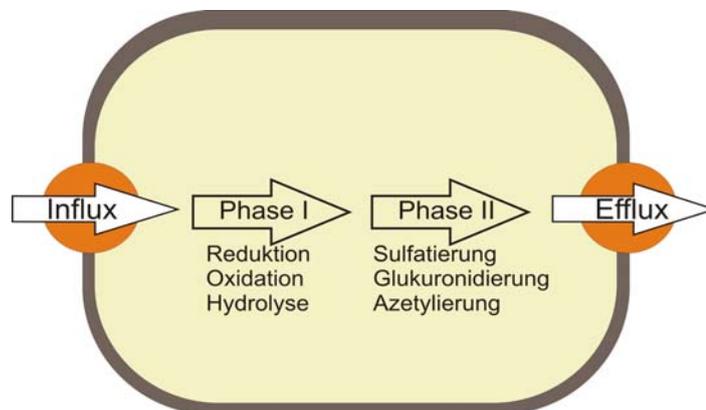


Abbildung 1.1: Schematische Zusammenfassung zellulärer Prozesse, die die Pharmakokinetik eines Medikaments beeinflussen können.

Es gibt insgesamt erst wenig Arzneistoffe, bei denen die beteiligten Transportproteine sowohl für den Influx als auch den Efflux umfassend identifiziert sind. Genetische Polymorphismen in Transportproteinen können die Expression oder – wenn es sich um nicht-synonyme Polymorphismen handelt – die Affinität zu bestimmten Substraten beeinflussen, wodurch sich auch die pharmakokinetisch messbare Absorption und Elimination der betroffenen Substanzen verändern kann. Zu den größten Transporterfamilien gehören die ABC-Transporter, mit dem MDR1 P-Glycoprotein (ABCB1) als bekanntesten Vertreter, welcher für den Transport von Xenobiotika aus der Zelle verantwortlich ist. Durch systematisches *Screening* der DNA wurden in einer ersten Arbeit 28 SNPs im MDR1 Gen identifiziert, von denen zwei SNPs (G2677T und C3435T), obwohl es stille Mutationen sind, einer Reihe von Publikationen zu Folge die Funktion und Expression des Transporters beeinflussen (Schwab et al., 2003), inzwischen sind in diesem Gen viele weitere genetische Polymorphismen identifiziert worden. Unter physiologischen Bedingungen wird MDR1 in einer Vielzahl von Geweben wie Dünndarm, Leberzellen,

proximalen Nierentubulus Zellen oder an der Blut-Hirn-Schranke exprimiert. Zudem wird MDR1 in bestimmten Tumoren überexprimiert wodurch er eine Resistenz von Tumorzellen gegenüber einer Vielzahl von Chemotherapeutika hervorruft (Kapitel 1.6).

Es gibt eine Reihe von Informationen zur genetischen Variabilität von Membrantransportern jedoch ist das Wissen darüber immer noch sehr gering, welche Effekte diese Varianten auf das Transportverhalten haben. Dies gilt insbesondere für alle Influxtransporter mit den *Solute-Carrier* (SLC) Transportern, als größte Familie. Genetische Varianten konnten z.B. in den Transportern für organische Anionen OATP (*SLC21A*) und für organische Kationen OCTs (*SLC22A*) identifiziert werden, jedoch gibt es bisher nur geringe oder widersprüchliche Hinweise darauf welchen Einfluss diese Polymorphismen auf die Pharmakokinetik und das therapeutische Ansprechen von Arzneimitteln haben.

Genetische Polymorphismen spielen nicht nur eine wichtige Rolle für das Ansprechen auf die Therapie mit Medikamenten oder für die Nebenwirkungen. Umgekehrt können genetische Polymorphismen auch Auswirkungen auf die Entstehung von Krankheiten haben. So liegt z.B. bei den Krebserkrankungen der Anteil durch genetische Vorbelastung in einem Bereich zwischen 5% und 10%. Bei bestehenden Krankheiten kann die molekulargenetische Information in vielen Fällen zu einer präziseren Diagnose führen und somit eine gezielte Therapie ermöglichen.

1.2 Krebsentstehung

Bei der Krebsentstehung handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, der seinen Ursprung in der Veränderung oder Schädigung der genetischen Information in einer somatischen Zelle hat. In der Folge wandeln sich normale Körperzellen in maligne (bösartige) Zellen um, was ein über mehrere Jahre andauernder Vorgang sein kann. Man unterscheidet bei der Krebsentstehung und -entwicklung im Groben drei Phasen: Initiation, Promotion und Progression. Unter der Initiation versteht man eine beständige Veränderung von Zellen, die auch auf Tochterzellen vererbt werden kann. Dies geschieht durch Veränderung der Erbinformation: Durch chemische oder physikalische Einflüsse kommt es zu Veränderungen an der DNA, die, wenn sie nicht durch DNA-Reparaturenzyme repariert werden können, entweder zum Zelluntergang führen (Apoptose) oder zu Mutationen führen. Die Promotion ist ein Prozess, der nach erfolgter Initiation die Entstehung eines Tumors verstärkt bzw. zu einer Beschleunigung der Proliferation der Tumorzellen führt. Unter Progression versteht man die Umwandlung von durch Initiation und Promotion

entstandenen benignen (gutartigen) Geschwülsten in maligne wuchernde Tumore. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass die Zellen fortwährend proliferieren und sich den endogenen Kontrollen von Zellzyklus und DNA-Schäden, den Einflüssen von externen inhibitorischen Faktoren und schließlich dem Zelltod entziehen. Dies geschieht durch Aktivierung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen (z.B. RAS), durch Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z.B. P53) und durch Hochregulierung von antiapoptotisch wirksamen (BCL-2) und immortalisierenden Molekülen. Sowohl Proto-Onkogene als auch Tumorsuppressorgene kommen in allen gesunden Körperzellen vor und regulieren dort Zellwachstum (Proliferation) und Zellreifung (Differenzierung). Während Proto-Onkogene prinzipiell das Zellwachstum fördern, wird das Zellwachstum von Tumorsuppressorgenen unterdrückt. Verliert dieses genetische Kontrollsystem seine Balance, gerät die Zelle aus ihrem Wachstumstakt, und es entsteht durch ein unkontrolliertes Wachstum ein Tumor. Maligne Tumore sind häufig genetisch instabil und akkumulieren nach den initialen transformierenden genetischen Ereignissen weitere, sekundäre genetische Veränderungen (Hoeijmakers, 2001). In den meisten Fällen werden derartige genetische Veränderungen im Laufe des Lebens erworben. Krebserregende Ursachen können z. B. einzelne chemische Stoffe, ionisierende Strahlung (wie UV-Strahlung oder Röntgenstrahlung) sowie Viren, oder auch ein Zusammenwirken von chemischen und physikalischen Faktoren sein. Sie können beim Krebsgeschehen in allen drei Phasen wirksam werden. Die Kenntnis der molekularen Basis von Krebserkrankungen hat bereits Fortschritte in der klinischen Diagnostik und Prognostik erbracht und zur Entwicklung neuer Strategien der Tumorthherapie und Prävention geführt.

1.3 Klassifikation maligner hämatologischer Erkrankungen

Mehr als ein Viertel aller Todesfälle in Deutschland sind derzeit den verschiedenen Krebsarten zuzuschreiben. In Deutschland erkranken etwa 333.000 Menschen jährlich an Krebs, 210.000 Patienten versterben daran (Becker, 1998). Nur Herz-Kreislauferkrankungen führen häufiger zum Tod. Im Jahr 2005 zählte bei Männern der Lungenkrebs mit 36,3% zu den häufigsten Krebstodesursachen. Bei den Frauen lag der Brustkrebs mit 18% an erster Stelle (Becker, 1998). Im Vergleich zu den soliden Tumorerkrankungen lagen die malignen hämatologischen Erkrankungen wie Lymphome, Leukämien und das multiple Myelom bei Frauen und Männern zwischen 1,5% und 5%.

Unter der Bezeichnung maligne Lymphome wird eine große Anzahl verschiedener Erkrankungen des lymphatischen Systems zusammengefasst. Maligne Lymphome

entwickeln sich aus Lymphozyten einschließlich ihrer Vorläufer und Stammzellen und bilden eine Gruppe klonaler maligner Erkrankungen. Sie lassen sich nach histologischen, immunologischen und zytogenetischen Kriterien klassifizieren. Anhand des klinischen Verlaufs können Lymphome wiederum verschiedenen Risikogruppen zugeordnet werden. Die differenzierte Diagnostik und Klassifikation bildet die Grundlage für krankheitsspezifische Therapieverfahren. Mit der international anerkannten WHO Klassifikation wird die europäische und US-amerikanische Klassifikation (Kiel und R.E.A.L) ersetzt und damit die klassische Aufteilung der malignen hämatologischen Erkrankungen nach Lymphomen und lymphatischen Leukämien aufgehoben.

Bei den malignen Lymphomen wird zunächst das Hodgkin-Lymphom (HL) von den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) unterschieden. Anders als beim NHL ist das HL durch eine typische Morphologie gekennzeichnet, den so genannten mehrkernigen Riesenzellen (Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen), die von reaktiven, überwiegend lymphatischen Zellen umgeben sind. Nach dem Immunophänotyp unterteilt man die NHL in B-Zell-Lymphome (90%) und T-Zell-Lymphome (10%). Weiterhin erfolgt die Klassifikation nach Krankheitsverlauf und Prognose (WHO-Klassifikation), d.h. in Abhängigkeit vom Malignitätsgrad, in 2 Gruppen nach indolente (niedrigmaligne) und sehr aggressive (hochmaligne) NHL (siehe Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Klassifikation der Non-Hodgkin Lymphome nach den WHO Kriterien.

Indolente Lymphome:	Chronische lymphatische Leukämie (CLL)
	Follikuläre Lymphome
	Haarzell Leukämie
	Immunozytom
	Kutane T-Zell Lymphome
	MALT Lymphom
	Multiples Myelom (Plasmozytom)
Sehr aggressive Lymphome:	Burkitt Lymphom
	Diffus großzellige B-Zell Lymphome
	Mantelzell Lymphome

1.3.1 Multiples Myelom

Im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen ist das multiple Myelom eine seltene Krebserkrankung. Die Häufigkeit des multiplen Myeloms beträgt in Deutschland 3-4 Fälle auf 100.000 Menschen. Das mittlere Alter bei Diagnoserstellung liegt bei 71 Jahren. Nur ca. zwei Prozent der Erkrankten sind jünger als 45 Jahre und Männer sind im Verhältnis von 3:2 etwas häufiger betroffen als Frauen.

Das multiple Myelom (MM), auch Plasmozytom genannt, ist eine Tumorerkrankung, die von den B-Lymphozyten ausgeht, aber im Gegensatz zu den übrigen malignen Lymphomen nicht die Lymphknoten, sondern vor allem das Knochenmark und in der Folge auch den Knochen selbst befällt. Dort verursacht die Erkrankung herdartige Auflösungen der Knochensubstanz. Die Tumorzellen sind Nachkommen einer entarteten Antikörper produzierenden Zelle (Plasmazelle). Normalerweise machen Plasmazellen nur einen sehr kleinen (< 5 %) Anteil der Zellen im Knochenmark aus. Menschen mit MM weisen jedoch ein verstärktes Wachstum maligner Plasmazellen (Myelomzellen) auf. Sie produzieren ebenfalls antikörperartige Eiweiße, die allerdings funktionslos sind, also keine Abwehrfunktion haben. Die so genannten Paraproteine können den Klassen der schweren Ketten IgG, IgA, IgM, IgD und IgE bzw. der leichten Ketten Typ λ und κ zugeordnet werden. Im Krankheitsverlauf kommt es aufgrund der vermehrten Ausscheidung von Paraproteinen zu einer Störung der Nierenfunktion. Unter Berücksichtigung klinischer Parameter in Korrelation zur gemessenen Myelomzellmasse (Gesamtzahl im Körper), Grades der Knochendestruktion und der Nierenfunktion, erfolgt nach Durie und Salmon (Durie and Salmon, 1975) die Stadieneinteilung zur Einschätzung des Krankheitsverlaufs.

1.4 Möglichkeiten der Tumortherapie

Prinzipiell basiert die Behandlung maligner Tumoren auf drei Säulen: der chirurgischen Behandlung, der Strahlentherapie sowie der medikamentösen Therapie. Bei der medikamentösen Behandlung von Tumorerkrankungen kommen in der so genannten Chemotherapie zellschädigende (zytotoxische) Substanzen zur Anwendung. Bei der Entwicklung weiterer Therapieansätze spielt neuerdings die gezielte Beeinflussung spezifischer zellulärer Funktionen bzw. Signaltransduktionswege (*targeted Therapy*) eine wichtige Rolle. Die Behandlungsmethoden können mit unterschiedlicher Zielsetzung erfolgen. In der adjuvanten Therapie werden Medikamente unterstützend eingesetzt, um nach vollständiger, meist operativer Tumorentfernung, das Risiko eines Rezidivs zu verringern. Bei der präoperativen oder neoadjuvanten Therapie (oft in Kombination mit einer Strahlentherapie) wird das Ziel verfolgt, den möglicherweise nicht operablen Tumor zu verkleinern, um ihn anschließend vollständig operieren zu können. Weiterhin unterscheidet man zwischen einer Heilung der Tumorerkrankung (kurative Therapie) oder, wenn diese nicht möglich ist, eine Linderung der tumorbedingten Beschwerden (palliative Therapie). Die Erstlinientherapie stellt bei Patienten mit metastatisierenden Tumorerkrankungen die erste Behandlung mit antineoplastischen Medikamenten dar. In

manchen Fällen kommt es nach der Erstlinientherapie zu einem Fortschreiten der Tumorerkrankung. Danach setzt die Folge- bzw. Zweitlinientherapie mit einer weiteren medikamentösen Behandlung ein.

1.5 Konventionelle Chemotherapie

Bei der Chemotherapie werden Medikamente eingesetzt, die das Tumorwachstum auf unterschiedliche Weise hemmen können. Die verwendeten Medikamente (Zytostatika) werden entweder synthetisch hergestellt oder sind Abkömmlinge von natürlich vorkommenden Zellgiften. Zytostatika entfalten ihre Wirkung überwiegend im Zellkern, wo sie den natürlichen Zelltod, die Apoptose, der Tumorzellen auslösen. Zytostatika reduzieren pro Therapiezyklus nicht alle Tumorzellen, sondern immer nur einen gewissen Prozentsatz. Deshalb werden sie über mehrere Zyklen verabreicht. Die Behandlungspause dient der Erholung und Regeneration des Normalgewebes. Da Zytostatika besonders auf Zellen wirken, die eine hohe Teilungsrates aufweisen, werden neben Tumorzellen auch gesunde Zellen, die sich häufig teilen, getötet. Deshalb werden bei einer Chemotherapie in erster Linie die Hämatopoese und in zweiter Linie die Schleimhäute und Haarwurzeln geschädigt (Karow T., 1998). Alle Zytostatika besitzen eine sehr geringe therapeutische Breite, wobei die Maximaldosis eines Zytostatikums in der Regel durch die Hämatotoxizität begrenzt wird. Sich teilende Zellen durchlaufen einen Zellzyklus. Dieser besteht aus der G₁-, S-, G₂- und M-Phase. In der G₁-Phase findet die Zelldifferenzierung, in der S-Phase die Verdopplung der DNA und in der G₂-Phase der Übergang zur Teilungsphase, der M-Phase, statt. Bevor die nächste Zellteilung beginnt, verharren gesunde Zellen in der G₀-Phase, in der sie ihre physiologischen Aufgaben erfüllen. Zytostatika greifen entweder während einer bestimmten Phase des Zellzyklus ein (phasenspezifische Zytostatika) oder sie sind in allen Phasen des Zellzyklus wirksam (phasenunspezifische Zytostatika).

Zur ersten Gruppe gehören die Antimetabolite, die Mitosehemmstoffe und die Topoisomerase-Hemmstoffe. Antimetabolite, wie z.B. Methotrexat (Folsäureanaloga), Fluoruracil (Pyrimidinanaloga) und 6-Mercaptopurin (Purinanaloga), werden auf Grund ihrer Strukturähnlichkeit mit Nukleotiden in die DNA eingebaut und hemmen dadurch die Nukleotidbiosynthese. Mitosehemmer wie Vinblastin binden entweder an Tubulin, wodurch die Ausbildung der Mikrotubuli gestört wird, oder sie verhindern die Depolymerisation der Mikrotubuli (Paclitaxel). Die Hemmung der Enzyme Topoisomerase I und II durch Irinotecan, Etoposid und zytostatisch wirksame Antibiotika wie Doxorubicin

bewirken, dass die DNA bei der Replikation zwar gespalten wird, aber nicht mehr in ihre superhelikale Form überführt werden kann. Infolge von Einzelstrangbrüchen wird die DNA- und RNA-Synthese unterbunden. Diese Zytostatika wirken nur in der S-Phase des Zellzyklus. Um möglichst viele Tumorzellen mit solchen Zytostatika abzutöten, ist es notwendig, die Tumorzellen über einen langen Zeitraum diesen auszusetzen.

Zur zweiten Gruppe, den phasenunspezifischen Zytostatika, gehören die alkylierenden Zytostatika deren Wirkung auf der Alkylierung von Nukleinsäuren beruht. Nach der Aktivierung zum Carboniumion reagieren diese Stoffe mit Proteinen oder Nukleotiden (z.B. Guanin) der DNA und führen zu multiplen DNA-Vernetzungen oder der Spaltung von DNA-Ketten. Die Einteilung dieser Gruppe erfolgt nach Stickstofflost-Derivaten wie Melphalan und Cyclophosphamid als Vertreter, Ethylenimin-Derivate mit Bulsulfan und Treosulfan, Nitroseharbstoffe wie z.B. Carmustin (BCNU) und Platin-Komplexe wie Cisplatin.

Die Medikamente werden in Tablettenform oder als intravenöse Injektion bzw. Infusion verabreicht. Man gibt entweder nur ein Zytostatikum (Monochemotherapie) oder auch geeignete Kombinationen verschiedener Zytostatika (Polychemotherapie). Für eine Reihe von Zytostatika konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung bei der Behandlung zahlreicher Tumore nachgewiesen werden, d.h. je höher die Dosis, desto besser das therapeutische Ansprechen. Aufgrund der erwähnten Hämatotoxizität ist es jedoch nicht möglich, die Dosis ins Unendliche zu steigern. Um höhere Dosen einsetzen zu können, kommt das Prinzip der Hochdosistherapie mit sich anschließender autologer Stammzelltransplantation zum Einsatz. Zytostatika weisen allerdings entscheidende Nachteile auf: Zum einen ist die Therapie mit starken und Dosislimitierenden Nebenwirkungen verbunden. Zum anderen verlieren sie nach mehrmaliger Gabe ihre Wirksamkeit, da die Tumorzellen Resistenzmechanismen entwickeln.

1.6 Resistenzmechanismen

Die Entstehung von Resistenzen gegenüber verabreichten Arzneistoffen stellt ein großes Problem bei der Chemotherapie von malignen Erkrankungen dar.

Unter Multidrug-Resistenz (MDR) versteht man eine Insensitivität oder verringerte Sensitivität gegenüber mehreren Arzneistoffen, die das Zellwachstum verringern oder zum Zelltod führen. Diese kann schon vor der Chemotherapie (intrinsisch) vorliegen oder wird während der Behandlung mit Zytostatika erworben.

Es gibt verschiedene zelluläre Faktoren, die mit der Resistenzbildung assoziiert sind. Zu den Hauptgründen zählen vor allem zelluläre Transporter, die entweder durch Herunterregulierung die Aufnahme des Medikaments verhindern oder durch Überexpression die Substanzen wieder aus der Zelle transportieren, bevor sie an den Ort der Wirkung in der Zelle gelangen können (Bradshaw and Arceci, 1998). Die klassische Definition von MDR wurde etabliert, nachdem die Expression des P-Glycoproteins in verschiedenen Tumorzelllinien durch Exposition mit verschiedenen Zytostatika gesteigert werden konnte (Kartner et al., 1983).

Das P-Glycoprotein (MDR1) wird der Familie der ABC (*ATP-binding-cassette*)-Transportproteine zugeordnet. Der MDR1 (*ABCB1*) Transporter besteht aus zwei homologen Hälften mit jeweils sechs in der Zellmembran verankerten hydrophoben Domänen und einer am hydrophilen Carboxylende intrazellulär lokalisierten ATP-Bindungsstelle. Die beiden homologen Strukturen bilden einen Kanal, durch den Xenobiotika aus den Zellen exportiert werden. Zu den Zytostatika, die für den MDR1 gekoppelten Transport von Bedeutung sind, zählen unter anderem Anthrazyline, Vinca-Alkaloide, Etoposid und Paclitaxel. Zu einem klinisch wichtigen Transporter des Exportsystems, der auch mit der Entwicklung von Multidrug-Resistenzen in Verbindung steht, zählt der MRP1 (*multidrug resistance related protein 1, ABCC1*) (Izquierdo et al., 1996). Dieser Transporter exportiert vorwiegend Produkte des Phase-II- Metabolismus wie Sulfat- oder Glutathion-Konjugate aber auch nichtkonjugierte hydrophobe Arzneimittel wie Vincristin oder Doxorubicin (Borst et al., 2000). Im Gegensatz zum MDR1 setzt sich der MRP1 aus insgesamt 3 Transmembrandomänen mit zwei ATP-Bindungsstellen zusammen. Weiterhin spielen physiologische Detoxifikationsmechanismen, wie Glutathion-S-Transferasen (GST) und Metallothionine eine wichtige Rolle bei einer erhöhten Zytostatika-Eliminierung aus der Zelle. GST übertragen Glutathion auf Zytostatika wie z.B. Melphalan und Chlorambucil (siehe Kapitel 1.7.3). In manchen Fällen konnte in Tumorzelllinien eine direkte Korrelation zwischen dem Grad der Resistenz und einer erhöhten zytoplasmatischen GSH-Konzentration (Suzukake et al., 1983; Qian et al., 1996) sowie einer gesteigerten Expression der GST (Lewis et al., 1989; Hao et al., 1994) nachgewiesen werden. Aber auch ein Zusammenspiel der Expression von GST und dem Konjugat-Efflux-Transporter (MRP1), kann für die Entstehung von Resistenzen wichtig sein (Morrow et al., 1998a; Morrow et al., 1998b).

1.7 Das Zytostatikum Melphalan

Melphalan enthält in der Molekülstruktur zwei funktionelle Komponenten, zum einen die Aminosäure Phenylalanin und zum anderen das als Kampfgas (Senfgas) bekannte Stickstoff-Lost (Abbildung 1.2). Melphalan wurde 1953 mit dem Ziel synthetisiert, ein Zytostatikum zu erhalten, welches bevorzugt in Melanomzellen penetriert, da man mit dem Phenylalanin einen wichtigen Bestandteil der Melaninsynthese erkannt hatte (Bergel, 1953; Bergel, 1954). Die erhoffte selektive Wirkung auf Melanomzellen blieb jedoch aus. Mittlerweile hat das Zytostatikum einen festen Platz in der Behandlung des multiplen Myeloms, weiterer B-Zell- Lymphome sowie beim Mamma- und Ovarialkarzinom eingenommen.

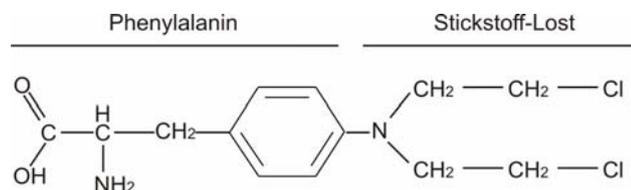


Abbildung 1.2: Strukturformel des Melphalans (N,N-bis-(2-chlorethyl)-Phenylalanin).

Das Zytostatikum Melphalan (Alkeran[®], L-PAM, L-Phenylalanin-mustard) gehört zur Gruppe der Alkylantien. Als zellzyklusphasenunspezifisch angreifende Substanz beruht seine zytotoxische Wirkung auf einer durch Alkylierung bedingten Störung der DNA- und RNA-Synthese. Dabei reagiert es über die beiden Chlorethylgruppen des N-Lostteils, als eine bifunktionelle alkylierende Verbindung (siehe Abbildung 1.3). Nach innermolekularer Umlagerung über die Stufe eines reaktiven Aziridiniumions entsteht ein Carboniumion, das als stark elektrophiles Alkylans mit dem Stickstoff des Guanins (N7), des Adenins (N1, N3, N7), des Cytosins (N3) oder Thymidins (N8) oder in Konkurrenz mit der Thiolgruppe des reduzierten Glutathions reagieren kann. Auf diese Weise entstehen DNA-Inner- und Intrastrangvernetzungen sowie DNA-Proteinverknüpfungen, die eine veränderte Basenstapelung, Basenverluste und Strangbrüche hervorrufen. Als Folge kommt es zu einer Behinderung der DNA-Replikation und Transkription (Brookes and Lawley, 1961; Ross et al., 1978; Vistica, 1979; Brox et al., 1980; Osborne and Lawley, 1993). Der Phenylalaninrest am Stickstoff-Lostmolekül unterdrückt allerdings die Tendenz zur Ausbildung eines Carboniumions und führt zu einer weniger stark ausgeprägten Reaktionsfähigkeit des Melphalans, verglichen zum Stickstoff-Lost (Ross et al., 1978).

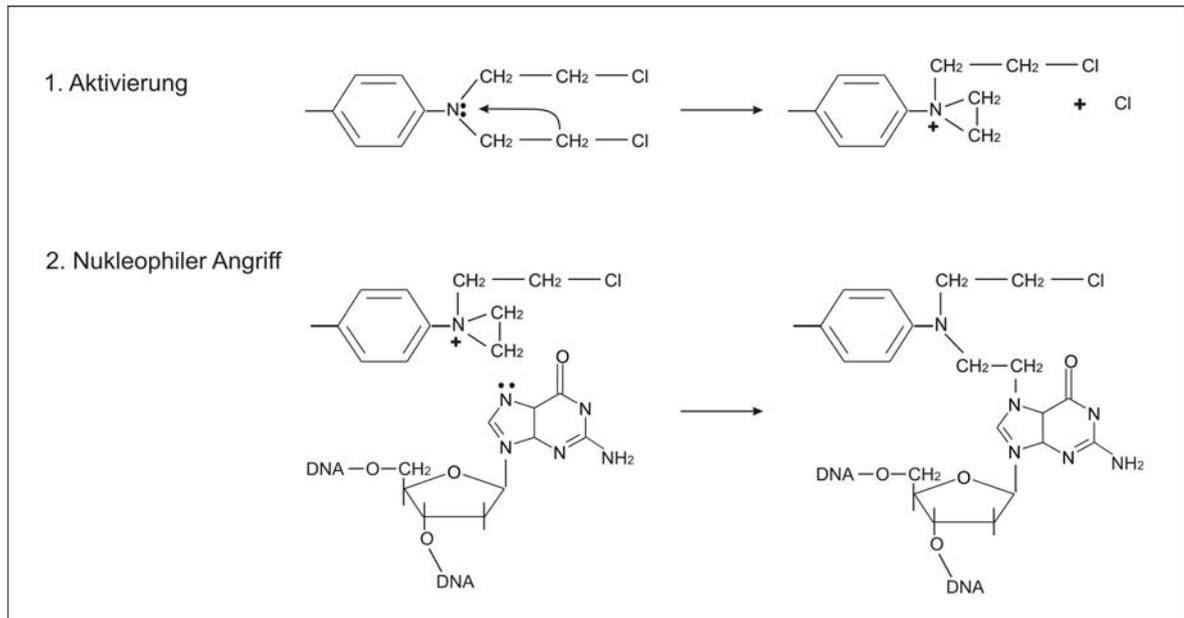


Abbildung 1.3: Reaktionsmechanismus von Melphalan (N,N-bis-(2-chlorethyl)-Phenylalanin).

1.7.1 Therapie mit Melphalan

In der Erstlinientherapie des Multiplen Myeloms (MM) ist Melphalan das Mittel der Wahl. Als Standardtherapie wird Melphalan (15 mg/m², intravenös) in Kombination mit Prednisolon in mehreren Zyklen nach dem Therapieschema von Alexanian eingesetzt (Alexanian and Dimopoulos, 1994). Bei ungefähr 40% der Patienten, die nach diesem Schema behandelt wurden, kommt es zu einer Remission der Krankheit. Wobei die mittlere Dauer der Remission 2 Jahre und das mittlere Überleben ungefähr 3 Jahre beträgt. Weniger als 10% der betroffenen Patienten überleben länger als 10 Jahre (Alexanian et al., 1969; McLaughlin and Alexanian, 1982). Probleme bei der Behandlung des Multiplen Myeloms liegen entweder in der Entstehung einer Resistenz oder der Entwicklung einer sekundären Tumorerkrankung (Alexanian and Dimopoulos, 1994). Durch Kombination von Vincristin, Doxorubicin und Dexamethason (VAD) zur Behandlung von Patienten mit MM in der Erstlinientherapie stieg die Ansprechrate im Vergleich zum Schema von Alexanian um 15%. Weder die Remission noch das Überleben mit VAD konnten verbessert werden (Samson et al., 1989; Alexanian et al., 1990; Monconduit et al., 1992). Dieses VAD-Schema findet aber bei Patienten mit einem Rezidiv Anwendung, wobei die Remission bei 40% lag und bei 25%, wenn vorher eine Resistenz nach der Erstlinientherapie vorlag (Barlogie et al., 1984). Begleitend zur Chemotherapie wird die Strahlentherapie vorwiegend eingesetzt, um Knochenschmerzen zu lindern und Knochenbrüche zu vermeiden (Alexanian and Dimopoulos, 1994).

Eine weitere Möglichkeit der Behandlung bietet die Hochdosis-Chemotherapie (140 mg/m² Mephalan) mit anschließender Stammzelltransplantation. Bei Patienten unter 60 Jahren mit progredientem Multiplen Myelom des Stadiums II und III (Durie and Salmon, 1975) betrug die 5-Jahres-Überlebensrate in der Hochdosisgruppe 52% im Vergleich zu 12% in der konventionell behandelten Gruppe (Attal et al., 1996). Auch das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben war in der Hochdosisgruppe besser (Child et al., 2003). Steigende Melphaladosen (100 mg/m², 140 mg/m², 200 mg/m², 220 mg/m²) gehen im Durchschnitt auch mit einer zunehmenden Wirksamkeit einher (Moreau et al., 1999). Jedoch kommt es dabei auch zu einer Steigerung der Therapie-assoziierten Toxizitäten wie Mukositis, Diarrhöe und Myelosuppression. Weiterhin wird Melphalan im Rahmen einer Zweitlinientherapie zur Behandlung maligner Lymphome wie Hodgkin und Non-Hodgkin Lymphomen und bei einigen soliden Tumorerkrankungen wie Mamma- und Ovarialkarzinom eingesetzt. Dabei wird Hochdosis-Melphalan mit weiteren Zytostatika, wie BCNU, Etoposid und Cytarabin, nach dem so genannten BEAM-Schema kombiniert oder das so genannte MOPP Schema (Melphalan, Vincristin, Procarbazine und Prednisolon) wird angewendet (Mills et al., 1995a; Mills et al., 1995b; Jantunen et al., 2003).

Die häufigsten Nebenwirkungen unter der Therapie mit Melphalan sind Myelotoxizität, Übelkeit und Erbrechen sowie Diarrhöe und Mukositis. Die therapiebezogene Mortalität bei Patienten mit Multiplen Myelom liegt zwischen 8-20%, zumeist als Folge einer Sepsis. Die Knochenmarkssuppression ist die wesentlichste dosislimitierende Nebenwirkung des Melphalans. Dosissteigerungen über 220 mg/m² sind aufgrund der mukosalen Toxizität nicht möglich. Die Ursachen dieser Nebenwirkungen können unmittelbar mit der zellulären Aufnahme (siehe Kapitel 1.7.5) und mit der Detoxifizierungskapazität durch Konjugation mit Glutathion zusammenhängen (siehe Kapitel 1.7.3).

1.7.2 Pharmakokinetik von Melphalan

Die Pharmakokinetik behandelt die quantitative Analyse der Verteilung und Umsetzung von Arzneistoffen im Organismus und in seine Kompartimente wie Blut und Gewebe. Durch experimentelle Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Konzentrationsänderung in Abhängigkeit von der Dosis und der Art der Applikation können in Verbindung mit der Pharmakogenetik Dosierungsvorschläge entwickelt werden. Der Verlauf der Konzentration resultiert aus einem Zusammenspiel von verschiedenen Prozessen im Organismus wie Absorption, Verteilung und Elimination. Zur Beschreibung der Pharmakokinetik von

Arzneistoffen dient die Bestimmung des Verteilungsvolumens, der Clearance, der Halbwertszeit und der Bioverfügbarkeit als pharmakokinetische Parameter.

Die Pharmakokinetik des Melphalans wurde in einigen Studien mit 5 bis 26 Patienten charakterisiert (Bosanquet and Gilby, 1982; Reece et al., 1988; Kergueris et al., 1994; Moreau et al., 1996; Pinguet et al., 1997; Mougenot et al., 2004). Dabei zeigte sich eine sehr variable Pharmakokinetik sowohl nach oraler als auch intravenöser Gabe des Melphalans. Nach oraler Verabreichung von Melphalan wurden große inter- und intraindividuelle Schwankungen in der Bioverfügbarkeit zwischen 25% und 95% beobachtet (Alberts et al., 1979a; Bosanquet and Gilby, 1982). Diese Schwankungen in der systemischen Verfügbarkeit lassen sich auf Resorption, Ausmaß der Proteinbindung (Greig et al., 1987) sowie renale Elimination (Osterborg et al., 1989) zurückführen. Zusätzlich hängt die Absorption davon ab, ob Melphalan zusammen mit der Nahrung oder auf nüchternen Magen genommen wird. Zwei Arbeiten zeigten, dass die AUCs (*area under the curve*) um 39% und 54% sanken, nachdem die Patienten das Melphalan zusammen mit dem Essen aufgenommen hatten (Bosanquet and Gilby, 1984; Reece et al., 1987).

Um mit einer höheren Plasmakonzentration von Melphalan ein optimales Ansprechen auf die Therapie zu gewährleisten, wird häufig von einer oralen Melphalangabe abgesehen und die intravenöse Verabreichung bevorzugt (Alberts et al., 1979a; Alberts et al., 1979b). Aus bisher unbekanntem Gründen bestehen auch bei der intravenösen Gabe ebenso große interindividuelle Schwankungen für die pharmakokinetischen Parameter Bioverfügbarkeit, Clearance, Halbwertszeit und Verteilungsvolumen (siehe Tabelle 1.2). Pinguet et al., 1997 untersuchten die Pharmakokinetik von 20 Patienten, die zur Krebsbehandlung eine Hochdosis-Therapie mit anschließender Stammzelltransplantation erhielten. Nach einer Dosis von 140 mg/m² streute die terminale Halbwertszeit ($t_{1/2\beta}$) zwischen 52 und 168 min und das Verteilungsvolumen zwischen 10-32 L/m² (Pinguet et al., 1997). Die Melphalanclearance schwankte um den Faktor 5 zwischen 127-797 mL/min/m². Pharmakokinetische Untersuchungen von Moreau et al., 1996 ergaben bei einer Melphalاندosis von 220 mg/m² eine $t_{1/2\beta}$, die zwischen 23-60 min (mittlere $t_{1/2\beta}$, 46 min) lag und eine Melphalanclearance, die im Bereich zwischen 170-600 mL/min/m² schwankte. In einer Studie mit einer Melphalاندosis von 5 mg/m² lag die totale renale Clearance für Melphalan zwischen 66 und 272 mL/min/m² und der Anteil des unverändert renal ausgeschiedenen Melphalans zwischen 2,5 und 93% (Reece et al., 1988).

Tabelle 1.2: Zusammenfassung der pharmakokinetischen Parameter nach intravenöser Gabe von 5, 140 und 220 mg/m² Melphalan.

Autor und Jahr	Dosis mg/m²	AUC [mg/L*min]	V_{ss} [L/m²]	Clearance [mL/min/m²]
Reece et al. 1988	5		4-15	60-270
Pinguet et al. 1997	140	160-700	10-32	130-800
Moreau et al. 1996	220	390-1100	6-20	170-600

Abkürzungen: AUC = Integral der Konzentrations-Zeit-Kurve, V_{ss} = Verteilungsvolumen im steady state.

1.7.3 Biotransformation des Melphalans durch Glutathion-S-Transferasen

In wässriger Lösung ist Melphalan wenig stabil. Nach innermolekularer Umlagerung über die Stufe eines reaktiven Azidiridiumions entsteht ein Carboniumion das als stark elektrophiles Alkylans mit nukleophilen Substanzen reagieren kann (siehe Abbildung 1.3). Durch Hydrolyse, d.h. Chloridatome werden durch Hydroxylgruppen ersetzt, entsteht das nicht zytotoxisch wirksame Monohydroxymelphalan und Dihydroxymelphalan (Flora et al., 1979; Gouyette et al., 1986). Weiterhin stehen die Chloridatome in Konkurrenz mit der Thiolgruppe des reduzierten Glutathions (Ross et al., 1978; Brox et al., 1980). Dabei reagiert das Melphalan mit dem Tripeptid γ -Glutamylcysteinylglycin (Glutathion, GSH) zu den Produkten Mono-GSH-Melphalan, Mono-OH-Mono-GSH-Melphalan oder Di-GSH-Melphalan (Suzukake et al., 1983; Rothbarth et al., 2002). Diese Konjugation wird durch die verschiedenen Klassen (α (GSTA), π (GSTP) und μ (GSTM)) der Glutathion-S-Transferasen (GST) katalysiert (Bolton et al., 1991; Mannervik et al., 1992; Hall et al., 1994; Awasthi et al., 1996). Weiterhin gibt es noch die Klassen ω (GSTO), θ (GSTT) und ζ (GSTZ), die aber nicht an der Konjugationsreaktion von Melphalan beteiligt sind. Die Inaktivierung des Melphalans durch die Konjugation mit Glutathion stellt einen molekularen Mechanismus zur Entwicklung einer Zytostatika-Resistenz dar (siehe Kapitel 1.6). Leukämie-Zellen mit einer Resistenz gegenüber Melphalan besitzen nicht nur eine deutlich erhöhte GSH Konzentration sondern auch eine gesteigerte Expression der Glutathion-S-Transferasen (A) als Melphalan sensitive Zellen (Suzukake et al., 1983; Qian et al., 1996).

Klinisch relevante Polymorphismen konnten bisher in den GST der Klasse M, T und P beschrieben werden. Der komplette Verlust der GSTM1 und GSTT1 Enzymaktivität wird durch einen homozygoten Deletionspolymorphismus hervorgerufen und konnte bei 20% bzw. 50,7% kaukasischer Patienten nachgewiesen werden (Seidegard et al., 1988; Brockmoller et al., 1994; Pemble et al., 1994; Brockmoller et al., 1996). Weiterhin wird

Melphalan durch die Glutathion-S-Transferase GSTP1 konjugiert (Awasthi et al., 1996). In diesem Gen führen zwei Aminosäureaustausche Ile105Val und Ala114Val zu einer verminderten Enzymaktivität (Zimniak et al., 1994; Watson et al., 1998). Diese Polymorphismen können direkt in Verbindung mit der Entwicklung von Nebenwirkungen in der Therapie mit Melphalan stehen.

1.7.4 Transportmechanismen durch biologische Membranen

Die meisten Arzneistoffe müssen zelluläre Barrieren überwinden, um an den Ort der Wirkung zu gelangen. Neben der einfachen Diffusion gibt es auch erleichterte Diffusion ohne Energieverbrauch in Richtung des Konzentrationsgradienten. Der Transport des Moleküls findet in diesem Fall durch reversible Bindung an ein membranständiges Transportprotein (Carrier) statt und ist im Gegensatz zur einfachen Diffusion sowohl hemm- als auch sättigbar. Gegen ein Konzentrationsgefälle können Moleküle Membranen nur durch aktive Transportsysteme überwinden. Die notwendige Energie wird durch elektrochemische Gradienten oder durch Hydrolyse von ATP bereitgestellt. Größere Moleküle wie Proteine oder Antigene werden durch vesikulären Transport in die Zelle aufgenommen.

Der Membrantransport über aktive Transportsysteme spielt eine große Rolle bei der Aufklärung von interindividuellen Schwankungen in der Pharmakokinetik (siehe Kapitel 1.7.2) und Resistenzmechanismen (siehe Kapitel 1.6) von Arzneistoffen. Transporter für Medikamente werden in verschiedenen Geweben wie z.B. Magen, Darm, Gehirn, Leber und Niere exprimiert, wo sie einen großen Einfluss auf die Absorption, Verteilung, Elimination und damit auch auf die Wirkung von Arzneistoffen haben. Die Charakterisierung der Transporter nach Funktion und Substratspezifität erfolgt anhand von *in vitro* und *in vivo* Experimenten in Zellsystemen, die den Transporter überexprimieren oder anhand von Tiermodellen mit so genannten *Knockout* Mäusen. Weiterhin geben Gewebeverteilung und Expressionsstärke der Transporter eine wichtige Information über eine mögliche Vorhersage der Pharmakokinetik für einen bestimmten Arzneistoff. Verschiedene Faktoren können einen Einfluss auf die Expression und Funktion eines Transporters haben. Dazu gehören, genetische Mutationen, SNPs, Spleißen, transkriptionelle Regulierung, mRNA Stabilität und posttranslationale Modifikationen. Von großer klinischer Bedeutung ist hierbei die Pharmakogenetik (siehe Kapitel 1.1) von Transportern, um die interindividuelle Variabilität in der Pharmakokinetik von Medikamenten zu erklären.

1.7.5 Membrantransport von Melphalan

Das Zytostatikum Melphalan wird über Heterodimere Na^+ -unabhängige Aminosäuretransporter aufgenommen. (Vistica et al., 1978; Vistica, 1979; Vistica and Rabinovitz, 1979; Vistica, 1983). Heterodimere Aminosäuretransporter werden nach ihrer Substratspezifität und Na^+ -Abhängigkeit in verschiedene *Solute-Carrier* (SLC)-Transporterfamilien eingeordnet. Zur *Solute-Carrier*-Familie zählen insgesamt 225 verschiedene Transporter. Die meisten sind hoch spezialisiert und vermitteln erleichterten Transport von essentiellen Nährstoffen wie Glukose, Aminosäuren, Fettsäuren und Nukleosiden. Darunter gibt es drei Na^+ -abhängige Familien (*SLC1*, *SLC6*, *SLC38*) und zwei Na^+ -unabhängige Familien (*SLC7*, *SLC16*) (Kanai and Endou, 2001). Na^+ -unabhängige Aminosäuretransportsysteme, die bevorzugt große neutrale Aminosäuren transportieren, wurden erstmals von Oxender und Christensen 1963 charakterisiert (Oxender and Christensen, 1963).

In den Jahren 1998 und 1999 wurden zwei Heterodimere Transporter identifiziert und dem Na^+ -unabhängigen L System zugeordnet (Kanai et al., 1998; Pineda et al., 1999). Diese Aminosäuretransporter bestehen aus einer 12 transmembrandurchspannenden katalytischen Untereinheit, der so genannten leichten Ketten LAT1 oder LAT2 (siehe Abbildung 1.4) (Verrey et al., 1999; Verrey et al., 2000). Zur funktionellen Expression benötigen LAT1 und LAT2 die schwere Kette des als Zelloberflächen-Antigen identifizierten CD98^+ (4F2). Das 4F2hc (4F2 heavy chain) ist ein integrales Membranprotein mit einer membrandurchspannenden Domäne und bildet als Glycoprotein (Typ II) über eine kovalente Disulfidbrücke einen heterodimeren Komplex mit LAT1 oder LAT2 (Abbildung 1.4). (Kanai et al., 1998). Die Bedeutung der schweren Kette ist bisher noch nicht hinreichend aufgeklärt. Es wird jedoch vermutet, dass 4F2hc mit an dem Transport der leichten Ketten zur Plasmamembran beteiligt ist. Die leichte Kette ist für die Erkennung und den Transport von Substraten verantwortlich (Wagner et al., 2001). Die Disulfidbrücke zwischen der leichten und schweren Kette hat weder einen Einfluss auf die Ausübung der Transportfunktion noch ist sie für den Transport der schweren Kette (4F2hc) zur Membran verantwortlich (Pfeiffer et al., 1998; Nakamura et al., 1999).

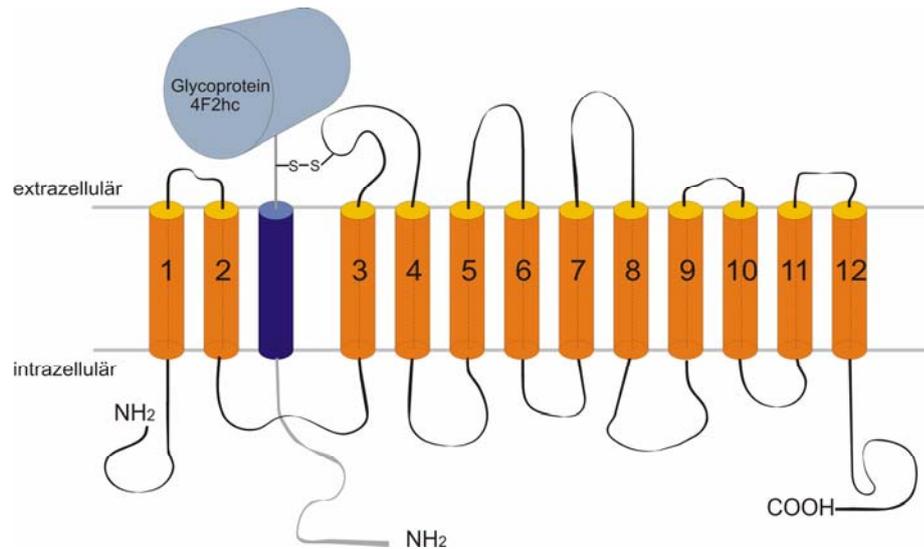


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung eines Heterodimeren Aminosäuretransporters. Die leichte Kette (LAT1 oder LAT2) ist mit dem Glycoprotein 4F2hc über eine Disulfidbrücke verbunden (Verrey et al., 2004).

Funktionelle Untersuchungen anhand von Expressionssystemen zeigten, dass es sich bei LAT1-4F2hc und LAT2-4F2hc um obligatorische Aminosäureaustauscher handelt, die sich in ihrer Substratspezifität und Gewebeexpression unterscheiden (siehe Tabelle 1.3).

LAT2-4F2hc transportiert sowohl kleine als auch große neutrale Aminosäuren (Pineda et al., 1999; Rossier et al., 1999; Segawa et al., 1999), wohingegen LAT1-4F2hc mit einem kleineren Substratspektrum vorwiegend große neutrale Aminosäuren mit verzweigten oder aromatischen Seitenketten wie Leucin, Isoleucin, Valin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Methionin, Histidin transportiert (Kanai et al., 1998).

Gewebeexpression und subzelluläre Lokalisierung der beiden Transporter weisen auf eine unterschiedliche funktionelle Rolle hin. LAT1 wird ubiquitär exprimiert und ist für die Versorgung von proliferierenden Geweben und Tumorzellen mit Aminosäuren verantwortlich (Nakamura et al., 1999; Campbell et al., 2000). Im Vergleich dazu wird LAT2 in Geweben mit epithelial Schranken wie den (re)-absorbierenden Epithelialzellen des Dünndarms und proximalen Nierentubulus-Zellen sehr stark exprimiert (Pineda et al., 1999; Rossier et al., 1999; Segawa et al., 1999).

Dabei wird vermutet, dass LAT2-4F2hc Aminosäuren vom extrazellulären Raum gegen andere extrazelluläre Aminosäuren austauscht. Parallel dazu existiert ein unidirektionales Transportsystem (TAT1, *SLC16A10*) als Recycling, dass die Aminosäuren wieder in den extrazellulären Raum zurück transportiert (Verrey et al., 1999; Verrey et al., 2000; Kim et al., 2001; Meier et al., 2002). Expressionsuntersuchungen von LAT1-4F2hc und LAT2-4F2hc in *Xenopus laevis* Oozyten zeigten, dass beide Transporter obligatorisch

Aminosäuren im Verhältnis 1:1 austauschen. Weiterhin wird der Influx-Transport durch das Angebot intrazellulärer Aminosäuren limitiert (Meier et al., 2002).

Aufgrund der breiten Substratspezifität spielen die L-Typ Aminosäuretransporter eine große Rolle bei dem Transport von Medikamenten mit einer Aminosäure-ähnlichen Struktur wie z.B. L-Dopa (Parkinson-Medikament), Schilddrüsenhormone (T3, T4) und Melphalan. Für das Zytostatikum Melphalan wurde bisher nur über Hemmung der Leucin-Aufnahme in *Xenopus* Oozyten der LAT1-4F2hc Transporter experimentell nachgewiesen (Uchino et al., 2002). Ob der LAT2 oder weitere Aminosäuretransporter wie der TAT1 an dem Transport von Melphalan beteiligt sind, wurde bisher nicht weiter untersucht.

Tabelle 1.3: Na⁺-unabhängige L-Typ und T-Typ Aminosäuretransporter.

Transporter	Gewebeverteilung	Substrate
LAT1-4F2hc	Gehirn, Ovarien, Testes, Plazenta, Blut-Hirn-Schranke, aktivierte Lymphozyten, Tumorzellen	große neutrale Aminosäuren, z.B. Leucin, T3, T4, L-Dopa, BCH
LAT2-4F2hc	Dünndarm, Niere, Plazenta, Ovarien, Testis, Gehirn, Skelettmuskel, basolaterale epitheliale Zellen	große und kleine Aminosäuren, z.B. Phenylalanin, BCH
TAT1	Niere, Skelettmuskel, Plazenta, Herz	z.B. aromatische Aminosäuren und L-Dopa

1.8 Aufgabenstellung

Das Zytostatikum Melphalan wird erfolgreich in der Therapie des Multiplen Myeloms eingesetzt. Dabei wird eine erhebliche interindividuelle Variabilität in der Pharmakokinetik von Melphalan nach intravenöser Gabe beobachtet, deren Ursache bislang unklar ist. Von großer Bedeutung könnten hier erbliche Polymorphismen sein, die die Pharmakokinetik, die Wirkungen und die Nebenwirkungen des Melphalans beeinflussen könnten.

Die Struktur von Melphalan legt die Bedeutung von Aminosäuretransportern nahe und zu genetischen Polymorphismen in diesen Transportproteinen gab es zu Beginn der Arbeit kaum Daten. Im ersten Teil der Arbeit sollte der Einfluss genetischer Polymorphismen in den Genen von Aminosäuretransportern und Phase-II-Enzymen auf die interindividuelle variable Pharmakokinetik und Nebenwirkungen des Melphalans untersucht werden. Anhand der Daten einer klinischen Assoziationsstudie sollten dazu folgende Punkte bearbeitet werden:

- Identifizierung funktionell bedeutsamer Polymorphismen in beiden Aminosäuretransportern LAT1-4F2hc und LAT2-4F2hc mittels Sequenzanalyse.
- Genotypisierung bereits bekannter klinisch relevanter Polymorphismen in den Glutathion-S-Transferasen.
- Korrelation der Genotypen mit den pharmakokinetischen Parametern und mit den Nebenwirkungen des Melphalans.
- Einfluss der Promotorvarianten auf die Expression der beiden Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2.

Im Hauptteil der vorliegenden Arbeit sollte der Membrantransport von Melphalan über die beiden Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2 unter Anwendung folgender Techniken charakterisiert werden.

- Hemmung durch bekannte Substrate oder Inhibitoren der jeweiligen Transporter
- Herunterregulierung der Transportergene mittels siRNA-Technik
- Expression der Transporter in Oozyten

Entscheidend für die Wirkung bzw. Nebenwirkungen eines Zytostatikums ist nicht nur der Transporter alleine, sondern auch die Expression der Transporter in dem entsprechenden Zielgewebe bzw. der Tumorzelle. Zum Abschluss der Arbeit sollte mit dem Fokus auf Multiple Myelom-Zelllinien, die Variabilität der Zytotoxizität und intrazellulären Akkumulation von Melphalan im Zusammenhang mit der Expression verschiedener Transportsysteme untersucht werden. Auch diese Experimente sollten dazu dienen, die für die Melphalanwirkungen relevanten Transporter zu identifizieren, um gegebenenfalls deren Pharmakogenetik weiter analysieren zu können.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
1 kb DNA-Größenstandard für Agarosegel	Rapidozym, Berlin
100 bp DNA-Größenstandard für Agarosegel	Rapidozym, Berlin
10fach Puffer für Sequenzer	Applied Biosystems, Darmstadt
2-Aminobicyclo[2,2,1]Heptan-2-Carboxylsäure (BCH)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
40% (w/v) Acryamid/ Mix 37,5:1	Biomol, Hamburg
Acrylamidlösung wässrig 40% (w/v)	Biomol, Hamburg
Agar (für die Bakteriologie)	AppliChem, Darmstadt
Agarose Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumperoxiddisulfat $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin min. 99%	AppliChem, Darmstadt
Bicinchoninic Säure (BCA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Borsäure 100%	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau Na-Salz (für die Elektrophorese)	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid $\geq 99,5\%$	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid-Dihydrat zur Analyse	Merck, Darmstadt
Chinidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chinin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloramphenicol $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloroform $\geq 99,8\%$	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Ciclosporin A	Novartis, Nürnberg
Coomassie [®] Brilliant Blue R 250	BioRad, München
dATP	ABgene, Hamburg
Dimethylsulfoxid $\geq 99,5\%$	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat $\geq 99,9\%$	Merck, Darmstadt
Disopyramid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dithiothreitol $\geq 99,5\%$ (für die Molekularbiologie)	AppliChem, Darmstadt
dNTP Set	ABgene, Hamburg
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
EDTA 0,5 M in wässriger Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
EDTA reinst	Merck, Darmstadt
Entwickler G150	AGFA, Leverkusen
Essigsäure 100%, pro analysis	Merck, Darmstadt
Ethanol 96%	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Ethanol vergällt 99% (Desinfektionsmittel)	GeReSo mbH, Einbeck
Ethidiumbromid 1% in H ₂ O (für die Elektrophorese)	Merck, Darmstadt
<i>Expand Long Template</i> PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
Ficoll Puffer Typ 400	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Fixierer G354	AGFA, Leverkusen

Chemikalien	Hersteller
Fötales Kälberserum	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
GeneScanLIZ120 Längenstandard für <i>SNaPshot</i> TM	Applied Biosystems, Darmstadt
Gentamicinsulfat A1492	AppliChem, Darmstadt
Glukose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Glycerin 85 %	Zentralapotheke, Klinikum Göttingen
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt
Helipur® H plus N Desinfektionsmittel	Braun, Melsungen
HEPES 99,5%	Appllichem, Darmstadt
Isoamylalkohol 98%	Schuchardt, Hohenbrunn
Isopropanol ≥ 99,9%	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat ≥ 99%	Riedel-De Haën AG, Seelze
Kaliumchlorid ≥ 99,5%	Riedel-De Haën AG, Seelze
Kaliumdihydrogenphosphat 100%	Merck, Darmstadt
Kanamycin ≥ 750 U/mg	AppliChem, Darmstadt
KOD HiFi DNA Polymerase	Novagen Merck, Darmstadt
Kupfersulfat-Pentahydrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Alanin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Histidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Leucin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Methionin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Serin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LumaSafe, Szintillationsflüssigkeit	Perkin Elmer, Massachusetts, USA
Magermilchpulver	Real, Göttingen
Magnesiumchlorid 99%	Riedel-De Haën AG, Seelze
Magnesiumsulfat ≥ 99,5%	Merck, Darmstadt
Melphalan	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Metformin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methanol zur Analyse	Merck, Darmstadt
Mineralöl für molekularbiologische Anwendungen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Na-deoxycholate D670	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid 100%	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Natriumdihydroxyphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen reinst	Merck, Darmstadt
Natriumnitrat	Merck, Darmstadt
Neodisher® A 8, Reinigungspulver	Chem. Fabrik Dr. Weigert, Mühlenhagen
Nonidet®P40 Substitute (Nonylphenylethylenglycol)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>ortho</i> -Phosphorsäure 85%	Merck, Darmstadt
PBS Pulver (Dulbeccos 1fach)	AppliChem, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe

Chemikalien	Hersteller
Phenylmethylsulfonyl (PMSF) $\geq 98,5\%$	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Poly-D-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Polymer POP7 für Sequenzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Probenecid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>Random Hexamer</i> (dN6) Primer	Roche, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RNAguard Ribonuklease Inhibitor (30 U/ μ L)	Amersham, Freiburg
RNase A $\sim 70\%$	AppliChem, Darmstadt
RnaseZap	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RPMI Medium 1640	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure 1 M	Merck, Darmstadt
SeeBlue [®] Plus2 Prestained Standard (LC5925)	Invitrogen, Karlsruhe
Sephadex [™] G-50 Superfine	Amersham, Freiburg
Siliconöl Dowcorning 200/1cs	Muster der Firma Dow Corning GmbH, Wiesbaden
Siliconöl Dowcorning 550	Muster der Firma Dow Corning GmbH, Wiesbaden
<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (SDS)	BioRad, München
<i>Super Script II</i> Reverse Transkriptase (200 U/ μ L)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
TEMED $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tetraethylammoniumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Thiazolylblau Tetrazoliumbromid (MTT-Lösung)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris 100%	Roth, Karlsruhe
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TrypLE [™] Express	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Trypton	AppliChem, Darmstadt
Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbit-Monolaurat)	BioRad, München
Wasser DNase und RNase-frei	Gibco, Karlsruhe

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Lieferant/Hersteller
<i>Adhesive</i> PCR-Folie zum Ableben der Mikrotiterplatten	ABgene, Hamburg
Costar [®] Mikrotiterplatten 96 Well	Corning, NY, USA
Dialysefilter, 0,025 μ m Porendurchmesser, VSWP01300	Millipore, Schwalbach
Elektroporationskuvette	PeqLab, Erlangen
Elektroporationskuvetten 2 mm	PreLab, Erlangen
Filterpapier Nr. 2668	Schleicher und Schuell,
Filterpapier Nr. 2CHR	Schleicher und Schuell
Filterplatte 96 Well, MANU 030, 96-Well	Millipore, Schwalbach
Filterplatte MAHV-N45, 96 Well	Millipore, Schwalbach
Flat cap strips, 8er, Deckel	ABgene, Hamburg
Glas Pasteur Pipetten 230 mm	WU, Mainz

Verbrauchsmaterialien	Lieferant/Hersteller
Glaskapillaren, 3,5 nL	WPI World precisions instruments, Sarasota Florida, USA
HPLC-Gewindeflaschen (1,5 ml)	Merck, Darmstadt
HPLC-Mikrogelaseinsätze	Merck, Darmstadt
HPLC-Septen (8 mm Scheiben)	Merck, Darmstadt
Hyperfilm™, MP, ECL-Filme	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Kapillare für 3130xl Genetic Analyser; 50 cm	Applied Biosystems, Darmstadt
Kryo-Röhrchen (2 mL)	Nunc, Wiesbaden
Kulturflaschen 25 cm ² und 75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Küvetten (UVetten) 50-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Küvetten 10x4x45 mm	Sarstedt, Hamburg
LiChrospher® 100 RP-18 (5µm)	Merck, Darmstadt
Lochplatte für Sephadex	Millipore, Schwalbach
Minisart Filter 2000 0,2 µm Porendurchmesser	Sartorius, Göttingen
Nunclon™ Multischalen 6, 12 und 24 Well	Nunc, Wiesbaden
Parafilm	Brand, Wertheim
PCR-Platten 96er	ABgene, Hamburg
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Pipetten sterile (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Platten mit flachem Boden, steril 96 Well	Greiner, Frickenhausen
Platten mit rundem Boden, steril 96 Well	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Polypropylen-Röhrchen sterile 15 ml	Greiner, Frickenhausen
Polypropylen-Röhrchen sterile 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
PVDF-Membran, 0,45 µm Porendurchmesser	Millipore, Schwalbach
Quali-Filterpipettenspitzen steril	Kisker, Steinfurt
Rahmen und Septen für Sequenzierung	Applied Biosystems, Darmstadt
Reaktionsgefäße 0,2 mL steril, RNase frei	Biozym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Szintillationsröhrchen (Mini Vial 6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf
Thermo-Fast 384er Platten	ABgene, Hamburg
Thermo-Fast 96er Platten	ABgene, Hamburg
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Beckman, München

2.3 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme („Kits“)

Kits	Lieferant/Hersteller
BigDye® Terminator v1,1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
EnzCheck® Caspase-2 Assay Kit	Invitrogen, Karlsruhe
EZ1 DNA Blood Kit	Qiagen, Hilden
FuGENE Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim
HiPerFect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
HotStart-IT™ SYBRGreen qPCR MasterMix (2x)	USB, Staufen

