

**Expression, Aufreinigung und
funktionelle Untersuchungen
der ABC-Transporter
ABCB1 und ABCG2**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Anna Jacobs

aus

Köln

Bonn 2010

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Im Rahmen des Graduiertenkollegs 804
„Analyse von Zellfunktionen mit Hilfe von Biochemie und kombinatorischer
Chemie“

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Wiese
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Bendas

Tag der Promotion: 19.07.2010

Erscheinungsjahr: 2010

Unser Kopf ist rund,
damit das Denken die Richtung wechseln kann.

Francis Picabia

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	ABC-Transporter und ihre klinische Relevanz	1
1.2	ABCB1	3
1.3	ABCG2	8
1.4	Aufreinigung von ABC-Proteinen	12
1.5	Heterologe Expressionssysteme für ABC-Transporter	14
2	Zielsetzung der Arbeit	17
3	Material und Methoden	19
3.1	Allgemeine und molekularbiologische Methoden	19
3.1.1	Herstellung von Pufferlösungen	19
3.1.2	Vermehrung eines Plasmids mit Hilfe von <i>E. coli</i>	20
3.1.3	Proteinbestimmung mittels Amido Black Assay	22
3.1.4	SDS-Gelelektrophorese	24
3.1.5	Färbung von Proteinen in SDS-PAGE Gelen	27
3.1.6	Western Blot	29
3.1.7	Färbung von Proteinen auf Western Blots	31
3.1.8	Herstellung der gemischten Lipide	32
3.1.9	ATPase Assay	34
3.2	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
3.2.1	<i>S. cerevisiae</i> Stämme und Plasmide	38
3.2.2	Herstellung der Kulturmedien	42
3.2.3	Inkulturnahme, Kultivierung und Kryokonservierung	46
3.2.4	Transformation	47
3.2.5	Säure-gewaschene Glaskugeln	49
3.2.6	Zellextrakt	49
3.2.7	Wachstumskinetik	51
3.2.8	Fed-Batch Kultivierung	52

3.2.9	Membranpräparation	53
3.2.10	Bestimmung der Expression von ABCB1	57
3.2.11	Funktionelle Untersuchung in lebenden Hefen	58
3.2.12	Detergenzienscreening für ABCG2	59
3.2.13	Aufreinigung von ABCB1 und ABCG2	59
3.2.14	Größenbestimmung der Proteoliposomen	64
3.2.15	Aktivitätsbestimmung der aufgereinigten Proteine	65
3.2.16	CHAPS-Assay	66
3.3	Arbeiten mit Insektenzellen	68
3.3.1	Zelllinien und Baculovirus	68
3.3.2	Inkulturnahme, Kultivierung und Kryokonservierung	68
3.3.3	Expression von ABCG2	70
3.3.4	Membranpräparation	72
3.3.5	Aktivität der Membranpräparation	74
3.3.6	Detergenzienscreening für ABCG2	77
3.3.7	Aufreinigung von ABCG2	78
3.4	Statistische Methoden	82
3.5	Chemikalien und Reagenzien	84
3.6	Verbrauchsmaterialien	88
3.7	Geräte	90
4	Ergebnisse und Diskussion	93
4.1	ABCB1 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	93
4.1.1	Das Expressionssystem BJ5457-ABCB1	93
4.1.2	Validierung des Fed-Batch Verfahrens	97
4.1.3	Selektionsmethoden für ABCB1 exprimierende Hefestämme	99
4.1.4	Optimierung der Aufreinigung von ABCB1	102
4.1.5	Optimierung der Membranpräparation von BJ5457-MDR1	107
4.1.6	Diskussion der Methoden-Optimierung für die Arbeiten mit BJ5457- ABCB1	112
4.2	Charakterisierung von ABCB1-Aktivatoren mittels ATPase Assay	115
4.2.1	QB102 und LM 8.1	115
4.2.2	Hoechst 33342	120
4.3	ABCG2 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	123
4.3.1	Charakterisierung des neuen Hefestammes LPY11-ABCG2	123
4.3.2	Funktionelle Untersuchungen von ABCG2 in LPY11-ABCG2	128
4.3.3	Anwendung der Fed-Batch Kultivierung auf LPY11-ABCG2	133

4.3.4	Etablierung der Membranpräparation von LPY11-ABCG2	134
4.3.5	Aufreinigung von ABCG2	136
4.3.6	Detergenzienscreening für ABCG2 in Hefemembranen	142
4.3.7	Optimierung der Aufreinigung von ABCG2	144
4.3.8	Gewinnung von ABCG2 aus <i>S. cerevisiae</i> – Fazit	158
4.4	ABCG2 aus Insektenzellen	160
4.4.1	Insektenzellen als Expressionssystem für ABCG2	160
4.4.2	Membranpräparation von Insektenzellen	160
4.4.3	Aktivitätsbestimmung von ABCG2 in verschiedenen Insektenzellmembranen	162
4.4.4	Optimierung der Proteinexpression	164
4.4.5	Detergenzienscreening für ABCG2 in Insektenzellmembranen	167
4.4.6	Aufreinigung von ABCG2	170
4.4.7	Optimierung der Aufreinigung mit CHAPS	172
4.4.8	Gewinnung von ABCG2 aus Insektenzellen – Fazit	175
5	Zusammenfassung	177
	Literaturverzeichnis	196
	Publikationen	197
	Verfassererklärung	199

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP binding cassette
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> nuclear polyhedrosis virus
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast cancer resistance protein, ABCG2
BEVS	Baculovirus-Expressionsvektor-System
BSA	Bovines Serumalbumin
CHO-Zellen	Chinesische Hamster-Ovarzellen
CMC	Kritische Mizellbildungskonstante
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltopyranosid, Dodecylmaltosid
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL-Reagenz	Enhanced Chemoluminescence-Reagenz
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FC-16	Foscholin-16
FKS	Fetales Kälberserum
FTC	Fumitremorgin C
GBD-Puffer	Glass beads disruption-Puffer
HDL	High density lipoprotein
Hi5	High Five
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
LB-Medium	Lysogeny broth-Medium
LiAc	Lithiumacetat
LPC	Lysophosphatidylcholin
MDR	Multidrug Resistenz
MOI	Multiplicity of infection, Multiplizität der Infektion
MRP1	Multidrug resistance-related protein 1, ABCC1

NBD	Nukleotid-Bindungsdomäne
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriacetic acid
OG	n-Octyl- β -D-glucoopyranosid, Octylglucosid
PA	Phosphatidylsäure
PC	Phosphatidylcholin
PCS	Photonenkorrelationspektroskopie
PDR-Netzwerk	Pleiotropic drug resistance-Netzwerk
PEG	Polyethylenglycol
PGK	3-Phosphoglycerat-Kinase
P-gp	P-glycoprotein, ABCB1
P _i	Anorganisches Phosphat
PMA1	Plasmamembran-ATPase 1
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF-Membran	Polyvinylidendifluorid-Membran
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SD-Medium	Synthetisch definiertes Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween
TCA	Trichloressigsäure
TDOC	Taurodesoxycholat
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TMD	Transmembranäre Domäne
wt	Wildtyp
YE _p	Yeast episomal plasmid
YNB	Yeast nitrogen base
YPDA-Medium	Yeast peptone dextrose adenine-Medium

1 Einleitung

1.1 ABC-Transporter und ihre klinische Relevanz

ATP-binding cassette (ABC) Transporter gehören zu einer großen Familie von strukturell verwandten Membranproteinen, die eine Vielzahl von Substraten unter ATP-Verbrauch durch die Zellmembran transportieren [1–3]. ABC-Transporter spielen bei vielen lebenswichtigen Prozessen eine Rolle und kommen in allen lebenden Spezies vor [4]. Namensgebend ist die Nukleotid-Bindungsdomäne (NBD), die in allen Proteinen der Familie hoch konserviert ist. An ihr wird ATP gebunden und hydrolysiert. Bisher wurden 48 humane ABC-Transporter beschrieben, die durch phylogenetische Analyse über die Sequenzhomologie ihrer NBDs in die sieben Unterfamilien ABC-A bis ABC-G eingeteilt werden. Die Mitglieder der ABC-Transporterfamilie weisen einige gemeinsame Strukturmerkmale auf. Sie bestehen zumeist aus zwei homologen Hälften, die jeweils eine transmembranäre Domäne (TMD) mit unterschiedlich vielen α -Helices und die bereits erwähnte Nukleotid-Bindungsdomäne auf der zytoplasmatischen Seite der Membran enthalten [1, 2].

Von den 48 humanen ABC-Transportern besitzt ein großer Teil eine sehr ausgeprägte Substratspezifität. So wird beispielsweise Retinol im Auge von ABCA4 erkannt. Ein anderes Beispiel ist ABCA1, welches Cholesterol in HDL-Vesikel transportiert [5]. Eine Reihe von Transportproteinen weist im Gegensatz zu den oben genannten Vertretern eine sehr breite Substraterkennung auf. Diese ABC-Transporter werden vor allem in Geweben exprimiert, die wichtige pharmakologische Barriere-Funktionen besitzen. Dazu gehören Darm, Leber, Niere, Plazenta und Blut-Hirn-Schranke. Dort transportieren sie in den meisten Fällen Substanzen vom Zellinneren auf die extrazelluläre Seite der Membran. Die Gewebeverteilung und die funktionalen Eigenschaften dieser Transportproteine lassen auf eine wichtige Rolle beim Schutz des Körpers vor potentiell toxischen Fremdstoffen schließen, da durch diese sowohl die Absorption der Stoffe im Darm verringert als auch die Ausscheidung über die Leber oder die Niere beschleunigt wird. Zudem wird ein Eindringen fremder Substanzen in empfindliche Gewebe, wie zum Beispiel in das Gehirn, durch die ABC-Transporter limitiert [3, 5, 6]. Bei vielen Transportproteinen sind sowohl die Substrate als auch die physiologischen Funktionen jedoch noch unbekannt.

Wie bereits erwähnt, weisen einige der humanen ABC-Transporter jeweils eine sehr breit gefächerte und teilweise auch überlappende Spezifität für strukturell verschiedene Moleküle auf. Häufig besitzen diese Moleküle eine bestimmte Lipophilie, eine planare räumliche Struktur und ein Molekulargewicht von weniger als 800 Da. Die genannten Charakteristika treffen auf sehr viele der sich auf dem Markt befindenden Arzneistoffe zu. Zu Substraten von ABC-Transportproteinen gehören zum Beispiel Wirkstoffe aus der Gruppe der Antibiotika, der Antimalariamittel und eine große Anzahl von Zytostatika [3, 7–9]. Dies verdeutlicht die pharmazeutische und klinische Relevanz der ABC-Transporter.

Diese Proteine beeinflussen Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion der von ihnen transportierten Arzneistoffe [6, 7, 10, 11]. So kann es bei der gleichzeitigen Einnahme mehrerer Wirkstoffe zu klinisch relevanten Interaktionen kommen, wenn diese mit dem gleichen ABC-Protein interagieren. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten der gegenseitigen Beeinflussung. Konkurrieren zwei Arzneistoffe zum Beispiel um die Aufnahme bzw. die Ausscheidung über den gleichen ABC-Transporter mit limitierter Transportkapazität, so kann die Plasmakonzentration beider Stoffe stark verändert sein. Es kann entweder bei Erniedrigung der Konzentration im Blut zu einem Wirkverlust oder bei geringem therapeutischen Fenster des Arzneistoffes durch Erhöhung der Plasmakonzentration zu einer Intoxikation kommen.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die Expression von einigen ABC-Transportern durch Arzneistoffe (z.B. Rifampicin) induziert und so die Pharmakokinetik anderer Wirkstoffe verändert wird, welche ebenfalls mit diesen Transportern interagieren. Ebenfalls beschrieben ist, dass bestimmte Arzneistoffe ihr Zielgewebe wie zum Beispiel das zentrale Nervensystem nicht erreichen, da dieses von ABC-Transportern geschützt wird. Dies betrifft unter anderem Zytostatika, die bei Hirntumoren eingesetzt werden [12]. Bei dem Antidiarrhoikum Loperamid wird dieses Prinzip jedoch bewußt ausgenutzt. Dieses Opioid-Derivat ist ein Substrat von ABCB1 und kann aus diesem Grund nicht ins zentrale Nervensystem gelangen. Somit weist die Substanz keine der für Opioide typischen unerwünschten Arzneimittelwirkungen auf [13].

Pharmakokinetische Parameter wie die Bioverfügbarkeit und die Gewebeverteilung sind nicht nur für die Arzneimittelsicherheit von Bedeutung, sondern stellen auch wichtige Charakteristika bei der Entwicklung neuer Arzneistoffe oder -formen dar. Diese werden wie zuvor beschrieben unter anderem auch von ABC-Transportern beeinflusst. Aus diesem Grund wird in der präklinischen Entwicklungsphase heutzutage routinemäßig sichergestellt, dass neue Wirkstoffkandidaten nicht mit ABC-Transportern (hier hauptsächlich ABCB1) interagieren [6].

Daneben spielt die Variation in der Expression oder eine Mutation bestimmter Transporter eine Rolle bei verschiedenen genetisch bedingten Erkrankungen. Mutiertes und somit funktionsloses ABCC7 (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) führt zur Ausbildung von zystischer Fibrose [2, 14], ein genetischer Defekt von ABCA1 zur Tangier-Krankheit [15].

Einige der multispezifischen ABC-Transporter sind zusätzlich am Phänomen der klassischen Multidrug Resistenz (MDR) von Tumoren beteiligt. Durch die vermehrte Expression dieser Transportproteine in der Zellmembran von Tumorzellen wird ein starker Efflux der betroffenen Zytostatika beobachtet. Auf diese Weise wird die intrazelluläre Konzentration der Wirkstoffe unter die wirksame Konzentration vermindert, so dass es zu einem Versagen der Chemotherapie kommt. Zudem liegt durch die breite Substraterkennung der involvierten ABC-Transportproteine meist eine Kreuzresistenz vor, bei der die Tumorzellen gleichzeitig unempfindlich gegenüber mehreren strukturell und vom Wirkungsmechanismus her verschiedenen Zytostatika sind.

Zu den am besten untersuchten MDR Transportern zählen ABCB1 (P-Glykoprotein, P-gp), ABCG2 (Breast cancer resistance protein, BCRP) und ABCC1 (Multidrug resistance-related protein 1, MRP1) [6, 16]. In zahlreichen Studien mit resistenten Tumorzellen unterschiedlichster Gewebeherkunft konnte gezeigt werden, dass vor allem diese drei Transporter für den Efflux vieler verschiedener Zytostatika verantwortlich sind [17–19]. Der Fokus dieser Arbeit lag auf den beiden ABC-Transportern ABCB1 und ABCG2. Diese werden zusammen mit ihrer individuellen klinischen Relevanz in den folgenden Kapiteln näher vorgestellt.

1.2 ABCB1

ABCB1, auch P-Glykoprotein genannt, gehört zur ABCB-Subfamilie der ABC-Transporter. Das Protein weist in glykosyliertem Zustand ein Molekulargewicht von 170 kDa auf und besteht aus 1280 Aminosäuren. Strukturell kann das Transportprotein in vier Domänen aufgeteilt werden, zwei transmembranäre Domänen aus jeweils sechs α -Helices und zwei ATP-Bindungsdomänen. Diese Domänen folgen alternierend aufeinander, N-terminal beginnend mit einer TMD, und bilden so zwei homologe Hälften. Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung der Topologie von ABCB1.

Entdeckt wurde ABCB1 1976 in einem resistenten Tumor von chinesischen Hamster-Ovarzellen [20]. Es ist der am längsten bekannte und am besten untersuchte Vertreter der humanen ABC-Transporter. Natürlicherweise kommt das Protein in den Bürstensaum-Zellen

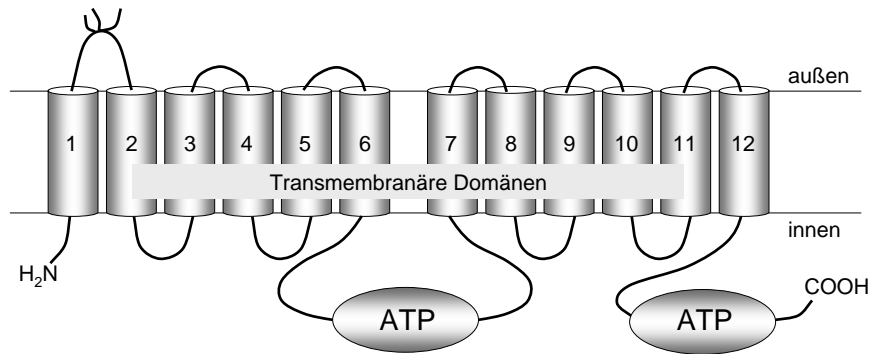


Abb. 1.1: Topologiemodell von ABCB1.

des Darms, den Canaliculi der Leber, dem proximalen Tubulus der Niere und den Epithelien der Blut-Hirn-Schranke und der Plazenta vor und stellt, wie bereits zuvor beschrieben, einen körpereigenen Abwehrmechanismus gegenüber Xenobiotika dar [17].

Zur Funktionsweise von ABCB1 existieren verschiedene Modelle, von denen die zwei wichtigsten hier kurz vorgestellt werden. Ein populäres Modell ist das des „hydrophoben Staubsaugers“. Dabei bilden die beiden homologen Hälften einen Transportkanal, der den Efflux von Molekülen direkt aus der Plasmamembran ermöglicht. Auf diese Weise werden die Stoffe ausgeschleust, bevor sie das Zytosol erreichen. Im Flippase-Modell befördert („flipp“) der Transporter das Molekül von der inneren zur äußeren Seite der Phospholipid-Doppelschicht, von wo dieses dann in den Extrazellulärraum entlassen wird [21, 22].

Die Art und die Anzahl der möglichen Substrat-Bindungsstellen von ABCB1 sind aktueller Gegenstand der Forschung. Sie werden sowohl intrazellulär als auch intramembranär diskutiert und zu ihrer genauen Lage und Struktur gibt es verschiedene Theorien. Einerseits wird eine große Bindungstasche vermutet, die für mehrere strukturell verschiedene Stoffe benachbarte oder sogar überlappende Erkennungsregionen beinhaltet [3, 23–25]. In dieser Tasche könnten zwei oder mehr Stoffe gleichzeitig gebunden werden. Daneben wird auch vermutet, dass die Bindungstasche sehr flexibel ist, so dass sich ihre Form an das jeweils gebundene Molekül anpassen könnte [26, 27].

Andererseits existieren viele Hinweise auf räumlich getrennte Bindungsstellen. Über die Existenz mehrerer Bindungsstellen herrscht weitgehend Einigkeit, jedoch werden die genaue Anzahl und die Spezifität für verschiedene Liganden noch untersucht. Shapiro und Ling konnten nachweisen, dass zwei verschiedene Stellen für die Bindung von Rhodamin 123 (R-site) und Hoechst 33342 (H-site) existieren, welche positiv kooperativ miteinander interagieren [28, 29]. An die R-site binden laut den Autoren neben verschiedenen Rhodamin-Derivaten auch Anthrazykline wie Daunorubicin oder Doxorubicin. Hoechst, Quercetin und Colchicin sollen da-

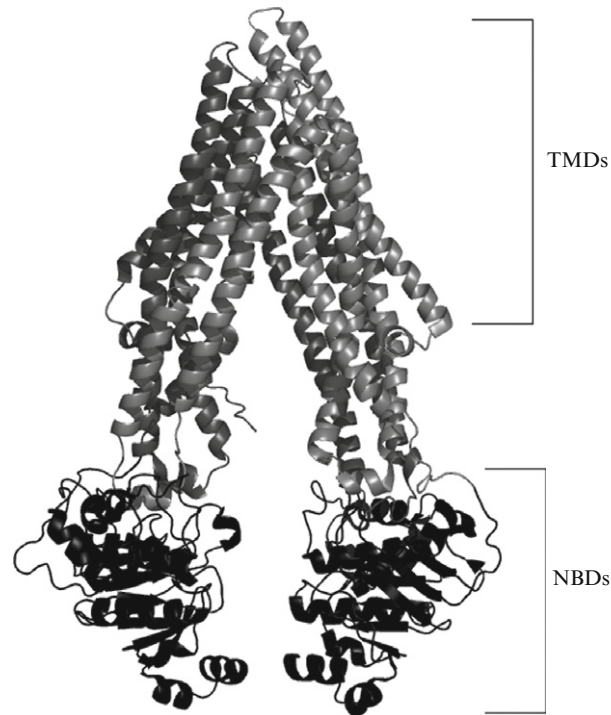


Abb. 1.2: Kristallstruktur von Abcb1a aus der Maus im ATP-freien Zustand, modifiziert nach [35, 36].

gegen Liganden der H-site sein. Diese Theorie wurde von anderen Arbeitsgruppen teilweise bestätigt oder auch weiterentwickelt [30, 31]. Insgesamt wurden bis zu sieben Bindungsstellen postuliert [32].

Die Lokalisation der Bindungsstellen in der Tertiärstruktur von ABCB1 wurde mit Hilfe von Photoaffinitäts-Markierungen und Mutationsstudien untersucht. Diese Daten wurden von Pajeva *et al.* zusammengefasst und auf ein Homologiemodell des Proteins übertragen [33]. Die Auswertung ergab, dass besonders die transmembranären Helices 5, 6, 11 und 12 an der Bindung von Wirkstoffen beteiligt sind. In einem weiteren Homologiemodell konnten drei potentielle Bindungsstellen identifiziert werden, von denen eine an der Grenzfläche zwischen Zytosol und Membran und zwei weitere innerhalb der transmembranären Helices lokalisiert sind [34]. 2009 wurde schließlich die Kristallstruktur des zu ABCB1 homologen Proteins aus der Maus (Abcb1a) veröffentlicht, welches zum humanen Protein eine Aminosäuresequenzhomologie von 87 % aufweist (siehe Abbildung 1.2) [35]. Hier wurde deutlich, dass Moleküle theoretisch direkt aus der Plasmamembran in das Protein gelangen können. Auf diese Weise konnten zuvor aufgestellte Theorien unterstützt werden [23].

Auf der Basis bisher durchgeführter Untersuchungen wurden mehrere Modelle zum Transportzyklus von ABCB1 publiziert, die das Zusammenspiel von ATP-Bindung bzw. -Hydrolyse

und Substrattransport beschreiben [37–40]. Das ATP-switch Modell, welches sich auch auf andere ABC-Transportproteine übertragen lässt, wird im Folgenden kurz vorgestellt. Higgins und Linton postulierten, dass der Transportzyklus bei Bindung eines Substrates gestartet wird. Nachfolgend bindet je ein ATP-Molekül an jede NBD. Die dadurch ausgelöste Konformationsänderung der NBDs führt zur Entstehung eines geschlossenen NBD-Dimers [39]. Dieser Vorgang löst wiederum Veränderungen in der räumlichen Anordnung der transmembranären Domänen aus. Dadurch wird das gebundene Substrat zur extrazellulären Seite der Membran transportiert. Aufgrund der zuvor genannten Konformationsänderungen der TMDs reduziert sich die Affinität des Substrates zu seiner Bindungsstelle und es kann den Transporter verlassen. Durch ATP-Hydrolyse und Freisetzung von ADP und Phosphat werden sowohl TMDs als auch NBDs in die Ausgangsposition zurückversetzt, von der ausgehend ein neuer Transportzyklus beginnen kann.

Zu den bisher identifizierten Substraten von ABCB1 gehören vor allem Zytostatika, wie zum Beispiel Anthrazykline (Doxorubicin, Daunorubicin), *Vinca* Alkaloide (Vinblastin, Vincristin), Taxane (Paclitaxel, Docetaxel), Podophyllotoxine (Etoposid, Teniposid) und Topoisomerase-Hemmstoffe (Topotecan, Irinotecan) [6, 41]. Transportiert werden unter anderem auch einige Corticoide (Dexametason, Hydrocortison, Triamcinolon), Antibiotika (Erythromycin, Valinomycin) und HIV-Protease-Inhibitoren (Saquinavir, Ritonavir, Nelfinavir). Daneben werden Farbstoffe wie Rhodamin 123, Hoechst 33342 oder Calcein-AM von ABCB1 erkannt [7]. Die hier aufgeführten Substrate weisen sehr unterschiedliche chemische Grundgerüste auf. Einige ausgewählte Verbindungen sind in Abbildung 1.3 dargestellt. Hier zeigt sich deutlich die breite Substratspezifität von ABCB1.

Auch die Inhibitoren von ABCB1 weisen eine breite chemische und strukturelle Vielfalt auf. 1981 wurde von Tsuruo und Mitarbeitern entdeckt, dass der Calciumkanal-Blocker Verapamil in der Lage ist, die ABCB1-vermittelte Resistenz *in vitro* aufzuheben [42]. Weitere Inhibitoren der ersten Generation gehören zu verschiedenen Wirkstoffklassen, darunter Immunsuppressiva, Antihistaminika, Neuroleptika und Antimalariamittel [41]. Zur Inhibition von ABCB1 wurden jedoch relativ hohe Konzentrationen dieser Substanzen benötigt. Die neben der ABCB1-Hemmung vorhandene pharmakologische Hauptwirkung der Inhibitoren führte bei Einsatz dieser hohen Konzentrationen zu starken Nebenwirkungen. Die Strukturen der Inhibitoren der ersten Generation wurden so weiterentwickelt, dass sich die Affinität zum Protein erhöhte und die pharmakologische Hauptwirkung verringerte. Vertreter dieser zweiten Generation sind zum Beispiel das Cyclosporin A-Analogon PSC 833 (Valspodar) oder das Verapamil-Derivat Dex-Verapamil [41]. Diese Verbindungen wiesen jedoch neben einer Inhibition von ABCB1 auch andere Effekte auf, die zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führten. Sie wirkten zum Beispiel ebenfalls inhibierend auf Enzyme des Cytochrom P450-

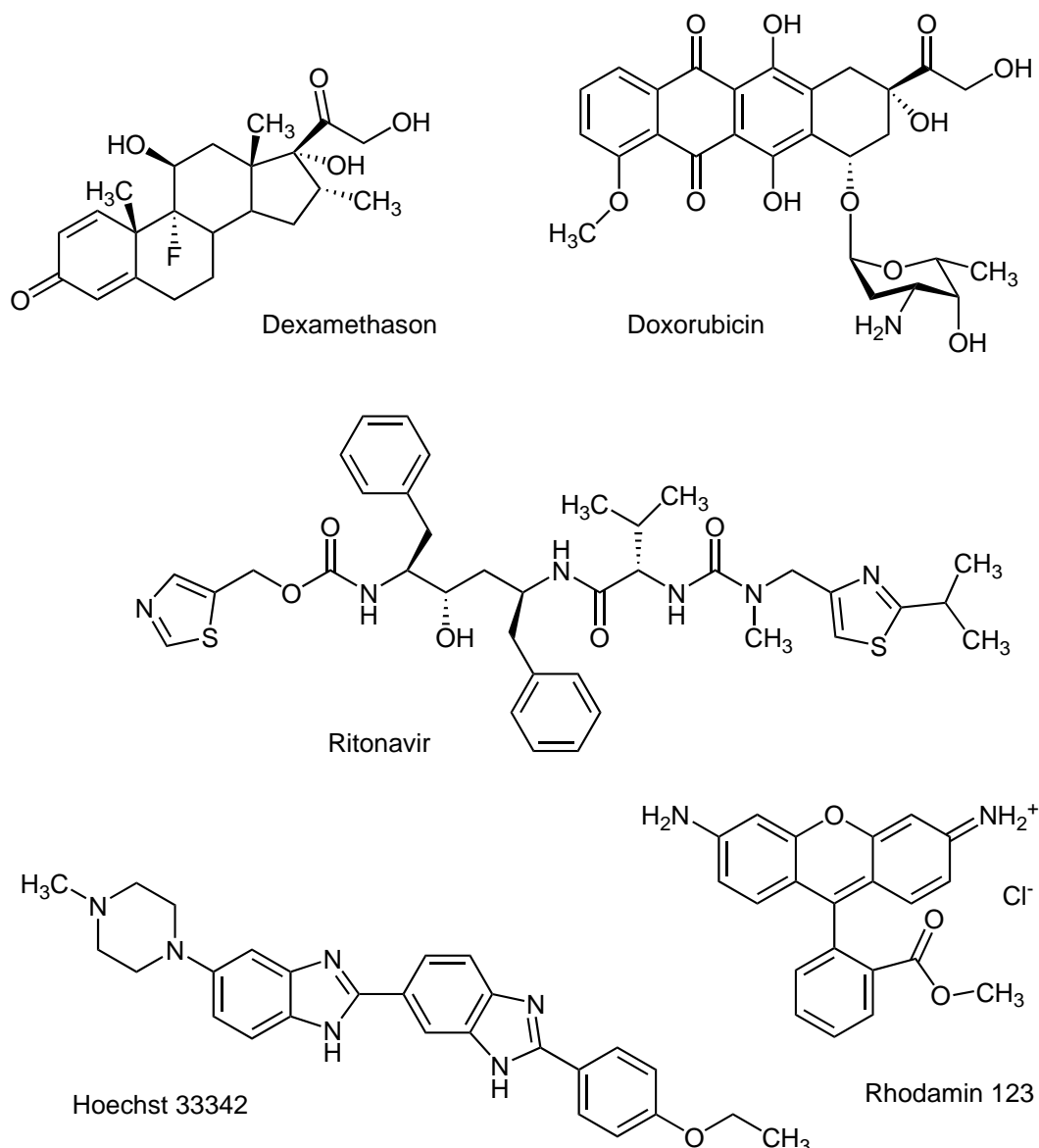


Abb. 1.3: Ausgewählte Substrate von ABCB1.

Systems, so dass es zu pharmakokinetischen Interaktionen mit den zugleich verabreichten Zytostatika kam [6]. Aus diesem Grund wurden neue Strukturen entwickelt, die gezielt nur eine Interaktion mit ABCB1 zeigten und eine sehr hohe Affinität zum Protein besaßen. Die prominentesten Vertreter der dritten Generation von ABCB1-Inhibitoren sind die Substanzen Tariquidar (XR9576) und Elacridar (GF120918) [43, 44], welche in der Lage sind, das Protein bereits in nanomolaren Konzentrationen zu hemmen.

Neben Inhibitoren sind auch Aktivatoren des Substrattransportes durch ABCB1 interessante Werkzeuge zur Untersuchung der Interaktion der verschiedenen Bindungsstellen. In der

Literatur wurde dieser aktivierende Effekt zum Beispiel für die Verbindungen Hoechst 33342, QB102 und weitere neue QB-Derivate beschrieben [28, 45, 46]. Ausführliche Informationen zu diesem Themengebiet finden sich im Ergebnisteil in Kapitel 4.2.

Diverse Inhibitoren der zweiten und dritten Generation wurden seit 1993 in klinischen Studien in Kombination mit verschiedenen Zytostatika eingesetzt, deren Ergebnisse zum Teil vielversprechend waren. Zum Teil zeigten diese jedoch auch keinen Vorteil für die behandelten Patienten. In einigen Fällen war die erhöhte Toxizität der verwendeten Zytostatika, die durch eine pharmakokinetische Interaktion mit dem ABCB1-Inhibitor ausgelöst wurde, ein Grund für den Abbruch der Studien. Eine Übersicht über die bis 2005 durchgeführten Studien gibt Referenz [6]. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse aus unzähligen *in vitro* Untersuchungen zur Kombination von Substraten und Inhibitoren hat bisher kein ABCB1-Inhibitor die Zulassung als Arzneimittel erhalten.

So gibt es auch nach vielen Jahren der Forschung an ABCB1 noch immer Fragen, die bisher offen geblieben sind. Obwohl bereits eine Kristallstruktur von Abcb1a aus der Maus veröffentlicht wurde, ist noch ungeklärt, warum das Protein eine so breite Substraterkennung besitzt und wie diese exakt funktioniert. Auch zum genauen Transportmechanismus und zum Zusammenspiel der verschiedenen Bindungsstellen konnten bisher nur Vermutungen angestellt werden, ein Beweis steht zum jetzigen Zeitpunkt noch aus.

1.3 ABCG2

ABCG2, auch bekannt unter den Namen Breast cancer resistance protein (BCRP), Placental ABC protein (ABCP) oder Mitoxantrone resistance protein (MXR) ist der neueste in der Literatur beschriebene MDR Transporter. Entdeckt wurde das Transportprotein in der humanen, gegenüber Mitoxantron resistenten Brustkrebszelllinie MCF-7/AdrVp, in welcher keine Überexpression von ABCB1 oder Transportern der ABCC-Subfamilie (MRPs) nachgewiesen werden konnte [47, 48]. Kurz danach wurde ABCG2 auch in anderen resistenten Zelllinien solider Tumoren und in Plazentagewebe nachgewiesen [49–52].

Physiologisch wird ABCG2, ähnlich wie ABCB1, in unterschiedlichen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert, die eine pharmakologisch relevante Barrierefunktion besitzen. Dazu gehören zum Beispiel Plazenta, Leber, Dünndarm und Kolon [51, 53]. Die physiologische Funktion des Proteins ist jedoch bis heute noch nicht vollständig geklärt [54].

ABCG2 ist aus 655 Aminosäuren zusammengesetzt, hat in glykosyliertem Zustand ein Molekulargewicht von 72 kDa und besteht aus einer N-terminalen Nukleotid-Bindungsdomäne

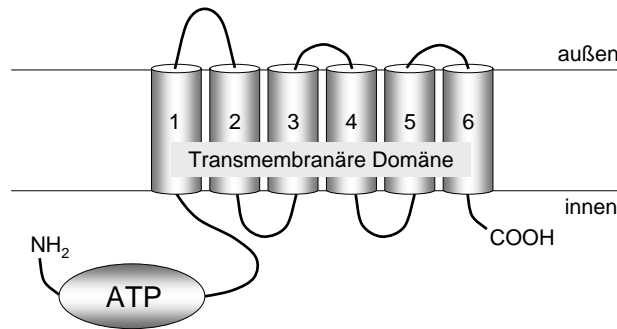


Abb. 1.4: Topologiemodell von ABCG2.

und einer C-terminalen transmembranären Region mit sechs α -Helices (Abbildung 1.4) [55]. Der Transporter weist somit im Vergleich zu ABCB1 eine umgekehrte Anordnung der Domänen auf. Eine weitere Besonderheit ist, dass hier nur jeweils eine NBD und eine TMD vorliegen, aus diesem Grund wird ABCG2 als Halbtransporter bezeichnet. Da jedoch für den Transport eines Substrates laut Literatur zwei ATP-Bindungsdomänen benötigt werden [37–40], wird ein Dimer als die kleinste funktionelle Einheit angenommen [56–58]. Die beiden Monomere sind wahrscheinlich über eine intermolekulare Disulfidbrücke verbunden, welche sich zwischen jeweils einem Cystein des dritten extrazellulären Loops ausbildet [59–62]. Es wurden Studien durchgeführt, bei denen alle Cysteine dieses Loops durch andere Aminosäuren ausgetauscht wurden [58, 59, 62]. Auf diese Weise konnten sich keine Disulfidbrücken und folglich auch kein kovalent verbundenes Dimer ausbilden. Trotzdem war mutiertes ABCG2 korrekt in der Zellmembran exprimiert und wies auch Transport- und ATPase Aktivität auf. Es konnte also gezeigt werden, dass die beide Monomere verbindende Disulfidbrücke nicht essentiell für die Funktionalität von ABCG2 ist. Neben einem Dimer werden auch höher organisierte Oligomere wie zum Beispiel ein Tetramer oder ein Tetramer aus Dimeren postuliert [63, 64].

Ein weiteres strukturelles Merkmal von ABCG2 ist die N-Glykosylierung an Position 596. Die Glykosylierung des Protein scheint jedoch nicht essentiell für dessen Funktionsfähigkeit zu sein, da in Mutationsstudien bezüglich der Lokalisation in der Zellmembran oder der ATPase Aktivität keine Unterschiede zwischen mutiertem und Wildtyp-ABCG2 auftraten [65–67].

ABCG2 ist in der Lage, viele strukturell verschiedene Zytostatika aus Zellen heraus zu transportieren. Dazu gehören neben Mitoxantron mehrere Camptothecine (Topotecan, Irinotecan, SN-38) und Methotrexat. Auch Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Imatinib werden erkannt. Daneben werden ebenfalls Vertreter weiterer Arzneistoffklassen wie HIV-Therapeutika (Lamivudin, Zidovudin), Antibiotika und andere Verbindungen wie die Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33342, Pheophorbid A und BODIPY-Prazosin aus ABCG2-exprimierenden Zellen

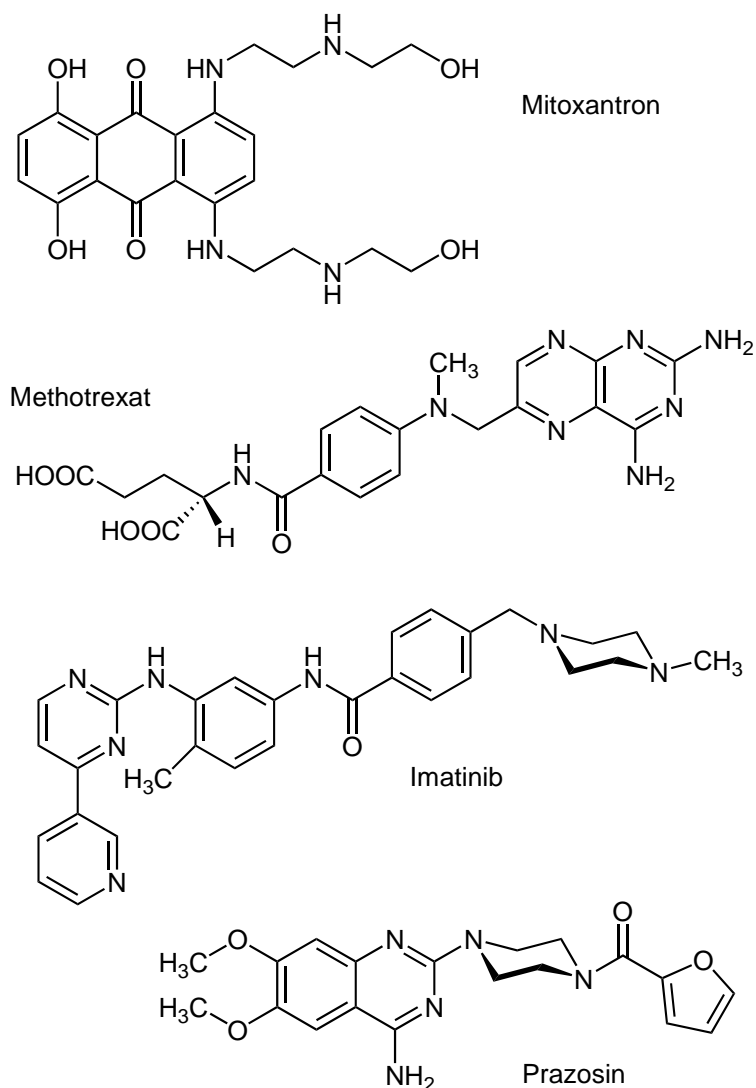


Abb. 1.5: Ausgewählte Substrate von ABCG2.

herausgeschleust. Es zeigt sich also eine deutliche Überlappung mit der Substratspezifität von ABCB1 und wiederum eine sehr große strukturelle Diversität der transportierten Verbindungen. Einige Vertreter der ABCG2-Substrate sind in Abbildung 1.5 dargestellt.

Interessanterweise erweitert eine Mutation von Arginin an Position 482 das Spektrum der transportierten Substrate deutlich [68–70]. Liegen diese Genvarianten (R482T bzw. R482G) im Protein vor, so werden auch Rhodamin 123, Doxorubicin und Daunorubicin transportiert. Dabei bleibt die Erkennung anderer Substrate wie zum Beispiel Hoechst 33342 oder Pheophorbid A unbeeinflusst, Methotrexat wird nun jedoch nicht mehr transportiert. Die Position von Arginin 482 soll laut Vorhersage am Anfang des dritten transmembranären Segments oder am Übergang zwischen Zytoplasma und Membran liegen, so dass eine Interferenz mit

dem Substrattransport wahrscheinlich ist [70, 71]. Jedoch wurden diese Mutationen bisher nur in mit verschiedenen Zytostatika selektierten resistenten Zelllinien beobachtet, in der Klinik sind sie bisher nicht dokumentiert worden [54].

Zu den bekanntesten Inhibitoren, welche jedoch auch mit ABCB1 interagieren, gehören Cyclosporin A [72], Tariquidar (XR9576) [73] und Elacridar (GF120918) [74]. Aus *Aspergillus fumigatus* konnte die Verbindung Fumitremorgin C (FTC) isoliert werden, die eine sehr gute und auch selektive Inhibition von ABCG2 aufweist [75]. Das FTC-Analogon Ko143 ist in der Lage, das Protein ebenfalls selektiv und bereits in nanomolaren Konzentrationen vollständig zu hemmen [76]. Eine weitere Strukturklasse der ABCG2-Inhibitoren sind Flavonoide, von denen zum Beispiel 6-Prenylchrysin als sehr potente Verbindung identifiziert werden konnte [77].

Die möglichen Bindungsstellen in der Proteinstruktur von ABCG2 sind im Fokus aktueller Forschung, bisher wurden jedoch erst wenige Studien zu diesem Thema veröffentlicht. Clark *et al.* untersuchten die ABCG2-Isoform R482G und postulierten die Existenz von drei Bindungsstellen [71]. Daneben wurden unterschiedliche Regionen für die Bindung von Nukleosiden und Prazosin vermutet [78]. Matsson und Mitarbeiter schlugen dagegen eine große Bindungstasche vor, in der mehrere Moleküle gleichzeitig an verschiedenen Stellen binden könnten [79]. Die Hypothese, dass mehrere Bindungsstellen vorhanden sind, wird durch weitere Publikationen unterstützt [80, 81]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von zweidimensionalen Kristallen ergaben, dass sich die Konformation der transmembranären Domänen in An- und Abwesenheit des Substrates Mitoxantron unterschied [82].

Eine Studie mit Abcg2-Knock-out Mäusen zeigte, dass diese Mäuse sehr sensitiv gegenüber dem ABCG2-Substrat Pheophorbid A waren [83]. Nach Gabe dieser Substanz kam es durch verminderte Exkretion der Substanz bei Exposition mit Licht zu schweren bzw. teilweise tödlichen Hautläsionen. Folglich spielt das Transportprotein in der Exkretion von Pheophorbid A eine entscheidende Rolle. Aufgrund der Expression von ABCG2 in Geweben mit Barrierefunktion liegt insgesamt die Vermutung nahe, dass auch dieser Transporter einen Einfluss auf Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion von Arzneistoffen besitzt. Bisher gibt es jedoch nur wenige Studien, die diese Fragestellung untersucht haben [54].

Die klinische Relevanz von ABCG2 für das Auftreten einer Resistenz von Tumoren ist aktueller Gegenstand der Forschung, da viele Zytostatika in Tumorzellkulturen als Substrate des Proteins identifiziert werden konnten. Bisher konnte jedoch noch kein gesicherter Zusammenhang zwischen der Expression von ABCG2 und einem Therapieversagen nachgewiesen werden.

Der ABC-Transporter wird ebenfalls stark in sogenannten Tumor-Stammzellen exprimiert, welche als Unterpopulation in Tumoren existieren könnten [84–87]. Die Rolle dieser Stammzellen ist noch ungeklärt. Jedoch wurde von Wu *et al.* die interessante Hypothese aufgestellt [85], dass oftmals ein Rezidiv eines Tumors auftritt, obwohl zuvor scheinbar alle Tumorzellen durch eine Chemotherapie zerstört worden waren. Tumor-Stammzellen sollen laut dieser Hypothese für den Krankheitsrückfall verantwortlich sein, da diese eine Resistenz gegenüber bestimmten Zytostatika aufweisen. Wu und Mitarbeiter schlagen eine Beteiligung von ABCG2 an dieser Resistenz durch den Efflux der Zytostatika vor. In einer anderen Veröffentlichung wird vermutet, dass die Hoch- bzw. Herunterregulierung der Expression von ABCG2 in Tumor-Stammzellen das Proliferationsverhalten eines Tumors beeinflusst [86].

Die bisher publizierten Studien zum ABC-Transporter ABCG2 lassen etliche Fragen offen. Wichtig wäre zum Beispiel zu klären, in welchem Oligomerisationsstatus das Protein in humanen Zellen vorliegt. Ausgehend von dieser Information könnte dann die Lokalisation und Anzahl der Bindungsstellen und der Mechanismus des Substrattransports untersucht werden. Auch die physiologische Funktion von ABCG2 ist noch nicht vollständig erforscht. Obwohl diverse Berichte zum Efflux von Zytostatika und anderen Wirkstoffen *in vitro* auf eine klinische Relevanz des Transportproteins in verschiedenen Bereichen hinweisen, konnte diese *in vivo* bisher nicht belegt werden.

1.4 Aufreinigung von ABC-Proteinen

Wie in den vorherigen Abschnitten dargelegt gibt es immer noch viele ungeklärte Fragen zum Mechanismus des Substrattransportes und vor allem zur Polyspezifität der beiden ABC-Transporter ABCB1 und ABCG2. Grundlegende mechanistische Untersuchungen sind also interessant, um diese beiden Transporter und ihre Funktion besser zu verstehen. Gesicherte Informationen zu Anzahl und Eigenschaften der Bindungsstellen für Substrate sind beispielsweise wichtig für die Entwicklung neuer Zytostatika, die keine Substrate der ABC-Transporter darstellen sollen. Auch das Design potenter und hochaffiner Inhibitoren kann durch Erkenntnisse in diesem Bereich vereinfacht werden. Daneben kann mit Hilfe derartiger Daten allgemein die Auswahl geeigneter Kandidaten für die Weiterentwicklung von Wirkstoffen effektiver gestaltet werden. Da ABCB1 und ABCG2 die Pharmakokinetik von Arzneistoffen beeinflussen, sollten neue Wirkstoff-Kandidaten nicht mit diesen Proteinen interagieren. So könnte zukünftig das Risiko einer pharmakologischen Interaktion bei der gleichzeitigen Gabe verschiedener Arzneistoffe verringert und die Therapiesicherheit erhöht werden.

Neben verschiedenen funktionellen Assays zur Charakterisierung von ABC-Transportern tragen auch Untersuchungen an aufgereinigtem Protein zur Beantwortung der genannten Fragestellungen bei. Reines Protein ist zum Beispiel nötig, um humanes ABCB1 oder ABCG2 zu kristallisieren und auf diese Weise tiefere Einblicke in die Struktur der beiden Proteine zu erhalten [88–90]. Eine Struktur mit sehr hoher Auflösung, vor allem der transmembranären Bereiche, könnte Fragen zu exakten strukturellen Gegebenheiten an den Substrat-Bindungsstellen beantworten. Diese Untersuchungen könnten eine Erklärung für die große chemische Vielfalt der erkannten Verbindungen liefern. Zur Identifizierung der Bindungsstellen können auch Photolabeling-Studien beitragen, die für ein aussagekräftiges Ergebnis an aufgereinigtem Protein durchgeführt werden sollten. Untersuchungen der ATPase Aktivität von reinem Protein können als Surrogatparameter Aufschluss über die verschiedenen konformativen und chemischen Prozesse geben, welche an den Substrattransport gekoppelt sind [91–93].

Auch zur Aufklärung und Differenzierung zwischen den verschiedenen Modellen des Substrattransportes kann aufgereinigtes Protein dienen. Der wichtigste Vorteil der Verwendung von zellulären Assays ist, dass der Transporter hier definitiv in seiner nativen Konformation vorliegt. Da bei Verwendung lebender Zellen jedoch ein sehr komplexes System untersucht wird, kann für bestimmte Fragestellungen eher eine vollständige Kontrolle der experimentellen Bedingungen nötig sein [36, 91]. Dies ist beispielsweise für die mechanistische Aufklärung des Zusammenhangs zwischen ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse, Substratbindung und Transport interessant [90].

Für Untersuchungen dieser Art werden große Mengen reines und vor allem funktionales Protein benötigt, die technisch effektiv und kostengünstig nur aus Membranmaterial mit einer ausreichend hohen Expression gewonnen werden können. Da endogene Expressionslevel in humanen Geweben relativ niedrig sind, können dazu nur überexprimierende Zelllinien oder heterologe Expressionssysteme sinnvoll eingesetzt werden.

1.5 Heterologe Expressionssysteme für ABC-Transporter

Obwohl viele ABCB1 oder ABCG2 überexprimierende Tumorzelllinien etabliert wurden, sind Membranpräparationen dieser Zellen für eine Aufreinigung ungeeignet. Vor allem wären die Kosten für die Kultivierung großer Mengen an Biomasse sehr hoch, daneben ist es nicht möglich, Mutationen in das Protein einzuführen [94]. Mutationsstudien wären jedoch zum Beispiel für die Bestimmung der Bindungsareale von verschiedenen Substraten sehr wichtig.

In der Vergangenheit wurden diverse heterologe Expressionssysteme für ABCB1 entwickelt. Dazu gehörten transient transfizierte HEK 293 Zellen [95] und vor allem Ovarzellen chinesischer Hamster (CHO Zellen) [88, 96–99]. Außerdem konnte das Protein erfolgreich in den Hefen *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) [100, 101] und *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) [89, 102–104] sowie in den Insektenzelllinien aus *Spodoptera frugiperda* (Sf9, expressSF⁺) [105–108] und aus *Trichoplusia ni* (BTI-Tn-5B1-4 = High Five) exprimiert werden [109]. Hohe Expressionsraten und eine sehr gute Ausbeute der Aufreinigungsprozedur wurden vor allem für den *S. cerevisiae* Stamm BJ5457, aber auch für die CHO Zelllinie CR1R12 und für die Insektenzelllinie expressSF⁺ berichtet [97, 103, 108].

Für ABCG2 wurden ebenfalls verschiedene heterologe Systeme zur Expression etabliert. Wie bereits für ABCB1 beschrieben wurden transient transfizierte HEK 293 Zellen eingesetzt [110], daneben aber auch Oozyten von *Xenopus laevis* [111], das prokaryotische System *Lactococcus lactis* [112, 113] und die Insektenzelllinie Sf9 [67, 71, 114–118]. Für in diesen Systemen exprimiertes Protein wurde aber bisher keine Aufreinigung berichtet. Aus der Hefe *Pichia pastoris* [65, 82] und aus der Insektenzelllinie High Five [64, 119, 120] konnte ABCG2 jedoch nach erfolgreicher Expression auch aufgereinigt werden.

Hauptsächlich wurden also verschiedene Hefestämme oder Insektenzellen als Expressionssysteme für ABCB1 und ABCG2 genutzt, da diese eine ausreichend hohe Expression der jeweiligen Proteine aufweisen. Im Folgenden sollen Vor- und Nachteile beider Systeme kurz dargestellt werden.

Hefen als Expressionssystem

Ein Vorteil der Verwendung von Hefen ist vor allem die einfache Kultivierung, auch eine Massenproduktion in großen Kulturvolumina ist im Gegensatz zu humanen Tumorzelllinien ohne Probleme und kostengünstig möglich. Weitere Vorteile gegenüber überexprimierenden Zelllinien sind, dass eine gezielte Mutagenese einzelner Proteinsegmente und zusätzlich

Studien von inaktiven Mutanten durchgeführt werden können. Die Expression von ABCB1 oder ABCG2 ist hier im Unterschied zu *Escherichia coli* (*E. coli*) problemlos möglich, da große Membranproteine für Hefen weniger toxisch sind. Die eukaryotische Biogenese und der Transport in die Zellmembran sind weitere Vorteile der Verwendung von Hefen als Expressionssystem humaner Proteine. Die Expressionsrate hängt vom verwendeten Plasmid ab und muss empirisch ermittelt werden, es können jedoch relativ hohe Level erreicht werden [89, 90, 94, 121].