Ligate-IT™ Rapid Ligations Kit	USB, Staufen
mMESSAGE mMASCHINE® T7 Ultra Kit	Ambion, Applied Biosystems, Darmstadt
Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden
PureYield™ Midiprep Kit	Promega, Mannheim
Qiaquick® Extraktionskit	Qiagen, Hilden
qPCR® Core Kit (RT-QP73-05)	Eurogentec, Köln
qPCR® Core Kit for SYBR® Green (RT-SN10-15)	Eurogentec, Köln
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
SnapShot™ Multiplex Kit	Qiagen, Hilden
TOPO® XL PCR Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Venor® GeM-Kit	Minerva Biolabs, Berlin
FirstChoice® Human Total RNA Survey AM6000	Ambion, Applied Biosystems, Darmstadt
QuantiTec® Primer Assay (10x) für mRNA Expression:	Qiagen, Hilden
Hs_SLC7A5_1_SGQT00089145 (LAT1)	Qiagen, Hilden
Hs_ABCB1_1_SGQT00081928 (MDR1)	Qiagen, Hilden
TaqMan® Genexpressionsassays (<i>Assay on Demand</i>):	Applied Biosystems, Darmstadt
Hs00185826_m1 (LAT1)	Applied Biosystems, Darmstadt
Hs00794796_m1 (LAT2)	Applied Biosystems, Darmstadt
Hs00374243_m1 (4F2hc)	Applied Biosystems, Darmstadt
Hs00218593_m1 (TAT1)	Applied Biosystems, Darmstadt
Hs00219905_m1 (MRP1)	Applied Biosystems, Darmstadt
Hs00427550_m1 (OCT1)	Applied Biosystems, Darmstadt
Hs00533907_m1 (OCT2)	Applied Biosystems, Darmstadt
Hs00222691_m1 (OCT3)	Applied Biosystems, Darmstadt
4326322E (TBP, VIC-MGB)	Applied Biosystems, Darmstadt

2.4 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Nummer	Zellursprung
HeLa	ATCC	CCL-2	Zervixkarzinom
HEK293	DSMZ	ACC305	embryonale Nierenzellen
CaCo-2	DSMZ	ACC169	Kolon Adenokarzinom
Colo320	DSMZ	ACC144	Kolon Adenokarzinom
HL-60	DSMZ	ACC3	Akute myeloische Leukämie
U-937*	DSMZ	ACC5	
JEKO-1*	DSMZ	ACC553	Mantelzell-Lymphom
MINO*	ATCC	CRL-3000	
GRANTA-519*	DSMZ	ACC342	
SP-53*	DSMZ		
BV-173*	DSMZ	ACC20	Chronisch myeloische Leukämie
LAMA-84*	DSMZ	ACC168	
K-562*	DSMZ	ACC10	
L-1236*	DSMZ	ACC530	Hodgkin-Lymphome
L-428*	DSMZ	ACC197	

Material

KM-H2*	DSMZ	ACC8	
L-591*	DSMZ	ACC602	
L-540*	DSMZ	ACC72	
BL-41**	DSMZ	ACC160	Burkitt Lymphom
BL-2**	DSMZ	ACC 625	
RAMOS	DSMZ	ACC603	
RAJI**	DSMZ	ACC319	
SK-MM-2	DSMZ	ACC430	Multiples Myelom
EJM***	DSMZ	ACC560	
L-363	DSMZ	ACC49	
U-266***	DSMZ	ACC9	
RPMI-8226***	DSMZ	ACC402	
OPM-2***	DSMZ	ACC50	
LP-1***	DSMZ	ACC41	
NCI-H929	DSMZ	ACC163	
SU-DHL-4*	DSMZ	ACC495	Diffuse B-Zell-Lymphome
BALM-3*	DSMZ		
KARPAS-422*	DSMZ	ACC32	

ATCC (Cell Biology Collection, www.lgcpromochem-atcc.com)

DSMZ (Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zellkulturen, www.dsmz.de)

* freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Björn Chapuy, Abteilung Hämatologie und Onkologie, Universität Göttingen

** freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dieter Kube, Abteilung Hämatologie und Onkologie, Universität Göttingen

*** freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Orhan Sezer, Abteilung Hämatologie und Onkologie, Charité' Berlin

2.5 Vektoren und Plasmide

Nummer	Vektoren	Verwendung	Restistenz	Bezug
IRATp970E0255D	pCMVSPORT6::LAT1	Ausgangskonstrukt (komplette cDNA LAT1)	Ampicillin	RZPD, Berlin
IRAU p969F09104	pOTB7::LAT2	Ausgangskonstrukt (komplette cDNA LAT2)	Chloramphenicol	RZPD, Berlin
pCR [®] -XL-TOPO		Zwischenklonierung	Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe
	pcDNA3.1	Expressionsvektor	Ampicillin	Invitrogen, Karlsruhe

2.6 Enzyme

Enzyme	Hersteller
<i>AclI</i>	New England BioLabs, Beverly, MA, USA
<i>BsmAI</i>	New England BioLabs, Beverly, MA, USA
<i>Calf intestinal</i> alkalische Phosphatase	New England BioLabs, Beverly, MA, USA
<i>DpnI</i>	Fermentas, St.Leon-Rot
<i>EcoRI</i>	Fermentas, St.Leon-Rot
Exonuklease I	USB Europe GmbH, Staufien
<i>HindIII</i>	Fermentas, St.Leon-Rot

Enzyme	Hersteller
<i>MspI</i>	Fermentas, St.Leon-Rot
<i>NotI</i>	Fermentas, St.Leon-Rot
<i>Shrimp</i> alkalische Phosphatase	USB Europe GmbH, Staufen

2.7 Geräte

Geräte	Hersteller
3130xl Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
Absaugpumpe Typ N035,3.AN18	Schütt. Göttingen
Autoradiographie-Kassette 2040	Fujix
Autosampler 655-40	Hitachi, Merck, Darmstadt
Bakterieninkubator-Incudrive	Schütt, Göttingen
Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
BioRobot® EZ1	Qiagen, Hilden
Blot-Aparatur	Biometra, Göttingen
Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
CO ₂ -Inkubator Cellsafe	Integra Bioscience, Chur, CH
ComPhor L Mini-Gelkammer (für Elektrophorese)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Elektroporator Gene Pulser II	BioRad, München
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fluor-S™ MultiImager	BioRad, München
Injektionskammer für Oozyten	Werkstatt, vegetative Physiologie, Göttingen
Interface D-6000A	Hitachi, Merck, Darmstadt
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau
Laborfuge 400R	Heraeus, Hanau
Lampe mit Kaltlichtquelle KL1500	Electronic Schott, Landshut
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Microskop Axiovert 40 CFL	Zeiss, Jena
Mikromanipulator	Brinkmann Instrumentenbau, Mannheim
MS 2 Minishaker-Vortexer	IKA, Staufen
MultiScreen® Assay System	Millipore, Schwalbach
Nanoliterinjektor	WPI World precisions instruments, Sarasota Florida, USA
Pumpe L-600°	Hitachi, Merck, Darmstadt
Schüttler für Bakterien KS260 basic	IKA, Staufen
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Elektro GmbH, Kelheim
Stereomikroskop Stemi 1000	Zeiss, Jena
Sterilbank-Clean Air type DFL/REC4 KL2A	Mahl, Trendelburg
Szintillationszählgerät TRI-CARB 2900TR	Perkin Elmer, Massachusetts, USA
TaqMan ABI PRISM 7900HT	Applied Biosystems, Darmstadt
Tecan Ultra Mikroplattengerät	Tecan, Crailsheim
Thermocycler gradient	Eppendorf, Hamburg

Geräte	Hersteller
Thermocycler PTC200	MJ Research/BioRad, Hercules, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
ThermoStat plus	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator TI 2	Biometra, Göttingen
UV Detektor 655A	Hitachi, Merck, Darmstadt
Vakuum Pumpe	Millipore, Schwalbach
Vertikal-Autoklav KSG 40/60	KSG, Olching
Vertikal-Autoklav: FV für Sterilgut	Tecnorama, Fernwald
Wasserbad GFL 1083	Schütt, Göttingen
Zählkammer 0,1 mm, 0,0025 mm ²	Brand, Wertheim
Zentrifuge JA-20 Rotor	Beckman, München
Zentrifuge Mikro 200R, Isotopenlabor	Hettich, Tuttlingen

2.8 Software, Datenbanken, Sequenzen

Software, Datenbanken und Sequenzen	Herkunft, Nummer
3100 Data Collection Software	Applied Biosystems
Adobe Photoshop	Adobe Systems GmbH, München
Clon Manager Suite	Sentral
DNA Sequencing Analysis Version 5.2	Applied Biosystems, Foster City, USA
GeneMapper, Version 3.7	Applied Biosystems, Foster City, USA
D-7000 HPLC-System-Manager	Merck, Darmstadt
Haploview	Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, UK
MS Office	Microsoft, USA
NONMEM Version 1.2 (Populationskinetische Analyse)	GloboMax™, Ellicott City (MD, USA)
WinNonlin Version 2.1 (Pharmakokinetik Analyse)	Pharsight Corporation, Mountain View, USA
Phase Version 2.1.1 (Haplotypberechnung)	Stephans et al., 2001
SigmaPlot 9.0	Systat Software GmbH, Erkrath
CorelDraw 13.0	Corel® Corporation
Quantity One S Version 4.3.1	BioRad, München
SPSS Version 12.0 für Window	SPSS Inc., Chicago, USA
Staden Package (Sequenzanalyse)	staden.sourceforge.net
Taqmananalyse-Software SDS 2.1	Applied Biosystems
XFluor4 Software	Tecan, Crailsheim
HapMap Datenbank	www.hapmap.org
NCBI-Datenbank	NCBI, Bethesda, USA www.ncbi.nlm.nih.gov
LAT1 gDNA	NCBI, NT_010498, GI: 51473102
LAT2 gDNA	NCBI, NT_026437, GI: 51493278
4F2hc gDNA	NCBI, NC_000011.8 GI:51511727
LAT1 mRNA	NCBI, NM_003486.5 GI:71979931
LAT2 mRNA	NCBI, NM_012244.2 GI:33286427
4F2hc mRNA	NCBI, NM_001012661.1 GI:61744474

3 Methoden

3.1 Klinische Studie

In einer klinischen Kohortenstudie zur Pharmakokinetik von Melphalan und genetischen Einflussfaktoren auf die Pharmakokinetik, wurden mit dem zustimmenden Votum der Ethikkommission in Kooperation mit der Abteilung Hämatologie/Onkologie der Georg-August-Universität Göttingen und der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Charité Berlin insgesamt 84 Patienten rekrutiert und eingeschlossen.

Ausschlusskriterien: Patienten mit klinisch manifestierter Leberinsuffizienz, mit Hepatitis oder Lebermetastasen. Ausgeschlossen wurden ferner alle Patienten, die gleichzeitig mit Substanzen wie cis-Platin, Cimetidin und potentiellen Induktoren des Cytochrom P450 abhängigen Enzymsystems behandelt wurden, sowie einer vorausgegangenen therapeutischen Bestrahlung, also mit Therapien, die auf sehr viele biologische Systeme durch Enzymhemmung oder Änderung der Genregulation einen Einfluss haben könnten.

Klinische Dokumentation: Die Patienten wurden im Rahmen der aktuellen medizinischen Standards in der Behandlung der jeweiligen Erkrankung therapiert. Von allen Patienten wurden im persönlichen Gespräch und unter Verwendung der Patientenakten demographische Daten und klinische Laborparameter erhoben und in codierter (pseudonymisierter) Form in Studienbögen dokumentiert. Um dem Datenschutz Rechnung zu tragen, wurden alle Proben und Untersuchungsdaten ausschließlich unter einem Code (Pseudonym) gespeichert.

Dokumentation der Toxizitäten nach den WHO Kriterien: Die Therapie-assoziierten Nebenwirkungen wie Mukositis und Diarrhöe wurden nach den Richtlinien der WHO in die vier verschiedenen Schweregrade eingeordnet (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Schweregrade für Mukositis und Diarrhöe nach den Richtlinien der WHO.

Schweregrad	0	1	2	3	4
Mukositis	keine	wund, gerötet	Rötung, Ulcera, feste Nahrung	Ulcera, flüssige Nahrung	Nahrungsaufnahme unmöglich
Diarrhöe	keine	transient <2Tage	erträglich aber >2Tage	unerträglich, benötigt Therapie	hämorrhagische Dehydratation

3.1.1 Pharmakokinetik: Probennahme und Konzentrationsanalysen

Die Patienten erhielten im Rahmen ihrer Therapie eine intravenöse Infusion von Melphalan. Zur Bestimmung der Melphalankonzentration wurden Blutproben zu bestimmten Zeitpunkten vor, während und nach der Infusion (0, 5, 20, 60, 120, 180 min) abgenommen. Das Blut wurde direkt nach der Entnahme zentrifugiert, das Plasma abgenommen und bei -80°C zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Für die DNA-Isolierung und Genotypisierung wurden weitere 7,5 mL EDTA-Vollblut abgenommen. Die Plasmakonzentration von Melphalan wurde mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) mit einer flüssig/flüssig Extraktion unter Einsatz einer *Reversed-Phase-C18* Säule und Fluoreszenz-Detektion bei einer Exzitationswellenlänge von 270 nm und einer Emissionswellenlänge von 365 nm gemessen. Die Details des Analyseverfahrens sind an anderer Stelle beschrieben (Kühne, 2004). Zu Beginn der Arbeit lagen bereits für alle Patienten die bestimmten Melphalankonzentrationen im Plasma vor.

3.2 Pharmakokinetische Berechnungen

3.2.1 Pharmakokinetische Modellanpassung

Mit Hilfe des Programms WinNonlin (Version 2.1, Pharsight Corporation, Mountain View, USA) konnten aus den Konzentrations-Zeit-Verläufen im Plasma die pharmakokinetischen Parameter entsprechend der gewählten Kompartiment-Modelle berechnet werden.

Ein-Kompartiment-Modell (siehe Abbildung 3.1): Das Ein-Kompartiment-Modell stellt das einfachste pharmakologische Modell zur Verfolgung von Konzentrationsverläufen bei intravenöser Gabe eines Stoffes unter Berücksichtigung seiner Verteilung auf ein einziges Kompartiment (z.B. Blut oder Extrazellularraum) dar. Der wechselseitige Austausch mit anderen Kompartimenten bleibt dabei unberücksichtigt. Die zusammenfassende integrative Darstellung erfolgt anhand der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (*area under the curve*, AUC) und der Clearance als Maß für die Elimination des Arzneistoffes aus dem Körper. Die Gesamtkörperclearance setzt sich aus den Clearances aller beteiligten Eliminationsorgane zusammen. Die Eliminationsgeschwindigkeit wird durch die Berechnung der Halbwertszeit ($t_{1/2}$) bestimmt; das ist die Zeitspanne, in der die Ausgangskonzentration des Arzneistoffes auf die Hälfte abnimmt. Das Verteilungsvolumen (V) ist eine fiktive Größe und beschreibt den Verteilungsraum des Arzneistoffes im Körper und wird aus der in der Regel bekannten Dosis (D) sowie der hier messbaren Blutkonzentration (c) nach der Gleichung:

$$C = \frac{D}{V} \cdot e^{-\frac{Cl}{V} \cdot t}$$

Zwei-Kompartiment-Modell (siehe Abbildung 3.1): In diesem Modell wird der Organismus in zwei pharmakokinetisch unterscheidbare Kompartimente (Verteilungsräume) eingeteilt (Abbildung 3.1). Das zentrale Kompartiment steht im unmittelbaren Gleichgewicht mit dem Plasma. Der Verteilungsvorgang innerhalb dieses Kompartiments ist in der Regel relativ schnell und benötigt je nach Substanz Zeiten zwischen wenigen Minuten und ein bis zwei Stunden. Das periphere Kompartiment ist das Volumen, in dem sich das Arzneimittel in der Regel etliche Stunden nach Applikation des Arzneistoffes verteilt.

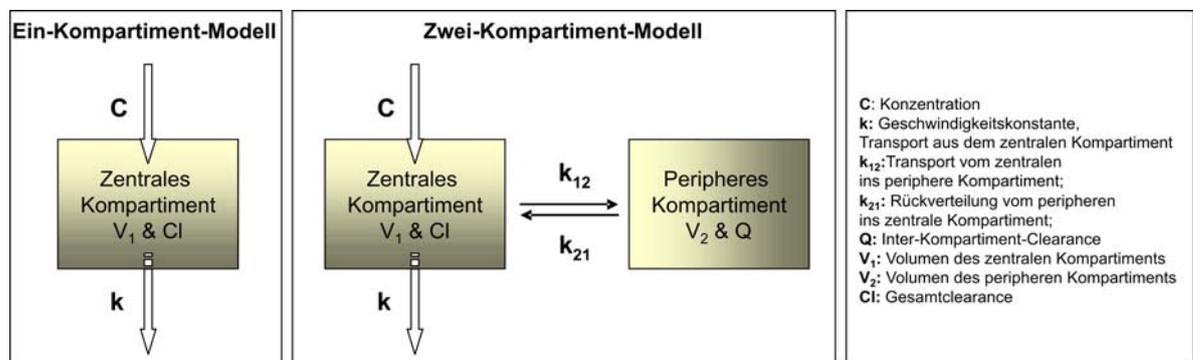


Abbildung 3.1: Graphische Darstellung der verwendeten Kompartiment-Modelle mit den entsprechenden Parametern.

3.2.2 Populations-pharmakokinetisches Modell

Die zusammenfassende Analyse der Pharmakokinetik aller Studienteilnehmer(innen) unter Berücksichtigung möglicher Einflussfaktoren (Populations-Pharmakokinetik) erfolgte mit Hilfe des Software-Paketes NONMEM V (Version 1.1) (NONMEM-project-group. NONMEM users guides). Diese Software ermöglicht es, die Mittelwerte der charakteristischen Kenngröße (Parameter) der Pharmakokinetik der untersuchten Patienten und ihre Verteilung ohne vorherige Kenntnisse der individuellen Parameter in einem Schritt zu bestimmen. Mit Hilfe der Schätzwerte für die gesamte Population kann man dann die individuellen Parameter berechnen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die interindividuelle Variabilität (Streuung von Patient zu Patient) von der intraindividuellen Variabilität (Streuung innerhalb eines jedem Patienten) in der Regel verfälschungsfrei getrennt analysiert werden kann.

Klinisch relevante Einflussgrößen wie Alter, Gewicht, Geschlecht und Nierenfunktion werden im so genannten Strukturmodell berücksichtigt. Die Berücksichtigung einer

bestehenden Abhängigkeit zwischen Populationsparameter und Einflussgröße (z.B. Körpergewicht, Nierenfunktion) reduziert die interindividuelle Variabilität des Parameters und erhöht die Vorhersagekraft des generellen Modells für die Konzentrations-Zeit-Profile der individuellen Patienten, kann also, wenn im therapeutischen Feld eingesetzt, zur individuellen Optimierung der Arzneitherapie beitragen.

Populations-Pharmakokinetische Modellanpassung: Die Schätzung der pharmakokinetischen Parameter, die die individuellen Konzentrationsverläufe am besten beschreiben, erfolgte mit der in NONMEM implementierten sogenannten Maximum-Likelihood-Methode. Für eine detaillierte Beschreibung der in NONMEM verwendeten Methode siehe Referenz (NONMEM-project-group. NONMEM users guides). Im Falle eines Ein-Kompartiment-Modells sind die wichtigen pharmakokinetischen Parameter totale Clearance (Cl), Halbwertszeit ($t_{1/2}$) und Verteilungsvolumen (V) eindeutig definiert und hängen entsprechend folgender Gleichung zusammen:

$$C = \frac{D}{V} \cdot e^{-\frac{Cl}{V} \cdot t}$$

Im Zwei-Kompartiment-Modell wurde zusätzlich das Volumen des peripheren Kompartiments (V_2) bestimmt, im Gegensatz zum Ein-Kompartiment-Modell gibt es hier also zwei Verteilungsvolumina. Und zur Definition des Zwei-Kompartiment-Modelles gehört die Inter-Kompartiment-Clearance (Q) zwischen dem zentralen und peripheren Kompartiment bestimmt.

Auswahl des besten Populationsmodells: Die Güte der Anpassung der verschiedenen Modelle an die Daten wurde mit dem Likelihood-Ratio-Test und den Zielfunktions-Werten beurteilt. Ein komplexeres Modell wurde einem einfacheren vorgezogen, wenn der Zielwert des komplexeren Modells gegenüber dem Basismodell signifikant kleiner war. Bei einer gewählten Irrtumswahrscheinlichkeit von $P = 0,05$ muss die Differenz dann mindestens 3,84 Punkte betragen. Um jedoch bei der Modellentwicklung die mehrfache Testung zu kompensieren, findet ein P-Wert von 0,01 Anwendung. Dieser P-Wert entspricht einer Abnahme des Zielwerts um 6,64 Punkte und ist im Folgenden notwendig, um eine statistische Signifikanz zwischen zwei Modellen zu zeigen, die sich nur in einem Parameter unterscheiden.

Analyse der demographischen Einflussgrößen: Nach der Entwicklung des pharmakokinetischen Modells wurden die individuellen pharmakokinetischen Parameter eines jeden Individuums bestimmt. Diese so genannten Bayes'schen Schätzungen

entstammen in NONMEM dem POSTHOC-Schritt (*Posterior Conditional Estimation Technique*) und stellen ein gewichtetes Mittel zwischen individuellen Daten und der Populationsinformation dar. Diese empirischen Bayes'schen Schätzungen für CI und V wurden in Abhängigkeit von den demographischen Einflussgrößen anhand graphischer Visualisierung der POSTHOC-Schätzungen und der Einflussgrößen dargestellt. Im nächsten Schritt wurden die potentiellen Einflussgrößen Alter, Gewicht, Geschlecht und Kreatininclearance in univariaten NONMEM-Analysen identifiziert und im Weiteren schrittweise in multivariaten NONMEM-Analysen auf ihre Signifikanz getestet.

Zur Berechnung der Parameter aus dem Endmodell wurden die NONMEM typischen Optionen der Parameterschätzung nach der *first-order conditional estimates method with interaction* benutzt. Die Interindividuelle (biologische) Variabilität wurde als exponentieller Fehler ermittelt und die verbliebene, zufallsbedingte Variabilität durch ein anteilmäßiges Fehlermodell beschrieben.

3.3 Arbeiten mit DNA

3.3.1 DNA Isolierung

3.3.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Vollblut

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mit Hilfe des BioRobot EZ1 (Qiagen). Die automatischen Schritte gliedern sich nach dem Herstellerprotokoll in Probenlyse, Bindung der DNA an magnetische Partikel und Wasch- und Eluierungsschritte der Nukleinsäure.

3.3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Es wurden zwei verschiedene Methoden der Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien angewendet, die sich in Ausbeute sowie Reinheit der DNA unterscheiden. Die so genannte Minipräparation wurde hauptsächlich dazu genutzt, die gewonnenen Plasmide zu analysieren. Das heißt, es wurde damit getestet, ob sie das gewünschte Insert tragen, dies gegebenenfalls in der richtigen Orientierung vorliegt oder ob es Abweichungen in der Basenabfolge gibt (→ 3.4.1). Die DNA für die Umklonierung eines Inserts in einen anderen Vektor wurde ebenfalls aus einer Minipräparation gewonnen. Für eine Transfektion in eukaryotischen Zellen (→ 3.8.4) und für die cRNA Synthese (Kapitel 3.5.4 *in vitro*-Transkription) zur Oozytenexpression (→ 3.9.3) sind diese Plasmidlösungen aufgrund des geringen Reinheitsgrads nicht geeignet. Dafür wurde eine Plasmidisolierung in präparativer Form, die so genannte Midipräparation, durchgeführt.

Minipräparation von Plasmid-DNA

Verwendete Puffer:

Resuspensionspuffer (Puffer 1) pH 8,0

Lagerung bei -4°C	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNAse A	100 µg/mL

Lysepuffer (Puffer 2)

Lagerung bei Raumtemperatur	NaOH	200 mM
	SDS	1 % (w/v)

Neutralisationspuffer (Puffer 3) pH 5,5

Lagerung bei Raumtemperatur	Kaliumacetat	3 M
-----------------------------	--------------	-----

TE-Puffer, pH 7,5

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

Für die Minipräparation wurden frische 5 mL Übernacht-Kulturen der Bakterien benutzt. Circa 5 µL der Kulturlösung wurden mit einer sterilen Pipettenspitze auf ¼-⅓ einer Agarplatte (mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert. Damit wurde der Klon kurzzeitig für weitere Anwendungen wie z.B. Midipräparation (→ 3.3.1.2) oder Herstellung von Glycerinkryokulturen (→ 3.6.4) aserviert. Die 5 mL Kulturen wurden abzentrifugiert (Centrifuge 5810 R; Eppendorf, 3220 x g, 10 min, RT). Der Überstand wurde restlos verworfen und das Pellet in 250 µL Puffer 1 resuspendiert. Nach dem Überführen in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß wurden 250 µL des alkalischen Lysepuffers zu der Suspension pipettiert. Durch kräftiges Schütteln des Reaktionsgefäßes erfolgte eine gleichmäßige Durchmischung der Komponenten, was die vollständige Lyse der Zellen unterstützt. Die Qualität der Lyse konnte durch eine hohe Viskosität der Flüssigkeit bestätigt werden. Eine Zugabe von 350 µL des schwach sauren Neutralisationspuffers mit anschließendem 4-6-maligen Invertieren des Reaktionsgefäßes führte zur Präzipitierung der Proteine in Form eines weißen Niederschlags. Dieser wurde während der folgenden Zentrifugation (Biofuge pico; 13000 rpm, 10 min, RT) sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µL Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) versetzt und nach kräftigem Schütteln weitere 5 Minuten unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die obere Phase, welche die Plasmid-

DNA enthielt, wurde wiederum in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 650 µL eiskaltem Isopropanol und sorgfältigem Schütteln wurden die Proben zentrifugiert (Biofuge fresco; 13000 rpm, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde im Anschluss verworfen und das entstandene Plasmid-DNA-Pellet mit 500 µL eiskaltem Ethanol (70%) gewaschen. Es wurde nochmals für 8 Minuten bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nachdem der Überstand komplett verworfen worden war, wurde das Plasmid-Pellet bei 37°C (Thermomixer 5436, Eppendorf) und geöffnetem Reaktionsgefäß solange getrocknet bis es transparent erschien. Zum Abschluss wurde das Plasmid-Pellet in 50 µL TE-Puffer aufgenommen.

Plasmidisolierung aus 100 mL Bakterienkultur (Midipräparation): Für die Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen wurde das Plasmid mit dem PureYield™ Midiprep Kit (Promega) gemäß dem mitgelieferten Protokoll präpariert. Dazu wurden 100 mL über Nacht (in 500 mL Glasflaschen/geschüttelt) gewachsene Bakterienkultur durch Zentrifugation für 20 min bei RT und 3220 x g (Zentrifuge 5810R, Eppendorf) sedimentiert und mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Zelltrümmer, Proteine und Salzkomplexe wurden nach der Neutralisation durch Zentrifugation bei 15 000 x g in der Beckmanzentrifuge für 10 min (bei Raumtemperatur) abgetrennt. Der Überstand wurde auf die Säulen des Kits gegeben und die DNA durch Anlegen von Vakuum an die Säule gebunden. Im ersten Waschschrift wurden bakterielle Endotoxine entfernt und anschließend die DNA mit Puffer gewaschen. Die gereinigte DNA wurde mit heißem Nuklease-freien Wasser in einem letzten Zentrifugationsschritt bei 2 000 x g für 5 min bei Raumtemperatur eluiert. Die Quantifizierung der Plasmide erfolgte wie unter 3.3.3 beschrieben. Für weitere Experimente wurden die Plasmide bei -20°C gelagert.

3.3.2 Lagerung von DNA

Wenn DNA länger als 2 Tage gelagert wurde, geschah dies bei -20°C, um einem Pilz- oder Bakterienwachstum bzw. um einer Degradation durch DNasen vorzubeugen.

3.3.3 Quantifizierung von Nukleinsäure

TE-Puffer, pH 7,5

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

Die Quantifizierung von Nukleinsäure-Konzentrationen erfolgte photometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm. Dazu wurden je 2 µL der Nukleinsäure-Lösung in

58 µL TE -Puffer verdünnt und gegen den Leerwert (60 µL TE-Puffer) in UV-durchlässigen Küvetten (UVetten 50-1000 µL; Eppendorf) im BioPhotometer (Eppendorf) gemessen und die Nukleinsäure-Konzentration folgendermaßen berechnet:

$$C_{\text{Nukleinsäure}} [\mu\text{g/ml}] = E_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Multiplikationsfaktor.}$$

Der Multiplikationsfaktor beträgt für dsDNA 50 und für RNA 40.

3.3.4 Agarose Gelelektrophorese

TBE-Puffer 5x, pH 8,0- 8,3

TRIS	0,1 M
Borsäure	0,1 M
EDTA	3,0 mM
ddH ₂ O	ad 2 L

Probenpuffer

Bromphenolblau	0,25% (v/v)
Ficoll Puffer Typ 400 in 1% TBE	10 % (v/v)

Laufpuffer

1x TBE	
Ethidiumbromid	0,1% (v/v)

Diese Methode diente zur Überprüfung der korrekten Spaltung von Plasmiden mit Restriktionsendonukleasen, zur Längenüberprüfung von PCR-Produkten und Plasmid-cDNA Inserts und zur Sichtbarmachung der Produkte aus der Restriktionsenzymanalyse. Das Prinzip der Gelelektrophorese nutzt die nativ existierende negative Ladung der DNA aus. Sobald ein elektrisches Feld aufgebaut ist, wandert die DNA in Richtung Pluspol (Anode). Wenn dies in einem Agarosegelgitter passiert, erfolgt eine Auftrennung der DNA-Fragmente nach Größe. Kleinere Fragmente wandern dabei schneller durch die Poren des Gels als größere. Damit man die Fragmente später unter UV-Licht erkennen kann, wird dem Gel Ethidiumbromid zugesetzt. Es interkaliert in der DNA und macht sie damit unter UV-Licht sichtbar.

Je nach Größe wurde die DNA in horizontalen Gelen aus 0,8–3% Agarose (Agarose, Ultra Pure; Invitrogen) in 1x TBE-Puffer, versetzt mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid (Merck), aufgetrennt. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen wurden, wurden sie zum Beschweren mit Probenpuffer versetzt. Dafür wurde pro 5 µL Probe je 1 µL Puffer zugesetzt. Parallel zur Auftrennung der DNA-Proben erfolgte deren Größenbestimmung durch Auftragung eines Größenstandards (100 bp oder 1 kb DNA-Größenstandard, Rapidozym). Die Elektrophorese fand in ComPhor Gelkammern (Biozym) bei 120 V statt.

Die Auftrennung der DNA wurde mit dem Fluor-S™ MultiImager (BioRad, Hercules, USA) sichtbar gemacht und mit der Software Quantity One® S Version 4.3.1 (BioRad) ausgewertet.

3.3.5 Aufreinigung von DNA

3.3.5.1 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Gel unter UV-Licht (Transilluminator TI 2; Biometra) ausgeschnitten und abgewogen. Um das Gelstück aufzulösen, wurde das dreifache Volumen einer hochmolaren Lösung des Salzes Natriumperchlorat (im Kit enthalten) hinzugegeben und bei 50°C für mindestens 10 min geschüttelt. Danach wurde ein Volumen Isopropanol zugegeben und die Lösung wurde in eine Anionenaustauschsilikat-Säule überführt. Nach der Durchführung der vom Hersteller vorgegebenen Waschschriffe wurde die DNA mit 50 µL EB-Puffer (pH 8,5; im Kit enthalten) eluiert.

3.3.5.2 Aufreinigung von DNA aus Lösungen

Zur Aufreinigung von DNA aus Lösungen (z.B. PCR-Ansätzen) wurde das MultiScreen® Assay System (Millipore) verwendet. Dazu wurde die Lösung ad 50 µL (mit ddH₂O) in je ein Well einer 96 Millipore-Multiscreen-PCR-Platte (MANU 030 PCR; Millipore) überführt. Wasser, Salze sowie DNA Moleküle kleiner als 100 bp wurden mit Hilfe von Vakuum (12 hg) durch den Filter auf dem Plattenboden abgesaugt. Die größeren DNA Moleküle, die sich nun auf dem Filter befanden, wurden anschließend zweimal mit 200 µL ddH₂O gewaschen. Dann wurde die Vakuumpumpe ausgeschaltet und 50 µL ddH₂O wurden zur Elution auf den Filter gegeben. Die Platte wurde nun auf dem Thermomixer 5436 (Eppendorf) geschüttelt (1000 rpm, 10 min, RT). Durch 10-15-maliges Auf- und Abpipettieren der Lösung wurden DNA-Fragmente aus dem Filter gelöst und für weitere Sequenzierungsschritte (→ 3.4.1) eingesetzt.

3.3.5.3 Aufkonzentrieren von DNA-Lösungen mittels Vakuum-Zentrifugation

Nach dem Aufreinigen von DNA war es von Vorteil die Lösungen durch Vakuum-Zentrifugation abzdampfen, um eine höher konzentrierte DNA-Lösung zu erhalten. Das geöffnete Reaktionsgefäß wurde dafür im Concentrator 5301 bei 60°C (Eppendorf) unter Vakuum (200 mbar, Membran-Vakuumpumpe, Vacuubrand) für ca. 10 Minuten zentrifugiert. Dabei wurde eine Reduktion des Probenvolumens um ca. 40% erreicht.

DNA, die sich an der Wand des Reaktionsgefäßes abgelagert hatte, wurde im Anschluss mit der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert.

3.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion dient zur *in vitro* Amplifizierung definierter DNA-Abschnitte. Es handelt sich um eine zyklische, enzymatische Reaktion. Typischerweise enthält jeder Zyklus folgende drei Schritte: Denaturierung, Anlagerung der Primer und Elongation. Bei der Denaturierung wird die DNA-Doppelhelix aufgetrennt, um die Anlagerung der Primer (ca. 18-35 bp lange, einzelsträngige, zum zu vervielfältigenden Strang komplementäre DNA-Stücke) im nächsten Schritt zu ermöglichen. Die Zusammensetzung (GC-Gehalt) und Länge der Primer bestimmt die Annealing-Temperatur. Während der anschließenden Elongationsphase werden die angelagerten Primer mit der Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase verlängert (von 5'- in 3'-Richtung). Dabei wird der komplementäre DNA-Strang als Matrize benutzt. Den zyklischen Phasen folgt ein finaler Elongationsschritt von 8 Minuten. Er dient dazu, angefangene Kettenverlängerungen zu vervollständigen. In jedem Zyklus verdoppelt sich der Anteil der DNA-Abschnitte, so dass nach n Zyklen eine Anzahl von 2^n Molekülen vorliegt.

In dieser Arbeit wurde die KOD Hot Start DNA Polymerase (Novagen Merck) für Klonierungsversuche verwendet. Sie besitzt eine Korrekturlesefunktion (Strachan and Read, 2005) und arbeitet daher weniger fehlerhaft als z.B. die *Taq*-Polymerase. Optional wurde den PCR-Ansätzen Q-Solution (im Qiagen *Taq*-Polymerase-Kit enthalten) zugesetzt. Zur Amplifizierung von längeren PCR-Fragmenten (1-20 kb) diente das ExpandLong Template PCR System von Roche, bestehend aus einer thermostabilen *Taq* DNA Polymerase und einer thermostabilen *Tgo* DNA Polymerase mit Korrekturlesefunktion.

Um die optimale Anlagerungs-Temperatur herauszufinden, wurde mit jedem neuen Primer zuerst eine so genannte Temperatur-Gradienten-PCR durchgeführt. Dafür wurden fünf identische 20 μ L PCR-Ansätze im Gradientencycler, mit verschiedenen Primer-Anlagerungstemperaturen (in der Regel im Bereich von 50-70°C), amplifiziert. Die Identifizierung der optimalen Primer-Anlagerungstemperatur fand durch Analyse der PCR-Produkte auf einem Agarosegel (\rightarrow 3.3.4) statt.

KOD HotStart Polymerase (Novagen Merck)

<u>Standard-PCR-Ansatz (100 µL):</u>		<u>Standard-PCR-Bedingungen:</u>		
	µL	Phase	Temperatur	Dauer
10 x Puffer	10	Denaturierung	94°C	5 min
dNTPs (2 mM)	10	35 Zyklen		
MgSO ₄ (25 mM)	4	Denaturierung	94°C	15 s
5 x Q-Solution (optional)	20	Anlagerung	50-70°C	30 s
Vorwärts-Primer (10 µM)	1	Elongation	72°C	1 min/kb
Rückwärts-Primer (10 µM)	1			
DNA (300 µg/mL)	2			
KOD HotStart Polymerase (1,0 U/µL)	2	Finale Elongation	72°C	8 min
ddH ₂ O	ad 100			

ExpandLong-Template PCR System (Roche)

<u>Standard-PCR-Ansatz (100 µL):</u>		<u>Standard-PCR-Bedingungen:</u>		
	µL	Phase	Temperatur	Dauer
10 x Puffer (BM 1,2 oder 3)	10	Denaturierung	94°C	2 min
dNTPs (2 mM)	7	30-40 Zyklen		
Vorwärts-Primer (10 µM)	2	Denaturierung	94°C	30 s
Rückwärts-Primer (10 µM)	2	Anlagerung	50-70°C	20 - 30 s
DNA (300 µg/mL)	2	Elongation	68°C	1 min/kb
ExpandLong Polymerasen (1,0 U/µL)	1			
MgSO ₄ (Qiagen, optional)	4	Finale Elongation	72°C	1 min
DMSO	4			
ddH ₂ O	ad 100			

Taq-Polymerase (Qiagen)

<u>Standard-PCR-Ansatz (100 µL):</u>		<u>Standard-PCR-Bedingungen:</u>		
	µL	Phase	Temperatur	Dauer
10 x Puffer	10	Denaturierung	95°C	2 min
dNTPs (2 mM)	7	30-40 Zyklen		
Vorwärts-Oligonukleotide (10 µM)	2	Denaturierung	94°C	30 s
Rückwärts-Oligonukleotide (10 µM)	2	Anlagerung	50-70°C	30 s
DNA (300 µg/mL)	2	Verlängerung	72°C	1min/kb
Taq Polymerase (5 U/µL)	1			
MgCl ₄ (25 mM)	4	Finale Elongation	72°C	1 min
5 x Q-Solution (optional)	20			
ddH ₂ O	ad 100			

Tabelle 3.2: Primer (IBA, Göttingen) und PCR-Bedingungen zur Amplifizierung von LAT1 Fragmenten

Bereich	Code	PCR Primersequenz, 5'-3'	Chromosomenposition	Tm	Fragmentlänge	10xPuffer	Kit	Elongationszeit
Promotor Exon1	1.1for 1.2rev	AGGGACGTCTGAGAGGAGTAGATT AGCCTAAATCAGCACCAGTCACTA	41519495-41519475 41516147-41516170	51°C	3000 bp	BM3**	ExpandLong	4 min
Exon2	2.1for 2.2rev	CAGGGGACTGGAGCTGTTTAA CCCCCAGGTGAGGTTACA	41499775-41499795 41499222-41499239	62°C	596 bp	BM1	Taq Qiagen	30 s
Exon3-8	3.1for 3.2rev	TCCTGGGCAGTGGTCAGAACT CCCCGGCTCCTGCAGTCACACT	41489218-41489198 41484104-41484125	68°C	5114 bp	BM2	ExpandLong	4,5 min
Exon3 *	4.1for 4.2rev	AGTGGTCAGAACTGCCT GACTGCGACGTGGAGCTAGA	41489210-41489194 41488616-41488635	68°C	600 bp	BM1	ExpandLong	30 s
Exon9	5.1for 5.2rev	CTCCTTCCATCCCTCACTATA AACCATGTGGGCTGCGTGTC	41482634-41482614 41482056-41482076	50°C	600 bp	BM3	ExpandLong	45 s
Exon10	6.1for 6.2rev	CTCCTTCCATCCCTCACTATA TGAGGGATGAGATTTCGTACCA	41482634-41482614 41480612-41480592	55°C	450 bp	BM3	ExpandLong	30s

* Nested PCR: AusgangsPCR-Produkt Exon 3-8; ** DMSO 2 µL pro Ansatz

Tabelle 3.3: Primer (IBA, Göttingen) und PCR Bedingungen zur Amplifizierung von LAT2 Fragmenten

Bereich	Code	PCR Primersequenz, 5'-3'	Chromosomenposition	Tm	Fragmentlänge	10xPuffer	Kit	Elongationszeit
Promotor	7.1for 7.2rev	TTCCAACGTGTGCACCTAGT TGGTCACTCGCGTTTACAAA	4654763-4654744 4652150-4652169	53°C	2500	BM1	ExpandLong	2,5 min
Exon1	8.1for 8.2rev	AGTCGCTGGCACAGTTCTATT TCCCTCCTTAAACCTATTGAA	4652258-4652238 4651472-4651492	56°C	787	BM1	Taq Qiagen	45 s
Exon2-3	9.1for 9.2rev	AGTTCCTGGTCAATAAGTGCT ATGGAGAGAAGTTAGGAGAGT	4635796-4635776 4634053-4634073	60°C	1723	BM2	Taq Qiagen	1,5 min
Exon4-7	10.1for 10.2rev	TGCTGGGCCCAAGCTCTAATT TGCGGCCTCCTCTGTCTTCT	4612469-4612449 4606683-4606703	65°C	5787	BM1	ExpandLong	4,5 min
Exon8	11.1for 11.2rev	TGGCTGCCTCTGGTTTGCTT ATGGGAGAACGGAAATAAGT	4600805-4600786 4600263-4600282	52°C	550	10xPuffer	Taq Qiagen	20 s
Exon8-11	12.1for 12.2rev	TTGCACCTGCATTTGTGAACA GGGAAGGCAGTAATGA	4600787-4600767 4595882-4595897	52°C	4910	BM3	ExpandLong	4,5 min
Exon11	13.1for 13.2rev	AGGTGGCGAGGATTCTCTT GGGAAGGCAGTAATGA	4596536-4596518 4595882-4595897	50°C	900 bp	BM3	ExpandLong	1 min

3.3.6.1 Multiplex PCR

Zur Genotypisierung von sechs *tagging* SNPs im 4F2hc (SLC3A2) Gen wurden mehrere PCR-Fragmente in einem 25 µL Ansatz unter Anwendung des Multiplex PCR Kits (Qiagen) amplifiziert. Dazu wurden 0,03 µM von jedem Primer (MWG, Tabelle 3.4) und 1x Multiplex Reaktionsansatz (enthält *Taq*-Polymerase, dNTPs und MgCl₂) in einer Reaktion eingesetzt. Die PCR lief unter folgenden Bedingungen ab: Denaturierung bei 95 °C für 2 min, gefolgt von 30 Zyklen bei 94 °C für 30 s, bei 57 °C für 30 s, bei 72 °C für 1 min, und einem finalen Elongationsschritt bei 72 °C für 8 min. Die PCR-Fragmente wurden dann zur weiteren Genotypisierung mittels Primerextension (→3.4.3) eingesetzt. Ein PCR-Fragment mit dem 4F2hc SNP (rs12794763) wurde separat in einer einzelnen PCR nach dem Protokoll von Qiagen mit der *Taq*-Polymerase amplifiziert (→3.3.6).

Tabelle 3.4: Primer für die Multiplex PCR zur Amplifizierung von 4F2hc-Fragmenten.

Bezeichnung	Sequenz, 5'-3'	rs-Nummer
SLC3A2_1f SLC3A2_1r	AGACAGGAGCCCAATAAGACA CCTCGAGGCTTAAAAGTAGCA	rs1059292
SLC3A2_2f SLC3A2_2r	TGGGCCTGAAAGGGTAGAAAG GCCCTTGTCTCCATCTTATCC	rs12794763
SLC3A2_3f SLC3A2_3r	TGCTGGTGCCGTGGTCATAAT GCAAGGCTGAATCACGAGACT	rs12804553
SLC3A2_4f SLC3A2_4r	GTGGTGGGTGAGGTTTAGTGT TCCCACATTGGAGCTGAGTCA	rs489381
SLC3A2_5f SLC3A2_5r	GGCCCCATTCTTTCTTGTGCT CTCATCCCCGTAGCTGAAAAC	rs4726
SLC3A2_6f SLC3A2_6r	CGTCTCCTCCAACTCCTTCAT CCCTTACCCTGAAACACCTT	rs2282477

3.3.7 Restriktionsanalyse

Restriktionsenzyme gehören zu der Gruppe der Endonukleasen und sind in der Lage, doppelsträngige DNA sequenzspezifisch zu schneiden.

Die Restriktionsspaltungen dienen im Verlauf der vorliegenden Arbeit einerseits der Herstellung passender Verknüpfungsstellen zwischen Vektoren und den cDNA-Fragmenten und zur Detektion von Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen (RFLP, → 3.4.2). Dies fand mit einem Gesamtvolumen von 50 µL im so genannten präparativen Ansatz statt. Andererseits wurde der so genannte analytische Ansatz mit 10 µL Reaktionsvolumen zur Überprüfung der Plasmid-Konstrukte genutzt. Ansätze für den analytischen Verdau wurden für 1 Stunde bei der vorgegebenen Temperatur inkubiert.

Beim präparativen Ansatz fand zuerst eine Inkubation für 2 Stunden oder über Nacht statt, dann wurde 1 µL Enzym nachgelegt und der Ansatz wurde wiederum für 1 Stunde inkubiert.

Analytischer Ansatz:

10 x Restriktionspuffer	1 µL
BSA (optional)	0,1 µL
DNA	1µL (~1 µg)
Enzym	1 µL
ddH ₂ O	ad 10 µL

Präparativer Ansatz:

10 x Restriktionspuffer	5 µL
BSA (optional)	0,5 µL
DNA	max. 10 µg
Enzym	5 µL
ddH ₂ O	ad 50 µL

Bei jeder Inkubation mit einem einzelnen Restriktionsenzym wurde der vom Hersteller vorgeschlagene optimale Puffer unter den vorgegebenen Restriktionsbedingungen angewendet. Wurden zwei Enzyme eingesetzt, die unterschiedlicher Puffer bedurften, wurde entweder ein Universalpuffer (Tango; Fermentas) benutzt, oder die verschiedenen Enzyme wurden in separaten nacheinander folgenden Reaktionen eingesetzt. Dabei wurde zwischen den Reaktionen eine Aufreinigung direkt aus der Lösung (→ 3.3.5.2) oder aus einem Agarosegel (→ 3.3.5.1) durchgeführt.

3.4 Methoden zur Genotypisierung

3.4.1 Sequenzierung

Sequenzierungs-PCR-Ansatz:

	µL
DMSO	0,5
Primer (10 µM)	1
BigDye [®] Reagenz	1,4
DNA (300 µg/mL)	1
ddH ₂ O	ad 10

PCR-Bedingungen:

Phase	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95°C	2 min
25 Zyklen		
Denaturierung	96°C	15 s
Anlagerung	56,5°C	15 s
Elongation	60°C	4 min
Finale Elongation	72 °C	7 min

Die Sequenzierung der PCR-Produkte bzw. der Plasmide erfolgte nach der Sanger Methode (Sanger et al., 1977). Für die Sequenzierung wurde das BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) eingesetzt. Neben den dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate) befinden sich im BigDye[®] auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Didesoxynukleotidtriphosphate). Diese werden an einer zufälligen Position in den DNA-Strang eingebaut und führen aufgrund ihrer fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Abbruch der Kettenverlängerung. Nach der Sequenzierungs-Reaktion mit dem aufgereinigten PCR-Produkt (→3.3.5.2) bzw. der Plasmide und dem entsprechenden Primer (siehe Tabelle 3.5, 3.6 und 3.7) wurde diese durch Sephadex-Filtration von Salzen und nicht gebrauchten ddNTPs aufgereinigt.

Dazu wurde das Sephadex-Pulver (G50 superfine, Amersham) in jede Vertiefung einer Lochplatte (MultiScreen[®] Column Loader, Millipore) portioniert und durch Invertieren in eine 96er Filterplatte (MAHV-N45, Millipore) gegeben. Nach Zugabe von 300 µL ddH₂O und Quellung über 3 h (oder über Nacht), wurde diese Platte bei 650 x g für 5 min zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Nach der Zugabe von weiteren 150 µL ddH₂O und nochmaliger Zentrifugation wurden dem Sequenzier-PCR-Produkt 30 µL ddH₂O zugesetzt und die Lösung auf die gequollene Säule pipettiert. Durch Zentrifugation in eine neue Mikrotiterplatte unter oben angegebenen Zentrifugationsbedingungen wurde das PCR-Produkt gereinigt und anschließend im Kapillarsequenzierer 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) aufgetrennt. Am Ende der Kapillaren (Länge: 50 cm, gefüllt mit Polymer7, Applied Biosystems) wurden die PCR-Fragmente durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt und gemessen. Anhand der vier verschiedenen Farbstoffe (für jede ddNTP-Form ein anderer) konnte der Detektor die Base am 3'-Ende eines jeden DNA-Stranges identifizieren. Aus der Abfolge, in der der Detektor die Farbsignale erkannte, wurde schließlich die Sequenz abgeleitet. Die durchschnittliche Länge der dabei gewonnenen Sequenzen betrug 700–900 Basenpaare. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit der PC-Software *Sequencing Analysis* Version 5.2 (Applied Biosystems) und anschließend mit dem Programm *Staden Package* Version 4.0 (staden.sourceforge.net).

Tabelle 3.5: Primer für LAT1-Sequenzierung.

Bereich	Bezeichnung	Sequenz, 5'-3'	Chromosomen Position
Promotor 1	1.3	AGGGACGTCTGAGAGGAGTAGATT	41519495-41519475
Promotor 2	1.4	TTGGGGTATGACTGTTGGTT	41519116-41519097
Promotor 3	1.5	ATGGTGGTACTGTCTCCTT	41518872-41518854
Promotor 4	1.6	TCCACCACGGCTATTGTTCA	41518544-41518525
Promotor 5	1.7	TTGGCAAGATTCTTTTGGGAT	41517945-41517925
Promotor 6	1.8	TGATGTTCCGCTGCAGGGT	41517377-41517359

Methoden

Bereich	Bezeichnung	Sequenz, 5'-3'	Chromosomen Position
Exon 1	1.9	AGCCTTGGGGAGAAGTGTA	41516491-41516510
Exon 2	2.3	CAGGGGACTGGAGCTGTTTAA	41499795-41499775
Exon 4	3.3	TCACCCACATCCCGACGA	41489210-41489194
Exon 4	3.4	AGAAACCGTGCTCAAGGACA	41488046-41488065
Exon 5	3.5	TCTGGGTGTGGCTTGGTATCA	41487238-41487258
Exon 6	3.6	ACAGAGTGGGGTTCGTTAGA	41487147-41487138
Econ 6	3.7	CGGGGTTTTGCCATATTGCT	41486286-41486305
Exon 7	3.8	CTGTCCTTGCCGAGTTGGTT	41485938-41485919
Exon 8	3.9	TCACACTTGGCACCCCTCGTA	41484119-41484138
Exon 3	4.3	AGTGGTCAGAACTGCCT	41489210-41489194
Exon 9	5.3	CTCCTCCATCCCTCACTATA	41482634-41482614
Exon 10	6.3	TGGCACTCCGCATTTCAAGT	41481042-41481022

Tabelle 3.6: Primer für LAT2-Sequenzierung.

Bereich	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Chromosomen Position
Promotor 1	7.3	TTCCAACGTGTGCACCTAGT	4654763-4654744
Promotor 2	7.4	ATCCCACATTAAGTCTGCATCA	4654600-4654579
Promotor 3	7.5	ATGATGCCTCCACTTTCTTGA	4653805-4653825
Promotor 4	7.6	TGAGGCTGGAGGATTGCTTGA	4653437-4653457
Promotor 5	7.7	TCAGGGAACAGTTGTGCCGAT	4653011-4653031
Promotor 6	7.8	CTCTTCTTTCTCGCTGGTCTT	4652599-4652619
Promotor 7	7.9	AATTGCAGAGGAGGGAGGAGA	4652815-4652795
Exon 1	8.3	TCCCTCCTTAAACCTATTGAA	4651472-4651492
Exon 2	9.3	AGTTCCTGGTCAATAAGTGCT	4635796-4635776
Exon 2	9.4	TGGCACACTGGAGACTGGAA	4635292-4635273
Exon 3	9.5	AGGGCTGGGTGTCTCATTGT	4634637-4634617
Exon 4	10.3	TGCTGGGCCCAAGCTCTAATT	4612469-4612449
Exon 5	10.4	TGGGGTGAACGGCAAATGGT	4609338-4609357
Exon 6	10.5	AAGGGCTGGGATAATAGGTGT	4608815-4608795
Exon 7	10.6	TGGCGGCCTCCTCTGTCTTCT	4606683-4606703
Exon 8	11.3	TTGCACCTGCATTTGTGAACA	4600787-4600767
Exon 9	12.3	GTGGAGAATGGAAATAGTGGT	4598523-4598543
Exon 10	12.4	TTGCGGGTCTAAGGTCTGTGT	4596845-4596865
Exon 11	13.3	AGGTGGCGAGGATTCTCTT	4596536-4596518

Tabelle 3.7: Primer für Plasmid-Sequenzierung.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
4F2hc_seq1261_for	AATATCACCAAGGGCTTCAGTGAA
4F2hc_seq947_for	TGCTGGGTCCAATTCACAAGA
LAT1_PM419_for	CCGGCCTTCATCGCAGTACAT
LAT1_Exon10_rev	ATGCTCCTCCGGCAGCCACT
LAT1_Exon3_rev	CATCCTCCATAGCAAAGA
LAT2_Exon5_rev	TAGGGATCAACAAGCTCCTCA
LAT2_Exon5_for	TTCTGGCTGGAGCCAAAGAA
pcDNA_rev1167	CCCCAGAATAGAATGACACCT
M13r	GTAAAACGACGGCCAG
M13f	CAGGAAACAGCTATGAC
CMV_for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG

3.4.2 PCR-RFLP Technik

Genotypisierung der GSTP1 Polymorphismen:

Zur Genotypisierung der GSTP1 Polymorphismen (Ile105Val und Ala114Val) wurde, in Anlehnung an eine bereits veröffentlichte Methode (Lu et al., 2006), zunächst eine PCR gefolgt von einem Inkubationsschritt mit einem Restriktionsenzym (PCR-RFLP) durchgeführt. Nach dem Inkubationsschritt mit *AciI* (Ile105Val) und *BsmAI* (Ala114Val), wie im Abschnitt 3.3.4 beschrieben, wurden die Proben in einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt und am Fluor-S™ MultiImager (BioRad, Hercules, USA) mit der Software Quantity One® S Version 4,3,1 (BioRad) ausgewertet.

Tabelle 3.8: Primer zur Genotypisierung der GSTP1 Polymorphismen.

Bezeichnung	Fragmentlänge	Sequenz, 5'-3'
Ile105Val		
GSTP1_Exon5_f	433 bp	GTAGTTTGCCCAAGGTCAAG
GSTP1_Exon5_r		AGCCACCTGAGGGGTAAG
Ala114Val		
GSTP1_Exon6_f	420 bp	GGGAGCAAGCAGAGGAGAAT
GSTP1_Exon6_r		CAGGTTGTAGTCAGCGAAGGAG

<u>Standard-PCR-Ansatz (25 µL):</u>	µL
10 x Puffer	2,5
dNTPs (10 mM)	0,65
MgCl ₄	3
5 x Q-Lösung	5
Vorwärts-Primer (10 µM)	0,75
Rückwärts-Primer (10 µM)	0,75
DNA	1
Taq-Polymerase Qiagen (1,0 U/µL)	0,2
ddH ₂ O	11,17

Standard-PCR-Bedingungen:

Phase	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94°C	5 min
5 Zyklen (Pro Zyklus steigt die Primeranlagerungstemperatur um 1°C)		
Denaturierung	94°C	30 s
Anlagerung	64-68°C	30 s
Elongation	72°C	30 s
25 Zyklen		
Denaturierung	94°C	30 s
Anlagerung	59°C	30 s
Elongation	72°C	30 s
Finale Elongation	72°C	5 min

Genotypisierung der LAT1 Polymorphismen: Die Genotypisierung der LAT1 28847A>G Genvariante erfolgte mittels RFLP-Analyse. Dazu wurde zunächst ein 373 bp langes Fragment mit dem Primerpaar: 5'-CCACTCCAGGTCCGCTTTCCA-3' und 5'-AGAAACCGTGCTCAAGGACA-3' unter den in Abschnitt (→ 3.3.6) beschriebenen Bedingungen mittels *Taq* Polymerase amplifiziert. Anschließend wurde das PCR-Produkt über Nacht bei 37°C mit *AciI* (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) inkubiert und auf einem 3%igen Agarose Gel mittels Elektrophorese aufgetrennt (→ 3.3.4). Für das A Allel erhielt man ein 24 und ein 300 bp großes Fragment, wohingegen das G Allel ungeschnitten blieb. Zur Genotypisierung der LAT1 8889C>T Genvariante erfolgte die PCR-Amplifizierung für ein 501 bp großes Fragment mit dem Primerpaar: 5'-CCACTCCAGGTCCGCTTTCCA-3' und 5'-GGCCACCTGGTCTGAATTCTA-3'. Um den Basenaustausch von C nach T zu detektieren, wurde das PCR-Produkt über Nacht mit *MspI* (Fermentas) inkubiert (→ 3.3.7) und der Ansatz auf einem 3%igen Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt (→ 3.3.4). Für das T Allel erhielt man 41 und 390 bp lange Fragmente, wohingegen das C Allel nur das ungeschnittene PCR-Fragment aufwies.

3.4.3 Primer-Extension Methode

Die ddNTP-Primerextension (*SNaPshotTM*) ist eine Methode zur Analyse von einzelnen Nukleotidaustauschen, so genannten SNPs (*single nucleotide polymorphisms*). Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass sich ein unmarkierter Primer unmittelbar vor der variablen Stelle anlagert und das entsprechende fluorezenzmarkierte Didesoxynukleotid eingebaut wird. Didesoxynukleotide tragen am 3'-Ende keine OH-Gruppe, wodurch die Verlängerung des Stranges verhindert wird. Für die Multiplex-Analysen war es notwendig, Primer mit unterschiedlicher Länge zu wählen, um die resultierenden Produkte anhand der Größe unterscheiden zu können. Es wurden daher zum Teil Oligonukleotide verwendet, deren spezifische Sequenz am 5' Ende durch eine Oligo-A-Sequenz verlängert worden war. Da das Produkt die Fragmentlänge des Primers plus ein zusätzliches Nukleotid beträgt, kann dadurch eine eindeutige Zuordnung der Signale erfolgen.

Für die Analyse der durch die Sequenzierung detektierten LAT1 und LAT2 SNPs bzw. mittels HapMap Daten (www.hapmap.org) ermittelten *tagging* SNPs für 4F2hc wurde ein *SNaPshotTM* Multiplex Kit (Applied Biosystems) verwendet. Dazu wurden die in der Tabelle 3.9 und Tabelle 3.10 aufgeführten Primer (MWG) mit den entsprechenden Konzentrationen in einem Ansatz eingesetzt.

Zur Vorbereitung wurden die relevanten genomischen DNA-Bereiche der LAT1, LAT2 und 4F2hc Gene mittels der unter Abschnitt (→3.3.6 und 3.3.6.1). beschriebenen PCR

bzw. Multiplex-PCR amplifiziert. Anschließend wurde der *SNaPshot*TM Assay nach dem Herstellerprotokoll mit einigen Modifikationen durchgeführt.

Zur Aufreinigung der gepoolten PCR-Produkte wurden jeweils 15 µL des Ansatzes für 1 h bei 37°C (Inkubator, Binder) mit 5 units einer *Shrimp* alkalischen Phosphatase (USB) and 2 Units einer Exonuklease I (USB) inkubiert. Die Deaktivierung der Enzyme erfolgte im Mastercycler (Eppendorf) für 15 min bei 80°C. Die *SNaPshot*TM Reaktion bestand aus 2 µL der zuvor aufgereinigten PCR-Produkte, 0,5 µL der gepoolten *SNaPshot*-Primern (siehe Tabelle..) und 2,5 µL des *SNaPshot*TM Multiplex Reaktionsassays (Applied Biosystems). Das SNaPshot-Reagenz enthält u.a. die für die Amplifikation nötige Polymerase und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide. Die *SNaPshot*-Reaktion, bei der das passende Didesoxynukleotid an der polymorphen Stelle eingebaut wird, wurde mit folgendem Programm durchgeführt: 96°C für 10 s, 50°C für 5 s und 60°C für 30 s mit insgesamt 26 Zyklen.

Anschließend musste der *SNaPshot*-Ansatz von überschüssigen ddNTPs befreit werden, weil diese aufgrund ihrer Fluoreszenz-Markierung bei der späteren Auswertung stören würden. Dazu wurde das *SNaPshot*-Produkt mit 0,5 units des Enzyms CIAP (*Calf intestinal* alkalische Phosphatase (New England BioLabs, Beverly, MA, USA) versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C, bei der die freien Didesoxynukleotide durch die Phosphatase CIAP dephosphoryliert wurden, erfolgte eine 15-minütige Enzym-Inaktivierung bei 75°C. Die elektrophoretische Auftrennung und Detektion des Endmarkierten SNaPshot-Produktes erfolgte mit Hilfe eines ABI Prism 3100 Genetic Analyzers. Hierfür wurde im 96-Well Format (ABgene) 1 µL der aufgereinigten Proben mit 9 µL HiDi Formamid (Applied Biosystems) und 0,5 µl GeneScanLIZ120 (Applied Biosystems) Längenstandard gemischt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben im Kapillarsequenzierer 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) und der entsprechenden Software (GeneMapper, Version 3.7, Applied Biosystems, Foster City, USA) analysiert. Die Elektropherogramme zeigten entsprechend der Fragmentlänge positionierte Peaks. Da die eingebauten ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren, konnten die detektierten Peaks den jeweiligen Basen zugeordnet werden.

Tabelle 3.9: *SNaPshot*TM-Primer für 4F2hc Polymorphismen.