Nachteilig ist, dass nicht alle benötigten posttranslationalen Modifikationen, wie zum Beispiel eine N-Glykosylierung, von Hefen korrekt durchgeführt werden können. Daneben besitzen Hefezellen im Unterschied zu humanen Zellen eine Zellwand, die die funktionelle Charakterisierung von Transportproteinen wie ABCB1 oder ABCG2 in lebenden Zellen erschwert. Auch werden in der Zellmembran verschiedene endogene ATPasen exprimiert, welche die Ergebnisse einer Bestimmung der Funktionalität der beiden ABC-Proteine im Stadium der Membranpräparation verfälschen können [121]. Eine sicherer Nachweis der funktionalen Expression der Transporter ist somit erst nach Aufreinigung möglich.

Die beiden Hefen *P. pastoris* und *S. cerevisiae* können zur Expression und anschließender Aufreinigung von ABC-Transportern eingesetzt werden. Ein Vorteil von *P. pastoris* ist, dass hier eine etwa 10 % höhere Expressionsrate erreicht werden kann als in *S. cerevisiae* [90]. Da jedoch nur ca. 10 % der Klone von *P. pastoris* das gewünschte Protein exprimieren, muss ein aufwändiges Screening durchgeführt werden. Auch ist die Expressionsrate der positiven Klone sehr inhomogen. Daneben ist die Expression in diesem System, bei dem das Zielgen in das Genom integriert wird, zeitaufwändiger als im Plasmid-basierten System von *S. cerevisiae* [65, 82, 94].

Insektenzellen als Expressionssystem

Die beiden Zelllinien Sf9 und High Five entstammen den Ovarzellen der Larven bestimmter Eulenfalter-Arten (*Spodoptera frugiperda* bzw. *Trichoplusia ni*) und wurden aus parental Zellen jeweils als solche Klone selektiert, die eine besonders hohe Expression des Zielproteins aufwiesen. Sf9 Zellen sind ein isolierter Klon der Zelllinie Sf21, High Five Zellen (BTI-Tn-5B1-4) entstammen aus einem einzelnen Klon der Zelllinie BTI-Tn-5B1-28.

Die oben beschriebenen Insektenzellen weisen nach Infektion mit Baculoviren, welche die DNA des Zielproteins enthalten, sehr hohe Expressionslevel auf. Dadurch ist in Membranpräparationen dieser Zellen, die als Startmaterial für einen Aufreinigungsprozess dienen, der benötigte hohe Proteingehalt vorhanden. Wie auch in Hefen ist hier die Expression

großer membranständiger Proteine möglich, ohne dass toxische Effekte auftreten. Diese Zellen können viele der posttranslationalen Modifikationen durchführen, welche für die korrekte Expression eukaryotischer Proteine wichtig sind. Einige posttranslationale Zuckerverknüpfungen wie zum Beispiel die N-Glykosylierung sind jedoch abweichend von Säugerzellen. Die erzielte Biomasse kann durch Umstellung von adhärenter Kultivierung auf Suspensionskultur erhöht werden. Außerdem ist eine unkomplizierte biochemische Charakterisierung des Zielproteins möglich. Vorteilhaft für die Expression der ABC-Transporter ABCB1 und ABCG2 ist zum Beispiel, dass hier deutlich weniger endogene ATPasen in der Zellmembran vorliegen und somit eine Bestimmung der funktionellen Expression bereits in der Membranpräparation möglich ist [89, 90, 122].

Der vornehmliche Nachteil der Verwendung von Insektenzellen gegenüber Hefen sind die erheblich höheren Kosten für die Kultivierung, da hier das sehr komplexe Nährmedium nicht selbst hergestellt werden kann. Auch wachsen Insektenzellen langsamer als Hefen. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Untersuchung von Mutationen des Zielproteins schwierig und zeitaufwändig ist. Für jede Mutante müsste ein neues Virus hergestellt und aufkonzentriert werden, um einen ausreichend hohen Titer der Viruslösung zu erhalten [89, 90, 122]. Daneben weisen Insektenzellmembranen einen im Vergleich zu humanen Zellen erniedrigten Cholesterolgehalt auf. Dies könnte nachteilig für die Bestimmung der Aktivität von exprimiertem ABCG2 sein, da dieses Protein die Gegenwart von Cholesteroll für seine Funktionalität benötigt. Dies könnte jedoch durch Zusatz von Cholesteroll zur Membranpräparation oder zur Rekonstitutionsumgebung von aufgereinigtem Protein wieder ausgeglichen werden [115, 116, 123].

Insgesamt sind also sowohl Hefen als auch Insektenzellen vielversprechende Expressionssysteme für ABC-Transporter. Wie sehr die jeweiligen Vor- und Nachteile bei der Expression von ABCB1 oder ABCG2 zum Tragen kommen, kann mit letzter Sicherheit nur empirisch festgestellt werden.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die ABC-Transporter ABCB1 und ABCG2 beeinflussen aufgrund ihrer ubiquitären Expression in physiologischen Barrieren und ihrer breiten Substraterkennung die Absorption, Distribution, Metabolisierung und Exkretion (ADME) vieler Arzneistoffe. Zusätzlich sind sie am Phänomen der klassischen Multidrug Resistenz von Tumorzellen beteiligt. Obwohl diese Transportproteine seit langem im Fokus intensiver Forschung stehen, sind wichtige Fragen noch immer ungeklärt. Vor allem die Mechanismen der Polyspezifität und des Substrattransportes sind in diesem Zusammenhang zu nennen. Untersuchungen im Hinblick auf diese Fragestellungen können dazu beitragen, grundlegende Erkenntnisse über ABCB1 und ABCG2 zu erlangen. Diese Erkenntnisse können zukünftig dazu beitragen, zum Beispiel Arzneistoffinteraktionen zu vermeiden oder die Weiterentwicklung von Wirkstoffkandidaten effektiver zu gestalten.

Zur Charakterisierung von ABCB1 und ABCG2 dienen neben verschiedenen funktionellen Assays auch Untersuchungen an aufgereinigtem Protein. Der große Vorteil gegenüber zellbasierten Systemen ist, dass Interaktionen mit dem isolierten Protein in einer genau definierten Umgebung betrachtet werden. Dies bedeutet, dass die Versuchsparameter im Hinblick auf eventuelle Störeinflüsse anderer Proteine vollständig kontrolliert werden können. Um derartige Untersuchungen durchführen zu können, müssen große Mengen an reinem und funktionellem Protein zur Verfügung stehen. Zu dessen Gewinnung können vor allem heterologe Expressionssysteme dienen.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei größere Bereiche. Zunächst liegt der Fokus auf einem heterologen Expressionssystem für ABCB1, aus welchem das Protein in reiner und funktioneller Form gewonnen werden kann. Im Weiteren werden zwei unterschiedliche Expressionssysteme für ABCG2 und Arbeiten zur Aufreinigung des Transporters vorgestellt.

Der *Saccharomyces cerevisiae* Stamm BJ5457 wurde bereits zuvor im Arbeitskreis als Expressionssystem für ABCB1 verwendet, jedoch konnten nur geringe bzw. stark schwankende Expressionsraten erreicht werden. Dieses System sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit so optimiert werden, dass es für die routinemäßige Anwendung eingesetzt werden kann. Dabei war das vordergründige Ziel eine Steigerung der Expression von ABCB1. Des Weiteren

wurden verschiedene Parameter des Aufreinigungsprozesses variiert, um die Ausbeute an reinem und rekonstituiertem ABCB1 zu erhöhen. Das aufgereinigte Protein sollte anschließend verwendet werden, um den Mechanismus der Aktivierung des Substrattransportes durch verschiedene neuartige Verbindungen zu untersuchen.

Zu Beginn der Arbeiten war für ABCG2 noch kein System beschrieben, aus welchem das Transportprotein aufgereinigt werden konnte. Ziel war es, ein Expressionssystem in *Saccharomyces cerevisiae* zu etablieren, aus welchem das Protein möglichst rein und funktionell gewonnen werden kann. Dazu sollten die für das Expressionssystem von ABCB1 gewonnenen Erkenntnisse auf ABCG2 übertragen werden. Darüber hinaus bildeten Techniken zur Etablierung und Optimierung der Proteinaufreinigung einen weiteren wichtigen Schwerpunkt.

Alternativ zu *Saccharomyces cerevisiae* sollte die Verwendung von Insektenzellen als heterologes Expressionssystem für ABCG2 evaluiert werden. Die beiden zur Verfügung stehenden Zelllinien High Five und Sf9 wurden dazu im Bezug auf Expressionslevel und Aktivität des exprimierten Proteins verglichen. Nach Auswahl einer geeigneten Zelllinie sollten deren Membranpräparationen zur Aufreinigung von ABCG2 genutzt und erste Schritte zur Optimierung des Prozesses durchgeführt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeine und molekularbiologische Methoden

3.1.1 Herstellung von Pufferlösungen

Der pH-Wert wässriger Pufferlösungen wurde stets auf die gleiche Weise eingestellt. Zunächst wurden die festen Bestandteile in der Hälfte des Zielvolumens gelöst und gegebenenfalls flüssige Zusätze zugesetzt. Dann wurde die Lösung auf etwa 90 % des Zielvolumens aufgefüllt. Vor der Messung des pH-Wertes wurde das pH-Meter mit Standardpuffern im Zweipunktverfahren kalibriert. Sollte der pH-Wert bei einer von der Raumtemperatur (RT) abweichenden Temperatur eingestellt werden, wurden sowohl die Standardpuffer als auch die zu vermessende Lösung zuvor entsprechend temperiert. Zur Messung des pH-Wertes wurde eine Kalomel-Elektrode eingesetzt, die mit der zumeist verwendeten Puffersubstanz Tris kompatibel ist. Nach Justierung des pH-Wertes mit dem jeweils angegebenen Reagenz wurde das Volumen der Pufferlösung schließlich in einem Messkolben auf 100 % ergänzt.

Für die in den folgenden Kapiteln beschriebenen wässrigen Lösungen und Puffer wurde stets destilliertes Wasser verwendet, sofern nichts anderes angegeben ist. Dies gilt auch für die Methoden, bei denen in irgendeiner Form der Einsatz von Wasser beschrieben wird. Destilliertes Wasser wurde mit Hilfe der Wasseraufbereitungsanlage Elix der Firma Millipore gewonnen. Zur Wassergewinnung kombiniert diese Anlage Umkehrosmose und Elektro-Entionisierung. Dieses Wasser erfüllt die Anforderungen für Aqua purificata.

Die Tabellen, in denen die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer beschrieben wird, enthalten jeweils in der rechten Spalte die finale Konzentration der genannten Zusätze.

3.1.2 Vermehrung eines Plasmids mit Hilfe von *E. coli*

Zur Vermehrung eines Plasmids wurden kompetente *E. coli* Zellen (One Shot TOPF' competent *E. coli*, Invitrogen) mit dem gewünschten Plasmid mittels Hitzeschock-Technik transformiert und positive Klone mit Hilfe des Antibiotikums Ampicillin auf Agar-Platten selektiert. Zur Gewinnung einer ausreichenden Menge an Zellen wurde eine große Schüttelkultur der transformierten Bakterien angelegt. Aus diesen Zellen wurde schließlich die Plasmid-DNA isoliert. Die Zusammensetzung der Medien und Lösungen für diese Methode ist in Tabelle 3.1 beschrieben.

Herstellung von LB-Medium und LB-Agar

Für das Lysogeny broth-Medium (LB-Medium) wurden Trypton, Yeast Extract und Natriumchlorid in Wasser gelöst. Die Lösung wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 50–55 °C die Ampicillin-Stammlösung zugegeben. Das fertige Medium wurde bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Zur Herstellung von LB-Agar wurden vor dem Autoklavieren der Lösung zusätzlich 1,5 % Agar-Agar zugegeben. Nach dem Autoklaviervorgang wurde die Flüssigkeit auf ca. 55 °C abgekühlt. Jetzt wurde Ampicillin-Stammlösung zugegeben, zum Mischen mehrfach geschwenkt und dann zügig in Petrischalen ausgegossen. Die Oberfläche wurde kurz mit der Bunsenbrennerflamme behandelt, um Luftblasen zu entfernen. Nach dem Abkühlen wurden die Agar-Platten mit Parafilm versiegelt und im Kühlschrank gelagert.

Um die Glycerol-Lösung 60 % herzustellen wurden die Bestandteile eingewogen, gemischt und anschließend autoklaviert.

Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli* Zellen wurden für 1 h auf Eis aufgetaut. Für die Transformation wurden 100 µl Zellsuspension mit 1,5–3 µg Plasmid versetzt, vorsichtig verrührt, für 30 min auf Eis und dann für den Hitzeschock genau 45 s im vorgewärmten Wasserbad bei 42 °C inkubiert. Nach einer zweiminütigen Ruhephase auf Eis wurden 500 µl vorgewärmtes LB-Medium ohne Ampicillin zu den Zellen gegeben und für 1 h auf dem Schüttler bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Anschließend wurden verschiedene Volumina der getrübbten Zellsuspension auf vorgewärmten Ampicillin-haltigen Agarplatten (100 µg/ml) ausgestrichen und für 16–18 h bei 37 °C gelagert, bis Kolonien gewachsen waren.

***E. coli* Schüttelkultur**

Von den über Nacht inkubierten Agar-Platten wurden einzeln liegende Kolonien mit einer Einmal-Impföse gepickt und für etwa 8 h bei 37 °C und 200 rpm in jeweils 10 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) geschüttelt, bis eine Trübung feststellbar war. Der Klon, der die stärkste Trübung aufwies, wurde in 100 ml frisches Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt und erneut für etwa 16 h über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert.

Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem „Midi-Prep Kit“ von Invitrogen. Zum Ernten der Zellen wurden 25 ml der Übernacht-Schüttelkultur mit 4.000 × g für 10 min bei RT zentrifugiert. Ein Teil der restlichen Zellsuspension wurde zur Herstellung von einigen Backups verwendet. Dazu wurden jeweils 900 µl Zellsuspension mit 300 µl Glycerol-Lösung 60 % versetzt und bei –80 °C eingefroren. Nach Ende der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 4 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen. Um die *E. coli* Zellen zu lysieren, wurde die Suspension mit 4 ml Lysispuffer versetzt, vorsichtig gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 4 ml Präzipitationspuffer zugesetzt, wieder vorsichtig gemischt und anschließend für 10 min mit 15.000 × g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde auf die zuvor äquilibrierte Midi-Säule gegeben.

Nach Durchfluss der Flüssigkeit wurde die Säule mit 20 ml Waschpuffer gewaschen. Durch Zugabe von 5 ml Elutionspuffer wurde die Plasmid-DNA von der Säule eluiert und nach Zusatz von 3,5 ml Isopropanol bei 18.000 × g für 30 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet mit Ethanol 70 % gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min unter den zuvor genannten Bedingungen wurde der Überstand entfernt, das Pellet für 10 min bei RT getrocknet und abschließend in etwa 200 µl Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer, im Kit enthalten) gelöst. Zur Kontrolle der erfolgreichen Präparation des Plasmids wurden der DNA-Gehalt und die Reinheit photometrisch untersucht. Dazu wurde die Absorption der Probe bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) bestimmt. Der Quotient aus diesen Absorptionswerten diente der Beurteilung der Reinheit des extrahierten Plasmids und sollte einen Wert von mindestens 1,8 aufweisen. Verunreinigungen durch Proteine würden diesen Wert verringern.

Tab. 3.1: Medien und Lösungen für die Transformation von *E. coli*.

Ampicillin-Stammlösung		
100 mg	Ampicillin Natrium	100 mg/ml
ad 1 ml	Wasser	
Ampicillin-haltiges LB-Medium		
5,0 g	Trypton	1,0 % (m/V)
2,5 g	Yeast Extract	0,5 % (m/V)
5,0 g	Natriumchlorid	1,0 % (m/V)
500 µl	Ampicillin-Stammlösung	100 µg/ml
ad 500 ml	Wasser	
Ampicillinhaltiger LB-Agar		
5,0 g	Trypton	1,0 % (m/V)
2,5 g	Yeast Extract	0,5 % (m/V)
5,0 g	Natriumchlorid	1,0 % (m/V)
500 µl	Ampicillin-Stammlösung	100 µg/ml
7,5 g	Agar-Agar	1,5 % (m/V)
ad 500 ml	Wasser	
Sterile Glycerol-Lösung 60 %		
76,1 g	Glycerol 100 %	60,0 % (m/V)
39,7 g	Wasser	

3.1.3 Proteinbestimmung mittels Amido Black Assay

Um die Gesamtmenge an Protein in verschiedenen Proben zu ermitteln, wurde der Amido Black Assay verwendet. Er basiert auf einer Methode von Kaplan *et al.* [124], die speziell dazu entwickelt wurde, um mit großer Genauigkeit geringe Mengen an Protein in Gegenwart größerer Mengen an Lipiden, Salzen, Pufferlösungen und nicht-ionischen Detergenzien zu bestimmen. Im ersten Schritt werden die mit Trichloressigsäure (TCA) ausgefällten Proteine auf einer PVDF-Membran fixiert und mit dem Farbstoff Amidoschwarz 10B angefärbt. Im zweiten Schritt wird die adsorbierte Farbstoffmenge von der Membran eluiert und deren Absorption photometrisch (630 nm) ermittelt. Da die Farbstoffmenge mit der Proteinmenge korreliert, kann über eine Kalibriergerade anschließend die Proteinkonzentration bestimmt werden.

Durchführung

Die zur Durchführung des Amido Black Assays benötigten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 3.2 zusammengestellt. Zusätzlich wurde die EDTA-Na Lösung 200 mM aus Kapitel

Tab. 3.2: Puffer und Lösungen für den Amido Black Assay.

Tris-SDS-Lösung		pH 7,5 bei RT
12,1 g	Tris	1,00 mol/l
2,0 g	Natriumdodecylsulfat (SDS)	2,0 % (m/V)
ad 100 ml	Wasser	
TCA-Lösung 100 %		
100 g	Trichloressigsäure (TCA)	100 % (m/V)
ad 100 ml	Wasser	
TCA-Lösung 6 %		
6 ml	TCA-Lösung 100 %	6 % (V/V)
ad 100 ml	Wasser	
Amido Black Färbelösung		
1,25 g	Amidoschwarz 10B	0,25 % (m/V)
50 ml	Eisessig	10 % (V/V)
25 ml	Methanol	45 % (V/V)
ad 500 ml	Wasser	
Entfärbelösung		
10 ml	Eisessig	2 % (V/V)
450 ml	Methanol	90 % (V/V)
ad 500 ml	Wasser	
Elutionslösung		
125 µl	EDTA-Na Lösung 200 mM pH 8,0	0,05 mmol/l
0,5 g	Natriumhydroxid	25 mmol/l
ad 500 ml	Ethanol 50 % (V/V)	

3.2.9 verwendet. Die beiden TCA-Lösungen wurden im Kühlschrank gelagert, alle anderen Lösungen waren bei RT stabil. Von den zu untersuchenden Proben wurde jeweils ein Volumen vorgelegt, das etwa 5–10 µg Protein enthielt. Aus einer BSA-Stammlösung wurden Proben für die Kalibriergerade hergestellt, die einen Proteingehalt zwischen 0 und 15 µg aufwiesen. Alle Proben wurden mit Wasser auf 225 µl aufgefüllt, zur Solubilisierung der Proteine mit 30 µl Tris-SDS-Lösung versetzt und gemischt. Dann wurden 50 µl 4 °C kalte TCA-Lösung 100 % hinzugefügt, erneut gemischt und für 2 min bei RT inkubiert.

Währenddessen wurde die PVDF-Membran für 20 s mit Methanol benetzt und dann in Wasser für 2 min äquilibriert. Ein Stück Filterpapier gleicher Größe wurde ebenfalls mit Wasser befeuchtet und in den Vakuumblock gelegt. Die Membran wurde exakt darauf platziert, dann wurde der Vakuumblock zusammengebaut und ein Unterdruck von 600 mbar angelegt. Nun wurden die Proben in die Vertiefungen des Blocks pipettiert. Die Probengefäße und die verwendeten Vertiefungen wurden nacheinander jeweils mit 180 µl TCA-Lösung 6 %

gespült, um eine möglichst vollständige Fixierung aller Proteine zu gewährleisten. Anschließend wurde die Membran aus dem Vakuumblock entnommen und unter Schwenken auf dem Horizontalschüttler für 20 min bei RT in Amido Black Färbelösung inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Membran zunächst für 1 min mit Wasser gespült. Die Hintergrundfärbung der Membran wurde anschließend durch dreimaliges Spülen mit Entfärbelösung für je 3 min entfernt. Um überschüssige Entfärbelösung zu entfernen wurde noch einmal für 3 min mit Wasser gespült. Danach wurde die Membran bei RT getrocknet und die einzelnen Proteinproben durch Ausstanzen aus der Membran in Glasröhrchen überführt. Unter regelmäßigem Vortexen wurde der Farbstoff mit Hilfe von je 1 ml Elutionslösung in 15 min eluiert. Bei 630 nm wurde schließlich die Absorption der Proben photometrisch gemessen und mit Hilfe der Kalibriergeraden die Konzentration der Proben bestimmt.

3.1.4 SDS-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurde die diskontinuierliche, eindimensionale Methode nach Lämmli *et al.* angewandt [125]. Vor dem Auftragen auf das Gel werden durch Zusatz von DTT Disulfid-Brücken in den Proteinen reduziert. Diese Proben werden dann unter denaturierenden Bedingungen zuerst in einem Sammelgel mit großer Porenweite (5 % Acrylamid) fokussiert und anschließend in einem Trenngel mit geringerer Porenweite (hier 7,5 % Acrylamid) aufgetrennt.

Durchführung

Zur Vorbereitung der SDS-Gelelektrophorese wurden die in den Tabellen 3.3 und 3.4 beschriebenen Puffer und Lösungen hergestellt. Die Gelkammerbestandteile wurden vor der Verwendung mit Isopropanol gereinigt, um Fett und sonstige Verunreinigungen zu entfernen. Danach wurde die Gelkammer zusammengebaut und mit Wasser auf Dichtigkeit geprüft.

Die Proben für die Gelelektrophorese wurden mit Tris-Lösung auf eine Konzentration von 1 µg/µl verdünnt. Pro Bahn wurden dann zwischen 2 und 5 µg Gesamtprotein vorgelegt und alle Proben mit Tris-Lösung auf das gleiche Volumen (maximal 20 µl) aufgefüllt. Der Probenauftragspuffer wurde durch Zusatz von 25 µl DTT-Lösung 20X (Endkonzentration DTT: 16 mM) vervollständigt.

Tab. 3.3: Lösungen für die Herstellung von SDS-Gelen.

Tris-HCl-Lösung (Trenngel-Lösung)		pH 8,8 bei RT
12,1 g Tris		1,00 mol/l
ad 100 ml Wasser		
Tris-HCl-Lösung (Sammelgel-Lösung)		pH 6,8 bei RT
12,1 g Tris		1,00 mol/l
ad 100 ml Wasser		
SDS-Lösung		
1,0 g Natriumdodecylsulfat (SDS)		10 % (m/V)
ad 10 ml Wasser		
APS-Lösung		
100 mg Ammoniumperoxodisulfat (APS)		10,0 % (m/V)
ad 1 ml Wasser		

Zur Herstellung des Trenngels wurden Acrylamid-Lösung 30 %, Trenngel-Lösung, SDS-Lösung und Wasser in der in Tabelle 3.5 beschriebenen Zusammensetzung gemischt. Die Mengenangaben beziehen sich auf die Herstellung von zwei Gelen. Um die Polymerisation zu starten, wurden TEMED und APS-Lösung zugegeben und erneut gemischt. Dann wurde die Mischung zügig in die Gelkammer gefüllt und mit Isopropanol überschichtet.

Nach einer Polymerisationszeit von etwa 10 min wurden für die Herstellung des Sammelgels Acrylamid-Lösung 30 %, Sammelgel-Lösung, SDS-Lösung und Wasser gemischt (siehe Tabelle 3.5). Dann wurde der Isopropanol vom polymerisierten Trenngel entfernt. Durch Zusatz von TEMED und APS-Lösung wurde die Polymerisation des Sammelgels gestartet und diese Mischung ebenfalls in die Gelkammer gefüllt. Zum Schluss wurde der Kamm eingesetzt. Während der Polymerisationszeit von etwa 30 min wurden die Protein-Proben denaturiert. Dazu wurde der zweifach konzentrierte Probenauftragspuffer im Verhältnis von 1:1 zu den Proben gegeben. Die Proben wurden bei RT für 30 min inkubiert.

Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, wurde der Kamm entfernt und die Elektrophoresekammer zusammengebaut. Der Elektrophoresepuffer wurde durch Verdünnung der Elektrophoresepuffer-Stammlösung im Verhältnis 1:10 mit Wasser hergestellt und in die Kammer gefüllt. Mit Hilfe von Geltips wurden alle Taschen nun mit Elektrophoresepuffer gespült und anschließend die Proben und der Proteinstandard (3–5 μ l) aufgetragen. Bei einer Spannung von 200 V dauerte die Elektrophorese 40–45 min. Wenn die Bromphenolblau-Front das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Das Sammelgel wurde vorsichtig mit einem Skalpell vom Trenngel abgetrennt. Das Trenngel selbst wurde nun entweder gefärbt oder für einen Western Blot vorbereitet.

Tab. 3.4: Weitere Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese.

Bromphenolblau-Lösung, gesättigt		
ca. 1 mg	Bromphenolblau	gesättigt
ad 10 ml	Wasser	
DTT-Lösung (20X)		
49,4 mg	Dithiothreitol (DTT)	3,20 mol/l
ad 100 µl	Wasser	
Probenauftragspuffer (2X)		
1,75 ml	Tris-HCl pH 6,8	175 mmol/l
1,50 ml	Glycerol 100 %	15,0 % (V/V)
5,0 ml	SDS-Lösung 10 %	5,0 % (m/V)
1,25 ml	Bromphenolblau-Lösung	15,0 % (V/V)
Herstellung von 475 µl Aliquots		
Elektrophoresepuffer-Stammlösung (10X)		
30,0 g	Tris	0,25 mol/l
144,0 g	Glycin	1,92 mol/l
10,0 g	Natriumdodecylsulfat (SDS)	1,00 % (m/V)
ad 1000 ml	Wasser	
Tris-Lösung		
24 mg	Tris	20 mmol/l
ad 10 ml	Wasser	

Tab. 3.5: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.

Zusatz	Trenngel 7,5 %	Sammelgel 5 %
Acrylamid-Lösung 30 %	3,75 ml	835 µl
Trenngel-Lösung	5,625 ml	-
Sammelgel-Lösung	-	625 µl
Wasser	5,345 ml	3,445 ml
SDS-Lösung	150 µl	50 µl
TEMED	27 µl	5 µl
APS-Lösung	105 µl	20,8 µl

3.1.5 Färbung von Proteinen in SDS-PAGE Gelen

Die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können mittels verschiedener Techniken im Gel detektiert werden. Die Proteine werden im ersten Schritt durch die Entfernung von SDS im Gel fixiert und danach durch eine Reaktion mit Farbstoffen oder Silbersalzen sichtbar gemacht. Einer der Standard-Farbstoffe ist Coomassie Brilliant Blau R-250, der unspezifisch mit einer Nachweisgrenze von 0,1–2 µg an die meisten Proteine bindet. Die bis zu 100fach empfindlichere Silberfärbung nutzt die Eigenschaft von Aminosäure-Seitenketten, ionisches Silber zu binden. Die Proteinbanden werden nach Reduktion der Silberionen zu elementarem Silber sichtbar. Durch eine vorherige Reduktion der Seitenketten mittels DTT wird die Bindungsfähigkeit für Ag^+ noch erhöht.

Coomassie-Färbung

Das vom Sammelgel befreite Trenngel wurde in Coomassie-Färbelösung gegeben und für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurde das Gel dreimal für je 30 min in Coomassie-Entfärbelösung bis zur gewünschten Helligkeit entfärbt, für 1,5 h in Wasser gewaschen und mit Hilfe des Scanners dokumentiert. Die Zusammensetzung der Lösungen kann Tabelle 3.6 entnommen werden, diese waren bei RT unter Lichtausschluss haltbar. Zur Langzeitkonservierung wurde das Gel abschließend zwischen Cellophanfolien in einen Trocknungsrahmen eingespannt und für drei Tage getrocknet.

Silberfärbung

Alle für die Silberfärbung benötigten Lösungen sind in Tabelle 3.7 beschrieben. Die DTT-Lösung 1 M wurde in Aliquots bei -20 °C gelagert. Die DTT-Lösung 325 µM, die Silbernitrat-Lösung 0,1 % und die Entwicklungslösung wurden kurz vor Verwendung frisch hergestellt.

Das Trenngel wurde für mindestens 1 h bei RT in Fixierlösung auf dem Schüttler inkubiert. Während dieser Zeit wurden 30 ml einer 1:1 verdünnten Fixierlösung und die oben genannten frisch zuzubereitenden Lösungen hergestellt. Für die Entwicklungslösung wurde zuerst die vorgegebene Menge an Natriumcarbonat in Wasser gelöst und danach die Formaldehyd-Lösung zugegeben. Nach der initialen Inkubation in Fixierlösung wurde das Gel nacheinander für je 15 min in der 1:1 verdünnten Fixierlösung, in Wasser, in DTT-Lösung 325 µM und in Silbernitrat-Lösung 0,1 % geschwenkt.

Tab. 3.6: Lösungen für die Coomassie-Färbung.

Coomassie-Färbelösung		
250 ml	Methanol	50 % (V/V)
50 ml	Eisessig	10 % (V/V)
1,25 g	Coomassie Brilliant Blau R-250	0,25 % (m/V)
ad 500 ml	Wasser	
Coomassie-Entfärbelösung		
200 ml	Methanol	20 % (V/V)
100 ml	Eisessig	10 % (V/V)
ad 500 ml	Wasser	

Tab. 3.7: Lösungen für die Silberfärbung.

Fixierlösung		
200 ml	Ethanol	45,5 % (V/V)
40 ml	Eisessig	9,0 % (V/V)
200 ml	Wasser	
DTT-Lösung 1 M		
154 mg	Dithiothreitol (DTT)	1,00 mol/l
ad 1 ml	Wasser	
DTT-Lösung 0,325 mM		
9,75 µl	DTT-Lösung 1 M	0,325 mmol/l
ad 30 ml	Wasser	
Silbernitrat-Lösung 20 %		
2,0 g	Silbernitrat	20 % (m/V)
ad 10 ml	Wasser	
Silbernitrat-Lösung 0,1 %		
150 µl	Silbernitrat-Lösung 20 %	0,10 % (m/V)
ad 30 ml	Wasser	
Entwicklungslösung		
3,0 g	Natriumcarbonat	2,0 % (m/V)
150 µl	Formaldehyd-Lösung 37 %	0,04 % (V/V)
ad 150 ml	Wasser	
Essigsäure 5 %		
25 ml	Eisessig	5,0 % (V/V)
ad 500 ml	Wasser	
Glycerol 3 %		
15 g	Glycerol 100 %	3,0 % (m/V)
ad 500 ml	Wasser	

Für die Entwicklungsreaktion wurde das Gel zweimal sehr kurz in Wasser gewaschen und dann Entwicklungslösung zugegeben. Bei der ersten Farbänderung der Lösung wurde diese sofort abgegossen, durch frische Entwicklungslösung ersetzt und das Gel bis zur gewünschten Farbtintensität geschwenkt. Nun wurde die Lösung schnell entfernt und die Farbreaktion durch zügige Zugabe von Essigsäure 5 % gestoppt. Nach einer Inkubation in Essigsäure von mindestens 5 min wurde das Gel in Glycerol 3 % überführt, für mindestens 30 min geschüttelt und mittels Scanner dokumentiert. Die Langzeitkonservierung erfolgte durch Trocknung wie bei der Coomassie-Färbung beschrieben.

3.1.6 Western Blot

Beim Western Blot werden die Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Anlegen einer Spannung auf die Oberfläche einer Membran transferiert und dort immobilisiert. In dieser Arbeit wurde das sogenannte Wet- bzw. Tank-Blot-Verfahren verwendet, bei dem der Transfer der Proteine sehr schonend und unter nur geringer Wärmeentwicklung stattfindet.

Nach der Absättigung von unspezifischen Bindungen auf der Blotmembran können dann bestimmte Proteine mit Hilfe spezifischer, primärer Antikörper gezielt markiert werden. Das Fc-Fragment des primären Antikörpers wird von einem sekundären Antikörper erkannt, der kovalent an ein Enzym gekoppelt ist, zum Beispiel an die Meerrettich-Peroxidase (HRP). Nach Inkubation des Blots mit Substraten dieses Enzyms entsteht eine Chemilumineszenz, die mit Hilfe einer Gamma-Kamera detektiert und dokumentiert werden kann. Auf diese Weise kann das Vorliegen eines bestimmten Proteins in einem Proteingemisch spezifisch nachgewiesen werden.

Durchführung

Zur Vorbereitung wurden die Puffer und Lösungen aus Tabelle 3.8 hergestellt. Der Transferpuffer wurde über Nacht im Kühlschrank gekühlt. Die Lösungen der primären Antikörper (siehe Tabelle 3.9) wurden ebenfalls im Kühlschrank gelagert und so lange wieder verwendet, bis keine Antikörperreaktion mehr stattfand. Auch die Stammlösung des sekundären Antikörpers war bei 4 °C etwa 2 Wochen haltbar. Im Gegensatz dazu wurden die Blockierungslösung und die verdünnte Lösung des sekundären Antikörpers jeweils frisch hergestellt und nach Verwendung verworfen.

Das Trenngel der zuvor durchgeführten SDS-PAGE wurde für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Währenddessen wurde eine PVDF-Membran für 20 s mit Methanol benetzt und dann ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Dann wurden das Gel und die Membran gemäß der Herstellerangaben luftblasenfrei in die Blot-Kassette eingesetzt. Der Kühlakku wurde zusammen mit der Kassette in den Blot-Tank eingesetzt, danach wurde der Tank mit 4 °C kaltem Transferpuffer aufgefüllt.

Der elektrophoretische Transfer der Proteine auf die Membran wurde bei 4 °C und einer Spannung von 100 V unter Rühren für 60 min durchgeführt. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran aus der Blot-Kassette entnommen und bei RT für 60 min in der Blockierungslösung geschüttelt. Nun wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T Lösung gewaschen, anschließend mit dem primären Antikörper versetzt und erneut für 60 min geschüttelt. Über Nacht wurde die Membran dann in der Antikörper-Lösung im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Membran wieder dreimal für 10 min mit TBS-T Lösung gewaschen und dann mit der frisch hergestellten Lösung des sekundären Antikörpers für 90 min bei RT geschüttelt. Nach zwei weiteren Waschschritten in TBS-T wurde die Membran mit 2 ml des frisch gemischten ECL-Reagenzes für 2 min inkubiert. Schließlich wurde die Chemolumineszenz mit einer Charge-coupled device-Kamera (CCD-Kamera) und der Software Quantity One der Firma Bio-Rad detektiert und dokumentiert. Die Software wurde auch für eine densitometrische Analyse der detektierten Banden genutzt.

Tab. 3.8: Puffer und Lösungen für den Western Blot.

Transferpuffer		
28,8 g	Glycin	192 mmol/l
6,1 g	Tris	25 mmol/l
ad 2000 ml	Wasser	
TBS-Stammlösung (10X)		pH 7,3 bei RT
40,0 g	Natriumchlorid	1,37 mol/l
6,06 g	Tris	100 mmol/l
ad 500 ml	Wasser	
TBS-T Lösung		
100 ml	TBS-Stammlösung	19,2 mmol/l
2 ml	Tween 20	0,2 % (V/V)
ad 1000 ml	Wasser	
Blockierungslösung		
2,5 g	Milchpulver	5,0 % (m/V)
ad 50 ml	TBS-T Lösung	

Tab. 3.9: Antikörper-Lösungen für den Western Blot.

Primärer Antikörper BXP-21 (ABCG2)		Verdünnung 1:1000
10 mg	Natriumazid	0,1 % (m/V)
500 mg	Albumin (BSA)	5,0 % (m/V)
10 µl	BXP-21	
ad 10 ml	TBS-T Lösung	
Primärer Antikörper C219 (ABCB1)		Verdünnung 1:640
10 mg	Natriumazid	0,1 % (m/V)
500 mg	Albumin (BSA)	5,0 % (m/V)
15,6 µl	C219	
ad 10 ml	TBS-T Lösung	
Stammlösung sekundärer Antikörper		
5 µl	Anti-mouse IgG Antikörper	
45 µl	TBS-T Lösung	
Sekundärer Antikörper		Verdünnung 1:20.000
0,5 g	Milchpulver	5,0 % (m/V)
5 µl	Stammlösung sekundärer Antikörper	
ad 10 ml	TBS-T Lösung	

3.1.7 Färbung von Proteinen auf Western Blots

Zur Färbung von Proteinen auf Western Blots können verschiedene Methoden verwendet werden. In dieser Arbeit wurden die Amidoschwarz- und die Ponceau S-Färbung eingesetzt. Der Farbstoff Amidoschwarz 10B kann nicht nur für die Proteinbestimmung genutzt werden, sondern auch Proteinbanden auf einem Western Blot anfärben. Ein Nachteil der Methode ist, dass es sich um eine irreversible Färbemethode handelt. Dagegen kann die Anfärbung von Proteinen mittels Ponceau S wieder entfernt werden und interferiert nicht mit einer anschließenden Antikörpermarkierung. Der Nachteil dieser Methode ist jedoch ihre geringe Sensitivität.

Tab. 3.10: Lösung für die Amidoschwarz-Färbung.

Amidoschwarz-Färbelösung		
50 mg	Amidoschwarz 10B	0,1% (m/V)
5,0 ml	Eisessig	10 % (V/V)
ad 50 ml	Wasser	

Amidoschwarz-Färbung

Der Western Blot wurde zweimal für 10 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Dann wurde er für maximal 1 min mit der in Tabelle 3.10 beschriebenen Färbelösung auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Zum Entfärben wurde der Blot nun zweimal für 1 min in Essigsäure 5 % geschwenkt und schließlich zum Entfernen der Essigsäure wieder zweimal für 10 min mit Wasser gewaschen.

Ponceau S-Färbung

Für die Ponceau S-Färbung wurde der Western Blot für 20 min in Ponceau S-Färbelösung auf dem Horizontalschüttler geschwenkt. Danach wurde der Blot zweimal kurz mit TBS-Puffer 1X gewaschen, bis die überschüssige Färbelösung entfernt war. Um die Membran im Anschluss wieder vollständig zu entfärben, wurde sie mehrmals in frischem TBS-Puffer 1X geschüttelt.

Tab. 3.11: Lösung für die Ponceau S-Färbung.

Ponceau S-Färbelösung		
100 mg	Ponceau S	0,20 % (m/V)
1,5 ml	TCA-Lösung 100 %	3,0 % (V/V)
1,5 g	5-Sulfosalicylsäure Dihydrat	3,0 % (m/V)
ad 50 ml	Wasser	

3.1.8 Herstellung der gemischten Lipide

Für die Rekonstitution von aufgereinigten integralen Membranproteinen in einer künstlichen Membranumgebung eignen sich verschiedene Lipidmischungen. In dieser Arbeit wurde eine Mischung aus 23 % Cholesterol, 67 % Phosphatidylcholin und 10 % Phosphatidylsäure verwendet. Im Gegensatz zu sogenannten Mixed Lipids aus *E. coli* weist diese Lipidmischung eine definierte und reproduzierbare Zusammensetzung auf, so dass Unterschiede in der Aktivität des rekonstituierten Proteins nicht auf eine veränderte Lipidumgebung zurückzuführen wären.

Durchführung

Cholesterol wurde in einem Enghalskolben eingewogen, die entsprechenden Mengen der beiden anderen Bestandteile wurden als Lösungen in Chloroform zugesetzt. Die Zusammensetzung der Lipidmischung ist in Tabelle 3.12 beschrieben. Nun wurde das Chloroform bei 40 °C und 350 mbar langsam entfernt. Nachdem augenscheinlich kein Chloroform mehr im Kolben war, wurde der Druck so weit wie möglich reduziert, um die Lipide für weitere 60 min vollständig zu trocknen.

In dieser Zeit wurde der Resuspendierungspuffer und die dafür benötigten Stammlösungen laut Tabelle 3.13 hergestellt. Für die Herstellung des Resuspendierungspuffers wurden die angegebenen Bestandteile bis auf Octylglucosid (OG) gemischt und für 30 min entgast. Dann wurde die OG-Stammlösung zugesetzt und der Puffer für 30 min mit Argon begast. Zu den getrockneten Lipiden wurde eine entsprechende Menge an Resuspendierungspuffer gegeben, so dass eine Lipidkonzentration von 50 mg/ml resultierte. Mit Hilfe von 40 Glas- kugeln (Durchmesser: 2,5 mm) wurden die Lipide dann unter intensivem Schütteln von der Kolbenwand abgelöst und gleichmäßig resuspendiert. Über Nacht wurde die Lipidmischung auf einem Horizontalschüttler geschwenkt. Am nächsten Tag wurde die fertige Mischung aliquotiert, mit Argon begast und schließlich bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Vor Verwendung der Lipidmischung bei einer Aufreinigung wurde die benötigte Menge über Nacht im Kühlschrank aufgetaut. Am Tag der Aufreinigung wurde sie dann ab morgens bis zur Verwendung bei RT auf dem Horizontalschüttler geschwenkt.

Tab. 3.12: Zusammensetzung der gemischten Lipide.

Zusatz	Einwaage/Volumen	Anteil
Cholesterol (CHOL)	299 mg	23 %
Phosphatidylcholin (PC) (20 mg/ml)	43,55 ml (871 mg)	67 %
Phosphatidylsäure (PA) (25 mg/ml)	5,2 ml (130 mg)	10 %

Tab. 3.13: Lösungen und Puffer für die Herstellung der gemischten Lipide.

Tris-HCl-Lösung 1 M		pH 7,4 bei 4 °C
12,1 g	Tris	1,00 mol/l
ad 100 ml	Wasser	
Natriumazid-Stammlösung		
6,5 mg	Natriumazid	0,1 mol/l
ad 1 ml	Wasser	
6-Aminohexansäure-Stammlösung		
65,6 mg	6-Aminohexansäure	0,50 mol/l
ad 1 ml	Wasser	
OG-Stammlösung		
8,0 g	n-Octyl- β -D-glucopyranosid (Octylglucosid, OG)	20 % (m/V)
ad 40 ml	Wasser	
Resuspendierungspuffer		
2,0 ml	Tris-HCl pH 7,4 bei 4 °C	50 mmol/l
16 ml	Glycerol 50 %	20 % (V/V)
0,4 ml	Natriumazid-Stammlösung	1,0 mmol/l
0,4 ml	6-Aminohexansäure-Stammlösung	5,0 mmol/l
3,42 g	Saccharose	0,25 mol/l
17,2 ml	Wasser	
4 ml	OG-Stammlösung	2 % (V/V)

3.1.9 ATPase Assay

Die Bestimmung der ATPase Aktivität von aufgereinigtem ABCB1 bzw. ABCG2 basiert auf dem kolorimetrischen Nachweis von anorganischem Phosphat (P_i), das bei der Hydrolyse von ATP zu ADP freigesetzt wird. Diese Hydrolyse liefert die für die Funktion von ABC-Transportern notwendige Energie. Das jeweilige Protein wird mit einem Überschuss an ATP in Gegenwart verschiedener Stimulatoren oder Inhibitoren inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten werden Proben gezogen, deren P_i Gehalt durch eine Reaktion mit Ammoniummolybdat und Malachitgrün zu einem gefärbten Komplex detektiert werden kann, dessen Absorption photometrisch ermittelt wird [126]. Da die Farbstoffmenge mit der Phosphatmenge korreliert, kann über eine Kalibriergerade die Phosphatkonzentration in jeder Probe bestimmt werden.

Durchführung

Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen ist in den Tabellen 3.14 und 3.15 dargestellt, zusätzlich wurde die EGTA-Lösung aus Kapitel 3.2.9 eingesetzt. Grundsätzlich wurden

die beschriebenen Stoffe in MilliQ-Wasser gelöst und auf das entsprechende Volumen aufgefüllt. Die ATP-Lösung wurde hergestellt, wie in der Literatur beschrieben [127].

Zur Herstellung des Basis Assay Puffers ABCB1 I wurde die benötigte Menge Tris in etwa 90 ml Wasser gelöst und die EGTA-Lösung hinzugegeben. Dann wurde der gewünschte pH-Wert der Lösung bei 37 °C mit Schwefelsäure (0,6 mol/l) eingestellt. Zum Schluss wurde Magnesiumsulfat zugesetzt, gelöst und bei RT auf das Zielvolumen aufgefüllt.

Für die Herstellung der Malachitgrün-Lösung wurde Polyvinylalkohol zunächst bei 80 °C in Wasser gelöst. Nach Abkühlen auf RT wurde die Lösung auf das gewünschte Volumen aufgefüllt und anschließend der Farbstoff hinzugegeben.

Zur Vorbereitung des ATPase Assays wurde der Reaktionspuffer auf Eis hergestellt, der zusätzlich zum jeweiligen 1:1-verdünnten Basis Assay Puffer noch 2 mM Natriumazid und 10 mM ATP enthielt. Die Verdünnungsreihe der Testsubstanz in DMSO wurde so hergestellt, dass sich die finale Konzentration im Assay durch eine 100fache Verdünnung ergab. Die benötigte Anzahl an Glasröhrchen wurde mit 1 ml EDTA-Lösung beschickt und auf Eis gekühlt. Für die Kalibriergerade im Bereich von 0–25 nmol P_i wurden Glasröhrchen mit der entsprechenden Menge an Phosphat-Stammlösung 1 mM beschickt und mit EDTA-Lösung auf 1 ml aufgefüllt. Jedes Röhrchen der Kalibriergerade wurde nun mit 50 μ l Reaktionspuffer versetzt und auf Eis gekühlt.

Die Enzymreaktion wurde bei 37 °C in 250 μ l Reaktionsvolumen durchgeführt. Dazu wurden je 2,5 μ l der Verdünnungen der Testsubstanz vorgelegt und mit 247,5 μ l Reaktionspuffer versetzt. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 1–2 μ g aufgereinigtem Protein gestartet. Dies geschah mit Hilfe einer 10 μ l Hamiltonspritze. Zu den Zeitpunkten 0, 30, 60 und 90 min wurden aus jedem Ansatz Proben mit einem Volumen von 50 μ l entnommen, zur Beendigung der Reaktion in die kalte EDTA-Lösung gegeben und bis zur Phosphat-Bestimmung auf Eis gekühlt.

Um die entstandene Menge an anorganischem Phosphat zu bestimmen, wurde jede Probe mit 200 μ l Ammoniummolybdat-Lösung versetzt und 15 min im Wasserbad bei RT inkubiert. Dann wurden 200 μ l Malachitgrün-Lösung zu den Proben gegeben und für 20 min erneut im Wasserbad inkubiert. Zum Schluss wurden 200 μ l Schwefelsäure 4 M hinzupipettiert und die Absorption der Proben bei 610 nm bestimmt.

Tab. 3.14: Lösungen für die Durchführung des ATPase Assays.

Basis Assay Puffer ABCB1 I (2X)		pH 7,4 bei 37 °C
0,97 g	Tris	80 mmol/l
0,74 g	Magnesiumsulfat Heptahydrat	30 mmol/l
0,1 ml	EGTA-Na 200 mM pH 8,0	0,2 mmol/l
ad 100 ml	Wasser (MilliQ)	
Basis Assay Puffer ABCG2 (2X)		pH 7,0 bei 37 °C
953 mg	HEPES	40,0 mmol/l
247 mg	Magnesiumsulfat Heptahydrat	10,0 mmol/l
ad 100 ml	Wasser (MilliQ)	
Natriumazid-Stammlösung		
6,5 mg	Natriumazid	0,1 mol/l
ad 1 ml	Wasser (MilliQ)	
Phosphat-Stammlösung 10 mM		
18,0 mg	Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	10,0 mmol/l
ad 10 ml	Wasser (MilliQ)	
Phosphat-Stammlösung 1 mM		
1,0 ml	Phosphat-Stammlösung 10 mM	1,0 mmol/l
ad 10 ml	Wasser (MilliQ)	
EDTA-Na Lösung 8 mM		pH 8,0 bei RT
1,2 g	EDTA	8,0 mmol/l
ad 500 ml	Wasser (MilliQ)	

Tab. 3.15: Lösungen für die Detektionsreaktion des ATPase Assays.

Ammoniummolybdat-Lösung (Reagenz A)		
8,75 g	Ammoniummolybdat Tetrahydrat	1,75 % (m/V)
87,5 ml	konzentrierte Schwefelsäure	12,6 mol/l
ad 500 ml	Wasser (MilliQ)	
Malachitgrün-Lösung (Reagenz C)		
175 mg	Malachitgrün HCl	0,04 % (m/V)
1,75 g	Polyvinylalkohol	0,35 % (m/V)
ad 500 ml	Wasser (MilliQ)	
Schwefelsäure 4 M		
111 ml	konzentrierte Schwefelsäure	4,00 mol/l
ad 500 ml	Wasser (MilliQ)	

Die Freisetzung von P_i über die Zeit wurde durch eine lineare Regression der vier Messzeitpunkte ermittelt, dabei entsprach die Steigung der resultierenden Geraden (m_r) der Reaktionsrate. Die spezifische Aktivität des Transportproteins (als freigesetztes P_i /mg/min) wurde über die Steigung der Kalibriergeraden (m_{cal}), das Probenvolumen ($V_{protein}$) und die eingesetzte Proteinkonzentration ($c_{protein}$) mit Hilfe von Gleichung 3.1 berechnet. Konzentrations-Effekt-Kurven wurden durch nicht-lineare Regression über eine Vier-Parameter logistische Gleichung mit variabler Steigung (GraphPad Prism[®] 5.0) erstellt.

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{m_r}{m_{cal}} \cdot \frac{5}{V_{protein} \cdot c_{protein}} \quad [\mu\text{mol } P_i/\text{mg}/\text{min}] \quad (3.1)$$

3.2 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.1 *S. cerevisiae* Stämme und Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene *Saccharomyces cerevisiae* Stämme und Plasmide zur Etablierung von Expressionssystemen für die ABC-Transportproteine ABCG2 bzw. ABCB1 verwendet. Tabelle 3.16 gibt eine Übersicht über die Eigenschaften der untransformierten Hefestämme. Der genetische Hintergrund der Stämme in internationaler Nomenklatur beschreibt die dominanten bzw. rezessiven Mutationen, die gegenüber dem Wildtyp-Stamm vorgenommen wurden.

MAT α bzw. MATa bezeichnen den Paarungstyp (mating type) des Hefestammes. Durch die Gensymbole *ura*, *trp*, *lys*, *leu* oder *his* wird angegeben, dass eine rezessive Mutation für die Fähigkeit zur Synthese der jeweiligen Aminosäure vorliegt. Da die Hefezellen nur haploid sind, wirkt dieser genetischer Defekt wie eine Deletion des mutierten Gens. Im Gegensatz dazu bedeuten HIS oder LEU dominante Mutationen, so dass die genannte Aminosäure von dem Hefestamm selbst hergestellt werden kann. Diese Aminosäuren können dann als auxotrophe Marker eingesetzt werden, wenn sie dem Kulturmedium nicht zugesetzt werden. Die Zahl hinter dem Gensymbol gibt den jeweiligen Genort (Locus) an. In einigen Fällen ist zusätzlich die Allel-Nummer benannt, diese Zahl wird mittels Bindestrich von der Zahl des Genortes getrennt. Durch das Symbol Δ wird angezeigt, dass es sich um eine Deletionsmutante handelt.

Im Genom des Hefestammes LPY11 wurde zusätzlich das *erg6*-Gen mutiert, das für eine Sterolmethyltransferase kodiert. Dieses Enzym ist an einem späten Schritt der Ergosterol-Biosynthese beteiligt, bei dem Zymosterol zu Fecosterol umgewandelt wird. Durch die Mutation wird die Ergosterol-Konzentration in den Hefezellen herabgesetzt. Somit handelt es sich bei LPY11 um einen ergosterol-defizienten Hefestamm.