Bezeichnung	Sequenz, 5'-3'	Konzentration [μM]	rs-Nummer
SLC3A2_1 SNaPshot	GGCCCATCTCCTCAGAGTTA	0,2	rs1059292
SLC3A2_2 SNaPshot	(A) ₁₅ AAGCTAAATCATTGAATTA	1	rs12794763
SLC3A2_3 SNaPshot	(A) ₂₀ ATCCCGTACCGACGACTGT	0,5	rs12804553
SLC3A2_4 SNaPshot	(A) ₂₅ AGGGACTCAGCTAGAGCCTC	0,08	rs489381
SLC3A2_5 SNaPshot	(A) ₃₀ CTGGGGAGCATAAAAATCC	0,5	rs4726
SLC3A2_6 SNaPshot	(A) ₃₅ AAGCACCCATGCCTCACCCA	0,8	rs2282477

Tabelle 3.10: *SNaPshot*TM-Primer für LAT1 und LAT2 Polymorphismen.

Bezeichnung	Sequenz, 5'-3'	Konzentration [μM]	rs-Nummer
LAT1_-1464	TATGTCGGGCATTCTCTGC	0,1	-1464 C>T
LAT1_-1226	(A) ₅ CACCCAGCTCTGCAACCGGT	0,1	-1226 G>C
LAT1_-1198	(A) ₉ AGGCCTTTGTTCTGGGTGAGC	0,2	-1198 C>T
LAT1_-1103	(A) ₁₅ GGTCAGGGAGGAAGCTCCTC	0,2	-1103 T>C
LAT1_-352	(A) ₂₀ TCATCCCAGCCGTCCTCCC	1,0	-352 C>T
LAT1_-235	(A) ₂₄ TGCGTCGTCGGCCAGCCTG	2,0	-235 C>T
LAT1_31447	(A) ₃₀ GAGTGGCAGAGTCAGCCACC	2,0	31447 C>T
LAT1_31765	(A) ₃₅ TGTGGCAGCCACCATATATT	2,0	31765 T>C
LAT2_-2709	ACCAGTGCAAACCTGATAACG	0,1	-2709del-2695
LAT2_-1401	(A) ₅ TGTGCAACAGAGCGAGACCC	0,2	-1401C>T
LAT2_-1348	(A) ₁₀ CGCTTTGGGAGGCTGACAGG	0,2	-1348C>T
LAT2_-1065	(A) ₁₄ TAAATCAGGGAACAGTTGTGC	0,2	-1065G>T
LAT2_-585	(A) ₂₀ GGGAAGGGAAAAGAAACCCA	0,2	-585A>T
LAT2_53149	(A) ₂₅ CTGCTGATGCTGGTCACCAG	0,2	53149C>T
LAT2_53172	(A) ₃₀ GGTAGTTGATGAAGCCAC	0,1	53172G>A
LAT2_53275	(A) ₃₅ GCCCCATCAAGGTGAGAGAA	2,0	53275T>G

In Abbildung 3.2 sind zwei Elektropherogramme aus der *SNaPshot*TM Analyse für LAT1 und LAT2 dargestellt. Jeder Peak steht dabei für eine Basenverlängerung. Entsprechend dem Längenstandard und der unterschiedlichen Primerlänge konnten die Peaks jedem Genotyp bzw. Polymorphismus zugeordnet werden. Zur Qualitätssicherung der Genotypisierung wurden 20% der Proben doppelt bestimmt.

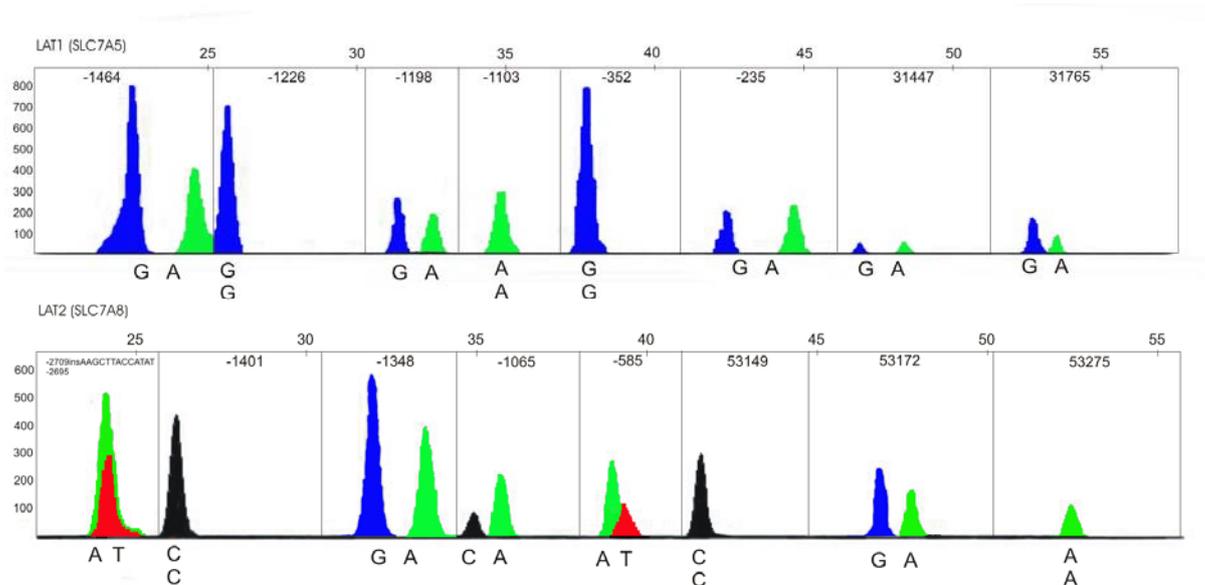


Abbildung 3.2: Elektropherogramme nach der Primer-Extension Methode für LAT1 (oben) und LAT2 (unten) Polymorphismen. Innerhalb der Rechtecke sind die Polymorphismen mit der Position relativ zum A des ATG Startcodons gegeben und außerhalb die Länge der Oligonukleotide (Basenpaare) des Standards.

3.4.4 Allelische Diskriminierung mittels Real-Time PCR

Für diese Genotypisierung konnte sowohl ein herkömmlicher Thermocycler oder das Gerät ABI PRISM[®] 7900HT zur Amplifizierung benutzt werden. Nach der PCR-Reaktion wird eine so genannte Endpunktdetektion durchgeführt (→ 3.5.5). Als Endpunktdetektion wurde die akkumulierte Fluoreszenz mit Hilfe des TaqMan 7900HT (Applied Biosystems) bestimmt. Ein Signalanstieg der Fluoreszenzfarbstoffe FAM (6-Carboxyrhodamin) oder VIC (6-Carboxyfluorescein) repräsentiert das für den Farbstoff charakteristische Allel. Nach dieser Methode wurde der Deletionspolymorphismus in den beiden Genen GSTM1 und GSTT1 bestimmt. Dabei diente Albumin als Referenzgen (Aarskog and Vedeler, 2000), welches im gleichen Reaktionsansatz amplifiziert wurde. Dafür wurden 200 nmol/l GSTM1 (400 nmol/l; GSTT1) Primer und Sonden (Tabelle 3.11) in einem 10 µL Ansatz mit 10 ng DNA und 1x TaqMan[®] Universal PCR Master Mix No AmpErase[®]UNG (Applied Biosystems) in eine 384-Well-Platte zusammen pipettiert und unter folgenden Bedingungen im ABI PRISM[®] 7900HT amplifiziert: Initiationsphase 2 min bei 50°C, gefolgt von einem Denaturierungsschritt zur Aktivierung der HotStart-Polymerase bei 95°C für 10 min und für 40 Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 s und einem Anlagerungsschritt bei 60°C für 1 min.

Zur Analyse der Allelischen Diskriminierung wurde nach der PCR mit Laserlicht (Argon Laser) die Fluoreszenz der freigesetzten Marker angeregt und die Emission zwischen 500 und 600 nm von der Kamera aufgenommen. Da VIC und FAM bei unterschiedlichen

Wellenlängen ihr Emissions-Maximum haben, kann man über die Menge an VIC- und FAM- Emission auf das Vorkommen des jeweiligen Allels schließen.

Tabelle 3.11: Verwendete Primer und Sonden zur Allelischen Diskriminierung.

Bezeichnung	Fragmentlänge	Primersequenz, 5'-3'
GSTM1F1		AGATCATGCCCCAGCTGCATAT
GSTM1R1	80 bp	GGAGACAGAAGAGGAGAAGATTCGT
GSTT1F1		GTGCCCTTCCCTTACCCATC
GSTT1R1	96 bp	GGTACCAGTAGTCAGGGACCTTA
alb ex12 for		TGTTGCATGAGAAAACGCCA
alb ex12 rev	72 bp	GTCGCCTGTTCAACCAAGGAT
Sonden		
GSTM1P1		5' FAM-TTGTCCATGGTCTGGTTCTCCAAAATGTCCA-TAMRA
GSTT1P1		5' FAM-ACAGTGTGGCCATCCTGCTCTACCTGA-TAMRA
ALB/MGB		5' VIC-AGAGTCACCAAATGC-MGB

3.5 Arbeiten mit RNA

3.5.1 RNA Isolierung

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) entsprechend folgendem Protokoll angewendet. Bevor die Zellen geerntet werden konnten wurden sie nach dem Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen. Durch eine Zugabe von 350 μ L RLT-Puffer (Bestandteil des RNeasy Kits), versetzt mit 10 μ L/mL 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich), wurden die Zellen lysiert. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erhalten, wurde das Well mehrmals mit der Flüssigkeit sauber gespült. Das Zelllysate wurde in ein 1,5 mL RNase-freies Reaktionsgefäß umpipetiert und sofort weiter bearbeitet, oder alternativ für einige Tage bei -20°C gelagert. Zur weiteren Bearbeitung wurden 350 μ L 70%-iger Ethanol zum Lysat gegeben, damit vermischt und dann in ein RNeasy-Spin-Column (aus dem RNeasy Kit) überführt. Die Säulen wurden zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico; 13.000 rpm, 1 min, RT) und der Durchfluss verworfen. Die anschließenden drei Waschschrte (1 x mit 700 μ L RW1-Puffer und 2 x mit 500 μ L RPE-Puffer) wurden nach folgendem Schema durchgeführt: Waschpuffer auf die Säulen pipettieren, Säulen abzentrifugieren (Biofuge pico; 13.000 rpm, 1 min, RT) und den Durchfluss verwerfen. Um nach dem letzten Waschschrte Rückstände des RPE-Puffers zu entfernen, wurden die Säulen noch einmal abzentrifugiert (Heraeus Biofuge pico; 13.000 rpm, 2 min, RT). Die RNA wurde durch die Zugabe von 30 μ L RNase-freiem Wasser mittels weiterer Zentrifugationen (Biofuge pico; 13.000 rpm, 2 min, RT) aus der Säule eluiert. Qualität und

Menge der gewonnenen RNA wurden photometrisch bestimmt (→ 3.3.3). Die RNA wurde kurzfristig (einige Wochen) bei -20°C und langfristig bei -80°C aufbewahrt.

3.5.2 Arbeiten mit der RNA

Da RNA sehr schnell durch RNasen degradiert werden kann, war darauf zu achten, dass alle Arbeitsmaterialien möglichst RNase-frei waren. Im Umgang mit RNA wurden daher stets saubere Handschuhe getragen, um einen RNase-Eintrag von der Haut zu verhindern. Außerdem wurden alle Flächen vor dem Arbeiten mit einem Anti-RNase-Spray (RNaseZap; Sigma-Aldrich) dekontaminiert. Als Verbrauchsmaterialien wurden ausschließlich RNase und DNase-freie Pipettenspitzen (Quali-Filterpipettenspitzen steril; Kisker, Steinfurt) und RNase-freie Reaktionsgefäße (0,2 mL; Biozym) benutzt. Da RNasen auch in der Luft sehr stabil sind, wurden alle Arbeitsschritte mit RNA unter einem Abzug durchgeführt.

3.5.3 cDNA Synthese (reverse Transkription)

Die reverse Transkription (RT) der RNA zu *copy* oder *complementary DNA* (cDNA) wurde mit *Super Script II* Reverser-Transkriptase (Invitrogen) durchgeführt. Dazu wurden 1 µg RNA ad 16,5 µL mit Wasser verdünnt und 1 µL *Random Hexamer* (dN6) Primer (Roche) zugegeben. Der Ansatz wurde in einem 0,2 mL Reaktionsgefäß (Biozym) für 10 Minuten auf 70°C im Thermocycler (Eppendorf) erhitzt, um die RNA zu denaturieren. Danach wurden die Proben auf 8°C heruntergekühlt, um die Anlagerung der Primer zu gewährleisten. Anschließend wurden 12,5 µL vom RT-Mastermix zugefügt. Nach der Inkubation bei 42°C für eine Stunde war die reverse Transkription beendet. Der Ansatz wurde mit 70 µL DNase- und RNase-freiem Wasser (Gibco) auf eine Endkonzentration von 10 ng/µL verdünnt. Die Aufbewahrung der cDNA erfolgte für kurze Zeit bei -20°C und bei -80°C für einen längeren Zeitraum.

<u>RT-Reaktionsansatz (für 1 µg RNA)</u>	µL
5x Superskript RT Puffer	6,00
0,1 M DTT	3,50
10 mM dNTPs	1,00
RNase Inhibitor (30 U/µL)	1,50
Reverse Transkriptase (200 U/µL)	0,25

3.5.4 cRNA Synthese (*in vitro*-Transkription)

Um die Aminosäuretransporter, bestehend aus der leichten Kette (LAT1 und LAT2) und einer schweren Kette (4F2hc) in Oozyten exprimieren zu können, musste die cRNA durch Transkription der hLAT1-cDNA, hLAT2-cDNA und h4F2hc-cDNA (Abschnitt....) unter Verwendung einer RNA-Polymerase zuvor *in vitro* hergestellt werden. Dafür wurde die hLAT1, hLAT2 und h4F2hc-cDNA, die als pcDNA3.1-Konstrukte vorlagen (→3.6.9), nach der Synthese in transformierten *E.coli* Bakterien (Stamm: Top10) zunächst sequenziert (→3.4.1), um Fehler vor der Verwendung der cDNA als Grundlage für die cRNA-Synthese auszuschließen. Bevor die cRNA *in vitro* synthetisiert werden konnte, musste das Plasmid am 3'-Ende des Inserts durch Schnitt mit einer Restriktionsendonuklease (*NotI*, 3'-Überhänge, Fermentas) in der MultipleCloningSite des Plasmids linearisiert werden. Nach dem Inkubationsschritt mit dem Restriktionsenzym (→3.3.7) wurde das linearisierte Plasmid nach Protokoll des Qiaquick[®] Extraktionskit (→3.3.5.1) aufgereinigt und die Konzentration der Plasmidmenge mit dem BioPhotometer (→3.3.3) bestimmt. Die cRNA-Synthese erfolgte unter der Anwendung des mMESSAGING mMASCHINE[®] T7 Ultra Kits von Ambion. Dazu wurde entsprechend dem Protokoll 1 µg der zuvor linearisierten und aufgereinigten Plasmid-DNA in einem 20 µL Ansatz bestehend aus 10 µL T7 NTP/ARCA (2x), 2 µL 10x T7 Reaktions Puffer und 2 µL T7 Enzym bei 37°C für 1½ Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Ausgangs-DNA durch Zugabe von 1 µL TURBO DNase (37°C für 15 min) aus dem Ansatz entfernt. Für die Expressionsversuche in Oozyten ist es notwendig, dass sich an der cRNA ein Poly-A-Schwanz befindet. Dieser wurde in einem weiteren Schritt bestehend aus 20 µL Reaktionsansatz, 36 µL Nuklease-freiem Wasser, 20 µL E-PAP Puffer (5x), 10 µL 25 mM MnCl₂, 10 µL ATP-Lösung, 4 µL E-PAP (*E.coli* Poly(A) Polymerase) nach einer Inkubation bei 37°C für 30 min angehängt. Die Menge und Qualität der cRNA wurde im Photometer (→3.3.3) überprüft. Damit die cRNA erfolgreich in Oozyten exprimiert werden kann, musste diese nochmals mit Hilfe des RNeasy[®] Mini Kits (Qiagen) aufgereinigt werden (→3.5.1).

3.5.5 Quantitative PCR

Ziel der quantitativen PCR (qPCR) ist es, aus der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt auf die Menge an eingesetztem DNA- bzw. RNA-Template zu schließen. Damit kann z.B. die Transkriptmenge bestimmter Gene ermittelt werden. Quantitative PCR kann als Endpunktbestimmung oder Real-Time-PCR durchgeführt werden. Mit Hilfe des Gerätes

TaqMan ABI PRISM[®] 7900HT kann im Gegensatz zur konventionellen PCR anhand der Real-Time PCR die Zunahme an spezifisch-amplifiziertem Produkt in jedem Zyklus verfolgt werden. Man verwendet entweder sequenzspezifische Sondenmoleküle, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff als Reporter und einem Quencher-Molekül markiert sind, oder DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. SYBR[®]Green.

3.5.5.1 Real-Time-PCR mit sequenzspezifischen Fluoreszenzsonden

Bei dieser Variante der qPCR binden zusätzliche Oligonukleotide an die denaturierte Zielsequenz. Diese so genannten „TaqMan-Sonden“ sind mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen markiert, einem „Reporter-Farbstoff“ am 5'-Ende und einem „Quencher-Farbstoff“ am 3'-Ende. Das Emissionsspektrum des Reporter-Farbstoffs ist so gewählt, dass es mit dem Anregungsspektrum des Quencher-Farbstoffs überlappt. Während der PCR bindet die Sonde zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer. Der Reporter-Farbstoff wird durch Laserlicht angeregt, so dass eine Überlappung der Spektren und somit eine Energieübertragung auf den Quencher-Farbstoff stattfindet, sofern Reporter- und Quencher-Farbstoff sich in räumlicher Nähe befinden. Diese Energieübertragung FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) führt dazu, dass nur der Quencher-Farbstoff Licht seiner spezifischen Wellenlänge emittiert. Wird nun infolge der Polymerasekettenreaktion und der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase das Fluorochrom-markierte Oligonukleotid abgebaut, kommt es zu einer räumlichen Trennung beider Fluorochrome. Bei gleichbleibender Anregungswellenlänge ändert sich nun die detektierbare Emissionswellenlänge.

Dieses Verfahren besitzt eine hohe Spezifität, da nicht nur die Oligonukleotide, sondern auch die Sonde spezifisch an der jeweiligen DNA-Sequenz binden muss. Die relative Menge der mRNA eines bestimmten Gens kann mit geeigneten Sonden und einem Vergleichs-gen über quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) ermittelt werden, wenn die Gesamt-RNA vorher in cDNA umgeschrieben wurde.

Mit steigender Produktkonzentration erhöht sich auch die Menge an freien fluoreszierenden Reportern. Allerdings steigen auch störende Einflüsse, die die exponentielle Wachstumsrate bremsen und sogar abstoppen. Deshalb wird möglichst früh noch in der exponentiellen Phase ein Fluoreszenz-Schwellenwert C_T (= cycles at threshold) festgelegt, bei dem die Proben miteinander verglichen werden. Je mehr Ausgangs-cDNA vorhanden war, desto früher wird dieser Schwellenwert erreicht. Die Sonden sind am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit einem Minor groove binder-dark quencher (MGB-DQ) markiert. Als Referenzgen (*house keeping* Gen) wurde das

TATA-Box-bindende Protein (TBP) mit dem Farbstoff 6-Carboxyrhodamin (VIC) am 5'-Ende und dem *Minor groove binder-dark quencher* (MGB-DQ) am 3'-Ende verwendet (Lossos et al., 2003). Um die Transkriptmenge der verschiedenen Gene zu bestimmen, wurden fertige TaqMan[®] Assays der Firma Applied Biosystems benutzt (→2.3). Die Assays enthalten eine 20fach konzentrierte Mischung von PCR-Primern und fluoreszenzmarkierten Sonden, die für das analysierte Transkript spezifisch sind. Ein Reaktionsmix mit folgender Zusammensetzung pro Reaktion wurde vorbereitet:

Zunächst wurden 15 µl des Reaktionsansatzes in die Wells einer 384-Well-Platte (Thermo Fast Plate 384 PCR, ABgene) vorgelegt und anschließend durch 3 µL der cDNA (1 ng/µL) je Well ergänzt. Alle Proben wurden als Duplikate gemessen. Die Platte wurde mit spezieller Transparentfolie abgeklebt (*adhesive* PCR-Folie, ABgene) und anschließend im ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) bei den unten genannten Bedingungen gemessen (Software; SDS Version 2.1).

Eurogentec Reaktionsansatz

	µL
10x Puffer	25
MgCl (50 mM)	20
dNTPs (5mM)	10
Taq-Polymerase	11,2
ddH ₂ O	688,8

Der Reaktionsansatz wurde bei 4°C lichtgeschützt gelagert

RT-PCR-Reaktionsansatz

	µL
Eurogentec Ansatz	9,0
20x Assay on Demand	0,9
cDNA (10 ng/µL)	3
ddH ₂ O	ad 15

RT-PCR-Bedingungen

Phase	Temperatur	Dauer
Aktivierung der Polymerase	50°C	2 min
40 Zyklen		
Initialisierung	95°C	10 min
Denaturierung	95°C	15 s
Anlagerung/Elongation	60°C	1 min

3.5.5.2 Real-Time-PCR mit SYBR[®]Green

Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Nutzung von DNA-Farbstoffen (SYBR[®]Green). Die Fluoreszenzfarbstoffe interkalieren an die doppelsträngige cDNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der Ausgangs-cDNA-Menge korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus

zu Zyklus. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann. Eine höhere Spezifität kann durch Verwendung einer Hot-Start-Polymerase gewährleistet werden, die die Bildung von Primer-Dimeren und nicht-spezifischen PCR-Produkten minimiert. Es wurde das HotStart-IT™ SYBR® Green PCR Kit von USB in Kombination mit dem Realtime-Thermocycler (ABI PRISM® 7900HT) nach dem folgenden Protokoll verwendet:

<u>Reaktionsansatz:</u>		<u>RT-PCR-Bedingungen</u>		
	µL	Phase	Temperatur	Dauer
HotStart-IT™ SYBR® Green	4,2	Initialisierung	95°C	2 min
10x AssayMix (Qiagen)	0,8	40 Zyklen		
cDNA (10 ng/µL)	3	Denaturierung	95°C	15s
ddH ₂ O	ad 10	Anlagerung	60°C	25s
		Elongation	72°C	35 s

3.5.5.3 Relative Quantifizierung

Wenn die Transkriptmenge von Proben relativ zueinander bestimmt werden sollte, so wurde die Expression relativ zu einer ausgewählten Kontroll-Probe berechnet. Es wurden jeweils Doppelmessungen durchgeführt. Für die Berechnung wurde zunächst der Mittelwert der Kontrollprobe für den Zykluswert bei dem der PCR-Produkt-Schwellenwert erreicht wurde, sowie der Mittelwert für diese Proben aus den Einzelmessungen für das Normalisierungsgen (NGen) bestimmt. Diese Mittelwerte wurden in die unten angegebene Formel eingesetzt und damit für die Einzelwerte aller Messungen die relative Genexpression bestimmt. Aus den sich ergebenden Werten wurden für die Mehrfachmessungen Mittelwerte und die Standardabweichung bestimmt und graphisch dargestellt.

$\text{relative Expression} = 2^{-[(Ct - Ct \text{ NGen}) - (Ct \text{ Kontrolle} - Ct \text{ NGen Kontrolle})]}$ $= 2^{-[\Delta\Delta Ct]}$
--

3.5.5.4 Absolute Quantifizierung

Um eine Aussage über absolute Transkriptmengen des betrachteten Gens in der Probe zu machen, wurden für LAT1, LAT2 und 4F2hc die unter Abschnitt 3.6.9 hergestellten Konstrukte als Referenzplasmide eingesetzt. Nach der Quantifizierung der Plasmide (→ 3.6.9) im Photometer (→ 3.3.3) wurde unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes der Konstrukte die Menge an Plasmiden pro µL berechnet. Es wurden Verdünnungen mit

bekanntem Plasmidgehalt hergestellt, die im Messbereich der Proben lagen (10^7 - 10^3 Moleküle). Die Verdünnungen wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert, so dass sie jederzeit als Standardlösung zur Verfügung standen. Die Standardkurve wurde auf jeder Probenplatte erneut erstellt, so dass Schwankungen in der PCR das Ergebnis nicht beeinflussen konnten.

3.6 Klonierung und Arbeiten mit Bakterien

3.6.1 Kulturmedium für Bakterien

Luria-Bertani (LB) Medium wurde zur Anzucht von Bakterien in flüssiger Kultur verwendet. Es wurde mit bidestilliertem Wasser angesetzt und anschließend autoklaviert. Zur Selektion wurde nach dem Abkühlen der Lösung das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten wurde das LB-Medium mit 15 g Agar (AppliChem, Darmstadt) pro Liter Medium versetzt, autoklaviert und unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen. Sowohl LB-Medium als auch die Agarplatten wurden bei 4°C aufbewahrt. Die Antibiotika wurden in ddH₂O gelöst, steril filtriert (Minisart 0,2 μm , Sartorius), je zu 1 mL aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Bakterienmedium

Mediumkomponenten	LB-Medium (pH 7,0) % (w/v)	LB-Agar-Platten % (w/v)
Trypton	10	10
Hefeextrakt	5	5
NaCl	10	10
Agar		15

Antibiotikazusätze

Mediumzusatz	Stammlösung mg/mL	Endkonzentration $\mu\text{g/mL}$
Ampicillin	50	100
Kanamycin	50	20
Chloramphenicol ¹	25	12

3.6.2 Anzucht von Bakterien in Lösung

Zur Herstellung einer Bakteriensuspension wurde die gewünschte Menge LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion gemischt und anschließend mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte versetzt. Kulturen bis zu einem Gesamtvolumen von 5 mL wurden in sterilen 15 mL Röhren über Nacht leicht schräg stehend bei 37°C im

¹ Chloramphenicol wurde in Ethanol gelöst

Bakterieninkubator (Incudrive, Schütt) geschüttelt. Die Schräglage ($\sim 40^\circ$) konnte eine große Oberfläche und damit eine gute Sauerstoffversorgung der Bakterien gewährleisten. Die Ansätze mit 100 mL Kulturvolumen wurden in autoklavierten Glasflaschen (500 mL) über Nacht rotiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Deckel der Gefäße nie fest verschlossen waren, so dass Luft und damit frischer Sauerstoff in die Flasche gelangen konnte.

3.6.3 Anzucht von Bakterien auf Agarplatten

Direkt nach der Transformationsprozedur sowie vor der Kolonie-PCR und zur kurzzeitigen Aufbewahrung von bestimmten Bakterienklonen wurden Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen. Dazu wurden Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum mit Hilfe von sterilen Pipettenspitzen, sterilen Zahnstochern oder abgeflammt gebogenen Pasteurpipetten aus Glas mit Bakterien bestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Bakterieninkubator (Incudrive Schütt) inkubiert. Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Platten mit Parafilm (Brand) verschlossen und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.6.4 Herstellung von Glycerinkryokulturen

Die bakteriellen Stämme wurden langfristig in einer 50%igen Glycerinlösung (Klinikum, Apotheke) bei -80°C gelagert. Dazu wurden $600\ \mu\text{L}$ aus einer frischen 5 mL-Über-Nacht-Kultur mit $600\ \mu\text{L}$ einer sterilen 50%-igen Glycerinlösung in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß vermischt und sofort eingefroren. So können die bakteriellen Stämme über mehrere Jahre gelagert werden.

3.6.5 Dichtebestimmung von Bakterienlösungen

Die Dichte einer Bakterienlösung konnte durch den Grad der Trübung der Lösung bestimmt werden. Dazu wurde 1 mL der Kultur gegen reines LB-Medium als Leerwert bei 600 nm (OD_{600}) gemessen (BioPhotometer, Eppendorf). Bei OD_{600} -Werten von 0,05 bis 0,3 ist Linearität der optischen Dichte mit der Anzahl der Zellen gegeben.

3.6.6 Präparation von elektrokompetenten Bakterien

Am Vortag der Präparation wurde eine Vorkultur aus *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) in 6 mL LB-Medium angesetzt. Diese Vorkultur wurde am nächsten Tag gleichmäßig in drei sterile 500 mL-Flaschen mit je 200 mL LB-Medium (RT) verteilt und solange geschüttelt, bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,65-0,8 erreicht war (ca. $2\frac{1}{2}$ - 3 Stunden). Die optische Dichte wurde in einem BioPhotometer (Eppendorf) mit 10 x 4 x 45 mm

Küvetten (Sarstedt) gegen eine Leer-Probe aus reinem LB-Medium gemessen. Dann wurde die Bakteriensuspension schnell auf Eis runtergekühlt. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Der Inhalt der Flaschen wurde in insgesamt zwölf vorgekühlte 50 mL-Röhrchen umgefüllt und abzentrifugiert (Zentrifuge 5810 R; Eppendorf; 3220 x g, 10 min, 4°C). Nachdem der Überstand restlos verworfen worden war, wurde das Pellet in 1 mL eiskalter, steriler 10%-iger Glycerin-Lösung resuspendiert. Im Anschluss wurden die Röhrchen auf 30 mL mit der gleichen Glycerin-Lösung aufgefüllt, kurz geschwenkt und wiederum abzentrifugiert (Centrifuge 5810 R; 3220 x g, 10 min, 4°C). Diesem ersten Waschschrift folgten noch drei weitere, die unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden, aber mit einer gleichzeitigen Reduzierung des Probevolumens einhergingen. Diese Schritte dienten der Auswaschung diverser Salze, die die Elektroporation stören könnten. Beim zweiten Waschschrift wurden die zwölf Röhrchen auf sechs reduziert und beim vierten und damit letzten Schritt wurden die sechs Bakterien-Pellets zu dreien gepoolt. Diese wurden nochmals auf 30 mL aufgefüllt und abzentrifugiert. Nach der Entfernung des Überstandes wurden die Pellets mit je 400 µL des 10%-igen Glycerins resuspendiert und in Aliquots von je 60 µL in 1,5 mL Reaktionsgefäße abgefüllt. Diese wurden im Anschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

3.6.7 Transformation durch Elektroporation

Um eine unnötige Zugabe von Salzen in der Elektroporationsmischung zu vermeiden, wurden die einzusetzenden Plasmidlösungen vor der Elektroporation einer Dialyse unterzogen. Dafür wurde eine kleine Petrischale mit ddH₂O befüllt und ein Dialysefilter vom Typ VSWP01300 (Millipore) mit der glänzenden Seite nach oben auf die Wasseroberfläche gesetzt. Im Anschluss wurde die Plasmidlösung auf den Filter aufgetragen. Nach 30 Minuten wurde die Lösung wieder vorsichtig vom Filter entfernt und in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Für die Transformation wurde ein Aliquot (60 µL) der elektrokompenten Bakterien möglichst schnell aufgetaut und dann in eine vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette (PeqLab, Erlangen) überführt. Danach wurden 1 - 3 µL der Plasmidlösung hinzugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogen in der Bakterienlösung verteilt. Die Elektroporation wurde im Gene Pulser II (BioRad) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 2500 kV, 25 µF und 200 Ω. Durch den ca. 5 ms dauernden Hochspannungspuls wurden mikroskopisch kleine Löcher in der Bakterienhülle erzeugt, durch die die Plasmide ins Bakterieninnere eindringen konnten. Nach der Elektroporation wurden umgehend 800 µL LB-Medium (auf 37°C vorgewärmt) hinzupipettiert und die Suspension wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden je 50 - 300 μL des Transformationsansatzes auf Selektionsagarplatten (LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum) (\rightarrow 3.6.3) ausgestrichen. Wenn eine sehr hohe Transformationseffizienz erwartet wurde, wurden 1:10- bzw. 1:100-Verdünnungen hergestellt und mit einem Volumen von 50 μL ausplattiert. Die Transformation wurde durch Kolonie-PCR (\rightarrow 3.6.8) und/oder Minipräparation (\rightarrow 3.3.1.2) überprüft.

3.6.8 Kolonie-PCR

Durch die Kolonie-PCR war es möglich nach einer Transformation positive von negativen Klonen zu unterscheiden, ohne vorher die Plasmide zu isolieren. Es wurden Primer so ausgewählt, dass eine Bande auf dem Agarosegel nach erfolgter PCR das Vorhandensein und die richtige Orientierung des Inserts im Plasmid signalisierte. Dem Kolonie-PCR Mastermix wurde durch Auf und Abpipettieren eine frisch gepickte Bakterienkolonie beigefügt. Bei der anschließenden PCR unter folgenden Bedingungen war es wichtig, einen 10 Minuten dauernden Schritt bei 95°C an den Beginn des PCR-Reaktion zu setzen, um die Bakterienzellen aufzuschließen und die vollständige Denaturierung der Plasmide zu gewährleisten.

<u>Kolonie-PCR-Ansatz</u>		<u>Standard-PCR-Bedingungen</u>		
	μL	Phase	Temperatur	Dauer
dNTPs (10 mM)	0,4	Aufschluss der Bakterienzellen	95°C	10 min
Vorwärts-Primer (100 μM)	0,1	30 Zyklen		
Rückwärts-Primer (100 μM)	0,1	Denaturierung	96°C	30 s
<i>Taq</i> -Polymerase (Qiagen)	0,2	Anlagerung	50°C	30 s
10 x Puffer Qiagen	2	Elongation	72°C	1min/kb
ddH ₂ O	ad 20			
Frisch gepickte Bakterienkolonie		Finale Elongation	72°C	5-10 min

3.6.9 Klonierung von cDNA in Plasmide

3.6.9.1 Umklonierung in pcDNA3 Vektor

Als Ausgangskonstrukte für die PCRs dienten Plasmide (\rightarrow 2.5) mit der gesamten cDNA von LAT1 und LAT2 (RZPD). Wie in Abschnitt 3.6.3 beschrieben, wurden die Plasmide auf den Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die nach der Minipräparation (\rightarrow 3.3.1.2) gewonnenen Plasmide wurden für die sich anschließende

Umklonierung in den Expressionsvektor pcDNA3.1 (Invitrogen) verwendet. Die Primer mit den entsprechenden Schnittstellen für jeweils ein Restriktionsenzym (*HindIII* oder *EcoRI*, Fermentas) sind in Tabelle 3.12 zusammengefasst. Unter den genannten Bedingungen wurden die entsprechenden cDNA-Fragmente amplifiziert.

Tabelle 3.12: Primer mit Restriktionsschnittstelle (fett unterstrichen) für PCR-Amplifizierung.

Primer	Sequenz, 5' – 3'
LAT1_HindIII_f	GGCCGGT <u>AAGCTT</u> AGCATGGCGGGTGCGGGCCCCGAA
LAT1_EcoRI_r	ACTCGGCC <u>GAATTC</u> TATGTCTCCTGGGGGACCAC
LAT2_HindIII_f	AATCCTA <u>AAGCTT</u> AGGATGGAAGAAGGAGCCAGGCAC
LAT2_EcoRI_r	AAGGAGAG <u>GAATTC</u> CGCCAGGAATGGTGGTCCTCA
4F2hc_HindIII_f	AGGTT <u>AAGCTT</u> ACCATGAGCCAGGACACCGAGG
4F2hc_EcoRI_r	CATGTC <u>GAATTC</u> AAGTCAGGCCGCGTAGGGGAA

<u>PCR-Reaktionsansatz (100 µL)</u>	µL	<u>Standard-PCR-Bedingungen:</u>		
		Phase	Temperatur	Dauer
10 x Puffer	10	Denaturierung	94°C	5 min
dNTPs (2 mM)	10	35 Zyklen		
MgSO ₄ (25 mM)	4	Denaturierung	94°C	15 s
5 x Q-Solution	20	Anlagerung	65°C	30 s
Vorwärts-Primer (100 µM)	1	Elongation	72°C	2 min
Rückwärts-Primer (100µM)	1			
Plasmid-DNA (Miniprep oder cDNA)	2			
KOD HotStart Polymerase (1,0 U/µL)	2	Finale Elongation	72°C	8 min
ddH ₂ O	ad 100			

Im Fall LAT1 wurde sowohl das cDNA-Fragment als auch der Expressionsvektor (pcDNA3.1, Invitrogen) mit den beiden Restriktionsenzymen *HindIII* und *EcoRI* inkubiert (→ 3.3.7), nach dem Protokoll des Ligate-ITTM Rapid Ligation Kits (USB) (→ 3.6.9.4) ligiert und in *E.coli* mittels Elektroporation transformiert (→ 3.6.7). Das LAT2 cDNA-Fragment wurde zunächst als Zwischenschritt in den Topo-Vektor kloniert (→ 3.6.9.3) und dann anschließend mit den passenden Schnittstellen für *HindIII* und *EcoRI* in den Expressionsvektor pcDNA3.1 umkloniert.

Als Vorlage zur cDNA-Klonierung der schweren Kette 4F2hc des Aminosäuretransporters diente cDNA der Zelllinie HeLa (→ 3.5.3). Das cDNA-Fragment wurde in einer PCR nach dem Protokoll (→ 3.3.6, KOD Hotstart Polymerase,) mit den Primern (Tabelle 3.12) und der cDNA als Template amplifiziert. Anschließend wurde sowohl das PCR-Fragment als auch der Expressionsvektor (pcDNA3.1) mit den beiden Restriktionsenzymen *HindIII* und *EcoRI* inkubiert (→ 3.3.7), nach dem Protokoll des Ligate-ITTM Rapid Ligation Kits

(USB) (→ 3.6.9.4) ligiert und in *E.coli* mittels Elektroporation transformiert (→ 3.6.7). Die Plasmide mit dem entsprechenden Insert wurden vor der Midiprep sequenziert (→ 3.4.1). Falls die Sequenz (entnommen aus der NCBI-Datenbank, www.ncbi.nlm.nih.gov, siehe Kapitel 2.8) Mutationen aufwies, wurden diese wie im Abschnitt (→ 3.6.9.5) beschrieben aus der Sequenz entfernt.

3.6.9.2 Generierung von 3'-A-Überhängen an PCR-Produkten

Die benutzte KOD Polymerase stellt nur PCR-Produkte mit glatten Enden her. Sollte ein DNA-Fragment mit einem TOPO-Vektor ligiert werden, war jedoch die Generierung von Adenosin-Überhängen am 3'-Ende des synthetisierten DNA-Stranges notwendig. Die *Taq*-Polymerase ist aufgrund ihrer Template-unabhängigen terminalen Transferase-Aktivität dazu fähig. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde für 10 Minuten mit dATPs, 10 x Puffer und *Taq*-Polymerase (Qiagen) bei 72°C inkubiert (Thermocycler, Eppendorf).

Ansatz zur Generierung von 3'-A-Überhängen:

dATPs (10 mM)	5 µL
10 x Puffer	5 µL
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µL)	0,5 µL
DNA-Fragment	39,5 µL

3.6.9.3 Topo-Ligation

Die Topo-TA-Klonierung ist eine Methode zur Klonierung von PCR-Produkten in einem einzigen Reaktionsschritt. Diese Methode basiert auf der Gegebenheit, dass die in PCR-Reaktionen verwendete *Taq*-Polymerase an die 3'-Enden der synthetisierten DNA-Stränge ein einzelnes Desoxyadenosin anhängt. Diese Tatsache wird im TOPO-TA-Kloning genutzt. Der Vektor wurde von der Firma Invitrogen mit der Topoisomerase I des *Vaccinia Virus* vorbehandelt. Danach liegt der Vektor linearisiert mit einzelnen 3'-Thymidin-Überhängen vor und hat das Enzym Topoisomerase I kovalent an das 3'-Phosphat des geschnittenen Vektors gebunden. Bei der Ligation eines PCR-Fragmentes liefert die gebundene Topoisomerase I die Energie zur Bindung des Fragmentes an den Vektor. Die Topoisomerase I wird in diesem Schritt wieder freigesetzt. Dieses System wurde als Zwischenschritt für die Umklonierung der LAT2 cDNA in den Expressionsvektor pcDNA3.1 genutzt. Aus Kostengründen wurde mit 0,5 µL nur die Hälfte des empfohlenen Volumens an Vektor verwendet. Die Ansätze wurden wie folgt pipettiert:

TOPO-Ligationsansatz

DNA-Fragment Lösung	4,5 µL
<i>TOPO XL® PCR Cloning</i> Vektor	0,5 µL

Es wurde exakt 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von der Zugabe von 1 µL der dem Kit beiliegenden Salz-Stop-Lösung (0,3 M NaCl, 0,06 M MgCl₂). Anschließend wurde das Ligationsprodukt nach einer 30minütigen Dialyse (Membranfilter, Millipore) der Transformation mittels Elektroporation unterzogen (→ 3.6.7).

3.6.9.4 Ligation von amplifizierten cDNA-Fragmenten in Plasmid-DNA

Um die zuvor geschnittenen (→ 3.3.7) und aufgereinigten (→ 3.3.5.1) DNA-Fragmente (z.B. Vektor und Insert) mit den passenden Enden miteinander zu verknüpfen, wurde eine Ligase-Reaktion durchgeführt. Zur Durchführung der Ligase-Reaktion wurde das Ligate-IT™ Rapid Ligation Kit (USB) benutzt. Dieses Kit ermöglichte die Ligierung von Vektor und Insert innerhalb von 10 Minuten. Dafür wurden Insert und Vektor im Verhältnis 13:2 (v/v) mit einem Endvolumen von 15 µL vermischt. Wurde der Vektor nur mit sich selbst ligiert, wurde er 1:4 mit nuklease-freiem Wasser ad 15 µL verdünnt. Zu der DNA wurden dann noch 4 µL 5 x Puffer und 1 µL Ligase gegeben. Die Ligation erfolgte für 5 -10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Dialyse für ½ Stunde auf einem Membranfilter (Millipore) konnten der Ansatz mittels Elektroporation (→ 3.6.7) in die Bakterien transformiert werden.

3.6.9.5 Zielgerichtete *in vitro*-Mutagenese

Im Gegensatz zur Bestrahlung oder Behandlung mit chemischen mutagenen Substanzen geht es bei dieser Methode um die gezielte Veränderung (Mutierung) eines definierten kurzen (bis zu vier Basen) DNA-Bereichs. Das Prinzip, entnommen aus dem Protokoll des QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene), basiert auf einer PCR mit fehlgepaarten Oligonukleotiden (Tabelle 3.13.). Diese Primer besitzen Sequenzen, die zur Gensequenz im Bereich der geplanten Mutation genau komplementär sind, mit Ausnahme der Nukleotide, die sich an der Mutationsstelle befinden. Diese sind komplementär zu den gewünschten mutierten Nukleotiden.

Tabelle 3.13: Primer mit Punktmutation. Veränderte Nukleotide sind fett unterstrichen.

Methoden

Primer	Sequenz, 5' - 3'
LAT1_223D_for	GATCGGGAAGGGTGA <u>A</u> TGTGTCCAATCTAG
LAT1_223D_rev	CTAGATTGGACACA <u>T</u> CACCCTTCCCCGATC
4F2hc_S/P_for	CCAGAGTGAAGACC <u>C</u> CTGGCTCCCTCCTT
4F2hc_S/P_rev	AAGGAGGGAGCCAGG <u>G</u> GTCTTCACTCTGG
LAT2_Ala94Thr_for	AGCCCTCTGCTAT <u>A</u> CTGAACTCGGGGTACACAT
LAT2_Ala94Thr_rev	ATGGTGACCCCGAGTTCAG <u>T</u> ATAGCAGAGGGCT

Als Ausgangskonstrukte dienten aus Bakterien isolierte Plasmide (→3.3.1.2). Die PCR-Mastermixe unterschieden sich nur in der Plasmid-DNA und den entsprechenden Primern (Tabelle 3.13). Alle Amplifizierungen wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

<u>PCR-Reaktionsansatz:</u>	μL	<u>Standard-PCR-Bedingungen:</u>		
		Phase	Temperatur	Dauer
10 x Puffer	5	Denaturierung	95°C	3 min
dNTPs (2 mM)	5	19 Zyklen		
MgSO ₄ (25 mM)	2	Denaturierung	95°C	30 s
Q-Solution	10	Anlagerung	60°C	30 s
Vorwärts-Primer (10 nM)	1,3	Elongation	72°C	3 min
Rückwärts-Primer (10 nM)	1,3			
Plasmid-DNA (50 ng/μL)	1			
KOD HotStart Polymerase (1,0 U/μL)	1			
ddH ₂ O	23,4			

Die neu synthetisierten Plasmide waren im Gegensatz zu den Ausgangsplasmiden, welche aus Bakterien isoliert wurden, nicht methyliert. Diese Tatsache wurde im nächsten Schritt ausgenutzt. Im Anschluss an die Amplifizierung wurde 1 μL des Restriktionsenzym *DpnI* (Fermentas) zum Reaktionsmix gegeben und der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Da das *DpnI* nur methylierte bzw. hemi-methylierte DNA schneidet, wurden die Ausgangsplasmide zerstört, während die neuen, mutationstragenden Konstrukte übrig blieben.

Nach vorheriger Dialyse konnten die Plasmide nun durch Elektroporation in Bakterien transformiert (→ 3.6.7) werden. Aus den gewachsenen Klonen wurde mittels Minipräparation (→ 3.3.1.2) die Plasmid-DNA isoliert. Um zu überprüfen, ob wirklich eine Mutation im Plasmid erzeugt worden ist, wurde der entsprechende Abschnitt sequenziert (→ 3.4.1).

3.7 Proteinbiochemische Methoden

3.7.1 Isolierung von Gesamtprotein

RIPA Puffer

TRIS-HCl	50 mM
Nonylphenylethylenglycol	1% (v/v)
Na-deoxycholate	0,25% (v/v)
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
PMSF (vor dem Gebrauch zugeben)	1 mM

Die vorkultivierten Zellen (mindestens 10^7 Zellen) wurden mit 0,5-1 mL PBS gewaschen, in 400 μ L RIPA Puffer aufgenommen und in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Zur Lyse der Zellen wurden diese dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurden die Zelltrümmer in einem Zentrifugationsschritt (10000 x g, 10 min, 4°C, Biofuge fresco, Heraeus) als Pellet vom Überstand mit den Gesamtproteinen abgetrennt. Nach der Proteinbestimmung (\rightarrow 3.7.2) wurden die Proben bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren.

3.7.2 Konzentrationsbestimmung des Proteingehaltes

Verwendete Lösungen:

Bicinchoninic Säure, Sigma

4%ige Kupfersulfat-Pentahydrat-Lösung

Rinderserumalbumin (BSA) minimum 96%, Sigma, #A4503

BSA Stammlösungen mit RIPA angesetzt und bei 4°C gelagert

Die Proteinbestimmung erfolgte nach dem BCA-Protein Assay (BCA = Bicinchoninic acid; (Smith et al., 1985)), der sich durch hohe Empfindlichkeit und geringe Störanfälligkeit auszeichnet und mit vielen ionischen und nicht-ionischen Detergenzien kompatibel ist. Bei dieser Methode wird ein Cu(I)-Ion durch zwei Moleküle BCA zu einem roten Farbkomplex gebunden. Dieser Komplex kann mit hoher Empfindlichkeit bei 562 nm gemessen werden. Dazu wurden alle Proben 1:10 mit RIPA Puffer verdünnt. Für die Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration wurden BSA Stammlösungen von 1 mg/mL – 30 mg/mL mit RIPA verdünnt. Als Nullprobe diente nur RIPA Puffer. Sowohl

von den Referenzproben, als auch von den zu bestimmenden Proben wurden in einer Doppelbestimmung 10 μL + 200 μL BCA-Lösung (50 Teile Bicinchoninic Säure + 1 Teil 4%iger Kupfersulfatlösung) pro Well auf die Mikrotiterplatte (96-Well) gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Tecan Ultra (Crailsheim) bei 570 nm gemessen. Die Proteingehalte der Lösungen wurden mittels einer parallel durchgeführten Eichreihe errechnet.

3.7.2.1 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Am Anfang des Nachweises eines spezifischen Proteins mittels Western Blot Analyse, steht die elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches in einem Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Die Auftrennung erfolgt hierbei aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts der einzelnen Proteinkomponenten. Zu Beginn wurden die Proteine mit dem anionischen Detergenz SDS in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol als Reduktionsmittel denaturiert. Das SDS umhüllt dabei die Proteine mit negativ geladenen, sich abstoßenden Sulfatgruppen, was zu deren Dissoziation in ihre Untereinheiten und vollständigen Entfaltung führt. Dies erlaubt die Auftrennung der Polypeptidketten nach ihrem Molekulargewicht, unabhängig von der Eigenladung der enthaltenen Aminosäurereste oder der ursprünglichen räumlichen Gestalt.

3.7.3 Herstellung von vertikalen SDS-Polyacrylamid-Minigelen

SDS-Polyacrylamid-Minigele wurden in einer „Mighty Small SE Dual Gel Caster“-Kammer gegossen (Plattengröße: 83 x 101 mm, Geldicke 1 mm). Zur Herstellung der Gele wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Lösungen bis auf N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 10% Ammoniumperoxiddisulfat (APS) zusammenpipettiert und die Mischung für bis zu 2 min im Wasserstrahlvakuum entgast. Anschließend wurde durch Zusatz von TEMED und APS die radikalische Polymerisation gestartet, das Trenngel gegossen und sofort mit Wasser überschichtet, um unter Luftabschluß eine gleichmäßige Polymerisation und eine exakte Grenzschicht zu gewährleisten. Nach ca. 30 min war die Polymerisation abgeschlossen. Nach Entfernung der Wasserschicht wurde das mit TEMED und APS versetzte Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm (10 Zähne) zwischen die Trennwände gesteckt.

Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels

Angaben in μl	4% Sammelgel	12% Trenngel
ddH ₂ O	3,25	4,35
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)		2,5
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25	
10% (w/v) SDS	0,05	0,1
40% (w/v) Acrylamid/Mix 37:5:1	0,5	3
10% APS	25	50
TEMED	2,5	5

Der pH-Wert von Trenn- und Sammelgelpuffer wurde mit 1 N HCl eingestellt. Die Lösungen konnten bei 4 °C gelagert werden.

3.7.4 Elektrophorese

4x Probenpuffer

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	6,6 mL
Glycerin	7,5 mL
10% (w/v) SDS	12,0 mL
2% (w/v) Bromphenolblau	0,5 mL
ad 25 mL ddH ₂ O; in Aliquots zu 100 μL bei -20°C lagern	

10 x Elektrophoresepuffer pH 8,4

Tris-HCl	30,3 g
Glycin	144,1 g
SDS	10 g
ddH ₂ O	ad 1 L

Die Proteinextrakte wurden mit 4x Probenpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert (Thermomixer 5436 Eppendorf), auf Eis abgekühlt und kurz herunterzentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus). Währenddessen wurden die Gele in die Elektrophoresekammer „Mighty Small II“ eingespannt und diese mit 1x Elektrophoresepuffer befüllt. Pro Tasche wurden nach Möglichkeit 10 μg Gesamtproteine eingesetzt. Zur Größenbestimmung der Banden wurden 6 μl vorgefärbter Proteinstandard auf das Gel aufgetragen (SeeBlue[®]Plus2 Prestained Standard, Invitrogen) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte unter Wasserkühlung bei konstanter Stromstärke von 24 mA (12 mA pro Gel) etwa 10-20 min im Sammelgel. Zur anschließenden Auftrennung im Trenngel wurde der Stromfluss auf 50 mA (25 mA pro Gel) erhöht. Nach dem Austritt der Bromphenolblaufront aus dem Gel wurde die Elektrophorese gestoppt.

3.7.5 Nachweis von Proteinen im Western-Blot

Nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden aufgetrennte Proteine über einen Semidry-Transfer aus dem Gel eluiert und auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF) immobilisiert, um sie immunologischen Analysen zugänglich zu machen (Western-Blot).

3.7.6 Semidry-Transfer

Transferpuffer pH 9

Tris	48 mM
Glycin	39 mM
SDS	0,0374%
Methanol	15%

Waschpuffer pH 7,4

Tris	10 mM
NaCl	154 mM

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran basierte auf einer ursprünglich von Kyhse-Andersen, 1984 beschriebene Methode (Kyhse-Andersen, 1984). Für das Semidry-Verfahren wurde eine Transferkammer mit einer Edelstahlkathode und einer Glas/ Graphitanode benutzt. Im Gegensatz zu dem von Kyhse-Andersen, 1984 beschriebenen Verfahren kam ein kontinuierliches Puffersystem zum Einsatz. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurde zunächst das Sammelgel vom Trenngel mit einem Skalpell abgetrennt. Die PVDF-Membran (Imobilon-P Transfer Membran # IPVH00010 Porendurchmesser 0,45 µm, Millipore) wurde für 10 s in Methanol aktiviert und in Transferpuffer für 10 min äquilibriert. Zeitgleich wurden 6 dicke und 2 dünne Filterpapiere (5,2 x 8,3 cm) in Transferpuffer für 10 min äquilibriert. Das „Transfer-Sandwich“ wurde nach gleichmäßiger Befeuchtung der Elektroden der Blot-Aparatur (Biometra) mit dem Transferpuffer wie folgt zusammengesetzt:

Anode (+) oben
3 dicke Filterpapiere (Whatman® Schleicher und Schuell Nr. 2668)
1 dünnes Filterpapier (Whatman® Schleicher und Schuell Nr. 2CHR)
PVDF-Membran
Polyacrylamidgel
1 dünnes Filterpapier
3 dicke Filterpapiere
Kathode (-) unten

Luftblasen wurden beim Aufbau des Sandwiches mit einer Glasrolle entfernt. Der Transfer erfolgte für 1,5 h bei Raumtemperatur bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA/cm² (ca. 45 mA/Gel).

3.7.7 Färbung

Färbelösung

Coomassie® Brilliant Blue R 250	1% (w/v)
Methanol	5% (v/v)
Essigsäure	7%

Um Effizienz und Gleichmäßigkeit des Transfers zu überprüfen, wurde das Polyacrylamidgel nach dem Transfer für 5 min in Coomassie-Blau-Lösung gefärbt und dann anschließend über Nacht in Wasser differenziert.

3.7.8 Immunchemischer Nachweis

Waschpuffer pH 7,5

Tris	25 mM
NaCl	150 mM
Tween-20	0,01%

Blockierungspuffer

Waschpuffer mit Magermilchpulver	5%
----------------------------------	----

Puffer für primäre Antikörperbehandlung

Tris	10 mM
NaCl	154 mM
Tween-20	0,05%
Magermilchpulver	0,5%

Puffer für sekundäre Antikörperbehandlung

Tris	25 mM
NaCl	150 mM

Die PVDF-Membran wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur in Waschpuffer mit 5% Magermilchpulver (Real) inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Die folgenden Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten unter leichtem Schwenken. Die abgesättigte Membran wurde zunächst 6 x 5 min im Waschpuffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht (nach

Bedarf wurde 0,5% Magermilchpulver zugesetzt). Zur Entfernung von überschüssigem Antikörper wurde die Membran 6 x 5 min in dem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit sekundärem, Peroxidase-gekoppelten Antikörper (Verdünnung siehe Tabelle 3.14) in dem Puffer für sekundäre Antikörper inkubiert. Die Membran wurde erneut 6 x 5 min mit dem Waschpuffer gewaschen und von überschüssiger Flüssigkeit befreit. Gleiche Volumina (1-2 mL) des Peroxidasesubstrats Luminol und des Co-Substrates H₂O₂ (Lösungen 1 und 2 des ECL-Systems, SuperSignal[®] West Pico Trial Kit, Perbio Science, Bonn) wurden vermischt und die noch feuchte Membran unter leichtem Schütteln 5 min darin inkubiert. Überschüssige Substratlösung wurde abgegossen und die nebelfeuchte Membran in Klarsichtfolie gelegt. Die unter enzymatischer Umsetzung der Substrate auftretende Chemilumineszenz im Bereich der Immunkomplexe wurde durch Exposition von ECL-Filmen (Hyperfilm[™] MP, Amersham) in einer Autoradiographie-Kassette (FUJIX Cassette 2040) bei Raumtemperatur bis zur gewünschten Filmschwärzung detektiert (Entwickler G150, AGFA und Fixierer G354 AGFA). Je nach Intensität waren Expositionszeiten von wenigen Sekunden bis zu einigen Minuten notwendig. Die optimalen Verdünnungsverhältnisse für die primären Antikörper waren im Vorfeld im Verhältnis zur eingesetzten Proteinmenge und zur Verdünnung des sekundären Antikörpers ausgetestet worden.

Tabelle 3.14: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper.

Primäre Antikörper	Verdünnung	Hersteller
LAT1	1:1000	Acris (# NB100-734) Serotec (# AHP951) Biomol (IMG-71989)
LAT2	1:1000	Santa Cruz (# sc-27581)
GAPDH	1:2500	Serotec (# AHP996)
Sekundäre Antikörper		
Anti-Kaninchen IgG-HRP Peroxidase-gekoppelt (für LAT1 und GAPDH)	1:10000	Biomol (#111-035-003)
Anti-Ziege IgG-HRP (für LAT2)	1:10000	Serotec (#sc-2020)

3.8 Zellbiologie

3.8.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Kulturmedien:

DMEM		
Fötale Kälberserum (FKS)	10%	20%
Penicillin/Streptomycin Lösung	1%	1%
RPMI		
Fötale Kälberserum (FKS)	10%	20 %
Penicillin/Streptomycin Lösung	1%	1%

Es wurden nur sterile Lösungen, Kulturmedien und Materialien verwendet. Medien wurden im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Arbeiten fanden unter der Sterilbank (Clean Air Typ DFL/REC4 KL2A) statt. Um eine mikrobielle Kontaminierung auszuschließen, wurden die Zellen regelmäßigen Kontrollen unter dem Mikroskop (Axiovert 40 CFL, Zeiss) unterzogen. Zusätzlich wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen mit dem Venor[®]GeM-Kit (Minerva Biolabs) untersucht, um mögliche, unter dem Mikroskop nicht nachweisbare, Kontaminationen mit Mykoplasmen auszuschließen. Um ein optimales Wachstum zu gewährleisten, wurden die Zellen in Flaschen mit 75 cm² oder 25 cm² Kulturoberfläche und Gas-permeablen Verschlüssen (Sarstedt) im Brutschrank (CO₂-Inkubator BBD 6220; Heraeus) in dem jeweiligen Medium unter folgenden Bedingungen kultiviert: 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂.

Kultivierung adhärent wachsender Zellen: Zunächst mussten die Zellen bei jedem Umsetzen vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst werden. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde für fünf Minuten bei 37°C mit einer Trypsin-Lösung (Gibco) inkubiert. Der Prozess des Ablösens der Zellen wurde mikroskopisch überprüft. Nach erfolgreicher Ablösung wurde die Reaktion durch Zugabe des entsprechenden Nährmediums gestoppt. Nach einem Zentrifugationsschritt (Labofuge, 3 min, 500 x g) wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen abschließend im gewünschten Verhältnis in neue Flaschen umgesetzt.

Kultivierung von Suspensionszellen: Da die Zellen nicht-adhärent auf dem Boden der Kulturflasche wuchsen, konnten sie ohne den sonst erforderlichen Trypsinisierungsschritt durch Zugabe von frischem Medium oder durch einfaches Umsetzen in eine neue Kulturflasche versorgt werden. Die Häufigkeit, mit der das Medium erneuert wurde,

richtete sich nach der Proliferationsrate und der Stoffwechselaktivität der jeweiligen Zelllinie.

3.8.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 μ L Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau-Lösung (0,4% Lösung in 0,81% NaCl und 0,06% KCl; Sigma-Aldrich) versetzt und 10 μ L davon in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Dieses System ermöglicht die Bestimmung der Zellzahl pro ml bei bekanntem Volumen der Zählkammer. Das Auszählen der Zellen erfolgte unter Zuhilfenahme eines Mikroskops. Durch die Färbung mit Trypanblau-Lösung kann man lebende von toten Zellen gut unterscheiden, da die Zellmembran toter Zellen im Gegensatz zu der der lebenden für den Farbstoff Trypanblau permeabel ist.

3.8.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die dauerhafte Aufbewahrung vitaler eukaryotischer Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Für die Konservierung wurden die konfluent wachsenden Zellen einer 75 cm² Kulturflasche pelletiert (Heraeus Laborfuge 400R, 300 x g, 3 min, RT), in je 7,2 mL Einfriermedium resuspendiert und jeweils 1,8 mL in jedes Kryoröhrchen (Nunc) gegeben. Nachdem die Zellen für 1-2 Stunden in einem Eisbad langsam heruntergekühlt wurden, konnten diese bei -80°C für 3-5 Tage eingefroren und zur längeren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Einfriermedium: 90% FKS
 10% DMSO

Um die Zellen zu revitalisieren wurde die Kryokultur möglichst rasch aufgetaut, in einem 15 mL Röhrchen mit 10 mL vorgewärmtem Medium vermischt und abzentrifugiert (Heraeus Laborfuge 400R, 300 x g, 3 min, RT). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 5 mL Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine 25 cm² Kulturflasche überführt und für 2-3 Tage im Brutschrank unter den Standardbedingungen kultiviert. Um gleichbleibende Konditionen zu gewährleisten, wurden die Zellen vor ihrer Verwendung zunächst zweimal passagiert.

3.8.4 Transiente Transfektionsmethoden

3.8.4.1 Transfektion von adhären wachsenden Zellen mit Plasmid-DNA

Die Transfektion von Plasmid-DNA in adhären wachsende Zellen zur Überexpression der beiden Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2 erfolgte mit dem Transfektionsreagenz von FuGene (Roche) nach dem Herstellerprotokoll. Das Prinzip der Transfektion basiert zunächst darauf, dass die Plasmid-DNA an ein komplexes Gemisch, z.B. pH-sensitiven Liposomen gebunden wird, um sie dann in die Zellen zu schleusen. Diese komplexen Transfektionsreagenzien zeichnen sich durch eine hohe Transfektionseffizienz bei niedriger Toxizität aus (Budker et al., 1996).