Der Stamm BJ5457 ist protease-defizient, da Gene für zwei Proteinasen (*pep4*, *prb1*) verändert wurden. Diese Mutationen verhindern die Aktivierung einiger Proteasen, die durch diese Proteinasen gefördert würde. Eine weitere Eigenschaft des Stammes ist seine Resistenz

Tab. 3.16: Untransformierte Hefestämme.

Bezeichnung	Genetischer Hintergrund	Marker	Referenz
LPY11 wt	MATa <i>erg6::LEU2 leu2 his3 ura3-52</i>	LEU2	ATCC 201842 [128]
BJ5457 wt	MAT α <i>ura3-52 trp1 lys2-801 leu2-Δ1 his3-Δ200 pep4::HIS3 prb1-Δ1.6R can1 GAL</i>	HIS3	ATCC 208282 [129]

Tab. 3.17: Verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Marker	Promotor	Gen	Tag	Referenz
pCHH10m3N-ABCG2	URA3	PGK	ABCG2 (R482G)	10 His (N-term.), 3 Myc (N-term.)	
YEplac195-MDR1His	URA3	PMA1	ABCB1	10 His (C-term.)	[130]
YEplac181-MDR1His	LEU2	PMA1	ABCB1	10 His (C-term.)	[103]

gegenüber Canavanin. Dieser Resistenz liegt die Deletion einer Arginin-Permease (*can1*) zugrunde. Zusätzlich wurde dem Genom des Stammes der Galactokinase-Promotor (GAL) hinzugefügt. Das Wachstum dieser Hefezellen kann also durch den Zusatz von Galactose zum Medium induziert werden.

Tabelle 3.17 fasst einige Eigenschaften der zur Expression der entsprechenden ABC-Transporter verwendeten Plasmide zusammen, Plasmidkarten sind in den Abbildungen 3.1 und 3.2 dargestellt. Diese Plasmide gehören zur Klasse der „Yeast episomal plasmids“ (YEp). Sie basieren genetisch auf dem 2- μ m-Plasmid, das natürlicherweise in 50–60 Kopien im Zellkern von *S. cerevisiae* vorkommt und sich autonom und extrachromosomal repliziert. Der Startpunkt dieser Replikation ist in den Abbildungen mit „2- μ m Start“ bezeichnet. Die physiologische Funktion des 2- μ m-Plasmids ist bisher unbekannt. Vorteile der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sind eine hohe Transformationsrate, die autonome Replikation und eine hohe Stabilität während der Mitose.

Zu den wichtigen Eigenschaften der eingesetzten Plasmide gehören die auxotrophen Marker URA3 und LEU2, die es nach Transformation eines Hefestammes ermöglichen, die erfolgreich behandelten Zellen zu selektieren. Die Plasmide besitzen unterschiedliche Promotoren, die die Expression des insertierten Gens kontrollieren. Der Promotor der 3-Phosphoglycerat-Kinase (PGK) ist konstitutiv aktiv, genauso wie der Promotor der Plasmamembran-ATPase 1 (PMA1). Zusätzlich weisen die Plasmide das β -Lactamase-Gen auf, das zu einer Ampicillin-Resistenz führt, sowie einen Startpunkt für die Replikation in *E. coli* („pUC19“). Mit Hilfe dieser Eigenschaften können die Plasmide in den Bakterien vermehrt und auf Ampicillin-Agar selektiert werden.

Die beiden Proteine ABCB1 und ABCG2, die aus den in die Vektoren klonierten Genen entstehen, weisen eine Histidin-Markierung (His-Tag) auf. Dieser besteht aus 10 Histidinen und wurde jeweils an dem Ende des Proteins angefügt, an dem sich die ATP-Bindungsstelle befindet (ABCB1: C-terminal, ABCG2: N-terminal). Um Proteine mittels Affinitätschromatographie aufzureinigen, ist der His-Tag essentiell. An das ABCG2-Gen mit der Punktmutation R482G wurde zusätzlich noch ein Myc-Tag aus 3 Myc-Epitopen hinzugefügt, welcher

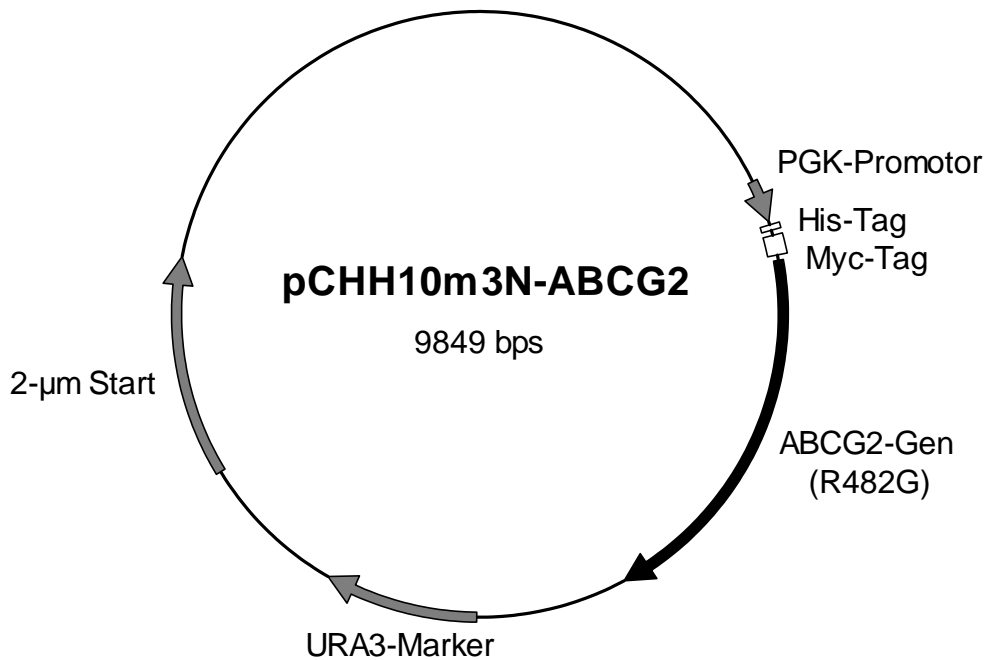


Abb. 3.1: Plasmidkarte von pCHH10m3N-ABCG2. Folgende Eigenschaften des Plasmids sind in der Karte markiert: Replikationsursprung *S. cerevisiae* (2-µm Start), PGK-Promotor, His-Tag (10 Histidine), Myc-Tag (3 Myc-Epitope), ABCG2-Gen (Mutation R482G), auxotropher Marker (URA3).

von einem speziellen Anti-Myc Antikörper erkannt werden kann. Die Eigenschaften dieser Mutation werden ausführlich in Kapitel 1.3 beschrieben.

Das Plasmid pCHH10m3N-ABCG2 wurde dem Arbeitskreis dankenswerterweise von Dr. Christine Hrycyna (Purdue University, Indiana, USA) überlassen. Die beiden anderen Plasmide YEplac195-MDR1His und YEplac181-MDR1His wurden zusammen mit dem Hefestamm LPY11 freundlicherweise von Dr. Marwan Al-Shawi (University of Virginia, USA) zur Verfügung gestellt. Der Hefestamm BJ5457 wurde über die American tissue culture collection (ATCC) bezogen.

Die in dieser Arbeit erzeugten Hefestämme werden in Tabelle 3.18 vorgestellt. Die Charakterisierung dieser Stämme wird in den Kapiteln 4.1.1 und 4.3.1 des Ergebnisteils beschrieben.

Tab. 3.18: Transformierte Hefestämme.

Bezeichnung	Plasmid	Marker	Promotor	Referenz
LPY11-ABCG2	pCHH10m3N-ABCG2	LEU, URA	PGK	
LPY11-ABCB1	YEplac195-MDR1His (RAF46)	LEU, URA	PMA1	[130]
BJ5457-ABCB1	YEplac181-MDR1His (RAF13)	HIS, LEU	PMA1	[103]

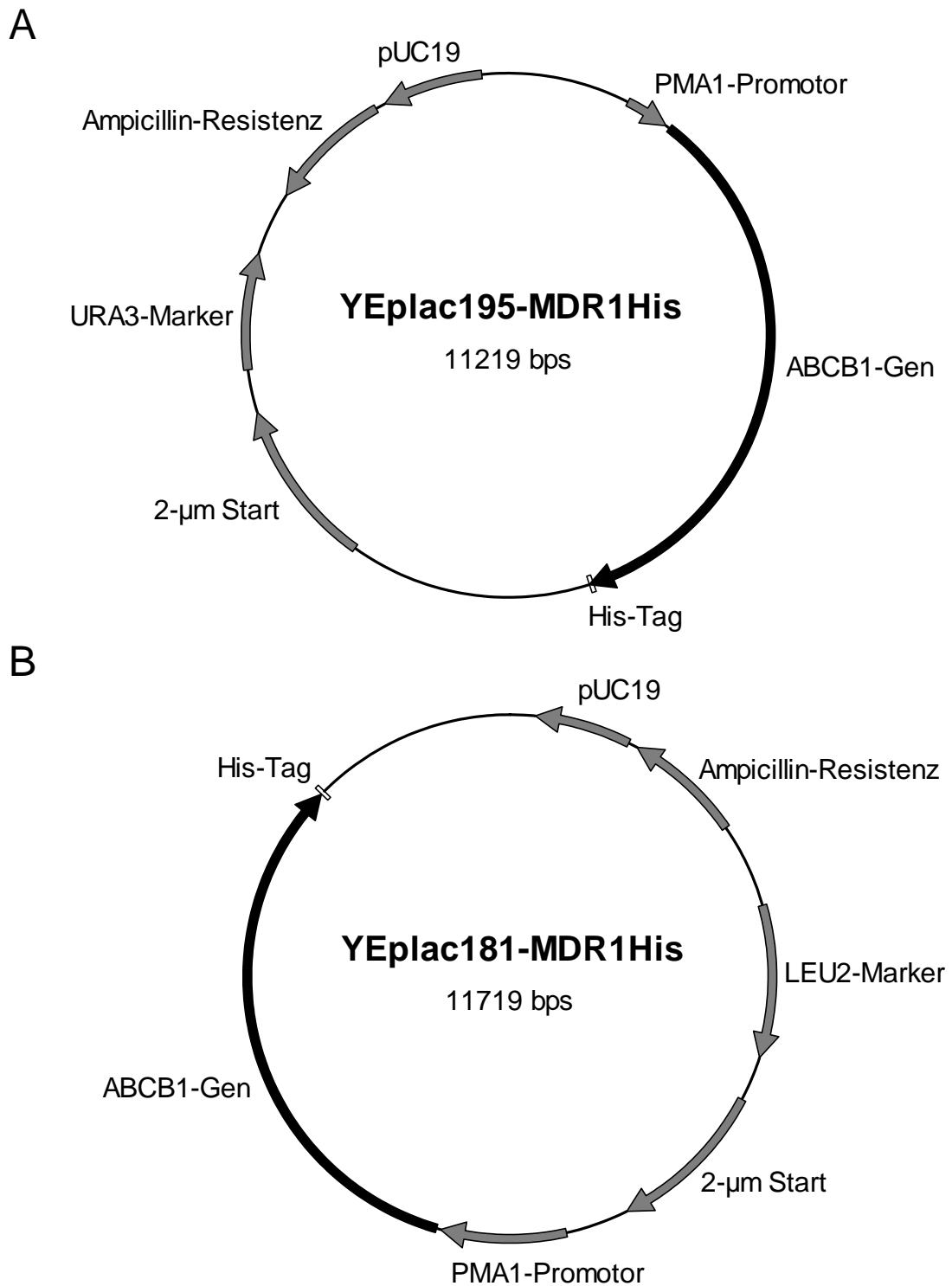


Abb. 3.2: Plasmidkarten von YEplac195-MDR1His (A) und YEplac181-MDR1His (B). Die Karten zeigen folgende Eigenschaften der Plasmide: Replikationsursprung *E. coli* (pUC19), β -Lactamase-Gen (Ampicillin-Resistenz), Replikationsursprung *S. cerevisiae* (2- μ m Start), PMA1-Promotor, ABCB1-Gen, His-Tag (10 Histidine), auxotropher Marker (URA3 bzw. LEU2).

3.2.2 Herstellung der Kulturmedien

Das synthetisch definierte Kulturmedium (SD-Medium) ist ein sogenanntes komplettes Minimalmedium, das bei Bedarf aus den im Weiteren beschriebenen Stammlösungen frisch hergestellt wurde. Die Aminosäure-Stammlösung war so konzipiert, dass daraus Medien für Hefestämme mit unterschiedlichen auxotrophen Markern hergestellt werden konnten. Histidin, Leucin und Uracil fehlten in der Mischung, so dass diese nach Bedarf dem Medium zugesetzt wurden. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem flüssigen Medium noch 2 % Agar-Agar zugesetzt. Alle Schritte zur Herstellung der Kulturmedien wurden unter aseptischen Bedingungen ausgeführt.

Herstellung der Stammlösungen für das SD-Medium

Vor Verwendung wurden die entsprechenden Gefäße für die Stammlösungen der Kulturmedien autoklaviert. Die Zusammensetzung der jeweiligen Lösungen ist in den Tabellen 3.19, 3.21 und 3.20 angegeben. Die fertigen Lösungen wurden dann in diese Gefäße sterilfiltriert.

Die Substanzen für die Aminosäure-Stammlösung (ohne Histidin, Leucin und Uracil) wurden in der vorgegebenen Menge eingewogen und unter Rühren in der Hitze gelöst. Nach Abkühlen der Flüssigkeit wurde im Meßkolben mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Für die Fed-Batch Kultivierung wurde die Aminosäure-Stammlösung in doppelter Konzentration hergestellt. Je 100 ml einer 100fach konzentrierten Stammlösung der drei Aminosäuren Histidin, Leucin und Uracil wurde in separaten Gefäßen angefertigt. Zur Herstellung der Glucose-Stammlösung wurde etwa die Hälfte der benötigten Wassermenge vorgelegt und unter Rühren auf ca. 60 °C erwärmt. Nach und nach wurde die vorgegebene Menge an Glucose zugegeben, um eine Verklumpung zu vermeiden. Wenn die Glucose gelöst war, wurde die Flüssigkeit abgekühlt und dann auf das gewünschte Volumen aufgefüllt.

Bevor die Vitamine-Stammlösung hergestellt wurde, wurden die Stammlösungen von Biotin und Folsäure im angegebenen Lösungsmittel angefertigt. Dann wurden die weiteren Vitamine eingewogen, unter Lichtausschluss gelöst und schließlich die beiden oben genannten Stammlösungen zugesetzt. Zur Lagerung der Vitamine-Stammlösung wurde eine braune Glasflasche verwendet. Nach Ablauf von 4 Wochen wurde sie verworfen und frisch hergestellt. Die Stammlösungen der Spurenelemente und von Calciumchlorid wurden durch Einwaage und Lösen der entsprechenden Substanzen hergestellt. Die Eisen(III)chlorid-Stammlösung wurde wie die Vitamine-Lösung unter Ausschluss von Licht hergestellt und in einer braunen Glasflasche gelagert.

Die Herstellung der Yeast nitrogen base (YNB) Stammlösung erfolgte ebenfalls unter Ausschluss von Licht. Dazu wurden die angegebenen Feststoffe eingewogen und unter Rühren gelöst. Die sterilfiltrierten Stammlösungen wurden aseptisch zugesetzt und die Lösung nun auf etwa 900 ml ergänzt. Mit 10 M Natronlauge wurde jetzt der pH-Wert auf 5,4 eingestellt und danach die Lösung auf 1000 ml aufgefüllt. Schließlich wurde die YNB-Lösung in eine braune Flasche sterilfiltriert. Diese Stammlösung war vier Wochen haltbar.

Herstellung von flüssigem SD-Medium und SD-Agarplatten

Das flüssige SD-Medium wurde bei Bedarf aus jeweils 10 % (V/V) Aminosäure- und YNB-Stammlösung, 5 % (V/V) Glucose-Stammlösung und 1 % (V/V) der benötigten einzelnen Aminosäure-Lösungen hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge an Wasser autoklaviert und nach Abkühlen die Stammlösungen aseptisch zugesetzt. Zur Kultivierung des BJ5457-Stammes mit der Fed-Batch Technik enthielt das Medium ab einem Volumen von 500 ml zusätzlich 10 % Glycerol.

Zur Herstellung von SD-Agarplatten wurde das entsprechende Volumen an Wasser autoklaviert, dem 2 % (m/V) Agar-Agar zugesetzt worden war. Pro Platte wurden etwa 20 ml ausgegossen. Sollten die Agarplatten länger bebrütet werden, wurde das Volumen pro Platte auf 25–30 ml erhöht. Nach dem Autoklavieren wurde die Lösung auf unter 65 °C abgekühlt und dann aseptisch und zügig die Stammlösungen in der oben genannten Konzentration zugesetzt. Nach jeder Lösung wurde die Flüssigkeit durch vorsichtiges Schwenken sorgfältig durchmischt, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Dann wurde das Gemisch gleichmäßig in die vorbereiteten Petrischalen ausgegossen. Zur Entfernung von Luftblasen wurde zum Abschluss die Oberfläche des Agars kurz abgeflämmt. Nachdem der Agar erstarrt und die Platten abgekühlt waren (etwa 4 h), wurden sie mit Parafilm umwickelt und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Valinomycin- oder Aureobasidin A-haltige Agarplatten eingesetzt, die der zusätzlichen Selektion von ABCB1-exprimierenden Hefestämmen dienten [103, 131]. Valinomycin-haltige Agarplatten wurden hergestellt, in dem zu 25 ml Agarlösung nach dem Abkühlen und der Zugabe der anderen Bestandteile 417 µl einer Valinomycin-Lösung (1 % in DMSO) zugesetzt wurden. Die Endkonzentration in den Agarplatten betrug 150 µM. Zur Herstellung der Aureobasidin A-Stammlösung wurden 5 mg in 1 ml Ethanol gelöst. Diese Stammlösung wurde mit Ethanol im Verhältnis 1:100 verdünnt, so dass eine Konzentration von 50 µg/ml resultierte. Von dieser Lösung wurden 1000 µl zu 100 ml Agarlösung gegeben. Auf diese Weise lag im Agar eine Endkonzentration von 0,5 µg/ml (0,45 µM) vor.

Tab. 3.19: Aminosäuren-Stammlösungen für das SD-Medium.

Aminosäuren-Stammlösung (10X)		
100 mg	L-Adenin Hemisulfat	200 mg/l
100 mg	L-Arginin HCl	200 mg/l
150 mg	L-Isoleucin	300 mg/l
150 mg	L-Lysin HCl	300 mg/l
100 mg	L-Methionin HCl	200 mg/l
250 mg	L-Phenylalanin	500 mg/l
1000 mg	L-Threonin	2000 mg/l
100 mg	L-Tryptophan	200 mg/l
150 mg	L-Tyrosin	300 mg/l
750 mg	L-Valin	750 mg/l
ad 500 ml	Wasser	
Histidin-, Leucin- und Uracil-Stammlösungen (100X)		
200 mg	L-Histidin HCl Monohydrat	2,00 g/l
1,0 g	L-Leucin	10 g/l
200 mg	Uracil	2,00 g/l
je ad 100 ml	Wasser	

Tab. 3.20: YNB-Stammlösung für das SD-Medium.

YNB-Stammlösung (10X)		
50,0 g	Ammoniumsulfat	378 mmol/l
10,0 g	Kaliumdihydrogenphosphat	73,5 mmol/l
10,0 g	Magnesiumsulfat Heptahydrat	41,5 mmol/l
1,0 g	Natriumchlorid	17,1 mmol/l
100 ml	Vitamine-Stammlösung	10X
10 ml	Spurenelemente-Stammlösung	10X
10 ml	Calciumchlorid-Stammlösung	0,9 mmol/l
10 ml	Eisen(III)chlorid-Stammlösung	1,23 µmol/l
ad 500 ml	Wasser	

Tab. 3.21: Stammlösungen für das SD-Medium.

Glucose-Stammlösung (20X)		
100 g	D(+)-Glucose	40,0 % (m/V)
ad 250 ml	Wasser	
Biotin-Stammlösung		
10 mg	Biotin	10 g/l
ad 1 ml	Dimethylsulfoxid (DMSO)	
Folsäure-Stammlösung		
10 mg	Folsäure	10 g/l
ad 1 ml	NaOH 1 M	
Vitamine-Stammlösung (100X)		
100 mg	D-Pantothensäure	200 mg/l
500 mg	Myo-Inositol	1000 mg/l
20 mg	Nicotinsäure	40 mg/l
10 mg	4-Aminobenzoessäure	20 mg/l
20 mg	Pyridoxin HCl	40 mg/l
10 mg	(-)-Riboflavin	20 mg/l
20 mg	Thiamin HCl	40 mg/l
100 µl	Biotin-Stammlösung	2 mg/l
10 µl	Folsäure-Stammlösung	0,2 mg/l
ad 500 ml	Wasser	
Spurenelemente-Stammlösung (1000X)		
250 mg	Borsäure	8,10 mmol/l
31 mg	Kupfersulfat Pentahydrat	0,25 mmol/l
50 mg	Kaliumiodid	0,60 mmol/l
224 mg	Mangansulfat Monohydrat	2,65 mmol/l
117 mg	Natriummolybdat Dihydrat	0,97 mmol/l
357 mg	Zinksulfat Heptahydrat	2,48 mmol/l
ad 500 ml	Wasser	
Calciumchlorid-Stammlösung (1000X)		
66,0 g	Calciumchlorid Dihydrat	0,90 mol/l
ad 500 ml	Wasser	
Eisen(III)chlorid-Stammlösung (1000X)		
100 mg	Eisen(III)chlorid	1,23 mmol/l
ad 500 ml	Wasser	

3.2.3 Inkulturnahme, Kultivierung und Kryokonservierung

Inkulturnahme auf Agar-Platten

Um *Saccharomyces cerevisiae* Stämme in Kultur zu nehmen, wurden SD-Agarplatten ohne die entsprechenden auxotrophen Marker auf 30 °C vortemperiert. Unter aseptischen Bedingungen wurde mit einer sterilen Impföse von der Oberfläche eines Glycerol-Backups etwas gefrorene Lösung abgekratzt und gleichmäßig auf der Agaroberfläche ausgestrichen. Dabei sollte das Backup auf keinen Fall auftauen. Die Agarplatten wurden dann im Brutschrank bei 30 °C für etwa 4 Tage inkubiert, bis Kolonien deutlich zu sehen waren. Nun wurden die Platten mit Parafilm versiegelt und bis zur Verwendung der Kolonien bei 4 °C gelagert. Auf diese Weise konnten die Hefezellen für 4 Wochen konserviert werden.

Kultivierung von *S. cerevisiae*

In sterilen 250 ml Weithals-Erlenmeyerkolben wurden je 50 ml SD-Medium ohne die entsprechenden auxotrophen Marker hergestellt und auf dem Orbital Shaker auf 25 °C temperiert. Dann wurde mit Hilfe einer sterilen Impföse aseptisch eine Einzelkolonie von einer Agar-Platte abgenommen und durch Abstreichen im Inneren des Kolben unterhalb des Flüssigkeitsspiegels im Medium suspendiert.

Das Wachstum der Zellen wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) überwacht, da diese proportional zur Zellzahl ist. Dazu wurde jeweils aseptisch eine Probe von etwa 2 ml aus den Kolben gezogen und vermessen. Um die Unterschätzung des Wachstumsfortschritts bei steigender Zelldichte zu umgehen, wurde die Probe zusätzlich vier- und zehnfach verdünnt. Derjenige Messwert wurde zur Beurteilung der Probe herangezogen, der der maximalen optischen Dichte entsprach. In diesem Bereich entsprechen 0,1 OD-Einheiten etwa 3×10^6 Zellen. Bei einer OD_{600} zwischen 0,8 und 1,2 befand sich die Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase.

Kryokonservierung

Zur Herstellung von Glycerol-Backups der Hefestämme wurde eine Flüssigkultur aus einer Einzelkolonie von einer möglichst frischen Agarplatte bis zu einer OD_{600} von 1 herangezogen. Dann wurden 500 µl Glycerol 50 % (siehe Kapitel 3.2.9) und 500 µl Zellsuspension in ein zuvor beschriftetes Kryoröhrchen gegeben, durch mehrmaliges Schwenken gemischt und sofort bei -80 °C eingefroren.

3.2.4 Transformation

S. cerevisiae Zellen können durch verschiedene Methoden mit dem gewünschten Plasmid transformiert werden. Dazu gehören die Spheroplasten-Transformation, die Elektroporation und die Lithiumacetat-Methode. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das „Yeastmaker Yeast Transformation System 2“ der Firma Clontech verwendet, welches auf der Lithiumacetat-Methode basiert [132].

Eine ausreichende Menge an untransformierten Hefezellen wird in Vollmedium (Yeast peptone dextrose adenine-Medium, YPDA-Medium) über Nacht herangezogen. Aus diesen Zellen werden dann mit Hilfe von Lithiumacetat (LiAc) und Polyethylenglycol (PEG) sogenannte kompetente Zellen hergestellt. Die Zellmembran von kompetenten Zellen ist teilweise permeabilisiert, so dass größere DNA-Stücke aufgenommen werden können.

Im nächsten Schritt wird das Plasmid mittels einer Carrier-DNA in die Hefezellen eingebracht. Zur Selektion erfolgreich transformierter Klone werden die Zellen auf SD-Agar ohne die beiden entsprechenden auxotrophen Marker (von untransformiertem Hefestamm und Plasmid) ausplattiert.

Vorbereitung

Zur Vorbereitung der Transformation wurden die in Tabelle 3.22 beschriebenen Lösungen hergestellt. Die Adenin- und die NaCl-Lösung wurden nach der Herstellung autoklaviert. Zusätzlich wurde noch die in Kapitel 3.2.2 beschriebene Glucose-Stammlösung benötigt. Für das YPDA-Medium wurden Yeast Extract und Pepton in ca. 450 ml Wasser unter Hitzezufuhr gelöst und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums auf ca. 55 °C wurden die Glucose- und die Adenin-Lösung aseptisch zugesetzt und das Gesamtvolumen auf 500 ml ergänzt.

Herstellung kompetenter Hefezellen

Von einer frischen SD-Agarplatte wurden aseptisch einzeln liegende Kolonien des untransformierten Hefestammes gepickt und in ein steriles PP-Röhrchen mit je 3 ml vorgewärmtem YPDA-Medium gegeben. Die Öffnung der Gefäße wurde mit Alufolie so bedeckt, dass noch etwa ein Viertel der Fläche frei blieb. Nun wurden die Zellen bei 30 °C und 250 rpm auf dem Orbital Shaker für 8–12 h inkubiert. Es wurde die Kultur ausgewählt, die die höchste optische Dichte aufwies. Von dieser wurden 5–20 µl in 50 ml frisches YPDA-Medium überimpft und für weitere 16–20 h bei 30 °C mit 230 rpm auf dem Orbital Shaker inkubiert.

War eine OD_{600} von 0,15–0,3 erreicht (frisches YPDA-Medium als Referenz), wurde die Zellsuspension mit $700 \times g$ für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und zu 90 ml vorgewärmtem YPDA-Medium gegeben. Die Zellsuspension wurde erneut für 3–5 h bei 30 °C mit 230 rpm auf dem Orbital Shaker inkubiert. Währenddessen wurden 10 ml TE/LiAc-Lösung (1,1X) aus 1,1 ml Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer), 1,1 ml LiAc-Lösung (10X) und 7,8 ml sterilem Wasser hergestellt. Ausserdem wurden 4 ml PEG3350 mit 0,5 ml TE-Puffer und 0,5 ml LiAc-Lösung (10X) gemischt, um die PEG/LiAc-Lösung herzustellen.

War eine OD_{600} von 0,4–0,5 erreicht, wurde die Zellsuspension mit $700 \times g$ für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 100 ml sterilem Wasser gewaschen und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Das Pellet wurde nun in 3 ml TE/LiAc-Lösung (1,1X) aufgenommen, zu je 750 μ l aliquotiert und bei $16.100 \times g$ für 15 s (short spin) zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen und die Pellets schließlich in je 600 μ l TE/LiAc-Lösung (1,1X) resuspendiert. Die so erzeugten kompetenten Zellen waren bei –80 °C für 6 Monate haltbar.

Transformation

30 μ l der Hering Testes Carrier DNA wurden für 5 min auf 99 °C erhitzt und dann sofort auf Eis gekühlt. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Für den Transformationsansatz wurden 50 μ l kompetente Zellen, 5 μ l Carrier DNA und 1 μ g Plasmid vorsichtig gemischt. 0,5 ml PEG/LiAc-Lösung wurde hinzugefügt und wieder vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde nun für 30 min bei 30 °C im Heizblock inkubiert und dabei alle 10 min vorsichtig geschwenkt. Nach Zusatz von 20 μ l DMSO wurde der Transformationsansatz erneut geschwenkt, bei 42 °C für 15 min im Wasserbad inkubiert und nach jeweils 5 min gemischt.

Um die Zellen zu waschen wurde danach mit $16.100 \times g$ für 15 s (short spin) zentrifugiert und das Pellet in 1 ml YDPplus-Medium aufgenommen. Anschließend wurde erneut bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert und das resultierende Pellet mit 1 ml NaCl-Lösung resuspendiert. Die transformierten Zellen wurden schließlich auf SD-Agar ohne die entsprechenden auxotrophen Marker ausplattiert. Dazu wurde nicht nur unverdünnte Zellsuspension verwendet, sondern auch im Verhältnis 1:10- und 1:100-verdünnte Zellen, um die Existenz von einzeln liegenden Kolonien auf den Agarplatten sicherzustellen. Die Platten wurden bei 30 °C im Brutschrank für mehrere Tage inkubiert, bis Kolonien zu sehen waren.

Tab. 3.22: Lösungen für die Transformation.

Adenin-Stammlösung 0,2 %		
100 mg	L-Adenin Hemisulfat	0,20 % (m/V)
ad 50 ml	Wasser	
NaCl-Lösung 0,9 %		
900 mg	Natriumchlorid	0,90 % (m/V)
ad 100 ml	Wasser	
YPDA-Medium		
5,0 g	Yeast Extract	40 % (m/V)
10,0 g	Pepton	40 % (m/V)
25 ml	Glucose-Stammlösung	2,0 % (V/V)
7,50 ml	Adenin-Stammlösung	0,003 % (V/V)
ad 500 ml	Wasser	

3.2.5 Säure-gewaschene Glaskugeln

Säure-gewaschene Glaskugeln werden für die Herstellung eines Extraktes von Hefezellen benötigt. Die Menge an Glaskugeln (Durchmesser: 0,5 mm) wurde in einem Messzylinder abgemessen und in einen kleinen Iodzahlkolben überführt. Konzentrierte Salpetersäure wurde zugegeben, bis die Kugeln bedeckt waren, und für 2 h inkubiert. Danach wurde die konzentrierte Säure abdekantiert und die Glaskugeln zehnmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurden die Kugeln auf Alufolie ausgegossen und im Trockenschrank über Nacht bei 100 °C getrocknet. Nach Abkühlung wurden die Glaskugeln dicht verschlossen im Kühlschrank gelagert.

3.2.6 Zellextrakt

Um den Erfolg einer Transformation festzustellen, kann die Expression des Zielproteins in einem Zellextrakt von verschiedenen Klonen des neuen Hefestammes untersucht werden. Bei der Herstellung dieses Extraktes wird die rigide Zellwand der Hefen mit säure-gewaschenen Glaskugeln (siehe Kapitel 3.2.5) wie in einer Kugelmühle aufgebrochen. Die auf diese Weise aus der Zelle freigesetzten Proteine werden abschließend durch Zentrifugation von größeren Zellbruchstücken oder nicht zerstörten Zellen abgetrennt und im Weiteren mittels SDS-PAGE und Western Blot (Kapitel 3.1.4 und 3.1.6) auf das Vorhandensein des Zielproteins untersucht.

Tab. 3.23: Stammlösung für den Zellextrakt.

GBD-Stammlösung		pH 7,9 bei 4 °C
485 mg	Tris	20,0 mmol/l
407 mg	Magnesiumchlorid Hexahydrat	10,0 mmol/l
58,4 mg	EDTA	1,0 mmol/l
10 ml	Glycerol 100 %	5,0 % (V/V)
ad 200 ml	Wasser	

Durchführung

Um eine ausreichende Menge an Hefezellen für den Zellextrakt herzustellen, wurden mehrere Klone des Hefestammes in je 50 ml des entsprechenden SD-Mediums laut Kapitel 3.2.3 kultiviert. Bei einer OD_{600} von 1 wurden die Zellen mittels Zentrifugation mit $1500 \times g$ für 5 min bei 4 °C geerntet. Die Pellets wurden mit je 5 ml sterilem Wasser gewaschen und erneut bei den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt und das Gewicht jedes Pellets bestimmt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach bei -80 °C gelagert.

Die Stammlösung des Glass beads disruption (GBD)-Puffers wurde durch Lösen der in Tabelle 3.23 beschriebenen Substanzen in etwa 170 ml destilliertem Wasser vorbereitet. Dann wurde der pH-Wert der Lösung bei 4 °C mit 1 M HCl auf 7,9 eingestellt und die Stammlösung im Kühlschrank gelagert.

Die Fertigstellung des GBD-Puffers aus GBD-Stammlösung und instabilen Zusätzen (siehe Tabelle 3.24) geschah immer erst am Tag der Herstellung des Zellextraktes. Die Herstellung der verwendeten Standard-Proteaseinhibitor-Stammlösungen wird in Kapitel 3.2.9 beschrieben.

Für die Herstellung des Zellextraktes wurden die Hefezellen über Nacht im Kühlschrank aufgetaut. Die Volumina, die im Folgenden von den Glaskugeln bzw. dem GBD-Puffer eingesetzt wurden, standen in einem bestimmten Verhältnis zum zuvor ermittelten Gewicht des Pellets. Dabei entsprach das Gewicht des Pellets in Gramm dem sogenannten gepackten Zellvolumen in Millilitern. Dieses Volumen wird im folgenden mit „vol“ abgekürzt. Betrug zum Beispiel das Gewicht des Pellets 2 g, so entsprach 1 Volumeneinheit (vol) einem Volumen von 2 ml.

Alle Arbeiten wurden in der Kühlkammer bei 4 °C durchgeführt. Nach Entnahme einer Probe von 10 μ l wurden die verbliebenen Zellen mit 2 vol GBD-Puffer resuspendiert und auf Eis gestellt. 4 vol gekühlte, säure-gewaschene Glaskugeln wurden zugesetzt. Das Gefäß wurde so ausgewählt, dass das Endvolumen des Inhaltes 70 % des Gefäßvolumens nicht überstieg.

Tab. 3.24: Puffer für den Zellextrakt.

GBD-Puffer		
49,4 ml	GBD-Stammlösung	
7,7 mg	Dithiothreitol (DTT)	1,0 mmol/l
500 µl	PMSF-Lösung	1,0 mmol/l
36,5 µl	Pepstatin A-Lösung	2,0 µmol/l
52,2 µl	Leupeptin-Lösung	1,0 µmol/l
10 µl	Benzamidin-Lösung	1,0 mmol/l

Die Zellen wurden jetzt für 60 s bei maximaler Geschwindigkeit gevortext und dann für 3 min auf Eis inkubiert. Diese beiden Schritte wurden fünfmal wiederholt. Dann wurde mit Hilfe eines Mikroskops untersucht, ob die Zellen bereits vollständig aufgebrochen waren. Als Vergleich diente die am Anfang gezogene Probe der intakten Zellen. Da die Zellsuspension zu konzentriert war, wurden beide Proben 1:20 mit Wasser verdünnt.

Waren noch intakte Zellen vorhanden, wurde der oben beschriebene Vortex- und Inkubationsvorgang weitere fünfmal wiederholt und dann mittels Mikroskop auf vollständige Zerstörung der Zellen untersucht. Nachdem nahezu alle Hefezellen aufgebrochen waren, wurde der Überstand in einem Zentrifugenglas gesammelt. Die Kugeln wurden mit 2 vol GBD-Puffer gespült und der Überstand in das gleiche Zentrifugenglas überführt. Im vorgekühlten Festwinkelrotor JA25.50 wurde die Suspension schließlich mit $12.000 \times g$ für 60 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand entsprach dem Zellextrakt und wurde in 100 µl Aliquots bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zusätzlich wurde das Pellet in 500 µl GBD-Puffer resuspendiert und ebenfalls in 100 µl Aliquots bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

3.2.7 Wachstumskinetik

Um Hefestämme genauer zu charakterisieren, wurde eine Wachstumskinetik aufgenommen. Auf diese Weise konnte die Verdopplungszeit der Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt werden.

Dazu wurden Einzelkolonien von frischen SD-Agarplatten in je 50 ml flüssigem SD-Medium ohne die entsprechenden auxotrophen Marker überimpft und bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 230 rpm auf dem Orbital Shaker inkubiert. Zur Bestimmung des Wachstumsfortschritts wurden aseptisch Proben der Zellsuspension genommen und die optische Dichte bei 600 nm bestimmt. Um die Unterschätzung des Wachstumsfortschritts bei steigender Zelldichte zu umgehen, wurden die Proben wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben verdünnt, jedoch zusätzlich 40fach. Der zeitliche Abstand zwischen den Proben richtete sich nach dem Wachstum der Hefen. In der

exponentiellen Wachstumsphase wurden stündlich Proben genommen, in der lag- und der stationären Phase seltener.

Derjenige Messwert jeder Probe wurde in die Wachstumskinetik mit einbezogen, der unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der maximalen optischen Dichte entsprach. Die Absorptionswerte wurden gegen die Zeit aufgetragen und die Datenpunkte mit Hilfe der Gompertz-Gleichung [133] analysiert (GraphPad Prism[®] 5.0). Aus dem exponentiellen Teil der Kurve wurde dann die Verdopplungszeit berechnet.

3.2.8 Fed-Batch Kultivierung

Die Fed-Batch Kultivierung wird bei biotechnologischen Prozessen eingesetzt, um bei gleichem Kulturvolumen eine höhere Zelldichte zu erzielen. Auf diese Weise kann die Ausbeute an Biomasse deutlich erhöht werden. Bei der Standard-Kultivierungstechnik werden dem Medium von Anfang an alle Nährstoffe zugesetzt. Der Fed-Batch Prozess dagegen beinhaltet, dass in einem kleineren Startvolumen nicht sofort alle Nährstoffe enthalten sind, sondern dass diese der Kultur in mehreren Schritten hinzugefügt werden. Auch werden diese so eingesetzt, dass eine erhöhte Endkonzentration resultiert. In der vorliegenden Arbeit wurden zum Beispiel die Aminosäuren und die YNB-Mischung im SD-Medium dreifach höher konzentriert als bei einer normalen Kultivierung.

Durchführung

Zur Vorbereitung einer Fed-Batch Kultur mit einem Endvolumen von 10 l wurden 1,5 l Aminosäuren-Stammlösung 20X (statt 10X), 830 ml Glucose-Stammlösung und 3 l YNB-Stammlösung laut Kapitel 3.2.2 hergestellt. Sollte der BJ5456-Stamm verwendet werden, wurde ein Teil des zu autoklavierenden Wassers durch Glycerol 87 % ersetzt, so dass im Medium eine Endkonzentration von 10 % Glycerol resultierte.

Zunächst wurde eine kleine Vorkultur (50 ml) mit einer Einzelkolonie angeimpft und überwacht, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben. Hatte diese Vorkultur eine OD_{600} von 1 erreicht, wurde das gesamte Volumen für eine 1:10 Verdünnung in 450 ml frisches vorgewärmtes Medium überführt und weiterhin bei 30 °C und nun 200 rpm konstant geschüttelt.

Bei einer OD_{600} zwischen 0,8 und 1 wurde diese große Vorkultur durch Zentrifugation mit $1.000 \times g$ bei 4 °C für 4 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 100 ml frischem Medium resuspendiert und in den Fermenter überführt. Zuvor war der Fermenter mit 4100 ml Wasser autoklaviert, dann aseptisch mit 1500 ml Aminosäuren-Stammlösung,

330 ml Glucose-Stammlösung und 670 ml YNB-Stammlösung beschickt und auf 25 °C vorgewärmt worden.

Unter kontinuierlicher Kontrolle des Wachstumsfortschrittes wurde die Zellsuspension bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 1,2 kultiviert. Nun wurden 920 ml YNB-Lösung und 220 ml steriles Wasser zugesetzt. Bei einer OD₆₀₀ zwischen 1,6 und 1,8 wurden in einem zweiten Fütterungsschritt 500 ml Glucose-, 1380 ml YNB-Stammlösung und 320 ml Wasser hinzugefügt. Erreichte die Kultur eine optische Dichte von 2,4, wurde mit dem Ernte-Vorgang begonnen.

Zum Ernten der Fed-Batch Kultur wurde eine Pumpe an den Fermenter angeschlossen, mit deren Hilfe Zellsuspension in 500 ml Zentrifugengläser überführt werden konnte, ohne das das Durchmischen der Kulturlösung gestoppt werden musste. Die Hefezellen wurden für 10 min bei 4 °C mit 10.000 × g (Festwinkelrotor JLA-10.500) pelletiert und das resultierende Zellpellet sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nachdem das gesamte Kulturvolumen geerntet worden war, wurde die erhaltene Biomasse gewogen und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

3.2.9 Membranpräparation

Da es sich bei den beiden in den verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen exprimierten Proteinen ABCB1 und ABCG2 um membranständige Proteine handelte, wurde mit Hilfe einer Membranpräparation die Plasmamembran der Hefezellen gewonnen [103]. Dazu wurde in einem ersten Schritt die rigide Zellwand der Hefen mechanisch zerstört. Aus der resultierenden Suspension wurde die Zellmembran anschließend mittels differentieller Zentrifugation von den anderen Zellbestandteilen abgetrennt.

Durchführung

Zur Vorbereitung der Membranpräparation wurden die in den Tabellen 3.25 und 3.26 beschriebenen Stammlösungen hergestellt. Die Leupeptin- und die Pepstatin A-Lösung wurden nach der Herstellung aliquotiert, bei –20 °C gelagert und bei Bedarf aufgetaut. Die PMSF-Lösung konnte am Tag vor der Membranpräparation hergestellt werden. Dazu wurde PMSF eingewogen, bei 40 °C in Isopropanol gelöst und dann bis zur Verwendung mit Parafilm versiegelt und unter Lichtausschluss bei RT gelagert. Die Benzamidin-Lösung wurde immer frisch am Tag der Membranpräparation hergestellt und stets auf Eis gekühlt.

Die weiteren in Tabelle 3.27 dargestellten Pufferlösungen wurden am Tag vor der Membranpräparation vorbereitet. Für den Homogenisationspuffer wurden die beiden Feststoffe eingewogen und in etwa 400 ml Wasser gelöst. Die mit einem Stern gekennzeichneten Stammlösungen wurden zugesetzt und der so vorbereitete Puffer im Kühlschrank gelagert. Kurz vor Verwendung wurden die weiteren Bestandteile zugegeben, mit kaltem Wasser auf 500 ml ergänzt und ab diesem Zeitpunkt stets auf Eis gekühlt. Zur Herstellung des Wasch- und des Lagerpuffers wurden ebenfalls die mit einem Stern gekennzeichneten Bestandteile gemischt, kühl gelagert und dann bei Bedarf mit den anderen Stammlösungen ergänzt.

Alle gefrorenen Hefezellen, die mittels Fed-Batch Kultivierung hergestellt worden waren, wurden in 300 ml kaltem Wasser und 5 ml PMSF-Lösung unter Rühren aufgetaut. Nach Zentrifugation der Zellen bei $15.000 \times g$ und 4 °C für 10 min (Festwinkelrotor JLA-10.500) wurde das resultierende Pellet in Homogenisationspuffer aufgenommen und zu den zirkonisierten Glaskugeln in die vorgekühlte Beadbeater Kammer gegeben. Der pH-Wert wurde mit Tris-Base auf 7,5 justiert, 31 μl Diisopropylfluorophosphat (DFP) zugesetzt und die Zellen für 4 min aufgeschlossen. Danach ruhte die Kammer für 4 min auf Eis. Ab DFP-Zugabe wurden die beschriebenen Schritte noch zweimal wiederholt, dann wurde erneut der pH auf 7,5 eingestellt.

Der Überstand wurde anschließend bei 4 °C zuerst für 5 min bei $3.500 \times g$ („Zentrifugation 1“) und dann für 20 min bei $14.000 \times g$ zentrifugiert („Zentrifugation 2“). Alle folgenden Schritte wurden in der Kühlkammer bei 4 °C ausgeführt. Die Zellmembranen, die sich im Überstand der zweiten Zentrifugation befanden, wurden in der Ultrazentrifuge bei 4 °C für 80 min mit $200.000 \times g$ pelletiert („Ultrazentrifugation 1“) und alle Pellets in einem Glashomogenisator vereinigt. Danach wurden die Zentrifugengläser sorgfältig mit Waschpuffer gespült, diese Flüssigkeit ebenfalls in den Homogenisator überführt und die gesamte Suspension durch 10 Hübe bei 1500 Upm homogenisiert.

Durch erneute Ultrazentrifugation unter den zuletzt genannten Bedingungen („Ultrazentrifugation 2“) wurden die Zellmembranen wieder pelletiert, wie beschrieben homogenisiert und bei -80 °C eingefroren. Jedoch wurde für diesen Schritt statt des Waschpuffers der Lagerpuffer verwendet.

Tab. 3.25: Stammlösungen für die Membranpräparation von Hefezellen.

EDTA-Na Lösung 200 mM			pH 8,0 bei RT
29,22 g	EDTA		200,0 mmol/l
ad 500 ml	Wasser		
EGTA-Na Lösung 200 mM			pH 8,0 bei RT
38,04 g	EGTA		200,0 mmol/l
ad 500 ml	Wasser		
Sterile Glycerol-Lösung 50 %			
250 ml	Glycerol 100 %		50,0 % (V/V)
ad 500 ml	Wasser		
Tris-HCl-Lösung 1 M			pH 7,5 bei 4 °C
12,1 g	Tris		1,00 mol/l
ad 100 ml	Wasser		
Tris-Base 1 M			
12,1 g	Tris		1,00 mol/l
ad 100 ml	Wasser		

Tab. 3.26: Lösungen der Standard-Proteaseinhibitoren.

PMSF-Lösung 0,1 M			
261 mg	Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)		0,10 mol/l
ad 15 ml	Isopropanol p.a.		
Benzamidin-Lösung 0,5 M			
196 mg	Benzamidin HCl		0,50 mol/l
ad 2,5 ml	Wasser		
Leupeptin-Lösung 1 mM			
4,8 mg	Leupeptin Hemisulfat		1,0 mmol/l
ad 10 ml	Dimethylsulfoxid (DMSO)		
Pepstatin A-Lösung 2 mM			
13,7 mg	Pepstatin A		2,00 mmol/l
ad 10 ml	DMSO/Eisessig (9:1)		

Tab. 3.27: Puffer für die Membranpräparation von Hefezellen. (Die mit * gekennzeichneten Bestandteile können am Tag vor der Membranpräparation zusammengemischt werden.)

Homogenisationspuffer		
2,5 g	Albumin (BSA)	5 mg/ml
51,35 g	Saccharose	0,3 mol/l
12,5 ml	EDTA-Na pH 8*	5 mmol/l
2,5 ml	EGTA-Na pH 8*	1 mmol/l
25 ml	Tris-HCl pH 7,5*	50 mmol/l
800 μ l	β -Mercaptoethanol	25 mmol/l
500 μ l	Leupeptin-Lösung	1 μ mol/l
500 μ l	Pepstatin A-Lösung	2 μ mol/l
1 ml	Benzamidin-Lösung	1 mmol/l
5 ml	PMSF-Lösung	1 mmol/l
87 μ l	Diisopropylfluorophosphat (DFP)	1 mmol/l
ad 500 ml	Wasser	
Waschpuffer		
1,8 ml	EGTA-Na pH 8*	1 mmol/l
3,6 ml	Tris-HCl pH 7,5*	10 mmol/l
72 ml	Glycerol 100 %*	10 % (V/V)
277,5 ml	Wasser*	
51 μ l	β -Mercaptoethanol	2 mmol/l
360 μ l	Leupeptin-Lösung	1 μ mol/l
360 μ l	Pepstatin A-Lösung	2 μ mol/l
720 μ l	Benzamidin-Lösung	1 mmol/l
3,6 ml	PMSF-Lösung	1 mmol/l
63 μ l	Diisopropylfluorophosphat (DFP)	1 mmol/l
Lagerpuffer		
250 μ l	EGTA-Na pH 8*	1 mmol/l
500 μ l	Tris-HCl pH 7,5*	10 mmol/l
25 ml	Glycerol 100 %*	25 % (V/V)
23,7 ml	Wasser*	
7 μ l	β -Mercaptoethanol	2 mmol/l
500 μ l	PMSF-Lösung	1 mmol/l

3.2.10 Bestimmung der Expression von ABCB1

Die apparente Expression von ABCB1 in den in Kapitel 3.2.9 isolierten Hefemembranen von BJ5457-MDR1 kann mit Hilfe eines modifizierten ATPase Assays nach Figler *et al.* [103] bestimmt werden. Bei einer Untersuchung der präparierten Membranen mittels des in Kapitel 3.1.9 beschriebenen Assays würden jedoch andere Membran-ATPasen, insbesondere die in Hefemembranen am häufigsten vorkommende Plasmamembran-ATPase 1 (PMA1), das Messergebnis verfälschen.

Um dieses Problem zu umgehen, wird die Aktivität der Membranpräparation bei zwei verschiedenen pH-Werten (7,4 und 8,5) durchgeführt. Dabei wird ausgenutzt, dass ATPasen bei verschiedenen pH-Werten eine unterschiedliche Aktivität aufweisen [134]. Bei pH 7,4 wird die Gesamt-ATPase-Aktivität in den Hefemembranen bestimmt, in der die basale Aktivität von ABCB1 enthalten ist. Bei pH 8,5 ist PMA1 nahezu inaktiv und es wird hauptsächlich die Aktivität von ABCB1 (stimuliert durch 80 μ M Verapamil) wird gemessen.

Durchführung

Für die Bestimmung der apparenten ABCB1 Expression in den Membranen wurden die Basis Assay Puffer ABCB1 I (Tabelle 3.14) und II (Tabelle 3.28) verwendet. Der Basis Assay Puffer ABCB1 II wurde analog zum Basis Assay Puffer ABCB1 I hergestellt (siehe Kapitel 3.1.9).

Aus diesen beiden Basis-Puffern wurden zwei verschiedene Reaktionspuffer hergestellt: Der eine Reaktionspuffer bestand aus Basis Puffer I (1X), 2 mM Natriumazid und 10 mM ATP. Der andere Reaktionspuffer setzte sich aus Basis Puffer II (1X), 2 mM Natriumazid und 10 mM ATP und zusätzlich 80 μ M Verapamil zusammen. Die ATPase Aktivität von 1 μ l Membranfraktion (etwa 20 μ g Gesamtprotein) wurde in Triplikaten in beiden Puffern wie in Kapitel 3.1.9 bestimmt. Dabei wurden jedoch die Proben zu anderen Zeitpunkten gezogen: aus Basis Assay Puffer I alle 3 min, aus Basis Assay Puffer II alle 15 min.

Die gemessenen Absorptionswerte wurden gemittelt, daraus wurde die spezifische Aktivität S in beiden Pufferlösungen errechnet. Nun konnte durch Einsetzen der Werte in Gleichung 3.2 die basale ABCB1 Aktivität B als freigesetztes P_i /mg/min berechnet werden:

$$B = \frac{S_{\text{Puffer II}} - 0,038 \cdot S_{\text{Puffer I}}}{4,562} \quad [\mu\text{mol } P_i/\text{mg}/\text{min}] \quad (3.2)$$

Tab. 3.28: Puffer für die Bestimmung der ABCB1 Expressionsrate.

Basis Assay Puffer ABCB1 II (2X)		pH 8,5 bei 37 °C
0,97 g	Tris	80,0 mmol/l
1,48 g	Magnesiumsulfat Heptahydrat	60,0 mmol/l
0,1 ml	EGTA-Na 200 mM	0,2 mmol/l
ad 100 ml	Wasser (MilliQ)	

Reines ABCB1 weist eine basale Aktivität von $0,7 \mu\text{mol P}_i/\text{mg}/\text{min}$ auf [103]. Anhand dessen konnte nun mit Hilfe der experimentell bestimmten basalen Aktivität B die apparente Expressionsrate bestimmt werden.

3.2.11 Funktionelle Untersuchung in lebenden Hefen

Um die Funktionsfähigkeit der exprimierten Membranproteine in lebenden Hefezellen zu untersuchen, wurden die Zellen in Gegenwart von Substraten von ABCB1 bzw. ABCG2 kultiviert. Über die Bestimmung der Wachstumsrate wurde untersucht, ob diese Substrate durch vermehrten Efflux aus transformierten Hefen für diese Stämme weniger toxisch sind als für die Wildtyp-Stämme [135].

Vorbereitung

Zur Herstellung einer Vorkultur wurde der jeweilige Hefestamm wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben bis zu einer OD_{600} von 1 kultiviert.

Untersuchung der Wachstumsrate

Mehrere Ansätze mit je 9 ml frischem SD-Medium wurden vor Versuchsbeginn hergestellt. Für die Kontrollmessung und für jedes untersuchte Substrat wurden jeweils drei Ansätze vorgewärmt. Nun wurde jedem Ansatz 1 ml der Vorkultur zugesetzt und die Kulturlösung für 60 min geschüttelt. In dieser Zeit wurde nach 0 und 30 min die OD_{600} bestimmt und nach weiteren 30 min das jeweilige Substrat zugegeben. Zu den Zeitpunkten 0, 60, 120, 180, 240 und 300 min wurden Proben mit einem Volumen von 700 μl gezogen und die OD_{600} gemessen.

Zur Auswertung wurden die für jeden Ansatz bestimmten Absorptionswerte gemittelt und zusammen mit der Standardabweichung gegen die Zeit aufgetragen.

3.2.12 Detergenzscreening für ABCG2

Jedes aufzureinigende Membranprotein besitzt individuelle Eigenschaften, zum Beispiel die Verankerung in der Membran betreffend. Aufgrund dessen existieren für jedes Protein unterschiedliche Detergenzien, welche es in seiner nativen und aktiven Konformation aus der Membran herauszulösen vermögen. Um ein geeignetes Detergenz zu finden, wurden 16 nicht-ionische oder zwitterionische Detergenzien auf ihre solubilisierenden Eigenschaften bezüglich ABCG2 untersucht. Die Versuchsbedingungen für dieses Solubilisationsexperiment wurden der Literatur entnommen [136].

Durchführung

Für das Screening wurden die folgenden Detergenzien eingesetzt: 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propansulfonat (CHAPS), 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-2-hydroxy-1-propansulfonat (CHAPSO), Brij 35, Brij 58, Triton-X-100, n-Decyl- β -D-maltopyranosid (DM), n-Dodecyl- β -D-maltopyranosid (DDM), n-Octyl- β -D-glucopyranosid (OG), Fos-cholin 12 (FC-12), Fos-cholin 13 (FC-13), Fos-cholin 14 (FC-14), Fos-cholin 15 (FC-15), Fos-cholin 16 (FC-16), Cymal 5, Cymal 6 und Cymal 7.

Ein Solubilisationsansatz enthielt je 5 mg Hefemembranen und 1 % des jeweiligen Detergenzes und wurde mit dem in Kapitel 3.2.13 beschriebenen Solubilisationspuffer auf 1 ml aufgefüllt. Die Ansätze wurden in dicht verschlossenen Reaktionsgefäßen unter vorsichtigem Schwenken für 60 min bei 4 °C in der Kühlkammer inkubiert. Solubilisiertes und nicht-solubilisiertes Material wurde mittels Ultrazentrifugation (300.000 \times g, 30 min, 4 °C) getrennt. Der Überstand wurde aliquotiert, das Pellet in detergent-freiem Puffer resuspendiert und ebenfalls aliquotiert. Alle auf diese Weise erhaltenen Proben wurden auf Trockeneis bei -80 °C eingefroren und im weiteren mittels Western Blot auf das Vorhandensein von ABCG2 untersucht.

3.2.13 Aufreinigung von ABCB1 und ABCG2

ABCB1 wurde mit der Methode von Urbatsch *et al.* [88] aufgereinigt, die von Figler und Mitarbeitern [103] weiterentwickelt wurde. Diese Methode wurde im Rahmen der vorliegenden

Arbeit auf ABCG2 übertragen und durch einige Änderungen optimiert.

Eine Aufreinigung erfolgt in mehreren Schritten: zuerst wird das jeweilige Protein mit einem geeigneten Detergenz aus den Hefemembranen solubilisiert. Anschließend wird es durch Affinitätschromatographie aufgereinigt und schließlich in einer definierten Lipidumgebung rekonstituiert. Bei allen Schritten ist es wichtig, dass das Protein in seiner nativen Konformation verbleibt. Nur so behält es seine Funktionalität und kann anschließend für weitere Untersuchungen eingesetzt werden [137].

Die Solubilisation eines Membranproteins kann in drei Phasen eingeteilt werden [138]. Der Vorgang beginnt mit einer Destabilisierung der Membran durch Einlagerung von Detergenzmolekülen. Dann werden Fragmente bestehend aus Protein und assoziierten Phospholipiden aus der Membran herausgelöst, an deren Rändern sich Detergenz angelagert hat. Schließlich werden die Phospholipide nahezu vollständig durch Detergenz ersetzt und das gewünschte Protein geht in Lösung. Zusätzlich werden allerdings noch weitere Proteine solubilisiert.

Das Zielprotein kann nun mit Hilfe der Metall-Chelat-Affinitätschromatographie von den anderen ebenfalls solubilierten Proteinen getrennt werden [139]. Dazu werden verschiedene Harze eingesetzt, an deren Oberfläche Nickel- oder Cobalt-Ionen immobilisiert sind. Besitzt das aufzureinigende Protein einen Histidin-Tag aus mindestens 6 Histidin-Molekülen, so kann dieser Tag koordinativ an die immobilisierten Kationen binden. In dieser Arbeit wurde das sogenannte Batch-Verfahren verwendet. Dabei wird das Harz zuerst mit der Proteinlösung inkubiert und dann in eine Säule überführt. Nicht oder nur schwach gebundene Proteine werden in Gegenwart geringer Imidazol-Konzentrationen herausgewaschen. Imidazol kann Histidin aus seiner Chelatbindung verdrängen. Durch Zugabe hoher Imidazol-Mengen wird das gewünschte Protein schließlich vom Harz eluiert.

Um das aufgereinigte Protein funktionell untersuchen zu können, muss es wieder in eine membranartige Umgebung eingebettet werden. Hierbei findet eine Art umgekehrte Solubilisation statt [140]. Zum Protein wird eine definierte Lipidmischung zugesetzt. Anschließend werden an das Protein gebundene Detergenzmoleküle durch Dialyse entfernt und wieder durch Lipide ersetzt. Während der Dialyse bilden sich Liposomen, in denen das Protein funktionsfähig eingebaut und somit rekonstituiert wird. Diese Liposomen werden auch als Proteoliposomen bezeichnet.

Herstellung der Stamm- und Pufferlösungen

Für die Vorbereitung der Aufreinigung wurden die in der Tabelle 3.29 beschriebenen Stammlösungen hergestellt. Der pH-Wert wurde jeweils mit 1 M HCl eingestellt. Natriumsulfat wur-

Tab. 3.29: Stammlösungen für die Aufreinigung aus Hefemembranen.

Imidazol-Lösung		pH 8,0 bzw. pH 7,4 bei 4 °C
13,6 g	Imidazol	2,00 mol/l
ad 100 ml	Wasser	
Tris/Glycerol-Lösung (2X)		pH 8,0 bzw. pH 7,4 bei 4 °C
3,05 g	Tris	50,0 mmol/l
200 ml	Glycerol 100 %	40,0 % (V/V)
ad 500 ml	Wasser	
Magnesiumsulfat-Lösung		
24,7 g	Magnesiumsulfat Heptahydrat	1,00 mol/l
ad 100 ml	Wasser	
Natriumsulfat-Lösung		
161 g	Natriumsulfat Decahydrat	2,00 mol/l
ad 250 ml	Wasser	

de in der Hitze unter Rühren gelöst und nach dem Abkühlen zum Entfernen von Kristallisationskeimen sterilfiltriert. Zusätzlich wurden die Lösungen der Standard-Proteaseinhibitoren und der Tris-Base 1 M aus Kapitel 3.2.9 verwendet.

Diese Stammlösungen wurden am Tag vor der Aufreinigung für die Herstellung der weiteren in den Tabellen 3.30 und 3.31 beschriebenen Pufferlösungen verwendet. Die mit einem Stern gekennzeichneten Lösungen wurden gemischt, für 30 min entgast und danach für weitere 30 min mit Argon gespült. Nun wurden die Gefäße mit Parafilm versiegelt und bis zum nächsten Tag im Kühlschrank gelagert. Kurz vor Verwendung wurden die weiteren Bestandteile zugesetzt und ab diesem Zeitpunkt stets auf Eis gekühlt.

Am Tag der Aufreinigung wurden zweimal 5 l des Rekonstitutionspuffers (Tabelle 3.32) hergestellt. Dazu wurden Tris, EGTA und 6-Aminohexansäure in vorgekühltem Wasser gelöst und der pH-Wert eingestellt. Kurz vor Verwendung wurde dann jeweils DTT als Feststoff zugegeben.

Solubilisation

Die Membranpräparation aus Kapitel 3.2.9 wurde auf Eis aufgetaut. Alle folgenden Arbeitsschritte der Aufreinigung wurden in der Kühlkammer bei 4 °C durchgeführt. Nach Fertigstellung des Solubilisationspuffers wurden unter Rühren zuerst die Hefemembranen und dann das Detergenz zugegeben.

Tab. 3.30: Puffer für die Solubilisierung aus Hefemembranen. (Die mit * gekennzeichneten Bestandteile können am Tag vor der Membranpräparation zusammengemischt werden.)

Solubilisierungspuffer		
175 ml	Tris/Glycerol-Lösung pH 8,0*	1X
880 µl	Imidazol-Lösung pH 8,0*	1,0 mmol/l
350 µl	Magnesiumsulfat-Lösung*	1,0 mmol/l
8,75 ml	Natriumsulfat-Lösung*	50,0 mmol/l
124 ml	Wasser*	
25 µl	β -Mercaptoethanol	1,0 mmol/l
350 µl	Leupeptin-Lösung	1,0 µmol/l
350 µl	Pepstatin A-Lösung	2,0 µmol/l
700 µl	Benzamidin-Lösung	1,0 mmol/l
3,5 ml	PMSF-Lösung	1,0 mmol/l
61 µl	Diisopropylfluorophosphat (DFP)	1,0 mmol/l
875 µl	ATP-Lösung (400 mmol/l)	1,0 mmol/l
35 ml	Membranpräparation (20 mg/ml)	2,0 mg/ml

Zur Solubilisierung der beiden Membranproteine ABCB1 und ABCG2 wurden sowohl verschiedene Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet, als auch unterschiedliche Mengen an Gesamtprotein eingesetzt. Für ABCB1 betrug die Ausgangsprotein-konzentration jedoch stets 2 mg/ml. Die Solubilisierungszeit war für beide Proteine ebenfalls verschieden. ABCB1 wurde stets für 20 min solubilisiert, ABCG2 für 20 oder 60 min. Eine genaue Beschreibung der untersuchten Versuchsbedingungen für ABCG2 und ABCB1 findet sich in den jeweiligen Kapiteln im Ergebnisteil (ABCB1: Kapitel 4.1.4, ABCG2: Kapitel 4.3.5 und 4.3.7).

Nach Ende des Solubilisierungsvorgangs wurden die nicht solubilisierten Bestandteile mittels Ultrazentrifugation (2 °C, 70 min, 100.000 × g) pelletiert und verworfen. Der Überstand wurde für die Affinitätschromatographie verwendet.

Affinitätschromatographie

Zur Vorbereitung der Affinitätschromatographie wurde pro 40 mg an eingesetztem Protein 1 ml des Nickel-Harzes (Ni-NTA) mit Tris/Glycerol-Lösung pH 8,0 (1X) äquilibriert, bis die durchfließende Lösung einen pH-Wert von 8,0 hatte. Bei Verwendung des Cobalt-Harzes zur Aufreinigung von ABCG2 wurde pro 25 mg Protein ein Volumen von 1 ml Harz eingesetzt und auf die gleiche Weise äquilibriert.

Tab. 3.31: Puffer für die Affinitätschromatographie. (Die mit * gekennzeichneten Bestandteile können am Tag vor der Membranpräparation zusammengemischt werden.)

Waschpuffer		
180,0 ml	Tris/Glycerol-Lösung pH 8,0*	1X
9,0 ml	Imidazol-Lösung pH 8,0*	50 mmol/l
720 µl	Magnesiumsulfat-Lösung*	2,0 mmol/l
36,0 ml	Natriumsulfat-Lösung*	200 mmol/l
95,0 ml	Wasser*	
25 µl	β -Mercaptoethanol	1,0 mmol/l
360 µl	Leupeptin-Lösung	1,0 µmol/l
360 µl	Pepstatin A-Lösung	2,0 µmol/l
720 µl	Benzamidin-Lösung	1,0 mmol/l
3,6 ml	PMSF-Lösung	1,0 mmol/l
1,8 ml	ATP-Lösung (400 mmol/l)	2,0 mmol/l
25,2 ml	OG-Stammlösung	1,4 % (V/V)
7,2 ml	Gemischte Lipide	0,1 % (V/V)
Elutionspuffer		
36,0 ml	Tris/Glycerol-Lösung pH 7,4*	1X
9,00 ml	Imidazol-Lösung pH 7,4*	250 mmol/l
140 µl	Magnesiumsulfat-Lösung*	2,0 mmol/l
1,8 ml	Natriumsulfat-Lösung*	50 mmol/l
13,2 ml	Wasser*	
10 µl	β -Mercaptoethanol	1,0 mmol/l
720 µl	PMSF-Lösung	1,0 mmol/l
360 µl	ATP-Lösung (400 mmol/l)	2,0 mmol/l
5,00 ml	OG-Stammlösung	1,40 % (V/V)
5,76 ml	Gemischte Lipide	0,40 % (V/V)

Der Überstand der Ultrazentrifugation wurde mit Natriumsulfat-Lösung auf eine Endkonzentration von 200 mM eingestellt. Nun wurde der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls mit Tris-Base auf 8,0 justiert. Dann wurde das jeweilige Harz zugegeben und die verbleibende Luft durch Argon ausgetauscht. Unter langsamem Rühren wurde die Suspension für 5 h inkubiert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Harz in Chromatographiesäulen überführt und der Überstand mit einer Fließgeschwindigkeit von einem Tropfen pro Sekunde abgelassen. Das Harz in der Säule wurde im Anschluss mit einem Volumen Waschpuffer gewaschen, das dem 20fachen Volumen des Harzbettes entsprach. Um das gebundene Protein zu eluieren, wurde das Harz zuerst dreimal mit dem doppelten Harzvolumen an Elutionspuffer behandelt, dabei wurde der Puffer immer wieder auf die Säule gegeben. Im Anschluss wurde noch einmal mit dem gleichen Volumen an frischem Elutionspuffer eluiert und die Flüssigkeiten vereinigt.

Tab. 3.32: Puffer für die Rekonstitution mittels Dialyse.

Rekonstitutionspuffer		pH 7,4 bei 4 °C
30,0 g	Tris	50,0 mmol/l
1,9 g	EGTA	1,0 mmol/l
3,3 g	6-Aminohexansäure	5,0 mmol/l
0,77 g	Dithiothreitol (DTT)	1,0 mmol/l
ad 5000 ml	Wasser	

Rekonstitution

Zur Vorbereitung der Dialyse wurden die Dialyseschläuche (1 cm Schlauch pro 2 ml Eluat) in Wasser vorgequollen. Das Gesamteluat wurde mit DTT-Lösung 1 M auf eine Endkonzentration von 2 mM eingestellt, in die Schläuche überführt und sorgfältig verschlossen. Nun wurde das Eluat für 12 h gegen ein Volumen von 5 l Rekonstitutionspuffer dialysiert. Dieses Volumen entsprach etwa dem 70fachen Volumen des Eluats. Nach Ablauf von 12 h wurden die Dialyseschläuche in 5 l frischen Rekonstitutionspuffer überführt und die Dialyse für weitere 5 h fortgesetzt. Dann wurden die bei der Dialyse entstandenen Proteoliposomen mittels Ultrazentrifugation für 3 h bei $186.000 \times g$ und 2 °C pelletiert.

Um eine homogene Suspension zu erhalten wurde das Pellet mit Rekonstitutionspuffer (ohne DTT) aufgenommen und mit Hilfe eines 2 ml Glashomogenisators durch 4 Hübe bei 750 Upm homogenisiert. Schließlich wurde die Liposomensuspension aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

3.2.14 Größenbestimmung der Proteoliposomen

Um den Durchmesser der bei der Dialyse entstandenen Proteoliposomen zu untersuchen, wurde die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) eingesetzt. Mit Hilfe dieses optischen Messverfahrens kann die Größe kleiner Partikel mit einem Durchmesser zwischen 5 und 5000 nm bestimmt werden. Das Verfahren nutzt die Streuung von Laserlicht durch diese Partikel aus. Wenn monochromatisches Licht auf einen Partikel trifft, verursacht dieser eine Lichtstreuung, die von einem Photomultiplier detektiert werden kann. Kleine Teilchen streuen über eine bestimmte Zeitspanne immer wieder in kurzen Abständen Photonen zum Detektor. Durch größere Teilchen dagegen resultiert eine Streuung, deren Lichtintensität über längere Zeit konstant bleibt. Betrachtet man also die zeitliche Verteilung der Detektionsereignisse, so kann auf die Größe der streuenden Partikel geschlossen und auch die Größenverteilung (Polydispersität) bestimmt werden.

Durchführung

5–20 µl der Liposomensuspension wurden in 1 ml sterilfiltrierte NaCl-Lösung 0,9 % gegeben und sorgfältig gemischt und am Malvern Autosizer 2c vermessen. Das Gerät bestimmt die Größe der Partikel und die Größenverteilung durch 10 Messungen, diese Bestimmung wird dreimal durchgeführt und daraus schließlich der Mittelwert berechnet.

3.2.15 Aktivitätsbestimmung der aufgereinigten Proteine

Um zu überprüfen, ob die in Kapitel 3.2.13 aufgereinigten und rekonstituierten ABC-Transporter noch aktiv waren, wurde der ATPase Assay aus Kapitel 3.1.9 verwendet. Es wurde ein Faktor für die Aktivierbarkeit des Proteins durch eine Standardsubstanz im Verhältnis zur basalen Aktivität bestimmt.

Für ABCB1 wurde als Standard-Stimulator Verapamil in einer Konzentration von 130 µM eingesetzt. Diese Konzentration wurde ausgewählt, da sie zu einer maximalen Stimulation des Proteins führt.

Als Standard-Stimulator für ABCG2 wurde 100 µM Prazosin verwendet. Da ABCG2 eine relativ hohe basale ATPase Aktivität aufweist [65, 67, 112], wurden zusätzlich Aktivitätswerte in Anwesenheit von 1 mM Vanadat gemessen. Die Phosphat-Entstehung, die nicht auf eine Aktivität von ATPasen zurückzuführen war, wurde auf diese Weise bestimmt und in der Auswertung von den Messwerten sowohl für die basale als auch für die stimulierte Aktivität abgezogen. Die Ergebnisse wurden als Vanadat-sensitive ATPase Aktivität dargestellt.

Durchführung

Zur Vorbereitung der Aktivitätsbestimmung wurden der Reaktionspuffer, die Verdünnungen der Standardsubstanzen und die Proben für die Phosphat-Kalibriergerade so hergestellt, wie in Kapitel 3.1.9 beschrieben. Für ABCG2 wurde der Basis Assay Puffer ABCG2 verwendet, für ABCB1 der Basis Assay Puffer I. Vor Verwendung der Vanadat-Lösung (siehe Tabelle 3.33) wurde diese für 2 min im auf 99 °C vorgewärmten Thermostat erhitzt. Im Unterschied zum Standard-Assay wurden die zu untersuchenden Substanzen jeweils dem Assaypuffer zugesetzt und die einzelnen Reaktionen in Triplikaten untersucht.

Für die Aktivitätsbestimmung wurde die Versuchsdurchführung gegenüber dem Standard-ATPase Assay leicht modifiziert. Zunächst wurde jeweils 1 ml der verschiedenen Reaktionspuffer für 10 min auf 37 °C vorgewärmt. In dieser Zeit wurde das Protein mit Hilfe einer

Tab. 3.33: Lösung für die Aktivitätsbestimmung von ABCG2.

Vanadat-Lösung 10 mM		
5,5 mg	Natriumorthovanadat	10 mmol/l
ad 3 ml	Wasser	

10 μ l Hamiltonspritze in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, die weiterhin auf Eis gekühlt wurden. Im Falle von ABCB1 wurde 1 μ g Protein eingesetzt, für ABCG2 5 μ l der Proteoliposomen-Suspension.

Zum Starten der Enzymreaktion wurde der Reaktionspuffer zum Protein gegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 250 μ l resultierte. Zu den Zeitpunkten 0, 20, 40 und 60 min wurden aus jedem Ansatz Proben mit einem Volumen von 50 μ l gezogen, zum Stoppen der Reaktion in eiskalte EDTA-Lösung gegeben und bis zur Detektion auf Eis gekühlt. Die Detektionsreaktionen erfolgten analog zum Standard-Assay.

Die Freisetzung von P_i über die Zeit und die daraus resultierenden spezifischen Aktivitätswerte wurden berechnet wie in Kapitel 3.1.9 beschrieben. Die Ergebnisse wurden als spezifische Aktivität (freigesetztes P_i /mg/min) oder als relative Vanadat-sensitive ATPase Aktivität (relative Einheiten) dargestellt. Zur Berechnung des Aktivierungsfaktors wurde der Quotient aus stimulierter und basaler Aktivität gebildet.

3.2.16 CHAPS-Assay

Zur weiteren Charakterisierung von aufgereinigtem, rekonstituiertem ABCB1 wurde die Ausrichtung der Proteinmoleküle nach Einbau in die Liposomen bestimmt. Dazu wurde der CHAPS Assay verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Modifizierung des ATPase Assays aus Kapitel 3.1.9.

Das aufgereinigte Protein wird durch den Zusatz von 130 μ M Verapamil voll stimuliert. Zusätzlich wird das Detergenz CHAPS in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Dieses ist in der Lage, ab einer bestimmten Konzentration die Proteoliposomen zu zerstören. Bei geringen CHAPS-Konzentrationen wird also nur die Aktivität jener ATP-Bindungsstellen gemessen, die nach außen gerichtet in die künstliche Membran der Liposomen eingebaut worden sind. Ab einer CHAPS-Konzentration oberhalb seiner kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) von 9 mmol/l werden die Liposomen durch das Detergenz aufgebrochen, so dass nun auch die Aktivität der ABCB1 Moleküle bestimmt werden kann, deren Nukleotidbindungsstellen zuvor im Inneren der Liposomen eingeschlossen waren.

Aus diesen Messwerten kann schließlich der prozentuale Anteil der nach außen gerichteten ATP-Bindungsstellen berechnet werden.

Durchführung

Aus dem Basis Assay Puffer ABCB1 I (Tabelle 3.14) wurden zwei verschiedene Reaktionspuffer hergestellt. Für den einen Reaktionspuffer wurde dem Basis Puffer 20 % Glycerol (V/V) zugesetzt. Der andere Reaktionspuffer beinhaltet neben 20 % Glycerol (V/V) zusätzlich 25 mmol/l CHAPS. Durch Mischen der beiden Reaktionspuffer in unterschiedlichem Verhältnis wurden zehn verschiedene CHAPS-Konzentrationen eingestellt (0; 2; 4; 6; 7,5; 10; 12,5; 15; 20; 25 mM). Die spezifische ATPase Aktivität wurde wie in Kapitel 3.1.9 beschrieben ermittelt. Dabei wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 1 µg aufgereinigtem ABCB1 gestartet und alle 20 min Proben entnommen. Es wurden Duplikate von jeder CHAPS-Konzentration untersucht.

Die mittlere spezifische Aktivität der Proben wurde gegen die CHAPS-Konzentration aufgetragen. Anschließend wurde für die Konzentrationsbereiche von 0–7,5 mmol/l (nach außen gerichtete NBDs) und von 12,5–25 mmol/l CHAPS (alle NBDs) unabhängig voneinander eine nicht-lineare Regression über die Gleichung „one phase exponential decay“ (GraphPad Prism[®] 5.0) durchgeführt. Daraus resultierten zwei verschiedene Funktionen.

Im nächsten Schritt wurde die ATPase Aktivität S bei einer CHAPS-Konzentration von 7,5 mmol/l mit Hilfe der beiden Funktionen berechnet und der Quotient aus den beiden Aktivitäten berechnet ($S_{\text{Funktion 1}}/S_{\text{Funktion 2}}$). In einem weiteren Schritt wurde dieser Quotient auch für die CHAPS-Konzentration von 12,5 mmol/l bestimmt. Aus beiden Quotienten wurde der Mittelwert berechnet und dieser mit dem Faktor 100 multipliziert. Auf diese Weise ergab sich der prozentuale Anteil der nach außen gerichteten ATP-Bindungsstellen.

3.3 Arbeiten mit Insektenzellen

3.3.1 Zelllinien und Baculovirus

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden Insektenzelllinien Sf9 und High Five (Hi5) für die Expression von humanem ABCG2 verwendet. Beide Zelllinien basieren ursprünglich auf Ovarzellen von Larven verschiedener Eulenfalter-Arten. Sf9 Zellen stammen aus *Spodoptera frugiperda*, Hi5 Zellen aus *Trichoplusia ni*, deren Larve auch Kohlspanner-Raupe genannt wird. Insektenzellen werden zur Produktion von rekombinanten Proteinen eingesetzt und können adhärent oder als Suspension in serum-freiem Medium kultiviert werden.

Das in dieser Arbeit verwendete Baculovirus ist ein *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) vom M-Morphotyp und enthält die cDNA des humanen ABCG2 Gens (R482). AcMNPV ist ein Insektenvirus aus der Familie der *Baculoviridae*, das doppelsträngige DNA als genetisches Material enthält (ds-DNA-Virus). Die DNA-Polymerase der Wirtszelle wird zur Replikation genutzt. Eine weitere Eigenschaft dieses Virus ist, dass es nach Vermehrung durch die Wirtszelle deren Tod durch Zellyse bewirkt. Deswegen wird es auch als lytisches Virus bezeichnet.

Die beiden Zelllinien und das ABCG2-Virus wurden freundlicherweise von Dr. Christine Hrycyna (Purdue University, Indiana, USA) zur Verfügung gestellt.

3.3.2 Inkulturnahme, Kultivierung und Kryokonservierung

Beide Insektenzelllinien wurden in Gewebekulturflaschen verschiedener Größe adhärent kultiviert. Alle Arbeiten wurden an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die in Tabelle 3.34 beschriebenen Nährmedien wurden vor Verwendung entweder bei RT oder im Wasserbad auf 27 °C angewärmt. Die Zellen wurden im Inkubator bei 27 °C ohne CO₂-Begasung gelagert.

Inkulturnahme

Um Insektenzellen in Kultur zu nehmen, wurden drei 25 cm²-Kulturflaschen mit je 4 ml Nährmedium vorbereitet. Zwei Flaschen enthielten Medium mit 5 % FKS, eine Flasche Medium ohne FKS. Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen wurden schnell in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und je 330 µl Zellsuspension in jede Kulturflasche überführt. Um eine gleichmäßige Anheftung der Zellen zu gewährleisten, wurden die Kulturflaschen

nun mehrmals vorsichtig hin- und hergeschwenkt und dann bei 27 °C auf einer exakt geraden Oberfläche gelagert.

Nach 30–40 min wurde der Anheftungsstatus mittels Mikroskop kontrolliert. Wenn noch nicht alle Zellen angeheftet waren, wurde noch maximal weitere 20 min abgewartet. Waren die meisten Zellen angeheftet, wurde das Medium entfernt und 4–5 ml frisches Medium zugegeben: zu einer der Flaschen mit FKS wurde jetzt Medium ohne FKS hinzugefügt, zu den beiden anderen Flaschen jedoch das gleiche Medium, in welchem die Zellen aufgetaut worden waren. Nach 24 h wurde das Medium erneut gewechselt oder die Zellen passagiert, wenn sie nahezu 95 % konfluent waren. Für Versuche wurden die Zellen erst nach mehreren Passagen verwendet, wenn sie ein morphologisch einheitliches Aussehen aufwiesen.

Zur weiteren Kultivierung der Hi5 Zellen sollten die Zellen verwendet werden, die mit FKS aufgetaut wurden und dann ohne FKS behandelt worden waren. Für die Sf9 Zelllinie sollten die Zellen weiter eingesetzt werden, die ohne FKS aufgetaut worden waren.

Kultivierung und Passagierung

Je nach benötigter Zellzahl wurden 75 cm²-Kulturflaschen mit 10–15 ml Nährmedium oder 175 cm²-Kulturflaschen mit 20–25 ml Nährmedium für die normale Kultivierung der Insektenzellen verwendet. Das Nährmedium wurde je nach Dichte des Zellrasens im Abstand von 1–3 Tagen gewechselt. Hi5 Zellen verdoppelten sich etwa alle 18 h und waren nicht sehr fest am Boden der Kulturflasche angeheftet. Sf9 Zellen dagegen hefteten sich relativ fest an und hatten eine Verdopplungszeit von ungefähr 72 h.

Waren die Zellen nahezu 95 % konfluent, wurde zunächst das alte Nährmedium entfernt. Dann wurden die Zellen mit 10 ml frischem Medium und einer 5 ml Einmalpipette oder einer langen Pasteurpipette vom Boden der Kulturflasche ab gespült. Dabei wurde die Flasche aufrecht gehalten und zuerst die untersten Zellen abgelöst. Dann wurden immer die jeweils darüber liegenden Zellen ab gespült, bis der Flaschenhals erreicht war. Um ein vollständiges Ablösen von Sf9 Zellen zu erreichen, konnten die Kulturflaschen bei Bedarf zusätzlich leicht mit der Längsseite gegen den Handballen geschlagen werden.

Mit Hilfe des Mikroskops wurde überprüft, ob alle Zellen vollständig abgelöst waren. Für die normale Passagierung wurde in einer Gewebekulturflasche der gewünschten Größe frisches Medium vorgelegt und die Zellen in einer Verdünnung zwischen 1:2 und maximal 1:5 zugegeben. Wichtig war dabei, dass die Zellen nicht in zu geringer Konzentration ausgesät wurden. Durch vorsichtiges Hin- und Herschwenken wurden die Zellen in der Kulturflasche

Tab. 3.34: Insektenzelllinien und Zusammensetzung der Medien.

Zelllinie	Verdopplungszeit	Nährmedium	Einfriermedium
Sf9	72 h	Sf-900 II SFM + 0,5 % Antibiotic- Antimycotic 100X	60 % frisches Medium 30 % FKS 10 % DMSO
High Five (Hi5)	18 h	Express Five SFM + 9 % L-Glutamin + 0,5 % Antibiotic- Antimycotic 100X	42,5 % frisches Medium 42,5 % benutztes Medium 5 % FKS 10 % DMSO

verteilt und anschließend auf einer exakt geraden Oberfläche bei 27 °C gelagert, so dass die Zellen sich gleichmäßig anhefteten.

Es wurde vermieden, die Zellen über eine Konfluenz von 95 % hinaus zu kultivieren, da sich dies negativ auf die Proteinexpression auswirkte. Aus diesem Grund wurden Hi5 Zellen auch nicht länger als 20 Passagen kultiviert.

Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung wurden sterile Kryo-Röhrchen beschriftet und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit benutztem Medium abgelöst und dann für 10 min mit 400–600 × g bei RT zentrifugiert. Währenddessen wurde das Einfriermedium laut Tabelle 3.34 in der benötigten Menge hergestellt. Aus einer 75 cm²-Kulturflasche wurde ein Backup, aus einer 175 cm²-Kulturflasche wurden je nach Dichte des Zellrasens 2–3 Backups hergestellt. Das Zellpellet wurde dazu in Einfriermedium resuspendiert und je 1 ml dieser Zellsuspension in die Kryo-Röhrchen aliquotiert. Die Röhrchen wurden nun für 1 h bei –20 °C, dann für 24–48 h bei –80 °C gelagert und schließlich für die Langzeitkonservierung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.3.3 Expression von ABCG2

In der vorliegenden Arbeit wurde das Baculovirus Expressionsvektor-System (BEVS) verwendet, um in Hi5 oder Sf9 Zellen humanes ABCG2 zu exprimieren. Die Zellen wurden mit dem in Kapitel 3.3.1 beschriebenen ABCG2-Baculovirus in einer „multiplicity of infection“ (MOI, dt. Multiplizität der Infektion) von 10 infiziert. Dies bedeutet, dass pro Zelle 10 Viruspartikel eingesetzt wurden.

Bei einer erfolgreichen Infektion wird eine morphologische Veränderung der Zellen beobachtet, sie schwellen an, d.h. sie werden größer und runder. Schließlich wird die infizierte Kultur geerntet. Im benutzten Medium befinden sich nun viele Viruspartikel, diese Lösung wird konserviert und kann für weitere Infektionen verwendet werden.

Infektion

Sollten die Zellen bei einer in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Passagierung für eine Infektion ausgesät werden, wurde die Suspension aus abgelösten Zellen mit $266 \times g$ bei $4^\circ C$ für 4 min zentrifugiert, in 10 ml frischem Medium resuspendiert und mit Hilfe des Zellzählgerätes CASY die Zellzahl bestimmt. Bei den weiteren Arbeitsschritten war es wichtig, die für die einfache Kultivierung und die Infektion verwendeten Medien getrennt zu handhaben, um eine unerwünschte Kontamination durch Viruspartikel zu vermeiden. Aus diesem Grund wurden nun zuerst die Zellen für die normale Kultivierung ausgesät, bevor das ABCG2-Virus verwendet wurde.

Die für die Infektion vorgeschriebene Zellzahl (siehe Tabelle 3.35) wurde in die entsprechenden Gewebekulturschalen gegeben, gleichmäßig verteilt und für 30 min bei $27^\circ C$ gelagert, bis sich die Zellen angeheftet hatten. Währenddessen wurde die kühl und vor Licht geschützt aufbewahrte Viruslösung bei RT aufgewärmt. Das für die Infektion benötigte Volumen an Viruslösung wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl} \cdot \text{MOI}}{\text{Titer}} \cdot 1000 = V_{\text{Viruslösung}} [\mu\text{l}] \quad (3.3)$$

Weiter wurde das Restvolumen an frischem Medium berechnet, welches zusätzlich zur Viruslösung zu den Zellen gegeben werden sollte, damit diese ausreichend bedeckt waren. Dieses ergab sich aus der Differenz des in Tabelle 3.35 beschriebenen Volumens für die Infektion und des Volumens der Viruslösung.

Nun wurde das Medium von den angehefteten Zellen abgenommen und für die weitere Verwendung in einem PP-Röhrchen gelagert. Zuerst wurde das oben beschriebene Restvolumen an Medium wieder zu den Zellen gegeben. Dazu wurde das nach Anheften der Zellen abgenommene Medium verwendet. Dann wurde die entsprechende Menge an Viruslösung zu den Zellen gegeben und diese durch vielfaches Hin- und Herschwenken gleichmäßig verteilt. Nach einer Inkubation für 2 h bei $27^\circ C$ wurde mit dem nach Anheften der Zellen abgenommenen Medium zum in Tabelle 3.35 genannten finalen Volumen ergänzt. Falls nötig konnte dieses mit frischem Medium ergänzt werden.

Tab. 3.35: Bedingungen für die Infektion von Insektenzellen.

Kulturflasche	Zellzahl	Medium (Infektion)	Medium (final)
25 cm ²	$3,1 \times 10^6$	850 μ l	3,5 ml
75 cm ²	$9,3 \times 10^6$	2,5 ml	7,5 ml
175 cm ²	$1,86 \times 10^7$	5 ml	15 ml

War der Titer der Viruslösung unbekannt, wurde ein Validierungsversuch durchgeführt, bei dem unterschiedliche Volumina der Viruslösung zu einer einheitlichen Zahl an Zellen gegeben wurden. Es wurde das Volumen für weitere Infektionen ausgewählt, bei dem nach 72 h die oben beschriebenen morphologischen Veränderungen der Zellen beobachtet werden konnten. Zusätzlich wurde die korrekte Expression von ABCG2 mittels Western Blot überprüft. Dieser und andere Validierungsversuche werden im Ergebnisteil in Kapitel 4.4.4 beschrieben.

Ernten infizierter Zellen

Die infizierten Zellen wurden nach etwa 72 h geerntet. Zu diesem Zeitpunkt waren alle Zellen angeschwollen und es hatten sich ca. 50 % vom Boden der Gewebekulturflasche abgelöst. Der Ablösestatus wurde nach leichtem Schwenken der Kulturflasche beurteilt. Zum Ernten wurden die Zellen unsteril mit benutztem Medium möglichst vollständig abgelöst und für 10 min mit $120 \times g$ bei RT pelletiert. Das benutzte Medium, das eine große Zahl an Viruspartikeln enthielt, wurde in ein steriles PP-Röhrchen überführt, mit 3 % FKS versetzt und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank vor Licht geschützt gelagert. Zur Langzeitkonservierung wurde das virushaltige Medium bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Das Zellpellet wurde sofort auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.3.4 Membranpräparation

ABCG2 wird von Insektenzellen in der Plasmamembran exprimiert, die mit Hilfe einer Membranpräparation gewonnen werden kann. Dabei wird in einem ersten Schritt die Zellwand der Insektenzellen mit einem Dounce Hand-Homogenisator mechanisch zerstört. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die Zellkerne nicht zerstört werden und so keine genomische DNA in die Membransuspension gelangt, die zu einer Erhöhung der Viskosität führen würde. Durch mehrere Zentrifugationsschritte wird die Zellmembran von den anderen Zellbestandteilen abgetrennt.

Tab. 3.36: Stammlösung für die Präparation von Insektenzellmembranen.

EGTA-Na Lösung 125 mM		pH 7,0 bei RT
4,75 g	EGTA	125 mmol/l
ad 100 ml	Wasser	

Durchführung

Für die Präparation von Insektenzellmembranen wurde zuerst die EGTA-Na Lösung hergestellt (siehe Tabelle 3.36). Die weiteren benötigten Lösungen Tris-HCl pH 7,5, Glycerol 50 % und die Standard-Proteaseinhibitoren wurden in Kapitel 3.2.9, die DTT-Lösung 1 M in Kapitel 3.1.5 bereits beschrieben. Am Tag vor der Membranpräparation wurden die stabilen Bestandteile des Homogenisations- und des Resuspendierungspuffers, die in Tabelle 3.37 mit einem Stern gekennzeichnet sind, gemischt und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Erst am Tag der Membranpräparation wurden die labilen Bestandteile zugesetzt und die Puffer während der weiteren Durchführung immer auf Eis gekühlt.

Tab. 3.37: Puffer für die Präparation von Insektenzellmembranen. (Die mit * gekennzeichneten Bestandteile können am Tag vor der Membranpräparation zusammengemischt werden.)

Homogenisationspuffer		
5,0 ml	Tris-HCl 1 M pH 7,5*	50,0 mmol/l
1,6 ml	EGTA-Na 125 mM pH 7,0*	2,0 mmol/l
910 mg	Mannitol*	50,0 mmol/l
91,8 ml	Wasser*	
200 µl	DTT-Lösung 1 M	2,0 mmol/l
1,0 ml	PMSF-Lösung	1,0 mmol/l
100 µl	Pepstatin A-Lösung	2,0 µmol/l
100 µl	Leupeptin-Lösung	1,0 µmol/l
200 µl	Benzamidin-Lösung	1,0 mmol/l
Resuspendierungspuffer		
250 µl	Tris-HCl 1 M pH 7,5*	50,0 mmol/l
40 µl	EGTA-Na 125 mM pH 7,0*	1,0 mmol/l
2,0 ml	Glycerol 50 %*	10 % (V/V)
275 mg	Mannitol*	300 mmol/l
3,64 ml	Wasser*	
5,0 µl	DTT-Lösung 1 M	1,0 mmol/l
50 µl	PMSF-Lösung	1,0 mmol/l
5,0 µl	Pepstatin A-Lösung	2,0 µmol/l
5,0 µl	Leupeptin-Lösung	1,0 µmol/l
10 µl	Benzamidin-Lösung	1,0 mmol/l

Die gefrorenen, nach Infektion mit dem ABCG2-Virus geernteten Insektenzellen (siehe Kapitel 3.3.3) wurden auf Eis aufgetaut. Dann wurde Homogenisationspuffer zu den Zellen hinzugefügt und für 30–40 min auf Eis inkubiert. Das Volumen des Puffers richtete sich dabei nach der Anzahl der vorhandenen Zellen. Pro 10^7 Zellen wurde 1 ml Puffer eingesetzt. Die Anzahl der Zellen wurde über die zu Beginn der Infektion eingesetzte Zellzahl abgeschätzt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension in einen vorgekühlten Dounce Hand-Homogenisator überführt. Die Größe des Homogenisators richtete sich dabei nach dem Volumen der Zellsuspension. Es wurde jedoch stets ein Zylinder-Kolben-Paar verwendet, das einen engen Spalt zwischen Kolben und Zylinder aufwies.

Durch 30 Hübe mit dem Dounce Hand-Homogenisator wurden die Zellen aufgeschlossen. Nun wurden nicht zerstörte Zellen durch Zentrifugation mit $500 \times g$ für 10 min bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ abgetrennt. Der Überstand wurde in gekühlte kleine Ultrazentrifugengläser überführt und mit $300.000 \times g$ bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ für 30 min zentrifugiert (Rotor: Type 70 Ti). Der Überstand wurde verworfen und 200–1000 μl Resuspendierungspuffer zum entstandenen Pellet gegeben. Dann wurde es mit einem Pinsel resuspendiert und in einen Glashomogenisator überführt. Danach wurde das Zentrifugenglas sorgfältig mit wenig Resuspendierungspuffer nachgespült, diese Flüssigkeit wurde ebenfalls in den Homogenisator überführt. Die gesamte Suspension wurde jetzt durch 10 Hübe bei 750 Upm homogenisiert, aliquotiert und auf Trockeneis bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

3.3.5 Aktivität der Membranpräparation

Um die Aktivität von ABCG2 in einer Membranpräparation aus Insektenzellen (siehe Kapitel 3.3.4) zu überprüfen, wurde ein in der Detektionsmethode modifizierter ATPase Assay verwendet [70]. Dabei wird ein Faktor für die Aktivierbarkeit des Proteins durch die Standardsubstanz Prazosin ($40\text{ }\mu\text{M}$) im Vergleich zur basalen Aktivität bestimmt. Zusätzlich werden die gleichen Proben jeweils in Anwesenheit von Vanadat ($300\text{ }\mu\text{M}$) untersucht. Der Gehalt an innerhalb von 20 min freigesetztem anorganischem Phosphat wird durch eine Reaktion mit Ammoniummolybdat und Ascorbinsäure zu einem gefärbten Komplex photometrisch (880 nm) detektiert. Da die Farbstoffmenge mit der Phosphatmenge korreliert, kann dann über eine Kalibriergerade die Phosphatkonzentration in jeder Probe bestimmt werden.

Durchführung

Zur Vorbereitung des modifizierten ATPase Assays wurden die Lösungen aus den Tabellen 3.38 und 3.39 hergestellt. Grundsätzlich wurden die aufgeführten Stoffe in MilliQ-Wasser gelöst und auf das entsprechende Volumen aufgefüllt. Desweiteren wurde die EGTA-Lösung aus Kapitel 3.3.4 und die DTT-Lösung aus Kapitel 3.1.5 verwendet. Der Assay Puffer (2X) wurde nach der Herstellung bei 4 °C gelagert und war etwa 2 Tage haltbar. Das Phosphat-Reagenz wurde bei RT lichtgeschützt aufbewahrt. Die Ascorbinsäure-Lösung wurde für jeden Assay frisch hergestellt und bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt. Außerdem wurde die ATP-Lösung mit vorgekühltem MilliQ Wasser auf eine Konzentration von 100 mM verdünnt und auf Eis gekühlt.

Die verwendete Membranpräparation aus Insektenzellen wurde sofort nach dem Auftauen mit vorgekühltem unverdünnten Assay Puffer auf eine Gesamtproteinkonzentration von 2,5 µg/µl verdünnt und auf Eis gelagert. Es wurden fünf verschiedene Reaktionsansätze mit einem Volumen von 100 µl jeweils als Triplicate in Glasröhrchen vorbereitet. Dazu wurde die entsprechende Menge an Wasser, Assay Puffer (2X) und Vanadat-Lösung vorgelegt und gemischt.

Dann wurden je 4 µl der verdünnten Membranpräparation (entspricht 10 µg) zugegeben, gemischt und für 3 min bei RT inkubiert. Dann wurde je 1 µl DMSO (für die Kontrollen) oder Prazosin 4 mM zugesetzt, gemischt und erneut für 3 min bei RT inkubiert. Als letztes wurden 5 µl der ATP-Lösung 100 mM hinzugegeben, gemischt und im Wasserbad bei 37 °C für 20 min inkubiert. Somit ergab sich eine finale ATP-Konzentration von 5 mM. Nach Ende der Inkubationszeit wurden zum Stoppen der Reaktion je 100 µl SDS-Lösung 5 % hinzupipettiert. Die Zugabe der in diesem Absatz genannten Reagenzien zu den Reaktionsansätzen geschah immer in der gleichen Reihenfolge der Ansätze und exakt alle 10 s.

Die nun folgenden Detektionsreagenzien konnten zeitunabhängig zugegeben werden, nach jedem Reagenz wurde der Ansatz gemischt. Zuerst wurden 400 µl Phosphat-Reagenz, dann 500 µl MilliQ-Wasser und schließlich 200 µl Ascorbinsäure-Lösung zugesetzt. Nun wurden alle Ansätze für 10 min bei RT inkubiert und danach die Absorption bei 880 nm bestimmt.

Für die Kalibriergerade im Bereich von 0–75 nmol P_i wurden Glasröhrchen mit der entsprechenden Menge an Phosphat-Stammlösung beschickt und mit Assay Puffer 1X, der 1 µl DMSO und 5 µl ATP-Lösung 100 mM enthielt, auf 100 µl aufgefüllt. Dann wurden 100 µl SDS-Lösung 5 % zugegeben und anschließend die Detektionsreaktion wie oben beschrieben durchgeführt. Die Absorptionswerte wurden gegen die eingesetzte Phosphat-Konzentration aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt.

Tab. 3.38: Stammlösungen für den modifizierten ATPase Assay.

Tris-HCl-Lösung 100 mM		pH 7,5 bei RT
1,21 g	Tris	100 mmol/l
ad 100 ml	Wasser (MilliQ)	
Natriumazid-Lösung 250 mM		
16,25 mg	Natriumazid	250,0 mmol/l
ad 1 ml	Wasser (MilliQ)	
Magnesiumchlorid-Stammlösung		
4,1 g	Magnesiumchlorid Hexahydrat	2,0 mol/l
ad 10 ml	Wasser (MilliQ)	

Tab. 3.39: Reagenzien für den modifizierten ATPase Assay.

Assay Puffer (2X)		
4,57 ml	Tris-HCl-Lösung 100 mM	91,4 mmol/l
200 µl	Natriumazid-Lösung 250 mM	10,0 mmol/l
160 µl	EGTA-Na Lösung 125 mM	4,0 mmol/l
7,3 mg	Ouabain Octahydrat	1,5 % (m/V)
20 µl	DTT-Lösung 1 M	4,0 mmol/l
50 µl	Magnesiumchlorid-Stammlösung	20,0 mmol/l
Phosphat-Reagenz		
1,0 g	Ammoniummolybdat Tetrahydrat	1,0 % (m/V)
14 mg	Kaliumantimontartrat	0,014 % (m/V)
6,9 ml	Schwefelsäure, konzentriert	1,25 mol/l
ad 100 ml	Wasser (MilliQ)	
SDS-Lösung 5 %		
1,0 g	Natriumdodecylsulfat	5,0 % (m/V)
ad 20 ml	Wasser (MilliQ)	
Ascorbinsäure-Lösung		
100 mg	Ascorbinsäure	1,0 % (m/V)
ad 10 ml	Wasser (MilliQ)	

Mit Hilfe der so erhaltenen Gleichung der Phosphat-Kalibriergerade wurde der ATPase Assay ausgewertet. Zuerst wurden die Absorptionswerte der Triplikate gemittelt. Dann wurde der Mittelwert der Proben, die nur Vanadat enthielten, von dem Mittelwert der Kontrollproben mit DMSO subtrahiert. Außerdem wurde der Mittelwert der Proben, die mit Vanadat und Prazosin versetzt worden waren, vom Mittelwert der Proben, denen nur Prazosin zugesetzt worden war, subtrahiert. Zur Bestimmung der Phosphat-Menge in jeder Probe wurden die berechneten neuen Absorptionsmittelwerte in die Geradengleichung eingesetzt. Das Ergebnis in nmol Phosphat wurde nun noch auf die Inkubationszeit von 20 min und die eingesetzte Proteinmenge von 0,01 mg bezogen. So wurde die Vanadat-sensitive spezifische Aktivität in nmol P_i /min/mg berechnet. Der Aktivierungsfaktor ergab sich schließlich aus dem Quotienten der Werte für die stimulierte und die basale spezifische Aktivität des Proteins.

3.3.6 Detergenzscreening für ABCG2

Werden Membranen von Insektenzellen untersucht, kann durch die von Hefezellen verschiedenen Membraneigenschaften ein anderes Detergenz zu optimalen Ergebnissen führen. Aus diesem Grund wurde vor der Aufreinigung von ABCG2 aus Insektenzellmembranen ein Screening mit sechs verschiedenen Detergenzien durchgeführt. Die Versuchsbedingungen wurden der Literatur entnommen [136].

Durchführung

Für das Screening wurden die folgenden Detergenzien eingesetzt: 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-propansulfonat (CHAPS), Brij 35, n-Octyl- β -D-glucopyranosid (OG), n-Dodecyl- β -D-maltopyranosid (DDM), Fos-cholin 16 (FC-16) und Cymal 7.

Ein Solubilisationsansatz bestand aus je 2 mg Membranpräparation sowie 1 % des jeweiligen Detergenzes und wurde mit Solubilisationspuffer (siehe Kapitel 3.3.7) auf 1 ml aufgefüllt. In dicht verschlossenen Reaktionsgefäßen wurden die Ansätze unter vorsichtigem Schwenken für 60 min bei 4 °C in der Kühlkammer inkubiert. Um solubiliertes von nicht-solubiliertem Material abzutrennen, wurden die Ansätze anschließend mit $300.000 \times g$ für 30 min bei 4 °C ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert. Die Resuspendierung des Pellets erfolgte mit detergenz-freiem Puffer, die entstandene Suspension wurde ebenfalls aliquotiert. Die so erhaltenen Proben wurden bei -80 °C eingefroren und danach mittels Western Blot auf das Vorhandensein von ABCG2 untersucht.

3.3.7 Aufreinigung von ABCG2

Nachdem die Funktionalität von ABCG2 in der Membranpräparation nachgewiesen worden war, wurde das Protein aufgereinigt. Die grundsätzliche Vorgehensweise bei einer Aufreinigung wurde bereits in Kapitel 3.2.13 ausführlich beschrieben. Das Prinzip der Aufreinigungsmethode, welches diesem Kapitel zugrunde liegt, von Anderson *et al.* übernommen [141]. Für die Aufreinigung aus Insektenzellen wurde jedoch das mit Hilfe des Detergenzscreenings (Kapitel 3.3.6) ermittelte Detergenz CHAPS eingesetzt, dessen Verwendung auch in der Literatur beschrieben worden ist [119]. Außerdem wurde der von Pozza *et al.* verwendete Solubilisationspuffer eingesetzt.