3.8.4.2 Transfektion von adhären wachsenden Zellen mit siRNA

Bei den siRNAs (small interfering RNA) handelt es sich um kurze, doppelsträngige RNA-Moleküle von 21-23 Nukleotiden Länge mit symmetrischen Überhängen von 2-3 Nukleotiden am 3'-Hydroxyl-Ende. Die siRNA Moleküle führen zu einer Sequenz-spezifischen Degradierung der Ziel-mRNA in der Säugetierzelle. Sie können dazu verwendet werden, spezifisch die Expression beliebiger Gene zu unterdrücken. Nach den Richtlinien von Tuschl (www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html), wurden für das LAT2 Gen zwei neu entwickelte siRNAs und eine siRNA von der Firma Qiagen eingesetzt (Tabelle 3.16). Für das LAT1 Gen wurde eine bereits publizierte siRNA verwendet ((Li and Whorton, 2005) (Tabelle 3.16). siRNAs sind als kurze doppelsträngige RNA-Moleküle vor RNasen zu schützen (→3.5.2). Die Stammlösungen der siRNA-Moleküle wurden mit einer Konzentration von 20 μ M zu 20 μ L aliquotiert bei -20°C gelagert. Für eine Transfektion von siRNA wurde das Transfektionsreagenz HiPerFect (Qiagen) verwendet (Abbildung 3.3). Dazu wurden 1-3 x 10⁵ Zellen pro Well einer 6-Well-Platte (Nunc) ausgesät und über Nacht bei optimalen Bedingungen (60-70% konfluent) inkubiert. Für jedes zu transfizierende Well wurden nach dem Protokoll von Qiagen 100 μ L reines D-MEM mit 3 μ L der siRNA (25 nM als Endkonzentration) gemischt, mit 12 μ L HiPerFect versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß inkubiert. Anschließend wurde die Mischung tropfenweise auf der Oberfläche des Mediums über den angewachsenen Zellen verteilt. Die Zellen wurden etwa 72 Stunden bei optimalen Bedingungen im Inkubator gelagert. Anschließend wurde das Medium möglichst vollständig abgenommen. Im Fall der Zelllinie HeLa mit 200 μ L TrypLE™ Express (Gibco, Invitrogen) trypsinisiert und mit 2 mL vollem D-MEM vom Boden abgewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem 15 mL Falconröhrchen abzentrifugiert

(Heraeus, 500 x g, 3 min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde möglichst vollständig abgesaugt und das Pellet in 5 mL komplettem Kulturmedium resuspendiert. Nachdem die Zellzahl bestimmt worden war (\rightarrow 3.8.29), wurden $1-3 \times 10^5$ Zellen wieder in 6-Well Platten ausgesät. Am nächsten Tag (Tag 4 nach der ersten Transfektion) wurden die Zellen (mindestens 3 Wells) erneut nach dem oben beschriebenen Protokoll (Tabelle 3.15) mit der gleichen siRNA (25 nM) transfiziert. Nachdem die Zellen konfluent gewachsen waren (Tag 5 oder 6), wurden die transfizierten Zellen wieder gesplittet und für weitere Analysen eingesetzt. Ein Teil der Zellen ($2,5 \times 10^4$) wurde für MTT-Assay (\rightarrow 3.10.1) und Caspase-Assay (\rightarrow 3.10.2) in Mikrotiterplatten (96-Well) ausgesät. Der andere Teil ($4-8 \times 10^4$ Zellen) wurde in 24-Well Platten ausgesät und für Transportmessungen (\rightarrow 3.9.1) mit radioaktiv markierten Substanzen (Tag 7 bzw. Tag 9 nach der ersten Transfektion) eingesetzt. Ein weiterer 3. Transfektionsschritt mit der siRNA konnte in den 24-Well Platten 24 Stunden vor den Transportmessungen durchgeführt werden. Zur Kontrolle der siRNA-Wirkung wurde alle jeweils 24 Stunden nach der ersten Transfektion Proben zur RNA- (\rightarrow 3.5.1) und Protein-Isolierung (\rightarrow 3.7.1) abgenommen.

Tabelle 3.15: Optimierte Bedingungen für siRNA Transfektion.

Format	Zellzahl	Gesamtvolumen	Volumen HiPerFect	siRNA Endkonzentration
6 Well	$1-3 \times 10^5$	2,3 mL	12 μ L	25 nM
24 Well	$4-8 \times 10^4$	0,5 mL	3 μ L	25 nM

Tabelle 3.16: Verwendete siRNAs mit der Zielsequenz.

siRNA Bezeichnung	Zielsequenz	Hersteller
GFP	CGG CAA GCT GAC CCT GAA GTT CAT	Qiagen
LAT2T	AA GCCCAAGTGTTCAGTGAC TT	Qiagen
LAT2A	AA CCTGCTGTTCCCCATCATC TT	Qiagen
LAT2Q	TGG TGA GAA ATT GTA AAC AAA	Qiagen (Hs_SLC7A8-4_HP)
LAT1*	AAG GAC ATC TTC TCC GTC ATC	Qiagen

* (Li and Whorton, 2005)

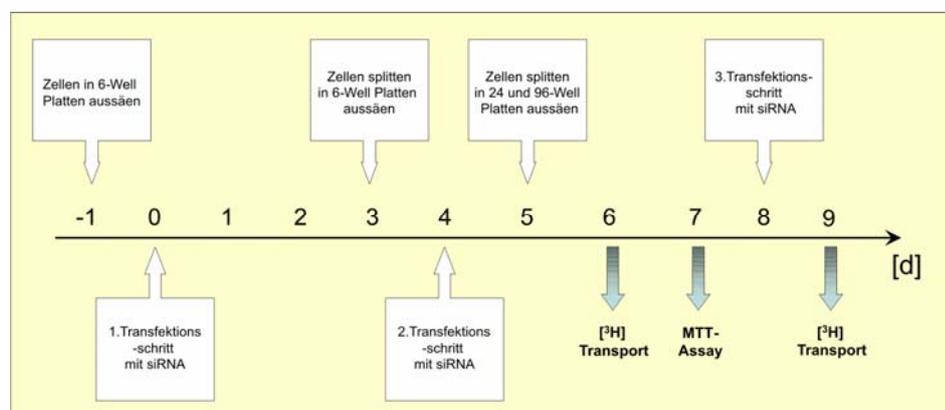


Abbildung 3.3: Optimiertes Zeitschema zur Transfektion mit siRNA.

3.9 Transportmessungen in Zelllinien und Oozyten

3.9.1 Transport in adhären wachsenden Zellen

Ringer 10fach

Nach dem Autoklavieren bei -20°C lagern	NaCl	130 mM
	KCl	4 mM
	CaCl ₂	1 mM
	MgSO ₄	1 mM
	HEPES	20 mM

Ringer 1fach (Lagerung bei -20°C)

10fach Ringer 1:10 verdünnt

NaH ₂ PO ₄	1 mM
Glukose	18 mM

PBS Puffer (1x)

Dulbeccos 1fach AppliChem

Zur Charakterisierung der Melphalan-Aufnahme wurden die Transportversuche zunächst an adhären wachsenden Zelllinien durchgeführt. Damit sich die Zellen nicht während des Transportversuches von der Oberfläche ablösen, wurden die 24-Well-Platten vorher mit Poly-D-Lysin Hydrobromid (2 mg/mL, Sigma) beschichtet. Jeweils 2-3 Tage vor den Experimenten wurden 1,5-3 x 10⁵ Zellen pro Well ausgesät. Nachdem die Zellen vollkommene Konfluenz erreicht hatten, wurden diese 3mal mit 1 mL PBS gewaschen und bis zum Transportversuch in einer Ringer Lösung inkubiert. Für die Bestimmung der [³H]-Aufnahme in die Zellen wurde die Ringer Lösung abgesaugt (Pumpe, Schütt) und durch 195 µL Transportpuffer, versetzt mit der radioaktiv markierten Substanz, pro Well ersetzt. Je nach Experiment enthielt dieser Transportpuffer weitere unmarkierte Substanzen. Dieses ist im Abschnitt 4.5 (Ergebnisteil) für jedes Experiment detailliert beschrieben. Die Aufnahme erfolgte in einem Zeitraum von 10 min für [³H] Leucin und [³H] Melphalan und in einem Zeitraum von 15 min für [³H] Phenylalanin bei Raumtemperatur (Tabelle 3.17). Anschließend wurde der Transport durch Absaugen (Pumpe, Schütt) des radioaktiven Transportpuffers und dreimaligen vorsichtigen Spülens mit eiskaltem PBS Puffer gestoppt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 0,5 mL einer 1 M NaOH Lösung. Am nächsten Tag erfolgte eine Neutralisation mit 0,5 mL einer 1 M HCl Lösung. Das komplette Volumen wurde in Szintillationsröhrchen (MiniVial 6 mL, Sarstedt) überführt, mit 2,5 mL Szintillationsflüssigkeit (LumaSafe Plus, PerkinElmer) versetzt, und die Radioaktivität durch eine 5minütige Messung im Flüssigkeitsszintillationszähler (TRI-

CARB 2900TR Liquid Scintillations Analyzer, Perkin Elmer, Massachusetts, USA) bestimmt. Vor jedem Transportexperiment wurde per Mikroskop (Axiovert 40 CFL, Zeiss) die 100%ige Konfluenz der Zellen optisch bestätigt. Eine Normalisierung der Ergebnisse durch Messung des Proteingehaltes, erwies sich nach jahrelanger Erfahrungen der Mitarbeiter der Abteilung vegetative Physiologie und Pathophysiologie als nicht hilfreich. Zur Bestimmung der Transportkinetik wurden die beiden Parameter IC₅₀- und K_i-Wert mittels SigmaPlot und Excel ermittelt. Als Maßeinheit der Radioaktivität bzw. Anzahl der Zerfallereignisse pro Zeiteinheit diente der dpm Wert (1 dpm = 1 Zerfall/1 Minute). Die sich anschließende Auswertung bezog sich auf die bekannte spezifische Radioaktivität von [³H] Melphalan, [³H] Leucin und [³H] Phenylalanin.

Tabelle 3.17. Verwendete radioaktivmarkierte Substanzen.

Substanz	Konzentration und spezifische Radioaktivität	Hersteller/Vertreter
[³ H] Melphalan (nicht aufgereinigt)	1 mCi, 15 Ci/mmol, 66,7 µM	Jörg Kix (Handelsvertreter)
[³ H] Melphalan (aufgereinigt, →3.11)	2,7 µM, 0,03 µCi/µL	
L-[4,5- ³ H] Leucin	1 mCi, 77 Ci/mmol, 12,9 µM	Hartmann Analytik, Braunschweig
L-[2,3,4,5,6- ³ H] Phenylalanin	250 µCi, 120 Ci/mmol, 8,3 µM	Amersham, Pittsburgh, USA

3.9.2 Transport in Suspensionszellen

Siliconöl im Verhältnis 86:14 (v/v) (550: 200/1cs)

Siliconöl Dowcorning 550	86 mL	Dow Corning GmbH
Siliconöl Dowcorning 200/1cs	14 mL	Dow Corning GmbH

Der Transport in Suspensionszellen wurde anhand einer so genannten „Öl-Stopp“ Zentrifugationstechnik durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglicht es, die Zellen in einem Zentrifugationsschritt durch eine Ölschicht von der Radioaktivität zu entfernen und somit den Transport zu stoppen. Zur Optimierung der Messungen wurde der Transport durch Zugabe einer kalten Pufferlösung schon vorher abgestoppt.

Zur Vorbereitung der Transportmessungen wurden jeweils 200 µL eines Siliconöls (DowCorning 550 und 200/1cs im Verhältnis 86:14) in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Vor jedem Transport wurden die Zellen ausgezählt (→3.8.2) und auf eine Zellzahl von 2 x 10⁶ pro 100 µL Ansatz eingestellt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit jeweils 1 mL PBS Puffer gewaschen und dann das Pellet im

Transportpuffer (Ringer) resuspendiert. Alle Transportmessungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Transport wurde gestartet, indem 100 μL der Zellsuspension zu 100 μL Transportpuffer mit der doppelten Konzentration der radioaktiv markierten Substanz pipettiert wurden. Nach 10 min wurde durch Zugabe von 800 μL kalter PBS Lösung der Transport abgestoppt und das gesamte Volumen (1000 μL) vorsichtig über das Siliconöl in dem vorbereiteten 1,5 mL Reaktionsgefäß geschichtet. Anschließend wurde dieser Ansatz für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Mikro 200R, Hettich), sowohl die wässrige als auch die Ölschicht abgesaugt und das Zellpellet in 500 μL einer 1 M NaOH Lösung resuspendiert. Nach der Neutralisation mit 500 μL einer 1 M HCl Lösung am nächsten Tag wurde das gesamte Volumen in ein Szintillationsröhrchen (Minivail 6 mL, Sarstedt) überführt und jeweils 2,5 mL Szintillationsflüssigkeit (LumaSafe Plus, PerkinElmer) zugegeben. Die Messung der intrazellulären radioaktiven Substanzen erfolgte im Flüssigkeitsszintillationszählgerät (TRI-CARB 2900TR Liquid Scintillations Analyser, Perkin Elmer, Massachusetts, USA) wie im Abschnitt 3.9.1 beschrieben.

3.9.3 Transport in Oozyten

ORi pH 7,6 (eingestellt mit 1 M Tris-Lösung)

Lagerung bei -4°C	NaCl	90 mM
	KCl	3 mM
	CaCl ₂	2 mM
	MgCl ₂	1 mM
	HEPES	5 mM

Barth pH 7,5 (eingestellt mit 1 M NaOH)

Lagerung bei -4°C	NaCl	88 mM
	KCl	1 mM
	MgCl ₂	0,82 mM
	NaNO ₃	0,66 mM
	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,74 mM
	HEPES	5 mM
	Gentamycin	12 mg

3.9.3.1 Vorbereitung der *Xenopus* Oozyten

Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) repräsentieren ein häufig genutztes System zur transienten Expression von heterologen Proteinen für die Untersuchung von Kanälen, Transportern und Rezeptoren, die an der Zellmembran lokalisiert sind. Die Fähigkeit von *Xenopus* Oozyten fremde mRNA bzw cRNA zu

translatieren, wurde erstmals 1971 beschrieben (Gurdon et al., 1971). Nach der Oozyten-Präparation wird eine zuvor *in vitro* synthetisierte cRNA, die für das zu untersuchende Protein kodiert, in die Zelle injiziert. Die Oozyten sind in der Lage, aus der im Überfluss injizierten cRNA das kodierte Protein in großer Menge zu synthetisieren. Diese Überexpression ermöglicht die Messung von Membrantransportprozessen mit Hilfe verschiedener Messmethoden unter Vernachlässigung der in weit geringerer Konzentration exprimierten endogenen membranösen Transportsysteme.

Das folgende Protokoll wurde von B. Burckhardt, vegetative Physiologie und Pathophysiologie in Göttingen, überlassen.

Die Ovarien eines ausgewachsenen weiblichen *Xenopus* Frosches enthalten eine Mischung von Oozyten verschiedener Entwicklungsstufen. Nur die letzten beiden Stufen eignen sich für Expressionsstudien. Oozyten dieser Stufen (5 und 6) sind ungefähr 1,0-1,3 mm groß. Die animale Hemisphäre ist dunkelbraun gefärbt mit leichter Maserung und die vegetative Hemisphäre besitzt ein blass gelblich bis weißes Aussehen und sollte keine dunklen Flecken aufweisen (Abbildung 3.4). Um die aus den Ovarien entnommenen Oozyten aus dem Bindegewebe zu lösen, wurden diese 24 h in einer Barth Lösung mit 0,5 mg/ml Kollagenase (Typ CLSII, Biochrom, Berlin) behandelt. Vor der Mikroinjektion wurden alle beschädigten Oozyten sorgfältig unter dem Stereomikroskop aussortiert. Während dieser Prozedur befanden sich die Zellen in einer mit ORi (18°C) gefüllten Petrischale.



Abbildung 3.4: Verwendte *Xenopus laevis* Oozyten.

3.9.3.2 Mikroinjektion von Oozyten

Die sortierten Oozyten wurden zur Mikroinjektion in eine Injektionskammer (Werkstatt der Abteilung Vegetative Physiologie und Pathophysiologie) mit ORi Lösung überführt. Kapillaren, gezogen aus Glas-Mikropipetten (WPI, 3,5 Nanoliter, Sarasota Florida, USA), wurden an der Spitze abgeschnitten, mit einem leichten Mineralöl (Sigma) gefüllt und in einen Mikromanipulator eingespannt. Danach wurde die jeweilige cRNA (0,6 µg/µL) (→

3.5.4) durch eine an den Mikromanipulator geschlossene Nanoliterpumpe (WPI World precisions instruments, Sarasota Florida, USA) aus einer Pipettenspitze in die Kapillare eingezogen und ca. 2 x 23 nL in jede Oozyte injiziert. Kontroll-Oozyten wurden mit der gleichen Menge an RNase-freiem Wasser injiziert. Die so behandelten Oozyten wurden in 24-Well Platten für drei Tage bei 18°C in einem Kühlschrank inkubiert, wobei täglich die Barth Lösung, versetzt mit Gentamicin, erneuert wurde. In dieser Zeit exprimieren die Oozyten das Transportprotein und integrieren es in die Zellmembran.

3.9.3.3 Influx-Transport in *Xenopus* Oozyten

Alle Experimente an Oozyten wurden bei Raumtemperatur in 24-Well Platten durchgeführt. Der Transport wurde gestartet, indem jeweils 11 Oozyten pro Experiment in 0,5 mL Transportpuffer (ORi) mit der radioaktiv markierten Substanz überführt wurden. Je nach Experiment waren in der Lösung weitere Substanzen, wie z.B. Leucin, Phenylalanin, Melphalan enthalten. Nach einer Inkubationszeit von 30 min, wurde die Substrataufnahme in die Oozyten abgestoppt. Nach einem viermaligen Spülen wurden die Oozyten einzeln in Szintillationsgefäße (Sarstedt) pipettiert und in 250 µL einer 1 M NaOH Lösung für 3 Stunden aufgelöst. Nach der Neutralisation mit 250 µL einer 1 M HCl Lösung konnten pro Röhrchen 2,5 mL Szintillationsflüssigkeit (LumaSafe, PerkinElmer) zugegeben werden. Die Messung der intrazellulären radioaktiven Substanzen erfolgte im Flüssigkeitsszintillationszählgerät (TRI-CARB 2900TR Liquid Scintillations Analyser, Perkin Elmer, Massachusetts, USA).

3.10 Zytotoxizität und Apoptosemessungen

3.10.1 MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität

MTT Lösung (in PBS Puffer gelöst und steril filtriert)

Thiazolylblau Tetrazoliumbromid 5 mg/mL

Lysepuffer

Salzsäure Lösung 0,02 N (v/v)

SDS 20% (w/v)

Die Vitalität der Zellen wurde über die Aktivität der Succinatdehydrogenase, einer mitochondrialen Dehydrogenase, bestimmt. Der angewandte MTT-Test liefert Informationen darüber, wie die Vitalität der Zellen in der Zellkultur durch Inkubation mit bestimmten Substanzen beeinflusst wird. Das wasserlösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-

Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) wird in lebenden, metabolisch aktiven Zellen von der mitochondrialen Succinatdehydrogenase in ein blaues Formazansalz umgewandelt. Die Menge des gebildeten Formazansalzes dient als Maß für die Vitalität der Zellen und wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt. Das Verhältnis der Menge der Formazan-Bildung in behandelten Zellen zur Menge der Formazan-Bildung in unbehandelten Zellen, angegeben in Prozent, ermöglicht eine Aussage über die Vitalität der Zellen bzw. Zytotoxizität der Inkubationssubstanz Melphalan.

Der MTT-Test wurde in klaren 96-Well-Platten für Suspensionszellen mit rundem Boden (Sarstedt) und für adhärent wachsende Zellen mit flachem Boden (Greiner) durchgeführt. Pro Vertiefung wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen in 100 μ L des entsprechenden Kulturmediums ausgesät (37°C, 5% CO₂, Inkubator BBD 6220 Heraeus). Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit verschiedenen Endkonzentrationen (0, 1, 2,5, 10, 25, 100, 1000 μ M) des Zytostatikums Melphalan (Sigma) für 24 h in einem Gesamtvolumen von 200 μ L. Nach den 24 h wurden die Platten für 5 min bei 500 x g (Zentrifuge 5310R, Eppendorf) abzentrifugiert und das Medium in einen speziellen Sammelbehälter für Zytostatika abgesaugt. Die MTT-Lösung wurde mit vorgewärmtem Kulturmedium im Verhältnis 1:10 verdünnt (Endkonzentration der Lösung: 0,5 mg/mL) und jeweils 100 μ L in jede Vertiefung pipettiert. Anschließend wurden die Platten für 1 Stunde im Inkubator gelagert. Die Reaktion vom MTT zum blauen Farbstoff wurde unter dem Mikroskop optisch bestätigt und durch Zugabe eines Lysepuffer abgestoppt. Zur vollständigen Zellyse wurde die Platte lichtgeschützt für mindestens 16 Stunden auf den Schüttler (Polymax 1040, Heidolph) gestellt. Die Messung der Absorption bei 570 nm erfolgte am Tecan Ultra (Software: X Flour4 Version 4,4, Tecan Crailsheim). Die Absorption der Wells ohne Zellen wurde als Blank eingesetzt und die Vitalität der Zellen bzw. Zytotoxizität des Melphalans entsprechend berechnet.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden die Versuche an drei unabhängigen Tagen unter den gleichen Bedingungen mit jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Vor jeder Inkubation mit dem Melphalan wurden zuvor in 6-Well-Platten ausgesäte Zellen zur RNA-Isolierung in 350 μ L RLT-Puffer lysiert und bis zur weiteren Isolierung (\rightarrow 3.5.1) bei -20°C weggefroren.

3.10.2 Bestimmung der Apoptose durch Messung der Caspase-3/7-Enzymaktivität

Substratstammlösung 5 mM

Z-DEVD-R110	2 mg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	264 µL

Rhodamin R110 Referenzlösung 5 mM

Rhodamin 110	0,5 mg
DMSO	273 µL

Substratansatz (100 Reaktionen)

5fach Reaktionspuffer	1,6 mL
Dithiothreitol (DTT)	40 µL
Z-DEVD-R110 Substrat	4 µL
ddH ₂ O	2,36 mL

Lysepuffer

Kurz vor dem Beginn wurde der 20fach Zellysepuffer bei Raumtemperatur aufgetaut, mit ddH₂O 1:20 verdünnt und auf Eis vorgekühlt. Pro Well wurden 40 µL eingesetzt.

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes. Dieser Prozess ist sowohl biochemisch als auch morphologisch von der Nekrose zu unterscheiden. Im Vergleich zu einer nekrotischen Zelle sind apoptotische Zellen durch Verdichtung des Chromatins, Zellkondensation und der Entstehung von *apoptotic bodies* morphologisch charakterisiert. Zu den biochemischen Veränderungen der Apoptose gehören: Zellkernfragmentierung, Spaltung und Degradation von zahlreichen Zellproteinen. Der programmierte Zelltod wird durch eine Signaltransduktionskaskade von Enzymen schrittweise initiiert. Zu den wichtigsten Enzymen zählen hierbei die Caspasen. Bei der Bestimmung der Effektorcaspase 3 und 7-Enzymaktivität wurde das EnzCheck[®] Caspase-3 Assay Kit von Invitrogen (Karlsruhe) angewendet. Hierbei handelt es sich um Proteasen mit einer Substratspezifität für die Peptidsequenz Asp-Glu-Val-Asp (DEVD). Parallel zum Zellvitalitätstest wurde die Caspase3/7-Enzymaktivität nach der Behandlung mit dem Zytostatikum Melphalan in einem Zeitraum von 16 Stunden gemessen. Der EnzCheck[®] Caspase-3 Assay wurde in schwarzen Mikrotiterplatten (96-Well) mit durchsichtigem und flachem Boden (Costar[®] Corning Incorporated, USA) sowohl für Suspensionszellen als auch adhärent wachsende Zellen durchgeführt. Pro Vertiefung wurden $2,5 \times 10^4$ Zellen in 100 µL Medium ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation (37°C, 5% CO₂, Inkubator BBD 6220 Heraeus) mit verschiedenen Endkonzentrationen (0, 10, 25, 100 µM) des Zytostatikums Melphalan (Sigma) für 16 h in einem Gesamtvolumen von 200 µL. Anschließend wurden die Platten für 5 min bei

500 x g (Centrifuge 5310R, Eppendorf) abzentrifugiert und das Medium in einen speziellen Sammelbehälter für Zytostatika abgesaugt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 40 µL eiskaltem Lysepuffer. Zur vollständigen Lyse wurden die Platten zusätzlich im flüssigen Stickstoff eingefroren und auf Eis wieder aufgetaut. Währenddessen wurde der Substrat-Mastermix frisch angesetzt und die Proben für eine Eichgerade, bestehend aus dem Rhodamin R110, entsprechend verdünnt. Anschließend wurden je 40 µL von dem Mastermix mit dem Substrat in jedes Well pipettiert. Die Messung der Fluoreszenz am Tecan Ultra (Crailsheim) erfolgte über einen Zeitraum von 2-3 Stunden mit folgenden Einstellungen des Gerätes (Filter: Fluoreszenz 485/535 nm; Gain (Manuel): 25-30; Number of flashes: 10; Lag time: 0 µs; Integration time: 20 µs; Kinetic interval: 200 Zyklen; Temperatur: 37°C). Vor jeder Inkubation mit dem Melphalan wurden Zellen in 6-Well-Platten ausgesät, zur RNA-Isolierung in 350 µL RLT-Puffer lysiert und bis zur weiteren Isolierung (→ 3.5.1) bei -20°C weggefroren.

3.11 Analytische Methode

Das kommerziell erworbene [³H] Melphalan zeigte in einer ganzen Reihe von zunächst durchgeführten Transportmessungen ein für Substrate von Enzymen bzw. Transportproteinen untypisches Verhalten, nämlich eine lineare Steigerung des Transportes mit der Konzentration ohne dass eine Sättigung erkennbar wurde. Dies brachte uns auf den Verdacht, dass das hier verwendete Melphalan radiochemisch hochgradig verunreinigt sein könnte. Die Überprüfung der Reinheit des [³H] Melphalan erfolgte mittels chromatographischer Bestimmung über ein HPLC-System mit UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 261 nm (655A variable Wavelength UV Monitor). Dazu wurde das Melphalan über eine Reversed-Phase-C18 Säule (HPLC-Cartridge 125-4) aufgetrennt und isokratisch mit Methanol:Phosphatpuffer (0,005 M, pH 4) im Verhältnis 42:58 (v/v) eluiert. Die Flussrate (1,5 mL/min) wurde über eine Pumpe (L-6000A, Merck HITACHI) gesteuert. Zum Probenauftrag stand ein automatischer Probengeber (Autosampler 655A-40, Merck HITACHI) zur Verfügung. Mit Hilfe des D-6000A Interface-Systems und der D-7000 HPLC-System-Manager Software konnten die aufgezeichneten Chromatogramme ausgewertet werden. Als Referenzsubstanz diente nichtmarkiertes Melphalan (Sigma), welches die gleiche Retentionszeit wie das [³H] Melphalan besaß.

In der Tat zeigte sich in der Chromatographie nicht nur im Bereich der Retentionszeit von Melphalan Radioaktivität. Diese war vielmehr zu einem Anteil von 90% in den Fraktionen, die vor und nach dem Melphalanpeak gesammelt worden sind. Jedoch konnte aufgrund des

hohen Anteils der unspezifischen Radioaktivität, deren chemische Natur nicht näher bestimmt werden konnte, dieses Melphalan nicht verwendet werden.

Die Aufreinigung der [³H] Melphalanlösung erfolgte nach den in der Tabelle 3.18 beschriebenen chromatographischen Bedingungen. Dazu wurden jeweils 100 µL injiziert und die Fraktionen über den Zeitraum gesammelt an dem der Melphalanpeak auf dem Chromatogramm erschien. Die gesamten Fraktionen wurden unter Stickstoff eingedampft und in einer 0,9% NaCl-Lösung (pH 4, eingestellt mit 1 M Salzsäurelösung) wieder aufgenommen. Anschließend wurden die gepoolten Proben in 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Konzentration der aufgereinigten [³H] Melphalanlösung wurde mittels einer Eichgerade unter den in Tabelle 3.18 genannten chromatographischen Bedingungen bestimmt.

Rechromatographien des aufgereinigten Melphalans haben belegt, dass das [³H]-Melphalan unter unseren Lagerungs- und Handhabungsbedingungen durchaus ausreichend stabil war, woraus wir schlussfolgern, dass wir tatsächlich eine ungenügende Präparation erhalten hatten. Nur das aufgereinigte [³H] Melphalan wurde für die weiteren Transportmessungen verwendet.

Tabelle 3.18: Zusammenfassung der chromatographischen Bedingungen.

HPLC-System	Chromatographische Bedingungen
Trennsäule (stationäre Phase)	HPLC-Catridge, 125 x 4 mm, LiChrosper® 100, Reversed Phase C-18, Teilchendurchmesser 5µm
Fließmittel (mobile Phase)	Methanol : Phosphatpuffer 0,005 M pH 4 (42:58, v/v)
Flussrate	0,5 mL/min - 1,5 mL/min
Injektionsvolumen	10-100 µL
Detektion	UV Detektion 261 nm

3.12 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der pharmakokinetischen und pharmakogenetischen Daten erfolgte anhand des Computerprogramms SPSS (Version 12.0). Zur graphischen Darstellung der erhobenen Daten wurden die Programme Exel, SPSS (Version 12.0), SigmalPlot (Version 9.0) oder CorelDraw X3 (Version 13.0) für Windows verwendet.

Deskriptive Statistik:

Die deskriptive bzw. beschreibende Statistik diente zur Darstellung der Verteilung und Variabilität der Pharmakokinetik, Pharmakogenetik und Expressionsdaten. Diese erfolgte

entweder in Form von Tabellen, graphischen Darstellungen oder typischen Kenngrößen, die im Folgenden zusammengefasst sind:

Der **Mittelwert** ist das arithmetische Mittel der Messwerte, berechnet aus der Summe der Messwerte geteilt durch ihre Anzahl.

Bei einer nach der Größe sortierten Reihe von Messwerten ist der **Median** der Wert, der von gleich vielen kleineren und größeren Werten eingerahmt wird. Bei einer geraden Anzahl von Messwerten ist der Median das arithmetische Mittel der beiden mittleren Werte.

Die **Varianz** ist ein Maß für die Messgenauigkeit. Sie entspricht der Summe der Standardabweichungen aller Messwerte vom Mittelwert der Stichprobe im Quadrat. Je geringer die Varianz ist, desto größer ist die Zuverlässigkeit der Messung.

Die **Standardabweichung** ist ein Maß für die Streuung der Messwerte, berechnet aus der positiven Quadratwurzel der Varianz. Trägt man die Standardabweichung zu beiden Seiten des Mittelwertes auf, liegen bei normalverteilten Werten etwa 67% aller Werte in diesem Intervall.

Der **Standardfehler** berechnet sich aus der Standardabweichung dividiert durch die Quadratwurzel des Stichprobenumfangs. Je mehr Einzelwerte desto robuster ist der Mittelwert, desto kleiner der Standardfehler.

Normalverteilung (Gauß-Verteilung): Die Normalverteilung wird angewendet, um die Lage und die Streuung von Messwerten zu beschreiben. Die Normalverteilung unterstellt eine symmetrische Verteilungsform in Form einer Glocke (Gauß-Funktion, Gauß-Glocke), bei der sich die Werte der Zufallsvariablen in der Mitte (Mittelwert) der Verteilung konzentrieren und mit größtem Abstand zur Mitte immer seltener auftreten.

Chancenverhältnis (*odds ratio*): Das Chancenverhältnis wird verwendet, um den Unterschied zweier Aussagen (*odds*) über die Stärke von Zusammenhängen zu untersuchen. Ein Chancenverhältnis von 1 bedeutet, dass es keine Unterschiede zwischen den *odds* gibt. Ist die *odds ratio* > 1 sind die *odds* der ersten Gruppe größer und ist die *odds ratio* < 1 sind sie kleiner als die der zweiten Gruppe. Das Chancenverhältnis findet in Fall-Kontroll-Studien häufig Anwendung.

Beurteilende Statistik: In der beurteilenden (induktiven) Statistik leitet man aus den Daten einer Stichprobe Eigenschaften einer Grundgesamtheit ab. Die Wahrscheinlichkeitstheorie liefert die Grundlagen für die erforderlichen Schätz- und Testverfahren. Es wird als Verneinung der eigentlichen Arbeitshypothese eine Nullhypothese aufgestellt. Die Prüfung

diese Nullhypothese erfolgt mit Hilfe eines statistischen Testverfahrens, welches anhand einer aus den Beobachtungen errechneten Prüfgröße eine Entscheidung über Annahme oder Ablehnung der Nullhypothese herbeiführt. In der Statistik heißen Unterschiede oder Zusammenhänge signifikant, wenn die Wahrscheinlichkeit gering ist, dass sie durch Zufall zustande gekommen sind. Das Ergebnis wurde als signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit mit $P < 0,05$ unter 5% lag.

Prüfung auf Normalverteilung: Die Prüfung der Normalverteilung erfolgte mit Hilfe des statistischen Tests nach Kolmogorov-Smirnov. Es liegt keine Normalverteilung vor, wenn der Test ein Signifikanzniveau $P < 0,05$ besaß.

Gruppenvergleich: Statistische Tests, welche eine Normalverteilung der Messwerte zur Voraussetzung haben, nennt man parametrische Tests. Im Fall einer Normalverteilung werden die Mittelwerte der Stichproben auf signifikante Unterschiede untersucht. Gibt es eine Abhängigkeit zwischen den Messwerten der Stichprobe findet der T-Test bei einer Normalverteilung Anwendung. Sind die Messwerte nicht normalverteilt, wird der Median berechnet und zum Vergleich abhängiger Stichproben ein nicht-parametrischer Test (z.B. Wilcoxon-Test) verwendet. Für zwei unabhängige Stichproben kann sowohl der T-Test (Normalverteilung) als auch der Mann-Whitney-Test (keine Normalverteilung) verwendet werden. Bei mehr als zwei Gruppen, können die nicht-parametrischen Tests wie z.B. Kruskal-Wallis-Test oder Jonckheere-Terpstra-Test verwendet werden.

Varianzanalyse: Die Varianz einer (univariat) oder mehrerer (multivariat) Zielvariable(n) wird dabei durch den Einfluss einer oder mehrerer Einflussvariablen (Faktoren) erklärt. Mit den Prüfgrößen des Verfahrens wird getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen (z.B. interindividuell) größer als die Varianz innerhalb der Gruppen (z.B. intraindividuell) ist.

Korrelationsanalyse: Die Korrelationsanalyse untersucht den Zusammenhang zwischen zwei Variablen. Die Berechnung erfasst Wertepaare, die aus den abhängigen Stichproben gebildet werden. Der Korrelationskoeffizient r stellt ein Maß für die lineare Abhängigkeit zweier statistischer Variablen dar. Die Werte für r können zwischen +1 und -1 liegen. Je näher $|r|$ bei 0 ist, desto schwächer ist der "lineare Zusammenhang", d.h. die Korrelation.

Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test): Im χ^2 -Test wird die Häufigkeit eines Merkmals in zwei statistisch unabhängigen Gruppen verglichen und zugleich die Frage nach der Signifikanz des Testes beantwortet. Der Chi-Quadrat-Test funktioniert als asymptotischer Tests und ist deshalb erst ab einer bestimmten Stichprobengröße zuverlässig. Im Falle der Kontingenztafeln gilt als Faustregel, dass pro Feld einer Kontingenztafel mindestens etwa

fünf Beobachtungen erwartet werden und dass mehr als ein Freiheitsgrad vorhanden ist. Ist dies nicht erfüllt kommt der exakte Fisher-Test zum Einsatz.

Beurteilung der Genotypen (Hardy Weinberg-Gesetz): Das Hardy-Weinberg-Gesetz besagt folgendes: In einer idealen Population bleiben die prozentualen Anteile bestimmter Allele über Generationen hinweg gleich. Aus den beobachteten Häufigkeiten wurden die Allelfrequenzen ermittelt und aus diesen wiederum die zu erwartenden Verteilungen der Genotypen nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz errechnet. Durch Vergleich der beobachteten mit den erwarteten Werten konnte das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts als ein Maß für die Güte der Genotypisierungen geprüft werden. Dieses war für alle Bestimmungen erfüllt (alle P-Werte > 0,05 im χ^2 -Test). Zusätzlich wurden beide Allelfrequenzen mit der SNP Datenbank (dbSNP) des *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov) verglichen. Die Nomenklatur der Genotypen erfolgte nach den Dunnen und Antonarakis 2001 (den Dunnen and Antonarakis, 2001).

Berechnung der genetischen Variabilität:

Die Parameter Nukleotid Diversität (θ) und durchschnittliche Heterozygotität (π) wurden zur Darstellung der genetischen Variabilität wie folgt berechnet (Glatt et al., 2001):

$$\theta = S / \left[L * \left(\sum_{i=1}^n 1/i \right) \right].$$

S entspricht hierbei der Anzahl der Segretationsstellen, n entspricht

der Chromosomenanzahl und L der Anzahl der sequenzierten Nukleotide pro Chromosom.

$$\pi = \left(\sum_{j=1}^s 2p_j(1-p_j) \right) / L * (1-1/n),$$

mit p_j als beobachtete Frequenz für j^{th} SNPs. Jeder

Parameter wurde zusätzlich separat für die kodierende, nichtkodierende, 5'-flankierende Promotorregion sowie für alle Introns und nichttranslatierende Bereiche bestimmt.

3.13 Kopplungsungleichgewicht und Haplotypenanalyse

Das genetische Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) wurde im paarweisen Vergleich mit der Haploview-Software (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, UK) erstellt. Nach der Vertrauensintervallmethode von Gabriel et al., 2002 (Gabriel et al., 2002) wurden Haplotypenblöcke unter Anwendung des Programms Halpoview bestimmt. Es wurden nur Varianten mit einer Minor Allelfrequenz (MAF) größer als 1% für die *linkage disequilibrium* Analyse eingeschlossen. In die

Bewertung ging der D' Wert zwischen zwei Varianten ein, sowie die Vertrauensintervalle für D' . D' ist ein Parameter zur Beschreibung der biologischen Rekombination zwischen zwei genetischen Markern. Er kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Der Wert 0 bedeutet ein komplettes Kopplungsgleichgewicht, d.h. die Häufung der Kombination zweier Marker ist so, wie man es auf Grund der jeweiligen Allelfrequenz erwarten würde. Der Wert wird erreicht, wenn von 4 theoretisch möglichen Kombinationen zweier Marker mindestens eine nicht beobachtet wird.

Haplotypen und ihre Häufigkeiten wurden mit dem Programm PHASE (Version 2.1.1) berechnet (Stephens et al., 2001; Stephens and Donnelly, 2003). Die Abschätzung der Haplotypen erfolgte in dem Programm in 10 unabhängigen Läufen. Die Durchläufe ergaben hohe Übereinstimmungen in der Abschätzung und der Lauf mit dem höchst wahrscheinlichen Haplotypen-Ergebnis wurde für weitere Auswertungen herangezogen.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Membrantransportproteine für die Aufnahme in menschliche Zellen verantwortlich sind und welche Bedeutung genetische Varianten in diesen Transportproteinen haben. Diese Untersuchungen erfolgen einerseits in einer klinischen Studie an Patienten unter Behandlung mit Melphalan, wo es um die Bedeutung angeborener Polymorphismen in den Aminosäuretransportern LAT1 und LAT2 für die Pharmakokinetik, Nebenwirkungen und Wirkung des Zytostatikums Melphalan ging. Und andererseits wurde der Melphalan-Transport in unterschiedlichen zellulären Modellen analysiert.

4.1 Klinische Studie zur Melphalan Pharmakokinetik und -genetik

In die prospektive klinische Studie sind 84 Patienten mit Multiplen Myelom und weiteren B-Zell-Lymphomen eingeschlossen worden. Die Studie wurde multizentrisch sowohl an der Universitätsmedizin Charité in Berlin als auch an der Universitätsmedizin der Georg-August-Universität Göttingen durchgeführt und für beide Institutionen lag ein positives Votum der zuständigen Ethik-Kommissionen vor. Alle in die Studie eingeschlossenen Patienten haben nach Information über die Studie ihr schriftliches Einverständnis gegeben.

4.1.1 Patientendaten

4.1.1.1 Untersuchte Patienten

Von den 84 Patienten waren 53 Männer und 31 Frauen. Das Multiple Myelom trat bei 61 Patienten auf und zählte damit zu der häufigsten Erkrankung, gefolgt von Non-Hodgkin-Lymphomen als Diagnose bei 15 Patienten und 8 Patienten mit verschiedenen Arten von Lymphomen. In Tabelle 4.1 sind die demographischen Daten aller analysierten Patienten für Alter, Körpergewicht, Größe, Körperoberfläche, Kreatininclearance ($Cl_{\text{Kreatinin}}$) und Kreatininserumspiegel angegeben.

Tabelle 4.1: Patienten Charakteristika (n = 84; 53 Männer und 31 Frauen).

Patienten	Mittelwert \pm SD	Bereich
Alter (Jahre)	59,5 \pm 9,5	33-77
Körpergewicht (kg)	75,9 \pm 14,2	48-130
Größe (cm)	171,1 \pm 7,6	155-188
Körperoberfläche (m ²)	1,9 \pm 0,2	1,5-2,4
$Cl_{\text{Kreatinin}}$ (mL/min)*	88,3 \pm 36,3	11,9-179,8
Kreatininserum (mg/dL)	1,1 \pm 0,9	0,4-7,4

SD: Standardabweichung; Cl: totale Plasmaclearance * Formel nach Cockcroft and Gault (Cockcroft and Gault, 1976)

4.1.1.2 Untersuchte Dosierungen und Arzneimittelkombinationen

Die Patienten wurden im Rahmen ihrer Therapie mit verschiedenen Melphaladosen in Kombination mit weiteren Zytostatika (BEAM Schema) oder in einer Monotherapie (Hochdosis-Melphalan und Therapieschema nach Alexanian) behandelt (siehe Abschnitt 1.7.2). Da die Melphaladosen entsprechend dem Therapieschema zwischen 10 mg/m² und 140 mg/m² variierten, wurden die Patienten zur weiteren statistischen Analyse in fünf verschiedene Dosisgruppen unterteilt. Weiterhin gab es Patienten, die nicht nur eine Einzeldosis Melphalan bekommen hatten, sondern eine weitere Dosis Melphalan in gleicher Höhe am folgenden Tag. Dieses wurde bei der statistischen Analyse berücksichtigt, indem beide Dosen als eine Gesamtdosis gezählt und entsprechend den 5 Dosisgruppen zugeordnet wurden. Zusätzlich erhielten die Patienten Medikamente gegen Zytostatika induziertes Erbrechen und Übelkeit. Weiterhin wurden Opiate zur Schmerzbehandlung sowie Glukokortikoide zur Immunsuppression eingesetzt.

4.1.2 Pharmakokinetik von Melphalan: Analyse nach dem 2-Schritt-Verfahren

Die Melphalan-Plasmakonzentrationsdaten lagen bereits zu Beginn der Arbeit vor (Kühne, 2004). Zur Bestimmung der Pharmakokinetik des Melphalans wurde zunächst das Ein-Kompartiment-Modell, als einfachstes pharmakokinetisches Modell, ausgewählt, um jeden einzelnen der Konzentrations-Zeit-Verläufe nach einer intravenösen Gabe von Melphalan zu analysieren (siehe Kapitel 0). Mit Hilfe des Programms WinNonlin wurden die entsprechenden Parameter, wie Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve ($AUC_{0-\infty}$), die totale Plasmaclearance, die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) und das Verteilungsvolumen (V) von Melphalan mit Hilfe einer nichtlinearen Regressionsanalyse bestimmt. Da nur die Plasma-, aber nicht die Urinkonzentrationen bestimmt wurden, konnte nur eine totale und keine renale Melphalanclearance bestimmt werden.

Für die weitere statistische Auswertung war es notwendig zu überprüfen, ob die pharmakokinetischen Parameter normal verteilt waren oder nicht. Nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test konnte eine Normalverteilung der Clearance ausgeschlossen werden. Als Konsequenz wurden nur nicht-parametrische Tests zur weiteren statistischen Analyse angewendet werden. Ausgedrückt als Verhältnis zwischen höchstem und niedrigstem Wert variierte die totale Melphalanclearance 6,2fach mit dem Median von 323,2 mL/min/m²

(Tabelle 4.2). Eine noch größere Variabilität 12fach konnte bei dem Verteilungsvolumen mit einem Median von 14,9 L/m² (4,7-55,6 L/m²) beobachtet werden (Tabelle 4.2). Die weitere statistische Analyse zeigte eine signifikante Abhängigkeit zwischen der Melphalanclearance und dem Geschlecht. Dabei wiesen Männer eine signifikant höhere Melphalanclearance auf als Frauen ($P = 0,005$, Kruskal-Wallis Test) mit einem Median (Bereich) von 346 mL/min/m² (115-715) gegenüber einem Median (Bereich) von 284 mL/min/m² (117-499) bei den Frauen. Mittels multipler Regressionsanalyse konnte dieser Effekt des Geschlechts auf die Clearance nicht auf Geschlechtsunterschiede im Körpergewicht bzw. in der Nierenfunktion zurückgeführt werden (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 4.1 ist die Variabilität der Melphalanclearance illustriert. Die kleine eingefügte Graphik zeigt eine lineare Beziehung zwischen der Melphalanclearance und der Kreatininclearance ($P < 0,001$). Kreatinin ist ein Abbauprodukt des Stoffwechsels, das normalerweise durch glomeruläre Filtration von der Niere ausgeschieden wird und nicht nennenswert rückresorbiert wird, die Kreatininclearance dient damit als Maß für die so genannte glomeruläre Filtrationsrate. Wenn die Nieren geschädigt sind, wie es bei einigen Patienten mit Multiplem Myelom der Fall ist, steigt der Kreatininserumspiegel an und die Clearance sinkt. Die Bestimmung der Kreatininclearance diene somit als Maß für die Nierenfunktion. Jedoch konnten mit einem r^2 Wert von 0,14 nur etwa 14% der interindividuellen variablen Melphalanclearance durch die individuell unterschiedliche Nierenfunktion bei den Patienten erklärt werden. Weiterhin zeigte sich über den gesamten Dosisbereich eine lineare Beziehung zwischen der Dosis und der individuell gemessenen maximalen Melphalankonzentration (C_{\max}) sowie zwischen der Dosis und der AUC (Abbildung 4.2). Dieses ist bei dem breiten Bereich der gewählten Dosierungen nicht selbstverständlich, bei höheren Dosen hätte man zum Beispiel eine Sättigung von Elimination oder Rückresorption erwarten können. Innerhalb der Dosisgruppen variierten die AUCs zwischen den Patienten, die mit 10-16 mg/m² Melphalan behandelt worden sind, etwa um das 4fache und um das 2fache bei Patienten, die mit der hohen Melphaladosis von 140 mg/m² behandelt wurden.

Tabelle 4.2: Pharmakokinetische Parameter von Melphalan nach individueller Analyse aller Patienten entsprechend einem Ein-Kompartiment-Modell.

Dosis [mg/m ²]	n		AUC [mg/L*min]	C _{max} [mg/L]	t _½ [min]	Cl _{total} [mL/min/m ²]	V [L/m ²]
10-16	30	Median	46,8	0,7	31,5	320,8	13,1
		Bereich	21,0-113,9	0,3-1,1	11,2-77,4	116,8-714,7	8,1-31,3
20	11	Median	64,8	1,1	40,2	308,5	14,9
		Bereich	41,5-130,3	0,5-2,1	10,5-98,4	153,5-482,0	4,7-34,4
50-70	12	Median	254,5	2,4	43,6	268,2	15,8
		Bereich	168-458,6	1,7-3,6	9,2-75,2	152,6-416,7	5,6-27,0
100	18	Median	289,5	3,3	39,3	330,8	17,0
		Bereich	182,8-871,3	1,4-5,9	25,7-70,4	114,8-546,9	9,6-55,6
140	13	Median	395,5	5,2	35,0	354,0	15,0
		Bereich	327-492,8	3,2-10,7	10,8-39,2	284,1-428,2	5,2-24,1
Gesamt	84	Median Bereich			37,5 9,2-98,4	323,2 114,7-714,7	14,9 4,7-55,6

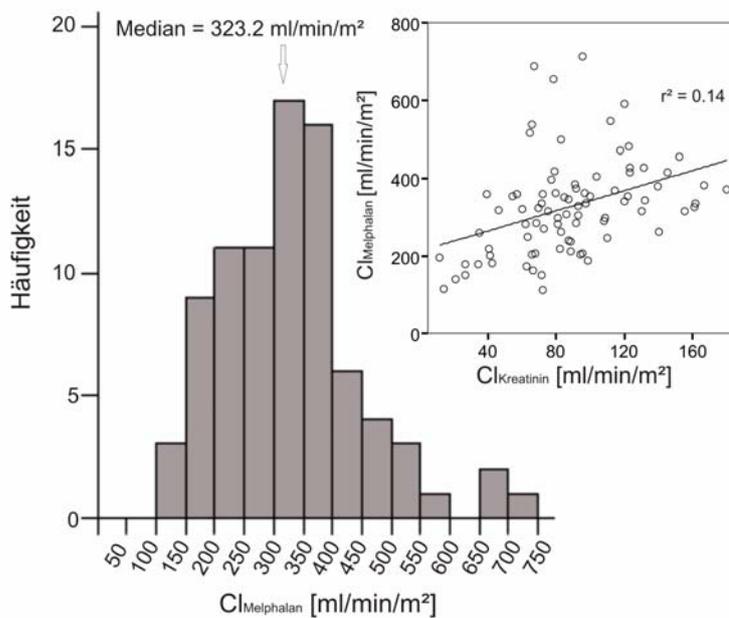


Abbildung 4.1: Häufigkeitsverteilung der Melphalan-Clearance bei 84 Patienten. Die Höhe der Balken gibt die Anzahl der untersuchten Patienten an. Die eingefügte Graphik gibt die Abhängigkeit der Melphalan-Clearance von der Kreatinin-Clearance an ($P < 0.001$, $r^2 = 0.14$).

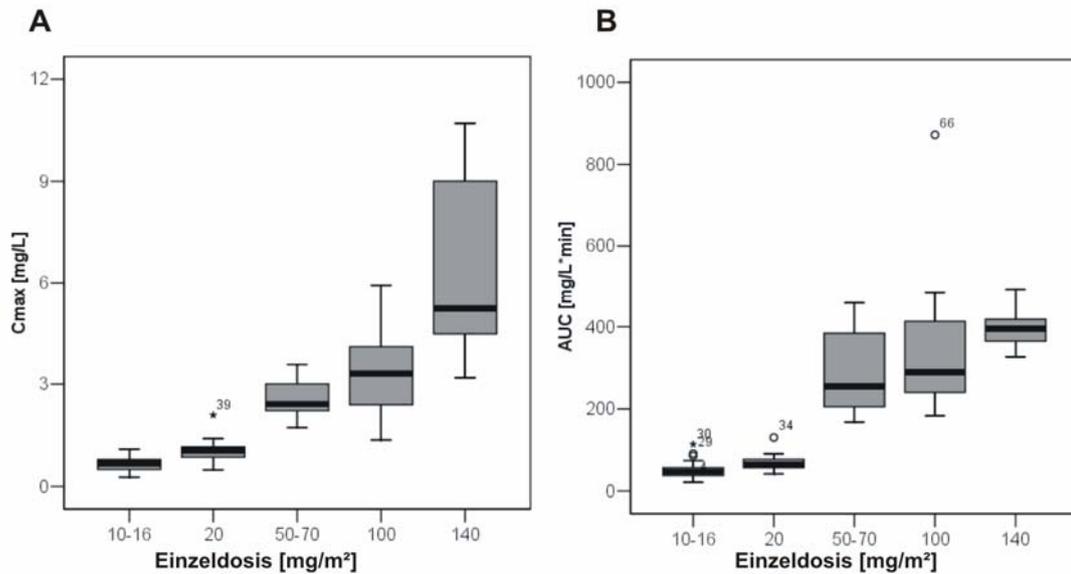


Abbildung 4.2: Lineare Korrelation **(A)** zwischen der Melphalandosis und der maximalen Melphalankonzentration C_{\max} ($r = 0,83$, $P < 0,001$) sowie **(B)** zwischen der Melphalandosis und der AUC ($r = 0,85$, $P < 0,001$). Die mittlere fette Linie in den Kästchen bezeichnet den Median, die grau unterlegten Kästchen den Bereich zwischen der 25% und 75% Quartile und die Antennen bezeichnen den Bereich aller Werte mit Ausnahme von Ausreißern.

4.1.3 Populations-pharmakokinetische Analyse

Die im Abschnitt 4.1.2 dargestellte Pharmakokinetik-Analyse jedes einzelnen Patienten mit anschließender statistischer Zusammenfassung (so genanntes *two-stage*-Verfahren) hat für die detaillierte Auswertung gewisse Grenzen, insbesondere, da hier um die Patienten nicht zu belasten, nur eine relativ kleine Zahl von Blutproben abgenommen wurde. Daher wurde in einem weiteren Schritt eine ergänzende populations-pharmakokinetische Analyse von Melphalan unter Verwendung der Software NONMEM durchgeführt. Zur Analyse lagen insgesamt 504 Eingaben zu Melphalankonzentrationen, Zeiten und Dosisinformationen von 84 Patienten vor. Statistisch belegt durch eine signifikante Abnahme der Zielfunktion um 289 ($P < 0,001$, Likelihood-Ratio-Test) und durch lineare Streuung in den Identitäts-Plots (erwartete und beobachtete Werte) konnten die Konzentrations-Zeit-Daten des Melphalans mit Hilfe des Zwei-Kompartiment-Modells deutlich besser beschrieben werden als mit dem Ein-Kompartiment-Modell.

Auf der Basis des Zwei-Kompartiment Pharmakokinetik-Modells wurden die Kovariablen wie Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Dosis und Kreatinin-clearance als mögliche Einflussgrößen auf die pharmakokinetischen Eigenschaften bzw. Parameter nach dem *general additive* Modell mit der Software X-Pose Version 4.0 untersucht. Entsprechend dieser Analyse zeigten sich eine Abhängigkeit des Verteilungsvolumens vom Körpergewicht sowie eine Abhängigkeit des Körpergewichtes und der Kreatinin-clearance

auf die Melphalan-Plasmaclearance. Im abschließenden Populations-Pharmakokinetik-Modell wurde das Verteilungsvolumen als eine lineare Funktion des Körpergewichtes dargestellt, indem das Verteilungsvolumen um 0.26 Liter pro kg Körpergewicht zunimmt (Tabelle 4.3). Zur Modellierung der Melphalan-Plasmaclearance wurden damit zwei weitere Zusammenhänge berücksichtigt. Die erste Beziehung beschreibt die gewichtsabhängige Verteilung der Kreatininclearance. Daraus resultiert wie in der Tabelle 4.3 angegeben ein Populationsmittelwert von 0.0027 L/min*min/mL in einer Erhöhung der Melphalanclearance pro 1 mL/min Kreatininclearance. Die zweite Beziehung äußert sich mit einer Erhöhung der Melphalanclearance von 0.00032 L/min pro kg Körpergewicht.

4.1.4 Populations-pharmakokinetische Parameter von Melphalan

Mit Hilfe der populations-pharmakokinetischen Software NONMEM konnten die gemessenen Konzentrations-Zeit-Verläufe der 84 Patienten mit einem Zwei-Kompartiment-Modell beschrieben werden. Dieses Modell hat mindestens 4 charakteristische Kenngrößen bzw. Parameter, nämlich das Verteilungsvolumen im zentralen und peripheren Kompartiment, die totale und die Inter-Kompartiment Melphalanclearance. In einem zweiten Schritt erlaubt die Software NONMEM auch für jeden einzelnen Patienten individuelle Parameter wie AUCs (Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve), Verteilungsvolumen und Clearance zu berechnen, und zwar mit Hilfe eines Bayesischen Verfahrens aus den populations-pharmakokinetischen Parametern. Diese Analyse geht also genau umgekehrt vor wie die zuerst durchgeführte Zwei-Stufen-Methode mittels WinNonlin und anschließender nicht-parametrischer statistischer Zusammenfassung der pharmakokinetischen Daten.

Wie in der Tabelle 4.3 zusammengefasst, lag das zentrale Verteilungsvolumen für eine typische Person mit 70 kg Körpergewicht bei 18,3 L (95%-Vertrauensintervall: 10,3-32,1). Dabei zeigte sich entsprechend dem Populationsmodell wie eine Abhängigkeit des Verteilungsvolumens vom Körpergewicht mit einer Zunahme von 0,26 L pro 1 kg Körpergewicht beschrieben werden kann (Tabelle 4.3). Zwischen dem individuell niedrigsten (7,0) und dem höchsten Wert (77,4) des Verteilungsvolumens gab es eine 11,1fache Variation. Für eine Person mit einer normalen Kreatininclearance von 120 mL/min und einem Körpergewicht von 70 kg lag die Melphalan-Plasmaclearance bei 0,551 L/min (95%-Vertrauensintervall: 0,430- 0,705). Dabei variierten die individuellen Melphalanclearances um das 5,2-fache zwischen 0,18 und 1,03 L/min. Weitere Parameterabschätzungen des Zwei-Kompartiment-Modells sind zum einen die Inter-Kompartiment Clearance zwischen dem zentralen und peripheren Kompartiment (Q) mit

einem Wert von 0,43 L/min und zum anderen das Volumen des peripheren Kompartiments (V_2) mit 15,1 L.

Tabelle 4.3: Populations-pharmakokinetische Parameter von Melphalan.

Parameter (Symbol)*	Einheit	Populations- mittelwert	Standard -fehler **	Populationsvariabilität *** (95%-Vertrauensintervall)
Verteilungsvolumen des zentralen Kompartiments V_1	L	18,260	1,370	0,0824 (10,389 - 32,095)
Verteilungsvolumen des peripheren Kompartiments V_2	L	15,100	1,120	
Clearance von Melphalan ($Cl_{\text{Melphalan}}$)	L/min	0,551	0,061	0,0158 (0,430- 0,705)
Intercompartment-Clearance Q	L/min	0,43	0,023	0,12 (0,217-0,847)
Erhöhung von V pro kg Körpergewicht	L/kg	0,26	0,0196	
Erhöhung von $Cl_{\text{Melphalan}}$ pro mL/min $Cl_{\text{Kreatinin}}$	L/min* min/mL	0,0027	0,00044	

*Parameter sind in Abhängigkeit von der Kreatininclearance und dem Körpergewicht für ein typisches Körpergewicht von 70 kg und einer typischen Kreatininclearance von 120 mL/min angegeben

**Standardfehler der Parameterschätzung

***Populationsvariabilität konnte nicht für alle Parameter abgeschätzt werden

In der Abbildung 4.3 (A) ist die Beziehung zwischen der Kreatininclearance (berechnet nach der Cockcroft-Gault Formel (Cockcroft and Gault, 1976) und der Melphalanclearance dargestellt. Die Kreise stehen für die individuellen Parameter der 84 Patienten und die Linien zeigen entsprechend dem populations-pharmakokinetischen Modell die Parameterabschätzungen für einen typischen Probanden mit einem Körpergewicht von 50, 60, 70, 80 und 90 kg (von oben nach unten). Die Graphik der Abbildung 4.3 (B) zeigt das lineare Modell, welches möglicherweise die Korrelation entsprechend dem Populationsmodells zwischen dem Körpergewicht und dem Verteilungsvolumens des Melphalans beschreibt.

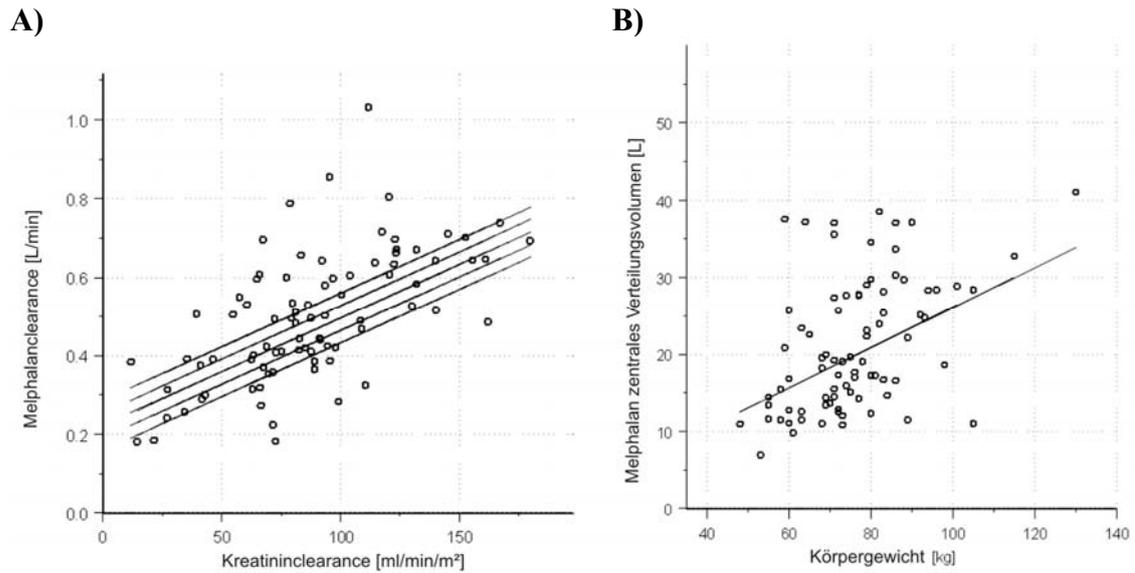


Abbildung 4.3: **A)** Die Abbildung zeigt die Beziehung zwischen der Kreatininclearance und der Melphalanclearance. Die Kreise stehen für die individuellen Parameter der 84 Patienten und die Linien zeigen entsprechend dem populations-pharmakokinetischen Modell die Parameterabschätzungen für einen typischen Probanden mit einem Körpergewicht von 50, 60, 70, 80 und 90 kg (von oben nach unten). **B)** Die Abbildung zeigt entsprechend dem Populationsmodell wie eine Korrelation zwischen dem Körpergewicht und dem Verteilungsvolumen des Melphalans beschrieben werden kann.

4.1.5 Korrelation der Nebenwirkungen mit der Pharmakokinetik von Melphalan

Die häufigsten Nebenwirkungen unter der Therapie mit Melphalan sind die Knochenmarksschädigung (Myelotoxizität), Übelkeit und Erbrechen sowie Diarrhöe und Schleimhautentzündungen (Mukositis). Dabei stellt die Knochenmarkssuppression, als dosislimitierende Nebenwirkung des Melphalans, ein medizinisch besonders relevantes Problem dar, denn gäbe es diese dosislimitierende Nebenwirkung nicht, könnte man möglicherweise durch höhere Dosierungen bessere Heilungsraten erzielen. Die Nebenwirkungen des Melphalans wurden im Rahmen dieser Studie nach den Kriterien der WHO für jeden Patienten schriftlich dokumentiert

Von den 84 Patienten litten insgesamt 30% an Mukositis und 33% an Diarrhöe. Wie in Tabelle 4.4 und Abbildung 4.4 (A) zusammengefasst, stiegen die Therapie-assoziierten Toxizitäten wie Mukositis und Diarrhöe mit zunehmender Melphalandosis (10-16, 20-35, 70-100, 130-140 und 170-200 mg/m²) an. So litten deutlich mehr Patienten unter einer Mukositis bzw. Diarrhöe, die mit einer hohen Melphalandosis behandelt wurden, als Patienten mit einer niedrigen Dosis. Keiner der 41 Patienten die mit einer Melphalandosis von ≤ 35 mg/m² behandelt worden sind, entwickelten einen Grad 4 Mukositis, wo hingegen drei von 15 Patienten mit einer Melphalandosis von 170-200 mg/m² unter Grad 4 Mukositis litten. Auch bei der Diarrhöe zeigte sich eine ähnliche Abhängigkeit von der

Dosis. So entwickelten nur 10% der Patienten bei einer Melphalandosidosis von $\leq 35 \text{ mg/m}^2$ eine Diarrhöe, verglichen mit 70% der Patienten, die bei einer hohen Dosis von 170-200 mg/m^2 Diarrhöe entwickelten.

Tabelle 4.4: Zusammenfassung der Melphalan-induzierten Nebenwirkungen Myelotoxizität (bestimmt als Leukozyten-Nadir), Mukositis und Diarrhöe.

Dosis* [mg/m^2]	n	Leukozyten-Nadir Median (Bereich)	Grad Mukositis					Grad Diarrhöe			
			0	1	2	3	4	0	1	2	3
10-16	29	2,9 (1,2-7,9)	28	0	0	1	0	28	1	0	0
20-35	12	0,2 (0,001-2,9)	11	0	1	0	0	9	1	1	1
70-100	4	0,16 (0,02-0,20)	3	1	0	0	0	2	0	2	0
130-140	23	0,06 (0,1-0,26)	10	5	5	2	1	7	7	6	1
170-200	15**	0,03 (0,01-4,93)	6	2	2	2	3	8	3	3	1

n: Anzahl der Patienten

* Melphalandosidosis nach 8 Tagen der Studie

**Ein Patient ohne Daten zur Mukositis und 3 Patienten ohne Daten für Diarrhöe. Der Grad der Mukositis und Diarrhöe wurde entsprechend den Kriterien der WHO in verschiedene Schweregrade eingeteilt.

Wie in Abbildung 4.4 (B) dargestellt, korrelierte die Mukositis mit der AUC des Melphalans. Die Mukositis wurde nur bei etwa 5% der Patienten mit einer AUC niedriger als $100 \text{ mg/L} \cdot \text{min}$ beobachtet, trat jedoch bei 78% der Patienten mit einer AUC über $800 \text{ mg/L} \cdot \text{min}$ ($P < 0,001$, exakter Fisher-Test). Eine ähnliche Assoziation konnte mit einem signifikanten P-Wert von $< 0,001$ bei der Diarrhöe beobachtet werden. Hier entwickelten nur 7,4% der Patienten mit einer AUC niedriger als $100 \text{ mg/L} \cdot \text{min}$, verglichen mit 72% aller Patienten mit einer AUC über $800 \text{ mg/L} \cdot \text{min}$ das entsprechende Krankheitsbild.

Weiterhin lässt sich eine Abhängigkeit der Nebenwirkungen von der Dosis (Abbildung 4.4 (A)) wie folgt ausdrücken: Patienten mit einer Dosis über 70 mg/m^2 haben ein 23fach erhöhtes Risiko Mukositis zu entwickeln, als Patienten mit einer niedrigen Dosis zwischen 10 und 35 mg/m^2 ($P < 0,001$, zweiseitig, χ^2 -Test), und ein 12fach erhöhtes Risiko, an Diarrhöe zu erkranken.

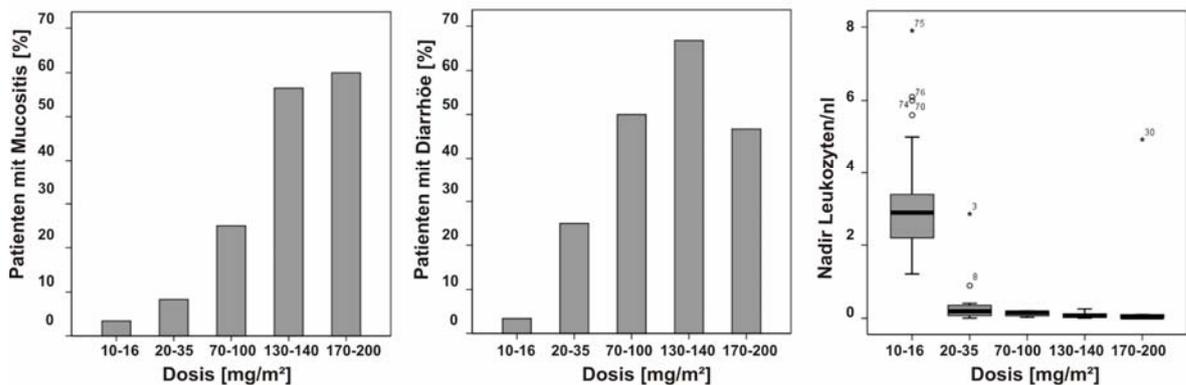
Zusätzlich wurde getestet, ob die Nebenwirkungen besser durch die individuellen AUCs oder durch die verabreichte Melphalandosidosis vorhergesagt werden können. Jedoch zeigten die ROC-Kurven (*area under the Receiver-Operator Curves*), dass die Mukositis nur marginal besser mit Hilfe der AUC vorhergesagt werden konnte, als mit der Dosis alleine (ROC 0,85 mit der AUC versus 0,81 mit der Dosis). Die Vorhersage für die Diarrhöe war

sogar in keiner Weise besser mit der individuellen AUC als mit der Dosis (ROC 0,8 mit der AUC versus 0,8 mit der Dosis).

Zur weiteren statistischen Analyse der Daten wurde eine binäre logistische Regression mit Dosis, Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Melphalanclearance und Kreatininclearance als unabhängige Variablen durchgeführt. Dabei zeigte sich auch hier eine signifikante Korrelation zwischen der Mukositis (jeder Grad) und der verabreichten Melphalandosis. Das Chancenverhältnis (*odds ratio*) betrug für die Mukositis 1,011 mit einem 95%igen Vertrauensintervall zwischen 1,006 und 1,017 ($P < 0,0001$) pro mg Melphalandosis, gegeben am Anfang des Studienintervalls. Jedoch kam kein weiterer Parameter als Prädiktor für die Nebenwirkung Mukositis in Frage. Eine ähnliche Beziehung lag bei dem Auftreten der Diarrhöe und der verabreichten Melphalandosis vor (Chancenverhältnis: 1,008 und 95%-Vertrauensintervall: 1,003-1,012, pro mg ansteigende Dosis).

Die Myelosuppression, gemessen als Nadir (niedrigster Wert) der Leukozytenzahl im Blut nach der Behandlung, ist in der Abbildung 4.4 in Abhängigkeit von der Dosis und der AUC dargestellt. Die Grad 4 Toxizität (< 1000 Leukozyten/ μL) wurde bei 82% der Patienten in der Dosisgruppe 20 mg/m^2 und bei 100% in den oberen Dosisgruppen < 70 mg/m^2 beobachtet. Jedoch wiesen die Patienten, die mit einer niedrigen Dosis von 10-16 mg/m^2 behandelt wurden, in keinem Fall einen Schweregrad 4 auf. Eine Korrelation der Leukopenie mit der Dosis und der AUC zeigte eine steile Zunahme der schweren Leukopenie ab einer Dosis von > 20 mg/m^2 und einer AUC > 100 $\text{mg}/\text{L} \cdot \text{min}$. Faktoren wie Dosis, Alter, Geschlecht, Körpergewicht, Melphalanclearance und Kreatininclearance, die zur Vorhersage des Leukozytennadir herangezogen werden können, wurden mit Hilfe der multiplen Regression analysiert. Auch hier zeigte kein weiterer Parameter, mit Ausnahme der Dosis ($P = 0,001$), eine signifikante Abhängigkeit.

A) Abhängigkeit der Nebenwirkungen von der Dosis



B) Abhängigkeit der Nebenwirkungen von der AUC

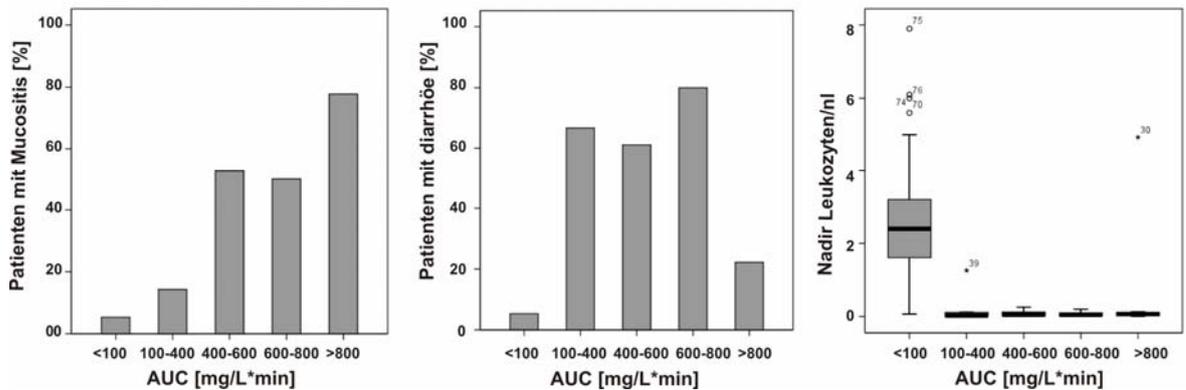


Abbildung 4.4: Darstellung der Beziehungen zwischen den Nebenwirkungen und der Dosis (A) sowie zwischen den Nebenwirkungen und der AUC (B).

4.2 Einfluss genetischer Polymorphismen auf Pharmakokinetik und Nebenwirkungen von Melphalan

Um den Einfluss genetischer Polymorphismen in den Genen der beiden Aminosäuretransportern LAT1 und LAT2 und den Melphalan möglicherweise detoxifizierenden Glutathion-S-Transferasen auf die Pharmakokinetik und Nebenwirkungen des Melphalans zu untersuchen, wurden 64 bzw. 84 Patienten aus der klinischen Studie unter Anwendung verschiedener Techniken genotypisiert (→ 3.4). Die Auswertung der Daten erfolgte sowohl für jeden SNP einzeln aber auch unter Berücksichtigung von Kopplungsgleichgewichten und Haplotypenstruktur.

4.2.1 Genetische Variabilität in LAT1 und LAT2

Die Resequenzierung der beiden Gene *SLC7A5* (LAT1) und *SLC7A8* (LAT2), umfasste jeweils 2 kb der mutmaßlichen Promotorregion sowie alle Exons (21), einschließlich 200 bp der 5'-und 3'-flankierenden Intronbereiche anhand der isolierten DNA von 64 Patienten. Wie man aus der Tabelle 4.5 entnehmen kann wurden insgesamt 7992 bp von

dem LAT1 Gen sequenziert. Dieses lässt sich unterteilen in 1468 bp der kodierenden Region, 6524 bp der nicht kodierenden Region und 2152 bp der 5'-flankierenden Region mit dem mutmaßlichen Promotor. In dem LAT1 Gen, das sich auf dem Chromosomenabschnitt 16q24.3 befindet, wurden insgesamt 44 Varianten identifiziert. Davon lag nur eine Variante (345C>A), mit einer Allelfrequenz von 0,12 (Minor Allelfrequenz, MAF) im kodierenden Bereich. Jedoch führte diese als stille Mutation zu keinem Aminosäureaustausch. Alle anderen Varianten lagen im Intron- oder Promotorbereich. Alle Genotypen lagen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit einer MAF zwischen 2,3 und 42,2% (Tabelle 4.7). Die genetische Variabilität, ausgedrückt als Nukleotid Diversität (θ) und durchschnittliche Heterozygotität (π), wurde für jeden Bereiche des LAT1 Gens einzeln berechnet. Es zeigte sich eine sehr geringe genetische Variabilität in der kodierenden Region (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der genetischen Variabilität für das LAT1 Gen

LAT1	bp sequenziert	Anzahl der Varianten	θ [x 10 ⁻⁴]	π [x 10 ⁻⁴]
Insgesamt	7992	44	10,0	16,6
Kodierender Bereich	1468	1	0,2	1,4
Nichtkodierender Bereich	6524	43 (1 Ins, 2 Del)	9,9	20,0
5'-flankierende Region (Promotor)	2152	18 (1 Ins)	4,2	26,8
5'- und 3'- UTRs + Introns	4372	25 (2 Del)	5,8	16,7

Abkürzungen: Ins: Insertionsvariante; Del: Deletionsvariante; UTR: untranslatierte Region; bp: Basenpaare.

Für das LAT2 Gen sind alle Parameter zur Beschreibung der genetischen Variabilität in Tabelle 4.6 zusammengefasst. Es wurden insgesamt 8191 bp des LAT2 Gens sequenziert. Darunter waren 1488 bp in der kodierenden Region, 2017 bp der 5' flankierenden Region, 3760 bp intronische Bereiche an den Intron-Exon-Grenzen und 926 bp der 3'- und 5'-nicht translatierten Region. In dem LAT2 Gen, das sich auf dem Chromosomenabschnitt 14q11.1 befindet, wurden insgesamt 21 Varianten identifiziert. Davon lagen vier Varianten im kodierenden Bereich. Jedoch führte nur eine davon zu einem nichtkonservativen Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin an der Aminosäureposition 94. Alle anderen Varianten waren im Intron- und Promotorbereich lokalisiert. Alle Genotypen lagen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit einer Minor Allelfrequenz zwischen 0,8 und 49,2% (Tabelle 4.6). Auch hier zeigte sich eine sehr geringe genetische Variabilität in der

kodierenden Region ($\theta = 0,9$ und $\pi = 5,8$) und eine sehr hohe genetische Variabilität in den nichtkodierenden Regionen wie in Tabelle 4.6 zusammengefaßt ist.

Tabelle 4.6: Zusammenfassung der genetischen Variabilität für das LAT2 Gen.

LAT2	bp	Anzahl der Varianten	θ [x 10 ⁻⁴]	π [x 10 ⁻⁴]
Insgesamt	8181	21	4,7	8,5
Kodierender Bereich	1488	4	0,9	5,8
Nichtkodierender Bereich	6703	17 (1 Ins, 1 Del)	3,8	8,9
5'-flankierende Region (Promotor)	2017	5 (1 Ins)	1,4	9,7
5'- und 3'- UTRs + Introns	4686	12 (1 Del)	2,5	8,5

Abkürzungen: Ins: Insertionsvariante; Del: Deletionsvariante; UTR: nichttranslatierte Region; bp: Basenpaare

4.2.2 Genetische Kopplung und Haplotypanalyse der LAT1 und LAT2 Polymorphismen

Um die gegenseitige Abhängigkeit der identifizierten Sequenzvarianten in den beiden Genen darzustellen, wurde mit Hilfe des Programms Haploview die genetische Kopplung aller Polymorphismen und die Kombinationsmöglichkeiten aller Allele als Haplotypen unter Verwendung des Programms PHASE bestimmt. Es wurden nur Polymorphismen mit einer Minor Allelfrequenz von über 1% in dieser Analyse berücksichtigt. Die genauen Einstellungen und Begrifflichkeiten sind im Kapitel 3.13 beschrieben.

Das *linkage disequilibrium* (LD) bei paarweisem Vergleich zweier biallelischer SNPs wurde mit dem Parameter D' mit Hilfe des Programms Haploview in beiden LAT Genen bestimmt.

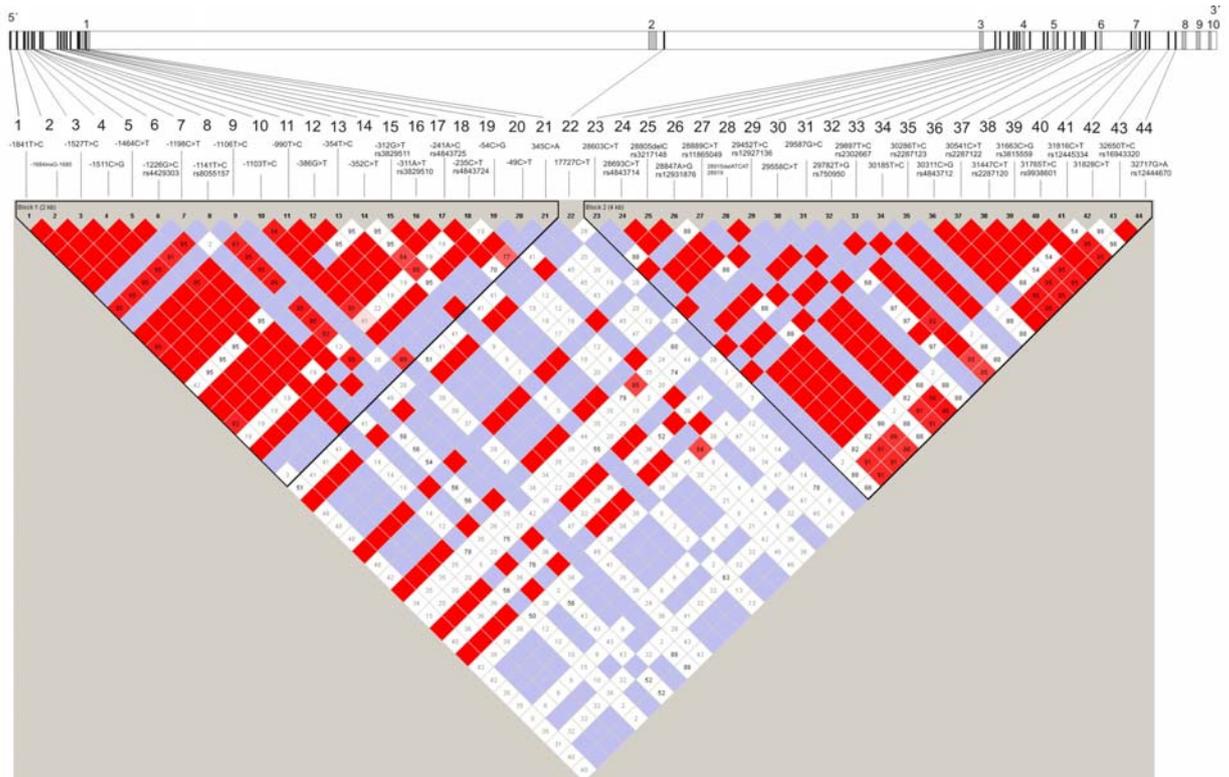


Abbildung 4.5: Darstellung der genomischen Lokalisierung und Kopplung zwischen LAT1-Varianten. Der obere Bereich zeigt die genomische Anordnung der identifizierten Polymorphismen entsprechend den 10 Exons (in grau) auf dem LAT1 Gen. Die Positionen der Varianten sind nach dem Startcodon (Beginn mit +1) nummeriert und beziehen sich auf die genomische Sequenz (LAT1: NT_010498, gi51473102, NCBI Datenbank). Die NCBI SNP-Nummern werden als rs-Nummern angegeben und als interne Nummern 1-44 durchnummeriert.

Der untere Teil der Graphik zeigt das Kopplungsungleichgewicht im paarweisen Vergleich aller 44 identifizierten Polymorphismen. Die Rauten geben die paarweise bestimmten D' Werte an. Die roten Felder stehen für eine statistisch signifikante Kopplung ($LOD \geq 2$) in Abhängigkeit von dem D' Wert (wenn $D'=1$, dann leuchtend rote Felder). Wenn keine signifikante Kopplung ($LOD < 2$) vorliegt, sind die Rauten in blau ($D'=1$) oder weiß ($D' < 1$) dargestellt.

Nach der Analyse der Daten zum LAT1 Gen mit insgesamt 44 Polymorphismen zeigten sich zwei getrennte Bereiche mit einer hohen Kopplung (Abbildung 4.5). Diese beiden Kopplungs- bzw. LD-Blöcke umfassten die 5'- und 3'-Region des LAT1 Gens und wurden entsprechend dem Kopplungsprofil definiert. Im Promotorbereich des LAT1 Gens bildeten die SNPs ein starkes LD, vom ersten Polymorphismus an der Position -1841 mit einem Nukleotidaustausch von T nach C, bis zum 21. Polymorphismus -54C>G. Ein zweiter Block wurde zwischen dem 23. Polymorphismus (28693C>T) und dem 44. Polymorphismus an der Position 32717G>A im Intronbereich des LAT1 Gens gebildet.

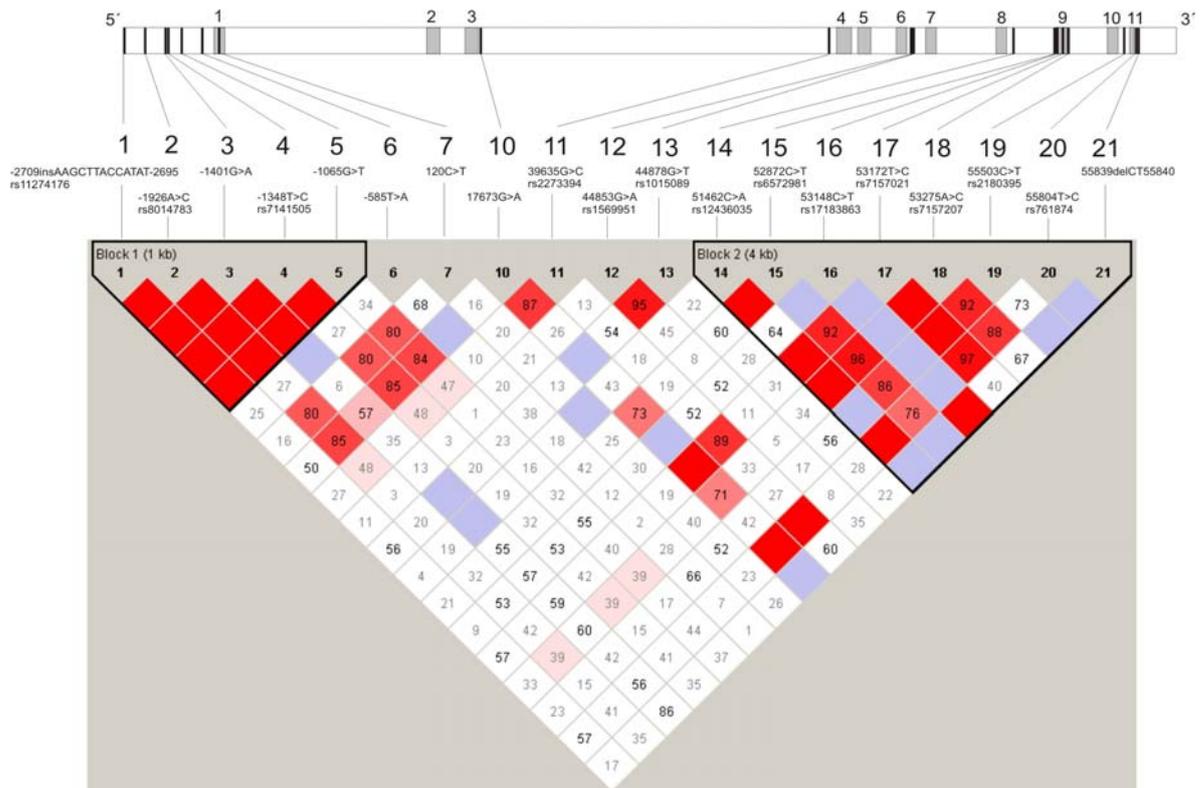


Abbildung 4.6: Darstellung der genomischen Lokalisierung und Kopplung zwischen LAT2 Varianten. Der obere Bereich zeigt die genomische Anordnung der identifizierten Polymorphismen entsprechend den 11 Exons (in grau) auf dem LAT2 Gen. Die Positionen der Varianten sind nach dem Startcodon (Beginn mit +1) nummeriert und beziehen sich auf die genomische Sequenz (LAT2: NT_026437, gi:51493278, NCBI Datenbank). Die NCBI SNP-Nummern werden als rs-Nummern angegeben und als interne Nummern 1-21 durchgezählt.

Der untere Bereich stellt das Kopplungsungleichgewicht im paarweisen Vergleich aller 19 identifizierten Polymorphismen dar. (die beiden SNPs 16503G>A (8) und 16695G>A (9) wurden mit einer Minor Allelfrequenz von < 1% aus der D' Berechnung ausgeschlossen). Die Rauten geben die paarweise bestimmten D' Werte an. Die roten Felder geben dabei eine statistisch signifikante Kopplung ($LOD \geq 2$) in Abhängigkeit von dem D' Wert an (wenn $D'=1$, dann leuchtend rote Felder). Wenn es keine signifikante Kopplung gibt ($LOD < 2$), sind die Rauten in blau ($D'=1$) oder weiß ($D' < 1$) dargestellt.

In Abbildung 4.6 wurden die D' Werte graphisch für das LAT2 Gen dargestellt. Dabei zeigte sich für das Gen mit 19 von 21 Polymorphismen eine ähnliche Struktur der Kopplungsblöcke wie bei LAT1. Auch hier konnten zwei Bereiche mit einem starken LD in der 5'- und 3'-Region dargestellt werden. Der erste Block umfasste fünf von sechs Promotor SNPs, 1, 2, 3, 4, 5 ($D' = 1$) und der zweite Block, mit D' Werten zwischen 0,91 und 1, schloss die Polymorphismen 44878G>T (Nr. 14) bis 53148C>T (Nr. 21) ein.

Weiterhin wurden die Haplotypen mit ihren geschätzten Frequenzen unter Verwendung des Programms PHASE für alle identifizierten biallelischen SNPs im LAT1 und LAT2 Gen bestimmt. Für das LAT1 Gen sind 16 Haplotypen mit einer Häufigkeit von $\leq 1\%$ in der Tabelle 4.7 zusammengefasst. Alle Nukleotide die sich vom 1. Haplotypen mit einer Frequenz von 22% unterscheiden, wurden in der Tabelle grau markiert. Zusätzlich sind alle identifizierten SNPs mit ihrer Position im Gen und ihrer Allelfrequenz aufgeführt.

Außerdem wurde jedem Patienten ein Diplotyp zugeordnet (Daten nicht gezeigt). Für das LAT2 Gen konnten über 26 Haplotypen bestimmt werden (Tabelle 4.8). Wobei der häufigste Haplotyp nur eine Frequenz von 12% aufwies. Aufgrund der umfangreichen Daten für die LAT2 Haplotypen war es nicht möglich, jedem Patienten einen eindeutigen Diplotypen zuzuordnen (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4.7: LAT1 Haplotypen und Allelfrequenzen von jedem Polymorphismus.

Position	MAF	Bereich	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 -1841 T>C	0,20	5'	T	T	T	T	C	T	C	T	C	C	T	T	T	T	T	C
2 -1684 -1685ins	0,20	5'	D	D	D	D	I	D	I	D	I	I	D	D	D	D	D	I
3 -1527 T>C	0,20	5'	T	T	T	T	C	T	C	T	C	C	T	T	T	T	T	C
4 -1511 C>G	0,20	5'	C	C	C	C	G	C	G	C	G	G	C	C	C	C	C	G
5 -1464 C>T*	0,41	5'	C	C	C	C	T	T	T	T	C	T	T	C	T	C	C	T
6 -1226 G>C*	0,20	5'	G	G	G	G	C	G	C	G	C	C	G	G	G	G	G	C
7 -1198 C>T*	0,09	5'	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T
8 -1141 T>C	0,20	5'	T	T	T	T	C	T	C	T	C	C	T	T	T	T	T	C
9 -1106 T>C	0,04	5'	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T
10 -1103 T>C*	0,31	5'	T	T	T	C	C	T	C	T	C	C	T	C	T	T	T	C
11 -990 G>A	0,20	5'	G	G	G	G	A	G	A	G	A	A	G	G	G	G	G	A
12 -386 G>T	0,20	5'	G	G	G	G	T	G	T	G	T	T	G	G	G	G	G	T
13 -354 T>C	0,20	5'	T	T	T	T	C	T	C	T	C	C	T	T	T	T	T	C
14 -352 C>T*	0,11	5'	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C
15 -312 G>T	0,20	5'	G	G	G	G	T	G	T	G	T	T	G	G	G	G	G	T
16 -311 A>T	0,20	5'	A	A	A	A	T	A	T	A	T	T	A	A	A	A	A	T
17 -241 A>C	0,40	5'	A	A	A	C	C	C	C	A	C	C	A	C	A	A	C	C
18 -235 C>T*	0,28	5'	C	C	C	T	T	T	C	C	C	C	C	T	C	C	T	T
19 -54 C>G	0,20	5'UTR	C	C	C	C	G	C	G	C	G	G	C	C	C	C	C	G
20 -49 C>T	0,10	5'UTR	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C
21 345 C>A G115G	0,12	Ex1	C	C	C	A	C	C	C	C	C	C	C	A	C	C	C	C
22 17727 C>T	0,02	Int.2	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C
23 28603 C>T	0,04	Int.3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C
24 28693 C>T	0,26	Int.3	C	T	C	C	C	T	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C
25 28805-28805delC	0,26	Int.3	I	D	I	I	I	D	I	I	I	I	I	D	I	I	I	I
26 28847 A>G	0,27	Int.3	A	G	A	A	A	G	A	A	A	A	A	G	A	A	A	A
27 28889 C>T	0,04	Int.3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C
28 28915-28919del	0,26	Int.3	I	D	I	I	I	D	I	I	I	I	I	D	I	I	I	I
29 29452 T>C	0,25	Int4	T	C	T	T	T	C	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T
30 29558 C>T	0,04	Int4	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C
31 29587 G>C	0,09	Int4	G	G	G	G	C	G	G	G	G	G	G	G	G	C	C	G
32 29782 T>G	0,34	Int5	T	T	G	G	T	T	T	G	G	G	T	T	G	T	T	G
33 29897 G>A	0,04	Int5	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G
34 30185 C>T	0,33	Int5	T	C	C	C	C	C	T	C	C	C	T	C	C	C	C	C
35 30286 C>T	0,04	Int5	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C
36 30311 G>C	0,34	Int5	C	G	G	G	G	G	C	G	G	G	C	G	G	G	G	G
37 30541 C>T	0,25	Int5	C	T	C	C	C	T	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C
38 31447 C>T*	0,24	Int6	C	T	C	C	C	T	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C
39 31663 C>G	0,24	Int7	C	G	C	C	C	G	C	C	C	C	C	G	C	C	C	C
40 31765 C>T*	0,42	Int7	T	C	C	C	T	C	T	C	C	C	T	C	C	T	T	C
41 31816 C>T	0,24	Int7	C	T	C	C	C	T	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C
42 31828 C>T	0,09	Int7	C	C	C	C	C	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	T
43 32650 T>C	0,27	Int7	T	C	T	T	T	C	T	T	T	T	T	C	C	T	T	T
44 32717 G>A	0,27	Int7	G	A	G	G	G	A	G	G	G	G	G	A	A	G	G	G
Haplotypenfrequenz			0,22	0,13	0,09	0,06	0,05	0,05	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,01	0,01

Abkürzungen und Erklärungen: MAF: Minor Allelfrequenz; D: Deletion; I: Insertion; Int: Intron; Ex: Exon; UTR: nicht translatierte Region; Alle Nukleotide, die sich vom 1. Haplotypen unterscheiden, sind grau markiert. SNPs markiert mit einem * SNPs wurden ebenso bei der Probandenstudie zur Genexpression analysiert. Alle Haplotypen mit einer Häufigkeit von $\leq 1\%$ wurden zusammengefasst.

Tabelle 4.8: LAT2 Haplotypen und Allelfrequenzen von jedem Polymorphismus.

Position	MAF	Bereich	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1 -2708-2696delAAGCTTACCATAT*	0,23	5'	D	D	D	D	D	I	D	D	D	D	I	D	D	I	D	I	I	D	I	D	I	I	D	D	D	D
2 -1926 C>A	0,38	5'	C	C	C	C	C	A	C	C	A	C	A	C	A	A	A	A	A	C	A	A	A	A	A	A	A	C
3 -1401 G>A*	0,11	5'	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	
4 -1348 T>C*	0,38	5'	T	T	T	T	T	C	T	T	C	T	C	T	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	T	
5 -1065 T>G*	0,37	5'	T	T	T	T	T	G	T	T	G	T	G	T	G	G	G	G	G	T	G	G	G	G	G	G	T	
6 -585 T>A*	0,28	5'	T	T	A	T	T	T	T	A	T	A	A	T	T	T	T	A	A	T	A	T	A	T	T	T	T	
7 120 C>T_1le231le	0,15	Ex1	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	T	C	C	T	T	C	
10 17673 T>C	0,09	Int3	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	
11 39635 C>G	0,22	Int3	C	C	C	C	C	G	C	C	C	C	G	G	C	C	C	C	C	C	C	G	C	C	C	G	C	
12 44853 G>A	0,49	Int6	G	A	A	A	A	G	G	A	G	G	A	A	G	A	A	A	A	A	G	G	A	A	A	A	A	
13 44878 G>T	0,38	Int6	T	G	G	G	G	G	T	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	T	T	G	G	G	G	G	
14 51462 C>A	0,21	Int8	C	C	C	A	C	C	A	A	C	C	A	A	C	C	C	C	C	C	C	C	A	C	C	C	C	
15 52872 C>T	0,27	Int8	C	C	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	C	T	T	C	T	C	T	C	T	C	C	T		
16 53149 C>T Ser282Ser*	0,05	Ex9	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T		
17 53172 T>C Tyr390Tyr*	0,45	Ex9	T	T	T	C	C	C	C	C	T	T	C	C	T	T	C	C	T	C	T	C	C	C	T	C		
18 53275 A>C*	0,33	Int9	A	A	A	A	C	C	A	A	A	A	A	A	A	C	C	A	C	A	C	A	C	A	C	C		
19 55503 C>T	0,17	Int10	C	C	C	C	T	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	T	C	C	C		
20 55804 T>C	0,47	3'UTR	T	T	T	C	C	C	C	C	T	T	C	C	T	T	C	C	T	T	T	C	C	C	T	C		
21 55839-55840delCT	0,06	3'UTR	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	D		
8 16503 G>A Ala94Thr	0,008	Ex2																										
9 16695 G>A	0,008	Int2																										
Haplotypenfrequenz			0,12	0,09	0,05	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01		

Abkürzungen und Erklärungen: MAF: Minor Allelfrequenz; D: Deletion; I: Insertion; UTR: nicht translatierte Region; Int: Intron; Ex: Exon. Alle Nukleotide, die sich vom 1. Haplotypen unterscheiden, sind grau markiert. SNPs markiert mit einem * wurden ebenso bei der Probandenstudie zur Genexpression analysiert. Alle Haplotypen mit einer Häufigkeit von $\leq 1\%$ wurden zusammengefasst. Allelfrequenzen der beiden SNPs 8 und 9 lagen unter 1% und wurden deshalb aus der Haplotypenanalyse ausgeschlossen.

4.2.3 Häufigkeit der genotypisierten *tagging* SNPs im 4F2hc Gen

Für 4F2hc dem assoziierten Glycoprotein der Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2 wurde nicht das gesamte Gen sequenziert sondern nur *tagging* SNPs (tSNPs) mittels *SNaPshotTM* (→ 3.4.3) analysiert. Bei den *tagging* SNPs handelt es sich um charakteristische genetische Marker, die ausreichen, um das Vorhandensein eines bestimmten Haplotypen zu bestimmen. Die Daten zur Haplotypenanalyse stammen von dem so genannten HapMap Projekt (www.hapmap.org). Hier wurde unter anderem die DNA von 90 US-amerikanischen Kaukasiern in vielen Millionen Polymorphismen genotypisiert und die Daten im Internet zugänglich gemacht. Nach der Analyse der Haplotypen (Programm PHASE) für das gesamte *SLC3A2* (4F2hc) Gen konnten die SNPs mit einer Allelhäufigkeit von über 5% ausgewählt werden, die für die Bildung aller Haplotypen notwendig sind. Die Auswahl beschränkte sich dabei nur auf Haplotypen mit einer Häufigkeit von über 1%. Auch hier gab es laut der Datenbank keinen relevanten Aminosäureaustausch. In Tabelle 4.9 sind die SNPs mit ihrer rs-Nummer und der Lokalisierung im Gen angegeben. Es wurden insgesamt 64 Patienten aus der zuvor beschriebenen klinischen Studie genotypisiert. Die Allelhäufigkeiten lagen für alle genotypisierten SNPs nach dem χ^2 -Test im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Tabelle 4.9: Lokalisierung und Minor Allelfrequenz (MAF) der 4F2hc tSNPs genotypisiert in 64 Patienten.

rs-Nummer	Bereich	Nukleotidaustausch	MAF
rs1059292	5'-flankierende Region	T>C	0,07
rs12794763	UTR	T>G	0,12
rs12804553	UTR	T>C	0,31
rs489381	Intron Bereich	G>A	0,10
rs4726	Exon 10	C>T (Leu449Leu)	0,24
rs2282477	5'-flankierende Region	T>C	0,19

4.2.4 Beziehung zwischen Melphalan Pharmakokinetik und genetischen Polymorphismen in den Transportern LAT1-4F2hc und LAT2-4F2hc

Wie in dem Histogramm (Abbildung 4.1) dargestellt, wies die Melphalan clearance eine Spannweite zwischen 115 und 715 mL/min/m² auf, also mehr als 6fache Unterschiede zwischen niedrigstem und höchstem Wert. Um Zusammenhänge zwischen den Genotypen und der Melphalan clearance aufzuspüren, wurde eine nicht-parametrische

Signifikanzanalyse mit dem Kruskal-Wallis Test und dem Jonckheere-Terpstra Test durchgeführt. Aus Kostengründen wurden von insgesamt 84 Patientenproben nur 64 zur Identifizierung von LAT-Polymorphismen sequenziert. Es gab jedoch keine signifikante Assoziation zwischen den individuell berechneten Melphalanclearances und den einzelnen SNPs sowie den berechneten Haplotypen.

4.2.5 Nebenwirkungen des Melphalans und genetische Polymorphismen in den Transportern LAT1-4F2hc und LAT2-4F2hc

Da sich zwischen den Nebenwirkungen und der verabreichten Melphalandosis eine signifikante Abhängigkeit zeigte (siehe Abschnitt 4.1.5), erfolgte die statistische Auswertung für jede Dosisgruppe einzeln. Zur Analyse, ob Nebenwirkungen überzufällig häufig bei bestimmten Genotypen der Transportproteine auftraten, wurde der χ^2 Test angewendet. Falls die Gruppen weniger als 5 Patienten umfassten, kam der Exakte Fisher-Test zum Einsatz. Bei manchen SNPs zeigte sich ein Trend, unter Berücksichtigung des multiplen Testens (Bonferroni-Korrektur), zeigte jedoch kein Polymorphismus im LAT1, LAT2 oder 4F2hc-Gen einen signifikanten Einfluss auf das Auftreten der Nebenwirkungen Mukositis, Diarrhöe und Leukopenie.

4.2.6 Nebenwirkungen des Melphalans und genetische Polymorphismen in den Glutathion-S-Transferasen

Um zu untersuchen, ob Polymorphismen in den Genen ausgewählter Glutathion-S-Transferasen einen Einfluss auf die Toxizität bzw. Nebenwirkungen von Melphalan hatten, wurden alle 84 Patienten aus der klinischen Studie genotypisiert. Bei den Polymorphismen im GSTT1- und im GSTM1-Gen handelt es sich um Deletionspolymorphismen die zum kompletten Verlust der Enzymaktivität führen. Die Häufigkeiten der Genotypen aller 84 Patienten sind in der Tabelle 4.10 zusammengefasst. Die homozygote Deletionsvariante wurde mit *0/0 und die heterozygote Deletionsvariante mit *0/1 bezeichnet. Die Aminosäuresubstitutionen (Ile105Val und Ala114Val) in dem Gen der Glutathion-S-Transferase GSTP1 wurden mittels RFLP (Restriktions-Fragmentlängen Polymorphismus) analysiert. In der Tabelle 4.10 sind die Chancenverhältnisse als *odds ratio* für Mukositis und Diarrhöe in Abhängigkeit vom Genotyp dargestellt. Die Werte mit ihrem 95%-Vertrauensintervall wurden in einer binären logistischen Regression ermittelt. Da sowohl die Melphalandosis als auch die Kreatininclearance bei der monovariaten Analyse als signifikante Einfluss Parameter identifiziert worden sind, mussten die Chancenverhältnisse (*odds ratios*) nach diesen beiden Parameter adjustiert, ermittelt werden. Zur Vereinfachung

wurden die Daten sowohl bei den unabhängigen Variablen (GST) als auch bei den abhängigen Variablen (Nebenwirkungen) dichotomisiert, d.h. in zwei Gruppen eingeteilt: Patienten mit Nebenwirkungen gegen Patienten ohne Nebenwirkungen (siehe Tabelle 4.10) und auf der anderen Seite Patienten mit einem Schweregrad von ≥ 3 gegen Patienten mit einem Schweregrad ≤ 2 . Nach der Analyse zeigte nur der GSTT1-Genotyp ein signifikantes Ergebnis mit einem P - Wert von 0,05. Mit einem Chancenverhältnis von 6,7 trugen die Patienten mit dem heterozygoten Genotyp für GSTT1 im Vergleich zu Patienten mit einem voll funktionsfähigem Enzym ein erhöhtes Risiko, an Diarrhöe zu erkranken. Weiterhin konnte ein Trend zwischen dem GSTP1 Polymorphismus Ile105Val und der Entstehung von Mukositis beobachtet werden ($P = 0,06$). Auch hier lag eine erhöhtes Risiko bzw. Chancenverhältnis (*odds ratio* = 14,9), an Mukositis zu erkranken, bei Patienten heterozygot für den Genotypen gegenüber Patienten die keinen Aminosäureaustausch im Genotypen trugen, vor. Nach Adjustierung auf Multiples Testen (4 Genotypen und 2 Endpunkte, Signifikanzgrenze adjustiert nach Bonferroni damit 0,0063) war keiner der Zusammenhänge statistisch signifikant.

Tabelle 4.10: Melphalan-Nebenwirkungen und Genotypen der Glutathion-S-Transferasen bestimmt bei 84 Patienten.

Enzyme	Genotyp	n Gesamt	Mukositis		Diarrhöe	
			n pro Genotyp		n pro Genotyp	
GSTM1	GSTM1*1/1	10	2	*	3	*
	GSTM1*0/1	28	4	0,2 (0,02-1,9)	5	0,9 (0,1-5,2)
	GSTM1*0/0	46	19	0,27 (0,06-1,2)	19	0,6 (0,2-2,3)
GSTT1	GSTT1*1/1	31	10	*	13	*
	GSTT1*0/1	36	11	1,5 (0,2-10,7)	12	6,7 (0,9-47,8)**
	GSTT1*0/0	17	4	2,3 (0,3-15,1)	2	5,4 (0,8-37,7)
GSTP1	Ile/Ile	39	13	*	13	*
Ile105Val	Ile/Val	38	11	14,9 (0,9-238,4)***	11	0,3 (0,03-2,0)
	Val/Val	7	1	13,1 (0,8-212,9)	3	0,2 (0,03-1,7)
GSTP1	Ala/Ala	65	21	*	24	*
Ala114Val	Ala/Val	18	4	#	3	#
	Val/Val	1	0	#	0	#

Erklärungen:* Referenz Genotyp, ** P = 0,05, *** P = 0,06, # keine Angaben möglich aufgrund des fehlenden Genotyps mit Mukositis und Diarrhöe.

4.3 Einfluss der Genetik auf die LAT1 und LAT2 Expression

Zur Untersuchung, ob sich möglicherweise die mRNA Expression der Transporter LAT1 und LAT2 in Abhängigkeit einiger der Polymorphismen unterscheidet, wurde die mRNA und die Polymorphismen in peripheren weißen Blutzellen von 35 gesunden nicht verwandten männlichen Probanden analysiert. Von diesen Probanden lagen zur Bestimmung der intraindividuellen Variabilität zwei Blutproben vor, welche an 2 Tagen im Abstand von mindestens einer Woche abgenommen worden sind.

Da bereits Daten zum *linkage disequilibrium* vorlagen war es nicht notwendig, alle Polymorphismen in dieser Gruppe zu genotypisieren, (Tabelle 4.7 und Tabelle 4.8, SNPs sind mit einem Stern markiert). Vielmehr wurden aus den beiden Haplotyp-Blöcken im 5'-Bereich von LAT1 und LAT2 (Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6) nur die *tagging* SNPs analysiert.

Da nicht nur Promotorpolymorphismen Auswirkungen auf die mRNA Expression haben können, wurden zusätzlich zwei bzw. drei SNPs im Intronbereich von LAT1 und LAT2 zur Genotypisierung ausgewählt, die bei der klinischen Studie marginal signifikant ($P < 0,1$) mit der totalen Melphalanclearance assoziiert waren (Tabelle 4.7 und Tabelle 4.8, SNPs sind mit einem Stern markiert). Um zwischen intra- und interindividueller Variabilität in der LAT-Expression unterscheiden zu können, wurden Blutproben zur RNA Isolierung an zwei Tagen von den gesunden Probanden abgenommen. Die Normalisierung der mRNA Messungen erfolgte mit TBP als Referenzgen in einer relativen Quantifizierung. Zur Beurteilung der intraindividuellen Schwankungen wurden die Messpunkte pro Proband für jeden Tag gegeneinander graphisch aufgetragen. Aus der linearen Regression (siehe Abbildung 4.7) geht hervor, dass die beiden LAT1-Expression Messungen an verschiedenen Tagen (X und Y) geringer miteinander korrelieren ($r^2 = 0,29$) als die beiden LAT2 Expression Messungen ($r^2 = 0,65$). Für LAT1 lagen somit größere intraindividuelle Schwankungen als für die Expression des LAT2 Gens vor.

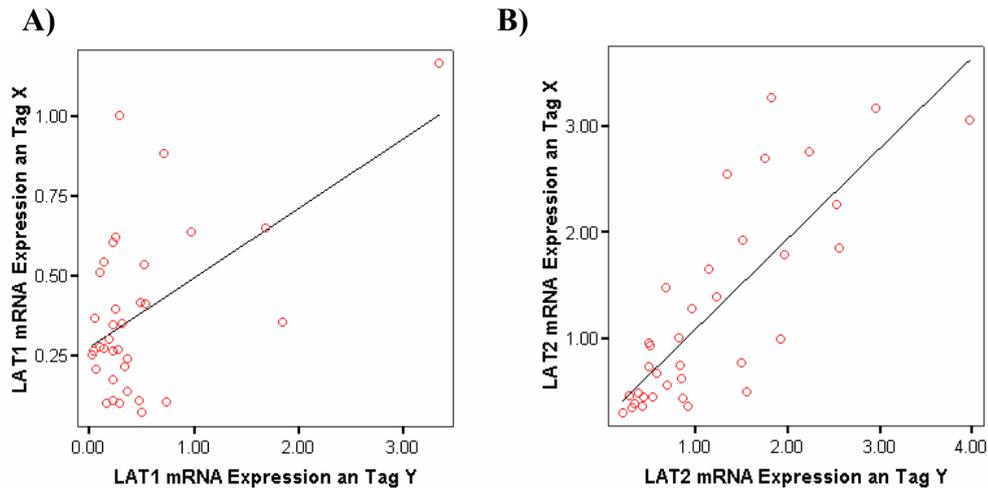


Abbildung 4.7: Korrelation der relativen LAT-Expression an zwei verschiedenen Tagen (X und Y).

Mit Hilfe der Varianzanalyse wurde untersucht, wie viel von der gesamten Variabilität in beiden Messungen auf interindividuelle Schwankungen zurückgeführt werden konnte. Bei der LAT1-Expression waren 51% der Gesamtvariabilität auf interindividuelle Schwankungen zurückzuführen, d.h. dass maximal 51% der Variabilität durch genetische Merkmale beeinflusst sind. Die gleiche statistische Berechnung zeigte für die LAT2 mRNA Expression einen 88%igen Anteil interindividueller Variabilität an der Gesamtvariabilität und somit einen 88%igen Anteil genetischer Einflüsse.

Die statistische Auswertung zur Assoziation zwischen Promotor SNPs und der LAT Expression erfolgte unter Anwendung des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis Tests. In der Abbildung 4.8 sind die Genotypen der Varianten in Abhängigkeit von der LAT1 Expression, ausgedrückt als Mittelwert zwischen den beiden Messpunkten und dem Standardfehler, dargestellt. Die LAT-Expression korrelierte jedoch nicht mit den selektierten LAT1 und LAT2 Polymorphismen.

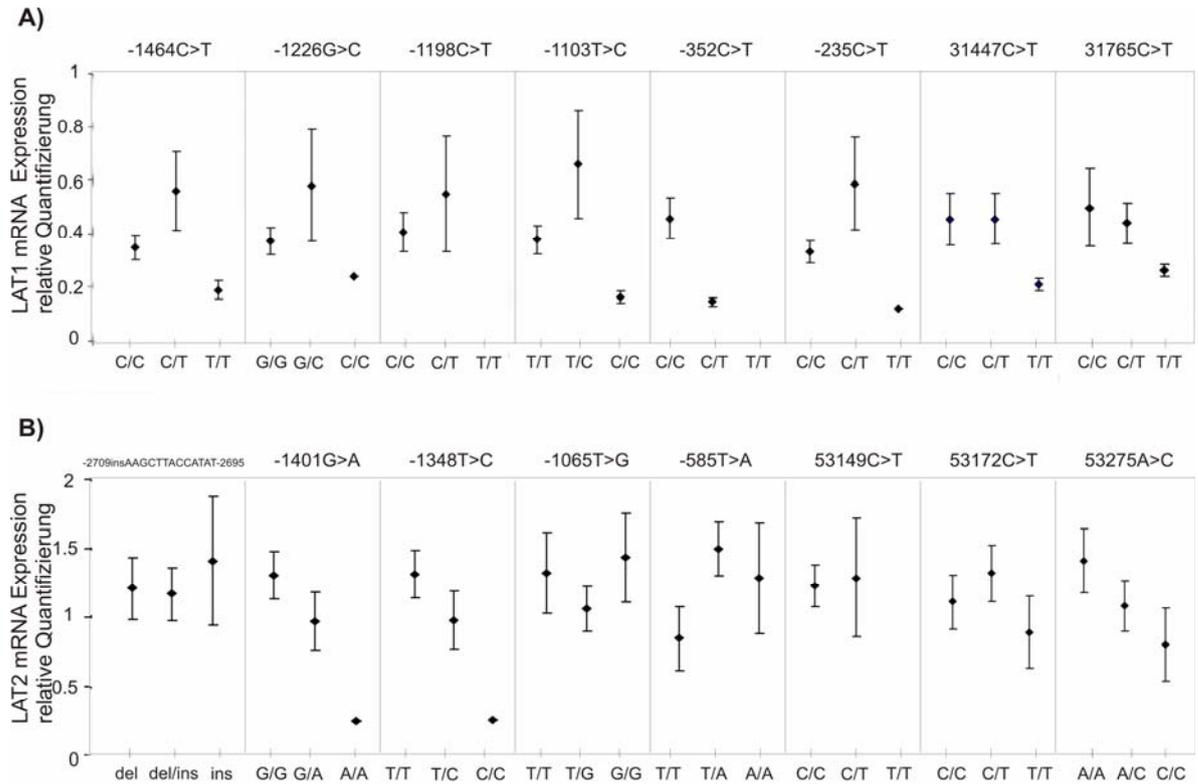


Abbildung 4.8: Relative Quantifizierung der (A) LAT1- und (B) LAT2-Expression (Mittelwert \pm Standardfehler) in peripheren Blut Leukozyten gemessen bei 35 gesunden Probanden bezüglich der selektierten LAT1 und LAT2 Polymorphismen.

4.4 Gewebespezifische Expression von LAT1 und LAT2

Die Expression der beiden Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2 und dem assoziierten Protein 4F2hc wurde in 20 Geweben mittels RT-PCR absolut quantifiziert und die Transkriptmenge auf TBP, als Referenzgen, normalisiert. Die mRNA des 4F2hc konnte ubiquitär in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Das 4F2hc wurde stark in der Lunge, der Niere, der Leber, der Schilddrüse und im Dünndarm mit 0,57, 0,47, 0,25, 0,21 und 0,20 Transkripte/TBP exprimiert. Im Vergleich zu diesen Geweben war 4F2hc in den Testes, den Ovarien, dem Thymus und der Plazenta 3,5-19fach mit 0,02, 0,04, 0,06, 0,06 Transkripte/TBP geringer exprimiert. LAT2 wurde am stärksten in der Niere und der Lunge exprimiert mit einer Transkriptmenge/TBP von 2,3 und 1,1. Die Gewebe Prostata, Schilddrüse und Dickdarm wiesen eine 2fach geringere LAT2 Expression als die Niere und Lunge. Es konnte eine signifikante Korrelation ($r^2 = 0,63$, $P > 0,001$) zwischen der LAT2- und der 4F2hc-mRNA nachgewiesen werden. Wobei die mRNAs von LAT2 und 4F2hc in einem Verhältnis von 5:1 in den Geweben vorlagen. Für LAT1 und 4F2hc konnte keine Korrelation nachgewiesen werden. LAT1 wurde 2fach stärker im Gehirn exprimiert als LAT2 und 4F2hc. Der Dünndarm, das Herz, die Luftröhre und die Speiseröhre wiesen

gleiche Transkriptmengen von LAT1, LAT2 und 4F2hc auf. In den anderen Geweben wie der Schilddrüse, der Plazenta und im Fettgewebe war LAT1 nur sehr schwach mit einer Transkriptmenge/TBP von 0,019, 0,018 und 0,004 nachweisbar.

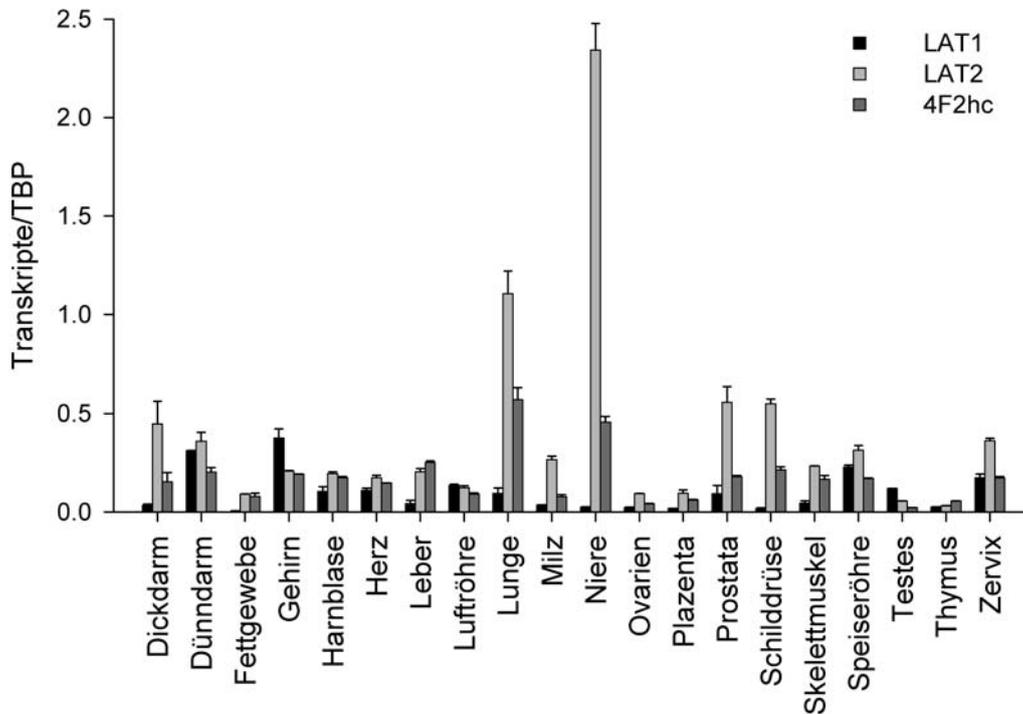


Abbildung 4.9: Absolute Expression (Transkripte/TBP mit Standardabweichung bei Doppelbestimmung) von LAT1, LAT2 und 4F2hc in 20 untersuchten Geweben.

4.5 Charakterisierung des Membrantransportes von Melphalan

4.5.1 Zelllinienspezifische Expression von LAT1 und LAT2

Die adhärent wachsenden Zellen wurden entsprechend ihrem LAT-Expressionsprofil für die Experimente zur Charakterisierung des Membrantransportes von Melphalan ausgewählt. HeLa-Zellen wiesen eine sehr starke LAT1-Expression mit einer Transkriptmenge/TBP von 2,89 auf, wohingegen der LAT2 in den HeLa-Zellen mit 0,007 Transkripten/TBP um das 400fache geringer exprimiert war (Tabelle 4.11). Auch in den beiden Zelllinien HEK293 und CaCo-2 konnte der LAT1 mit einer 19fach und 7fach stärkeren Expression als LAT2 nachgewiesen. In der Zelllinie Colo320 war der LAT2 mit 0,47 Transkripten/TBP 2fach stärker exprimiert als LAT1 mit einer Transkriptmenge von 0,25.

Tabelle 4.11: Absolute Quantifizierung (Transkripte/TBP mit Standardabweichung (SD)) für die adhärent wachsenden Zelllinien HeLa, HEK293, CaCo-2 und Colo320.

Expression		HeLa	HEK293	CaCo	Colo320
LAT1	Transkripte/TBP	2,86	0,08	0,40	0,25
	SD	0,17	0,001	0,11	0,06
LAT2	Transkripte/TBP	0,007	0,0042	0,06	0,47
	SD	0,0004	0,001	0,004	0,013

Zur Charakterisierung des Melphalan-Transportes bzw., um zu untersuchen über welchen Transporter Melphalan transportiert wird, wurden mehrere experimentelle Ansätze verfolgt. Zunächst wurde in Zellen mit einer endogenen Expression der beiden Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2 Inhibitionsversuche mit radioaktiv markierten möglichen Substraten dieser Transporter durchgeführt. Die Expression von beiden LAT-Gene wurde sequenzspezifisch durch *small interfering* RNAs (siRNAs) herunterreguliert, um den Effekt auf den Melphalan-Transport zu analysieren. Weiterhin wurden die beiden Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2 mit dem assoziierten Glycoprotein 4F2hc in *Xenopus* Oozyten überexprimiert, um den LAT1 bzw. LAT2 vermittelten Transport von Leucin, Phenylalanin und Melphalan zu untersuchen.

4.5.2 Inhibition der Melphalan-Aufnahme in verschiedenen Zelllinien

Wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben, exprimieren HEK293- und CaCo-2-Zelllinien beide Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2. Bei den Zelllinien handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen (HEK293) und um humane Kolon Adenokarzinomzellen (CaCo-2). Leucin und Phenylalanin sind bekannte typische Substrate der Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2 (Kanai et al., 1998; Pineda et al., 1999). In den ersten Experimenten wurde der Transport von radioaktiv markierten Aminosäuren wie [³H] Phenylalanin und [³H] Leucin durch das nichtmarkierte Melphalan und BCH, einem Inhibitor für L-Typ Aminosäuretransporter, gehemmt.

Der Transport wurde durch die beiden Kinetikparameter IC₅₀ und K_i Wert charakterisiert. Dabei gibt der IC₅₀ Wert an, bei welcher Konzentration 50% der [³H] markierten Substrataufnahme gehemmt sind. Je geringer die Konzentrationen desto stärker konkurriert die zugegebene Substanz mit der anderen Substanz um die Bindungsstelle am Transporter. Um zu überprüfen ob eine kompetitive oder nicht-kompetitive Hemmung vorlag, wurde der K_i Wert nach der Methode von Dixon (Dixon, 1953; Cornish-Bowden, 1974) bestimmt.