Durchführung

Zur Vorbereitung der Aufreinigung wurden die Stammlösungen aus Tabelle 3.40 hergestellt. Die Grundlage aller Puffer bildete der HEPES-Puffer 2X nach Pozza *et al.* [119]. Jedoch wurden die daraus hergestellten Puffer in der vorliegenden Arbeit bei der Optimierung der Aufreinigung in Kapitel 4.4.6 vor allem durch Zusatz von Lipiden für die Rekonstitution noch weiterentwickelt. Nur diese weiterentwickelte Pufferzusammensetzung ist in den folgenden Ausführungen dargestellt.

Der pH-Wert des HEPES-Puffer 2X wurde mit NaOH eingestellt. Zusätzlich wurden die Lösungen der Standard-Proteaseinhibitoren und Glycerol 50 % aus Kapitel 3.2.9, die Imidazol-Lösung pH 8,0 aus Kapitel 3.2.13 und die OG-Stammlösung aus Kapitel 3.1.8 verwendet. 37,5 ml des HEPES-Puffers 2X wurden im Verhältnis 1:1 mit vorgekühltem Wasser verdünnt und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Zusätzlich wurden zweimal 5 l des Rekonstitutionspuffers (Tabelle 3.32) mit vorgekühltem Wasser hergestellt, wie in Kapitel 3.2.13 beschrieben.

Am Tag der Aufreinigung wurden die Insektenzellmembranen, deren Gewinnung in Kapitel 3.3.4 dargestellt wurde, auf Eis aufgetaut. Dann wurde ein Solubilisationsansatz mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml in der Kühlkammer bei 4 °C hergestellt, wie er beispielhaft in Tabelle 3.41 zusammengefaßt ist. Der Ansatz wurde in ein Gefäß mit etwa dem doppelten Volumen des Ansatzes gegeben und für 1 h bei 4 °C vorsichtig auf einem Horizontalschüttler geschwenkt. Während dieser Zeit wurden die Waschpuffer und der Elutionspuffer (siehe Tabelle 3.42) auf Eis mit vorgekühltem Wasser hergestellt. Außerdem wurde das Cobalt-Harz äquilibriert. Dazu wurden zweimal je 1,5 ml Harz in ein kleines PP-Röhrchen gegeben, für 2 min bei 120 × g bei 4 °C zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig entfernt. 7 ml HEPES-Puffer 1X wurden mit 0,5 µl β-Mercaptoethanol (1 mM final) versetzt. Jedes

Harz-Pellet wurde nun mit je 1,5 ml dieses Puffers gewaschen. Die Suspension wurde erneut unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert und der Waschschrift wiederholt. Zuletzt wurde der Überstand entfernt und das noch gerade mit Flüssigkeit bedeckte Harz auf Eis gelagert.

Ab jetzt wurden alle weiteren Schritte in der Kühlkammer bei 4 °C durchgeführt. Nach Ende der Solubilisationszeit wurde der Ansatz gleichmäßig auf vorgekühlte kleine Ultrazentrifugengläser verteilt und dann mit $300.000 \times g$ für 30 min bei 2 °C zentrifugiert (Rotor: Type 70 Ti). Die Überstände wurden vereinigt, in eines der mit Harz gefüllten PP-Röhrchen gegeben („Harz-1“) und für 1 h bei 4 °C vorsichtig auf einem Horizontalschüttler geschwenkt. Das Pellet der Ultrazentrifugation wurde dreimal mit 1,5 ml HEPES-Puffer 1X gewaschen, dann mit Hilfe des Glashomogenisators in 500 μ l dieses Puffers resuspendiert und eingefroren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Harz-1 zentrifugiert (2 min, $120 \times g$, 4 °C) und der Überstand in das zweite mit frischem Harz gefüllte PP-Röhrchen überführt („Harz-2“). Der Solubilisationsansatz wurde erneut, für 1 h bei den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde das Harz-1 gewaschen. Dazu wurden 7,5 ml Waschpuffer 1 zugegeben und für 10 min auf dem Horizontalschüttler geschwenkt. Nach Zentrifugation (2 min, $120 \times g$, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und der Waschschrift wiederholt. Dann wurde das Harz einmal mit Waschpuffer 2 gewaschen und erneut zentrifugiert. Das so pelletierte Harz wurde nun mit einer Pipette aufgenommen und in eine Chromabond Leersäule überführt. Diese war vorher zur Kontrolle des Durchflusses am Auslauf mit Parafilm abgedichtet worden. Reste des Waschpuffers 2 wurden verworfen. Dann wurde mit 4,5 ml Elutionspuffer eluiert. Nach Ende der Inkubationszeit des Harz-2 wurde dieses genauso behandelt, wie es für Harz-1 beschrieben wurde, und die Eluate schließlich vereinigt.

Zum semi-quantitativen Nachweis des Proteins wurde das Eluat mit Hilfe einer Ultrafiltration aufkonzentriert. Dazu wurde die Lösung für 25 min bei $5.000 \times g$ in einer Zentrifugationsfiterereinheit mit einer Molekulargewichtsbegrenzung von 30 kDa (Amicon Ultra-15) zentrifugiert (Rotor JA-10).

Für funktionelle Assays wurde statt des Aufkonzentrierungsschrittes eine Rekonstitution von ABCG2 mittels Dialyse durchgeführt. Dazu wurde das Gesamteluat in einen in Wasser vorgequollenen Dialyseschlauch überführt (1 cm Schlauch pro 2 ml Eluat) und sorgfältig verschlossen. Die Dialyse, die anschließende Ultrazentrifugation und Homogenisation wurden ausgeführt, wie in Kapitel 3.2.13 beschrieben. Schließlich wurde die erhaltene Liposomen-suspension aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Die Größe der resultierenden Liposomen wurde wie in Kapitel 3.2.14 beschrieben bestimmt.

Tab. 3.40: Stammlösungen für die Aufreinigung aus Insektenzellmembranen.

HEPES-Puffer (2X)		pH 8,0 bei RT
2,28 g	HEPES	100 mmol/l
5,84 g	Natriumchlorid	1,0 mol/l
80 ml	Glycerol 50 %	40 % (V/V)
ad 100 ml	Wasser	
CHAPS-Lösung 10 %		
600 mg	CHAPS	10,0 % (m/V)
ad 6 ml	Wasser	

Tab. 3.41: Ansatz für die Solubilisation aus Insektenzellmembranen.

Solubilisationsansatz		
3,5 ml	HEPES-Puffer 2X	1X
700 µl	CHAPS-Lösung 10 %	1 %
1185 µl	Membran (11,85 mg/ml)	2 mg/ml
70 µl	PMSF-Lösung	1 mmol/l
7 µl	Pepstatin A-Lösung	2 µmol/l
7 µl	Leupeptin-Lösung	1 µmol/l
14 µl	Benzamidin-Lösung	1 mmol/l
35 µl	Imidazol-Lösung pH 8,0	10 mmol/l
0,5 µl	β -Mercaptoethanol	1 mmol/l
1484 µl	Wasser	

Tab. 3.42: Puffer für die Aufreinigung aus Insektenzellmembranen.

Waschpuffer 1		
20 ml	HEPES-Puffer 2X	1X
400 µl	PMSF-Lösung	1 mmol/l
40 µl	Pepstatin A-Lösung	2 µmol/l
40 µl	Leupeptin-Lösung	1 µmol/l
80 µl	Benzamidin-Lösung	1 mmol/l
5,6 µl	β -Mercaptoethanol	1 mmol/l
4 ml	CHAPS-Lösung 10 %	1 %
2,8 ml	OG-Stammlösung	1,4 %
800 µl	Gemischte Lipide	0,1 %
800 µl	Imidazol-Lösung pH 8,0	40 mM
11 ml	Wasser	
Waschpuffer 2		
10 ml	HEPES-Puffer 2X	1X
200 µl	PMSF-Lösung	1 mmol/l
20 µl	Pepstatin A-Lösung	2 µmol/l
20 µl	Leupeptin-Lösung	1 µmol/l
40 µl	Benzamidin-Lösung	1 mmol/l
2,8 µl	β -Mercaptoethanol	1 mmol/l
200 µl	CHAPS-Lösung 10 %	0,1 %
1,4 ml	OG-Stammlösung	1,4 %
1,6 ml	Gemischte Lipide	0,4 %
400 µl	Imidazol-Lösung pH 8,0	40 mM
6,12 ml	Wasser	
Elutionspuffer		
6,52 ml	HEPES-Puffer 2X	0,65X
200 µl	PMSF-Lösung	1 mmol/l
20 µl	Pepstatin A-Lösung	2 µmol/l
20 µl	Leupeptin-Lösung	1 µmol/l
40 µl	Benzamidin-Lösung	1 mmol/l
2,8 µl	β -Mercaptoethanol	1 mmol/l
200 µl	CHAPS-Lösung 10 %	0,1 %
1,4 ml	OG-Stammlösung	1,4 %
1,6 ml	Gemischte Lipide	0,4 %
10 ml	Imidazol-Lösung pH 8,0	1 mol/l

3.4 Statistische Methoden

Beschreibende Statistik

Die in dieser Arbeit angegebenen Werte repräsentieren den arithmetischen Mittelwert \pm Standardabweichung von Messwerten, sofern nichts anderes angegeben wurde. Dabei wurde eine annähernde Normalverteilung der Werte angenommen.

Der arithmetische Mittelwert beschreibt die durchschnittliche Lage einer Verteilung. Aus Messreihen mit n Messwerten x_i wurde dieser Mittelwert mit Hilfe von Gleichung 3.4 berechnet.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (3.4)$$

Die Varianz s^2 ist ein Maß für die Streuung von Beobachtungswerten, die aus einer Stichprobe der Grundgesamtheit stammen. Sie gibt die mittlere quadratische Abweichung vom Mittelwert an und wurde mit folgender Formel berechnet:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad (3.5)$$

Zur Berechnung der Standardabweichung s (standard deviation, SD) aus der Varianz wurde Gleichung 3.6 verwendet. Sie stellt die in der Grundgesamtheit zu erwartende Streuung der Einzelwerte dar und beschreibt somit die Präzision einer Messung.

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (3.6)$$

Außerdem wurde in einigen Fällen der Standardfehler des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$ (standard error of the mean, SEM) angegeben, der eine Aussage über den Vertrauensbereich des berechneten Mittelwertes macht. Dieser Fehler schätzt die mittlere Streuung von Mittelwerten um den wahren Wert einer Grundgesamtheit ab und beschreibt somit die Standardabweichung der Mittelwerte-Verteilung. Der mittels Gleichung 3.4 berechnete Mittelwert \bar{x} ist nur ein einzelnes Element dieser Verteilung. Mit Hilfe von Gleichung 3.7 wurde der beschriebene Standardfehler bestimmt.

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (3.7)$$

Ein mittels Durchflusszytometer bestimmter Messwert einer Probe stellte den geometrischen Mittelwert aller gemessenen Zellen in dieser Probe dar. Dieser Mittelwert \bar{x}_G kann wie folgt berechnet werden:

$$\bar{x}_G = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n x_i} \quad (3.8)$$

Die hier dargestellten Gleichungen wurden der Literatur entnommen [142].

Beurteilende Statistik

Zur Ermittlung statistisch signifikanter Unterschiede von zwei Mittelwerten wurde der zweiseitige ungepaarte Student-t-Test durchgeführt. Dazu wurde vorausgesetzt, dass die untersuchten Messwerte annähernd normalverteilt waren. Der Test basiert weiterhin auf der Annahme, dass die Varianzen der beiden zu vergleichenden Mittelwerte sich nicht unterscheiden. Dies wurde zuvor mit Hilfe eines F-Tests überprüft. Wurde diese Bedingung nicht erfüllt, wurde bei der Durchführung des t-Tests zusätzlich die Welch-Korrektur eingesetzt. Die Signifikanzebenen sind in den jeweiligen Darstellungen gekennzeichnet, wobei Folgendes festgelegt wurde: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3.5 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 3.43: Informationen zu den verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Substanz/Reagenz	Bezugsquelle und Bestellnr.
Acrylamid-Lösung 30 %	Applichem, A3626
Adenin Hemisulfat	Sigma, A-9126
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma, A2383
Agar-Agar	Merck, 1.01614
Albumin (BSA)	Applichem, A0850
Amidoschwarz 10B	Applichem, A1399
4-Aminobenzoesäure	Sigma, A-9878
6-Aminohexansäure	Sigma, A-2504
Ammoniummolybdat Tetrahydrat	Sigma, A-1343
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, A-3678
Ammoniumsulfat	Fluka, 09978
Ampicillin Natrium	Applichem, A0839
Antifoam A	Sigma, A-5633
Antikörper BXP-21	Abcam, ab3380
Antikörper C219	Signet Laboratories, 870-01
Anti-mouse IgG, H&L chain specific (goat) peroxidase conjugate	Calbiochem, 401215
L-Arginin HCl	Sigma, A-5131
L(+)-Ascorbinsäure	Applichem, A1052
Aureobasidin A	Takara, 9000
Benzamidin HCl	Sigma, B-6506
Biotin	Sigma, B-4501
Borsäure	Sigma, B-6768
Brij 35 30 % (m/V)	Acros, 329581000
Brij 58	Acros, 34429
Bromphenolblau	Merck, 108122
Calciumchlorid	Sigma, C-4901
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-2-hydroxy-1-propansulfonat (CHAPSO)	ICN Biomedicals, 190320
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propansulfonat (CHAPS)	Applichem, A4011

Fortsetzung – Chemikalien und Reagenzien

Substanz/Reagenz	Bezugsquelle und Bestellnr.
Cholesterol	Sigma, C-8667
Coomassie Brilliant Blau R-250	Roth, 3862.1
Decon 90	Zinsser Analytik, 80000
Diisopropylfluorophosphat (DFP)	Acros, 115230010
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Acros, AC19773
Dithiothreitol (DTT)	Appllichem, A2948
n-Dodecyl- β -D-maltopyranosid (DDM)	Anatrace, D310LA
Eisen(III)chlorid	Sigma, F-7134
Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma, E-3889
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Aldrich, E2 628-2
N-Ethylmaleimid	Alfa Aesar, 040526
Folsäure	Sigma, F-7876
Formaldehydlösung 37 %	Grüssing, 11002
Fos-cholin 16	Anatrace, F316
Genistein	Appllichem, A2202
D(+)-Glucose, wasserfrei	Appllichem, A0883
Glycerol 100 % (wasserfrei)	Appllichem, A1123
Glycerol 87 %	Appllichem, A0970
L-Histidin HCl Monohydrat	Sigma, H-8125
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Appllichem, A1069
Imidazol	Sigma, I-0125
Immobilon Western HRP substrate	Millipore, WBKLS0050
L-Isoleucin	Sigma, I-2752
myo-Inositol	Sigma, I-5123
Kaliumantimontartrat	Acros, 223800050
Kaliumchlorid	Merck, 1.04936
Kaliumdihydrogenphosphat	Appllichem, A3095
Kaliumiodid	Sigma, P-8256
Kaliumnitrat	Acros, 19677
Kaliumnatriumtartrat Tetrahydrat	Merck, 1080871
Ketoconazol	Sigma, K-1003
Ko143	Tocris, 3241
Kupfersulfat Pentahydrat	Acros, AC19773
L-Leucin	Aldrich, L60-2

Fortsetzung – Chemikalien und Reagenzien

Substanz/Reagenz	Bezugsquelle und Bestellnr.
Leupeptin Hemisulfat	Applichem, A2183
L-Lysin HCl	Sigma, L-5626
Lysophosphatidylcholin (LPC)	Avanti, 830071P
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck, 105833
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Applichem, A4101
Malachitgrün HCl	Sigma, M-9636
Mangansulfat	Fluka, 63555
β -Mercaptoethanol	Sigma, M-6250
L-Methionin	Applichem, A3897
Milchpulver	Roth, T145.1
Natriumazid	Fluka, 71290
Natriumcarbonat	Aldrich, 451614
Natriumchlorid	Merck, 106404
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, A2572
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Applichem, A4732
Natriumhydroxid	Acros, 13407
Natriummolybdat Dihydrat	Sigma, M-1651
Natriumorthovanadat	Acros, 205330500
Natriumsulfat Decahydrat	Fluka, 71969
Di-Natriumtartrat Dihydrat	Fluka, 71995
Natriumtaurodeoxycholol Hydrat (TDOC)	Sigma, T-0875
Nicotinsäure	Sigma, N-4126
n-Octyl- β -D-glucoopyranosid (Octylglucosid, OG)	Applichem, A1010
Ouabain Octahydrat	Fluka, 75640
D-Pantothensäure Hemicalciumsalz	Sigma, P-2250
L-Phenylalanin	Sigma, P-2126
Pepstatin A	Applichem, A2205
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, P-7626
Phosphatidylcholin (PC)	Avanti, 840051C
Phosphatidylsäure (PA)	Avanti, 840101C
Polyvinylalkohol (PVA)	Aldrich, 3438406
Ponceau S	Sigma, P-3504
Prazosin HCl	Sigma, P-7791
Progesteron	Sigma, P-8783
Protein Marker unstain (10 - 150)	Applichem, A3993

Fortsetzung – Chemikalien und Reagenzien

Substanz/Reagenz	Bezugsquelle und Bestellnr.
Protein Marker stain (6,5 - 200)	Appllichem, A5418
Protein Standard Precision Plus (All-Blue)	Bio-Rad, 161-0373
Proteinstandard 200 mg BSA/ml	Sigma, P-5369
Pyridoxin HCl	Sigma, P9755
Rhodamin 123	Acros, 419091000
(–)-Riboflavin	Sigma, R-4500
D(+)-Saccharose	Appllichem, A2211
Silbernitrat	Appllichem, A3944
D-Sorbit	Appllichem, A4992
5-Sulfosalicylsäure Dihydrat	Roth, 4119.1
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Appllichem, A1148
Thiamin HCl	Sigma, T-4625
L-Threonin	Sigma, T-8625
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma, T-8657
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris)	Appllichem, A2264
Triton-X-100	Sigma, T-9284
Trypton/Pepton aus Casein	Roth, 8952.1
L-Tryptophan	Appllichem A3410
Tween 20	Appllichem, A4974
L-Tyrosin	Sigma, T-3754
Uracil	Appllichem, A0667
L-Valin	Sigma, V-0500
Valinomycin	Appllichem, A2238
Verapamil	Sigma, V-4629
Yeast Extract	Sigma, Y-0500
Zinksulfat Heptahydrat	Sigma, Z-4750

3.6 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3.44: Informationen zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien und Kits

Bezeichnung	Firma, Bestellnummer
Amicon Ultra-15 (Ultracel 30k)	Millipore, UFC903008
Antibiotic-Antimycotic 100X	Gibco, 15240
Aufschraubmembranfilter	Millipore, SCGPT01RE
Blotting paper	Sigma, P-7796
Chromabond Leersäule 3 ml	Macherey-Nagel, 730160
Dialyseschlauch	Spectrum Laboratories, 132700
Einmal-Küvetten PMMA (1,5 ml halbmikro)	Brand, 759115
FACS-Teströhrchen	BD Biosciences, 352054
Fos-choline Detergent (13-16) Kit	Anatrace, DSOL-F1316
Fötale Kälberserum (FKS)	Sigma, F-7524
Gewebekulturflasche 25 cm ²	Greiner Bio-one, 690175
Gewebekulturflasche 75 cm ²	Greiner Bio-one, 658175
Gewebekulturflasche 175 cm ²	Greiner Bio-one, 650175
Gewebekulturplatte 6 well	Greiner Bio-one, 657160
L-Glutamin Lösung	Sigma, G-7513
Handdispenser Aufsatz 12,5 ml	Brand, 7023-78
Handdispenser Aufsatz 2,5 ml	Roth, H682.1
Impfösen	VWR, I612-9355
Kryo-Röhrchen	Sarstedt, 72.693.100
Kulturröhrchen (12 × 100 mm)	Brand, 114110
Melsept SF	Braun, 18907
Membranfilter (für den Fermenter)	Sartorius, 17805
Midi Prep Kit	Invitrogen, K2100-04
Multi-Flex 0,5 - 200 µl ECOFLEX Tips	Roth, Y419.1
Nährmedium High Five: Express Five SFM	Invitrogen, 10486-025
Nährmedium Sf9: Sf-900 II SFM	Invitrogen, 10902-096
Ni-NTA Superflow	Qiagen, 30410
One Shot TOPF' competent <i>E. coli</i>	Invitrogen, C303003
Parafilm M	Pechiney Plasic Packaging, PM-996
Petrischalen (90 × 14 mm)	VWR, 4912478
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Roth, T830.1

 Fortsetzung – Verbrauchsmaterialien und Kits

Bezeichnung	Firma, Bestellnummer
Popular Detergent Kit	Anatrace, DSOL-POP
PP-Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-one, 188271
PP-Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-one, 227261
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, 72.690
Rundfilter MN 615 (240 mm)	Macherey-Nagel, 431024
Standardpuffer pH 10,01	Hanna Instruments, HI-70010P-Lab
Standardpuffer pH 4,01	Hanna Instruments, HI-70004P-Lab
Standardpuffer pH 7,01	Hanna Instruments, HI-70007P-Lab
Talon Metal Affinity Resin (Cobalt-Harz)	Clontech, 635502
Yeastmaker Yeast Transformation System 2	Clontech, 630439

3.7 Geräte

Tab. 3.45: Informationen zu den verwendeten Geräten und deren Zubehör

Gerät bzw. Zubehör	Hersteller, Nummer
Adapter (für Type 70 Ti)	Beraneck Laborgeräte, 11028
Antrieb (für Glashomogenisator)	IKA Labortechnik
Ausschwingrotor JS-7.5 (für Laborzentrifuge)	Beckman Coulter
Beadbeater	Hamilton Beach Commercial, 1G918
Belüftungsvorrichtung (für Fermenter)	Dunn Labortechnik, 1969-66000 u. 1965-45006
Blotdokumentation Versa Doc Imagine System 5000	Bio-Rad
Brutschrank Kelvitron T (für <i>E. coli</i> , Hefen)	Heraeus Instruments
Cellophan-Folien (für Geltrocknungsrahmen)	Roth, K422.1
CO ₂ Water Jacketed Incubator (für Insektenzellen)	Forma Scientific Inc.
Dounce Hand-Homogenisator 2 ml	Sartorius, 8530734 u. 8530793
Dounce Hand-Homogenisator 7 ml	Wheaton, 357542
Dounce Hand-Homogenisator 15 ml	Scherf Präzision, SCERSP-885303-0015
Elektrophorese-/Blottingapparatur Mini-Protean II	Bio-Rad
FACScalibur	BD Biosciences
Fermenter	Dunn Labortechnik, 1965-08000
Festwinkelrotor JA-10	Beckman Coulter
Festwinkelrotor JA-25.50 (für Laborzentrifuge)	Beckman Coulter
Festwinkelrotor JLA-10.500 (für Laborzentrifuge)	Beckman Coulter
Festwinkelrotor Type 45 Ti (für Ultrazentrifuge)	Beckman Coulter
Festwinkelrotor Type 70 Ti (für Ultrazentrifuge)	Beckman Coulter
Geltrocknungsrahmen (14 × 14 cm)	Roth, K420.1
Glashomogenisator 2 ml	VWR International, 432-1202
Glashomogenisator 5 ml	VWR International, 432-1205
Glashomogenisator 50 ml	VWR International, 432-5021
Glass Econo Column Chromatographiesäulen	Bio-Rad, 737-2512
Glaskugeln, zirkonisiert (für Beadbeater)	Roth, N034.1
Glaskugeln (0,5 mm)	Roth, N030
Glaskugeln (2,5 mm)	Roth, N032.1
Hahn 2-Way Stopcock (für Glass Econo Column)	Bio-Rad, 732-8102

Fortsetzung – Geräte und Zubehör

Gerät bzw. Zubehör	Hersteller, Nummer
Hamiltonspritze 10 µl	Hamilton Bonaduz AG, 701N
Handdispenser Handystep	Brand
Heizmanschette (für Fermenter)	Dunn Labortechnik, 1964-54080
Horizontalschüttler Red Rotor	Hoefer Pharmacia Biotech
Laborzentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG
Orbital Shaker Model 4520	Forma Scientific Inc.
PCS Malvern Autosizer 2c	Malvern Instruments
pH-Kalomel-Elektrode (für pH-Meter)	Sigma, E6009-1EA
pH-Meter	Beckman Coulter
Pumpe Masterflex Easy-load II (für Fermenter)	Cole-Parmer, 77521-47
Stromgeber (für Mini-Protean II)	Life Sciences Int., EC250-90
Temperaturregulierung und -fühler (für Fermenter)	Eigenbau
Thermostat plus	Eppendorf
Tischzentrifuge 5451R	Eppendorf AG
Überkopfrührer (für Fermenter)	Bellco Glass Inc., 7774-10000
Ultrazentrifuge Optima LE-80K	Beckman Coulter
Ultrazentrifugengläser (für Type 45 Ti)	Beckman Coulter, 355655
Ultrazentrifugengläser 13 × 51 mm (für Type 70 Ti)	Beckman Coulter, 349622
UV-Photometer Ultrospec 4000	Amersham Biosciences
Vakuumblock Dot-Blot	Roth, T790.1
Vakuumpumpe PC5	Vacuubrand
Vortexschüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasseraufbereitungsanlage Elix	Millipore
Wasseraufbereitungsanlage MilliQ Biocel A10	Millipore
Zellzählgerät CASY 1 Modell TT	Innovatis AG
Zentrifugengläser (für JA-25.50)	Nalge Nunc Int., 3118-0050
Zentrifugengläser (für JLA-10.500)	Beckman Coulter, 361690

4 Ergebnisse und Diskussion

Der Ergebnisteil gliedert sich in vier Abschnitte und ist hauptsächlich nach dem jeweiligen Transportprotein und darüber hinaus nach dem Expressionssystem geordnet.

Der erste Abschnitt beschreibt die Arbeiten mit einem Expressionssystem für ABCB1 in *S. cerevisiae*. Dazu zählen Optimierungen sowohl der Proteinexpression in dem verwendeten Hefestamm, als auch der Methoden der Membranpräparation und der Proteinaufreinigung.

Im zweiten Abschnitt werden funktionelle Untersuchungen mit Substraten und Modulatoren von ABCB1 mittels ATPase Assay vorgestellt.

Der dritte Abschnitt beschäftigt sich mit einem neuen Expressionssystem für ABCG2 in *S. cerevisiae* Zellen. Desweiteren wird die Etablierung der Aufreinigung des Proteins aus Hefemembranen dargestellt. Dieser Aufreinigungsprozess wurde in mehreren Schritten optimiert und die Funktionalität des aufgereinigten Proteins nachgewiesen.

Im vierten Abschnitt wird ein anderes Expressionssystem für ABCG2, die Insektenzelllinie *Trichoplusia ni* (Hi5), beschrieben. Aus diesem System gewonnene Membranen wurden für weitere Untersuchungen zur Aufreinigung des Transportproteins eingesetzt.

4.1 ABCB1 aus *Saccharomyces cerevisiae*

4.1.1 Das Expressionssystem BJ5457-ABCB1

ABCB1 wurde im Rahmen dieser Arbeit im *S. cerevisiae* Stamm BJ5457 exprimiert. Zum Nachweis der ABCB1-Expression in den untersuchten Klonen des so erhaltenen Stammes BJ5457-ABCB1 wurde zunächst die Herstellung eines Zellextraktes etabliert und die Bedingungen bei der Durchführung von SDS-PAGE und Western Blot optimiert.

Etablierung der Zellextraktionsmethode

Um die ABCB1-Expression von transformierten Hefezellen zu untersuchen und das gleichzeitige Screening mehrerer Klone zu ermöglichen, wurde die Herstellung eines Zellextraktes etabliert, die in Kapitel 3.2.6 beschrieben ist. Dabei wurden die Zellwände der Hefen durch Glaskugeln zerstört und im Überstand des letzten Zentrifugationsschrittes ein Gesamtproteinextrakt gewonnen.

Nachdem der Gesamtproteingehalt im Amido Black Assay (Kapitel 3.1.3) bestimmt worden war, wurde die Anwesenheit von ABCB1 in diesem Überstand und auch in dem aus der gleichen Zentrifugation resultierenden Pellet mittels SDS-PAGE und Western Blot (Kapitel 3.1.4 und 3.1.6) untersucht.

Im Überstand der Zentrifugation mit $12.000 \times g$ war zwar mehr Gesamtprotein, jedoch anteilig weniger ABCB1 enthalten als im Pellet. Dies zeigte ein Vergleich von Überstand und Pellet aus dem gleichen Ansatz auf einem Western Blot (siehe Abbildung 4.1). Die zusätzlichen kleineren Banden auf Bahn 2 werden im Abschnitt „Optimierung des Western Blots zum Nachweis von ABCB1“ diskutiert.

Es wurde gezeigt, dass grundsätzlich sowohl Überstand als auch Pellet des Zellextraktes zum Screening von ABCB1-exprimierenden Klone verwendet werden können. Besser geeignet zur Beurteilung der Expression ist jedoch der Überstand, da hier aufgrund des insgesamt schwächeren Signals auf dem Western Blot Unterschiede in der Intensität der Banden besser differenziert werden können.

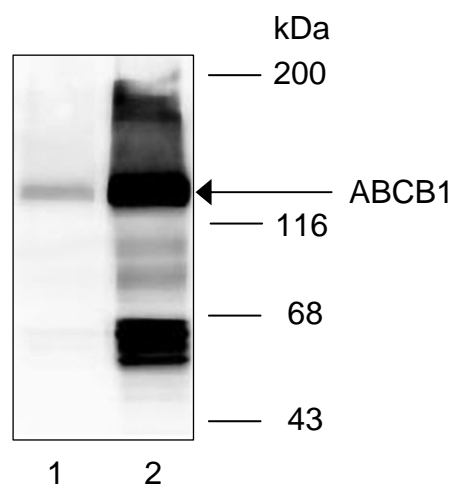


Abb. 4.1: Vergleich des ABCB1-Gehaltes in den Proben des Zellextraktes. Je eine Probe des Überstandes (Bahn 1) und des Pellets (Bahn 2) aus dem gleichen Ansatz wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf den ABCB1-Gehalt untersucht (5 μg pro Bahn).

Optimierung des Western Blots zum Nachweis von ABCB1

Der Nachweis von ABCB1 mit dem primären monoklonalen Antikörper C219 beim Western Blotting wurde optimiert, weil zu Beginn der Arbeiten nicht nur eine Bande von etwa 130 kDa durch den Antikörper C219 auf dem Western Blot markiert wurde, sondern auch mehrere Banden zwischen 43 und 68 kDa. Dies geht aus Abbildung 4.2 (A) hervor. Laut Literatur erkennt C219 zwei α -helikale Epitope in einem Bereich der ATP-Bindungsstellen, wo auch das ATP-Molekül selbst bindet [143]. Da der für ABCB1 spezifische Antikörper die kleineren Proteine auf dem Western Blot ebenfalls erkennt, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Bruchstücke des Transportproteins, die noch die Nukleotid-Bindungsdomänen beinhalten.

Um die teilweise Zersetzung des Membranproteins bei der Denaturierungsreaktion vor Durchführung der SDS-PAGE zu verringern, wurde die Reaktion statt bei 37 °C jetzt bei RT durchgeführt. Zusätzlich wurde zur Verminderung der unspezifischen Bindung der beiden Antikörper auf dem Western Blot die Verdünnung des primären Antikörpers von 1:160 auf 1:640 und die des sekundären Antikörpers von 1:10.000 auf 1:20.000 erhöht. Außerdem wurde die BSA-Konzentration in der Lösung des primären Antikörpers erhöht. Das Ergebnis dieser Optimierungen ist in Abbildung 4.2 (B) zu sehen.

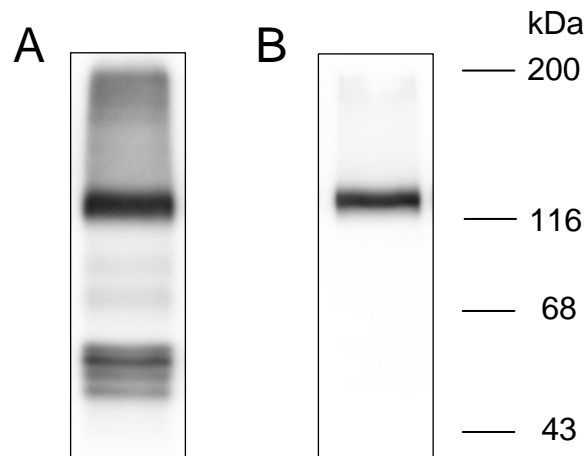


Abb. 4.2: Antikörpermarkierung eines Western Blots von ABCB1 vor und nach Optimierung. (A) Denaturierung der Proben für die SDS-PAGE bei 37 °C, Verdünnung des primären Antikörpers C219 1:160 und des sekundären Antikörpers 1:10.000 (5 μ g pro Bahn); (B) Denaturierung bei RT, Verdünnung des primären Antikörpers 1:640 und des sekundären Antikörpers 1:20.000 (5 μ g pro Bahn).

Transformation von BJ5457 wt

Für den Stamm BJ5457-ABCB1 wurde von Figler *et al.* eine durchschnittliche Expressionsrate von 3,2 % beschrieben [103]. In dieser Veröffentlichung wurde berichtet, dass der ABCB1-Gehalt von aus diesem Stamm isolierten Zellmembranen hoch sei, da der Abbau des Proteins durch die Protease-Defizienz der Hefezellen vermindert war. Durch Zusatz von 10 % Glycerol zum Kulturmedium konnte die Expression in dieser Studie noch weiter erhöht werden. Zusätzlich wurde für die Expression von ABCB1 der starke, konstitutive PMA1-Promotor eingesetzt. PMA1 ist ebenfalls eine membranständige ATPase, die in der Zellmembran von *S. cerevisiae* sehr häufig vorkommt. Der Expressionlevel von ABCB1 wurde unter der Kontrolle des PMA1-Promotors schließlich auf den oben genannten Wert gesteigert.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit variierte die Expression des vorhandenen Hefestammes BJ5457-ABCB1 von Klon zu Klon jedoch stark [127]. Aus diesem Grund wurde ein frisches Aliquot des BJ5457 wt Stammes mit dem Plasmid YEplac181-MDR1His transformiert und Klone des neuen BJ5457-ABCB1 Stammes bezüglich Expression und Wachstumsverhaltens charakterisiert.

Vor der Transformation von BJ5457 wt wurde das Plasmid YEplac181-MDR1His wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben mit Hilfe von *E. coli* vermehrt. Nach Midi-Präparation lag eine Konzentration von 1,5 µg/µl Plasmid-DNA in guter Reinheit (Faktor 1,9) vor. Mit dieser Plasmidpräparation wurde die Transformation von *S. cerevisiae* durchgeführt. Die Methoden zur Herstellung kompetenter Hefezellen und der sich anschließenden Transformation sind in Kapitel 3.2.4 ausführlich dargestellt. Für die Transformation wurden zwei verschiedene Plasmid-Mengen (1,5 und 3,0 µg) eingesetzt, um einen möglichen Einfluss auf die ABCB1-Expression zu untersuchen. Nach dem Transformationsvorgang wurden die Zellen auf Selektionsagar (SD-His-Leu) ausgestrichen.

Für beide eingesetzten Plasmid-Mengen entstand nach einer Inkubationszeit von etwa vier Tagen eine ähnliche Anzahl von Kolonien auf dem Agar. Zufällig ausgewählte Kolonien wurden zur Sicherstellung der Selektion über den auxotrophen Marker erneut auf frischen Agarplatten (SD-His-Leu) ausgestrichen. Die hierbei entstandenen Kolonien wurden für die weiteren Studien verwendet.

Charakterisierung von BJ5457-ABCB1

In allen untersuchten Klonen wurde eine Expression von ABCB1 mittels Zellextrakt und Western Blot nachgewiesen, sie erwies sich jedoch als inhomogen. In Abbildung 4.3 ist bei-

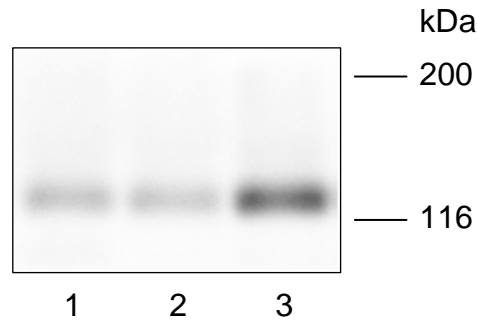


Abb. 4.3: Screening von Klonen des neu transformierten BJ5457-ABCB1 Stammes. Mittels Western Blot wurden mehrere Klone auf ihre Expressionsrate hin untersucht (5 µg pro Bahn): mit 1,5 µg Plasmid-DNA transformierter Klon (Bahn 1); mit 3,0 µg Plasmid-DNA transformierte Klone (Bahnen 2 & 3).

spielhaft ein Western Blot von drei verschiedenen Klonen dargestellt. Einer der Klone war mit 1,5 µg (Bahn 1), die beiden anderen Klone mit 3,0 µg Plasmid-DNA transformiert worden (Bahnen 2 und 3). Hier zeigte sich besonders, dass der Expressionslevel auch bei Verwendung der gleichen DNA-Menge sehr unterschiedlich war. Da der Klon mit der höchsten Expression (Bahn 3) mit 3,0 µg transformiert worden war, sollte zukünftig bei der Transformation von BJ5457 wt diese Plasmid-DNA Menge eingesetzt werden.

Der Klon mit der besten Expression wurde für alle folgenden Untersuchungen verwendet. Zur weiteren Charakterisierung wurde eine Wachstumskinetik aufgenommen (zur Methode siehe Kapitel 3.2.7). Dazu wurden die Hefezellen in 50 ml Medium so lange kultiviert, bis mittels OD-Messung kein weiteres Wachstum feststellbar war. Der transformierte Hefestamm BJ5457-ABCB1 wies eine gegenüber dem Wildtyp-Stamm (1,7 h) eine verlängerte Verdopplungszeit von $2,7 \pm 0,8$ h auf. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Expression von ABCB1 mit dem Wachstum der Hefezellen interferiert. Dieses Phänomen ist bereits in der Literatur beschrieben [89, 103]. Da der Effekt im Rahmen dieser Arbeit auch für die Expression von ABCG2 beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 4.3.1), ist dies wahrscheinlich ein generelles Problem bei der forcierten Expression großer fremder Proteine in *S. cerevisiae*.

4.1.2 Validierung des Fed-Batch Verfahrens

Um bei gleichem Kulturvolumen eine höhere Zelldichte zu erzielen und somit die resultierende Biomasse zu erhöhen, wurde der Hefestamm BJ5457-ABCB1 mittels Fed-Batch Verfahren kultiviert. Die Durchführung ist in Kapitel 3.2.8 beschrieben. Zur Verstärkung der Expression von ABCB1 wurden dem Medium 10 % Glycerol als chemisches Chaperon zugesetzt und ein Startvolumen von ca. 6,6 Liter, das jedoch nicht sofort alle Nährstoffe enthielt, mit einer

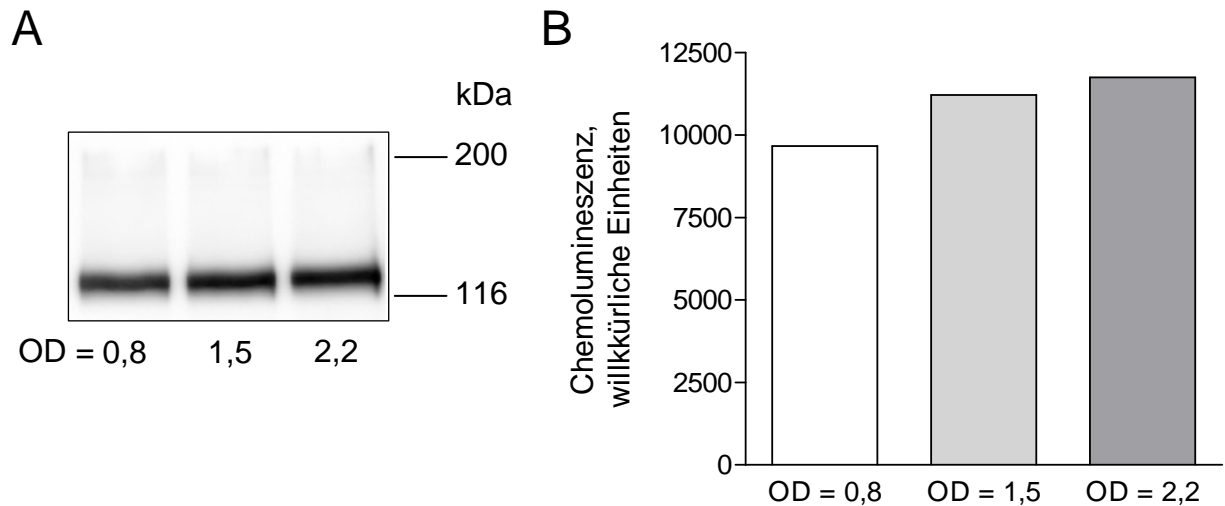


Abb. 4.4: Expression von ABCB1 im Verlauf des Fed-Batch Verfahrens. (A) Western Blot des Zellextraktes der bei der angegebenen OD_{600} entnommenen Proben (5 μ g pro Bahn); (B) Densitometrische Analyse der Chemolumineszenz des in (A) dargestellten Western Blots.

Vorkultur angeimpft. Ab diesem Zeitpunkt wurde der Prozess entlang eines vordefinierten Biomasse- bzw. Zelldichte-Profiles gelenkt, in dem durch regelmäßige Kontrolle der OD_{600} die Zelldichte überwacht wurde. Bei einer OD_{600} von 0,8–1,0 bzw. 1,6–1,8 wurden der Kultur weitere Nährstoffe hinzugefügt und bei einer optischen Dichte von 2,4 der Erntevorgang gestartet.

In der Literatur wurde beschrieben, dass die Expression von ABCB1 von der Wachstumsphase der Hefekultur abhängt und in der stationären Phase durch proteolytische Degradation stark zurückgeht [103, 144]. Die höchste ABCB1-Expression wurde bei Standard-Kultivierung für eine optische Dichte von 1,2 beschrieben [103]. Da der Hefestamm jedoch bei dem hier beschriebenen Fed-Batch Verfahren bis zur doppelten OD_{600} kultiviert wird, wurde untersucht, ob die Expression von ABCB1 über das gesamte OD-Profil stabil bleibt. Dazu wurden kurz vor Zusatz weiterer Nährstoffe ($OD = 0,8$ bzw. 1,5) und kurz vor Beginn der Ernte ($OD = 2,2$) Proben aus dem Fermenter entnommen. Der aus diesen Proben gewonnene Zellextrakt wurde jeweils mittels Western Blot auf den ABCB1-Gehalt untersucht. Zusätzlich wurden die Banden mittels densitometrischer Analyse verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 dargestellt.

Es zeigte sich, dass der ABCB1-Gehalt der Zellen mit Hilfe des Fed-Batch Verfahrens im OD_{600} -Bereich von 0,8 und 1,5 trotz erhöhter Zelldichte gesteigert werden konnte. Im weiteren Verlauf nahm die Expression ebenfalls noch geringfügig zu. Aus diesem Grund wurde die Fed-Batch-Kultivierung im Rahmen der vorliegenden Arbeit routinemäßig zur Herstellung großer Mengen an Biomasse verwendet und auch auf den Hefestamm LPY-ABCG2 übertragen.

4.1.3 Selektionsmethoden für ABCB1 exprimierende Hefestämme

Da der neu transformierte Hefestamm BJ5457-ABCB1 eine sehr inhomogene Expression aufwies (siehe Abbildung 4.3), wurden zwei verschiedene literatur-beschriebene Selektionsmethoden angewandt, die über die auxotrophen Marker hinausgehen. Das Prinzip der auxotrophen Selektion ist in Kapitel 3.2.1 ausführlich dargestellt. Zusätzlich dazu können dem Agar Verbindungen zugesetzt werden, die für Zellen toxisch sind, welche das Zielprotein nicht enthalten. Um dies zu erreichen müssten diese Stoffe im vorliegenden Fall eine fungizide Wirkung aufweisen und gleichzeitig Substrate von ABCB1 sein. Transformierte Hefezellen mit hoher ABCB1-Expression könnten solche Verbindungen wieder aus dem Zellinnern heraustransportieren und wären durch diesen Resistenzmechanismus vor der toxischen Wirkung der Stoffe geschützt. Zellen, die das Transportprotein nicht oder nur in sehr geringer Konzentration in der Membran aufweisen, würden durch die Fungizide jedoch in ihrem Wachstum gehemmt.

Zum einen wurde über das Fungizid und Peptidantibiotikum Valinomycin als Substrat von ABCB1 [144] und als Agarzusatz zur Selektion ABCB1-exprimierender *S. cerevisiae* Stämme [89, 102, 103] berichtet. Zum anderen wurde die antifungale Wirkung des Peptidantibiotikums Aureobasidin A beschrieben, welches ebenfalls ein ABCB1-Substrat darstellt [130, 131, 145].

Abbildung 4.5 zeigt verschiedene Agarplatten (SD-His). (A) und (C) enthielten jeweils kein Antibiotikum, während (B) 150 μM Valinomycin bzw. (D) 0,45 μM Aureobasidin A zugesetzt worden waren. In einem Viertel der Agarplatten war der Wildtyp-Stamm (in der Abbildung mit „wildtype“ oder „wildtyp“ bezeichnet) ausgestrichen, in den anderen drei Vierteln der transformierte Stamm. Die eingesetzten Antibiotika-Konzentrationen wurden der oben genannten Literatur entnommen.

In Abbildung 4.5 (B) und (D) ist zu sehen, dass der Wildtyp-Stamm im Gegensatz zum ABCB1-exprimierenden Stamm auf den antibiotika-haltigen Agarplatten keine Kolonien bilden kann. Zusätzlich sind die Kolonien auf dem Valinomycin-haltigen Agar in (C) kleiner als alle anderen Kolonien. Da alle Agarplatten über den gleichen Zeitraum inkubiert wurden, zeigte sich, dass Valinomycin das Wachstum des BJ5457-ABCB1 Stammes beeinflusste.

Von beiden Agarplatten wurden jeweils zwei Klone zufällig ausgewählt und mittels Fed-Batch Verfahren kultiviert (siehe Kapitel 3.2.8). Sowohl die OD_{600} zum Erntezeitpunkt ($2,6 \pm 0,2$), als auch die geerntete Biomasse ($60,3 \pm 1,8$ g) war bei allen Kultivierungen sehr einheitlich. Bei der Präparation der Zellmembranen laut Kapitel 3.2.9 zeigte sich, dass auch die im ersten Schritt permeabilisierte und pelletierte Biomasse vergleichbar war ($29,2 \pm 0,9$ g),

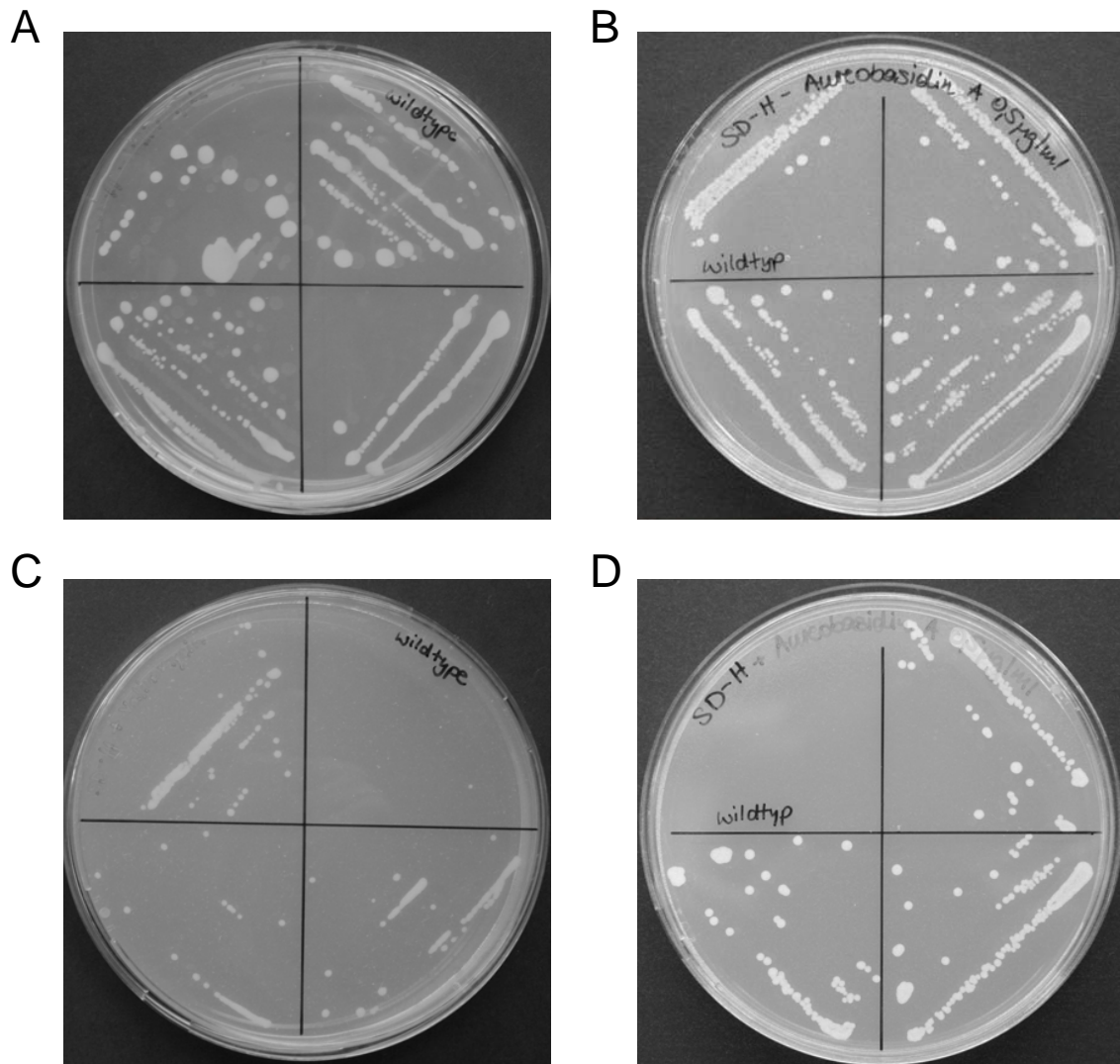


Abb. 4.5: Vergleich des Wachstums von BJ5457 wt und -ABCB1 Zellen in An- und Abwesenheit von Selektionsantibiotika. Agarplatten (SD-His) mit BJ5457-ABCB1 und BJ5457 wt (A) & (C) ohne Antibiotikum; (B) mit Valinomycin (150 μ M); (D) mit Aureobasidin A (0,45 μ M).

die anschließend im Beadbeater aufgeschlossen wurde. Unterschiede im ABCB1-Gehalt der vier Membranpräparationen können also nicht auf eine unterschiedliche Ausgangszellmasse zurückgeführt werden, ein Vergleich hinsichtlich des ABCB1-Gehaltes ist somit möglich.

Die Membranpräparationen wurden mittels Western Blot auf ihre ABCB1-Expression untersucht, die Ergebnisse sind in Abbildung 4.6 (A) dargestellt. Es zeigte sich, dass die mit Valinomycin selektierten Klone von BJ5457-ABCB1 einen viel geringeren Proteingehalt aufwiesen als die mit Aureobasidin A selektierten Klone. Durch densitometrische Auswertung der Chemolumineszenz-Intensität der Banden wurde festgestellt, dass sich der ABCB1-Gehalt um den Faktor 2 unterschied. Dies geht aus Abbildung 4.6 (B) hervor.