4.5.2.1 Konzentrationsabhängige Hemmung der [³H] Phenylalanin und [³H] Leucin Aufnahme durch Melphalan und BCH

Die Aufnahme der radioaktiv markierten Aminosäure [³H] Phenylalanin wurde durch verschiedene Konzentrationen (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 μ M) von Melphalan oder BCH (2-Aminobicyclo[2, 2, 1]Heptan-2-Carboxylsäure) gehemmt. In der Tabelle 4.12 sind die IC₅₀-Werte für die [³H] Phenylalanin-Aufnahme zusammengestellt. Die IC₅₀-Werte lagen für die Hemmung mit BCH sowohl in den HEK293 (24 μ M) als auch in den CaCo-2 (19 μ M) Zellen niedriger als für Melphalan (204 μ M und 106 μ M), die [³H] Phenylalanin-Aufnahme wurde somit stärker durch BCH als durch Melphalan gehemmt. Die Aufnahme von [³H] Leucin wurde in HEK293-Zellen wie bei Phenylalanin stärker durch BCH mit einem IC₅₀ Wert von 134 μ M als durch Melphalan mit einem IC₅₀ Wert von 254 μ M gehemmt (Abbildung 4.10).

Tabelle 4.12: Zusammenfassung der IC₅₀-Werte für BCH und Melphalan in HEK293 und CaCo-2 Zellen. Diese wurden für 15 min bei RT mit 5 nM [³H] Phenylalanin in Anwesenheit steigender Melphalan bzw. BCH Konzentrationen gemessen.

Zelllinien	Hemmstoffe	IC ₅₀ -Werte [μ M]
HEK293	Melphalan	204
	BCH	24
CaCo-2	Melphalan	106
	BCH	19

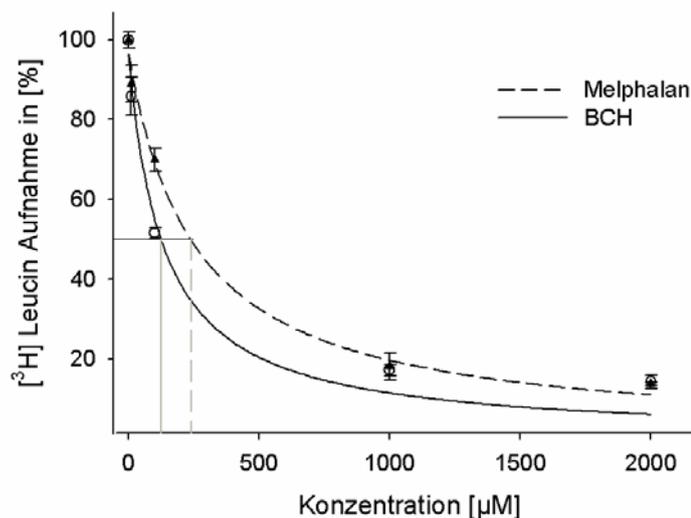


Abbildung 4.10: Konzentrationsabhängige Hemmung der [³H] Leucin-Aufnahme durch BCH (—) und Melphalan (---). HEK293-Zelllinien wurden 10 min bei RT mit 100 nM [³H] Leucin in Anwesenheit steigender BCH bzw. Melphalan Konzentrationen gemessen. IC₅₀-Wert = 134 μ M und IC₅₀ Wert = 254 μ M. Die Experimente wurden an 2 unabhängigen Tagen wiederholt.

Zur Bestimmung der kompetitiven Hemmung in HEK293 und CaCo-2 Zelllinien wurden zwei verschiedene Konzentrationen von Phenylalanin (5 nM und 50 nM) eingesetzt, die mit steigender Konzentration von BCH bzw. Melphalan (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 μM) inkubiert worden sind. Die K_i -Werte für Melphalan und BCH sind in den Abbildungen graphisch als Dixon Plots dargestellt. In den HEK293-Zellen lag der Schnittpunkt für BCH knapp im unteren negativen Bereich mit einem K_i Wert von 98 μM . Es lag somit keine kompetitive Hemmung vor, wobei BCH möglicherweise als Inhibitor an einer anderen Stelle des Transporters bindet. In dem Fall der CaCo-2 Zellen lag der Schnittpunkt für BCH genau auf der Linie und konnte somit nicht eindeutig der kompetitiven oder nicht-kompetitiven Hemmung zugeordnet werden. Melphalan zeigte sowohl in den HEK293 als auch CaCo-2-Zellen eine kompetitive Hemmung des Phenylalanins. Aufgrund der hohen K_i Werte mit 154 μM in HEK293 und 70 μM in CaCo-2 bindet das Melphalan jedoch mit einer geringen Affinität an die gleiche Stelle des Transporters wie Phenylalanin.

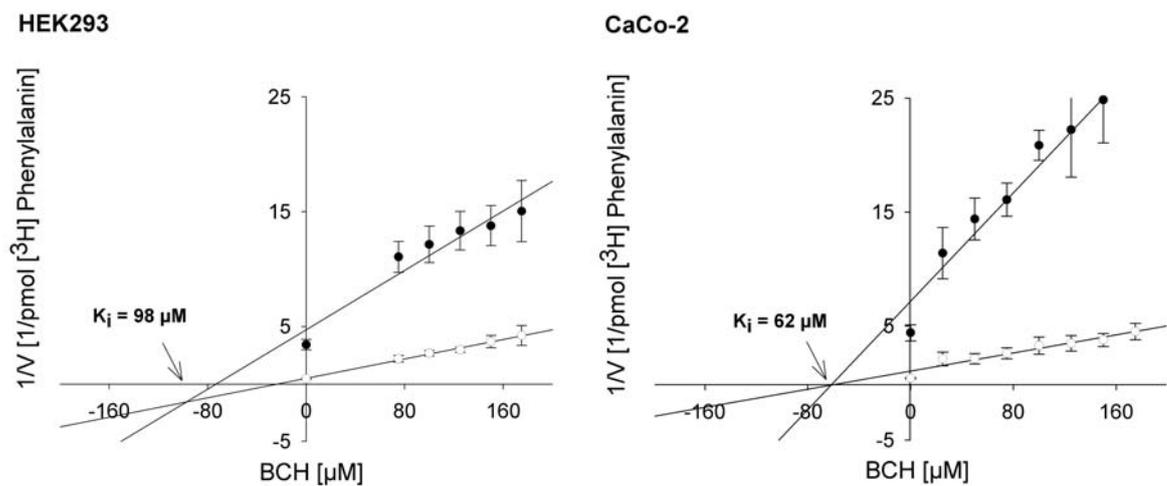


Abbildung 4.11: Kompetitive Hemmung zwischen BCH und Phenylalanin (Dixon Plot). HEK293- und CaCo-2-Zellen wurden 15 min bei RT mit (\bullet) 5 nM und (\circ) 50 nM [^3H] Phenylalanin in Anwesenheit steigender BCH Konzentrationen inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 4$).

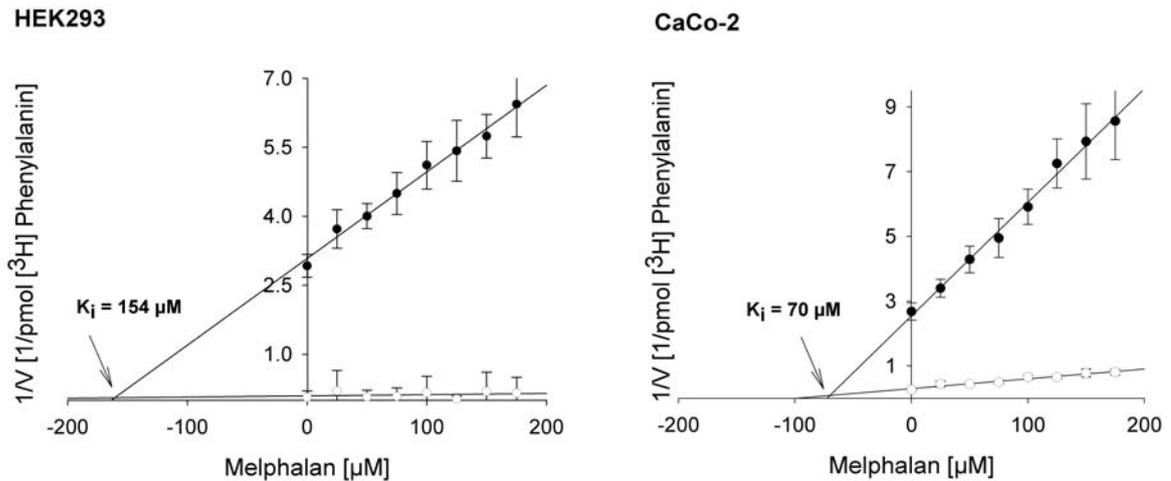


Abbildung 4.12: Kompetitive Hemmung zwischen Melphalan und Phenylalanin (Dixon-Plots). HEK293 und CaCo-2 Zelllinien wurden 15 min bei RT mit (•) 5 nM und (◦) 50 nM $[^3\text{H}]$ Phenylalanin in Anwesenheit steigender Melphalan Konzentrationen inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler ($n = 4$).

4.5.2.2 Hemmung der $[^3\text{H}]$ Melphalan-Aufnahme in HEK293-Zellen

In den ersten Versuchen wurde untersucht, ob typische Substrate für L-Typ Aminosäuretransporter und Transporter für organische Kationen (OCT) die Aufnahme von Melphalan in HEK293-Zellen inhibieren. Dazu wurde die Aufnahme des $[^3\text{H}]$ markierten Melphalans (50 nM) durch zwei Konzentrationen (0,1 mM und 1 mM) von nichtmarkierten Aminosäuren, BCH, TEA^+ (Tetraethylammonium-Ion), Metformin, Chinin und Chinidin gehemmt (Abbildung 4.13). Es konnte eine starke Hemmung der $[^3\text{H}]$ Melphalan-Aufnahme durch aromatische und nicht aromatische Aminosäuren beobachtet werden. Am stärksten wurde die Melphalan-Aufnahme durch die neutralen Aminosäuren Methionin und Leucin sowie durch die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Histidin und Tyrosin gehemmt. Bei einer Konzentration von 0,1 mM Methionin, Leucin und Tryptophan und Tyrosin wurde entsprechend die Melphalan-Aufnahme um 71,5%, 61,9%, 70,8% und 65,2% gehemmt. Erst ab einer Konzentration von 1 mM konnte der Melphalan-Transport durch die aromatische Aminosäure Phenylalanin bis auf 30% inhibiert werden. Die Aminosäuren Alanin, Isoleucin und Serin zeigten einen schwachen (Isoleucin und Serin) oder keinen signifikanten (Alanin) hemmenden Effekt auf den Melphalan-Transport. Auch BCH, ein spezifischer Inhibitor für das L-Typ Transportsystem, konnte den Transport des Melphalans in die Zellen nicht hemmen. Aus unbekanntem Gründen kam es sogar bei einer Konzentration von 0,1 mM zu einer Steigerung der Melphalan-Aufnahme. Die Substanzen TEA^+ , Metformin, Chinin und Chinidin stellen typische Substrate für die OCT1, 2, 3 dar. Jedoch konnte weder mit TEA^+ (OCT1) noch mit Metformin (OCT2) eine signifikante Hemmung der Melphalan-Aufnahme gezeigt werden. Für die beiden OCT3

Substrate Chinin und Chinidin konnte eine Inhibition des Melphalan-Transportes um 34,6% (Chinin) und 66,9% (Chinidin) nur bei der höheren Konzentration von 1 mM beobachtet werden.

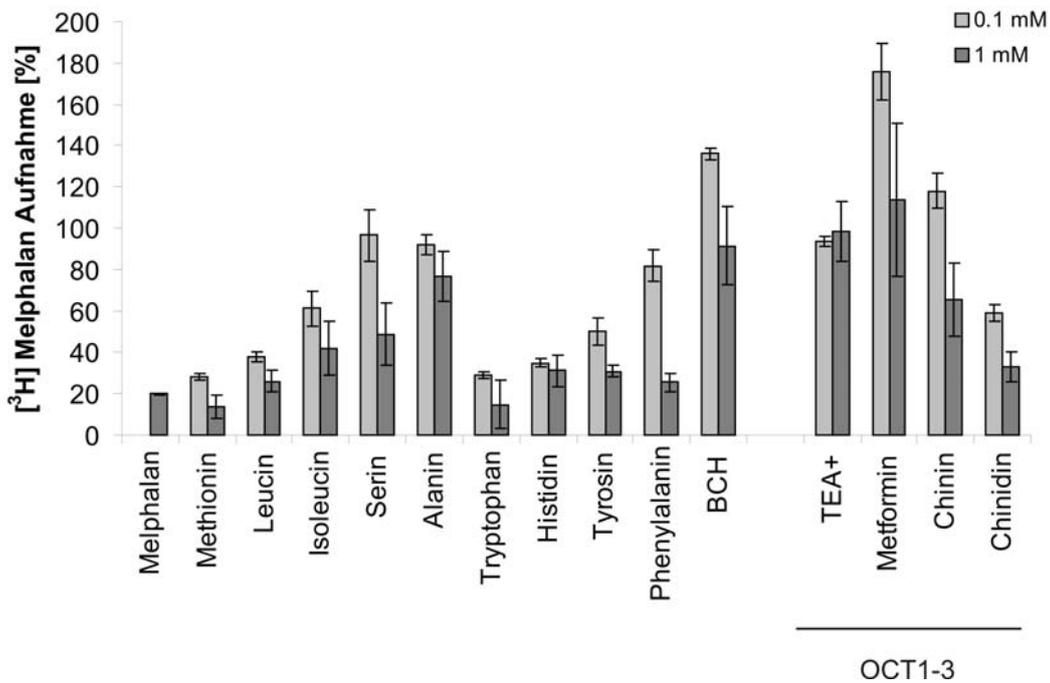


Abbildung 4.13: Hemmung der Melphalan-Aufnahme durch verschiedene Aminosäuren sowie OCT Substraten in HEK293 Zelllinien. Die Zellen wurden für 10 min bei RT mit 50 nM [^3H] Melphalan in Anwesenheit von (\square) 0,1 mM (\blacksquare) 1 mM und nichtmarkierten Aminosäuren bzw. OCT Substraten inkubiert.

4.5.3 Spezifische Herunterregulierung der Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2 mittels siRNA

Die siRNA vermittelte transkriptionelle Herunterregulierung von Genen wurde als Methode angewendet, um die Rolle der LAT1- und LAT2-Transporter bei der zellulären Aufnahme von Melphalan zu analysieren. Die Versuche erfolgten an ausgewählten menschlichen Zelllinien und die Effizienz der Herunterregulierung wurde mittels mRNA- und Proteinanalysen überprüft. Für die funktionellen Untersuchungen kamen sowohl Transportmessungen mit [^3H] markierten Substanzen als auch Bestimmungen der Zellvitalität mittels MTT-Assay zum Einsatz.

Die GFP-siRNA wurde in allen Versuchen als Negativkontrolle zur Herunterregulierung von LAT1 und LAT2 eingesetzt. Da es sich um ein artifizielles Protein handelt, können mögliche Effekte der siRNA auf andere Gene weitgehend ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung der Wirksamkeit der siRNA gegen GFP wurden die Zellen mit dem GFP-Plasmid und der siRNA gegen GFP transient transfiziert.

4.5.3.1 Kinetik und Spezifität der siRNA Wirkung auf LAT1-Expression

Zur Herunterregulierung der LAT1-Expression wurde eine aus der Literatur bekannte siRNA Sequenz eingesetzt (Li and Whorton, 2005). Aufgrund deren starker LAT1-Expression (siehe Abschnitt 4.5.1) wurden HeLa-Zellen ausgewählt, um den Effekt einer spezifischen siRNA vermittelten Herunterregulierung (*Gen-Knockdown*) von LAT1 zu ermitteln. Der Verlauf und die Reproduzierbarkeit wurde in Kinetik-Experimenten mit mRNA- und Proteinmessungen in mehreren Wiederholungen evaluiert. Danach konnten die passenden Zeitfenster für die folgenden funktionellen Untersuchungen ausgewählt werden, in denen die Expression von LAT1 maximal herunterreguliert war.

Die Kinetikversuche erstreckten sich zunächst für LAT1 auf einen Zeitraum von 3 Tagen mit einer einmaligen Transfektion der Hela-Zellen mit der siRNA. Wie man aus der Abbildung 4.14 (A) entnehmen kann, konnte die siRNA vermittelte Herunterregulierung der LAT1-mRNA in den ersten 24 Stunden nach der Transfektion beobachtet werden. Dieser Effekt ließ sich über einen Zeitraum von 3 Tagen nachweisen. Dabei war die LAT1-mRNA die gesamte Versuchsdauer auf unter 10% des Ausgangswertes herunterreguliert. Die GFP-siRNA und eine siRNA gegen LAT2, zeigten keinen Einfluss auf die LAT1-Expression. Um einen möglichst großen Effekt bei den funktionellen Untersuchungen zu erzielen und die ausbleibende Reduktion der Proteinexpression (unten dargestellt) weiter zu klären, wurden die Kinetikversuche für LAT1 auf 9 Tage mit wiederholten Transfektionen (siehe Kapitel 3.8.4.2) ausgeweitet. Die LAT1-mRNA Herunterregulierung auf 10% konnte auch hier über den Zeitraum von 9 Tagen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.14 (B)).

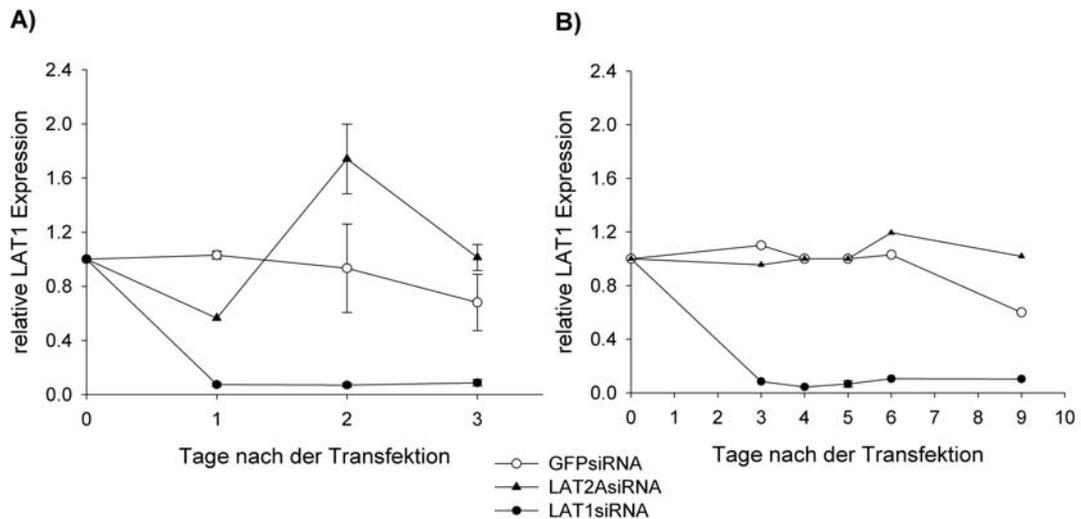


Abbildung 4.14: Kinetik des siRNA Effekts in HeLa-Zellen. A) Zellen wurden einmal mit der LAT1-siRNA transfiziert. Die LAT1-Expression wurden nach 1, 2 und 3 Tagen gemessen. B) Ausweitung der Kinetik-Versuche, wobei die Zellen dreimal (Tag 0, 4 und 8) mit der siRNA transfiziert worden sind. Nach 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9 Tagen wurde die LAT1-Expression in den Zellen gemessen.

Durch Analyse der Proteinexpression in den mit und ohne siRNA behandelten HeLa-Zellen wurde die Wirkung der LAT1-siRNA überprüft. Dabei wurden drei unterschiedliche Antikörper gegen LAT1 ausgetestet, jedoch konnte keine Veränderung der Proteinmenge bzw. der Bandenstärke während des gesamten Zeitraums von 9 Tagen gezeigt werden (Abbildung 4.15). Allerdings konnte eine herunterregulierte LAT1-Aktivität mittels Transportmessung von typischen LAT1 Substraten nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.5.4).

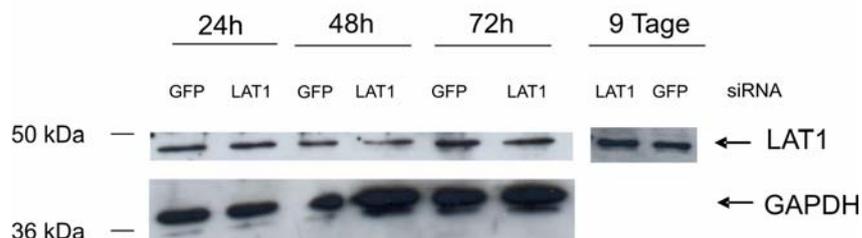


Abbildung 4.15: Effekt der siRNA vermittelten LAT1 Herunterregulierung auf Protein Ebene. Die HeLa-Zellen wurden mit LAT1-siRNA bzw. der Kontroll-siRNA gegen GFP transfiziert. Nach 24, 48, 72 und 9 Tagen wurden die Zellen geerntet und das isolierte Protein für die Western-Blot Analyse eingesetzt. Die Immunfärbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen LAT1 und GAPDH.

4.5.3.2 Kinetik und Spezifität der siRNA Wirkung auf LAT2-Expression

Zur Analyse der Herunterregulierung des LAT2 Gens lag keine optimale Zelllinie mit einer starken LAT2-Expression und einer niedrigen LAT1-Expression vor. Aus diesem Grund erfolgte die Transfektion der LAT2siRNA nicht nur für eine Zelllinie, sondern mit

insgesamt 3 Zelllinien (Colo320, HEK293 und CaCo-2). Es wurden auch insgesamt drei unterschiedliche siRNAs gegen LAT2 getestet: LAT2A, LAT2T und LAT2Q. Alle drei zeigten eine vergleichbare Herunterregulierung des LAT2-Gens auf 20% des Ausgangswertes nach einer einmaligen Transfektion über einen Zeitraum von 3 Tagen. Die LAT2AsiRNA wurde ausgewählt und in weiteren Experimenten angewendet. Wie für LAT1 beschrieben, wurden die Untersuchungen auch für LAT2 nach dem erweiterten Zeit- und Transfektionsschema ausgedehnt. Jedoch konnte die mRNA nicht auf das niedrige Niveau wie bei LAT1 herunterreguliert werden (Abbildung 4.16). Auch bei den anderen Zelllinien konnte keine verbesserte Herunterregulierung der LAT2-mRNA erzielt werden (Daten nicht im Detail gezeigt).

Auch bei LAT2 hat sich die siRNA vermittelte Herunterregulierung im Western-Blot nicht gezeigt (Abbildung 4.16). Die Diskrepanz zwischen mRNA-Expression und Proteinexpression legt nahe, dass die Transportproteine eine sehr lange Halbwertszeit haben (näheres in der Diskussion).

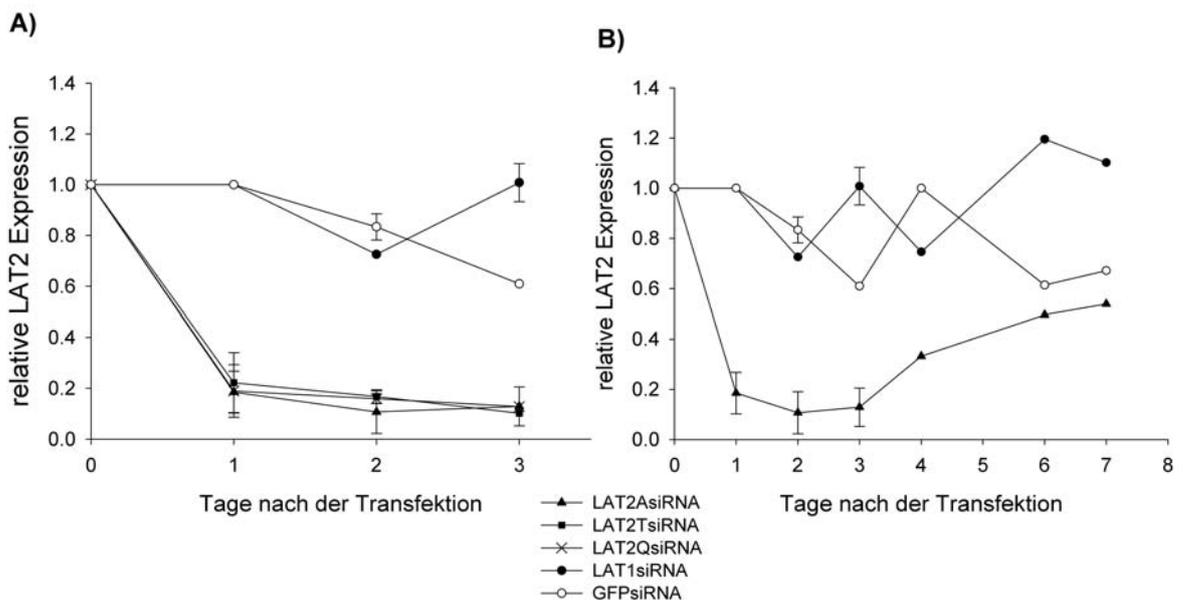


Abbildung 4.16: Kinetik des siRNA Effekts in Colo320-Zellen. **A)** Colo320 Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 mit der LAT2siRNA transient transfiziert. Die LAT2 mRNA Expression wurden nach 1, 2 und 3 Tage gemessen. **B)** Ausweitung der Kinetik-Versuche, wobei die Zellen wiederholt (zu den Zeitpunkten 0 und 4 Tage) mit der LAT2AsiRNA transfiziert worden sind. Nach 3, 4, 5, 6 und 7 Tagen wurde die LAT2-mRNA Expression in den Zellen gemessen.

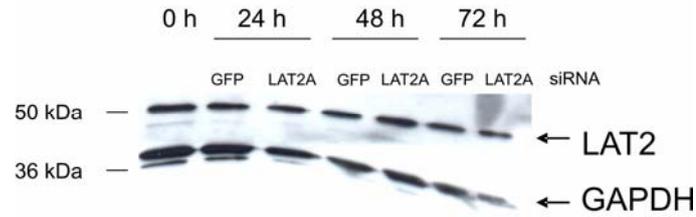


Abbildung 4.17: Effekt der siRNA vermittelten LAT1 Herunterregulierung auf die Proteinexpression. Die Colo320-Zellen wurden mit LAT2-siRNA bzw. der Kontroll siRNA gegen GFP transfiziert. Nach 24, 48 und 72h wurden die Zellen geerntet und das isolierte Protein für die Western-Blot Analyse eingesetzt. Die Immunfärbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen LAT2 und GAPDH.

4.5.4 Funktionelle Untersuchungen zur LAT1 Herunterregulierung

4.5.4.1 Effekt auf den Melphalan-Transport

Um zu untersuchen, welche Auswirkung die siRNA vermittelte Herunterregulierung von LAT1 und LAT2 auf den Melphalan-Transport hat, wurde die Aufnahme von [³H] Leucin, Phenylalanin und Melphalan in HeLa- und HEK293-Zellen untersucht. Die Transportmessungen erfolgten am 6. und 9. Tag nach der ersten Transfektion mit der entsprechenden siRNA. Die Herunterregulierung der leichten Kette des Aminosäuretransporters LAT1 bewirkte im Vergleich zu den mit GFP-siRNA transfizierten Zellen eine deutliche Abnahme der [³H] Leucin-Aufnahme nach 6 Tagen um 50% des Ausgangswertes und nach 9 Tagen bis auf 30,5% (siehe Abbildung 4.18). Für die Aminosäure Phenylalanin konnte der Transport in den mit LAT1-siRNA transfizierten HeLa-Zellen auf 80% nach 6 Tagen auf 60,8% nach 9 Tagen gehemmt werden. Nach der Inkubation der Zellen mit dem Zytostatikum Melphalan nahm der Transport in den mit LAT1-siRNA transfizierten Zellen auf 60% des Ausgangswertes nach 6 Tagen und auf 41,8% des Ausgangswertes nach 9 Tagen ab. Nach der Transfektion mit der LAT2-siRNA in HEK293-Zellen konnte weder für die Aminosäuren Leucin und Phenylalanin noch für Melphalan eine signifikante Veränderung der Aufnahme beobachtet werden.

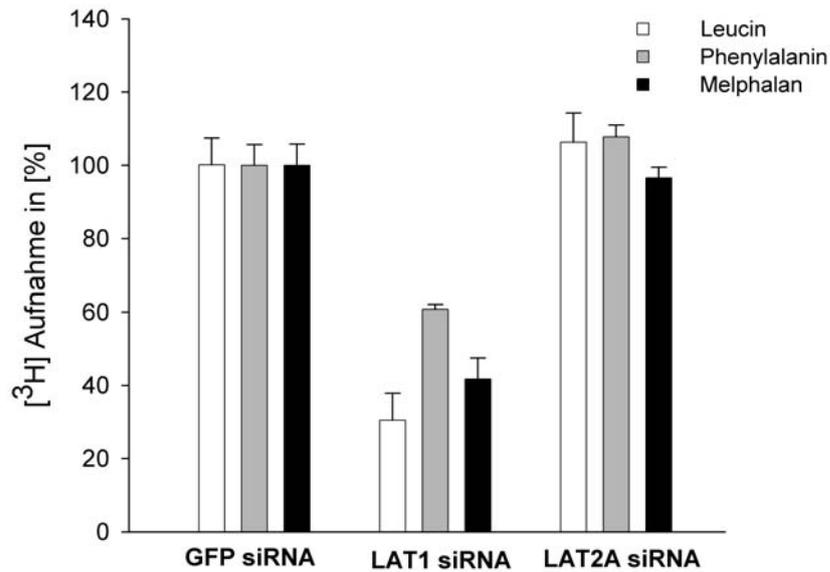


Abbildung 4.18: [^3H] Aufnahme von Leucin, Phenylalanin und Melphalan in mit LAT1-siRNA transfizierten HeLa-Zellen und mit LAT2A-siRNA transfizierten HEH293-Zellen nach 9 Tagen. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern ($n = 3$).

4.5.4.2 Effekt auf die Zellvitalität nach der Melphalan Behandlung

Zusätzlich wurde der Effekt der siRNA vermittelten LAT1-Herunterregulierung in einem weiteren Funktionstest zur Zytotoxizität des Melphalans untersucht. Die mit LAT1siRNA behandelten HeLa-Zellen wurden auf Veränderungen der Überlebensrate im Zellvitalitätstest nach der Behandlung mit verschiedenen Melphalankonzentrationen untersucht. Der Verlauf der konzentrationsabhängigen Überlebensrate in den mit und ohne siRNA behandelten Zellen zeigte einen Effekt der LAT1-Herunterregulierung auf das Überleben der Zellen nach der Inkubation mit Melphalan (Abbildung 4.19). Eine Verschiebung des IC_{50} Wertes von $84 \mu\text{M}$ auf $292 \mu\text{M}$ zeigte somit eine dreifach reduzierte zytotoxische Wirkung des Melphalans bei den Zellen mit einer geringeren LAT1-Expression gegenüber den normal exprimierenden Zellen.

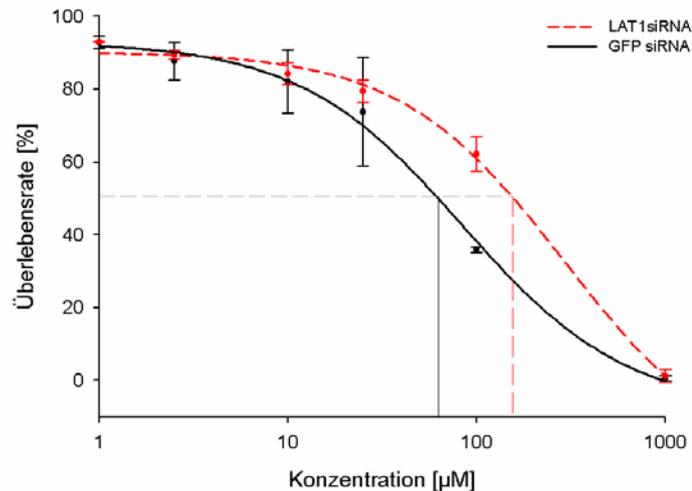


Abbildung 4.19: Darstellung der Zytotoxizität des Melphalans als Überlebenskurven. Hela-Zellen, die mit GFP- oder LAT1-siRNA transfiziert worden sind, wurden 7 Tage nach der 1. Transfektion mit Melphalankonzentrationen zwischen 1 und 1000 μM über 24h inkubiert und die Zellvitalität im MTT-Asay ermittelt.

4.5.5 Expression von LAT1 und LAT2 in Oozyten

Neben der siRNA vermittelten Gen-Herunterregulierung stellt die Überexpression von Proteinen in Oozyten ein System zur Untersuchung der Substratspezifität von Transportproteinen dar. Dazu wurden zunächst LAT1 oder LAT2 cRNA (siehe Kapitel 3.5.4) in die Oozyten injiziert und dann der Transport von radioaktiv markierten Substraten in diesen Oozyten gemessen.

Da es sich bei den Aminosäuretransportern LAT1 und LAT2 um Heterodimere handelt, bestehend aus der leichten Kette (LAT1 bzw. LAT2) und dem Glycoprotein 4F2hc, mussten beide in den Oozyten koexprimiert werden. Zur Kontrolle wurden Oozyten zum einen nur mit Wasser injiziert und zum anderen die beiden Proteine einzeln, ohne 4F2hc, in den Oozyten exprimiert.

Die Basal-Aufnahme der beiden radioaktiv markierten Aminosäuren Leucin und Phenylalanin war sehr gering (5,2 und 6,0 pmol/Oozyte/30min). Die Expression von LAT1, LAT2 und 4F2hc jeweils alleine führte zu keiner signifikanten Veränderung der Aufnahme (Abbildung 4.20 A und B). Nur bei den Oozyten, die sowohl die leichte als auch die schwere Kette überexprimierten, zeigte sich eine signifikant erhöhte Aufnahme der [^3H] Substrate Leucin und Phenylalanin. Die Koexpression von LAT1 mit 4F2hc führten zu einer Leucin-Aufnahme von 47,4 pmol/Oozyte/30 min (siehe Abbildung 4.21, A) und die Koexpression von LAT2 mit 4F2hc zu einer Phenylalanin-Aufnahme von 58,9 pmol/Oozyte/30 min (siehe Abbildung 4.21, B). Dieses entspricht einer 9,1fachen und 9,8fachen Erhöhung der Leucin bzw. Phenylalanin-Aufnahme.

Um die Substratspezifität der beiden Transporter zu vergleichen, wurde der Transport sowohl mit Leucin als auch mit Phenylalanin in den LAT1-4F2hc und LAT2-4F2hc überexprimierenden Oozyten gemessen. Dabei konnte für LAT1-4F2hc eine 42% stärkere Aufnahme von Leucin als von Phenylalanin bei gleicher Konzentration beobachtet werden. Für LAT2-4F2hc verhielt es sich umgedreht, hier wurde Phenylalanin 67% stärker in die Oozyten transportiert als das Leucin bei gleicher Konzentration von 10 μM . Daraus lässt sich schließen, dass beide Transporter Leucin und Phenylalanin transportieren können. Um die Substratspezifität der beiden Transporter auf Melphalan zu testen, wurden die Oozyten mit zwei verschiedenen Konzentrationen von Melphalan inkubiert und die Radioaktivität in den Oozyten gemessen. Es konnte eine 1,8fache Steigerung des Melphalan-Transportes in den mit LAT1-4F2hc und um eine 1,5fache Steigerung in den LAT2-4F2hc überexprimierenden Oozyten bei einer Melphalankonzentration von 100 μM nachgewiesen werden. Der Effekt war vergleichbar bei einer Konzentration von 300 μM Melphalan.

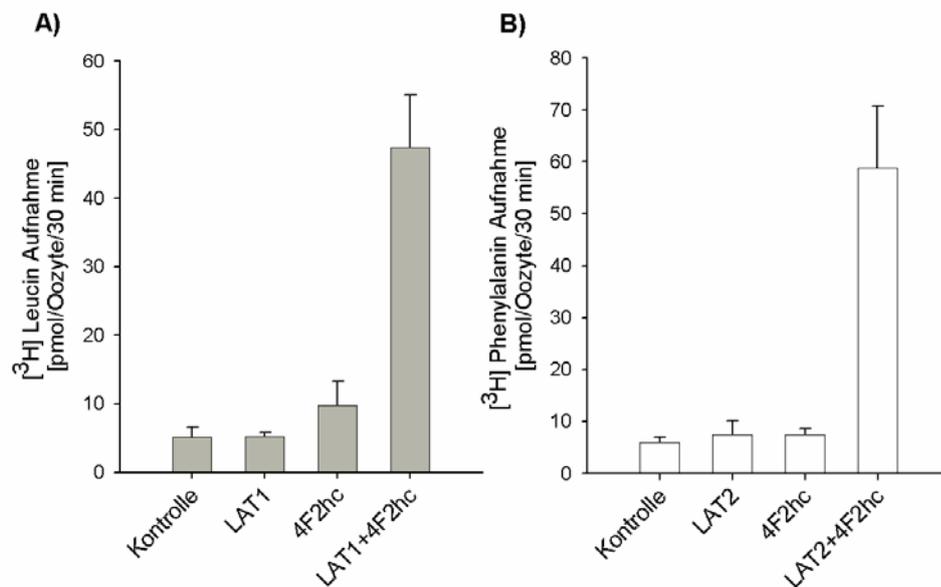


Abbildung 4.20: Funktionelle Expression von LAT1 und LAT2 mit 4F2hc in *Xenopus* Oozyten. **A)** $[^3\text{H}]$ Leucin (10 μM) Aufnahme in *Xenopus* Oozyten injiziert mit Wasser (Kontrolle), LAT1 cRNA, 4F2hc cRNA, LAT1+4F2hc cRNA zusammen. **B)** $[^3\text{H}]$ Phenylalanin (10 μM) Aufnahme in *Xenopus* Oozyten injiziert mit Wasser (Kontrolle), LAT2 cRNA, 4F2hc cRNA, LAT2+4F2hc cRNA zusammen.

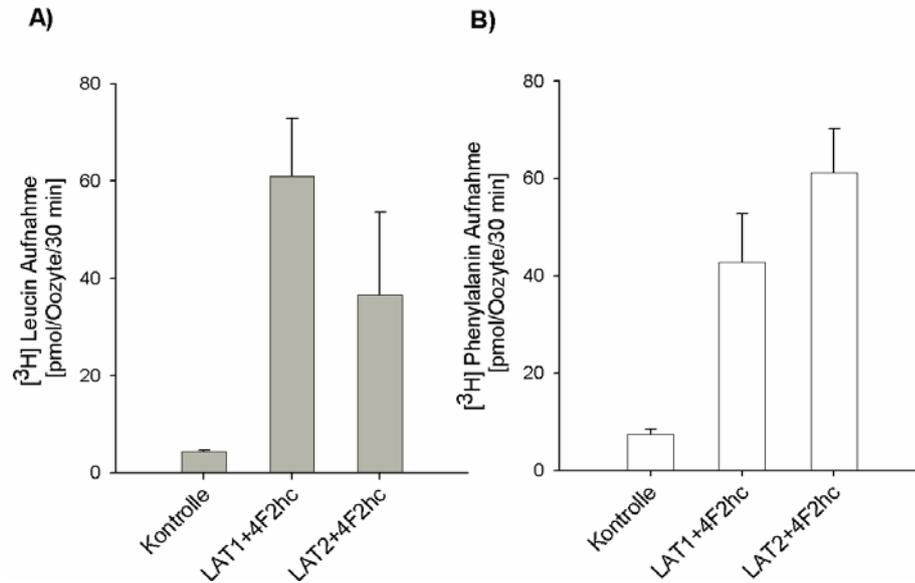


Abbildung 4.21: Funktionelle Expression von LAT1 und LAT2 in *Xenopus* Oozyten. Koexpression von LAT1/LAT2 mit 4F2hc. A) Aufnahme von ^3H Leucin (10 μM) B) Aufnahme von ^3H Phenylalanin (10 μM)

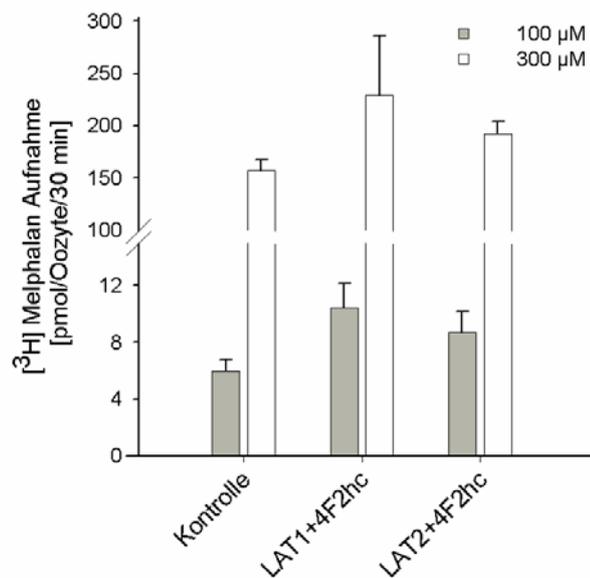


Abbildung 4.22: Funktionelle Expression von LAT1+4F2hc und LAT2+4F2hc in *Xenopus* Oozyten. Aufnahme von ^3H Melphalan (100 μM und 300 μM).

4.6 Einfluss der Expression von Influx- und Effluxtransportern in Tumorzelllinien auf die Zytotoxizität und intrazelluläre Akkumulation von Melphalan

Die Charakterisierung der Melphalan-Zytotoxizität in Abhängigkeit von der Expression verschiedener Transportsysteme erfolgte an insgesamt 29 Tumorzelllinien. Dabei handelte es sich um Zelllinien, die aus 8 Patienten mit Multiplem Myelom, 5 mit Hodgkin-Lymphom, 4 mit Burkitt-Lymphom, 4 mit Mantelzell-Lymphom, 3 mit diffusem B-Zell-

Lymphom, 3 mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) und 2 mit akuter myeloischer Leukämie (AML) generiert wurden. Alle Zelllinien entsprachen Tumorarten, die mit Melphalan in der Erstlinien- oder Folgetherapie behandelt werden. Wegen der besonderen Bedeutung von Melphalan bei der Therapie des Multiplen Myeloms fokussierten sich unsere Analysen auf diese Zelllinien.

Die Zytotoxizität des Melphalans wurde in drei unabhängigen Experimenten zum einen mittels Zellvitalitätstest (MTT-Test) und zum anderen mittels Apoptosemessung (Caspase-3/7-Enzymaktivität) in den 29 Zelllinien bestimmt. Zusätzlich wurde die Akkumulation des [³H] Melphalans nach der Inkubation mit drei Konzentrationen in diesen Zellen gemessen.

Parallel vor jedem Versuch wurde aus den gewonnenen cDNA Proben von jeder Zelllinie die Expression verschiedener Transporter bestimmt. Neben den Aminosäuretransportern LAT1, LAT2 und 4F2hc wurden die OCT1, -2, -3 (*organic cationic transporter*) und der T-Typ Aminosäuretransporter TAT1 sowie die beiden Effluxtransporter MRP1 (*multidrug resistance related protein 1*) und MDR1 (*multidrug resistance protein 1*) in den Tumorzelllinien quantifiziert.

4.6.1 Zellvitalitätsunterschiede nach der Behandlung mit Melphalan

Zur Bestimmung der Zytotoxizität des Melphalans wurden die Zellen im Rahmen eines Zellvitalitätstests mit 6 Melphalankonzentrationen (0, 1, 2,5, 10, 25, 100, 1000 µM) über 24 h inkubiert und aus den Überlebenskurven der IC₅₀-Wert für jede Tumorzelllinie ermittelt. Die verwendeten Melphalankonzentrationen lagen im Bereich von therapeutisch ermittelten Plasmakonzentrationen in Patienten, die mit Melphalan behandelt worden sind (Kühne, 2004).

Es konnten tumorspezifische Unterschiede in der Toxizität des Melphalans nachgewiesen werden (Abbildung 4.23). Die Abbildung 4.23 gibt einen Überblick, welche Tumorzelllinien einen niedrigen IC₅₀ Wert aufwiesen, d.h. sensitiv gegenüber Melphalan reagierten und welche sich mit einem hohen IC₅₀-Wert resistent gegenüber Melphalan verhielten. Für die Multiple Myelom Zelllinie EJM konnte kein IC₅₀-Wert ermittelt werden, da diese auch bei der höchsten gewählten Konzentration von Melphalan 1000 µM diesen Wert nicht erreichten und somit sehr schlecht auf das Melphalan ansprach. Die Gruppe der Mantelzell-Lymphom-Zelllinie zeigten durchweg ein gutes Ansprechen auf Melphalan mit einem Median IC₅₀ Wert von 11,9 µM. Bei den Zelllinien aus Hodgkin- und Burkitt- Lymphomen sowie von CML- und AML-Patienten führte bei einigen Zelllinien

bereits geringere Konzentrationen von Melphalan zu einem schnellen Absterben der Zellen während bei den anderen das Absterben der Zellen erst bei höheren Konzentrationen von Melphalan beobachtet werden konnte, hier hängt der Transport oder die Wirkung also offenkundig von tumorspezifisch erworbenen Faktoren ab.

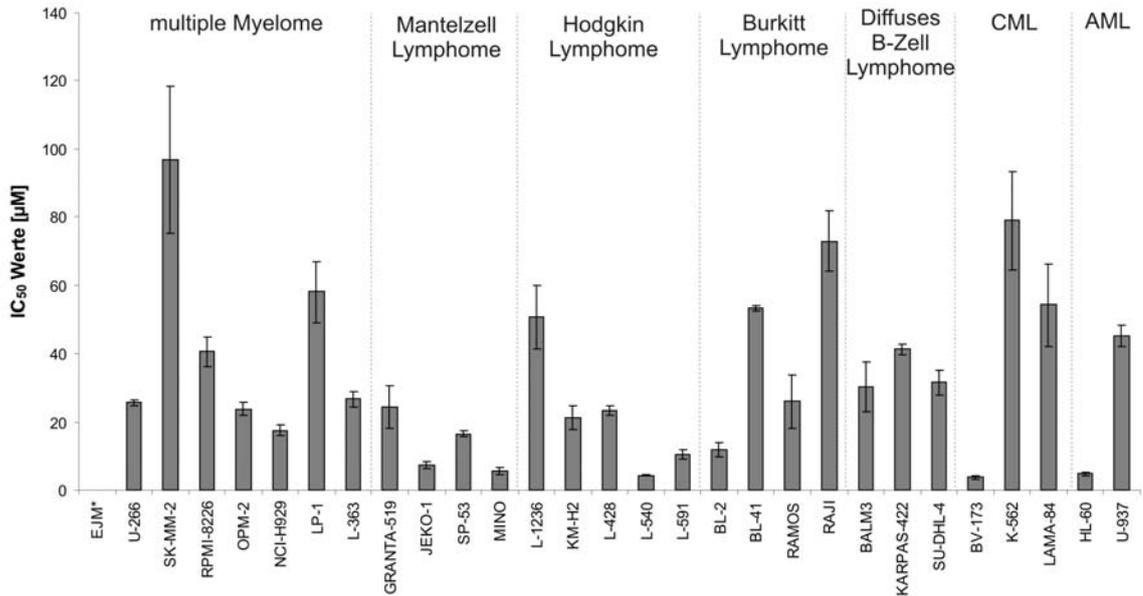


Abbildung 4.23: IC₅₀-Werte mit SEM von 29 Tumorzelllinien nach der Inkubation mit Melphalan über 24 Stunden. Für die EJM* Zelllinie konnte kein IC₅₀ Wert ermittelt werden, da über 50% der Zellen auch bei der höchsten Melphalan Konzentration von 1000 µM überlebten.

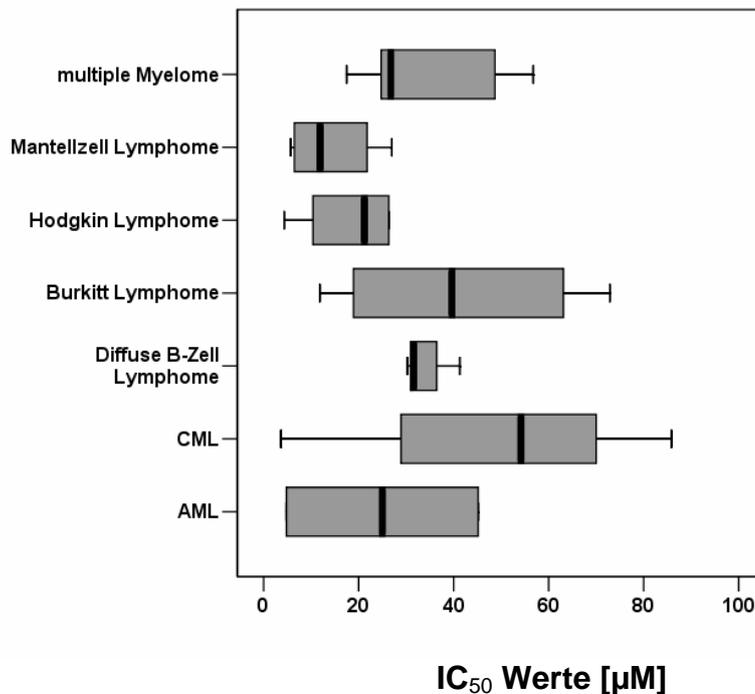


Abbildung 4.24: Variabilität in der Zellvitalität gruppiert nach 7 verschiedenen Tumorarten. CML = chronisch myeloische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie. Die mittlere fette Linie in den Kästchen bezeichnet den Median, die grau unterlegten Kästchen den Bereich zwischen der 25% und 75% Quartile und die Antennen bezeichnen den Bereich aller Werte mit Ausnahme von Ausreißern.

Die Zelllinien von Patienten mit Multiplem Myelom zeigten ein durchschnittliches Ansprechen auf Melphalan mit einem Median IC_{50} von $26,8 \mu\text{M}$. Es konnte eine breite Streuung innerhalb diese Gruppe beobachtet werden mit einem guten Ansprechen bei den NCI-H929 Zellen (IC_{50} von $17 \mu\text{M}$), bis hin zur Resistenz bei SK-MM-2 Zellen (IC_{50} von $88,9 \mu\text{M}$, Abbildung 4.23).

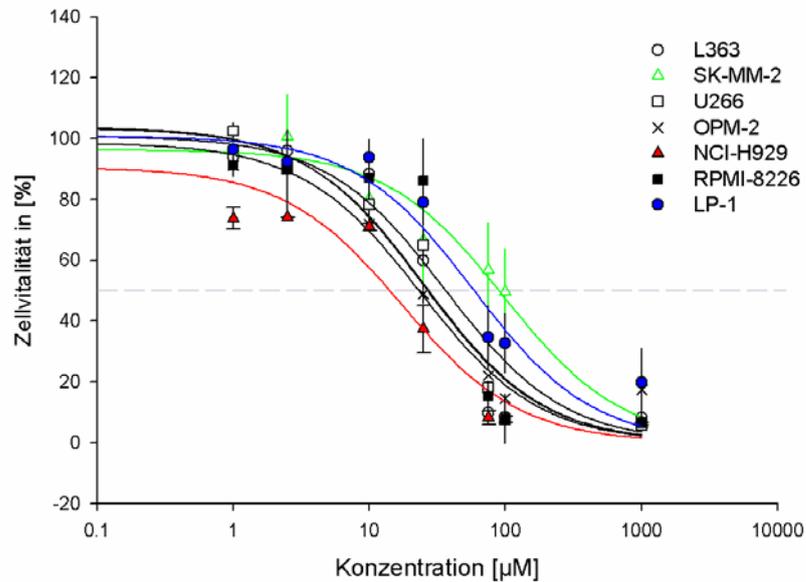


Abbildung 4.25: Überlebenskurven aller Multiplen Myelom-Zelllinien nach Inkubation mit Melphalan über 24 Stunden.

4.6.2 Unterschiede in der Caspase-3/7-Enzymaktivität nach der Behandlung mit Melphalan

Die Bestimmung der Caspase-3- und 7-Enzymaktivität stellt eine Methode dar, mit der die Melphalan-induzierte Apoptose ermittelt werden kann. Die Zellen wurden zunächst mit drei Konzentrationen von Melphalan (0, 10, 25 und $100 \mu\text{M}$) über 16 Stunden inkubiert. Anschließend konnte die intrazelluläre Caspase-3/7-Enzymaktivität als Apoptosemarker bestimmt werden.

Auch die Melphalan-induzierten Caspase-3/7-Aktivitäten zeigten eine starke Variabilität innerhalb der getesteten 29 Zelllinien. In der Abbildung 4.26 sind die berechneten Werte für die Enzymaktivität für alle Zelllinien graphisch gegen die IC_{50} Werte aus dem Zellvitalitätstest dargestellt. Beim Vergleich der Werte für die Enzymaktivität mit den IC_{50} Werten findet man eine Übereinstimmung zwischen dem Absterben bzw. Überleben und der durch Melphalan ($25 \mu\text{M}$) ausgelösten Apoptose. Der mittels linearer Regression bestimmte Korrelationskoeffizient (r^2) betrug 0,18 mit einem signifikanten P-Wert von 0,02 für alle untersuchten Tumorzelllinien. Daraus lässt sich schließen, dass 18% der

Unterschiede in der Sterblichkeit auf Unterschiede in der Melphalan-induzierten Apoptose zurückgeführt werden können.

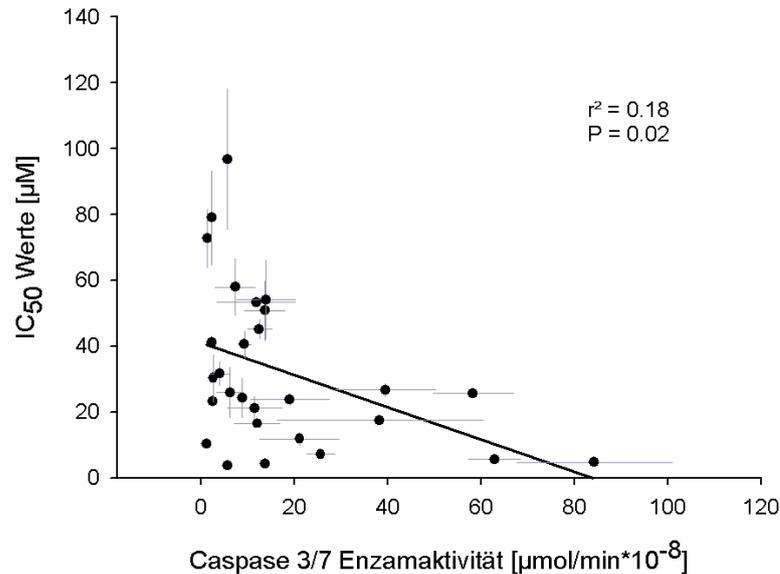


Abbildung 4.26: Korrelation der Zellvitalität mit der Apoptose für alle Zelllinien.

Betrachtet man diesen Zusammenhang nach den unterschiedlichen Tumorarten getrennt, weisen vor allem die Multiplen Myelomzellen eine 46%ige Korrelation der Sterblichkeit mit der Melphalan-induzierten Apoptose auf ($P = 0,04$, Abbildung 4.27). Zellen, wie z.B. SK-MM-2, die nach der Inkubation mit Melphalan einen sehr hohen IC_{50} Wert aufwiesen, zeigten auch bei der Bestimmung der Enzymaktivität sehr niedrige Werte, d.h. das Melphalan löste bei diesen Zellen keine Apoptose aus bzw. die Zellen verhielten sich gegenüber dem Melphalan resistent. Im Gegensatz dazu konnte bei den NCI-H929-Zellen mit einem zuvor ermittelten IC_{50} -Wert von $17 \mu\text{M}$ eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität nach der Inkubation mit $25 \mu\text{M}$ Melphalan beobachtet werden. Die höchsten Werte für die Enzymaktivität konnten bei einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ Melphalan erzielt werden. Bei einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ nahm die Aktivität der Caspasen 3/7 wieder ab, was auf einen möglichen Übergang von der Apoptose zur Nekrose schließen lässt.

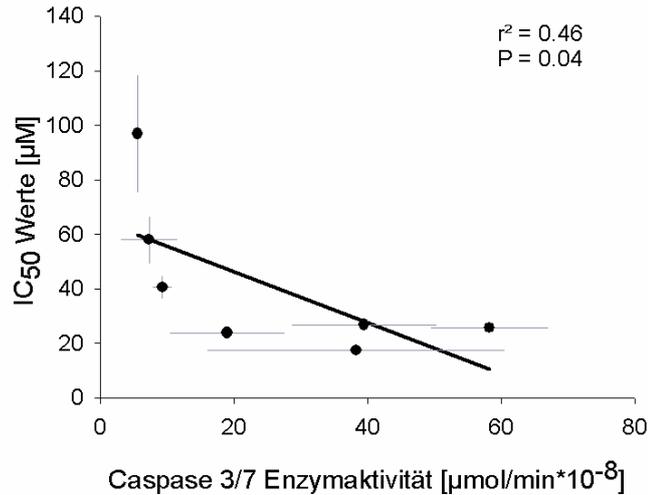


Abbildung 4.27: Korrelation der IC_{50} -Werte mit der Apoptose nach der Inkubation mit 25 μM Melphalan ($r^2 = 0,46$, $P = 0,04$).

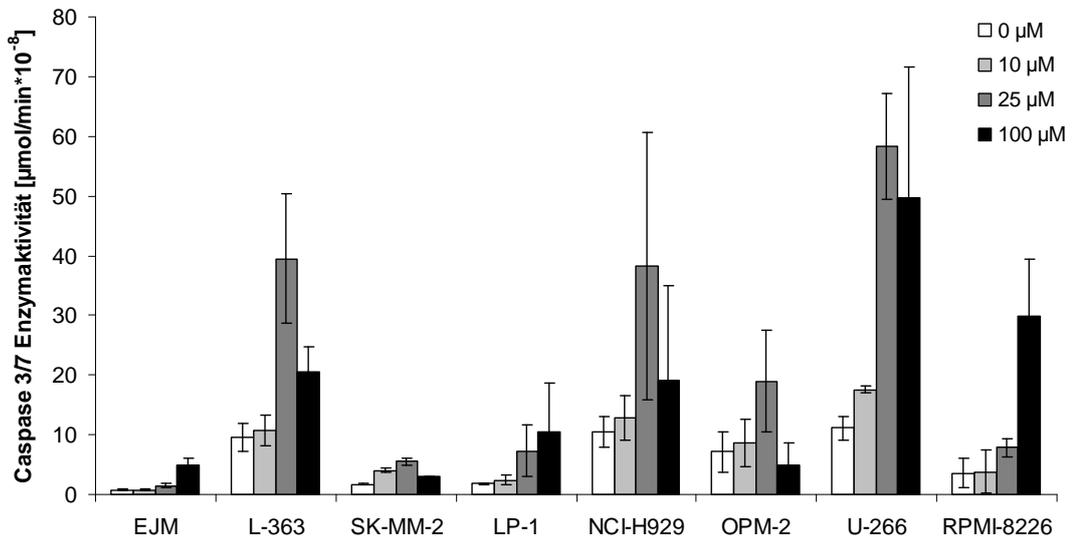


Abbildung 4.28: Darstellung der Caspase-3/7-Aktivität (Mittelwert ($n = 3$) \pm SEM) für alle Multiple Myelom-Zelllinien nach der Inkubation mit 0, 10, 25 und 100 μM Melphalan.

4.6.3 Unterschiede in der intrazellulären Akkumulation von Melphalan und Korrelation mit der Toxizität von Melphalan

In einem weiteren Experiment zur Charakterisierung der Zytotoxizität des Melphalans und um zu überprüfen, ob die Zytotoxizität mit dem Transport von Melphalan in die Zellen korreliert, wurde die Aufnahme von [3H] Melphalan in den 29 Tumorzellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit drei Melphalankonzentrationen (0,1, 0,8 und 20 μM) über 10 min inkubiert und die Aufnahme des Melphalans über die Radioaktivität ermittelt. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden die Experimente an drei Tagen in Doppelbestimmung wiederholt.

Für alle Zelllinien korrelierte der Transport mit den Ergebnissen des MTT-Assays und den Enzymwerten nicht. Jedoch konnte bei den Multiplen Myeloma Zelllinien für die Sterblichkeit ein signifikanter Zusammenhang mit der Melphalan-Akkumulation in den Zellen hergestellt werden ($r^2 = 0,47$, $P = 0,04$, Abbildung 4.29 (A)). Damit können 47% der Variabilität in der zytotoxischen Wirkung von Melphalan mit einer unterschiedlichen intrazellulären Akkumulation des Melphalans erklärt werden. Auch bei der Melphalan-induzierten Apoptose wiesen die Zellen mit einer hohen Enzymaktivität auch eine höhere Akkumulation des Melphalans auf, jedoch war dieses Ergebnis statistisch nicht signifikant ($r^2 = 0,28$, $P = 0,1$, Abbildung 4.29 (B)).

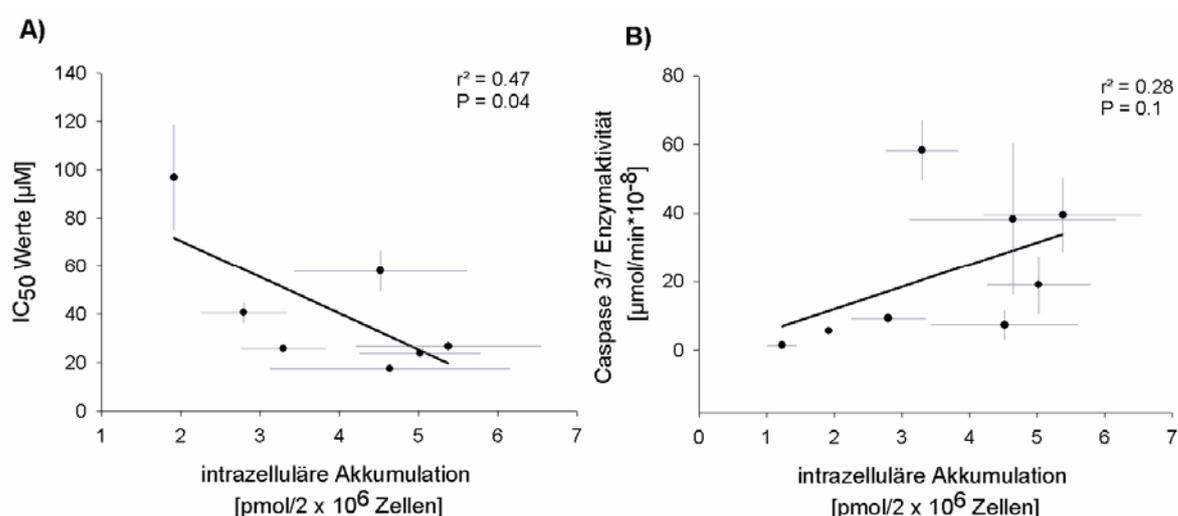


Abbildung 4.29: Korrelation zwischen intrazellulärer [³H] Melphalan-Akkumulation (0,8 µM) in den Multiplen Myelom-Zellen mit (A) der Sterblichkeit und (B) der Melphalan-induzierten Apoptose.