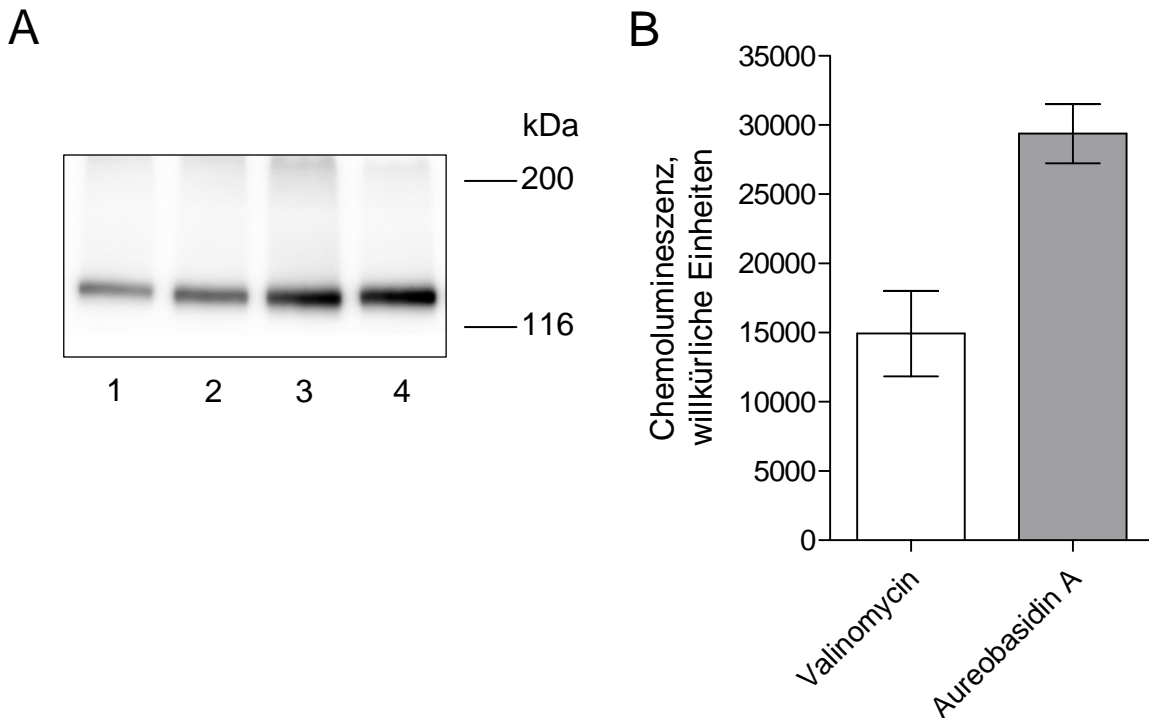


Abb. 4.6: Vergleich der Expression von ABCB1 in BJ5457-ABCB1 Klonen nach Selektion mit Valinomycin bzw. Aureobasidin A. (A) Western Blot von Membranpräparationen mit Valinomycin (Bahnen 1 & 2) und Aureobasidin A (Bahnen 3 & 4), je 5 μg pro Bahn; (B) Densitometrische Analyse der gemittelten Chemolumineszenz-Werte von (A).

Zusätzlich wurde die apparente Expression von ABCB1 mit Hilfe eines modifizierten ATPase Assays bestimmt, der laut Kapitel 3.2.10 durchgeführt wurde. Dabei ergab sich für die beiden mit Valinomycin selektierten Klone eine Expression von durchschnittlich 1,95 %. Für die mit Aureobasidin A selektierten Klone betrug die apparente Expression jedoch im Mittel 2,80 %. Der mit dieser Methode bestimmte Unterschied in der Expression war zwar etwas geringer ausgeprägt, der generelle Trend wurde jedoch bestätigt.

In Tabelle 4.1 werden die Kulturparameter des BJ5457-ABCB1 Stammes bei einer Selektion nur über den auxotrophen Marker, über Valinomycin und über Aureobasidin A im Fermenter verglichen. Es zeigte sich, dass mittels Aureobasidin-Selektion die Kulturdauer im Vergleich zur ausschließlichen Selektion über den auxotrophen Marker deutlich verkürzt werden konnte. Zur Dauer der Kultivierung mit Valinomycin-Selektion zeigte sich nur ein geringer Unterschied, jedoch war das Wachstum des Hefestammes nach Aureobasidin-Selektion geringeren Schwankungen unterlegen. Die Verdopplungszeit der Klone war bei allen verwendeten Selektionsmethoden gleich. Aufgrund der geringen Variabilität der Verdopplungszeit Aureobasidin-selektierter Klone war die Dauer der Kultivierung im Fermenter sehr zuverlässig vorhersagbar und vereinfachte somit die Durchführung des Fed-Batch Verfahrens.

Tab. 4.1: Kulturparameter des BJ5457-ABCB1 Stammes bei Anwendung verschiedener Selektionsmethoden.

Selektionsmethode	Kulturdauer [h]	Verdopplungszeit [h]
Auxotropher Marker	37,0	4,80 ± 0,70
+ Valinomycin 150 µM	32,7 ± 1,9	4,80 ± 0,20
+ Aureobasidin A 0,5 µg/ml	29,8 ± 0,8	4,70 ± 0,04

Da das Antibiotikum bereits in einer relativ geringen Konzentration Auswirkungen auf die Expression von ABCB1 hatte, wurde untersucht, wie sich der Zusatz zu einer 50 ml Kultur auf die Verdopplungszeit des Stammes auswirkt, die als Vorkultur des Fed-Batch Verfahrens dienen könnte. Dazu wurde eine Wachstumskinetik in An- und Abwesenheit von 0,5 µg/ml Aureobasidin A laut Kapitel 3.2.7 aufgenommen.

Die Verdopplungszeiten der Kulturen betragen mit Aureobasidin-Zusatz $2,7 \pm 0,3$ h bzw. ohne Aureobasidin $2,7 \pm 0,8$ h. Also würde der Einsatz des Selektionsantibiotikums keine Verzögerung im zeitlichen Ablauf der Fed-Batch Kultivierung bewirken und auch nur geringe Mehrkosten verursachen. Eventuell würde sich auf diese Weise die Expression von ABCB1 noch weiter erhöhen lassen.

Fazit

Insgesamt war Aureobasidin A deutlich besser geeignet als Valinomycin, um BJ5457-ABCB1 Klone mit hohem Expressionslevel zu selektieren. Der Einsatz dieses Peptidantibiotikums vereinfachte auch die Durchführung der Fed-Batch Kultivierung, da die auf diese Weise gewonnenen Klone gut reproduzierbare Kulturparameter aufwiesen. Zukünftig sollte diese Selektionsmethode in Kombination mit dem neu transformierten Hefestamm BJ5457-ABCB1 standardmäßig eingesetzt werden. So können Mehrkosten und Arbeitsaufwand für Klone mit niedriger Expressionsrate vermieden werden.

4.1.4 Optimierung der Aufreinigung von ABCB1

Zur Optimierung der Aufreinigung von ABCB1 aus Membranen von BJ5457-ABCB1 wurden die beiden Detergenzien Lysophosphatidylcholin (LPC) und Taurodesoxycholat (TDOC) verglichen, deren Verwendung zur Solubilisation dieses Proteins aus *S. cerevisiae* in der Literatur beschrieben worden ist [89, 103, 127]. Die Strukturen beider Verbindungen sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Bisher wurde vermutet, dass ABCB1 durch LPC viel effektiver solubilisiert wird als durch TDOC [127]. Um Unterschiede der Solubilisationsfähigkeit der

beiden Detergenzien nachzuweisen, wurde die Aufreinigung aus der gleichen Membranpräparation durchgeführt. Auf diese Weise wurden Unterschiede im ABCB1-Gehalt verschiedener Membran-Chargen als mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen.

BJ5457-ABCB1 Zellen wurden dafür mit Hilfe des Fed-Batch Verfahrens kultiviert und aus der gewonnenen Biomasse eine Membranpräparation hergestellt (siehe Kapitel 3.2.8 und 3.2.9). Das Vorliegen von ABCB1 in den Membranen wurde mittels Western Blot überprüft und die apparente Expression bestimmt, wie in Kapitel 3.2.10 beschrieben. Da die Expression von ABCB1 bei 2,7 % lag, waren diese Membranen für eine Aufreinigung gut geeignet.

Die Membranpräparation wurde in zwei Ansätze aufgeteilt, mit Solubilisationspuffer auf eine Gesamtproteinkonzentration von 2 mg/ml eingestellt und je 20 min mit 2 % TDOC oder 1 % LPC solubilisiert. Die Konzentration der Detergenzien orientierte sich an der zu Beginn des Kapitels genannten Literatur. Danach wurden beide Ansätze im weiteren Aufreinigungsprozess gleich behandelt, dessen Durchführung in Kapitel 3.2.13 ausführlich dargestellt ist. Zusätzlich wurden bei jedem Schritt Proben entnommen, die im Anschluss mittels SDS-PAGE und Silberfärbung bzw. Western Blot untersucht wurden. Die Ergebnisse für das Detergenz TDOC sind in Abbildung 4.8 (A) und (B) dargestellt. Vergleicht man in (B) die Banden von nicht-solubiliertem (Bahn 3) und solubiliertem ABCB1 (Bahn 4) mittels Densitometrie, zeigt sich, dass etwas weniger als 50 % des gesamten Proteins solubiliert wurde (Verhältnis 1:0,8). Auch wurde deutlich, dass etwa 50 % des solubilierten ABCB1 nicht an die Ni-beads gebunden wurden (Bahn 5).

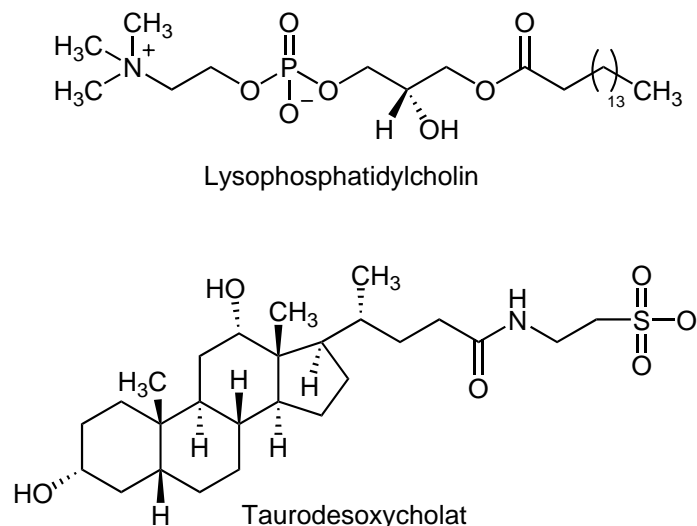


Abb. 4.7: Struktureller Vergleich der zur Solubilisierung von ABCB1 verwendeten Detergenzien Lysophosphatidylcholin (LPC) und Taurodesoxycholat (TDOC).

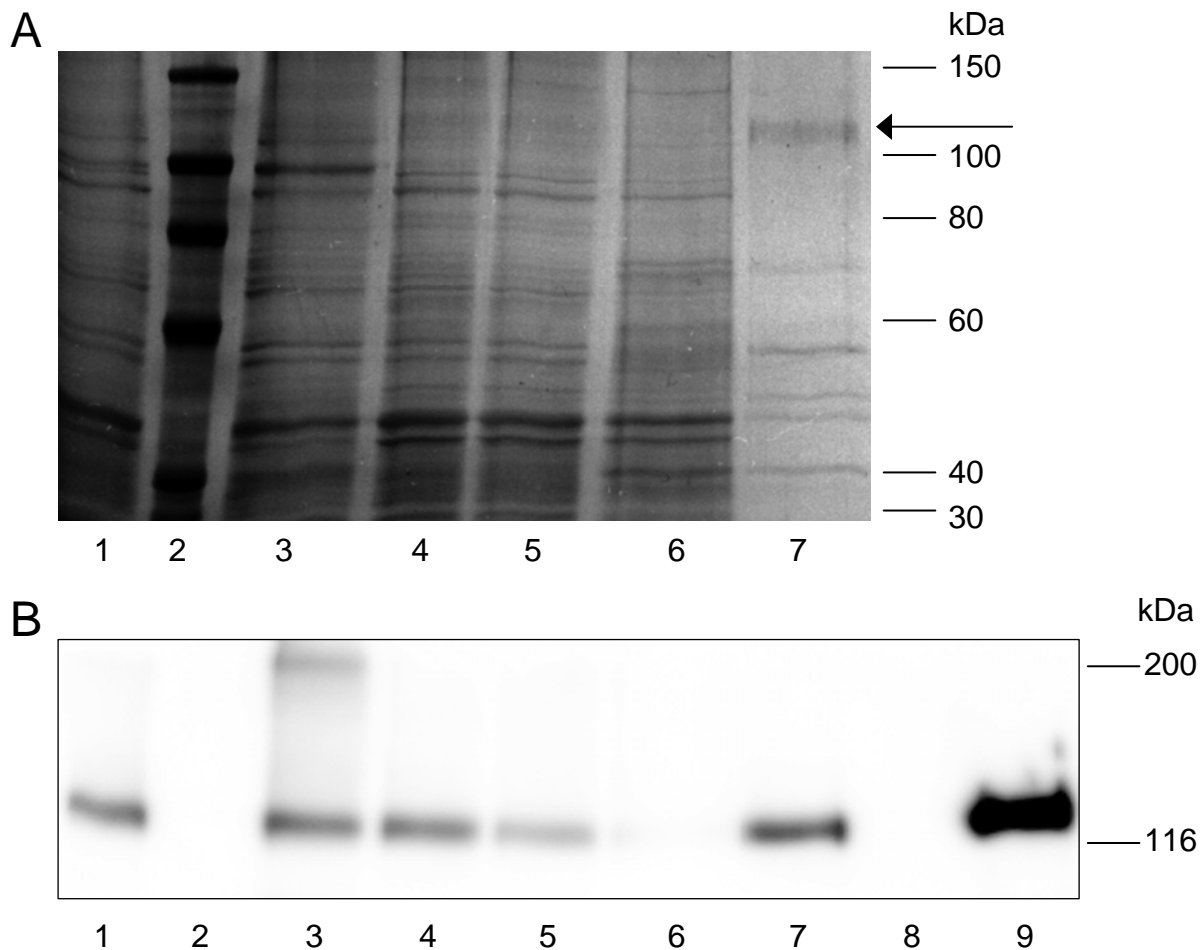


Abb. 4.8: Aufreinigung von ABCB1 mit 2 % TDOC. (A) SDS-PAGE und Silberfärbung von Proben des Aufreinigungsprozesses (5 μg in Bahnen 1, 3, 4, 9, 15 μl in Bahnen 5–8): Ausgangsmembranen (Bahn 1), Proteinstandard (Bahn 2), nicht-solubilierte Proteine (Bahn 3), mit TDOC solubilierte Proteine (Bahn 4), nicht an Ni-NTA gebundene Proteine (Bahn 5), Waschschrift Ni-NTA (Bahn 6), von Ni-NTA eluiertes ABCB1 (Bahn 7); (B) Western Blot der Proben aus dem Aufreinigungsprozess in der gleichen Reihenfolge und Konzentration wie bei (A), zusätzlich Überstand nach Ultrazentrifugation der Proteoliposomen (Bahn 8), rekonstituiertes Protein (Bahn 9).

Für LPC wurden andere Ergebnisse erhalten (siehe Abbildung 4.9). Bei Verwendung dieses Detergenzes wurde deutlich mehr ABCB1 solubiliert, in der densitometrischen Analyse von (B) zeigte sich ein Verhältnis von 1:1,6 zwischen nicht-solubiliertem (Bahn 3) und solubiliertem Protein (Bahn 4). Es wird also hier im weiteren Verlauf der Aufreinigung etwa doppelt so viel ABCB1 in der Affinitätschromatographie eingesetzt als nach Solubilisierung mit TDOC. Zusätzlich ist nach LPC-Solubilisierung die Bindung an die Ni-beads effektiver, nur 30 % des solubilierten ABCB1 werden nicht gebunden. Dies könnte auf eine Interferenz von TDOC mit der Bindung an Ni-NTA hindeuten, da anteilig viel mehr mit LPC solubiliertes Protein gebunden wird.

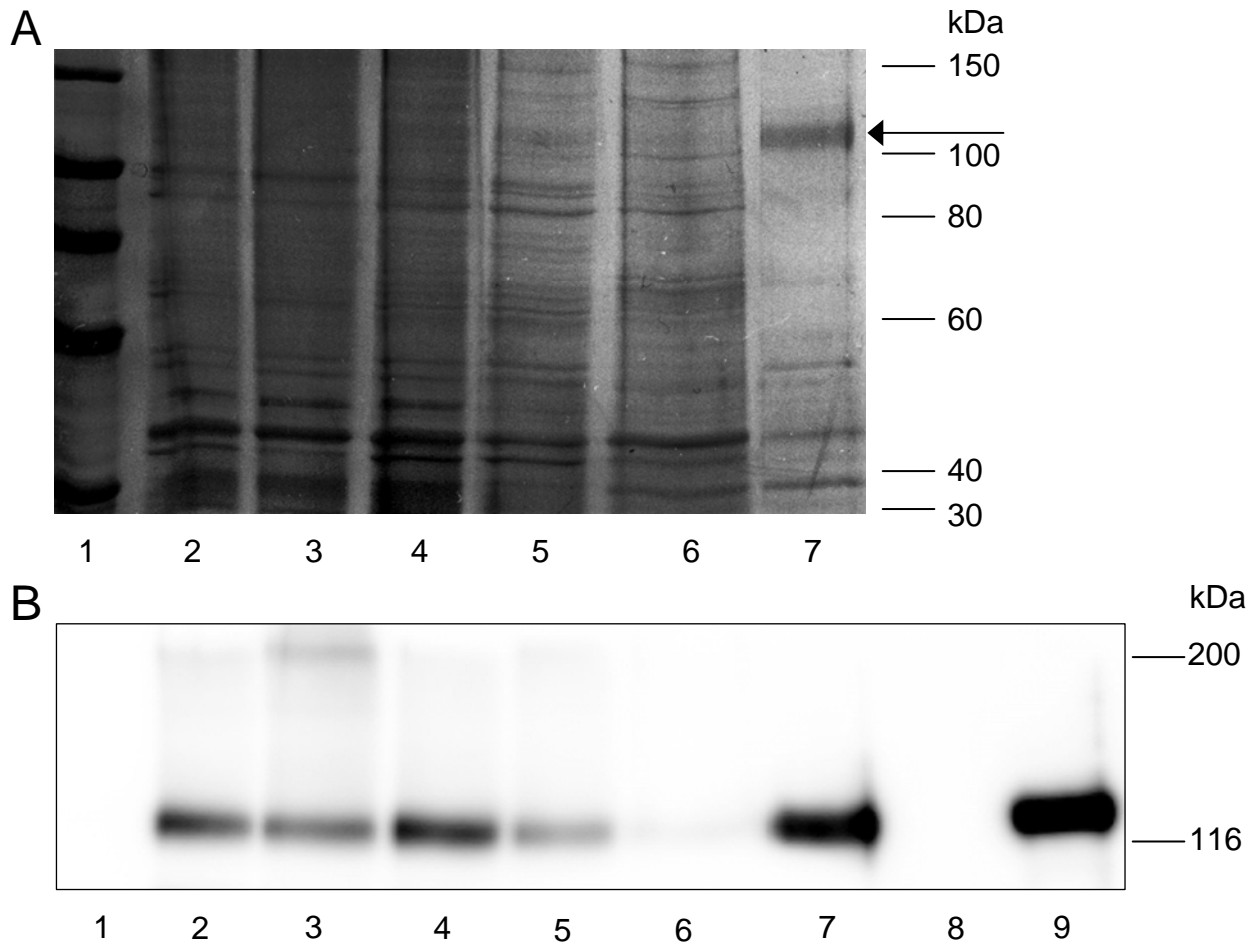


Abb. 4.9: Aufreinigung von ABCB1 mit 1 % LPC. (A) SDS-PAGE und Silberfärbung von Proben des Aufreinigungsprozesses (5 μ g in Bahnen 2–4 & 9, 15 μ l in Bahnen 5–8): Proteinstandard (Bahn 1), Ausgangsmembranen (Bahn 2), nicht-solubilisierete Proteine (Bahn 3), mit LPC solubilisierete Proteine (Bahn 4), nicht an Ni-NTA gebundene Proteine (Bahn 5), Waschschrift Ni-NTA (Bahn 6), von Ni-NTA eluiertes ABCB1 (Bahn 7); (B) Western Blot der Proben aus dem Aufreinigungsprozess in der gleichen Reihenfolge und Konzentration wie bei (A), zusätzlich Überstand nach Ultrazentrifugation der Proteoliposomen (Bahn 8), rekonstituiertes Protein (Bahn 9).

Für einen Vergleich der beiden von den Ni-beads eluierten Fraktionen (jeweils Bahn 7) wurden die Proben zusammen auf einen Blot aufgetragen. Dabei wurde deutlich, dass das mit LPC gewonnene Eluat sehr viel mehr ABCB1 enthielt als das mit TDOC gewonnene Eluat. Auch die mit Hilfe des Amido Black Assays bestimmte Gesamtproteinkonzentration in den final vorliegenden Proteoliposomen war für die LPC-Aufreinigung mit 0,99 mg/ml etwa doppelt so hoch wie die der TDOC-Aufreinigung (0,45 mg/ml). Die Unterschiede der beiden Detergenzien zeigten sich besonders bei Betrachtung der Gesamtausbeute. Dabei wurde der ABCB1-Gehalt der Ausgangsmembranen zur ABCB1-Menge im gesamten Volumen der

Proteoliposomen-Suspension ins Verhältnis gesetzt. Für LPC betrug sie 19,9 %, für TDOC nur 4 %.

Um die Aktivität des mit den verschiedenen Detergenzien aufgereinigten ABCB1 vergleichen zu können, wurde untersucht, ob die Ausrichtung der Proteinmoleküle in der Membran der Proteoliposomen einheitlich war. Diese Ausrichtung hängt von der beim Aufreinigungsprozess verwendeten Lipidkonzentration ab. Hier wurden dem Elutionspuffer 0,4 % gemischte Lipide zugesetzt, dies sollte zu einer inside-out Orientierung von ungefähr 50 % führen [127, 130]. In der Literatur wurde beschrieben, dass die ABCB1-Moleküle eine hohe Aktivität im ATPase Assay zeigen, wenn sie in diesem Verhältnis in den Proteoliposomen vorliegen. Würde weniger Lipid verwendet, wären dagegen bis zu 90 % der Moleküle in der inside-out Orientierung in die Liposomenmembran integriert. Trotzdem wäre die Aktivität wesentlich geringer. In der oben genannten Literatur wurde dieses Phänomen auf eine sterische Hinderung aufgrund der hohen ABCB1-Konzentration zurückgeführt.

Die inside-out Orientierung von ABCB1 in den Proteoliposomen wurde mit Hilfe des in Kapitel 3.2.16 beschriebenen CHAPS-Assays ermittelt. Für die beiden verschiedenen Aufreinigungen wurde eine mittlere inside-out Orientierung von $43,9 \pm 1,5$ % bestimmt, wie es durch den Einsatz der Lipide in einer Konzentration von 0,4 % etwa zu erwarten war und ähnlich in der Literatur beschrieben wurde. Dieses Ergebnis zeigt zum einen, dass das zur Solubilisation eingesetzte Detergenz, welches theoretisch beim Dialysevorgang entfernt werden sollte, keinen Einfluss mehr auf den Einbau von ABCB1 in die Proteoliposomen hat. Zum anderen war die Orientierung der ABCB1-Moleküle für beide Liposomen-Ansätze vergleichbar und Unterschiede der ATPase Aktivität wären vor allem auf den Einsatz der beiden verschiedenen Detergenzien zurückzuführen.

Mittels des in Kapitel 3.2.15 dargestellten ATPase Assays wurde die spezifische ATPase Aktivität der aufgereinigten Proteine bestimmt. Dazu wurde die basale Aktivität und die durch 130 μ M Verapamil stimulierte Aktivität ermittelt. Der aus beiden Werten gebildete Quotient stellte den Aktivierungsfaktor dar. Dieser Faktor betrug für die LPC-Aufreinigung $4,80 \pm 0,02$ und für die TDOC-Aufreinigung $3,90 \pm 0,56$. Das mit LPC solubilisierte ABCB1 war also etwas besser stimulierbar. Daneben waren die Ergebnisse für dieses ABCB1 im Gegensatz zum mit TDOC aufgereinigten Protein sehr gut reproduzierbar.

Neben dem Aktivierungsfaktor wurde untersucht, ob der pEC_{50} -Wert für Verapamil im ATPase Assay (siehe Kapitel 3.1.9) für beide Aufreinigungen übereinstimmte. Der pEC_{50} -Wert betrug für das mit LPC aufgereinigte ABCB1 $4,80 \pm 0,25$ (SEM), für das mit TDOC aufgereinigte Protein $4,63 \pm 0,10$ (SEM) und war somit vergleichbar.

Fazit

Das Detergenz LPC war in der Lage, doppelt so viel ABCB1 aus dem Proteingemisch der Membranpräparation zu solubilisieren wie TDOC. Auch die Bindung des Histidin-markierten Proteins an Ni-NTA in der Affinitätschromatographie war für mit LPC solubilisiertes Protein erhöht. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass TDOC die Bindung des His-Tags an Nickel direkt beeinflusst. Eine andere Möglichkeit wäre eine teilweise Veränderung der Konformation des His-Tags durch TDOC, so dass dieser nicht mehr frei zugänglich vorläge. Sowohl die weniger effektive Solubilisierung von ABCB1 durch TDOC, als auch die schlechte Bindung an die Ni-beads führten dazu, dass im Eluat der Affinitätschromatographie viel weniger Protein vorhanden war als für den Ansatz mit LPC. Die ABCB1-Konzentration in den Proteoliposomen war bei Verwendung von LPC doppelt so hoch wie beim Einsatz von TDOC. Die Gesamtausbeute verdeutlicht noch viel stärker den Vorteil von LPC, für dieses Detergenz betrug sie 19,9 %. Im Gegensatz dazu konnte mit TDOC nur 4 % des eingesetzten ABCB1 isoliert werden. LPC war somit insgesamt fast fünffach effektiver.

Die Aktivierbarkeit beider aufgereinigter Proteine wies zwar keinen so deutlichen Unterschied auf, jedoch war mit LPC aufgereinigtes Protein etwas stärker mit 130 μM Verapamil stimulierbar. In der Literatur wurde bisher über unterschiedliche Stimulationsfaktoren von ABCB1 berichtet, welches mit 1 % LPC aus *S. cerevisiae* aufgereinigt worden war. Zum einen wurde von Mao und Mitarbeitern eine 2,8fache Stimulation durch Verapamil beobachtet [89]. Im Vergleich dazu ist das hier gewonnene ABCB1 sehr viel besser aktivierbar. Zum anderen wurde von Figler *et al.* eine Stimulation der ATPase Aktivität durch Verapamil um das 4,8fache beschrieben [103]. Die hier präsentierten Ergebnisse stimmen damit sehr gut überein. Da die pEC_{50} -Werte von Verapamil für beide Aufreinigungen im gleichen Bereich lagen, konnten beide Präparationen für ATPase Messungen verwendet werden.

4.1.5 Optimierung der Membranpräparation von BJ5457-MDR1

Die Isolierung der Zellmembranen von BJ5457-ABCB1 stellt einen wichtigen Ausgangspunkt für die Gewinnung von aufgereinigtem ABCB1 dar. Da die Membranen für die Aufreinigung möglichst viel Protein enthalten sollten, wurde untersucht, ob bei der bisher etablierten Membranpräparationsmethode größere Mengen ABCB1 verworfen werden und ob dies vermindert werden könnte. Dazu wurden zunächst an verschiedenen Stellen im Standard-Prozess Proben entnommen und diese mittels Western Blot auf ihren ABCB1-Gehalt untersucht (siehe Abbildung 4.10). Es ist zu sehen, dass durch die Zentrifugation 2 ($14.000 \times g$) sehr viel ABCB1 abgetrennt und verworfen wurde (Bahn 2). Durch Zentrifugation 1 ($3.500 \times g$)

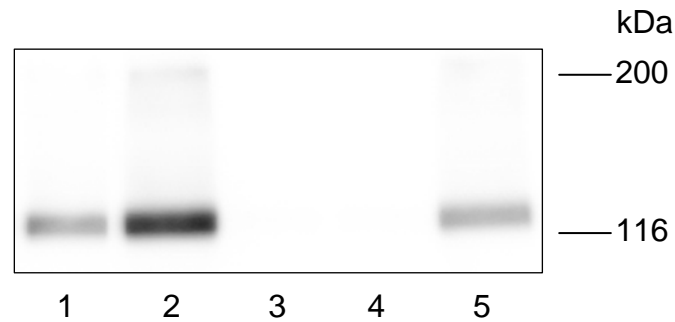


Abb. 4.10: Membranpräparation von BJ5457-ABCB1. SDS-PAGE und Western Blot von Proben des Membranpräparationsprozesses (5 μ g pro Bahn): Pellet Zentrifugation 1 (Bahn 1), Pellet Zentrifugation 2 (Bahn 2), Überstand Ultrazentrifugation 1 (Bahn 3), Überstand Ultrazentrifugation 2 (Bahn 4), Zellmembranen (Bahn 5).

wurde ebenfalls eine geringere Menge an Protein entfernt (Bahn 1). Unter anderem werden durch diesen Schritt jedoch auch nicht aufgeschlossene Zellen sedimentiert, deren ABCB1 im Aufreinigungsprozess nicht erfasst werden könnte. Aus diesem Grund sollte dieser Zentrifugationsschritt beibehalten werden. Eine effektive Optimierung der ABCB1-Ausbeute der Membranpräparation könnte also lediglich durch Weglassen von Zentrifugation 2 erfolgen.

Zur Überprüfung dieser These wurde mit Hilfe des Fed-Batch Verfahrens aus BJ5457-ABCB1 Zellen eine ausreichende Menge an Biomasse gewonnen und eine Membranpräparation hergestellt (siehe Kapitel 3.2.9). Dabei wurde der Überstand von Zentrifugation 1 in zwei Ansätze aufgeteilt. Einer der Ansätze wurde unter den Bedingungen von Zentrifugation 2 behandelt, der andere in dieser Zeit auf Eis gelagert. Danach wurden beide Ansätze ultrazentrifugiert und im Weiteren gleich behandelt. Bei verschiedenen Schritten wurden Proben entnommen und das Vorhandensein von ABCB1 mittels Western Blot überprüft.

Die densitometrische Auswertung des Blots zeigte, dass durch Auslassen von Zentrifugation 2 eine etwa 1,4fach stärkere Anreicherung von ABCB1 in der finalen Fraktion der Zellmembranen erreicht werden konnte. Mit Hilfe des ATPase Assays wurde daneben die apparente Expression von ABCB1 in beiden Zellmembran-Ansätzen bestimmt. Diese betrug für den Ansatz mit zweitem Zentrifugationsschritt 2,7 % und für den Ansatz ohne Zentrifugationsschritt 3,1 %. Auch hier war also ein Unterschied zu erkennen, jedoch war dieser nicht so stark ausgeprägt.

Laut Literatur werden bei Geschwindigkeiten zwischen 9.000 und $12.000 \times g$ Mitochondrien und endoplasmatisches Reticulum (ER) pelletiert [146, 147]. Folglich wären diese Zellbestandteile auch in einem Pellet nach der Zentrifugation 2 mit $14.000 \times g$ vorhanden. Der hohe ABCB1-Anteil in diesem Pellet kann damit erklärt werden, dass Proteine und somit auch ABCB1 im ER gebildet, gefaltet und posttranslational modifiziert werden. Es stellte

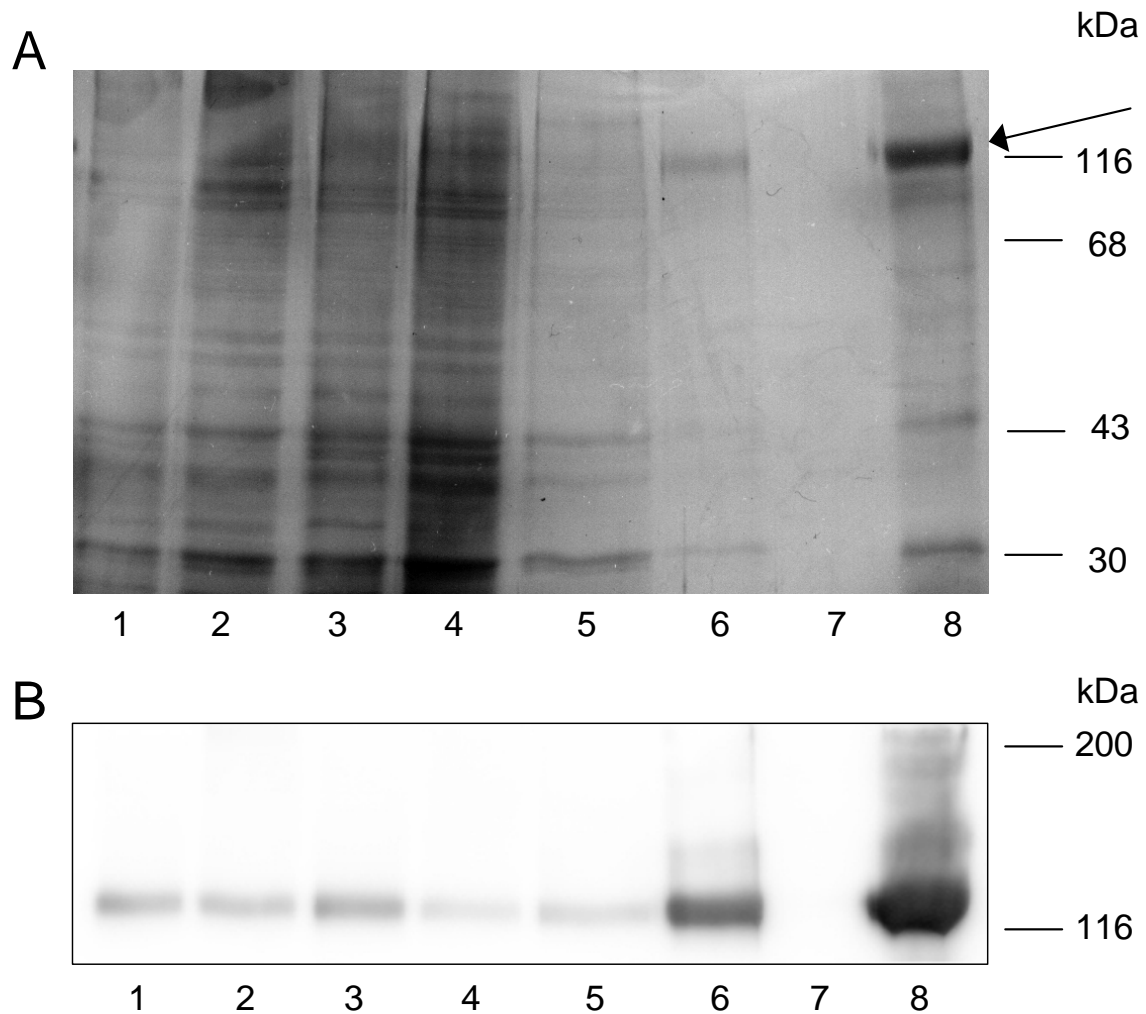


Abb. 4.11: Aufreinigung von ABCB1 aus einer Standard-Membranpräparation (mit Zentrifugation 2). (A) SDS-PAGE mit Silberfärbung und (B) Western Blot von Proben des Aufreinigungsprozesses in der gleichen Reihenfolge (5 μg in Bahnen 1–4, 15 μl in Bahnen 5–7, 1,5 μg in Bahn 8): Ausgangsmembranen (Bahn 1), nicht-solubilisierete Proteine (Bahn 2), solubilisierete Proteine (Bahn 3), nicht an Ni-NTA gebundene Proteine (Bahn 4), Waschschrift Ni-NTA (Bahn 5), von Ni-NTA eluiertes ABCB1 (Bahn 6), Überstand nach Ultrazentrifugation der Proteoliposomen (Bahn 7), rekonstituiertes ABCB1 (Bahn 8).

sich jedoch die Frage, ob das im ER vorhandene Protein bereits seine funktionelle Konformation erreicht hat oder ob es dort unfertig und aus diesem Grund inaktiv vorliegt.

Um diese Fragestellung zu klären, wurden die beiden verschiedenen Membranpräparationsansätze mit dem im vorigen Kapitel als optimal ermittelten Detergenz LPC (1 %) unter den dort beschriebenen Bedingungen aufgereinigt. An verschiedenen Stellen im Prozess wurden Proben entnommen und diese mittels SDS-PAGE und Silberfärbung bzw. Western Blot untersucht.

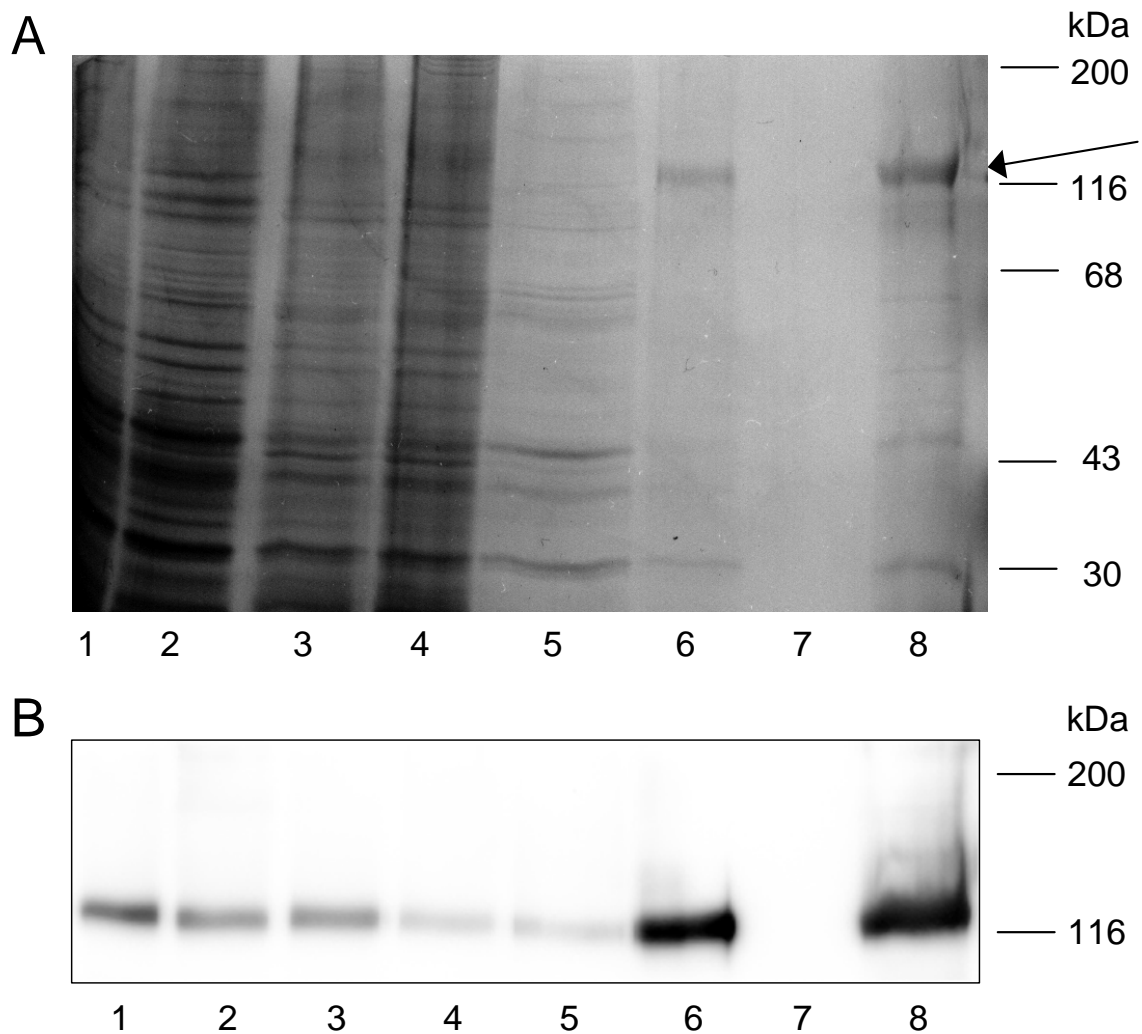


Abb. 4.12: Aufreinigung von ABCB1 aus einer Membranpräparation (ohne Zentrifugation 2). (A) SDS-PAGE mit Silberfärbung und (B) Western Blot von Proben des Aufreinigungsprozesses in der gleichen Reihenfolge (5 μg in Bahnen 1–4, 15 μl in Bahnen 5–7, 1,5 μg in Bahn 8): Ausgangsmembranen (Bahn 1), nicht-solubilierte Proteine (Bahn 2), solubilierte Proteine (Bahn 3), nicht an Ni-NTA gebundene Proteine (Bahn 4), Waschschrift Ni-NTA (Bahn 5), von Ni-NTA eluiertes ABCB1 (Bahn 6), Überstand nach Ultrazentrifugation der Proteoliposomen (Bahn 7), rekonstituiertes ABCB1 (Bahn 8).

Die Ergebnisse für das Standard-Protokoll (mit Zentrifugation 2) sind in Abbildung 4.11 dargestellt, Abbildung 4.12 zeigt die Ergebnisse für das Protokoll ohne Zentrifugation 2. Wie zuvor erwähnt enthielt der Ansatz ohne Zentrifugation mehr ABCB1 als der Ansatz mit Zentrifugationsschritt. Mit Hilfe von 1 % LPC konnte aus beiden Ansätzen etwa die Hälfte des vorhandenen ABCB1 solubilisiert werden (jeweils Bahn 3), davon wurden im Mittel 64 % an den Ni-beads gebunden. Um diesen Wert zu erhöhen, sollte zukünftig mehr Ni-NTA eingesetzt werden. Die Blots verdeutlichen auch, dass beim Wasch-Schritt der Beads Protein verloren geht. Ein Grund für diese nicht optimale Bindung über den His-Tag könnte eine zu hohe Imidazol-Konzentration im Waschpuffer sein. Diese sollte in weiteren Versuchen verringert werden.

Die Proteinkonzentration in den Proteoliposomen betrug 1,14 mg/ml für das Standard-Protokoll. Leider hatte sich über Nacht bei der Dialyse des anderen Ansatzes die Klammer des Dialyseschlauches geöffnet, so dass die Konzentration hier nur noch bei 0,17 mg/ml lag. Aus diesem Grund konnte die finale ABCB1-Konzentration beider Ansätze nicht verglichen werden. Beide Ansätze des aufgereinigten Proteins wurden trotzdem auf die Stimulierbarkeit der ATPase Aktivität untersucht, um zu überprüfen, ob das nicht durch Zentrifugation 2 abgetrennte ABCB1 in seiner aktiven Konformation vorlag. Mit 130 μ M Verapamil konnte die Aktivität des Proteins, das mit Zentrifugationsschritt 2 gewonnen worden war, um den Faktor 9,5 stimuliert werden. Obwohl die Konzentration des Proteins ohne Zentrifugation 2 sehr gering war, konnte eine Stimulation der ATPase Aktivität gemessen werden und der Faktor war mit 11,8 sogar etwas höher.

Fazit

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Konzentration von ABCB1 in den mittels Membranpräparation isolierten Zellmembranen erhöht werden kann, in dem der Zentrifugationsschritt 2 weggelassen wird. Zwar können hier die finalen Proteinkonzentrationen beider Aufreinigungsansätze nicht miteinander verglichen werden, da sich der Dialyseschlauch des Ansatzes ohne Zentrifugation 2 über Nacht geöffnet hatte. Trotzdem konnten noch ABCB1-haltige Proteoliposomen gewonnen und deren ATPase Aktivität bestimmt werden. Es wurde deutlich, dass in diesem Ansatz sehr aktives ABCB1 vorhanden war, da trotz geringer Proteinkonzentration ein hoher Stimulationsfaktor von 11,8 gemessen wurde. Also ist auch ohne die Durchführung von Zentrifugation 2 bei der Membranpräparation aktives ABCB1 in den gewonnenen Zellmembranen vorhanden. Aufgrund der geringen Ausbeute konnten nur wenige Untersuchungen mit dem aufgereinigten Protein durchgeführt werden. Der Versuch konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht wiederholt werden, da dies einen sehr großen zeitlichen und

arbeitstechnischen Aufwand und zusätzlich hohe Kosten bedeutet hätte. Jedoch kann diese Optimierung der Membranpräparationsmethode aufgrund der gezeigten Ergebnisse als sehr vielversprechend betrachtet werden.

4.1.6 Diskussion der Methoden-Optimierung für die Arbeiten mit BJ5457-ABCB1

Durch den Einsatz von Aureobasidin A-haltigen Agarplatten (0,5 µg/ml) konnten zuverlässig BJ5457-ABCB1 Klone mit hoher Expression selektiert werden. Diese Klone waren auch für die Anwendung in der Fed-Batch Kultivierung vorteilhaft, da sie einheitliche und somit vorhersagbare Kulturparameter aufwiesen. Durch Kombination mit dem neu transformierten Hefestamm BJ5457-ABCB1 werden zukünftig unnötige Kosten und unnötiger Arbeitsaufwand vermieden, da Fed-Batch Kultivierungen und Membranpräparationen von Klonen mit sehr niedriger Expressionsrate verhindert werden.

Der Gehalt von ABCB1 im Ausgangsmaterial für die Aufreinigung hatte sich bereits zuvor als sehr wichtig für den Erfolg einer Aufreinigung erwiesen [127]. Aus diesem Grund sollte dieser möglichst zuverlässig bestimmt werden können, da im Rahmen einer Aufreinigung noch deutlich höhere Kosten anfallen als bei einer Membranpräparation. Bei der Bestimmung der Expressionsrate von BJ5457-ABCB1 Klonen wurden in dieser Arbeit die Ergebnisse mehrerer Methoden zur Auswertung herangezogen. Zum einen wurde der ABCB1-Gehalt der Membranpräparation mittels Western Blot und Densitometrie semi-quantitativ untersucht und sollte zukünftig mit einer Referenzpräparation verglichen werden, aus der das Protein in großer Menge aufgereinigt werden konnte. Zum anderen wurde mit Hilfe des modifizierten ATPase Assays (Kapitel 3.2.10) die apparente Expression von ABCB1 in der Membranpräparation untersucht. Wie in Kapitel 4.1.3 erwähnt wiesen Aureobasidin A-selektierte Klone im Mittel eine mit Hilfe dieses Assays bestimmte Expression von 2,8 % auf. Im Folgenden werden die Parameter zur Bestimmung eines für eine erfolgreiche Aufreinigung ausreichenden ABCB1-Gehalts von Membranpräparationen zusammengefasst:

- Densitometrie: ABCB1-Gehalt mindestens gleich der Referenz und
- ATPase Assay: apparente Expression mindestens 2,7 %.

Betrachtet man die Ergebnisse aller im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aufreinigungen, so können mit TDOC $5,0 \pm 1,1$ % des im Ausgangsmaterial vorhandenen ABCB1 isoliert werden, die finale Proteinkonzentration in den Proteoliposomen betrug $0,44 \pm 0,1$ mg/ml.

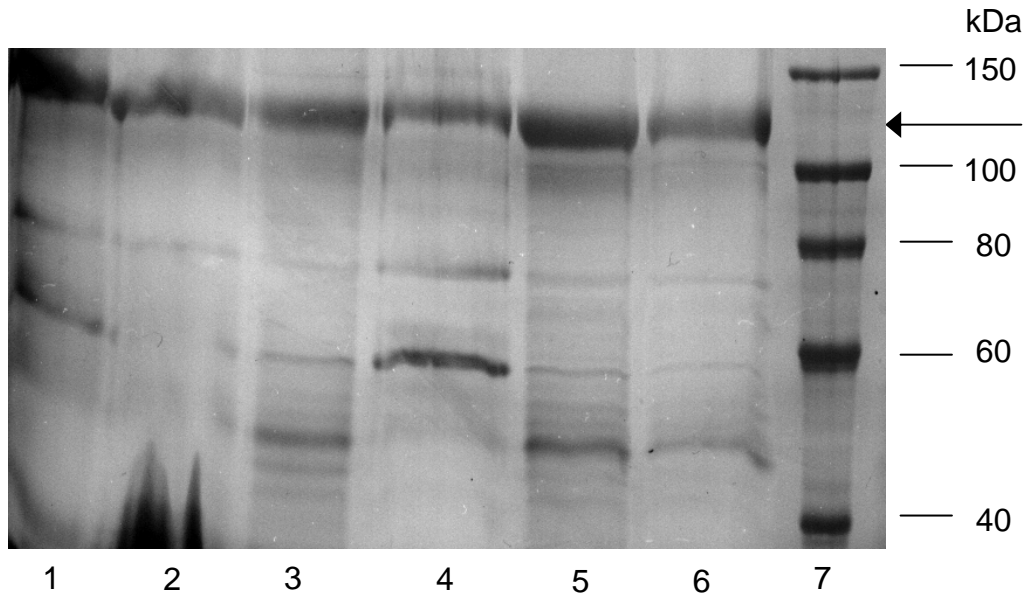


Abb. 4.13: Reinheit aller Aufreinigungen von ABCB1. SDS-PAGE mit Silberfärbung von den im Rahmen dieser Arbeit hergestellten ABCB1-Aufreinigungen mit den folgenden Detergenzien in der angegebenen Konzentration (5 µg pro Bahn): TDOC 2 % (Bahnen 1, 2, 4), LPC 1 % (Bahnen 3, 5, 6), Proteinstandard (Bahn 7).

Für LPC konnte eine Gesamtausbeute von $17,1 \pm 3,9$ % und eine mittlere Proteinkonzentration von $1,1 \pm 0,1$ mg/ml erzielt werden. Somit war die Ausbeute der LPC-Aufreinigung knapp 3,5fach höher und mit dem gleichen Arbeitsaufwand wurde Protein für eine sehr viel größere Anzahl an Assays gewonnen. Das aufgereinigte ABCB1 sollte nicht nur für Untersuchungen von Substraten und Modulatoren im ATPase Assay eingesetzt werden, sondern über diese Arbeit hinausgehend auch für Photolabeling-Experimente dienen. Zu diesem Zweck wäre die LPC-Aufreinigung besser geeignet, da die Endkonzentration an ABCB1 in den Liposomen höher war. Diese Ergebnisse belegen die deutliche Überlegenheit des Detergenzes LPC gegenüber TDOC, die in allen Versuchen reproduziert werden konnte.

Um die Reinheit aller aufgereinigten Proteine zu vergleichen, wurden sie mittels SDS-PAGE und Silberfärbung untersucht, wie in Abbildung 4.13 dargestellt. Bei allen Aufreinigungen ist die Bande von ABCB1 zwischen 100 und 150 kDa die stärkste, das Protein liegt in den Proteoliposomen fast rein vor.

Durch Veränderung des Protokolls der Membranpräparation konnte die Konzentration von ABCB1 in den isolierten Zellmembranen erhöht werden, indem auf Zentrifugation 2 verzichtet wurde. Im Vergleich zum Ansatz, der mit der Standardmethode hergestellt worden war, lag hier ebenfalls sehr aktives ABCB1 vor. Dies zeigte sich vor allem nach Aufreinigung und Rekonstitution beider Ansätze. Da die Durchführung der Dialyse jedoch nicht wie vorgesehen

Tab. 4.2: Übersicht der Eigenschaften aller Aufreinigungen von ABCB1.

Bezeichnung	Detergenz & Konz.	Ausbeute ABCB1 [%]	Proteinkonz. [mg/ml]	Inside-out [%]	Aktivierungs- faktor
ABCB1 I	TDOC 2 %	6,1	0,50	54,8	10,7 ± 1,7
ABCB1 II	TDOC 2 %	4,9	0,38	48,4	7,6 ± 0,2
ABCB1 III	LPC 1 %	19,9	0,99	45,3	4,80 ± 0,02
ABCB1 IV	TDOC 2 %	4,0	0,45	42,4	3,9 ± 0,6
ABCB1 VI	LPC 1 %	14,4	1,14	61,8	9,5 ± 2,2
ABCB1 VII	LPC 1 %	-	0,17	-	11,8 ± 2,8

verlief, sollten diese vielversprechenden Ergebnisse durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. So könnte auch die Ausbeute der Aufreinigung noch weiter erhöht werden.

In Tabelle 4.2 sind die wichtigsten Eigenschaften der in dieser Arbeit aufgereinigten ABCB1-Chargen zusammengestellt. Für Untersuchungen von Substanzen auf ihre die ATPase Aktivität von ABCB1 stimulierende Wirkung konnten prinzipiell alle Chargen verwendet werden, besonders geeignet waren aufgrund ihrer guten Aktivierbarkeit jedoch ABCB1 I und ABCB1 VI.

4.2 Charakterisierung von ABCB1-Aktivatoren mittels ATPase Assay

Aufgereinigtes und in Proteoliposomen rekonstituiertes ABCB1 kann allgemein für verschiedene Arten von funktionellen Assays verwendet werden. In dieser Arbeit wurde das Protein im ATPase Assay eingesetzt, um zu untersuchen, welchen Einfluss bestimmte Substanzen auf den ATP-Umsatz des Proteins besitzen.

4.2.1 QB102 und LM 8.1

Theoretischer Hintergrund

In der Literatur sind neben vielen verschiedenen Inhibitoren von ABCB1 auch Substanzen beschrieben, die das Transportprotein aktivieren können. Dazu gehören unter anderem bestimmte Flavonoid- und hydrophobe Peptid-Strukturen [148, 149]. Besonders interessante Effekte zeigten die von Kondratov und Mitarbeitern veröffentlichten QB-Verbindungen [45]. Diese sind laut den Autoren in der Lage, den Efflux einiger Substrate wie zum Beispiel verschiedener Anthrazykline oder Rhodamin 123 zu stimulieren, während sie auf den Transport anderer ABCB1-Substrate (*Vinca* Alkaloide, Hoechst 33342) inhibierend wirken. Die insgesamt stärkste Aktivierung wies die Substanz QB102 auf. Die Autoren schlossen eine mögliche Erhöhung der ABCB1-Expression als Grund für den verstärkten Auswärtstransport aus, da der aktivierende Effekt der Verbindungen sich bereits nach wenigen Minuten zeigte.

Die Interaktionen der in dieser Veröffentlichung untersuchten ABCB1-Substrate und Modulatoren lassen sich zumindest teilweise mit Hilfe eines von Shapiro und Ling beschriebenen Modells erklären [28, 29]. Diese Autoren postulierten zwei räumlich voneinander getrennte Bindungsstellen mit jeweils definierter Substratspezifität, von denen eine nach dem dort gebundenen Substrat Rhodamin 123 (R-site) und die andere nach Hoechst 33342 (H-site) benannt wurde. Dieses Modell wurde durch weitere Berichte in der Literatur unterstützt [30, 31]. Bindet ein Modulator an die eine Bindungsstelle, so kann laut Shapiro und Ling der Transport eines Substrates mit Affinität zur anderen Bindungsstelle verstärkt werden [28]. Die beiden Bindungsstellen wiesen somit eine positive Kooperativität auf. Basierend auf dieser Annahme ordneten Shapiro und Ling auch den Anthrazyklinen eine Affinität zur R-site zu, da diese den Transport von Hoechst 33342 stimulierten und den von Rhodamin 123 inhibierten. Die Inhibition wurde als eine Kompetition um die gleiche Bindungsstelle von ABCB1 interpretiert.

Um die Interaktion der verschiedenen Bindungsstellen von ABCB1 näher zu untersuchen, wurde von Lars Möllmann eine Serie von Analoga der durch Kondratov *et al.* beschriebenen Verbindung QB102 synthetisiert [46]. QB102 soll laut Literatur an die H-site des Proteins binden [33, 45] und somit den Efflux von Substraten der R-site verstärken. Diese ABCB1-aktivierende Wirkung der neuen QB-Derivate wurde von Katja Sterz sowohl in einem Daunorubicin- als auch in einem Rhodamin-Akkumulations-Assay durchflusszytometrisch überprüft [46]. Es zeigte sich, dass einige der neu synthetisierten Verbindungen, genauso wie auch die Referenzsubstanz QB102, in der Lage waren, den Efflux von Daunorubicin bzw. Rhodamin zu verstärken.

Wie zuvor erwähnt wurde in der Literatur postuliert, dass die QB-Aktivatoren an die H-site von ABCB1 binden, die sich im Bereich der transmembranären Domänen (TMDs) befinden soll [33, 150]. Auch die Bindungsstelle von Rhodamin 123 ist von mehreren Autoren in den transmembranären Regionen nachgewiesen worden [26, 33, 151]. Daneben wird beschrieben, dass die Bindung eines Substrates an die TMDs eng mit dem Vorgang der Bindung bzw. der Hydrolyse von ATP verknüpft ist, welcher die für den Transport benötigte Energie bereit stellt [37, 39, 152–154]. Zudem soll die Substrat-Bindung zu Konformationsänderungen in bestimmten transmembranären Regionen des Proteins führen, wodurch wiederum über eine sogenannte Kupplungshelix Veränderungen der Konformation der Nukleotidbindungsstellen (NBDs) hervorgerufen werden [33, 153, 155].

Es stellte sich die Frage, durch welchen Mechanismus Aktivatoren eine Verstärkung des Transports von ABCB1-Substraten auslösen können. Eine Möglichkeit wäre, dass diese Verbindungen die Konformation der R-site in den transmembranären Domänen so verändern, dass sich die Affinität des Proteins für Substrate dieser Bindungsstelle erhöht. Dadurch würden die Substrate vermehrt binden und aus diesem Grund auch verstärkt transportiert. Zwei weitere mögliche Erklärungen für den Mechanismus der Aktivierung basieren auf einer Beteiligung der Nukleotidbindungsstellen. Eine Grundlage dafür stellt die ATP-Hydrolyse als Voraussetzung für den Transportvorgang dar. Zum einen könnte die Bindung der Aktivatoren an ABCB1 den Umsatz von ATP stimulieren, der zu einer Erhöhung der Transportgeschwindigkeit führen würde. Zum anderen könnte die Affinität der NBDs für ATP durch die Bindung eines Aktivators erhöht werden. Dadurch käme es zu einer vermehrten Bindung von ATP, welche die Transportaktivität verstärken würde.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde derjenige mögliche Mechanismus der Aktivierung des Substrattransportes untersucht, der von einem verstärkten ATP-Umsatz ausgeht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im folgenden Unterkapitel vorgestellt. Der zuletzt beschriebene Mechanismus, der auf einer erhöhten Affinität von ATP basiert, wur-

de von Katja Sterz untersucht. Ihre Ergebnisse werden ebenfalls kurz dargestellt, um eine umfassende Diskussion der Fragestellung zu ermöglichen.

Untersuchungen mittels ATPase Assay

Für die folgenden Untersuchungen wurden die Referenzsubstanz QB102 und die im Daunorubicin-Akkumulations-Assay aktivste Verbindung LM 8.1 ausgewählt, deren Strukturen in Abbildung 4.14 dargestellt sind [46].

Zunächst wurde mittels des in Kapitel 3.1.9 beschriebenen ATPase Assays überprüft, ob QB102 und LM 8.1 einen Einfluss auf die ATPase Aktivität von ABCB1 aufweisen. Abbildung 4.15 stellt die Ergebnisse dieser Messungen vor. Im Vergleich zu Rhodamin 123, einem bekannten ABCB1-Substrat und Stimulator der ATPase Aktivität, konnten die beiden Aktivatoren die ATP-Hydrolyse des Proteins in keiner der eingesetzten Konzentrationen stimulieren. Die Verbindungen zeigen, wie auch im zuvor beschriebenen Rhodamin-Akkumulations-Assay, ein ähnliches Verhalten wie der in der Literatur beschriebene Aktivator Hoechst 33342 [46], der ebenfalls nicht oder nur in sehr geringem Maße in der Lage ist, die ATPase Aktivität von ABCB1 zu beeinflussen [92, 127, 153].

Da QB102 und LM 8.1 im funktionellen Rhodamin-Akkumulations-Assay den Efflux dieses Substrates verstärken konnten [46], wurde anschließend der Einfluss dieser beiden Verbindungen auf die durch Rhodamin 123 konzentrationsabhängig stimulierte ATPase Aktivität untersucht. Dazu wurden mittels ATPase Assay Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Rhodamin 123 in Ab- und Anwesenheit der beiden Aktivatoren aufgenommen. Die hier eingesetzten Konzentrationen wurden so ausgewählt, dass sie denjenigen entsprachen, die in den funktionellen Assays einen deutlich aktivierenden Effekt auslösten [46]. Abbildung 4.16 und Tabelle 4.3 zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Die durch Rhodamin stimulierte ATPase Aktivität wird durch die Anwesenheit der beiden Aktivatoren QB102 und LM 8.1

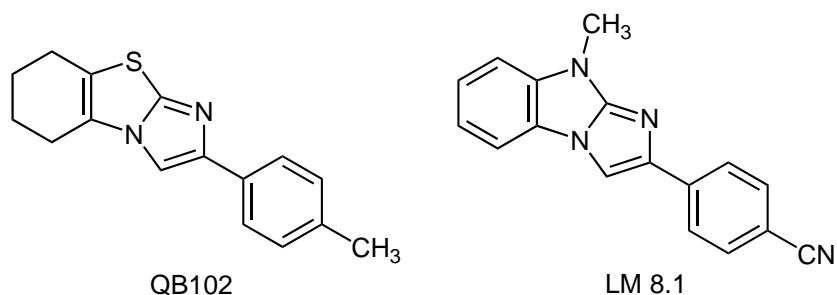


Abb. 4.14: Strukturen der ABCB1-Aktivatoren QB102 und LM 8.1.

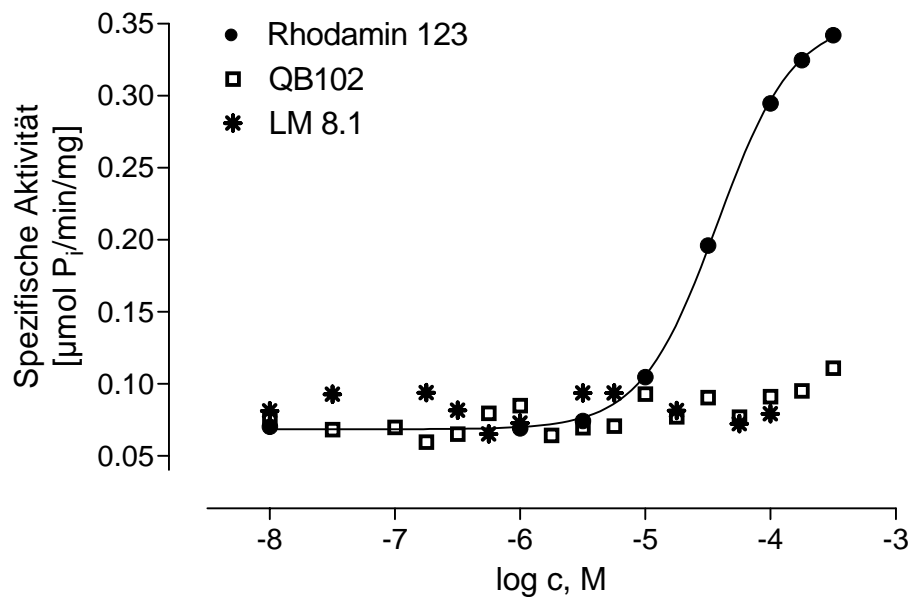


Abb. 4.15: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Rhodamin 123, QB102 und LM 8.1.

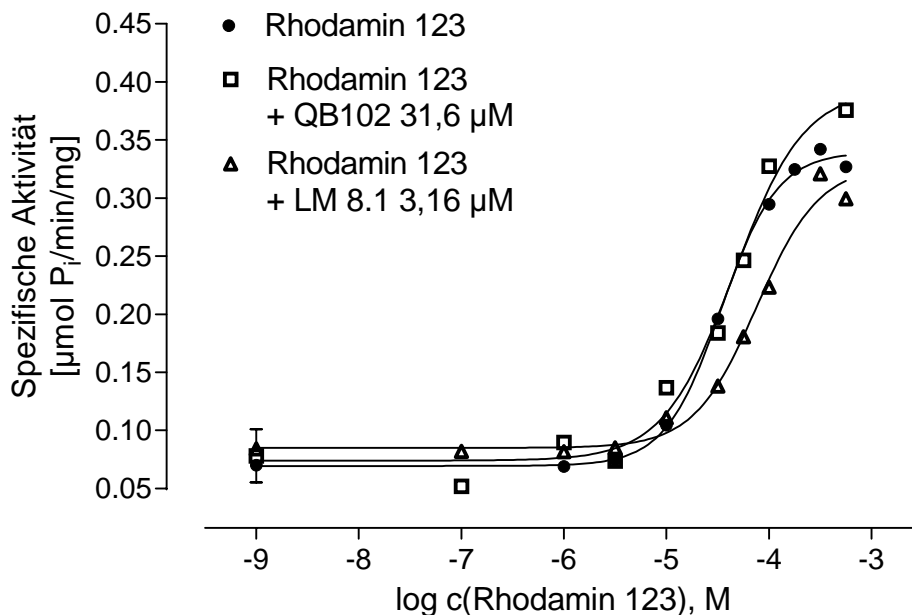


Abb. 4.16: Einfluss von QB102 und LM 8.1 auf die Stimulation der ATPase Aktivität von ABCB1 durch Rhodamin 123. Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Rhodamin 123 in Ab- und Anwesenheit von QB102 und LM 8.1 in der jeweils angegebenen Konzentration.

Tab. 4.3: Ergebnisse der Kombinationsversuche von Rhodamin 123 mit den Aktivatoren QB102 und LM 8.1 im ATPase Assay.

Zusatz	Rhodamin 123 pEC ₅₀ ± SEM
ohne	4,31 ± 0,01
QB102	
1,00 µM	4,22 ± 0,10
3,16 µM	4,25 ± 0,10
31,6 µM	4,27 ± 0,11
LM 8.1	
0,100 µM	4,15 ± 0,11
0,316 µM	4,00 ± 0,11
3,16 µM	4,02 ± 0,10

nicht signifikant beeinflusst. Es wird deutlich, dass die Bindung der zwei Aktivatoren in Kombination mit Rhodamin 123 an ABCB1 nicht zu einem vermehrten ATP-Umsatz führt und somit der verstärkte Substrat-Efflux nicht über diesen Mechanismus erklärt werden kann.

Um zu untersuchen, ob die Aktivatoren die Affinität von ATP gegenüber seiner Bindungsstelle erhöhen können, wurden von Katja Sterz K_M -Werte für ATP in Ab- und Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von QB102 und LM 8.1 bestimmt [46]. Wiederum wurden diese Konzentrationen der Substanzen eingesetzt, die bereits in den funktionellen Assays eine Aktivierung von ABCB1 hervorgerufen hatten. In Gegenwart von 0,1 µM LM 8.1 nahm der K_M -Wert zunächst geringfügig zu. Dies bedeutet, dass die Affinität von ATP zum Protein in Anwesenheit von LM 8.1 leicht abnahm. Bei höheren Aktivator-Konzentrationen sank der K_M -Wert und damit die Affinität wieder auf den Wert ohne Substanz ab. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Bestimmungen, die mit QB102 durchgeführt wurden. In diesem Fall war jedoch die Veränderung des K_M -Wertes geringer ausgeprägt. Aus diesen Untersuchungen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Aktivatoren LM 8.1 und QB102 die Affinität von ATP zu seiner Bindungsstelle nicht erhöhen.

Fazit

Die hier präsentierten Ergebnisse widerlegen beide zu Beginn aufgestellten Theorien zu einer Beteiligung der ATP-Bindungsstellen am Mechanismus der Verstärkung des Substrat-Transportes. Weder ein erhöhter ATP-Umsatz noch eine gesteigerte Affinität von ATP zu den NBDs tragen zur durch die beiden Aktivatoren QB102 und LM 8.1 ausgelösten Aktivierung von ABCB1 bei. Aus diesem Grund erscheint es eher wahrscheinlich, dass Substanzen dieser

Klasse in den transmembranären Regionen des Proteins binden und dadurch Konformationsänderungen hervorrufen, die zu einer erhöhten Affinität des transportierten Substrates zu seiner Bindungsstelle führen, und somit den verstärkten Transport bewirken.

4.2.2 Hoechst 33342

Theoretischer Hintergrund

Die Eigenschaften von Hoechst 33342 sind denen der ebenfalls aktivierend wirkenden QB-Verbindungen sehr ähnlich. Wie in der Literatur und im vorigen Kapitel bereits ausführlich beschrieben, ist Hoechst 33342 in der Lage, den Efflux von Substraten, wie zum Beispiel Rhodamin 123, in transport-basierten Assays zu verstärken [28, 46]. Jedoch besitzt die Verbindung selbst keinen oder nur einen sehr geringen stimulierenden Einfluss auf die ATPase Aktivität des Proteins [92, 127, 153]. Laut Literatur sollen die QB-Verbindungen an die nach dem Liganden Hoechst 33342 benannte H-site von ABCB1 binden [33, 45, 46]. In diesem Fall müsste der Einfluss dieser drei Substanzen auf die durch Rhodamin stimulierte ATPase Aktivität ebenfalls gleich sein. Um dies zu untersuchen, wurden die mit QB102 und LM 8.1 durchgeführten ATPase Messungen in Kombination mit Rhodamin 123 jetzt mit Hoechst 33342 ausgeführt.

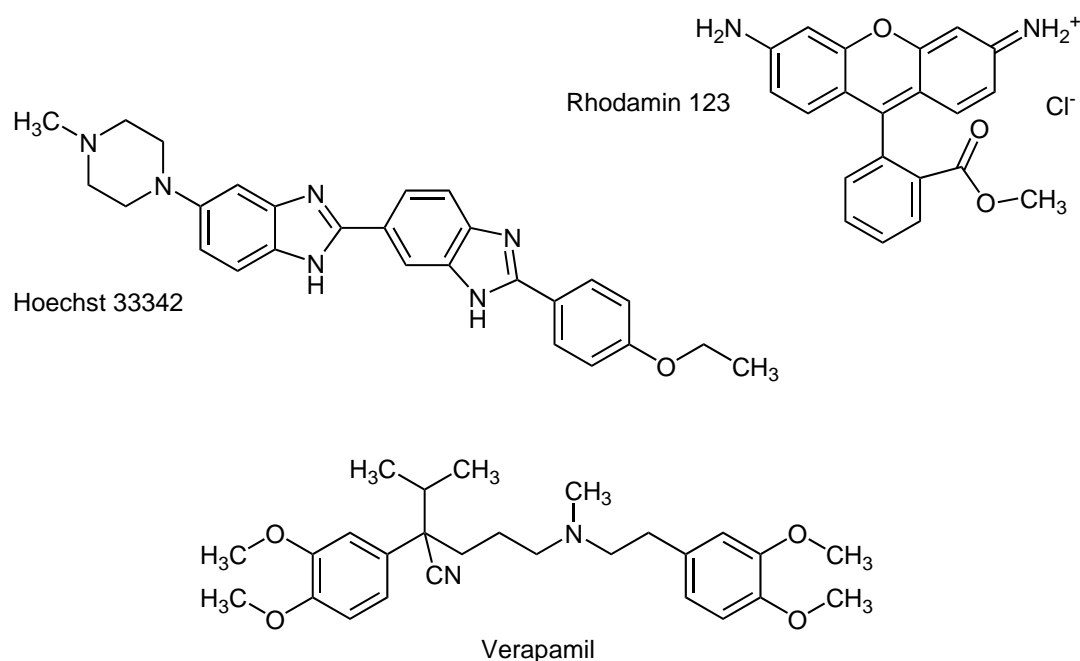


Abb. 4.17: Strukturen von Rhodamin 123, Hoechst 33342 und Verapamil.

Zusätzlich wurde die Substanz Verapamil untersucht, die einen klassischen Stimulator der ATPase Aktivität von ABCB1 darstellt. Über die genaue Lokalisation der Bindungsstelle von Verapamil gibt es in der Literatur unterschiedliche Berichte [26, 151, 156]. Einigkeit herrscht jedoch über die Tatsache, dass diese Bindungsstelle nicht exakt mit der von Rhodamin 123 übereinstimmt. In diesem Fall müsste der Einfluss von Hoechst auf die durch Verapamil und Rhodamin 123 stimulierte ATPase Aktivität unterschiedlich sein. Abbildung 4.17 zeigt die Strukturen der drei eingesetzten Substanzen.

Untersuchungen mittels ATPase Assay

Um zu überprüfen, welchen Einfluss Hoechst 33342 auf die durch Rhodamin 123 bzw. Verapamil stimulierte ATPase Aktivität hat, wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven der beiden Substanzen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Hoechst aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 zusammengestellt. Es zeigte sich, dass der pEC_{50} -Wert von Rhodamin 123 mit steigenden Mengen von Hoechst verringert wurde. Es wurde also in Anwesenheit des Aktivators weniger Rhodamin benötigt, um die ATPase Aktivität von ABCB1 halbmaximal zu stimulieren. Somit erhöhte sich die Affinität des Proteins für Rhodamin in Gegenwart von Hoechst. Im Gegensatz dazu wurde die Affinität von Verapamil durch die Anwesenheit von Hoechst nicht signifikant beeinflusst. Daneben konnte allgemein beobachtet werden, dass die maximale Aktivierbarkeit von ABCB1 bei Erhöhung der Hoechst-Konzentration geringer wurde. Dies ist beispielhaft zusammen mit der Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Rhodamin durch 31,6 μ M Hoechst in Abbildung 4.18 dargestellt.

Fazit

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass der Einfluss von Hoechst 33342 und QB102 bzw. LM 8.1 auf die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Rhodamin 123 unterschiedlich ist. Es wurde deutlich, dass steigende Konzentrationen von Hoechst sowohl den pEC_{50} -Wert von Rhodamin als auch die maximale Stimulierbarkeit des Proteins erniedrigten. Jedoch waren alle drei untersuchten Aktivatoren nicht in der Lage, selbst die ATPase Aktivität von ABCB1 zu stimulieren.

Durch die Abnahme der zur halbmaximalen Stimulation benötigten Rhodamin-Menge zeigte sich eine durch Hoechst ausgelöste Verstärkung der Affinität von Rhodamin 123 zu ABCB1. Zuvor konnte nachgewiesen werden, dass die QB-Verbindungen keinen Effekt auf die durch Rhodamin stimulierte ATPase Aktivität des Proteins aufweisen. Bezüglich des Mechanismus

Tab. 4.4: Ergebnisse der Kombinationsversuche von Rhodamin 123 bzw. Verapamil mit dem Aktivator Hoechst 33342 im ATPase Assay.

Zusatz	Rhodamin 123 pEC ₅₀ ± SEM	Verapamil pEC ₅₀ ± SEM
ohne	4,31 ± 0,01	4,95 ± 0,16
Hoechst 33342		
3,16 µM	4,45 ± 0,13	nicht bestimmt
5,62 µM	4,60 ± 0,01	4,77 ± 0,09
15,8 µM	4,61 ± 0,10	5,11 ± 0,03
31,6 µM	4,80 ± 0,06	5,01 ± 0,12

der Aktivierung von ABCB1 könnten zwischen den untersuchten Verbindungen folglich Unterschiede vorhanden sein. Um diesen veränderten Mechanismus näher zu charakterisieren, sind jedoch weitere Experimente notwendig.

Hoechst hatte unterschiedliche Effekte auf den pEC₅₀-Wert von Rhodamin bzw. Verapamil. Die Ergebnisse zeigten, dass Hoechst keinen Einfluss auf die Affinität von Verapamil zu ABCB1 hatte. Aus diesem Grund könnte vermutet werden, dass Verapamil und Rhodamin nicht an die gleiche Bindungsstelle binden. Dies steht in Übereinstimmung mit den Berichten aus der Literatur zu Unterschieden in der Lokalisation der Bindungsareale der beiden Substanzen [26, 151, 156].

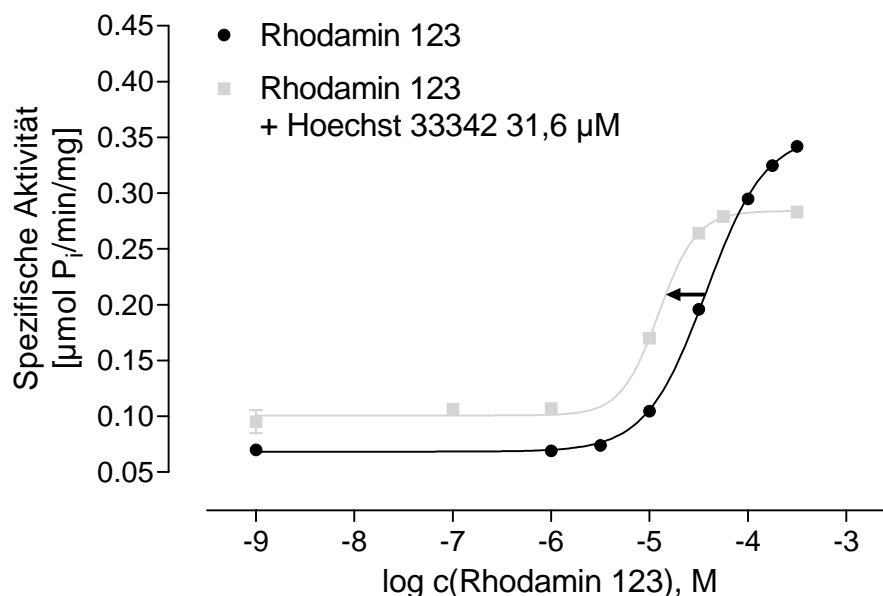


Abb. 4.18: Einfluss von Hoechst 33342 auf die Stimulation der ATPase Aktivität von ABCB1 durch Rhodamin 123. Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Rhodamin 123 in Ab- und Anwesenheit von 31,6 µM Hoechst.

4.3 ABCG2 aus *Saccharomyces cerevisiae*

4.3.1 Charakterisierung des neuen Hefestammes LPY11-ABCG2

Als heterologes Expressionssystem für die ABCG2-Mutante R482G wurde der *Saccharomyces cerevisiae* Stamm LPY11 ausgewählt, da für ihn in der Literatur bereits eine sehr hohe Expression des ABC-Transporters ABCB1 beschrieben wurde [130]. LPY11 wt Zellen, deren genetischer Hintergrund in Kapitel 3.2.1 dargestellt ist, besitzen eine reduzierte Konzentration von Ergosterol in ihrer Zellmembran. Dies wirkt sich laut Literatur vorteilhaft auf die Expression großer membranständiger Proteine aus [130, 157]. Zudem verliert die Membran durch die verringerte Ergosterol-Konzentration an Rigidität, so dass exprimierte Proteine bereits durch milde Detergenzien solubilisiert werden können. Dies hätte einen positiven Einfluss auf die Aktivität des im Weiteren aufgereinigten Proteins, da so die native und aktive Konformation mit größerer Wahrscheinlichkeit erhalten bliebe. Ein weiterer Vorteil von LPY11 ist seine im Vergleich zu dem in dieser Arbeit für die Expression von ABCB1 verwendeten Stamm BJ5457 kürzere Verdopplungszeit, die die Dauer der Fed-Batch Kultivierung entscheidend verringert.

Für die Transformation von LPY11 standen zwei verschiedene Plasmid-Konstrukte zur Auswahl, bei denen das ABCG2-Gen entweder C-terminal oder N-terminal mit einem Histidin-Tag aus zehn Histidinen markiert war. Diese Länge des His-Tags erscheint vorteilhaft zu sein, da in der Literatur mit einer kürzeren Markierung aus sechs Histidin-Molekülen nur eine schlechte Bindung an das bei der Aufreinigung eingesetzte Nickel-Harz erreicht werden konnte [64].

Die Verwendung sowohl eines N-terminal als auch eines C-terminal markierten ABCG2-Konstruktes ist literaturbeschrieben [64, 82, 119]. In einem Fall wurde über eine höhere Expressionsrate des Konstruktes mit Markierung am N-Terminus im Vergleich zum C-terminal markierten Protein berichtet [64]. Da ABCG2 eine umgekehrte Topologie aufweist, bedeutet eine N-terminale Markierung, dass sich der His-Tag an der ATP-Bindungsstelle des Proteins befindet. Generell scheint ein His-Tag an dieser Stelle günstig für die funktionale Expression von ABC-Transportern zu sein, da auch für ABCB1 oder ABCC1 aktives Protein aus solchen Konstrukten gewonnen wurde, bei denen die Histidin-Markierung an der ATP-Bindungsstelle war [94, 103]. Aus diesen Gründen wurde das Plasmid pCHH10m3N-ABCG2 ausgewählt, bei dem der His-Tag N-terminal vor dem Gen eingefügt wurde. Weitere Eigenschaften des Plasmids sind in Kapitel 3.2.1 beschrieben.

Transformation von LPY11-ABCG2

Zunächst wurde das für die Transformation von LPY11 vorgesehene Plasmid pCHH10m3N-ABCG2 mit Hilfe von *E. coli* vermehrt und mittels Midi-Präparation isoliert (siehe Kapitel 3.1.2). Danach lag es mit einer Konzentration von 1,4 µg/µl in guter Reinheit (Faktor 1,9) vor.

Zur Transformation von kompetenten LPY11 Zellen wurden 1,4 µg Plasmid-DNA verwendet, die entsprechenden Techniken sind in Kapitel 3.2.4 beschrieben. Nach 2–3 Tagen waren auf Selektionsagar (SD-Leu-Ura) Kolonien gewachsen, von denen einige zufällig ausgewählte noch zweimal nacheinander auf frischen Agar (SD-Leu-Ura) überimpft wurden, um die Selektion über den auxotrophen Marker sicherzustellen. Die so entstandenen Klone wurden für die weiteren im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche eingesetzt.

Charakterisierung von LPY11-ABCG2 Klonen

Mit Hilfe eines Zellextraktes und anschließendem Western Blot wurde die Expression von ABCG2 (R482G) in verschiedenen Klonen des neuen Hefestammes nachgewiesen. Für den Western Blot wurde BXP-21 als primärer Antikörper eingesetzt, der intrazellulär in der Linker-Region zwischen der ATP-Bindungsstelle und den transmembranären Regionen bindet [51, 158]. In Abbildung 4.19 ist das Ergebnis dieses Screenings beispielhaft für fünf Klone dargestellt, jedoch exprimierten auch alle anderen untersuchten Klone das Transportprotein. Insgesamt wurde ABCG2 unter dem Einfluss des starken PGK-Promoters homogen exprimiert, es zeigten sich nur kleinere Unterschiede.

Klon 13 (Bahn 4) mit einer gegenüber den anderen Klonen geringfügig erhöhten ABCG2-Expression wurde für die weitere Charakterisierung und Verwendung in dieser Arbeit ausgewählt. Das apparente Molekulargewicht von etwa 68 kDa lag unter dem für die Expression in humanen Zellen beschriebenen Molekulargewicht von 72 kDa [51] und legte die Vermutung nahe, dass ABCG2 in *S. cerevisiae* nur teilweise glykosyliert wird. Es konnte jedoch von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Glykosylierung von ABCG2 nicht essentiell für die Funktionsfähigkeit des Proteins ist [65–67]. Des Weiteren soll das Fehlen der Zuckermoleküle laut Diop und Mitarbeitern auch keinen Einfluss auf die Expressionsrate, den Transport des Proteins vom endoplasmatischen Retikulum zur Zellmembran oder das Zusammenfinden der Monomere zu Dimeren haben [66].

Zur weiteren Charakterisierung von LPY11-ABCG2 wurde eine Wachstumskinetik aufgenommen. Dabei zeigte sich, dass der transformierte Stamm eine deutlich verlängerte Ver-

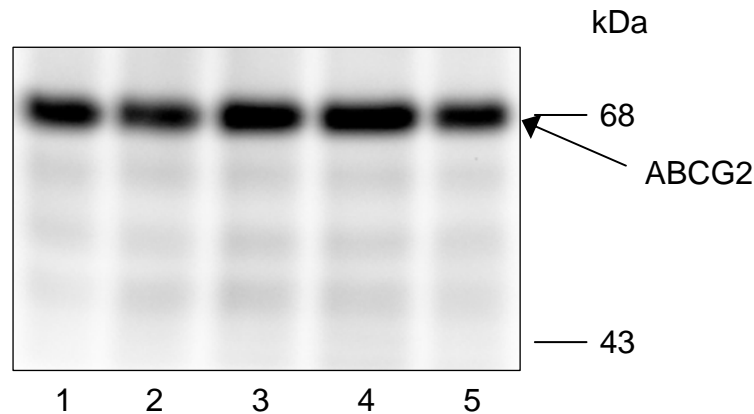


Abb. 4.19: Screening von LPY11-ABCG2 Klonen. Mittels Western Blot wurden mehrere Klone auf ihre Expressionsrate untersucht (5 µg pro Bahn): Klone 10–14 (Bahnen 1–5).

dopplungszeit von $2,2 \pm 0,4$ h gegenüber dem Wildtyp-Stamm mit $1,4 \pm 0,2$ h aufwies. Dieses Phänomen stimmt mit Beobachtungen für die Expression von ABCB1 in Hefen im Rahmen dieser Arbeit (Kapitel 4.1.1) und in der Literatur [89, 103] überein und wird vermutlich durch die forcierte Expression fremder Proteine verursacht.

Optimierung von SDS-PAGE und Western Blot zum Nachweis von ABCG2

Abbildung 4.20 (A) zeigt, dass zu Beginn der Arbeiten nicht nur eine Bande von ~ 68 kDa durch den primären Antikörper BXP-21 erkannt wurde, sondern auch mehrere kleinere Banden. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesen kleinen Banden um Bruchstücke des Proteins. Um dieses Problem zu umgehen, wurde wie schon im Fall von ABCB1 die Temperatur bei der Denaturierungsreaktion von 37°C auf RT reduziert.

Desweiteren wurde zur Verminderung von unspezifischer Bindung die Verdünnung des primären Antikörpers von 1:500 auf 1:1.000 erhöht und zusätzlich in dieser Lösung eine höhere BSA-Konzentration eingesetzt. Außerdem wurde die Verdünnung des sekundären Antikörpers von 1:10.000 auf 1:20.000 erhöht. Das Ergebnis dieser Optimierungen ist in Abbildung 4.20 (B) dargestellt. Wie zu sehen ist, konnte auf diese Weise nicht nur die unspezifische Bindung vermindert werden, sondern es wurde auch deutlich, dass ABCG2 in *S. cerevisiae* als zwei Spezies mit sehr geringem Molekulargewichtsunterschied exprimiert wurde. Diese Beobachtung wurde bereits für die Expression von ABCG2 in Insektenzellen beschrieben [120]. Pozza und Mitarbeiter erforschten dieses Phänomen im Detail und kamen nach verschiedenen Untersuchungen zu dem Schluss, dass die obere Spezies reifes und funktionelles Protein

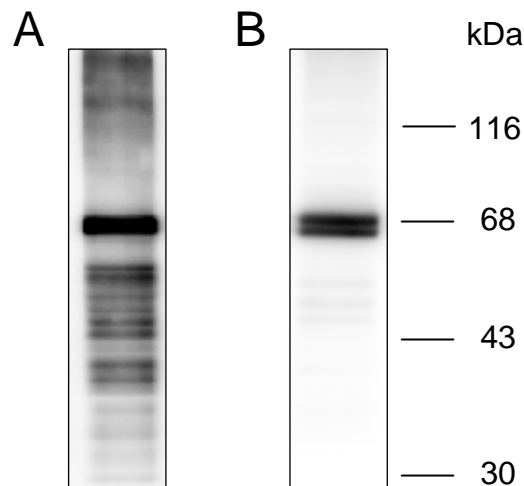


Abb. 4.20: Antikörpermarkierung eines Western Blots von ABCG2 vor und nach Optimierung. (A) Denaturierung der Proben für die SDS-PAGE bei 37 °C, Verdünnung des primären Antikörpers BXP-21 1:500 und des sekundären Antikörpers 1:10.000 (5 µg pro Bahn); (B) Denaturierung bei RT, Verdünnung des primären Antikörpers 1:1.000 und des sekundären Antikörpers 1:20.000 (5 µg pro Bahn).

darstellt, während es sich bei der unteren Spezies um ein inaktives Faltungsintermediat handelt.

Belichtet man den Western Blot eines Zellextraktes von LPY11-ABCG2 etwas länger, so wird eine weitere Bande sichtbar, die ein apparentes Molekulargewicht von ~140 kDa aufweist. Da dies etwa dem doppelten Gewicht des ABCG2-Monomers entspricht, könnte es sich um ein Dimer des Proteins handeln. Laut Literatur besteht ein ABCG2-Dimer aus zwei Monomeren, die über eine intermolekulare Disulfidbrücke verbunden sind [58, 59, 61, 62]. Dieses Dimer wird in der Literatur vielfach als die kleinste funktionelle Einheit des Halbtransporters ABCG2 beschrieben. Außer einem Dimer wurden auch höher organisierte Oligomere wie zum Beispiel ein Tetramer postuliert [63, 64].

Die in dieser Arbeit gewählten reduzierenden Bedingungen bei der Probedenaturierung für die SDS-PAGE führen im Allgemeinen dazu, dass Disulfidbrücken in der Proteinstruktur getrennt werden. Liegt jedoch eine große Menge solcher Bindungen in der Probe vor, werden nicht alle S-S-Bindungen vom Reduktionsmittel erfasst. Eine mögliche Erklärung für die Bande von ~140 kDa wäre also eine hohe Konzentration des ABCG2-Dimers in der Probe.

Um näher zu untersuchen, ob es sich bei der zusätzlichen Bande um ein ABCG2-Dimer handeln könnte, wurden Proben eines Zellextraktes und einer Membranpräparation von LPY11-ABCG2 vor der SDS-PAGE in An- und Abwesenheit des Reduktionsmittels DTT denaturiert. Da sich in Abwesenheit von DTT auch nicht-native Disulfidbrücken bilden könnten,

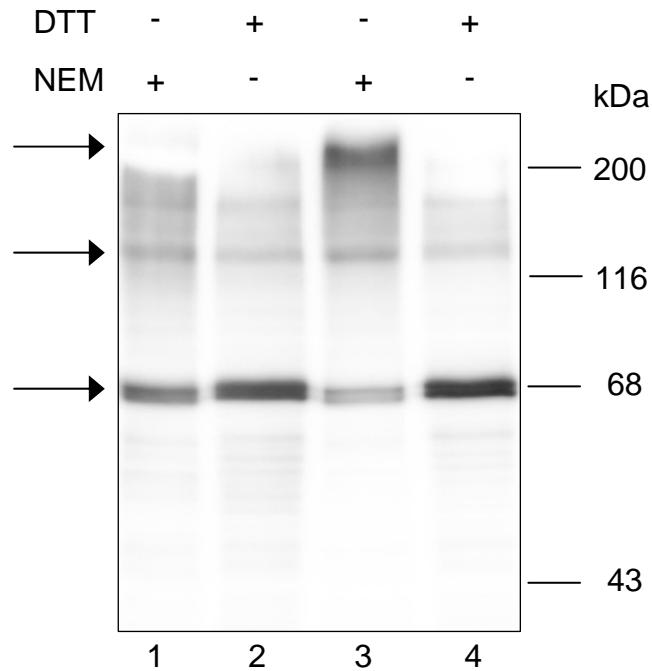


Abb. 4.21: Untersuchung der Oligomerisierung von ABCG2. Western Blot von Proben eines Zellextraktes (Bahnen 1 & 2) und einer Membranpräparation (Bahnen 3 & 4) von LPY11-ABCG2 unter reduzierenden (Bahnen 2 & 4) und nicht-reduzierenden Bedingungen (Bahnen 1 & 3), die Pfeile markieren detektierte Banden (5 µg pro Bahn).

wurde diesen Proben zusätzlich 10 mM *N*-Ethylmaleimid (NEM) zugesetzt [58], welches stabil an Thiolgruppen im Protein bindet. Betrachtet man Abbildung 4.21, so zeigt sich, dass die für das Monomer detektierte Bande in Anwesenheit von DTT (Bahnen 2 & 4) stärker ausgeprägt ist als in Abwesenheit der Substanz (Bahnen 1 & 3). Es scheint also in letzteren Proben weniger ABCG2-Monomer vorhanden zu sein. Für die vermutliche Bande des Dimers bei ca. 140 kDa zeigt sich nur ein geringer Unterschied der Chemolumineszenz, jedoch sind die Banden in den beiden Proben ohne DTT geringfügig dunkler. Dies legt den Schluss nahe, dass in diesen Proben mehr Dimer vorliegt. Die Probe ohne DTT, in der die Zellmembran angereichert ist (Bahn 3), weist zusätzlich noch eine weitere Bande auf, die größer als 200 kDa ist. Hierbei könnte es sich eventuell um ein Tetramer handeln, das ein Molekulargewicht von ungefähr 280 kDa hätte.

Fazit

Der Hefestamm LPY11 wt konnte erfolgreich mit dem Plasmid pCHH10m3N-ABCG2 transformiert werden. Alle untersuchten Klone des neuen Stammes LPY11-ABCG2 exprimierten das Zielprotein auf einem vergleichbaren Level. Die auf diese Weise nachgewiesene Stabili-

tät der Transformation war Voraussetzung für die routinemäßige Verwendung von LPY11-ABCG2. Außerdem wurde deutlich, dass die Selektion der Klone über den auxotrophen Marker ausreichend war. Weitere Stoffe zur Erhöhung des Selektionsdrucks wurden folglich nicht benötigt, so dass die Kosten der Kultivierung großer Mengen an Zellen gering blieben. Die zur weiteren Charakterisierung von LPY11-ABCG2 bestimmte Verdopplungszeit war gut reproduzierbar und betrug im Mittel 2,2 h. Hier bestätigte sich der Vorteil der Verwendung von LPY11 gegenüber BJ5457, dessen Verdopplungszeit mit $2,7 \pm 0,8$ h länger und auch viel schlechter reproduzierbar war.

Das apparente Molekulargewicht von ABCG2 lag bei 68 kDa und war im Vergleich zum in humanen Zellen exprimierten Protein etwas niedriger. Da Hefen nicht alle eukaryotischen posttranslationalen Zuckerverknüpfungen durchführen können, ließ diese Beobachtung auf eine Unterglykosylierung schließen. Die geringere Glykosylierung beeinflusst jedoch laut Literatur die Funktion des Proteins nicht [66]. Daneben zeigte sich, dass ABCG2 in *S. cerevisiae* als zwei Spezies mit geringem Molekulargewichtsunterschied exprimiert wurde.

Mittels SDS-PAGE und Western Blot konnte auch gezeigt werden, dass in den Proben der Membranpräparation zusätzlich ein Protein von ~ 140 kDa vorhanden war, welches das ABCG2-Dimer darstellen könnte. Um den Oligomerisierungsstatus von ABCG2 bei der Expression in *S. cerevisiae* genau zu bestimmen, müssten jedoch noch weitere, spezifischere Untersuchungen durchgeführt werden. Für die vorliegende Arbeit war dies jedoch zunächst nicht von zentralem Interesse. Wichtig war vor allem zu überprüfen, ob das Protein prinzipiell von den Hefezellen in einer funktionellen Konformation exprimiert wurde.

4.3.2 Funktionelle Untersuchungen von ABCG2 in LPY11-ABCG2

Nachdem die Expression von ABCG2 in LPY11-ABCG2 nachgewiesen wurde, wurde nun mit Hilfe eines funktionellen Tests untersucht, ob das Protein Transportaktivität aufwies. Dazu wurden Wachstumskurven von LPY11 wt und LPY11-ABCG2 in An- und Abwesenheit von bekannten ABCG2-Substraten verglichen und festgestellt, ob diese Substrate durch vermehrten Efflux aus transformierten Hefen für diese Zellen weniger toxisch sind als für die Wildtyp-Zellen. Der Versuchsablauf ist in Kapitel 3.2.11 dargestellt.

Etablierung des Testsystems mit LPY11-ABCB1

Um das neue Testsystem zu etablieren, war es notwendig, einen Hefestamm mit möglichst ähnlichen Eigenschaften zu LPY11-ABCG2 und einem nachweislich aktiven Transportpro-

tein zu verwenden. Da bereits in der Literatur beschrieben wurde, dass aus dem Stamm LPY11-ABCB1 aktives Protein isoliert werden konnte, wurde dieser als Vergleichsstamm ausgewählt [130]. Zur Herstellung wurde das Plasmid YEplac195-MDR1 eingesetzt, das zuvor in *E. coli* vermehrt worden war (Konzentration 1,2 µg/µl, Reinheitsfaktor 1,8). Nach der Transformation kompetenter LPY11 wt Zellen mit 1,8 µg Plasmid-DNA wurden die auf Selektionsagar entstandenen Kolonien ein weiteres Mal auf frischen Agarplatten ausgestrichen, um die Selektion über den auxotrophen Marker zu gewährleisten.

Aus zufällig ausgewählten Klonen wurde mittels Zellextrakt und Western Blot Klon 2a-1 als derjenige mit der höchsten ABCB1-Expression identifiziert und für die folgenden Studien verwendet. In der Wachstumskinetik zeigte dieser eine Verdopplungszeit von $2,3 \pm 0,3$ h, die gegenüber dem Wildtyp-Stamm mit $1,4 \pm 0,2$ h verlängert und zu der von LPY11-ABCG2 vergleichbar war.

Für die Etablierung der funktionellen Untersuchungen an LPY11 wt und LPY11-ABCB1 Zellen wurden Aureobasidin A (0,18 bzw. 0,45 µM) und Ketoconazol (3 bzw. 30 µM) verwendet. Für diese beiden Substanzen wurde zusätzlich zu ihrer fungiziden Wirkung auch eine Interaktion mit ABCB1 beschreiben [130, 131, 135, 159, 160]. Die eingesetzten Konzentrationen wurden der genannten Literatur entnommen. Verbindungen mit fungizider Wirkung würden das Wachstum des Wildtyp-Stammes hemmen. Da die hier verwendeten Stoffe gleichzeitig Fungizide und ABCB1-Substrate sind, war zu erwarten, dass die transformierten Zellen in ihrem Wachstum weniger beeinträchtigt werden, da sie in der Lage sind, die toxischen Stoffe über ABCB1 wieder aus der Zelle herauszutransportieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die fungizide Wirkung von Aureobasidin A für einen anderen Hefestamm, BJ5457 wt bereits nachgewiesen (siehe Kapitel 4.1.3).

Zuerst wurde LPY11 wt untersucht. Abbildung 4.22 stellt die Wachstumskurven dieses Stammes mit und ohne Zusatz von Aureobasidin A (A) und Ketoconazol (B) gegenüber. Es zeigte sich, dass der Wildtyp-Stamm vom Zeitpunkt der Zugabe der beiden ABCB1-Substrate an langsamer wuchs als in Abwesenheit der Substanzen. Zusätzlich zu den für die Wachstumskurven in der Abbildung verwendeten Fungizid-Konzentrationen wurden auch jeweils geringere Mengen eingesetzt, um zu überprüfen, ob der Effekt konzentrationsabhängig war. 0,18 µM Aureobasidin A bzw. 3 µM Ketoconazol waren ebenfalls in der Lage, das Wachstum von LPY11 wt zu hemmen, jedoch in einem geringeren Ausmaß. Diese Konzentrationsabhängigkeit zeigt, dass die Hemmung der Zellteilung die Folge des Zusatzes der beiden Fungizide war.

Als nächstes wurden die transformierten LPY11-ABCB1 Zellen in An- und Abwesenheit der gleichen Substanzen in der jeweils höheren Konzentration kultiviert. Die Wachstumskurven

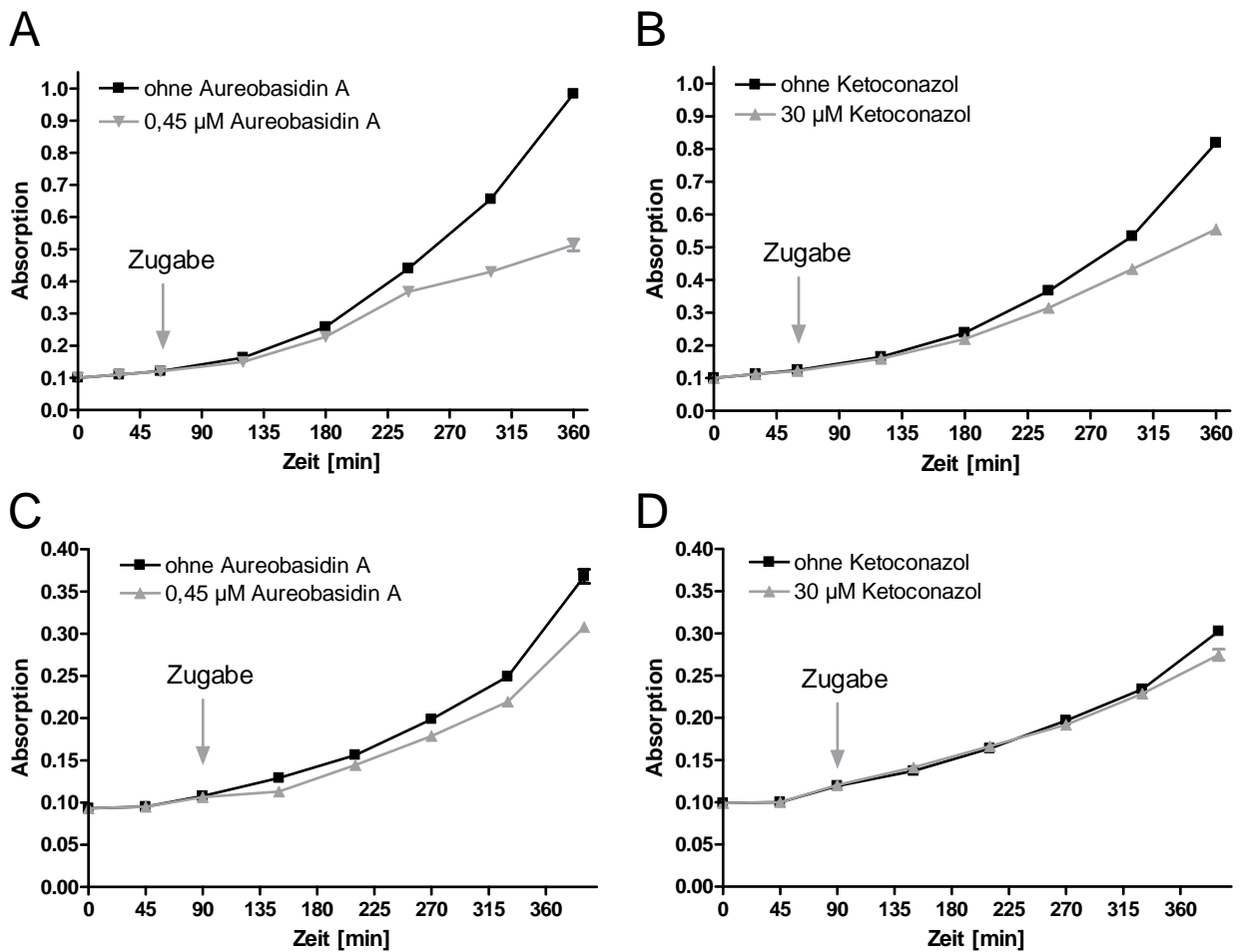


Abb. 4.22: Unterschiedliche Empfindlichkeit von LPY11 wt und LPY11-ABCB1 gegenüber Aureobasidin A bzw. Ketoconazol. Wachstumskurven in An- und Abwesenheit der genannten Fungizide in der angegebenen Konzentration von (A) & (B) LPY11 wt und (C) & (D) LPY11-ABCB1.

in Abbildung 4.22 (C) und (D) machen deutlich, dass beide Fungizide keinen bzw. einen sehr geringen Einfluss auf die Teilungsrates der transformierten Zellen haben. Da der einzige Unterschied zu den Wildtyp-Zellen in der Expression von ABCB1 liegt, kann die Resistenz von LPY11-ABCB1 gegenüber Aureobasidin A bzw. Ketoconazol eindeutig auf den Export dieser ABCB1-Substrate zurückgeführt werden.