4.6.4 Unterschiede in der Expression verschiedener Transporter in Tumorzelllinien

Die Unterschiede der Expression verschiedener Transportsysteme in den 29 Tumorzelllinien wurden mittels RT-PCR quantitativ bestimmt. Für LAT1 und LAT2 erfolgte die Quantifizierung aufgrund der vorhandenen Plasmide absolut mit TBP als Referenzgen. LAT1 wurde in allen untersuchten Tumorzelllinie mit dem niedrigsten Wert von 0,13 Transkripte/TBP in Lama-Zelllinien und den höchsten Wert von 6,63 Transkripte/TBP in der Zelllinie NCI-H929 exprimiert. Im Vergleich zum LAT1 konnte LAT2 nicht in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Nur die Zellen RPMI-8226, NCI-H929, Ramos und U937 wiesen eine Transkriptmenge/TBP von 0,07, 0,05, 0,04 und 0,02 auf. Im Vergleich zur Zelllinie mit der niedrigsten LAT1 Expression von 0,13 war der LAT2 um das 2 bis 6,5fache und im Vergleich zur Zelllinie mit der höchsten LAT1 Expression um das 95 bis 332fache geringer exprimiert.

Bei den Gewebeproben korrelierte die LAT2 Expression mit der 4F2hc Expression (siehe Kapitel 4.4). Im Fall der Tumorzellen mit einer stärkeren LAT1 Expression korrelierte diese mit der Expression von 4F2hc ($r^2 = 0,42$, $P = 0,009$). Dabei lag in den Tumorzellen die mRNA von LAT1 und 4F2hc in einem Verhältnis von 6:1 vor.

Von den drei Transportern für organische Kationen konnte nur OCT1 in einigen Zelllinien sehr schwach nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Werte für die beiden Effluxtransporter zeigte sich, dass die Tumorzelllinien den MDR1 stärker exprimieren als den MRP1 Transporter (Daten nicht gezeigt). Der T-Typ Aminosäuretransporter TAT1 konnte in allen Tumorzellen bis auf BV173 nachgewiesen werden.

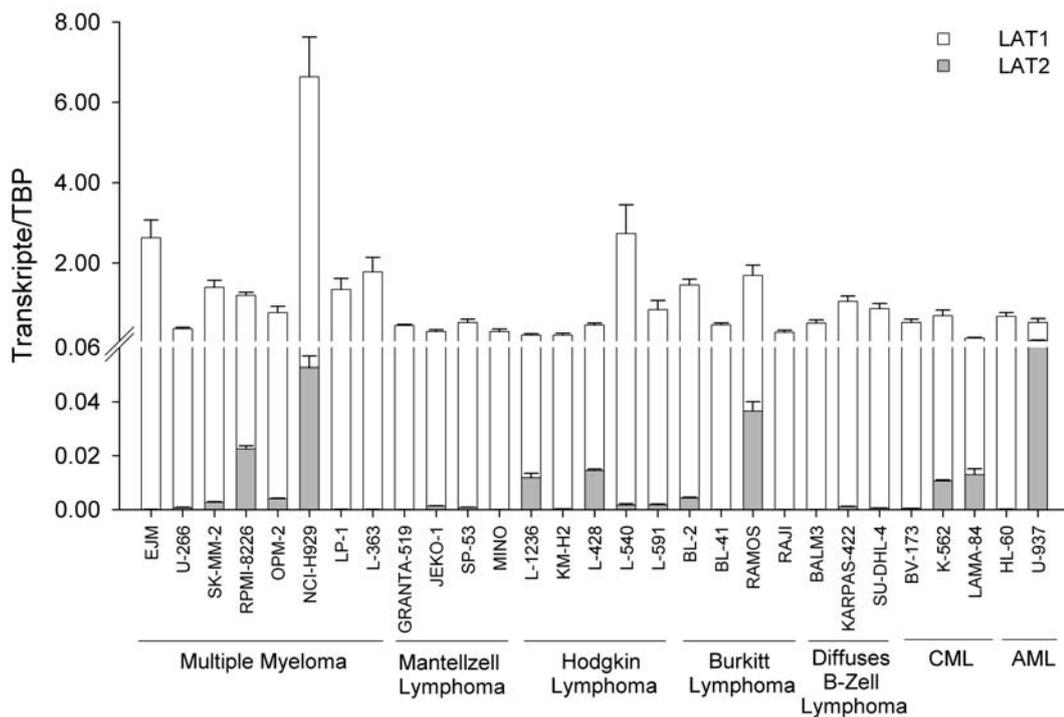


Abbildung 4.30: LAT1- und LAT2-Expression in B-Zell Lymphomen und Leukämie-Zelllinien (n = 29). Die Transkriptmenge wurde auf TBP normalisiert und ist als Mittelwert (n = 4) mit Standardfehler dargestellt.

4.6.5 Korrelation der Genexpression mit der Zytotoxizität und dem Transport des Melphalans in Multiplen Myelom-Zelllinien

Die statistische Auswertung erfolgte auch hier sowohl für alle Tumorzelllinien zusammen als auch nach Tumorerkrankung getrennt mittels einfacher linearer Regression. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression des Multidrug-Resistenz Transporters MDR1 und der Sterblichkeit nach der Melphalan-Behandlung bzw. der Melphalan-Akkumulation in den Multiplen Myeloma Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 4.1). Je stärker der MDR1 als Effluxtransporter in den Multiplen Myeloma

Zelllinien exprimiert war, desto geringer war das Ansprechen auf Melphalan ($r^2 = 0,62$, $P = 0,06$). Dieses Ergebnis konnte auch in einem weiteren Experiment zur Akkumulation des Melphalans in diesen Zellen bestätigt werden. Dabei wiesen die Zellen mit einer hohen MDR1 Expression eine geringere Melphalan Konzentration auf ($r^2 = 0,56$, $P = 0,03$). Auf der Ebene der Caspase-3/7-Enzymaktivität vermittelten Apoptose gab es keine signifikante Abhängigkeit von der MDR1 Expression.

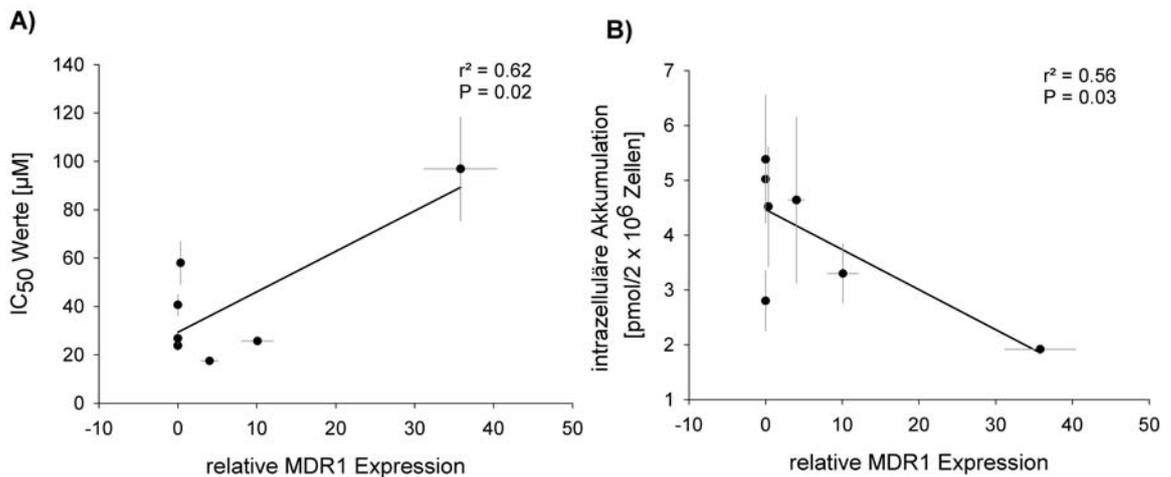


Abbildung 4.31: Korrelation der MDR1 Expression mit dem IC₅₀ Wert (A) und der intrazellulären Melphalan-Akkumulation (B) in 7 Multiplen Myelom-Zelllinien.

Bei der Analyse der LAT1-Expression zeigte sich ein Trend, wobei die Zellen mit einer höheren LAT1-Expression auch eine erhöhte Melphalan-Akkumulation und ein verbessertes Ansprechen gegenüber Melphalan aufwiesen (Abbildung 4.32). Dabei zeigten z.B. die NCI-H929-Zellen, die sehr gut auf Melphalan ansprachen auch eine sehr starke Expression des Aminosäuretransporters LAT1 (Abbildung 4.32 und Tabelle 4.13).

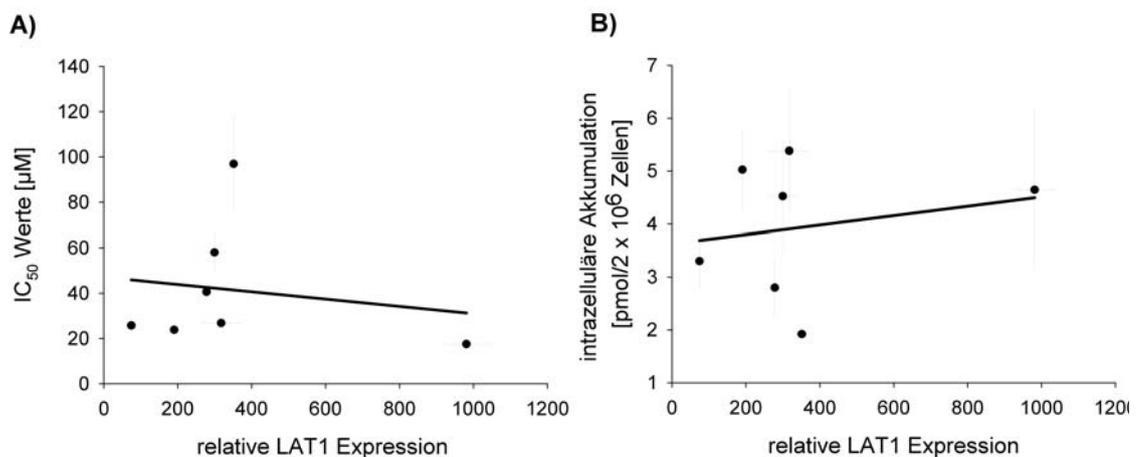


Abbildung 4.32: Korrelation der LAT1 Expression mit dem IC₅₀ Wert (A) und der Melphalan Akkumulation (B) in 7 Multiplen Myelom-Zelllinien.

Die weiteren Transporter LAT2, MRP1 und OCT1 korrelierten nicht mit der Sterblichkeit bzw. der Akkumulation des Melphalans. Jedoch wiesen LP1-Zellen die gegenüber Melphalan resistent waren, eine sehr starke Expression des zweiten Effluxtransporters MRP1 auf. Die Werte für alle Multiplen Myeloma Zelllinien können aus der Tabelle 4.13 entnommen werden. Für alle 29 Zelllinien zusammen konnte kein signifikanter Einfluss der Genexpression von verschiedenen Transportsystemen auf die Zytotoxizität bzw. den Transport von Melphalan nachgewiesen werden.

4.6.6 Zytotoxizität von Melphalan in Multiplen Myelom-Zelllinien bei Inkubation mit Transporter-spezifischen Inhibitoren

Um die Rolle der Influxtransporter LAT1 und OCT1 und der Effluxtransporter MDR1 und MRP1 auf die Zytotoxizität von Melphalan zu validieren, wurden die Transporter in drei ausgewählten Zelllinien mit einer starken Expression von LAT1 (NCI-H929), MDR1 (SK-MM-2) und MRP1 (LP-1) durch chemische Substanzen spezifisch gehemmt (Tabelle 4.15). Dazu wurden die NCI-H929 Zellen gleichzeitig mit 25 µM Melphalan und Leucin (einem typischen LAT1 Substrat) oder mit Disopyramid (einem typischen OCT1 Substrat) inkubiert. Um den Zellvitalitätsverlust zu messen, erfolgten die Hemmung des Effluxtransporters MDR1 mit Ciclosporin in den SK-MM-2-Zellen und die Hemmung des MRP1 Effluxtransporters mit Probenecid in den LP-1 Zellen.

Tabelle 4.13: Zusammenfassung aller ermittelten Werte für Multiple Myelom-Zelllinien.

Zelllinie	IC ₅₀ -Werte	Caspase -3/7-Enzymaktivität	intrazelluläre Akkumulation	LAT1*	LAT2*	4F2hc*	OCT1*	TAT1*	MDR1*	MRP1*
EJM	.	1,5	1,2	598,9	0,0015	10,9	6,6	3,4	0,55	0,57
U266	25,7	58,3	3,3	74,7	0,0035	1,6	9,4	0,5	10,08	0,34
SK-MM-2	96,9	5,6	1,9	351,4	0,04	8,9	8,9	0,001	35,81	0,09
RPMI-	40,6	9,3	2,8	278,1	0,29	4,7	5,7	4,6	0,0041	0,37
OPM-2	23,8	19,0	5,0	190,5	0,05	3,5	8,2	0,5	0,0002	0,14
NCI-H929	17,5	38,3	4,6	981,2	0,44	13,7	4,2	3,3	4,03	0,73
LP-1	58,0	7,3	4,5	299,7	0,0009	9,4	6,3	0,3	0,35	1,36
L363	26,8	39,5	5,4	317,5	0,0008	5,8	5,7	0,01	0,0036	0,88

* Werte der relativen Expression als 2⁻(Probe-TBP) dargestellt. Grau markierte Felder zeigen die Werte der Zelllinien mit einer sehr starken MDR1, MRP1 und LAT1-Expression an. Diese Zellen wurden für weitere Experimente wie unten beschrieben verwendet.

Bei der Zelllinie NCI-H929 konnte die Zellvitalität mit der gleichzeitigen Inkubation von Melphalan (25 μ M) und Leucin (1 mM) von 45% auf 67% erhöht werden, was den Einfluss der LAT1-Transporter auf die Melphalan Toxizität unterstützt. Im Gegenteil dazu, konnte keine Erhöhung der Zellvitalität bei der gleichzeitigen Behandlung mit dem OCT1 Substrat Disopyramid (0,5 mM) beobachtet werden. Die Hemmung des MDR1-Transporters mit Ciclosporin (8 μ M) führte zu eine 29%igen Reduktion der Zellvitalität in den SK-MM-2 Zellen. Auch bei der LP-1 Zelllinie konnte durch Hemmung des MRP1-Transporters mit Probenecid (1 mM) die Zellvitalität durch Melphalan um 22% gesenkt werden. In einem Kontrollansatz konnte gezeigt werden, dass keiner der eingesetzten Hemmstoffe alleine zu einer veränderten Zellvitalität führte.

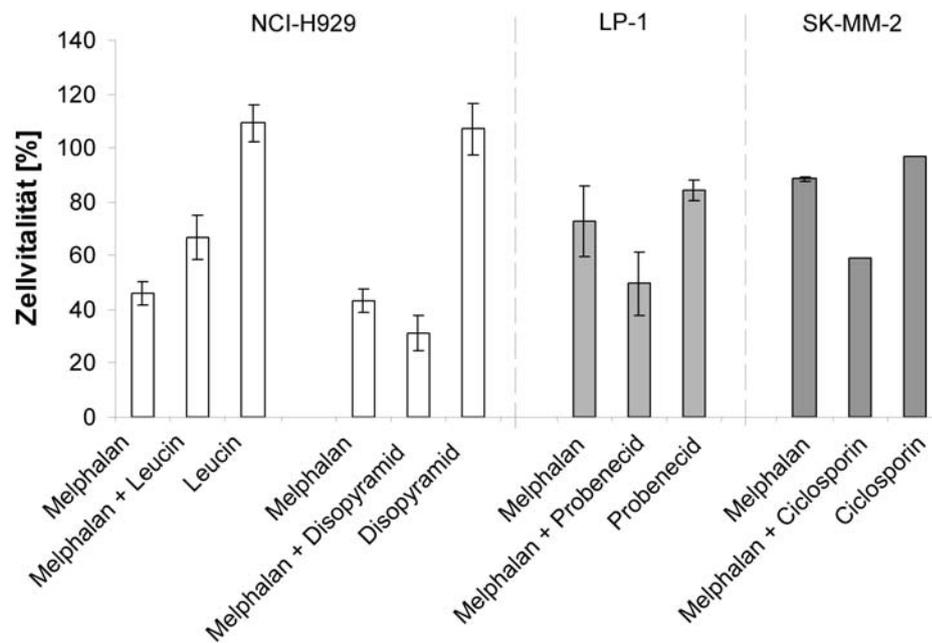


Abbildung 4.33: Darstellung der Zellvitalität von NCI-H929, SK-MM-2 und LP-1 nach der Inkubation mit verschiedenen Hemmstoffen für unterschiedliche Transportsysteme.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit ging es um mögliche genetische Ursachen der von Mensch zu Mensch sehr unterschiedlichen Pharmakokinetik, Wirkungen und Nebenwirkungen von Melphalan. Da Melphalan als Zytostatikum bei Überdosierung lebensbedrohlich toxisch, bei Unterdosierung lebensgefährlich unwirksam ist, war die Frage nach möglichen Markern für die individuelle Wirkung nicht nur wissenschaftlich interessant, sondern auch medizinisch wichtig. Bei der Analyse der Transportvorgänge ging ich zunächst von der Literatur aus, nach der der Transport von Melphalan durch LAT1 und LAT2 vermittelt sein könnte (Yanagida et al., 2001; Uchino et al., 2002), und habe entsprechend intensiv die Pharmakokinetik von Melphalan und die Expression in Relation zu den Varianten in diesen beiden Genen analysiert. Dabei zeigte sich, dass es sich um offenbar hochgradig konservierte Gene mit einer sehr geringen genetischen Variabilität in den kodierenden Bereichen handelt. Es wurden praktisch keine Proteinkodierenden Varianten gefunden, die man dann gern weiter funktionell charakterisiert hätte. Auch fanden sich keine deutlichen Zusammenhänge zwischen medizinischen und funktionellen Daten und den Polymorphismen in den nichtkodierenden Bereichen.

Angesichts der breiten Variabilität in der Pharmakokinetik von Melphalan drängte sich damit die Frage auf, ob nicht vielleicht weitere Transportproteine für die Variabilität der Melphalan-Pharmakokinetik verantwortlich sein könnten. Hier wurde die Zytotoxizität des Melphalans im Zusammenhang mit der Expression unterschiedlicher L-Typ Aminosäuretransporter, des Transporters TAT1, Transporter organischer Kationen aus der Klasse der OCTs und Effluxtransporter wie MDR1 und MRP1 anhand von 29 B-Zell-Lymphom- und Leukämie-Zelllinien untersucht. Andererseits sollten die Daten für LAT1 und LAT2 noch einmal bestätigt werden mit der Frage, welcher der beiden Proteine ein für Melphalan beim Menschen quantitativ wichtiger Transporter ist. Dieser Frage wurde in weiteren transportkinetischen und molekularbiologischen Analysen nachgegangen.

5.1 Pharmakokinetik von Melphalan

Bereits zu Beginn der vorliegenden Arbeiten war aus kleineren Studien sowohl nach oraler als auch nach intravenöser Gabe von Melphalan eine große Streuung der Pharmakokinetik bekannt (Bosanquet and Gilby, 1982; Reece et al., 1988; Kergueris et al., 1994; Moreau et al., 1996; Pinguet et al., 1997; Mougnot et al., 2004). Die systemische Verfügbarkeit des Melphalans nach oraler Dosis ist von verschiedenen Faktoren abhängig. So können andere Medikamente die Absorption des Melphalans beeinflussen. Von klinischer Bedeutung ist

hierbei die Wechselwirkung mit Cimetidin. Patienten, die unter einer Cimetidin-Dauertherapie stehen, zeigen ein verändertes Resorptionsverhalten gegenüber Melphalan. In einer Placebo-Studie wurde gezeigt, dass die Bioverfügbarkeit des Melphalans um 30% und die terminale Halbwertszeit um 20% signifikant durch Cimetidin verringert wird (Sviland et al., 1987). Es ist bekannt, dass die Aufnahme-Transporter OCT2 und OCT3 durch Cimetidin gehemmt werden, was dann auch sehr gut zu unseren Daten zu einer Beteiligung von OCT3 am Melphalan-transport passt (Drewe, 2000). Die gleichzeitige Gabe von Prednisolon nach dem Therapieschema von Alexanian, hat nach einer bereits vorliegenden Studie keinen Einfluss auf die Pharmakokinetik des Melphalans (Bosanquet and Gilby, 1982). Für die interindividuellen Schwankungen in der Pharmakokinetik des Melphalans nach intravenöser Gabe konnten bisher keine Einflussfaktoren identifiziert werden.

Die Ergebnisse aus unserer Studie bestätigten die starken interindividuellen Schwankungen in der Pharmakokinetik. Neben der Studie von (Mougenot et al., 2004) zur Populations-Pharmakokinetik des Melphalans mit 64 Patienten stellt unsere Studie mit 84 Patienten die größte Untersuchung zur Charakterisierung der Pharmakokinetik von Melphalan und von deren inter-individueller Variabilität dar. Der Median der totalen Melphalanclearance lag mit 323 mL/min/m^2 im Bereich von vorangegangenen Studien und der Bereich lag zwischen $115\text{-}715 \text{ mL/min/m}^2$ (siehe Tabelle 4.2). Patienten, die mit einer Hochdosis Melphalan behandelt wurden, wiesen Schwankungen in der Melphalanclearance zwischen 92 und 961 mL/min/m^2 auf (Mougenot et al., 2004) und in Studien mit einer niedrigen Dosierung variierte diese zwischen 73 und 510 mL/min/m^2 (Samuels and Bitran, 1995). Auch das von uns bestimmte Verteilungsvolumen mit einem Median von 15 L/m^2 ($5\text{-}56 \text{ L/m}^2$, siehe Tabelle 4.2) wies Schwankungen auf, die im selben Bereich lagen (zwischen 8 und 50 L/m^2), wie aus früheren Publikationen hervorgeht (Samuels and Bitran, 1995).

Ein erster schon fast als historisch zu bezeichnender Versuch der Individualisierung der Arzneitherapie bei Krebs ist die Anpassung der Dosis an die Körperoberfläche. Seit langem wird in der Krebstherapie die Dosis auf die Körperoberfläche (m^2) bezogen und nicht auf das Körpergewicht (kg). Wir haben anhand der von mir erhobenen Daten und Parameter (AUC) überprüft, ob die Korrelation der AUC mit der Körperoberfläche wirklich besser ist als diejenige mit dem Körpergewicht. Bei der Korrelation der AUC mit der Dosis betrug der Rangkorrelations-Koeffizient $r = 0,82$. Dieser verbesserte sich nur marginal bei der Korrelation der AUC mit der Dosis, adjustiert nach dem Körpergewicht ($r = 0,84$) und nach der Körperoberfläche ($r = 0,86$). Auch entsprechend den Ergebnissen

einer Studie von (Mougenot et al., 2004) erwies sich die Körperoberfläche nicht als signifikante Kovariable. Dosisadjustierungen nach der Körperoberfläche sind somit zumindest für den hier betrachteten Bereich der Körpergewichte erwachsener Patienten bei dem Medikament Melphalan unbegründet.

Eine weitere Frage der individuellen Optimierung der Arzneitherapie ist die Frage der Berücksichtigung des Geschlechtes bei Auswahl und Dosierung. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Pharmakokinetik von Melphalan wurden bereits in einer früheren Studie untersucht, wobei die Frauen eine 14% niedrigere Melphalanclearance aufwiesen als Männer (Mougenot et al., 2004). In der vorliegenden Studiengruppe lagen die Unterschiede im Geschlecht bei 18% mit einem Median der Melphalanclearance bei Frauen um 285 mL/min/m² und bei Männern um 346 mL/min/m². Da aber keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bei den Nebenwirkungen auftraten, bringt eine Dosisanpassung bezogen auf das Geschlecht für die betroffenen Patienten keine Verbesserung der Therapie.

Ein weiterer wichtiger Punkt in der Individualisierung der Arzneitherapie ist die Berücksichtigung des Alters bei der Arzneimitteldosierung. Wie auch schon in anderen Studien untersucht, korrelierte die totale Clearance oder das Verteilungsvolumen von Melphalan kaum mit dem Alter (Pinguet et al., 1997; Pinguet et al., 2000), eine Feststellung, die allerdings nur für den Bereich der Altersgruppen gültig ist, die gut untersucht wurden. Insbesondere zu sehr alten Patienten oder zu Kindern gibt es nur wenige Daten.

In Übereinstimmung mit verschiedenen Studien zeigten auch unsere Daten, dass die Kreatininclearance eine signifikante Kovariable für die Vorhersage der Melphalanclearance ist (Ardiet et al., 1986; Reece et al., 1988; Osterborg et al., 1989; Kergueris et al., 1994; Samuels and Bitran, 1995). Entsprechend dem Quadrat des Korrelationskoeffizienten (r^2 , auch als Bestimmtheitsmaß bezeichnet) von 0.14 konnten etwa 14% der Variabilität in der Melphalanclearance durch die Nierenfunktion erklärt werden. Somit wäre vorstellbar, dass einige Patienten, die aufgrund einer gestörten Nierenfunktion das Melphalan nur sehr langsam bzw. schnell ausscheiden, in Zukunft eine höhere bzw. niedrigere Melphalan Dosis erhalten sollten, um einen optimalen zytotoxischen Effekt auf die Tumorzellen bei möglichst geringer Schädigung der Normalgewebszellen zu erzielen.

5.2 Populations-Pharmakokinetik von Melphalan

Die Analyse der Populations-Pharmakokinetik diente dazu, den Einfluss von erhobenen probanden- und studienspezifischen Charakteristika (Kovariablen) auf die Pharmakokinetik des Melphalans zu untersuchen. Ein weiteres Ziel bestand darin, die Gesamtvariabilität der gemessenen Arzneistoffkonzentration mathematisch-statistisch korrekt in eine interindividuelle Komponente und eine intraindividuelle Komponente (Restvariabilität) zu differenzieren (Sheiner and Beal, 1980). Aus den Daten einer populationspharmakokinetischen Analyse lassen sich die relevanten populationspharmakokinetischen Parameter ableiten, die im Rahmen eines therapeutischen Drug Monitoring zur individuellen Dosiskorrektur eingesetzt werden, um schon basierend auf nur einer Blutkonzentration eine individuell möglichst gut adaptierte Dosis zu berechnen. Auch ohne Blutkonzentrationsmessungen können diese Pharmakokinetik-Parameter verwendet werden, um individuell besser adjustierte Dosierungen zu finden. Die Dosisanpassung ist vor allem wichtig, wenn wie bei dem Melphalan eine große interindividuelle Variabilität in der Pharmakokinetik vorliegt und das Medikament zugleich eine geringe therapeutische Breite hat. Der Verlauf der Plasmakonzentrationen von Melphalan konnte mit Hilfe des Programms NONMEM am besten mit einem 2-Kompartiment-Modell beschrieben werden. Basierend auf den Parametern der populationspharmakokinetischen Analyse, war es möglich, Nomogramme für die Dosisanpassung von Melphalan zu erstellen, die das Körpergewicht und die Nierenfunktion (Kreatininclearance) berücksichtigen. Die Abbildung 5.1 gibt keine spezifische Dosierung vor, sondern nur einen Faktor, um den die Dosis reduziert bzw. erhöht werden muss, im Vergleich zu einem Patienten mit einem optimalen Körpergewicht von 70 kg und keiner Nierenfunktionsstörung (Kreatininclearance 120 mL/min), damit alle Patienten eine gleiche AUC aufweisen können. Um eine angemessene Dosisadjustierung zu erreichen, müsste z.B. für einen Patienten mit einer Kreatininclearance von 20 mL/min die typische Dosis mit 0,5 multipliziert werden.

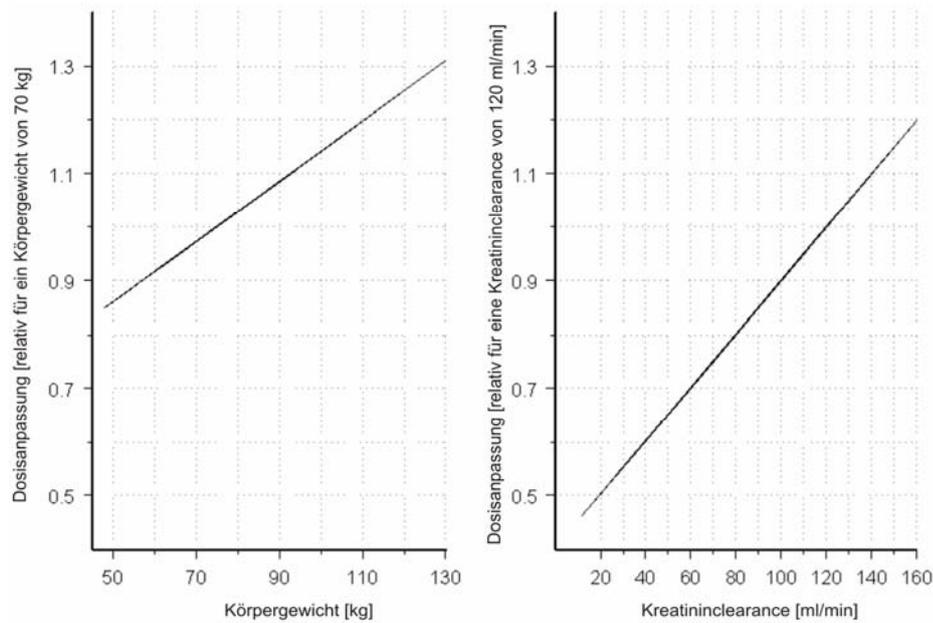


Abbildung 5.1: Nomogramme zur Dosisanpassung unter Berücksichtigung von Körpergewicht und Kreatinin-clearance.

5.3 Korrelation der Nebenwirkungen mit der Pharmakokinetik von Melphalan

Ein weiteres Ziel dieser Studie bestand darin, die Melphalan assoziierten Nebenwirkungen wie Mukositis, Diarrhöe und Myelosuppression durch die sehr variable Pharmakokinetik erklären zu können. Das Auftreten der Nebenwirkungen hing sehr eng mit der verabreichten Dosis von Melphalan zusammen. Ab einer Dosis von 20 mg/m² nahm die Anzahl der beobachteten Nebenwirkungen signifikant zu. Pinguet et al., 2000 beobachteten in diesem Zusammenhang bei 18 Patienten keine Mukositis bei einer verabreichten Dosis zwischen 20 mg/m² und 40 mg/m² und nur ein Patient litt unter Diarrhöe mit einem Schweregrad von eins. Im Vergleich zu dieser Studie traten in unserer Studie bei Patienten, die mit 20 mg/m² Melphalan behandelt wurden, die Nebenwirkungen Mukositis und Diarrhöe und einige Fälle mit schwerer Leukopenie auf. Ab einer Dosis von 140 mg/m² litten 60% der Patienten unter den Nebenwirkungen. Dieses wurde in einer weiteren Studie gezeigt, wo 60% der Patienten Grad 4 Mukositis entwickelten bei einer Melphalan Dosis von 220 mg/m² (Moreau et al., 1999). Laut unseren Daten und wie bereits in der Literatur zusammengefasst wurde, erreicht Grad 4 Mukositis ein Plateau, was auf mögliche vererbte Faktoren schließen lässt, die das Risiko Nebenwirkungen zu entwickeln, beeinflussen können. Die Anreicherung des Melphalans im Körper, aufgrund einer niedrigen Melphalan-clearance, führt zu einer erhöhten Toxizität des Melphalans. Die Nebenwirkungen Mukositis und Diarrhöe sollten somit bei Patienten mit einer langsamen

Melphalan-Ausscheidung deutlich stärker ausgeprägt sein, als bei Patienten mit einer schnellen Ausscheidung. Jedoch konnte in unserer Studie das Auftreten der Nebenwirkungen, abgesehen von der Dosis, durch keinen pharmakokinetischen Parameter, wie Clearance oder Verteilungsvolumen erklärt werden. Dies bestätigt die Daten von Mougnot et al., 2004, die ebenfalls in ihrer Studiengruppe mit 64 Patienten keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der AUC und den hämatotoxischen Nebenwirkungen innerhalb einer Dosisgruppe von 20-30 mg/m² feststellen konnten. Offenbar ist die außerhalb der Zellen gemessene Konzentration nicht sehr repräsentativ für die innerhalb der Zellen vorliegende Konzentration. Immerhin konnte ich bei Myelom-Zelllinien zeigen, dass hier eine recht gute Korrelation zwischen intrazellulären Konzentrationen von Melphalan und Zytotoxizität vorlag (siehe Abschnitt 4.6.3).

5.4 Bedeutung angeborener Unterschiede für die Krebstherapie mit Melphalan

5.4.1 Erworbene und erbliche Variabilität bei Melphalan

Neben den Enzymen, die für den Metabolismus von Arzneistoffen verantwortlich sind, beschäftigt sich die Pharmakogenetik auch mit Membrantransportern, die einen Einfluss auf die Pharmakokinetik eines Arzneistoffes haben können (Kerb et al., 2001; Kim, 2002; Roden and George, 2002; Evans and McLeod, 2003; Gerloff, 2004; Fischer et al., 2005). Für ausgewählte aber typische Medikamente konnten zwischen 20 und 95% der Variabilität im Ansprechen auf erbliche Unterschiede zurückgeführt werden (Kalow et al., 1998). Wie im Abschnitt 5.1 besprochen, gibt es auch eine Reihe nicht-genetischer Faktoren, wie das Alter, die Organfunktion und Komedikation, die die interindividuelle Pharmakokinetik und damit auch das unterschiedliche Ansprechen beeinflussen.

Für das Zytostatikum Melphalan wurde in der untersuchten Studiengruppe eine sehr variable Pharmakokinetik beobachtet, jedoch konnte nur ein geringer Anteil der Variabilität durch nicht-genetische Faktoren wie z.B. die Nierenfunktion erklärt werden. Unsere Studie stellt die erste Untersuchung zu genetischen Varianten in Membrantransportern und Metabolisierungsenzymen dar, die im Zusammenhang mit der variablen Pharmakokinetik und den Nebenwirkungen des Melphalans analysiert worden sind. Im Mittelpunkt unserer Arbeit standen die beiden Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2.

5.4.2 LAT1 und LAT2: Erbliche Variation

Aufgrund des unterschiedlichen Expressionsprofils von LAT1 und LAT2 in verschiedenen Geweben bestand unsere Arbeitshypothese darin, dass LAT1 den Transport von Melphalan in die Tumorzelle vermittelt und LAT2 auf der basolateralen Seite von proximalen Nierentubulus-Zellen für die (Re-)Absorption des Melphalans und somit für die renale Eliminierung verantwortlich ist.

Da zu Beginn der Studie nur wenig über die genetische Variabilität der beiden Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2 bekannt war, wurden die beiden Gene von 64 Patienten resequenziert. Die Sequenzierung aller Exons, Intron-Exon Grenzen und des Promotorbereiches diente der Identifizierung von funktionell bedeutsamen Polymorphismen. Eine veränderte Substratselektivität kann z.B. durch SNPs hervorgerufen werden, die zu einer Aminosäuresubstitution führen. Weiterhin können Polymorphismen im Promotorbereich die Transkription beeinflussen und Varianten im Intronbereich eines Gens können durch Bildung oder Entfernung von Spliceseiten von Bedeutung sein.

Unsere Analyse offenbarte eine große Anzahl von Polymorphismen, die bisher noch nicht von der NCBI Datenbank vollständig erfasst worden waren. Im Gesamten wurden 65 Polymorphismen identifiziert, wobei nur eine Variante mit einer MAF von 0,008 im LAT2-Gen zu einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin an der Aminosäureposition 94 führte. Zur besseren Darstellung der genetischen Variabilität wurden die beiden Parameter θ und π für die unterschiedlichen Bereiche der beiden Gene bestimmt (Cargill et al., 1999; Nickerson et al., 2000; Glatt et al., 2001; Leabman et al., 2003; Breidenthal et al., 2004; Glatt et al., 2004). Sowohl für LAT1 als auch LAT2 war die Anzahl und die Frequenz der identifizierten Polymorphismen im kodierenden Bereich sehr gering ($\theta = 0,2 \times 10^{-4}$ und $0,9 \times 10^{-4}$) im Vergleich zu anderen Transportern ($\theta = 8,9 \times 10^{-4}$) (Leabman et al., 2003) und menschlichen Genen ($\theta = 5,4 \times 10^{-4}$) (Cargill et al., 1999). Dieser geringe Grad an Varianten im kodierenden Bereich lässt auf eine essentiell wichtige Funktion der beiden LAT1 und LAT2 Gene schließen. In den nichtkodierenden Bereichen konnte jedoch eine Vielzahl von Varianten bestimmt werden. Die beiden Parameter θ und π wurden bereits in einigen Studien zur Charakterisierung der genetischen Variabilität von verschiedenen Membrantransportern oder anderen menschlichen Genen herangezogen (Cargill et al., 1999; Nickerson et al., 2000; Glatt et al., 2001; Leabman et al., 2003; Breidenthal et al., 2004; Glatt et al., 2004). Die berechneten Werte für θ im nichtkodierenden Bereich lagen für LAT2 niedriger mit $\theta = 4,7 \times 10^{-4}$ und im Fall von

LAT1 $\theta = 10,0 \times 10^{-4}$ ähnlich, im Vergleich zu anderen Membrantransportern, die als hoch konservierte Gene bezeichnet werden (Leabman et al., 2003).

5.4.3 LAT1 und LAT2: Genotyp-Phänotyp-Analyse

Es war uns nicht möglich einen oder mehrere SNPs in den LAT-Genen oder im 4F2hc-Gen zu identifizieren, die mit der variable Pharmakokinetik oder den Nebenwirkungen des Melphalans korrelierten. Die unterschiedlichen Dosen konnten jedoch durch Angabe der Blutkonzentrationen pro Dosiseneinheit normiert werden, so dass schließlich doch die gemeinsame Auswertung aller Daten möglich war.

Ein Kopplungsungleichgewicht besteht zwischen zwei Sequenzvarianten, wenn diese überdurchschnittlich häufig auf demselben Chromosom auftreten. Die genomweite Analyse von genetischen Polymorphismen hat gezeigt, dass auf den Chromosomen Blöcke, in denen ein Kopplungsungleichgewicht besteht (so genannte Haplotypblöcke), im Wechsel auftreten mit Blöcken, in denen kein oder nur ein geringes Kopplungsungleichgewicht besteht. Für die beiden Gene LAT1 und LAT2 konnten jeweils 2 Blöcke im 5'- und 3'-Bereich mit einem starken *linkage disequilibrium* definiert werden. Diese Haplotypblöcke erlauben die Zuordnung von SNPs zu Haplotypen, die im Falle meiner Analysen auch zur Analyse der Assoziation mit der Melphalanclearance und den Nebenwirkungen herangezogen wurden. Ein Vorteil der Korrelation mit Haplotypen gegenüber der Korrelationsanalyse mit einzelnen Polymorphismen liegt oft darin, dass es etwas weniger Haplotypen als SNPs gibt, so dass die statistische Power für Genotyp-Phänotyp-Korrelationsanalysen höher ist. Jedoch korrelierte bei LAT1 und LAT2 keiner der Haplotypen ab einer Frequenz von über 5% mit der Pharmakokinetik oder den Nebenwirkungen des Melphalans.

5.4.4 Rolle der Polymorphismen in den Glutathion-S-Transferasen für die Nebenwirkungen des Melphalans

Die Wege der Biotransformation von Xenobiotika zu unwirksamen oder auch zu wirksamen Metaboliten werden in die Phasen-I- und -II-Reaktionen unterteilt.

Biologisch dient dies dem Schutz vor toxischen Substanzen und der Umwandlung in wasserlösliche Moleküle und damit zur besseren Eliminierung über die Niere oder Galle. Die Identifizierung von Polymorphismen in diesen Enzymen der Phase-I- und -II-, die statistisch signifikant mit Nebenwirkungen verknüpft sind, sollte zu einer effizienteren und weniger toxischen Behandlung führen, wobei sich dann gegebenenfalls die Dosisadjustierung nach den Genotypen richten würde.

Melphalan wird hauptsächlich über Enzyme der Phase-II-Reaktion metabolisiert (Suzukake et al., 1983; Bolton et al., 1991; Mannervik et al., 1992; Hall et al., 1994; Awasthi et al., 1996; Rothbarth et al., 2002). Die Detoxifizierung des Melphalans zu einem GSH-Konjugat wird durch die Glutathion-S-Transferasen der Klassen A, P und möglicherweise auch M katalysiert (Bolton et al., 1991; Mannervik et al., 1992; Hall et al., 1994; Awasthi et al., 1996). Bisher gibt es keinen Hinweis, dass die GSTT1 direkt an der Biotransformation des Melphalans beteiligt ist, wohl aber an der Detoxifikation von Folgeprodukten reaktiver Sauerstoffverbindungen, die in großer Menge bei Behandlung mit zytotoxischen alkylierenden Zytostatika entstehen. Sowohl GSTT1 als auch GSTM1 weisen klinisch sehr relevante Deletionspolymorphismen auf, die zum kompletten Verlust der Enzymaktivität führen (Seidegard et al., 1988; Brockmoller et al., 1994; Pemble et al., 1994; Brockmoller et al., 1996). Der erwartete Zusammenhang einer höheren Häufigkeit und Schwere der Mukositis und/oder der Diarrhöe bei Trägern der Deletionsvariante konnte in der vorliegenden Studie mit 84 Patienten nicht konsequent nachgewiesen werden. Der GSTT1 Polymorphismus war nur für die heterozygoten Träger signifikant assoziiert mit Diarrhöe, was allerdings auch nicht gegen den Zusammenhang spricht, da aufgrund der geringen Anzahl von homozygoten Trägern eine statistische Auswertung nicht möglich war. Die beiden Aminosäuresubstitutionen in GSTP1 zeigten für die Diarrhöe nur einen Trend bei Trägern der Valin₁₀₄ Variante. Weiterhin wird Melphalan über die GSTA1 metabolisiert, jedoch gibt es in diesem Gen keinen klinisch relevanten Polymorphismus, der einen Einfluss auf Enzymaktivität und damit auf die Detoxifizierung des Melphalans hat (Bredschneider et al., 2002).

Über meine Analysen hinaus ist festzuhalten, dass GSTT, GSTM und GSTP polymorphe Gene sind, die eine wichtige Rolle sowohl bei der Mutagenese und Karzinogenese spielen und das zelluläre Ansprechen von Chemotherapeutika beeinflussen können. Dabei zeigten homozygot defiziente GSTM1*0/*0 und GSTT1*0/0-Genotypen tatsächlich wie erwartet ein reduziertes Risiko eines Rückfalls nach Chemotherapie bei Tumorerkrankungen wie der akuten lymphoblastischen Leukämie, dem Brustkrebs, dem Ovarienkrebs sowie Lungenkrebs (Howells et al., 1998; Stanulla et al., 2000; Sweeney et al., 2000; Sweeney et al., 2003a; Sweeney et al., 2003b). Die Rolle des GSTP1-I105V-Polymorphismus zur Voraussage des klinischen Ansprechens konnte sowohl bei Brustkrebspatientinnen als auch Patienten mit Multiplen Myelom nach einer Standard-Chemotherapie gezeigt werden (Dasgupta et al., 2003; Yang et al., 2005). Die Genotypisierung der GST-Polymorphismen erwies sich auch als sehr nützlich zur Voraussage von Arzneistoff assoziierten Toxizitäten.

Anhand dieser Studie konnten wir keinen signifikanten Nachweis erbringen, dass Polymorphismen in den Genen der GST einen Einfluss auf die Melphalan-induzierten Nebenwirkungen, wie Mukositis und Diarrhöe haben. Diese fehlende Korrelation zeigt die Bedeutung von bestätigenden Analysen, denn nur Ergebnisse, die sich regelmäßig reproduzieren lassen, könnten später in der medizinischen Praxis Anwendung finden. Im Rahmen oft exploratorischer klinischer Korrelationsanalysen gefundene Daten bedürfen unbedingt der Bestätigung in unabhängigen weiteren Studien. Auch die Studie von Dasgupta et al. (Dasgupta et al., 2003; Yang et al., 2005) zum Multiplen Myelom ergab nur in Untergruppen grenzwertig signifikante Werte und wurde nach meiner Recherche bislang an anderer Stelle nicht reproduziert. Zumindest für die Therapie mit dem Zytostatikum Melphalan muss man schlussfolgern, dass eine Typisierung der von uns analysierten GST-Polymorphismen für die klinische Anwendung noch nicht ausreichend belegt ist.

5.4.5 Assoziation genetischer Polymorphismen mit der LAT1- und LAT2-Expression

In einem Kollektiv aus 35 gesunden Probanden wurde der genetische Einfluss auf die interindividuelle variable mRNA-Expression der beiden Gene untersucht. Die Varianzanalyse anhand der Subgruppe, von der zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten mRNA quantifiziert wurde, zeigte, dass die Gesamtvariabilität mit 51% für LAT1 und 81% für LAT2 durch angeborene genetische Unterschiede oder aber auch individuell konstante Umweltfaktoren bei den Probanden erklärt werden könnte. Die restliche Variabilität war intraindividuell und also offenkundig nicht erblich.

In der Literatur wurde für viele Promotorvarianten gezeigt, dass sie erheblich die Transkription beeinflussen und dadurch funktionelle und klinische Bedeutung haben können (Schulz et al., 2002; Cayla et al., 2004; Xu et al., 2004; Mottagui-Tabar et al., 2005). Der LAT1-Promotor ist ein GC-reicher Bereich mit fehlender TATA oder CATT Box, aber vorhandenen Bindungsstellen (GGGGCGG) für den Transkriptionsfaktor SP1 (Nii et al., 2001). Weiterhin gibt es eine AP-2-Bindungsstelle zwischen den Nukleotiden -282 und -270, drei Hitzeschockprotein-Bindungssequenzen sowie vier GATA-Bindeproteinsequenzen. Von insgesamt 18 identifizierten Polymorphismen befanden sich zwei SNPs (-312 G>T und -311 A>T) im Bereich der AP-2-Erkennungssequenz und weitere zwei SNPs (-1106 T>C und -1103 T>C) im Bereich einer GATA-1,2-Bindungsproteinsequenz. Untersuchungen von Nii et al., 2001 zeigten, dass eine Deletion zwischen dem Nukleotid -281 und -100, die alle drei GC Boxen einschließt, zu einer

10fachen Abnahme der Promotoraktivität führt. Dieses weist auf wichtige regulierende Elemente in diesem Bereich hin, jedoch war kein einziger SNPs aus unserer Analyse in dieser Region lokalisiert. Zur Regulation der LAT2-Genexpression liegen zum jetzigen Zeitpunkt keine Kenntnisse vor. Die Promotorvarianten aus unserer Studie zeigten jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die LAT1- und LAT2-mRNA Expression in Lymphozyten. In weiteren Experimenten zur Charakterisierung der Promotorvarianten könnte anhand von Reporter-Gen-Analysen der Einfluss dieser Varianten auf die Promotoraktivität untersucht werden. Nachdem sich hier in den Leukozyten keine Unterschiede zeigten, ist nicht ausgeschlossen, dass in anderen Zelltypen wie den Nierentubulus-Zellen mit andere Ausstattung von Transkriptionsfaktoren doch Promotor-Varianten existieren, die einen Einfluss auf die Expression haben. Allerdings sind medizinisch derartige Untersuchungen an großen Zahlen von Menschen kaum möglich und nachdem weder aus Pharmakokinetik-Daten noch aus den Expressionsdaten sich deutliche Hinweise ergaben, kann man keine zu hohen Hoffnungen haben, dass funktionell relevante natürliche Genpolymorphismen in den Promotorregionen gefunden werden.

5.5 Charakterisierung des Membrantransportes von Melphalan

Der Transport von Melphalan wurde erstmal 1977 in Lymphoblasten als ein aktiver, konzentrations- und temperaturabhängiger Prozess beschrieben (Goldenberg et al., 1977). Wenige Jahre danach untersuchten Vistica et al. den Transportmechanismus und die Zytotoxizität von Melphalan in Leukämie-Zelllinien (L1210, Maus) in Abhängigkeit von der Konzentration anderer Aminosäuren im Zellkulturmedium (Vistica, 1979; Vistica and Rabinovitz, 1979). Bereits damals wurde der Transport und die Zytotoxizität von Melphalan stärker durch die Aminosäure Leucin inhibiert und weniger durch BCH, einem Inhibitor für L-Typ Aminosäuretransporter. In den weiteren Jahren wurden diese Untersuchungen ergänzt, indem der Transport von Melphalan in Lymphozyten mit dem Transport in Brustkrebszellen verglichen wurde (Begleiter et al., 1980). Dabei wurde Melphalan stärker von der Tumorzelllinie MCF-7 aufgenommen als von den normalen peripheren Lymphozyten. Zusätzlich wurde der Transport von Melphalan durch AIB, einem Inhibitor für das Transportsystem A, BCH und Glutamin, einem Substrat für das System ASC, gehemmt. Aus Ihren Beobachtungen schlossen sie, dass Melphalan sowohl über das L-Typ Aminosäuretransportsystem als auch über das System ASC transportiert wird. Ähnliche Ergebnisse wurden in einer Reihe von Studien zum Transport von Melphalan in verschiedenen Tumorzelllinien wie Leukämie-Zellen, Brustkrebszellen,

Lymphoblasten und Plasmazytom (LPC-1) Zellen beobachtet (Vistica, 1983). Da das Melphalan eine 300-400fach höhere Affinität zum L-Typ Aminosäuretransportsystem besitzt als zum Transportsystem ASC, lagen im Mittelpunkt unserer Untersuchungen die Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2. Um den Transport von Melphalan in die Zelle weiter zu charakterisieren und um den relevanten Transporter für Melphalan zu identifizieren, der für die variable Pharmakokinetik und Nebenwirkungen verantwortlich ist, wurden verschiedene experimentelle Ansätze verfolgt.

5.5.1 Inhibitionsexperimente

Zunächst wurde die Transportkinetik über die IC_{50} - und K_i -Werte anhand der beiden Zelllinien HEK293 und CaCo-2 bestimmt, um den Einfluss von Melphalan und BCH auf den Transport von Phenylalanin und Leucin zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass BCH in beiden Zelllinien den Transport von Phenylalanin stärker hemmt als Melphalan. Wie aus Expressionsstudien mit *Xenopus laevis* Oozyten hervorgeht wird die Aminosäure Phenylalanin mit einer höheren Affinität über LAT2 transportiert als über LAT1. Leucin hingegen wird bevorzugt über LAT1 transportiert (Rossier et al., 1999). Diese Ergebnisse stehen zumindest nicht im Widerspruch zu der Hypothese, das Melphalan tatsächlich durch LAT2 transportiert werden kann, was auch im Einklang mit den Transportmessungen an den Oozyten steht. Die Hemmung der radioaktiven Aufnahme von Melphalan durch verschiedene Aminosäuren wie Leucin und Phenylalanin zeigte, dass Leucin die Aufnahme von Melphalan stärker hemmt als Phenylalanin. BCH, das als spezifischer Inhibitor für das L-System bekannt ist, zeigte keinen Einfluss auf den Transport von Melphalan. Neben dem Leucin waren alle aromatischen Aminosäuren in der Lage, den Melphalan-Transport signifikant zu hemmen.

Basierend auf alten klinischen Daten, nach denen Cimetidin als Hemmstoff von OCTs einen Einfluss auf Melphalan hatte und basierend auf parallel durchgeführten Experimenten im Rahmen der Dissertationsarbeit von Herrn Shnitsar aus der Arbeitsgruppe Burckhardt (Abteilung vegetative Physiologie und Pathophysiologie, Georg-August-Universität Göttingen) haben wir in unsere Analysen auch die OCTs einbezogen.

Die Transportproteine OCT1, -2, und -3 (*organic cation transporter*, OCT) aus der *SLC22*-Transporterfamilie sind an der Absorption, Verteilung und Eliminierung von endogenen Monoaminen und vielen weiteren kationischen endogenen Verbindungen und Xenobiotika beteiligt. OCT1 (*SLC22A1*) und OCT2 (*SLC22A2*) werden vorwiegend an basolateralen Membranen von Hepatozyten, Enterozyten und den proximalen Tubuluszellen der Nieren

exprimiert. Im Gegensatz dazu hat OCT3 (*SLC22A3*) ein breiteres Expressionsprofil und Substratspektrum. Der Transport des Melphalans über diese Transporter wurde in Inhibitionsexperimenten durch den Einsatz von Inhibitoren untersucht, von denen bekannt war, dass sie einzelne OCTs relativ spezifisch hemmen können; in der Regel handelte es sich dabei um kompetitive Inhibitoren. Dazu gehörte das TEA⁺ (OCT1), Metformin (OCT2), Chinin und Chinidin (OCT3). Jedoch zeigten nur Chinin und Chinidin einen Einfluss auf den Melphalan-Transport. Unter dem Gesichtspunkt, dass Cimetidin, ein typisches OCT3 Substrat, die orale Verfügbarkeit von Melphalan bei gleichzeitiger Gabe verschlechtert, bietet die Hemmung der Melphalan-Aufnahme durch Chinin und Chinidin einen interessanten Hinweis bei der Suche nach dem relevanten Transporter für Melphalan. Die nicht nachweisbare Hemmung der Melphalan-Aufnahme durch typische OCT1- und OCT2-Substanzen lässt sich darauf zurückführen, dass diese Inhibitionsversuche nur anhand von Nierenzellen (HEK293) durchgeführt worden sind. Ein Expressionsprofil dieser Zelllinie könnte möglicherweise Aufschluss geben, ob die beiden Transporter OCT1 und OCT2 überhaupt von den Nierenzellen exprimiert werden. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass nicht alle drei OCTs an dem Transport von Melphalan beteiligt sind. In noch nicht veröffentlichten Ergebnissen von Herrn Shnitsar aus der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Burckhardt zeigten OCT3- überexprimierende Oozyten einen gesteigerten Transport des Melphalans gegenüber der Kontrolle. In weiterführenden Experimenten müsste auch der Transport des Melphalans in OCT1 und OCT2 überexprimierenden Oozyten untersucht werden. Die Erklärung, warum auch Transporter für organische Kationen an dem Transport von Melphalan beteiligt sein könnten, liegt in der Bildung eines Carboniumion während des Aktivierungsschrittes und dem anschließenden nukleophilen Angriffs auf Makromoleküle (siehe Abbildung 1.3).

In einer Arbeit wurden auch eine Reihe von anderen Zytostatika und Arzneistoffen im Zusammenhang mit der Melphalan-Akkumulation in Leukämie-Zellen untersucht (Martin et al., 1982). Carmustin (BCNU), ein Zytostatikum, das in der Kombinationstherapie nach dem BEAM Schema (BCNU, Etoposid und Cytarabin und Melphalan) Anwendung findet, stimulierte die Melphalan Akkumulation in den Zellen, ohne dass geklärt werden konnte, ob dies auf Änderungen des Influx oder des Efflux zurückzuführen war. Weiterhin zeigten Cyclophosphamid, Busulphan, Chlorambucil und Methotrexat keinen Einfluss auf die zelluläre Melphalankonzentration, wohingegen CCNU (Lomustin) und Vincristin die zelluläre Melphalan-Akkumulation reduzierten.

5.5.2 siRNA-Technik

Um die Bedeutung von LAT1 und LAT2 beim Transport von Melphalan zu differenzieren, wurde die Methode der RNA Interferenz (RNAi) angewendet. Bei der Herunterregulierung von Genen mittels siRNA-Technik müssen verschiedene Faktoren wie die sorgfältige Auswahl der siRNA-Sequenz, Transfektionsmethoden, Konzentrationen und Inkubationszeiten sowie geeignete Zelllinien berücksichtigt werden. Vor den Untersuchungen war nicht bekannt, welche natürliche Halbwertszeit diese LAT1- und LAT2-Membrantransporter haben, nachdem sie in die Zellmembran lokalisiert worden sind. Aus der Literatur ergaben sich für verschiedene Transporter, unter anderem auch LAT1, Inkubationszeiten nach der Transfektion mit der siRNA zwischen 48 und 72 Stunden, um Transportfunktionen zu untersuchen (Kim et al., 2006). Jedoch erwiesen sich diese kurzen Inkubationszeiten von 48 oder 72 Stunden in unserem Fall als nicht geeignet, da wir bei diesen Zeiten noch keine Abnahme der Transportaktivität feststellen konnten. Der Versuchsablauf musste durch zusätzliche Transfektionsschritte und längere Inkubationszeiten zwischen 6 und 9 Tagen optimiert werden. Eine alternative Möglichkeit einer stabilen Transfektion mit Vektor basierender siRNA hätte hier zusätzlich angewendet werden können, was aber aus Zeitgründen nicht möglich war (Li and Whorton, 2005). Die Effektivität der siRNA vermittelten Herunterregulierung der LAT1- und LAT2-Gene wurde auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR und auf Proteinebene mittels Western-Blot Analysen überprüft. Für LAT1 und LAT2 war die mRNA innerhalb von 24 Stunden nach der Transfektion mit siRNA auf unter 10% und 20% reduziert. Jedoch konnte zu diesem Zeitpunkt (1 bis 3 Tage nach Transfektion) weder auf Proteinebene noch bei den funktionellen Untersuchungen eine Veränderung beobachtet werden. Erst nach 9 Tagen konnte für LAT1 eine deutliche Hemmung des Transports von Leucin, Phenylalanin und Melphalan gezeigt werden. Dass die Aufnahme des Phenylalanins nicht so stark gehemmt wurde wie bei Leucin, liegt möglicherweise daran, dass die Affinität zum LAT1 für Leucin stärker ist als für Phenylalanin. Der Transport von Melphalan wurde in den Zellen mit einer herunterregulierten LAT1-Expression um 60% signifikant gesenkt. Daraus lässt sich schließen, dass Melphalan über den Transporter LAT1 in die Zelle aufgenommen wird aber nicht zu welchem prozentualen Anteil der LAT1-Transporter an dem Melphalan-Transport beteiligt ist. Mit der siRNA konnte nicht die komplette Transportfunktion des Aminosäuretransporters LAT1 aufgehoben werden. Es blieb ein gewisser Prozentsatz von 30% bei Leucin, 60% bei Phenylalanin und 40% bei Melphalan übrig. Dieser Anteil lässt

sich auch durch die Expression anderer Transportsysteme erklären, die sowohl die beiden Aminosäuren als auch Melphalan transportieren.

In einem weiteren Funktionstest zur Bestimmung der Zellvitalität konnte die Effektivität der siRNA gegen LAT1 bestätigt werden, wobei die Zytotoxizität des Melphalans in den Zellen mit einer geringeren LAT1-Expression herabgesetzt worden ist. Dieses entspricht auch den Ergebnissen von Vistica et al., 1979 wobei die Zytotoxizität des Melphalans durch die gleichzeitige Gabe der Aminosäure Leucin reduziert werden konnte. Im Vergleich zu unseren Ergebnissen war es ihnen jedoch nicht möglich, LAT1 als den relevanten Transporter von Melphalan zu identifizieren.

Der Versuch einer erfolgreichen Herunterregulierung zum Studium der Transporterfunktion hängt nicht nur von der Auswahl der oben genannten Bedingungen ab, sondern auch von der verwendeten Zelllinie. HeLa-Zellen waren geeignet für die Behandlung mit LAT1-siRNA, da sie eine sehr starke Expression des Transporters aufweisen. Der erfolglose Versuch, die Transportfunktion nach der Herunterregulierung des LAT2-Gens zu messen, lag möglicherweise daran, dass obwohl auf mRNA Ebene das Gen herunterreguliert war, die Transportfunktion des herunterregulierten LAT2 von dem LAT1 oder einem anderen Aminosäuretransporter übernommen wurde. Die Vermutung liegt nahe, dass sich die beiden Transporter in ihrer Funktion gegenseitig ergänzen. Da es keine Zelllinie gibt, die nur LAT2 exprimieren, war es uns nicht möglich LAT2 als Transporter für Melphalan mit Hilfe der siRNA-Technologie zu identifizieren.

5.5.3 Expression von LAT1 und LAT2 in *Xenopus* Oozyten

Die Expression von LAT1 und LAT2 zusammen mit 4F2hc in *Xenopus laevis* Oozyten bot eine weitere Möglichkeit, den Transport von Melphalan über LAT1 zu bestätigen und LAT2 zusätzlich zu untersuchen. Probleme des Oozyten-Systems liegen in saisonalen sowie biologischen Unterschieden zwischen Oozyten verschiedener Tiere, der kurzen Lebenszeit (ca. 14 Tage) und der starken Temperaturempfindlichkeit der Oozyten (Weber, 1999). In zwei Veröffentlichungen wurde bereits in Oozyten, die LAT1-4F2hc überexprimieren, getestet wie stark die Leucin- bzw. Phenylalanin-Aufnahme durch Melphalan gehemmt wird. Der LAT1 vermittelte Transport der beiden aromatischen Aminosäuren wurde kompetitiv zu einem Anteil von 50% durch Melphalan gehemmt (Yanagida et al., 2001; Uchino et al., 2002). Deutlich stärker wurde die Aufnahme von Phenylalanin und Leucin durch das Parkinson-Medikament L-Dopa, dem Schilddrüsenhormon T3, oder durch die Aminosäure L-Tyrosin bis auf 20% reduziert (Yanagida et al., 2001; Uchino et al., 2002). Die direkte Aufnahme von

radioaktivmarkiertem Melphalan wurde bisher sowohl für LAT1 als auch LAT2 nicht untersucht. Zunächst konnten wir mit unseren Untersuchungen bereits bestehende Erkenntnisse, dass z.B. beide LATs nur zusammen mit dem assoziierten Protein 4F2hc funktionell aktiv sind, bestätigen (Kanai et al., 1998; Mastroberardino et al., 1998; Nakamura et al., 1999; Pineda et al., 1999; Yanagida et al., 2001). Weiterhin geht aus den Versuchen zur Substratspezifität wie bekannt hervor, dass die beiden Aminosäuren Leucin und Phenylalanin Substrate für diese beiden Transporter sind, wobei Leucin eine höhere Affinität zum LAT1 besitzt und Phenylalanin stärker über LAT2 transportiert wird (Rossier et al., 1999). Für Melphalan konnte jedoch aus ungeklärten Gründen nur eine geringe Steigerung des Transportes durch LAT1 (1,5fach) und LAT2 (2fach) nachgewiesen werden.

Im Mittelpunkt der Arbeit zur Charakterisierung des Membrantransports von Melphalan stand der Influxtransport des Melphalans in die Zellen. Da es sich bei den beiden Transportern um obligatorische Aminosäureaustauscher handelt, spielt möglicherweise nicht nur der durch diese Proteine vermittelte Influx, sondern auch der Efflux eine Rolle. Der Efflux von Melphalan wird nicht wie der Influx (Leukämie-Zellen und Lymphoblasten) durch andere Aminosäuren im intrazellulären Milieu kompetitiv reduziert, sondern wird durch extrazelluläre Aminosäuren im Rahmen des Austausches stimulieren (Vistica and Schuette, 1981; Begleiter et al., 1982). Zu den effektivsten Substraten, die den Efflux von Melphalan beeinflussen, gehören, extrazelluläre Aminosäuren wie Glutamin, Asparaginsäure, Serin, Threonin, und Cystein (Vistica and Schuette, 1981; Begleiter et al., 1982).

Zukünftige Untersuchungen zum Effluxtransport des Melphalans über obligate Aminosäureaustauscher oder über Effluxtransporter aus der Gruppe der *ATP-binding cassette transporter* (ABC-Transporter) wie MDR1 oder MRP könnten die interindividuellen Unterschiede in der Pharmakokinetik und den Nebenwirkungen nach der Therapie mit Melphalan aufklären. Diese Frage ist in meiner Arbeit teilweise bereits durch weitere Analysen an Tumorzelllinien bearbeitet worden.

5.6 Bedeutung tumorspezifischer Unterschiede für die Krebstherapie mit Melphalan

5.6.1 Gewebespezifische Expression von LAT1, LAT2 und 4F2hc

Obwohl LAT1 und LAT2 offenbar eine überlappende Substratspezifität haben, weisen sie doch unterschiedliche Gewebeexpressionsmuster auf. Die Expression der beiden leichten Ketten LAT1 und LAT2 in den verschiedenen Geweben zeigte bekannterweise (siehe Abbildung 4.9), dass LAT2 sehr stark in der Niere und dem Darmgewebe (Rossier et al., 1999) aber auch in der Lunge, Milz und der Schilddrüse exprimiert wird. LAT1 zeigte seine höchste Expression im Dünndarm, im Gehirn und der Speiseröhre (Rossier et al., 1999; Yanagida et al., 2001). Die schwere Kette 4F2hc, die sowohl mit LAT1 als auch LAT2 einen Heterodimeren Aminosäuretransporter bildet, konnte durchweg in allen Geweben nachgewiesen werden (Rossier et al., 1999; Yanagida et al., 2001), wobei die 4F2hc-mRNA mit der LAT2-mRNA Expression korrelierte.

5.6.2 Tumorzellenspezifische Expression verschiedener Transportsysteme

Neben der Genotypisierung von angeborenen Polymorphismen bietet die die Analyse von genetischer Veränderungen in den Tumoren und die Analyse von Expressionsprofilen von Tumorgeweben die Aussicht, Marker zu finden, auf die sich eine individualisierte Behandlung von Tumorerkrankungen aufbauen lässt (Lustig, 2001). Diese Untersuchungen werden anhand von Microarrays durchgeführt, wobei zehntausende verschiedene Gene oder DNA-Moleküle gleichzeitig gemessen werden können. Dadurch gelingt es, bisher unbekannte molekulare Veränderungen in der Tumorigenese aufzudecken und die Charakterisierung von Tumoren durch das Erstellen von Expressionsprofilen zu verbessern (Lustig, 2001). Es ergeben sich neue tumorbiologische Einblicke, welche für Diagnose, prognostische Einschätzung und therapeutische Überlegungen genutzt werden können.

Diese genomweiten SNP- und Expressionsanalysen sind sehr aufwendig und erfordern aus statistischen Gründen (Problem des multiplen Testens) Fallzahlen bis zu vielen Tausenden von Patienten. Eine Alternative ist die gezielte Analyse funktioneller Systeme, in unserem Fall des Systems Melphalan-Membrantransport. Und hierauf fokussiert sollte durch weitere Untersuchungen in Tumorzelllinien die Bedeutung von interindividueller Variabilität in den Transportvorgängen untersucht werden, auch um die individuell sehr variable Pharmakokinetik weiter aufzuklären.

Im Folgenden versuchten wir, für verschiedene Tumorzelllinien ein Expressionsprofil von Transportproteinen zu erstellen, die für den Transport sowie für das Ansprechen verantwortlich sind. Die Auswahl der Tumorzelllinien für diese Fragestellung beschränkte sich vorwiegend auf Tumorarten wie das Multiple Myelom, B-Zell-Lymphome und Leukämien, die in der Erstlinientherapie aber auch Folgetherapie mit Melphalan behandelt werden.

Nach der Literatur erfolgte eine Auswahl von verschiedenen Transportsystemen die sowohl für den Influx als auch den Efflux von Melphalan verantwortlich sind oder sein könnten. Neben den beiden Aminosäuretransportern LAT1 und LAT2 und dem assoziierten Glycoprotein 4F2hc, die bereits im Mittelpunkt unserer Arbeit standen, wurde auch ein T-Typ Aminosäuretransporter TAT1 (SLC16A10) mit eingeschlossen, der bevorzugt als Uniporter aromatische Aminosäuren transportiert. Aus oben dargestellten Gründen wurden auch drei OCTs (OCT1-3) in die Analyse einbezogen.

Die hohe Rückfallrate beim Multiplen Myelom wird auf die Entwicklung von MDR (*multidrug-resistance*) zurückgeführt. Dabei spielt vor allem der *multidrug resistance*-Transporter MDR1 (ABCB1) eine wichtige Rolle. So korrelierte z.B. die Expression des P-Glycoproteins nach Behandlung des Multiplen Myeloms zu 75% mit der Gabe von Doxorubicin nach dem Therapieschema VAD (Vincristin, Doxorubicin und Dexamethason) (Grogan et al., 1993). Aus der gleichen Arbeit ging aber auch hervor, dass die Behandlung des Multiplen Myeloms mit Melphalan in keinem Zusammenhang mit der MDR1-Expression steht (Grogan et al., 1993). Bisher gibt es keinen direkten Nachweis, dass Melphalan über MDR1 nach außen transportiert wird. Während der Therapie mit Melphalan kommt es immer wieder zur Entwicklung von Resistenzen, deren Ursachen bislang unzureichend untersucht worden sind. Aus diesem Grund habe ich auch in den Tumorzelllinien die MDR1 Expression auf das Ansprechen und die intrazelluläre Akkumulation von Melphalan untersucht. Weiterhin resultiert die Resistenz von Tumorzellen häufig in einer verminderten zytotoxischen Wirkung, hervorgerufen durch eine erhöhte Eliminierung von Phase-II-Metaboliten über MRP1 oder MRP2. Der ABC-Transporter MRP1 transportiert vorwiegend Glutathion-, Sulfat- oder Glukuronidierungs-Konjugate, die während des Phase-II-Metabolismus entstehen, aus der Zelle (Hipfner et al., 1999; Borst et al., 2000). Wie bereits beschrieben, wird Melphalan durch GST (Phase II Enzyme) in Glutathion-Konjugate umgewandelt und anschließend über den MRP1 aus der Zelle transportiert (Muller et al., 1994; Barnouin et al., 1998). Die Entwicklung von Multidrug-Resistenzen beim Multiplen Myelom konnte bisher nicht auf die

Überexpression des Effluxtransporters MRP1 zurückgeführt werden (Linsenmeyer et al., 1992; Marie, 2001). Da es sich aber um ein Transportprotein handelt, das Melphalan aus der Zelle transportiert, habe ich hier die Expression des MRP1 in diesem Zusammenhang mit dem Transport von Melphalan anhand von 29 Tumorzelllinien bestimmt.

Von den Transportproteinen war der LAT1 in den von uns untersuchten Tumorzellen um ein 100faches stärker exprimiert als LAT2 (siehe Abbildung 4.30). Northern-Blot Analysen von Yanagida et al. 2001 zeigten in Tumorzelllinien (HL-60, U937 und K562), dass LAT1 in allen untersuchten Zellen sehr stark exprimiert ist und 4F2hc nur partiell in einigen Zelllinien exprimiert war (Yanagida et al., 2001). Auch in unserer Studie war 4F2hc weniger stark als LAT1 aber trotzdem in allen Tumorzellen gleichmäßig nachweisbar. Anders als bei den von uns untersuchten Geweben, korrelierte in den Tumorzellen die LAT1-Expression mit der 4F2hc-Expression. An dieser Stelle lässt sich nur vermuten, dass die Expression der beiden Transporter LAT1 und LAT2 in gesunden und kranken Geweben einer bisher nicht geklärten Genregulation unterliegen. Von den drei OCT1, 2, 3 war nur der OCT1 sehr schwach in einigen Zelllinien exprimiert, was gegen eine Bedeutung dieser Transporter für die Aufnahme in die Zellen der hier analysierten hämatologischen Tumoren spricht, aber nicht ausschließt, dass die OCTs bei der Pharmakokinetik eine Rolle spielen, also z.B. bei der Resorption nach oraler Dosierung, bei der Sekretion oder Rückresorption in den Nierentubuli oder bei der Ausscheidung in der Leber über die Gallenwege.

5.6.3 Zytotoxizität und intrazelluläre Akkumulation des Melphalans im Zusammenhang mit der Expression verschiedener Transportsysteme

Aus einer Arbeit geht hervor, dass die Expression der assoziierten Kette 4F2hc in resistenten Multiplen Myelom-Zellen (KHM-11^{EMS}) herunterreguliert ist und mit einer verminderten Aufnahme aber nicht mit dem Efflux von Melphalan korreliert (Harada et al., 2000). Jedoch beruhten diese Beobachtungen nur auf einer Zelllinie. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden Myeloma-Zellen von 5 Patienten frisch isoliert. In einer Probe konnte auch hier eine niedrigere Expression von 4F2hc mit einer verminderten Aufnahme von Melphalan bestätigt werden. Es ist also kein generelles Phänomen bei dieser Art von Tumoren, aber doch ein reproduzierbares, so dass es in Zukunft lohnen könnte, die Tumorzellen daraufhin zu typisieren um bei denjenigen, die das Protein nicht exprimieren, eher mit anderen Medikamenten zu behandeln.

Für alle Tumorzelllinien und getrennt nach den Tumorarten konnten wir keinen signifikanten Einfluss zwischen der 4F2hc-Expression auf die variable Zytotoxizität oder die intrazelluläre Akkumulation von Melphalan beobachten. Im Gegensatz zu den Melphalan resistenten KHM-11^{EMS} Zellen konnten wir in fast allen uns zur Verfügung stehenden Tumorzelllinien die Expression der Effluxtransporter MDR1 und MRP1 nachweisen.

MRP1 war relativ gleichmäßig, aber geringer als MDR1 in fast allen Zelllinien exprimiert. Für die Untergruppe der Zelllinien des Multiplen Myeloms, bei dem in der Erstlinientherapie mit Melphalan behandelt wird, konnten wir eine signifikante Korrelation sowohl bei der Zytotoxizität als auch der intrazellulären Akkumulation von Melphalan mit der MDR1 Expression nachweisen. Diese Beobachtungen beruhen nur auf einer Zelllinie, jedoch konnten wir in einem weiteren Experiment zeigen, dass sich die Zytotoxizität des Melphalans nach der Inhibition des MDR1 mit Ciclosporin signifikant erhöhte. In klinischen Studien wurde bereits getestet wie sich das Ansprechen nach der Chemotherapie bei der gleichzeitigen Gabe von MDR1 Inhibitoren verbessert (Durie and Dalton, 1988; Dalton et al., 1989; Dalton et al., 1991; Miller et al., 1991). wobei sowohl bei MDR1-Inhibitoren der so genannten 1. Generation (z.B. Ciclosporin und Verapamil) als auch der 2. Generation (z.B. Valspodar) vermehrt toxische Wirkungen auftraten, so dass das Prinzip gegenwärtig medizinisch nicht verwendet wird.

Bei einer Multiplen Myeloma-Zelllinie (LP-1) mit einer starken MRP1 Expression konnten wir durch Hemmung mit Probenecid die Zytotoxizität des Melphalans erhöhen. Probenecid ist bekannt als Inhibitor von MRP1, jedoch ist die Spezifität zum MRP1 nicht eindeutig geklärt (Burg et al., 2002). Als Bestätigung unserer Ergebnisse zum LAT1-vermittelten Melphalan-Transport konnten wir in der Multiplen Myelom-Zelllinie (NCI-H929) mit einer gesteigerten LAT1-Expression die Zytotoxizität des Melphalans durch gleichzeitige Inkubation mit Leucin verringern.

Es gibt bisher wenig vergleichbare Arbeiten zur Zytotoxizität und Akkumulation des Melphalans in Tumorzelllinien. In der Literatur findet man widersprüchliche Hinweise zum Transport des Melphalans in resistenten und sensitiven Tumorzelllinien. Einige Arbeitsgruppen konnten keine Unterschiede in der Akkumulation zwischen sensitiven und resistenten Zelllinien nachweisen (Ball et al., 1966; Parsons et al., 1981). Andere Arbeiten zeigen wiederum eine verminderte Aufnahme des Melphalans in resistenten Leukämie-Zellen (L1210, Maus) und Zelllinien aus dem Ovar des chinesischen Hamsters (CHO) gegenüber sensitiven Zelllinien (Redwood and Colvin, 1980; Elliott and Ling, 1981;

Begleiter et al., 1983) und vermuten als Ursache eine Überexpression des P-Glycoproteins (MDR1) Auch unsere Daten weisen darauf hin, dass die Expression von MDR1 im Zusammenhang mit der Resistenz des Multiplen Myeloms gegenüber Melphalan steht

5.7 Ausblick

Während der Arbeit zur Charakterisierung des Membrantransportes von Melphalan ergaben sich neue Anhaltspunkte, dass möglicherweise nicht nur typische Aminosäuretransporter sondern auch Transporter für organische Kationen (OCTs) an dem Transport von Melphalan beteiligt sind, und dass Effluxtransporter aus der Gruppe der ABC-Transporter in die Analysen einbezogen werden müssen. Anders als bei LAT1 und LAT2 gibt es in den Genen dieser Transporter (SCL22A1, 2 und 3) mehr nicht-synonyme bzw. *nonsense* Mutationen. Dies gilt insbesondere für OCT1, in dem eine Reihe von Aminosäuresubstitutionen mit verminderte oder fehlender Transportaktivität nachgewiesen wurden. Weiterführende Arbeiten liegen somit in der Genotypisierung aller 84 Patienten aus der klinischen Studie auf funktionell relevante Polymorphismen, um mögliche Zusammenhänge mit der variablen Pharmakokinetik und Nebenwirkungen des Melphalans herzustellen. Nach unseren Analysen würden sich diese auf OCT3 konzentrieren.

Zuvor könnte weiter in überexprimierenden Zellen, in *Xenopus* Oozyten oder mittels siRNA der Transport von Melphalan über OCT1, -2, -3 untersucht werden, auch weitere OCTs sollten einbezogen werden.

Obwohl die Promotorvarianten keinen Einfluss auf die Genexpression zeigten, wäre es interessant zu untersuchen, ob in Normalgewebszellen oder Tumorzellen eine epigenetische Inaktivierung bestimmter Transporter vorliegt, die über den Status der DNA-Methylierung des Promotors ermittelt werden kann. Hierbei wäre vor allem das LAT1-Gen von großem Interesse, mit einer statistisch signifikanten CpG-Nukleotid-Dichte, so genannten CpG-Inseln, um den Bereich des Transkriptionsstartpunktes (NCBI-Sequenzanalyse (Takai and Jones, 2002)). CpG-Inseln unterliegen der epigenetischen Genregulation. Über den Grad der Methylierung dieser CpG-Inseln könnte somit z.B. das LAT1-Gen als Tumormarker identifiziert werden.

Die Ergebnisse, aus dem letzten Teil der Arbeit, geben einen wichtigen Hinweis auf mögliche Kandidatengene im Bereich der Effluxtransporter. MDR1 und MRP1 sind wichtige Transporter bei der Entwicklung von Resistenzen. Hier sollte an Patienten die Expression der Transporter in den Tumorzellen in Relation zum Ansprechen auf die Therapie weiter analysiert werden.

Zuvor wäre ein naheliegender Schritt, anhand des DNA Materials von 84 Patienten aus der klinischen Studie und der 29 Tumorzelllinien eine Genotypisierung von klinisch relevanten Polymorphismen in den Genen *ABCB1* (MDR1), *ABCC1* (MRP1) und *ABCG2* (BRCP) durchzuführen, um Genvarianten zu identifizieren, die über Pharmakokinetik und Wirkungen und Nebenwirkungen von Melphalan bestimmend sind.

Generell werden gegenwärtig im Bereich der Krebstherapie zwei Forschungsrichtungen vertreten, einerseits die auf bestimmte biologische Systeme fokussierte hypothesengerichtete Forschung und die umfassenderer genomweite Forschung. Auch im Rahmen der Therapie mit Melphalan wäre es sinnvoll, ein vollständiges Expressionsprofil, mittels Affymetrix-Chips, von diesen Patienten anzulegen, um weitere Gene zu identifizieren, die möglicherweise einen Einfluss auf die Pharmakokinetik und das Ansprechen nach der Behandlung mit Melphalan haben. Diese Gene können nicht nur im direkten Zusammenhang mit dem Transport des Melphalans stehen, sondern sind auch im Bereich von DNA-Reparaturenzymen oder im Apoptosesignalweg zu suchen.

6 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen die beiden Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2 und deren Rolle bei Pharmakokinetik, Wirkungen und Nebenwirkungen des Zytostatikums Melphalan.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die erbliche Variabilität in den LAT1- und LAT2-Genen bestimmt und es wurde untersucht, welche Bedeutung angeborene genetische Polymorphismen bei 84 Patienten mit Multiplem Myelom und Non-Hodgkin-Lymphomen für die interindividuelle Pharmakokinetik und Nebenwirkungen des Melphalans hatten. In einer klinischen Studie konnte eine variable Pharmakokinetik des Melphalans nachgewiesen werden, deren Ursache zu 14% mit einer verminderten Nierenfunktion begründet werden konnte. Weitere nicht-genetische Einflussfaktoren auf die variable Pharmakokinetik des Melphalans konnten nicht identifiziert werden. Im Zuge der Resequenzierung konnte eine große Anzahl genetischer Varianten in den Genen der beiden Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2 identifiziert werden. Es konnte jedoch kein deutlicher Zusammenhang zwischen medizinischen und funktionellen Daten und den insgesamt 65 identifizierten Polymorphismen hergestellt werden. Auch die Promotorpolymorphismen zeigten keinen Einfluss auf die LAT1- und LAT2-Expression. Für die Nebenwirkungen konnte eine signifikante Abhängigkeit mit der verabreichten Dosis von Melphalan nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten funktionell inaktivierende Polymorphismen in den Glutathion-S-Transferasen GSTP1 und GSTT1 keinen signifikanten Einfluss auf die Nebenwirkungen Mukositis und Diarrhöe.

Aufgrund der weiterhin ungeklärten Variabilität in der Pharmakokinetik von Melphalan stellte sich die Frage, welche Proteine sind für den Melphalan-Transport verantwortlich. Mit dem Fokus auf die beiden Aminosäuretransporter LAT1 und LAT2 wurde im Hauptteil dieser Arbeit der Membrantransport von Melphalan charakterisiert, um zu überprüfen, welcher der beiden Transportproteine tatsächlich den quantitativ entscheidenden Anteil am Membrantransport von Melphalan hat. Über Inhibitionsexperimente in HEK293- und CaCo-2-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Melphalan sowohl durch neutrale Aminosäuren wie Leucin als auch durch aromatische Aminosäuren wie Tryptophan gehemmt wird. Weiterhin zeigten typische Substrate für OCTs wie Chinin und Chinidin einen hemmenden Einfluss auf den Transport von Melphalan. Unter Anwendung der siRNA-Technik konnte nachgewiesen werden, dass das Melphalan über den Aminosäuretransporter LAT1 transportiert wird.

Weiterhin korrelierte ein verminderter Transport über LAT1 signifikant mit einer geringeren zytotoxischen Wirkung des Melphalans. Für LAT2 konnte weder mit der siRNA-Technik noch über die Oozyten als Expressionssystem ein eindeutiger Beleg erbracht werden, dass dieser Transporter Melphalan transportiert.

In einer Reihe von Tumorzelllinien wurde die Expression ausgewählter Transportsysteme bestimmt und diese Daten mit der Toxizität und intrazellulärer Akkumulation des Melphalans in Beziehung gesetzt. Anhand der Expression von MDR1 in den Multiplen Myelom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass möglicherweise nicht nur Influxtransporter für die zytotoxische Wirkung des Melphalans verantwortlich sind sondern auch Effluxtransporter wie MDR1 eine entscheidende Rolle bei der Wirkung von Melphalan spielen.

Konkrete an diese Arbeit anschließende Projekte sollten die Rolle der Genvarianten in OCTs bei Melphalan weiter analysieren und daneben die Bedeutung von Genvarianten in den Efflux-Transportproteinen. Und schließlich spielen natürlich für die genetische Variabilität der Wirkungen von Melphalan auch Polymorphismen in den DNA-Reparaturenzymen und in weiteren zellulären Signalwegen eine große Rolle.

7 Literaturverzeichnis

- Aarskog, N.K. and Vedeler, C.A.: Real-time quantitative polymerase chain reaction. A new method that detects both the peripheral myelin protein 22 duplication in Charcot-Marie-Tooth type 1A disease and the peripheral myelin protein 22 deletion in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies. *Hum Genet* 107 (2000) 494-8.
- Alberts, D.S., Chang, S.Y., Chen, H.S., Evans, T.L. and Moon, T.E.: Oral melphalan kinetics. *Clin Pharmacol Ther* 26 (1979a) 737-45.
- Alberts, D.S., Chang, S.Y., Chen, H.S., Moon, T.E., Evans, T.L., Furner, R.L., Himmelstein, K. and Gross, J.F.: Kinetics of intravenous melphalan. *Clin Pharmacol Ther* 26 (1979b) 73-80.
- Alexanian, R., Barlogie, B. and Tucker, S.: VAD-based regimens as primary treatment for multiple myeloma. *Am J Hematol* 33 (1990) 86-9.
- Alexanian, R. and Dimopoulos, M.: The treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 330 (1994) 484-9.
- Alexanian, R., Haut, A., Khan, A.U., Lane, M., McKelvey, E.M., Migliore, P.J., Stuckey, W.J., Jr. and Wilson, H.E.: Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *Jama* 208 (1969) 1680-5.
- Alving, A.S., Carson, P.E., Flanagan, C.L. and Ickes, C.E.: Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science* 124 (1956) 484-5.
- Ardiet, C., Tranchand, B., Biron, P., Rebattu, P. and Philip, T.: Pharmacokinetics of high-dose intravenous melphalan in children and adults with forced diuresis. Report in 26 cases. *Cancer Chemother Pharmacol* 16 (1986) 300-5.
- Attal, M., Harousseau, J.L., Stoppa, A.M., Sotto, J.J., Fuzibet, J.G., Rossi, J.F., Casassus, P., Maisonneuve, H., Facon, T., Ifrah, N., Payen, C. and Bataille, R.: A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* 335 (1996) 91-7.
- Awasthi, S., Bajpai, K.K., Piper, J.T., Singhal, S.S., Ballatore, A., Seifert, W.E., Jr., Awasthi, Y.C. and Ansari, G.A.: Interactions of melphalan with glutathione and the role of glutathione S-transferase. *Drug Metab Dispos* 24 (1996) 371-4.
- Ball, C.R., Connors, T.A., Double, J.A., Ujhazy, V. and Whisson, M.E.: Comparison of nitrogen-mustard sensitive and -resistant Yoshida sarcomas. *Int J Cancer* 1 (1966) 319-27.
- Barlogie, B., Smith, L. and Alexanian, R.: Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. *N Engl J Med* 310 (1984) 1353-6.
- Barnouin, K., Leier, I., Jedlitschky, G., Pourtier-Manzanedo, A., Konig, J., Lehmann, W.D. and Keppler, D.: Multidrug resistance protein-mediated transport of chlorambucil and melphalan conjugated to glutathione. *Br J Cancer* 77 (1998) 201-9.
- Becker, N.W., J.: *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990*, Berlin Heidelberg. (1998).
- Begleiter, A., Froese, E.K. and Goldenberg, G.J.: A comparison of melphalan transport in human breast cancer cells and lymphocytes in vitro. *Cancer Lett* 10 (1980) 243-51.
- Begleiter, A., Grover, J., Froese, E. and Goldenberg, G.J.: Membrane transport, sulfhydryl levels and DNA cross-linking in Chinese hamster ovary cell mutants sensitive and resistant to melphalan. *Biochem Pharmacol* 32 (1983) 293-300.
- Begleiter, A., Grover, J. and Goldenberg, G.J.: Mechanism of efflux of melphalan from L5178Y lymphoblasts in vitro. *Cancer Res* 42 (1982) 987-91.

- Bergel, F.: Cytotoxic alpha amino acids and peptides. *British Empire Cancer Campaign* 31 (1953) 6-7.
- Bergel, F.: Cytoactive amino-acids and peptide derivates, part I: substituted phenylalanines. *J Chem Soc* (1954) 2409-2417.
- Beutler, E.: Drug-induced hemolytic anemia. *Pharmacol Rev* 21 (1969) 73-103.
- Bolton, M.G., Colvin, O.M. and Hilton, J.: Specificity of isozymes of murine hepatic glutathione S-transferase for the conjugation of glutathione with L-phenylalanine mustard. *Cancer Res* 51 (1991) 2410-5.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M. and Wijnholds, J.: A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 92 (2000) 1295-302.
- Bosanquet, A.G. and Gilby, E.D.: Pharmacokinetics of oral and intravenous melphalan during routine treatment of multiple myeloma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 18 (1982) 355-62.
- Bosanquet, A.G. and Gilby, E.D.: Comparison of the fed and fasting states on the absorption of melphalan in multiple myeloma. *Cancer Chemother Pharmacol* 12 (1984) 183-6.
- Bradshaw, D.M. and Arceci, R.J.: Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *J Clin Oncol* 16 (1998) 3674-90.
- Bredschneider, M., Klein, K., Murdter, T.E., Marx, C., Eichelbaum, M., Nussler, A.K., Neuhaus, P., Zanger, U.M. and Schwab, M.: Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase A1, the major glutathione S-transferase in human liver: consequences for enzyme expression and busulfan conjugation. *Clin Pharmacol Ther* 71 (2002) 479-87.
- Breidenthal, S.E., White, D.J. and Glatt, C.E.: Identification of genetic variants in the neuronal form of tryptophan hydroxylase (TPH2). *Psychiatr Genet* 14 (2004) 69-72.
- Brockmoller, J., Cascorbi, I., Kerb, R. and Roots, I.: Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res* 56 (1996) 3915-25.
- Brockmoller, J., Kerb, R., Drakoulis, N., Staffeldt, B. and Roots, I.: Glutathione S-transferase M1 and its variants A and B as host factors of bladder cancer susceptibility: a case-control study. *Cancer Res* 54 (1994) 4103-11.
- Brookes, P. and Lawley, P.D.: The reaction of mono- and di-functional alkylating agents with nucleic acids. *Biochem J* 80 (1961) 496-503.
- Brox, L.W., Gowans, B. and Belch, A.: L-phenylalanine mustard (melphalan) uptake and cross-linking in the RPMI 6410 human lymphoblastoid cell line. *Cancer Res* 40 (1980) 1169-72.
- Budker, V., Gurevich, V., Hagstrom, J.E., Bortzov, F. and Wolff, J.A.: pH-sensitive, cationic liposomes: a new synthetic virus-like vector. *Nat Biotechnol* 14 (1996) 760-4.
- Burg, D., Wielinga, P., Zelcer, N., Saeki, T., Mulder, G.J. and Borst, P.: Inhibition of the multidrug resistance protein 1 (MRP1) by peptidomimetic glutathione-conjugate analogs. *Mol Pharmacol* 62 (2002) 1160-6.
- Campbell, W.A., Sah, D.E., Medina, M.M., Albina, J.E., Coleman, W.B. and Thompson, N.L.: TA1/LAT-1/CD98 light chain and system L activity, but not 4F2/CD98 heavy chain, respond to arginine availability in rat hepatic cells. Loss Of response in tumor cells. *J Biol Chem* 275 (2000) 5347-54.
- Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., Shaw, N., Lane, C.R., Lim, E.P., Kalyanaraman, N., Nemes, J., Ziaugra, L., Friedland, L., Rolfe, A., Warrington, J., Lipshutz, R., Daley, G.Q. and Lander, E.S.: Characterization of

- single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22 (1999) 231-8.
- Cayla, C., Heinonen, P., Viikari, L., Schaak, S., Snapir, A., Bouloumie, A., Karvonen, M.K., Pesonen, U., Scheinin, M. and Paris, H.: Cloning, characterisation and identification of several polymorphisms in the promoter region of the human alpha2B-adrenergic receptor gene. *Biochem Pharmacol* 67 (2004) 469-78.
- Charlier, C., Broly, F., Lhermitte, M., Pinto, E., Anseau, M. and Plomteux, G.: Polymorphisms in the CYP 2D6 gene: association with plasma concentrations of fluoxetine and paroxetine. *Ther Drug Monit* 25 (2003) 738-42.
- Child, J.A., Morgan, G.J., Davies, F.E., Owen, R.G., Bell, S.E., Hawkins, K., Brown, J., Drayson, M.T. and Selby, P.J.: High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 348 (2003) 1875-83.
- Cockcroft, D.W. and Gault, M.H.: Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron* 16 (1976) 31-41.
- Cornish-Bowden, A.: A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem J* 137 (1974) 143-4.
- Dalton, W.S., Grogan, T.M., Meltzer, P.S., Scheper, R.J., Durie, B.G., Taylor, C.W., Miller, T.P. and Salmon, S.E.: Drug-resistance in multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma: detection of P-glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy. *J Clin Oncol* 7 (1989) 415-24.
- Dalton, W.S., Grogan, T.M. and Miller, T.P.: The role of P-glycoprotein in drug-resistant hematologic malignancies. *Cancer Treat Res* 57 (1991) 187-208.
- Dasgupta, R.K., Adamson, P.J., Davies, F.E., Rollinson, S., Roddam, P.L., Ashcroft, A.J., Dring, A.M., Fenton, J.A., Child, J.A., Allan, J.M. and Morgan, G.J.: Polymorphic variation in GSTP1 modulates outcome following therapy for multiple myeloma. *Blood* 102 (2003) 2345-50.
- den Dunnen, J.T. and Antonarakis, S.E.: Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 109 (2001) 121-4.
- Dixon, M.: The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* 55 (1953) 170-1.
- Drewe, J.: Klinische Pharmakologie: Proteine für den Transport von Arzneistoffen. *Med Wochenschr* (2000) 727-31.
- Durie, B.G. and Dalton, W.S.: Reversal of drug-resistance in multiple myeloma with verapamil. *Br J Haematol* 68 (1988) 203-6.
- Durie, B.G. and Salmon, S.E.: A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 36 (1975) 842-54.
- Eichelbaum, M., Ingelman-Sundberg, M. and Evans, W.E.: Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med* 57 (2006) 119-37.
- Elliott, E.M. and Ling, V.: Selection and characterization of Chinese hamster ovary cell mutants resistant to melphalan (L-phenylalanine mustard). *Cancer Res* 41 (1981) 393-400.
- Evans, W.E. and Johnson, J.A.: Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2 (2001) 9-39.
- Evans, W.E. and McLeod, H.L.: Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 348 (2003) 538-49.
- Fischer, V., Einolf, H.J. and Cohen, D.: Efflux transporters and their clinical relevance. *Mini Rev Med Chem* 5 (2005) 183-95.
- Flora, K.P., Smith, S.L. and Cradock, J.C.: Application of a simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of melphalan in the presence of its hydrolysis products. *J Chromatogr* 177 (1979) 91-7.

- Gabriel, S.B., Schaffner, S.F., Nguyen, H., Moore, J.M., Roy, J., Blumenstiel, B., Higgins, J., DeFelice, M., Lochner, A., Faggart, M., Liu-Cordero, S.N., Rotimi, C., Adeyemo, A., Cooper, R., Ward, R., Lander, E.S., Daly, M.J. and Altshuler, D.: The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296 (2002) 2225-9.
- Gerloff, T.: Impact of genetic polymorphisms in transmembrane carrier-systems on drug and xenobiotic distribution. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369 (2004) 69-77.
- Glatt, C.E., DeYoung, J.A., Delgado, S., Service, S.K., Giacomini, K.M., Edwards, R.H., Risch, N. and Freimer, N.B.: Screening a large reference sample to identify very low frequency sequence variants: comparisons between two genes. *Nat Genet* 27 (2001) 435-8.
- Glatt, C.E., Tampilic, M., Christie, C., DeYoung, J. and Freimer, N.B.: Re-screening serotonin receptors for genetic variants identifies population and molecular genetic complexity. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 124 (2004) 92-100.
- Goldenberg, G.J., Lee, M., Lam, H.Y. and Begleiter, A.: Evidence for carrier-mediated transport of melphalan by L5178Y lymphoblasts in vitro. *Cancer Res* 37 (1977) 755-60.
- Gouyette, A., Hartmann, O. and Pico, J.L.: Pharmacokinetics of high-dose melphalan in children and adults. *Cancer Chemother Pharmacol* 16 (1986) 184-9.
- Greig, N.H., Sweeney, D.J. and Rapoport, S.I.: Melphalan concentration dependent plasma protein binding in healthy humans and rats. *Eur J Clin Pharmacol* 32 (1987) 179-85.
- Grogan, T.M., Spier, C.M., Salmon, S.E., Matzner, M., Rybski, J., Weinstein, R.S., Scheper, R.J. and Dalton, W.S.: P-glycoprotein expression in human plasma cell myeloma: correlation with prior chemotherapy. *Blood* 81 (1993) 490-5.
- Gurdon, J.B., Lane, C.D., Woodland, H.R. and Marbaix, G.: Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 233 (1971) 177-82.
- Hall, A.G., Matheson, E., Hickson, I.D., Foster, S.A. and Hogarth, L.: Purification of an alpha class glutathione S-transferase from melphalan-resistant Chinese hamster ovary cells and demonstration of its ability to catalyze melphalan-glutathione adduct formation. *Cancer Res* 54 (1994) 3369-72.
- Hao, X.Y., Widersten, M., Ridderstrom, M., Hellman, U. and Mannervik, B.: Co-variation of glutathione transferase expression and cytostatic drug resistance in HeLa cells: establishment of class Mu glutathione transferase M3-3 as the dominating isoenzyme. *Biochem J* 297 (Pt 1) (1994) 59-67.
- HapMap Consortium: A haplotype map of the human genome. *Nature* 437 (2005) 1299-320.
- Harada, N., Nagasaki, A., Hata, H., Matsuzaki, H., Matsuno, F. and Mitsuya, H.: Down-regulation of CD98 in melphalan-resistant myeloma cells with reduced drug uptake. *Acta Haematol* 103 (2000) 144-51.
- Hipfner, D.R., Deeley, R.G. and Cole, S.P.: Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta* 1461 (1999) 359-76.
- Hoeijmakers, J.H.: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411 (2001) 366-74.
- Howells, R.E., Redman, C.W., Dhar, K.K., Sarhanis, P., Musgrove, C., Jones, P.W., Alldersea, J., Fryer, A.A., Hoban, P.R. and Strange, R.C.: Association of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null genotypes with clinical outcome in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 4 (1998) 2439-45.

- Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M. and McLellan, R.A.: Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 20 (1999) 342-9.
- Izquierdo, M.A., Shoemaker, R.H., Flens, M.J., Scheffer, G.L., Wu, L., Prather, T.R. and Scheper, R.J.: Overlapping phenotypes of multidrug resistance among panels of human cancer-cell lines. *Int J Cancer* 65 (1996) 230-7.
- Jantunen, E., Kuittinen, T. and Nousiainen, T.: BEAC or BEAM for high-dose therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma? A single centre analysis on toxicity and efficacy. *Leuk Lymphoma* 44 (2003) 1151-8.
- Johansson, I., Lundqvist, E., Bertilsson, L., Dahl, M.L., Sjoqvist, F. and Ingelman-Sundberg, M.: Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 11825-9.
- Kalow, W., Tang, B.K. and Endrenyi, L.: Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics* 8 (1998) 283-9.
- Kanai, Y. and Endou, H.: Heterodimeric amino acid transporters: molecular biology and pathological and pharmacological relevance. *Curr Drug Metab* 2 (2001) 339-54.
- Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E. and Endou, H.: Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J Biol Chem* 273 (1998) 23629-32.
- Karow T., L.R.: *Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie.*, Bergisch-Gladbach 1998.
- Kartner, N., Riordan, J.R. and Ling, V.: Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science* 221 (1983) 1285-8.
- Kerb, R., Hoffmeyer, S. and Brinkmann, U.: ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics* 2 (2001) 51-64.
- Kergueris, M.F., Milpied, N., Moreau, P., Harousseau, J.L. and Larousse, C.: Pharmacokinetics of high-dose melphalan in adults: influence of renal function. *Anticancer Res* 14 (1994) 2379-82.
- Kim, C.H., Park, K.J., Park, J.R., Kanai, Y., Endou, H., Park, J.C. and Kim do, K.: The RNA interference of amino acid transporter LAT1 inhibits the growth of KB human oral cancer cells. *Anticancer Res* 26 (2006) 2943-8.
- Kim, D.K., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Matsuo, H., Cha, S.H. and Endou, H.: Expression cloning of a Na⁺-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H⁺/monocarboxylate transporters. *J Biol Chem* 276 (2001) 17221-8.
- Kim, R.B.: Transporters and xenobiotic disposition. *Toxicology* 181-182 (2002) 291-7.
- Kirchheiner, J., Nickchen, K., Bauer, M., Wong, M.L., Licinio, J., Roots, I. and Brockmoller, J.: Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry* 9 (2004) 442-73.
- Kühne, A.: Charakterisierung der Pharmakokinetik des Zytostatikums Melphalan. Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen (2004).
- Kyhse-Andersen, J.: Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10 (1984) 203-9.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-5.
- Leabman, M.K., Huang, C.C., DeYoung, J., Carlson, E.J., Taylor, T.R., de la Cruz, M., Johns, S.J., Stryke, D., Kawamoto, M., Urban, T.J., Kroetz, D.L., Ferrin, T.E.,

- Clark, A.G., Risch, N., Herskowitz, I. and Giacomini, K.M.: Natural variation in human membrane transporter genes reveals evolutionary and functional constraints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 5896-901.
- Lewis, A.D., Forrester, L.M., Hayes, J.D., Wareing, C.J., Carmichael, J., Harris, A.L., Mooghen, M. and Wolf, C.R.: Glutathione S-transferase isoenzymes in human tumours and tumour derived cell lines. *Br J Cancer* 60 (1989) 327-31.
- Li, S. and Whorton, A.R.: Identification of stereoselective transporters for S-nitroso-L-cysteine: role of LAT1 and LAT2 in biological activity of S-nitrosothiols. *J Biol Chem* 280 (2005) 20102-10.
- Linsenmeyer, M.E., Jefferson, S., Wolf, M., Matthews, J.P., Board, P.G. and Woodcock, D.M.: Levels of expression of the *mdr1* gene and glutathione S-transferase genes 2 and 3 and response to chemotherapy in multiple myeloma. *Br J Cancer* 65 (1992) 471-5.
- Lossos, I.S., Czerwinski, D.K., Wechsler, M.A. and Levy, R.: Optimization of quantitative real-time RT-PCR parameters for the study of lymphoid malignancies. *Leukemia* 17 (2003) 789-95.
- Lu, C., Spitz, M.R., Zhao, H., Dong, Q., Truong, M., Chang, J.Y., Blumenschein, G.R., Jr., Hong, W.K. and Wu, X.: Association between glutathione S-transferase pi polymorphisms and survival in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 106 (2006) 441-7.
- Lustig, B., Morkel, M., Schlag, P.M.: Tumorprofiling durch Microarray-Technologie. *Der Onkologe* (2001).
- Mannervik, B., Awasthi, Y.C., Board, P.G., Hayes, J.D., Di Ilio, C., Ketterer, B., Listowsky, I., Morgenstern, R., Muramatsu, M., Pearson, W.R. and et al.: Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem J* 282 (Pt 1) (1992) 305-6.
- Marie, J.P.: Drug resistance in hematologic malignancies. *Curr Opin Oncol* 13 (2001) 463-9.
- Martin, A.D., Beer, R.W., Bosanquet, A.G. and Gilby, E.D.: The effect of alkylating agents and other drugs on the accumulation of melphalan by murine L1210 leukaemia cells in vitro. *Biochem Pharmacol* 31 (1982) 2727-32.
- Mastroberardino, L., Spindler, B., Pfeiffer, R., Skelly, P.J., Loffing, J., Shoemaker, C.B. and Verrey, F.: Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* 395 (1998) 288-91.
- McLaughlin, P. and Alexanian, R.: Myeloma protein kinetics following chemotherapy. *Blood* 60 (1982) 851-5.
- Meier, C., Ristic, Z., Klauser, S. and Verrey, F.: Activation of system L heterodimeric amino acid exchangers by intracellular substrates. *Embo J* 21 (2002) 580-9.
- Miller, T.P., Grogan, T.M., Dalton, W.S., Spier, C.M., Scheper, R.J. and Salmon, S.E.: P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *J Clin Oncol* 9 (1991) 17-24.
- Mills, W., Chopra, R., McMillan, A., Pearce, R., Linch, D.C. and Goldstone, A.H.: BEAM chemotherapy and autologous bone marrow transplantation for patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 13 (1995a) 588-95.
- Mills, W., Strang, J., Goldstone, A.H. and Linch, D.C.: Dose intensification of etoposide in the BEAM ABMT protocol for malignant lymphoma. *Leuk Lymphoma* 17 (1995b) 263-70.
- Monconduit, M., Menard, J.F., Michaux, J.L., Le Loet, X., Bernard, J.F., Grosbois, B., Pollet, J.P., Azais, I., Laporte, J.P., Doyen, C. and et al.: VAD or VMBCP in severe

- multiple myeloma. The Groupe d'Etudes et de Recherche sur le Myelome (GERM). *Br J Haematol* 80 (1992) 199-204.
- Moreau, P., Kergueris, M.F., Milpied, N., Le Tortorec, S., Mahe, B., Bulabois, C.E., Rapp, M.J., Larousse, C., Bataille, R. and Harousseau, J.L.: A pilot study of 220 mg/m² melphalan followed by autologous stem cell transplantation in patients with advanced haematological malignancies: pharmacokinetics and toxicity. *Br J Haematol* 95 (1996) 527-30.
- Moreau, P., Milpied, N., Mahe, B., Juge-Morineau, N., Rapp, M.J., Bataille, R. and Harousseau, J.L.: Melphalan 220 mg/m² followed by peripheral blood stem cell transplantation in 27 patients with advanced multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 23 (1999) 1003-6.
- Morrow, C.S., Diah, S., Smitherman, P.K., Schneider, E. and Townsend, A.J.: Multidrug resistance protein and glutathione S-transferase P1-1 act in synergy to confer protection from 4-nitroquinoline 1-oxide toxicity. *Carcinogenesis* 19 (1998a) 109-15.
- Morrow, C.S., Smitherman, P.K. and Townsend, A.J.: Combined expression of multidrug resistance protein (MRP) and glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) in MCF7 cells and high level resistance to the cytotoxicities of ethacrynic acid but not oxazaphosphorines or cisplatin. *Biochem Pharmacol* 56 (1998b) 1013-21.
- Mottagui-Tabar, S., Faghihi, M.A., Mizuno, Y., Engstrom, P.G., Lenhard, B., Wasserman, W.W. and Wahlestedt, C.: Identification of functional SNPs in the 5-prime flanking sequences of human genes. *BMC Genomics* 6 (2005) 18.
- Mougenot, P., Pinguet, F., Fabbro, M., Culine, S., Poujol, S., Astre, C. and Bressolle, F.: Population pharmacokinetics of melphalan, infused over a 24-hour period, in patients with advanced malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* 53 (2004) 503-12.
- Muller, M., Meijer, C., Zaman, G.J., Borst, P., Scheper, R.J., Mulder, N.H., de Vries, E.G. and Jansen, P.L.: Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 13033-7.
- Nakamura, E., Sato, M., Yang, H., Miyagawa, F., Harasaki, M., Tomita, K., Matsuoka, S., Noma, A., Iwai, K. and Minato, N.: 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J Biol Chem* 274 (1999) 3009-16.
- Nickerson, D.A., Taylor, S.L., Fullerton, S.M., Weiss, K.M., Clark, A.G., Stengard, J.H., Salomaa, V., Boerwinkle, E. and Sing, C.F.: Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene. *Genome Res* 10 (2000) 1532-45.
- Nii, T., Segawa, H., Taketani, Y., Tani, Y., Ohkido, M., Kishida, S., Ito, M., Endou, H., Kanai, Y., Takeda, E. and Miyamoto, K.: Molecular events involved in up-regulating human Na⁺-independent neutral amino acid transporter LAT1 during T-cell activation. *Biochem J* 358 (2001) 693-704.
- NONMEM-project-group. NONMEM users guides, N.p.g., San Francisco, 1992.
- Osborne, M.R. and Lawley, P.D.: Alkylation of DNA by melphalan with special reference to adenine derivatives and adenine-guanine cross-linking. *Chem Biol Interact* 89 (1993) 49-60.
- Osterborg, A., Ehrsson, H., Eksborg, S., Wallin, I. and Mellstedt, H.: Pharmacokinetics of oral melphalan in relation to renal function in multiple myeloma patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* 25 (1989) 899-903.
- Oxender, D.L. and Christensen, H.N.: Evidence for two types of mediation of neutral and amino-acid transport in Ehrlich cells. *Nature* 197 (1963) 765-7.

- Parsons, P.G., Carter, F.B., Morrison, L. and Regius Mary, S.: Mechanism of melphalan resistance developed in vitro in human melanoma cells. *Cancer Res* 41 (1981) 1525-34.
- Pemble, S., Schroeder, K.R., Spencer, S.R., Meyer, D.J., Hallier, E., Bolt, H.M., Ketterer, B. and Taylor, J.B.: Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 300 (Pt 1) (1994) 271-6.
- Pfeiffer, R., Spindler, B., Loffing, J., Skelly, P.J., Shoemaker, C.B. and Verrey, F.: Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS Lett* 439 (1998) 157-62.
- Pineda, M., Fernandez, E., Torrents, D., Estevez, R., Lopez, C., Camps, M., Lloberas, J., Zorzano, A. and Palacin, M.: Identification of a membrane protein, LAT-2, that Co-expresses with 4F2 heavy chain, an L-type amino acid transport activity with broad specificity for small and large zwitterionic amino acids. *J Biol Chem* 274 (1999) 19738-44.
- Pinguet, F., Culine, S., Bressolle, F., Astre, C., Serre, M.P., Chevillard, C. and Fabbro, M.: A phase I and pharmacokinetic study of melphalan using a 24-hour continuous infusion in patients with advanced malignancies. *Clin Cancer Res* 6 (2000) 57-63.
- Pinguet, F., Martel, P., Fabbro, M., Petit, I., Canal, P., Culine, S., Astre, C. and Bressolle, F.: Pharmacokinetics of high-dose intravenous melphalan in patients undergoing peripheral blood hematopoietic progenitor-cell transplantation. *Anticancer Res* 17 (1997) 605-11.
- Qian, Q., Yan, W. and Yang, C.Z.: [Mechanisms of resistance to melphalan in leukemia cell line and reversal by interferon alpha]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 76 (1996) 485-9.
- Redwood, W.R. and Colvin, M.: Transport of melphalan by sensitive and resistant L1210 cells. *Cancer Res* 40 (1980) 1144-9.
- Reece, P.A., Dale, B.M., Morris, R.G., Kotasek, D., Gee, D., Rogerson, S. and Sage, R.E.: Effect of L-leucine on oral melphalan kinetics in patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 20 (1987) 256-8.
- Reece, P.A., Hill, H.S., Green, R.M., Morris, R.G., Dale, B.M., Kotasek, D. and Sage, R.E.: Renal clearance and protein binding of melphalan in patients with cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 22 (1988) 348-52.
- Relling, M.V., Hancock, M.L., Boyett, J.M., Pui, C.H. and Evans, W.E.: Prognostic importance of 6-mercaptopurine dose intensity in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 93 (1999) 2817-23.
- Roden, D.M. and George, A.L., Jr.: The genetic basis of variability in drug responses. *Nat Rev Drug Discov* 1 (2002) 37-44.
- Ross, W.E., Ewig, R.A. and Kohn, K.W.: Differences between melphalan and nitrogen mustard in the formation and removal of DNA cross-links. *Cancer Res* 38 (1978) 1502-6.
- Rossier, G., Meier, C., Bauch, C., Summa, V., Sordat, B., Verrey, F. and Kuhn, L.C.: LAT2, a new basolateral 4F2hc/CD98-associated amino acid transporter of kidney and intestine. *J Biol Chem* 274 (1999) 34948-54.
- Rothbarth, J., Vahrmeijer, A.L. and Mulder, G.J.: Modulation of cytostatic efficacy of melphalan by glutathione: mechanisms and efficacy. *Chem Biol Interact* 140 (2002) 93-107.
- Sachse, C., Brockmoller, J., Bauer, S. and Roots, I.: Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 60 (1997) 284-95.

- Samson, D., Gaminara, E., Newland, A., Van de Pette, J., Kearney, J., McCarthy, D., Joyner, M., Aston, L., Mitchell, T., Hamon, M. and et al.: Infusion of vincristine and doxorubicin with oral dexamethasone as first-line therapy for multiple myeloma. *Lancet* 2 (1989) 882-5.
- Samuels, B.L. and Bitran, J.D.: High-dose intravenous melphalan: a review. *J Clin Oncol* 13 (1995) 1786-99.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (1977) 5463-7.
- Schulz, S., Schagdarsurengin, U., Greiser, P., Birkenmeier, G., Muller-Werdan, U., Hagemann, M., Riemann, D., Werdan, K. and Glaser, C.: The LDL receptor-related protein (LRP1/A2MR) and coronary atherosclerosis--novel genomic variants and functional consequences. *Hum Mutat* 20 (2002) 404.
- Schwab, M., Eichelbaum, M. and Fromm, M.F.: Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43 (2003) 285-307.
- Segawa, H., Fukasawa, Y., Miyamoto, K., Takeda, E., Endou, H. and Kanai, Y.: Identification and functional characterization of a Na⁺-independent neutral amino acid transporter with broad substrate selectivity. *J Biol Chem* 274 (1999) 19745-51.
- Seidegard, J., Vorachek, W.R., Pero, R.W. and Pearson, W.R.: Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 7293-7.
- Sheiner, L.B. and Beal, S.L.: Evaluation of methods for estimating population pharmacokinetics parameters. I. Michaelis-Menten model: routine clinical pharmacokinetic data. *J Pharmacokinet Biopharm* 8 (1980) 553-71.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C.: Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150 (1985) 76-85.
- Stanulla, M., Schrappe, M., Brechlin, A.M., Zimmermann, M. and Welte, K.: Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood* 95 (2000) 1222-8.
- Stephens, J.C., Schneider, J.A., Tanguay, D.A., Choi, J., Acharya, T., Stanley, S.E., Jiang, R., Messer, C.J., Chew, A., Han, J.H., Duan, J., Carr, J.L., Lee, M.S., Koshy, B., Kumar, A.M., Zhang, G., Newell, W.R., Windemuth, A., Xu, C., Kalbfleisch, T.S., Shaner, S.L., Arnold, K., Schulz, V., Drysdale, C.M., Nandabalan, K., Judson, R.S., Ruano, G. and Vovis, G.F.: Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science* 293 (2001) 489-93.
- Stephens, M. and Donnelly, P.: A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 73 (2003) 1162-9.
- Strachan, T. and Read, A.P.: *Molekulare Humangenetik*. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag, München, 2005.
- Suzukake, K., Vistica, B.P. and Vistica, D.T.: Dechlorination of L-phenylalanine mustard by sensitive and resistant tumor cells and its relationship to intracellular glutathione content. *Biochem Pharmacol* 32 (1983) 165-7.
- Sviland, L., Robinson, A., Proctor, S.J. and Bateman, D.N.: Interaction of cimetidine with oral melphalan. A pharmacokinetic study. *Cancer Chemother Pharmacol* 20 (1987) 173-5.
- Sweeney, C., Ambrosone, C.B., Joseph, L., Stone, A., Hutchins, L.F., Kadlubar, F.F. and Coles, B.F.: Association between a glutathione S-transferase A1 promoter polymorphism and survival after breast cancer treatment. *Int J Cancer* 103 (2003a) 810-4.

- Sweeney, C., McClure, G.Y., Fares, M.Y., Stone, A., Coles, B.F., Thompson, P.A., Korourian, S., Hutchins, L.F., Kadlubar, F.F. and Ambrosone, C.B.: Association between survival after treatment for breast cancer and glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism. *Cancer Res* 60 (2000) 5621-4.
- Sweeney, C., Nazar-Stewart, V., Stapleton, P.L., Eaton, D.L. and Vaughan, T.L.: Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and survival among lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12 (2003b) 527-33.
- Takai, D. and Jones, P.A.: Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 3740-5.
- Uchino, H., Kanai, Y., Kim do, K., Wempe, M.F., Chairoungdua, A., Morimoto, E., Anders, M.W. and Endou, H.: Transport of amino acid-related compounds mediated by L-type amino acid transporter 1 (LAT1): insights into the mechanisms of substrate recognition. *Mol Pharmacol* 61 (2002) 729-37.
- Verrey, F., Closs, E.I., Wagner, C.A., Palacin, M., Endou, H. and Kanai, Y.: CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* 447 (2004) 532-42.
- Verrey, F., Jack, D.L., Paulsen, I.T., Saier, M.H., Jr. and Pfeiffer, R.: New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J Membr Biol* 172 (1999) 181-92.
- Verrey, F., Meier, C., Rossier, G. and Kuhn, L.C.: Glycoprotein-associated amino acid exchangers: broadening the range of transport specificity. *Pflugers Arch* 440 (2000) 503-12.
- Vistica, D.T.: Cytotoxicity as an indicator for transport mechanism: evidence that melphalan is transported by two leucine-preferring carrier systems in the L1210 murine leukemia cell. *Biochim Biophys Acta* 550 (1979) 309-17.
- Vistica, D.T.: Cellular pharmacokinetics of the phenylalanine mustards. *Pharmacol Ther* 22 (1983) 379-406.
- Vistica, D.T. and Rabinovitz, M.: Concentrative uptake of melphalan, a cancer chemotherapeutic agent which is transported by the leucine-preferring carrier system. *Biochem Biophys Res Commun* 86 (1979) 929-32.
- Vistica, D.T. and Schuette, B.P.: Carrier mechanism and specificity accounting for the increase in intracellular melphalan by the basic amino acids. *Mol Pharmacol* 19 (1981) 92-6.
- Vistica, D.T., Toal, J.N. and Rabinovitz, M.: Amino acid-conferred protection against melphalan--characterization of melphalan transport and correlation of uptake with cytotoxicity in cultured L1210 murine leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 27 (1978) 2865-70.
- Vogel, F.: Moderne Probleme der Humangenetik. *Ergeb Inn Med Kinderheilkd* (1956) 52-125.
- Wagner, C.A., Lang, F. and Broer, S.: Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Am J Physiol Cell Physiol* 281 (2001) C1077-93.
- Watson, M.A., Stewart, R.K., Smith, G.B., Massey, T.E. and Bell, D.A.: Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 19 (1998) 275-80.
- Weber, W.M.: Endogenous ion channels in oocytes of *xenopus laevis*: recent developments. *J Membr Biol* 170 (1999) 1-12.
- Weinshilboum, R.M. and Sladek, S.L.: Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 32 (1980) 651-62.
- Xu, E., Lai, M., Lv, B., Xing, X., Huang, Q. and Xia, X.: A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter is associated with colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 324 (2004) 999-1003.

- Yanagida, O., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Kim, D.K., Segawa, H., Nii, T., Cha, S.H., Matsuo, H., Fukushima, J., Fukasawa, Y., Tani, Y., Taketani, Y., Uchino, H., Kim, J.Y., Inatomi, J., Okayasu, I., Miyamoto, K., Takeda, E., Goya, T. and Endou, H.: Human L-type amino acid transporter 1 (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1514 (2001) 291-302.
- Yang, G., Shu, X.O., Ruan, Z.X., Cai, Q.Y., Jin, F., Gao, Y.T. and Zheng, W.: Genetic polymorphisms in glutathione-S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and survival after chemotherapy for invasive breast carcinoma. *Cancer* 103 (2005) 52-8.
- Zimniak, P., Nanduri, B., Pikula, S., Bandorowicz-Pikula, J., Singhal, S.S., Srivastava, S.K., Awasthi, S. and Awasthi, Y.C.: Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties. *Eur J Biochem* 224 (1994) 893-9.

8 Danksagung

Herrn PD Dr. Kramer danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit zu betreuen und zu begutachten und Herrn Prof. Wimmer für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Brockmöller dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat mit einem Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs 1034 „Die Bedeutung genetischer Polymorphismen in der Onkologie“ diese Dissertation anzufertigen. Weiterhin danke ich ihm für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und interessanten Diskussionen sowie für die vielen kleinen nützlichen Hinweise zur Verbesserung meiner Doktorarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Rolf Kaiser für die Überlassung des Themas bedanken. Während der gesamten Zeit stand er mir als Ansprechpartner zur Verfügung und motivierte mich in meiner Arbeit.

Mladen Tzvetkov danke ich für die sehr gute Laborbetreuung und seine kompetente Unterstützung bei wissenschaftlichen Fragen. Durch sein Engagement und seine Ideen hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich möchte mich bei allen Kolleginnen und Kollegen der gesamten Abteilung Klinische Pharmakologie für Ihre freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken. Ein großes Dankeschön geht dabei an Karoline Jobst, Monika Winkler und Markus Schirmer für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und die unterhaltsamen Gespräche/Emails, die den Laboralltag aufgefrischt haben. Ich möchte mich auch bei Bernd Zirk für die hervorragende Computer-Administration bedanken. Ich danke allen herzlich für die wunderschöne Zeit und wünsche ihnen für die Zukunft alles Gute.

Für die freundliche Aufnahme und Starthilfe möchte ich mich bei Herrn Prof. Burckhardt und der gesamten Abteilung vegetative Physiologie und Pathophysiologie bedanken. Mein besonderer Dank geht dabei an Yohannes Hagos. Als Ansprechpartner für die Transportmessungen stand er mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Durch seine motivierenden Worte hat er mir durch so manche obligatorische Frustphasen geholfen. Ein lieber Dank geht auch an Sören Petzke für die Einarbeitung, seine Hilfsbereitschaft und die netten Gespräche. Mein Dank geht auch an Geshe Dallmeyer für ihre kompetente Hilfe beim Umgang mit den manchmal sehr eigenwilligen Oozyten.

Weiterhin möchte ich mich bei Björn Chapuy, Dieter Kube und Orhan Sezer (Abteilung Hämatologie und Onkologie, Berlin und Göttingen) bedanken, die mir freundlicherweise die Tumorzelllinien zur Verfügung gestellt haben.

Mein Dank geht auch an alle Stipendiaten und beteiligten Professoren des Graduiertenkollegs für die freundliche Atmosphäre und das wissenschaftliche interessante Ausbildungsprogramm.

Mladen Tzvetkov, Kristin Bokelmann, Marion Hoffmann und meiner Freundin Diana Strüver danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte mich herzlich an dieser Stelle bei meinen Eltern bedanken, die mich in jeder Lebenslage vorbehaltlos und aufopferungsvoll unterstützt haben. Ich danke auch meiner Schwester und ihrer Familie für alle aufmunternden Worte und den familiären Rückhalt, den sie mir geben. Weiterhin möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, die mir bei der Bewältigung meiner kleinen „Lebenskrise“ geholfen haben.