Untersuchung der Resistenz von LPY11-ABCG2

Nach Etablierung des Testsystems wurde dieses auf den Hefestamm LPY11-ABCG2 (R482G) übertragen, der sich nur durch die Expression des anderen Transportproteins von LPY11-ABCB1 unterscheidet. Die Resistenz von LPY11-ABCG2 konnte jedoch nicht mit den bei LPY11-ABCB1 verwendeten Fungiziden untersucht werden, da für diese Substanzen in der

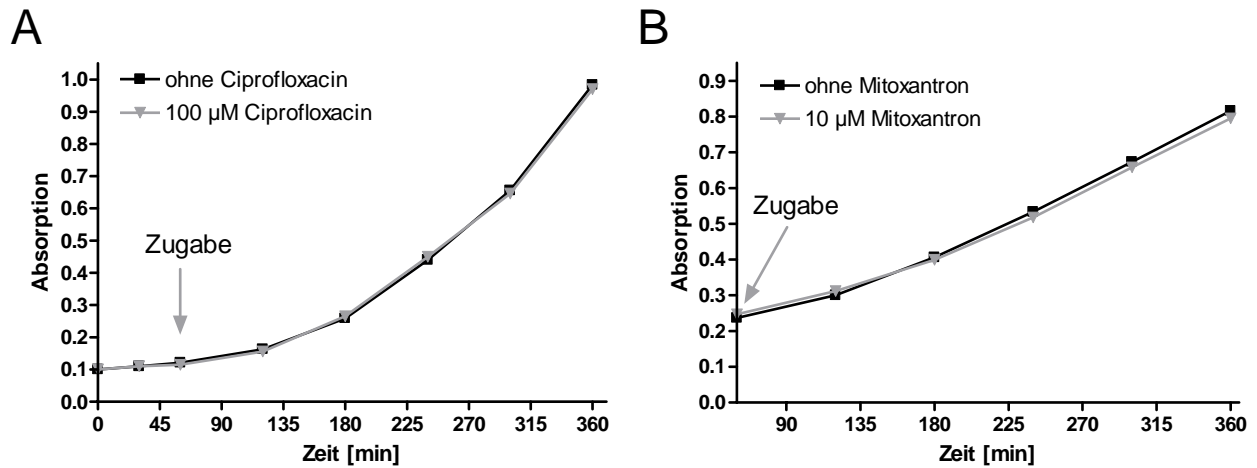


Abb. 4.23: Empfindlichkeit von LPY11 wt gegenüber Ciprofloxacin bzw. Mitoxantron. Wachstumskurven von LPY11 wt in An- und Abwesenheit von (A) Ciprofloxacin bzw. (B) Mitoxantron in der angegebenen Konzentration, der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe.

Literatur bisher keine Interaktion mit ABCG2 berichtet wurde. Daneben waren Versuche zur Kultivierung des ABCG2-exprimierenden Hefestammes auf Aureobasidin A-haltigem Agar im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich, da auch nach zehn Tagen keine Kolonien gewachsen waren.

Aus diesem Grund wurden zwei andere aus der Literatur bekannte ABCG2-Substrate, Ciprofloxacin (10 bzw. 100 µM) und Mitoxantron (1 bzw. 10 µM), jeweils in zwei verschiedenen Konzentrationen auf ihre Toxizität gegenüber dem Wildtyp-Stamm untersucht [18, 69, 161, 162]. Es zeigte sich, dass beide Substanzen (jeweils die höhere eingesetzte Konzentration) nicht in der Lage waren, das Wachstum von untransformierten LPY11 Zellen zu hemmen (siehe Abbildung 4.23).

Ein weiteres, für humane Krebszellen toxisches ABCG2-Substrat ist Hoechst 33342 [18, 69]. Bei der Kultivierung von LPY11 wt in Gegenwart von 30 bzw. 100 µM Hoechst wurde die Teilung der Zellen bereits durch die geringere Konzentration nicht nur verlangsamt, sondern nach kurzer Zeit vollständig gehemmt, wie in Abbildung 4.24 (A) zu sehen. Hoechst 33342 ist folglich zur Untersuchung der Transportaktivität des exprimierten ABCG2 geeignet. Es zeigte sich jedoch, dass 30 µM Hoechst ebenfalls für LPY11-ABCG2 toxisch war. Die entsprechende Wachstumskurve ist in Abbildung 4.24 (B) dargestellt.

Fazit

Versuche zum Nachweis der Transportaktivität von ABCG2 in lebenden Hefezellen waren nicht erfolgreich, da die verwendeten Substrate Ciprofloxacin und Mitoxantron keinen Einfluss

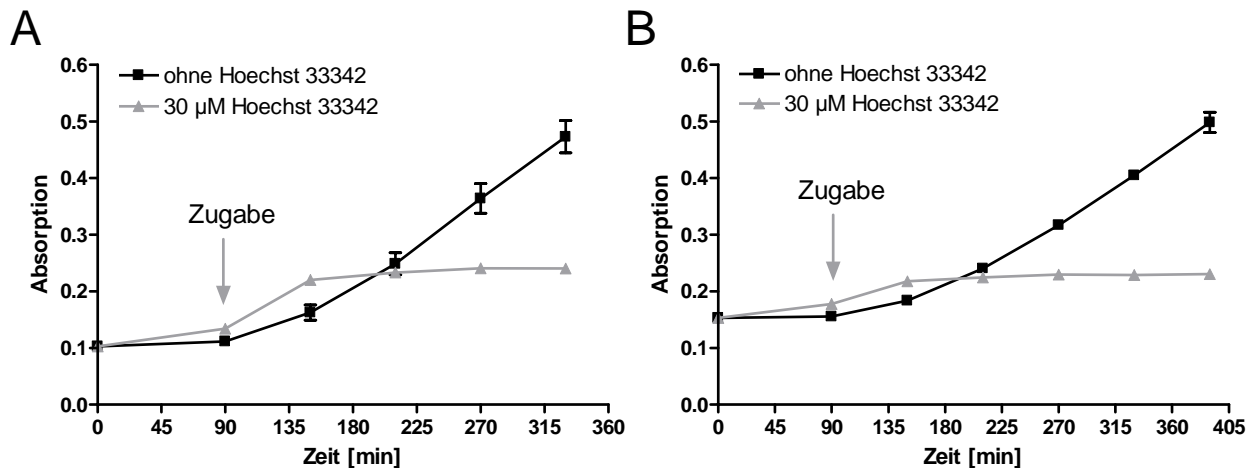


Abb. 4.24: Empfindlichkeit von LPY11 wt und LPY11-ABCG2 gegenüber Hoechst 33342. Wachstumskurven von (A) LPY11 wt bzw. (B) LPY11-ABCG2 in An- und Abwesenheit von Hoechst 33342 in der angegebenen Konzentration, der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zugabe.

auf das Wachstum von LPY11 wt zeigten. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Aktivität von ABCG2 durch verschiedene *S. cerevisiae*-spezifische Multidrug Transporter überdeckt wurde, die zum sogenannten Pleiotropic drug resistance (PDR) Netzwerk gehören [163, 164]. Zu den am besten untersuchten ABC-Transportern von *Saccharomyces cerevisiae* gehören Pdr5p und Snq2p, die laut Literatur auch am Transport von Daunorubicin und Doxorubicin beteiligt sind [163, 165, 166]. Diese beiden Zytostatika weisen eine große strukturelle Ähnlichkeit zum in den hier beschriebenen Versuchen verwendeten Mitoxantron auf. Wäre Mitoxantron ebenfalls ein Substrat dieser Transporter, würde dies die Ergebnisse erklären, die in Abbildung 4.23 (B) dargestellt sind. Da für Ciprofloxacin hier die gleichen Beobachtungen gemacht wurden, können die Schlussfolgerungen auch auf dieses ABCG2-Substrat übertragen werden.

Aus diesem Grund war es schwierig, die Transportaktivität von ABCG2 in den transformierten Hefen nachzuweisen, da keine literaturbekannte Substanz vorhanden war, die fungizide Eigenschaften aufwies und gleichzeitig ein Substrat des Transportproteins darstellte. Über die Toxizität von weiteren klassischen ABCG2-Substraten gegenüber Pilzen im Allgemeinen ist bisher nur sehr wenig veröffentlicht worden [121]. Daneben besitzen Hefezellen anders als humane Zellen eine Zellwand, die von Substanzen mit den genannten Eigenschaften zuerst überwunden werden muss, bevor diese mit dem in der Zellmembran exprimierten Transporter interagieren können [167]. Da funktionelle Untersuchungen in LPY11-ABCG2, die die Aktivität von ABCG2 belegen könnten, nicht durchgeführt werden konnten, musste das Protein folglich aufgereinigt und rekonstituiert werden, um eine erfolgreiche Expression von aktivem ABCG2 nachzuweisen.

4.3.3 Anwendung der Fed-Batch Kultivierung auf LPY11-ABCG2

Um die benötigte Menge an Biomasse für die Aufreinigung von ABCG2 zu gewinnen, wurde der Hefestamm mittels Fed-Batch Verfahren kultiviert. Die Parameter aller durchgeführten Kultivierungen für die 500 ml Vorkultur und für das Wachstum im Fermenter sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

LPY11-ABCG2 Zellen teilten sich im Fed-Batch Verfahren etwas langsamer als bei der Standard-Kultivierung ($3,3 \pm 0,6$ h bzw. $2,2 \pm 0,4$ h). Da die Kulturdauer von LPY11-ABCG2 im Fermenter mit durchschnittlich 19,7 h jedoch nur zwei Drittel der Kulturdauer von BJ5457-ABCB1 betrug, bestätigte sich der Vorteil der Verwendung des LPY11-Stammes.

In der Literatur wurde beschrieben, dass die Expression von ABCB1 bzw. ABCC1 in *S. cerevisiae* stark zurückgeht, wenn die Zellen die stationäre Phase erreichen [94, 103]. Daher wurde hier durch Überwachung des Wachstumsfortschritts darauf geachtet, dass die Zellen in der exponentiellen Phase bei einer optischen Dichte von $2,3 \pm 0,2$ geerntet wurden. Auf diese Weise konnten im Mittel $44,6 \pm 5,3$ g Biomasse gewonnen werden.

Insgesamt waren alle beschriebenen Parameter sehr gut reproduzierbar. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für den Hefestamm BJ5457-ABCB1 (siehe Kapitel 4.1.2) eignet sich der Fed-Batch Prozess zur routinemäßigen Anwendung auch für LPY11-ABCG2.

Tab. 4.5: Zusammenfassung der Parameter aller Fed-Batch Kulturen von LPY11-ABCG2.

	Kulturdauer [h]	Verdopplungszeit [h]
500 ml Vorkultur	$7,7 \pm 1,8$	$2,2 \pm 0,4$
Fermenter		
Beginn	$12,4 \pm 3,0$	$3,3 \pm 0,5$
nach 1. Zugabe	$3,4 \pm 1,1$	$3,6 \pm 0,6$
nach 2. Zugabe	$4,0 \pm 0,7$	$3,1 \pm 0,8$
Gesamt	$19,7 \pm 4,2$	$3,3 \pm 0,6$

4.3.4 Etablierung der Membranpräparation von LPY11-ABCG2

Die in Kapitel 3.2.9 dargestellte Methode zur Isolierung von Hefezellmembranen wurde bisher nur für den Stamm BJ5457-ABCB1 beschrieben [103]. Dieser protease-defiziente *S. cerevisiae* Stamm besitzt eine andere Zusammensetzung der Zellmembran als der ergosterol-defiziente Stamm LPY11. Um zu prüfen, ob die Methode der Membranpräparation auch auf Hefestämme mit anderen Membraneigenschaften übertragbar war, wurde der Vergleichsstamm LPY11-ABCB1 verwendet. Auf diese Weise konnte untersucht werden, ob eine veränderte Membranzusammensetzung andere Sedimentationseigenschaften bei der Ultrazentrifugation zur Folge hätte. Eine geringere Sedimentation bei der routinemäßig verwendeten Umdrehungszahl der Zentrifuge würde die Konzentration von ABCB1 in der Fraktion der Zellmembranen negativ beeinflussen.

LPY11-ABCB1 wurde mittels Fed-Batch Verfahren kultiviert und die geerntete Biomasse im Beadbeater aufgeschlossen. Nach Abtrennung nicht zerstörter Zellen und anderer Organellen wurde die Zellmembranfraktion durch Ultrazentrifugation pelletiert. Bei jedem Schritt wurden Proben entnommen und im Western Blot auf ihren ABCB1-Gehalt untersucht, das Ergebnis ist in Abbildung 4.25 zu sehen. Genauso wie schon bei Verwendung des Stammes BJ5457-ABCB1 wurde durch die ersten beiden Zentrifugationsschritte (Bahnen 1 & 2) eine gewisse Menge an ABCB1 abgetrennt, wobei der Anteil für beide Hefestämme etwa im gleichen Bereich liegt. Also kann das Protokoll der Membranpräparation auch auf andere, mit ABCB1 transformierte *S. cerevisiae* Zellen übertragen werden.

Zur Etablierung der Membranpräparation von LPY11-ABCG2 wurde die mit Hilfe der Fed-Batch Kultivierung gewonnene Biomasse auf die gleiche Weise behandelt, wie es zuvor für den LPY11-ABCB1 Stamm beschrieben wurde. Abbildung 4.26 zeigt den Western Blot der

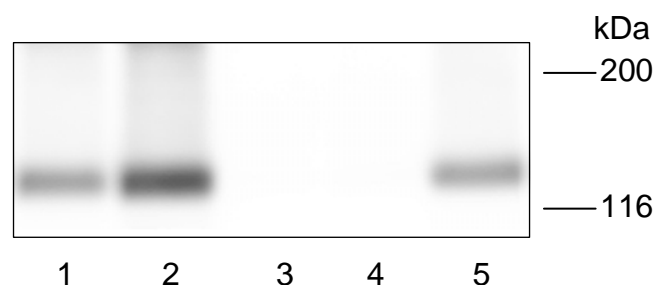


Abb. 4.25: Membranpräparation von LPY11-ABCB1. SDS-PAGE und Western Blot von Proben des Membranpräparationsprozesses (5 μg pro Bahn): Pellet Zentrifugation 1 (Bahn 1), Pellet Zentrifugation 2 (Bahn 2), Überstand Ultrazentrifugation 1 (Bahn 3), Überstand Ultrazentrifugation 2 (Bahn 4), Zellmembranen (Bahn 5).

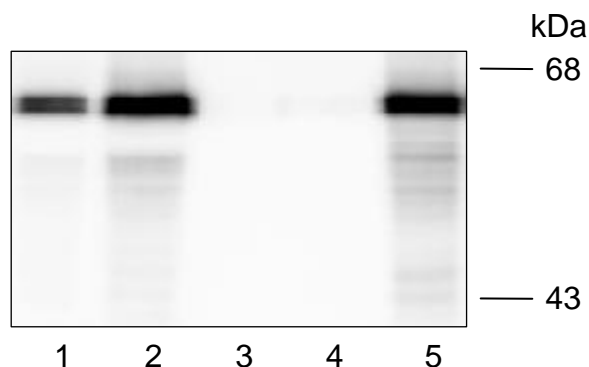


Abb. 4.26: Membranpräparation von LPY11-ABCG2. SDS-PAGE und Western Blot von Proben des Membranpräparationsprozesses (5 µg pro Bahn): Pellet Zentrifugation 1 (Bahn 1), Pellet Zentrifugation 2 (Bahn 2), Überstand Ultrazentrifugation 1 (Bahn 3), Überstand Ultrazentrifugation 2 (Bahn 4), Zellmembranen (Bahn 5).

während des Versuches entnommenen Proben. Auch bei Isolierung der Zellmembranen dieses Hefestammes ging durch die ersten beiden Zentrifugationsschritte Protein verloren (Bahnen 1 & 2). Jedoch wurde im Gegensatz zur Membranpräparation von BJ5457-ABCB1 (Abbildung 4.10) und LPY11-ABCB1 (Abbildung 4.25) hier das heterolog exprimierte ABCG2 in der Fraktion der Zellmembranen angereichert.

Fazit

Die Methode der Membranpräparation konnte also erfolgreich auf LPY11-ABCG2 übertragen werden und ist prinzipiell unabhängig vom verwendeten Hefestamm. In Kapitel 4.1.5 wurde ein Vorschlag zur Optimierung der Membranpräparation von BJ5457-ABCB1 gemacht. Ohne Durchführung der Zentrifugation 2 konnte mehr Protein in der Fraktion der Zellmembran angereichert werden. Da aus dieser Membranpräparation gewonnenes aufgereinigtes ABCB1 sehr aktiv war, könnte dieser Optimierungsschritt zukünftig auch bei der Präparation der Zellmembranen von LPY11-ABCG2 angewandt werden.

Alle aus LPY11-ABCG2 Zellen hergestellten Membranpräparationen wiesen einen homogenen Gehalt des exprimierten Proteins auf (siehe Abbildung 4.27) und waren somit für die weitere Aufreinigung gut geeignet. Mittels ATPase Assay konnte die Funktionalität von ABCG2 an dieser Stelle nicht überprüft werden, da in *S. cerevisiae* auch andere membranständige ATPasen exprimiert werden [168], die in der Membranpräparation vorhanden sein und so die Ergebnisse des Assays verfälschen könnten. Eine Aufreinigung und Rekonstitution des Transportproteins war also für die Beurteilung seiner Funktionsfähigkeit notwendig.

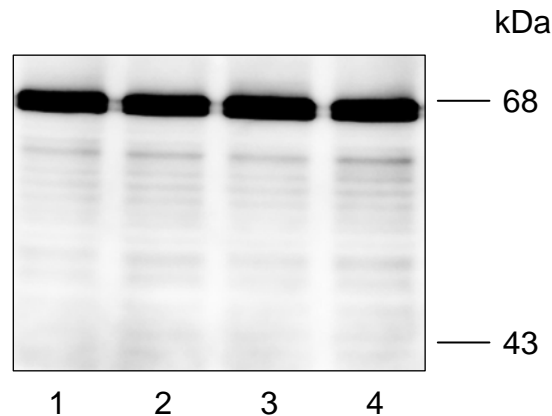


Abb. 4.27: Vergleich des ABCG2-Gehaltes in verschiedenen Membran-Chargen von LPY11-ABCG2. Western Blot von Proben aller durchgeführten Membranpräparationen (Bahnen 1–4), 5 µg pro Bahn.

4.3.5 Aufreinigung von ABCG2

Der Aufreinigungsprozess eines Membranproteins besteht aus den Schritten Solubilisierung, Affinitätschromatographie und Rekonstitution, wie in Kapitel 3.2.13 dargestellt. ABCB1 konnte laut Literatur unter Verwendung von 2 % n-Octyl- β -D-glucopyranosid (Octylglucosid, OG) erfolgreich aus LPY11-ABCB1 aufgereinigt werden [130]. Da die Auswahl eines geeigneten Detergenzes, welches das Zielprotein in seiner nativen und aktiven Konformation aus der Membrenumgebung herauszulösen vermag, unter anderem von der Zusammensetzung dieser Membran abhängt, wurde OG in der genannten Konzentration für die initiale Aufreinigung von ABCG2 verwendet. Auch weitere Versuchsbedingungen wie die Gesamtproteinkonzentration von 2 mg/ml, die Solubilisierungszeit von 20 min und die Verwendung von Ni-NTA bei der Affinitätschromatographie wurden zunächst beibehalten.

Für die Funktion von ABCG2 ist ein bestimmter Anteil von Cholesterol in der das Protein umgebenden Membran wichtig [116, 123]. Der mittlere Cholesterol-Gehalt von humanen MXR Zellen [116] und MDCKII-BCRP Zellen [123], die beide laut Literatur funktionelles ABCG2 exprimieren, beträgt etwa 23 %. Aus diesem Grund wurde für die Rekonstitution des Proteins mittels Dialyse eine finale Cholesterol-Konzentration von 23 % verwendet. Das Gesamtverhältnis des Molekulargewichtes von Lipiden zu Protein betrug ungefähr 270:1.

An verschiedenen Stellen im Aufreinigungsprozess wurden Proben entnommen und nach SDS-PAGE mit Hilfe der Silberfärbung bzw. des Western Blots auf ihren Protein- bzw. ABCG2-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.28 dargestellt. Das Protein wurde relativ rein vom Nickel-Harz eluiert, jedoch enthielt das Eluat nur eine sehr geringe Konzentration von ABCG2. Der Western Blot zeigt, dass vornehmlich die obere der beiden

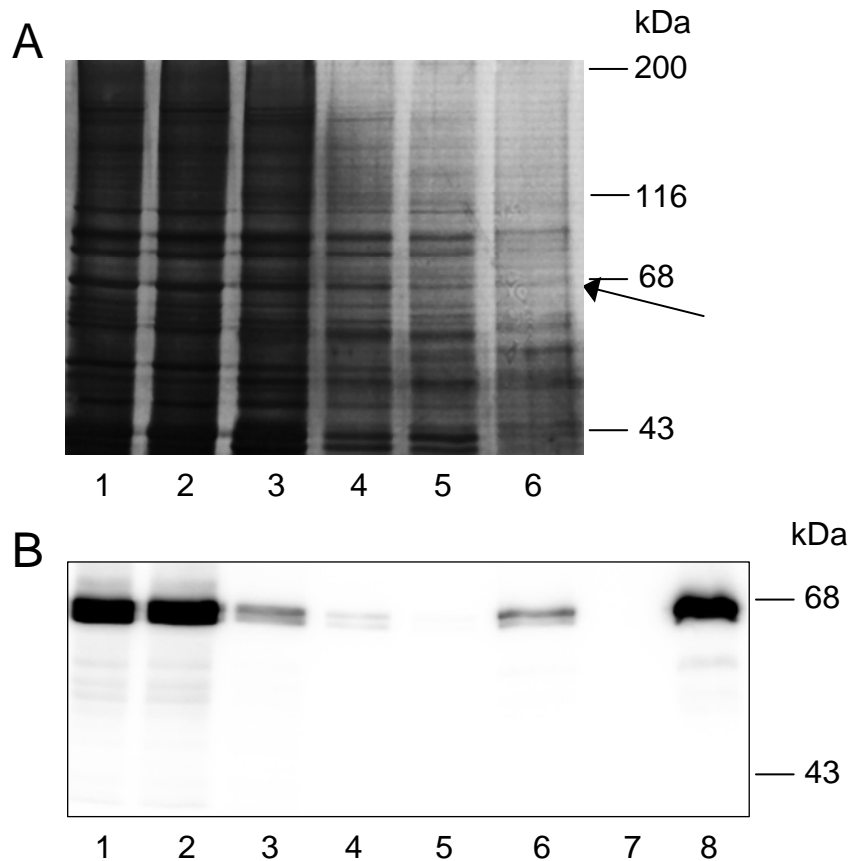


Abb. 4.28: Aufreinigung von ABCG2 mit 2 % OG. (A) SDS-PAGE und Silberfärbung von Proben des Aufreinigungsprozesses (5 μ g in Bahnen 1–5 & 8, 15 μ l in Bahnen 6 & 7): Ausgangsmembranen (Bahn 1), nicht-solubilierte Proteine (Bahn 2), mit OG solubilierte Proteine (Bahn 3), nicht an Ni-NTA gebundene Proteine (Bahn 4), Waschschrift Ni-NTA (Bahn 5), von Ni-NTA eluiertes ABCG2 (Bahn 6); (B) Western Blot der Proben aus dem Aufreinigungsprozess in der gleichen Reihenfolge und Konzentration wie bei (A), zusätzlich Überstand nach Ultrazentrifugation der Proteoliposomen (Bahn 7), rekonstituiertes Protein (Bahn 8).

Spezies von OG solubiliert wurde (Bahn 6). Dies ist von Vorteil, da die untere Spezies in der Literatur als inaktiv beschrieben wird und eine Solubilisation aus diesem Grund nicht erwünscht wäre. Zusätzlich wurde die Chemilumineszenz der vom Antikörper markierten Banden 1–4 densitometrisch ausgewertet. Nur etwa 20 % des insgesamt enthaltenen Proteins konnten durch das Detergenz solubiliert werden (Bahn 3). Jedoch wurde über den His-Tag aus 10 Histidinen eine sehr gute Bindung des Proteins an Ni-NTA von über 90 % erzielt und nur ein geringer Anteil von ABCG2 nicht gebunden (Bahn 4). Die Reinheit des Eluats war nicht optimal, die Silberfärbung (A, Bahn 6) zeigte das Vorhandensein einiger anderer Proteine.

Mit Hilfe eines Antikörpers gegen die am N-Terminus des Proteins vorhandenen Myc-Epitope wurde untersucht, ob es sich um Bruchstücke von ABCG2 handeln könnte. Diese könnten

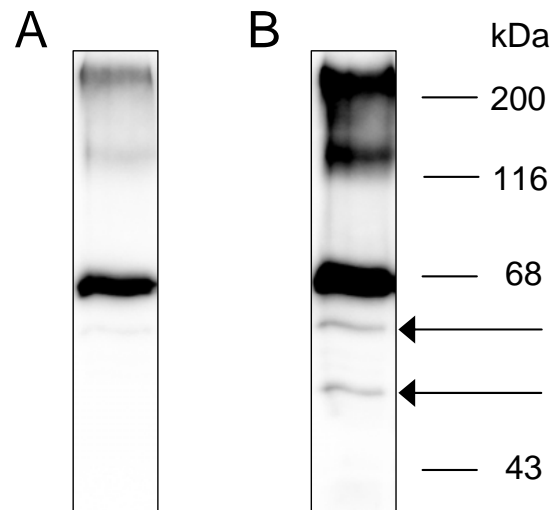


Abb. 4.29: Verwendung unterschiedlicher Antikörper bei der Untersuchung des Eluats der Affinitätschromatographie nach Solubilisatin mit OG mittels Western Blot (15 μ l pro Bahn). (A) BXP-21; (B) Myc-Antikörper.

durch Proteasen erzeugt worden sein, die trotz Verwendung mehrerer Proteaseinhibitoren Aktivität aufwiesen. Der in dieser Arbeit standardmäßig für Western Blots eingesetzte Antikörper BXP-21 bindet intrazellulär in der Linker-Region zwischen der ATP-Bindungsstelle und den transmembranären Regionen [51, 158]. Der Myc-Antikörper dagegen bindet am N-Terminus in großer Nähe zur Nukleotid-Bindungsdomäne. Diese weist eine sehr kompakte Struktur auf, welche für Proteasen generell schlechter zugänglich ist als die transmembranären Regionen des Proteins. Auf diese Weise sollten auch Bruchstücke von ABCG2 ohne BXP-21-Epitop, welche jedoch die NBD enthalten, von diesem Antikörper erkannt werden.

Abbildung 4.29 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung. Eine Probe des Eluats der Affinitätschromatographie wurde auf jeweils einem Western Blot mit BXP-21 (A) und dem Myc-Antikörper (B) behandelt. Es zeigte sich, dass beide Antikörper eine Hauptbande bei ca. 68 kDa markieren. Da BXP-21 hier bindet, handelt es sich dabei um ABCG2. Daneben werden zwei zusätzliche schmale Banden vom Myc-Antikörper erkannt, welche kleiner als 68 kDa sind. Hierbei handelt es sich folglich um Bruchstücke des Proteins.

Auf diese Weise können somit einige der in der Silberfärbung zusätzlich detektierten Banden erklärt werden. Daneben scheinen jedoch auch noch andere Proteine vorhanden zu sein. Zur Identifizierung dieser Proteine könnte eine sich anschließende massenspektrometrische Analyse durchgeführt werden. Diese könnte zeigen, ob es sich um fremde Proteine oder um weitere Bruchstücke von ABCG2 handelt, bei denen die Epitope für beide zuvor auf dem Western Blot eingesetzten Antikörper durch Proteasen beschädigt wurden.

Die Aufreinigung verlief insgesamt erfolgreich, ABCG2 konnte in den nach Dialyse resultierenden Proteoliposomen (Bahn 8) nachgewiesen werden. Die finale Proteinkonzentration betrug 0,38 mg/ml. Um die Lipsomen weiter zu charakterisieren, wurden deren Durchmesser und Größenverteilung mittels Photonenkorrelationsspektroskopie untersucht (siehe Kapitel 3.2.14). Proteoliposomen des mit OG solubilisierten ABCG2 wiesen bei homogener Größenverteilung (Polydispersitätsfaktor $0,099 \pm 0,038$) einen Durchmesser von $222,4 \pm 3,9$ nm auf. Da bei der Dialyse also sehr gleichmäßige Vesikel entstehen, kann angenommen werden, dass auch pro Vesikel gleich viele ABCG2-Moleküle vorhanden sind. Da mittels Dialyse Proteoliposomen mit einer homogenen Größenverteilung gewonnen werden, ist diese Methode also für die Rekonstitution von ABCG2 vor dem Hintergrund späterer funktioneller Untersuchungen sehr gut geeignet.

ATPase Aktivität des aufgereinigten ABCG2

Um zu untersuchen, ob ABCG2 mit der zuvor beschriebenen Methode in seiner aktiven, funktionellen Konformation solubilisiert, aufgereinigt und rekonstituiert werden konnte, wurde die ATPase Aktivität des ABC-Transporters bestimmt. Dazu wurde zunächst der ATPase Assay für dieses Protein etabliert, bei dem die basale Vanadat-sensitive und die durch in der Literatur beschriebene Stimulatoren erhöhte ATPase Aktivität gemessen und verglichen wird. Die Durchführung ist in Kapitel 3.2.15 zusammengefasst.

Da mit dem bisher für ABCB1 verwendeten Basis Assay Puffer I keine Aktivität gemessen werden konnte, wurde ein anderer, in der Literatur für die Untersuchung der ABCG2-ATPase Aktivität eingesetzter Puffer (hier Basis Assay Puffer ABCG2 genannt) ausgewählt [112]. Als Standard-Stimulator wurde Prazosin in einer Konzentration von 100 μ M verwendet, weil die Aktivität dieser Substanz bereits von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt und der größte Effekt für diese Konzentration beschrieben wurde [67, 114, 117, 169]. Zusätzlich wurden basale und stimulierte Aktivitätswerte in Anwesenheit von 1 mM Vanadat gemessen und von den Werten ohne Vanadat abgezogen. Die Phosphat-Entstehung, die nicht auf eine Aktivität von ATPasen zurückzuführen war, wurde also nicht in die Auswertung mit einbezogen.

Die basale, Vanadat-sensitive ATPase Aktivität des mit OG aufgereinigten ABCG2 betrug durchschnittlich 0,18 μ mol P_i /mg/min. Wie in der Literatur für ABCG2 beschrieben wies das Protein eine im Vergleich zu ABCB1 (in dieser Arbeit durchschnittlich etwa 0,077 μ mol P_i /mg/min) relativ hohe basale ATPase Aktivität auf [65, 67, 112]. 100 μ M Prazosin stimulierten die basale Aktivität ca. 2fach. Dieser Faktor stimmte mit den von vielen

anderen Arbeitsgruppen in Membranpräparationen verschiedener Spezies gemessenen Faktoren für die Stimulation durch Prazosin überein, die in einem Bereich von 1,4 bis 3fach lagen [66, 67, 70, 110, 114, 117, 169].

Neben Prazosin wurden auch andere literaturbekannte ABCG2-Substrate wie Progesteron [112], GF120918 [77] und Sulfasalazin [117] im ATPase Assay untersucht. In Abbildung 4.30 (A) sind die Ergebnisse der Assays für mit OG aufgereinigtes Protein zusammengefasst. Für 25 μM Progesteron und 5 μM GF120918 lag der Stimulationsfaktor bei 1,4fach, für 31,6 μM Sulfasalazin bei 1,5fach. Die genannten Verbindungen stimulierten also ebenfalls die ATPase Aktivität von ABCG2, jedoch in einem etwas geringeren Ausmaß. Auch diese Ergebnisse stimmten mit der zuvor genannten Literatur überein. Um die Funktionalität des aufgereinigten Proteins weiter zu bestätigen, wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Prazosin aufgenommen. Es zeigte sich, dass die ATPase Aktivität durch diese Verbindung konzentrationsabhängig stimuliert werden konnte, der EC_{50} -Wert der in Abbildung 4.30 (B) dargestellten Kurve betrug 4,37 μM . Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem in der Literatur berichteten EC_{50} -Wert von 5 μM überein [170].

Fazit

ABCG2 konnte mit Hilfe des Detergenzes Octylglucosid erfolgreich aus Membranen des Hefestammes LPY11-ABCG2 solubilisiert werden. Es zeigte sich zudem eine gewisse Präferenz für die obere der beiden Proteinspezies. Über den His-Tag aus zehn Histidin-Molekülen wurde eine effiziente Bindung von über 90 % an Ni-NTA erreicht. Jedoch lag das Protein nach Affinitätschromatographie nicht vollständig rein vor. Im ATPase Assay zeigte sich eine durch Prazosin und weitere literaturbekannte Verbindungen stimulierte Zunahme der Vanadat-sensitiven ATPase Aktivität. Folglich wurde ABCG2 in seiner aktiven Konformation aus den Hefemembranen extrahiert. Durch die erfolgreichen funktionellen Untersuchungen des aufgereinigten und rekonstituierten Proteins zeigte sich zusätzlich, dass die für die Rekonstitution gewählte Cholesterol-Konzentration und die Zusammensetzung der Lipidmischung den Erhalt der aktiven Konformation des Proteins ermöglichte.

Wie bereits erwähnt muss der Halbtransporter ABCG2 laut Literatur mindestens als Dimer vorliegen, um funktionsfähig zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige Versuche durchgeführt, die darauf hinweisen, dass ABCG2 in den Hefezellen und auch nach Membranpräparation in dieser Form vorliegt (siehe Kapitel 4.3.1). Da mittels Affinitätschromatographie nicht nur Monomere, sondern auch Dimere aufgereinigt werden können [139] und das in Proteoliposomen rekonstituierte Protein ATPase Aktivität aufwies, wurde wahrscheinlich

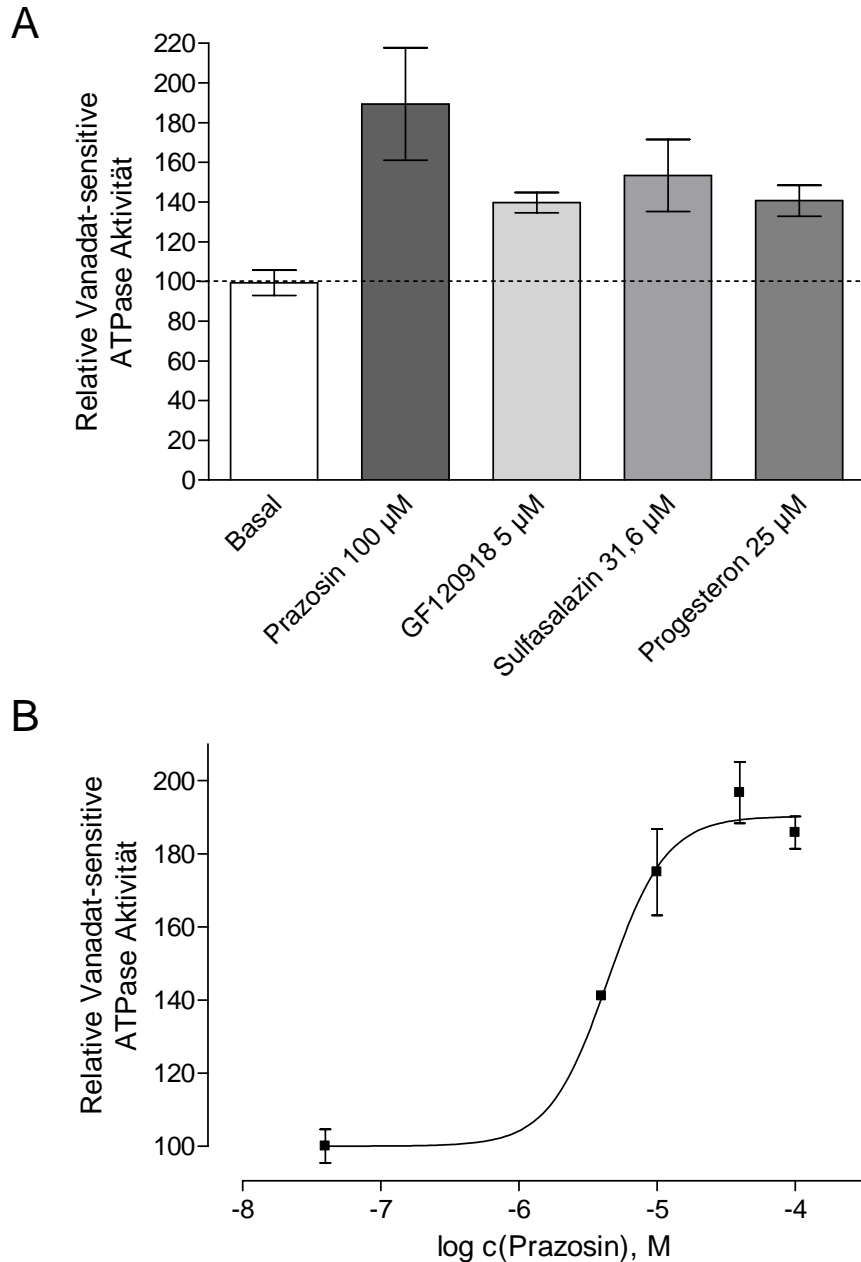


Abb. 4.30: Bestimmung der Aktivität von mit 2 % OG aufgereinigtem ABCG2. (A) Relative Vanadat-sensitive ATPase Aktivität in Abwesenheit (Basal) und Gegenwart der bekannten Stimulatoren Prazosin, GF120918, Sulfasalazin und Progesteron in der jeweils angegebenen Konzentration. (B) Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Prazosin (EC_{50} -Wert = 4,37 μM). Alle Experimente wurden mindestens zweimal in Triplikaten durchgeführt.

mit dem hier beschriebenen Verfahren ein Dimer oder höher organisiertes Oligomer gewonnen. Die in diesem Kapitel präsentierten Ergebnisse belegen, dass ABCG2 in *S. cerevisiae* funktionell exprimiert werden kann. Dies konnte bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden.

4.3.6 Detergenzscreening für ABCG2 in Hefemembranen

ABCG2 konnte zwar prinzipiell durch Octylglucosid in seiner nativen Konformation aus LPY11-ABCG2 Membranen solubilisiert werden, jedoch nur mit einem Anteil von etwa 20 %. Aus diesem Grund wurde ein Screening mit insgesamt 16 Detergenzien durchgeführt. Dabei wurden sowohl nicht-ionische (DM, DDM, Triton-X-100, Brij 35, Brij 58, Cymal 5, 6 und 7, OG), als auch zwitterionische Verbindungen (CHAPS, CHAPSO, Fos-cholin 12, 13, 14, 15 und 16) verwendet. Die zwitterionischen Fos-choline sollen laut Hersteller besonders gut zur Solubilisation von membranständigen Proteinen geeignet sein. Auch OG wurde zum Vergleich in dieses Screening mit einbezogen. Pro Ansatz von 1 ml wurden 5 mg Gesamtprotein mit 1 % Detergenz versetzt, für 60 min inkubiert und danach ultrazentrifugiert, um solubiliertes von nicht-solubiliertem Material abzutrennen. Die genauere Versuchsdurchführung und die ausführlichen Bezeichnungen der eingesetzten Detergenzien können Kapitel 3.2.12 entnommen werden.

Die auf diese Weise gewonnenen Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf ihren ABCG2-Gehalt untersucht, dabei wurden ABCG2-haltige Insektenzellmembranen als Kontrolle verwendet. Das in diesen Zellen exprimierte Protein hat ein etwas geringeres Molekulargewicht, dies wird in Kapitel 4.4.2 ausführlich diskutiert. Es zeigte sich, dass nicht alle eingesetzten Detergenzien in der Lage waren, ABCG2 aus Hefemembranen zu solubilisieren. Keine Solubilisation konnte mit Brij 35, Brij 58, CHAPS, und CHAPSO erreicht werden, wie aus Abbildung 4.31 (A) hervorgeht.

Um die Effizienz derjenigen Detergenzien besser vergleichen zu können, die in der Lage waren, ABCG2 aus der Zellmembran herauszulösen, wurden nur die Proben des solubilierten Materials zusammen auf einem Blot untersucht. Dies ist in Abbildung 4.32 dargestellt. Im Vergleich ist zu sehen, dass Triton-X-100, OG, Cymal 5, 6 und 7 viel weniger Protein solubilisieren als die anderen Detergenzien. Alle Fos-choline dagegen sind für die Solubilisation von ABCG2 sehr gut geeignet. Da das meiste Protein in der Probe von FC-16 enthalten war, wurde dieses Detergenz für die weitere Optimierung der Aufreinigung ausgewählt.

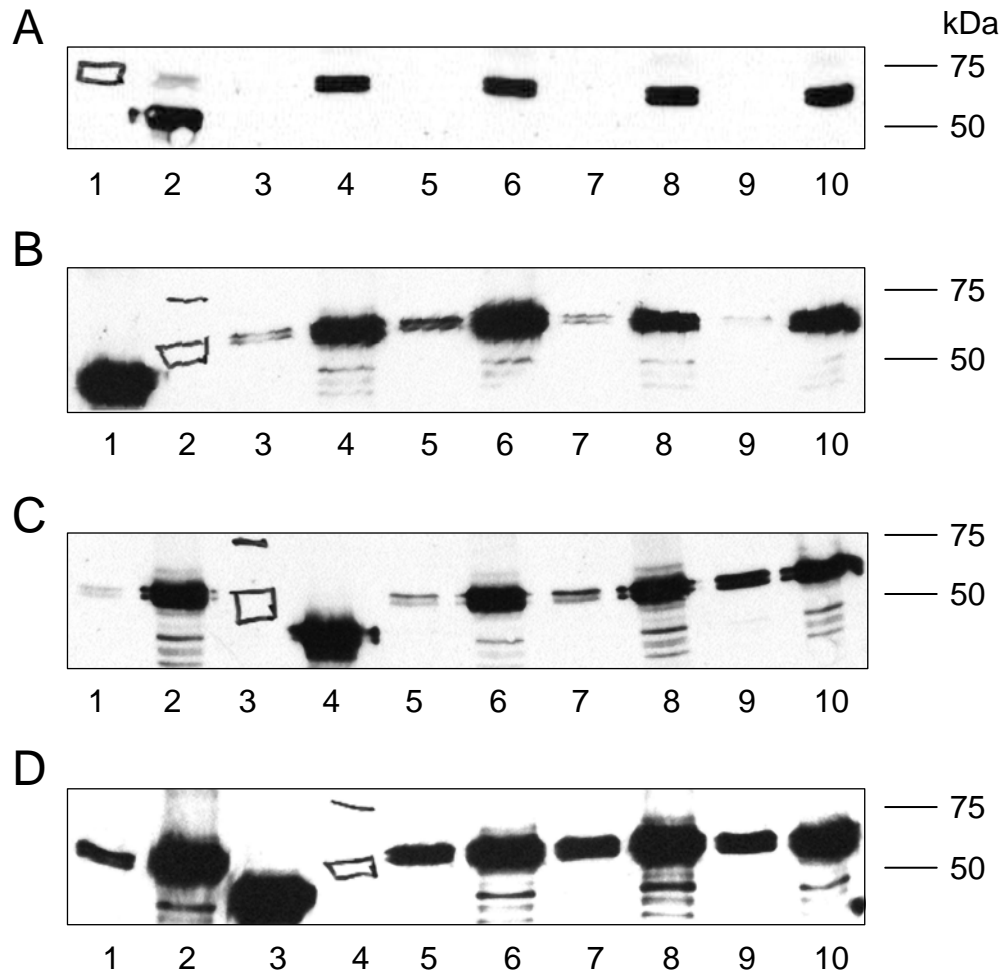


Abb. 4.31: Detergenzienscreening für ABCG2 aus LPY11-ABCG2 Membranen. Proben von durch 1 % der angegebenen Detergenzien solubilisierten („S“) und nicht-solubilisierten („P“) Proteinen wurden mittels Western Blot untersucht (2 µg pro Bahn): (A) Proteinstandard (Bahn 1), ABCG2-Kontrolle (Bahn 2), Brij 35 S & P (Bahnen 3 & 4), Brij 58 S & P (Bahnen 5 & 6), CHAPS S & P (Bahnen 7 & 8), CHAPSO S & P (Bahnen 9 & 10). (B) ABCG2-Kontrolle (Bahn 1), Proteinstandard (Bahn 2), DM S & P (Bahnen 3 & 4), DDM S & P (Bahnen 5 & 6), Triton-X-100 S & P (Bahnen 7 & 8), OG S & P (Bahnen 9 & 10). (C) Cymal 5 S & P (Bahnen 1 & 2), Proteinstandard (Bahn 3), ABCG2-Kontrolle (Bahn 4), Cymal 6 S & P (Bahnen 5 & 6), Cymal 7 S & P (Bahnen 7 & 8), FC-12 S & P (Bahnen 9 & 10). (D) FC-13 S & P (Bahnen 1 & 2), ABCG2-Kontrolle (Bahn 3), Proteinstandard (Bahn 4), FC-14 S & P (Bahnen 5 & 6), FC-15 S & P (Bahnen 7 & 8), FC-16 S & P (Bahnen 9 & 10).

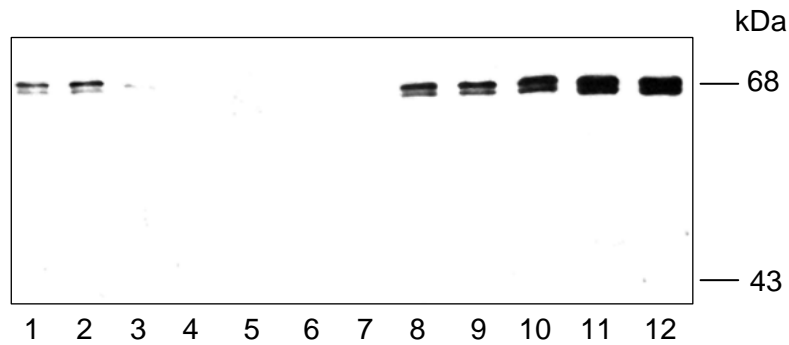


Abb. 4.32: Vergleich der Solubilisierungseffizienz verschiedener Detergenzien für ABCG2 aus LPY11-ABCG2 Membranen. SDS-PAGE und Western Blot der Proben von mit den folgenden Detergenzien solubilierten Proteinen (4 μg pro Bahn): DM (Bahn 1), DDM (Bahn 2), Triton-X-100 (Bahn 3), OG (Bahn 4), Cymal 5 (Bahn 5), Cymal 6 (Bahn 6), Cymal 7 (Bahn 7), FC-12 (Bahn 8), FC-13 (Bahn 9), FC-14 (Bahn 10), FC-15 (Bahn 11), FC-16 (Bahn 12).

4.3.7 Optimierung der Aufreinigung von ABCG2

Da Fos-cholin 16 in der Lage war, die größten Mengen von ABCG2 aus LPY11-Membranen zu extrahieren, wurde dieses Detergenz zur Optimierung der Aufreinigung eingesetzt. Dadurch sollte die Ausbeute an aufzureinigendem ABCG2 erhöht werden. Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen von FC-16 auf ihre Solubilisierungseffizienz hin untersucht. Ziel war es, die minimal nötige Konzentration für die maximal mögliche Solubilisierung des Proteins festzulegen. Dazu wurden die gleichen Versuchsbedingungen wie für das Detergenzscreening gewählt, jedoch die Konzentration von FC-16 zwischen 0 und 2,5 % variiert. Die so gewonnenen Proben wurden mittels Western Blot untersucht, welcher in Abbildung 4.33 dargestellt ist. Es zeigte sich, dass die Solubilisierung von ABCG2 mit FC-16-Mengen über der im Screening verwendeten Konzentration von 1 % noch sehr deutlich gesteigert werden konnte. Da sich die Menge an solubiliertem Protein mit 2,5 % Detergenz im Vergleich zu 2 % nicht weiter steigern ließ, wurde für die weiteren Versuche eine FC-16-Konzentration von 2 % ausgewählt.

Aufreinigung mit Fos-cholin 16

Die Aufreinigung von ABCG2 mit 2 % FC-16 wurde genauso durchgeführt, wie in Kapitel 4.3.5 für das Detergenz OG beschrieben. Jedoch wurde zum einen die zu Beginn eingesetzte Gesamtproteinkonzentration auf 5 mg/ml erhöht, zum anderen die Solubilisierungszeit von 20 min auf 60 min verlängert. Diese Versuchsbedingungen wurden vom Detergenzscreening bzw. von der Konzentrationsoptimierung übernommen.

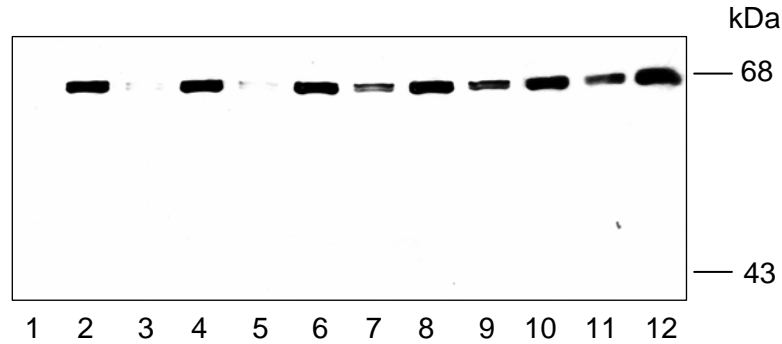


Abb. 4.33: Solubilisation von ABCG2 mit verschiedenen Konzentrationen von Fos-cholin 16. Western Blot der Proben von solubilierten („S“) und nicht-solubilierten („P“) Proteinen mit den folgenden Konzentrationen von FC-16 (4 μg pro Bahn): 0 % S & P (Bahnen 1 & 2), 0,5 % S & P (Bahnen 3 & 4), 1,0 % S & P (Bahnen 5 & 6), 1,5 % S & P (Bahnen 7 & 8), 2,0 % S & P (Bahnen 9 & 10), 2,5 % S & P (Bahnen 11 & 12).

Während des Aufreinigungsprozesses wurden Proben entnommen und nach SDS-PAGE mittels Silberfärbung und Western Blot untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 4.34 dargestellt. Durch densitometrische Analyse der Banden von (B) zeigte sich, dass mit 2 % FC-16 etwa 60 % des im Ausgangsmaterial vorhandenen ABCG2 solubilisiert werden konnten (Bahn 3). Der Einsatz dieses Detergenzes führte also im Vergleich zu OG zu einer dreifach höheren Ausbeute bei der Solubilisation. Obwohl nicht das gesamte solubilierte Protein vom Nickel-Harz gebunden werden konnte (Bahn 4), enthielt auch das Eluat mehr ABCG2 als bei der Aufreinigung mit Octylglucosid. Zusätzlich konnte die Reinheit des eluierten ABCG2 etwas verbessert werden.

Wie bereits bei der Aufreinigung mit OG stellte sich an dieser Stelle die Frage, ob es sich bei den mittels Silberfärbung im Eluat detektierten Banden um fremde Proteine oder um Bruchstücke von ABCG2 handelt. Auch in diesem Fall wurde die Eluat-Probe mittels Western Blot und Myc-Antikörper untersucht. Dieser Antikörper war in der Lage, neben der Hauptbande von ABCG2 an einige weitere kleinere Banden zu binden (siehe Abbildung 4.35). Folglich sind dies Bruchstücke von ABCG2. Jedoch konnten auch hier nicht alle zusätzlichen Banden auf der Silberfärbung den Banden auf dem Western Blot zugeordnet werden. Eine Analyse mittels Massenspektrometrie könnte Aufschluss über die Identität der weiteren Proteine geben.

Mittels Dialyse wurde das aufgereinigte Protein anschließend erfolgreich in Proteoliposomen rekonstituiert, deren finale Proteinkonzentration 0,30 mg/ml betrug. Außerdem wurde der Durchmesser der Liposomen mit Hilfe der PCS bestimmt, der mit durchschnittlich $678,2 \pm 8,0$ nm sehr groß war. Auch die Größenverteilung war sehr inhomogen (Polydispersitätsfaktor $0,682 \pm 0,013$). Dies könnte darauf zurückzuführen, dass das Detergenz FC-16

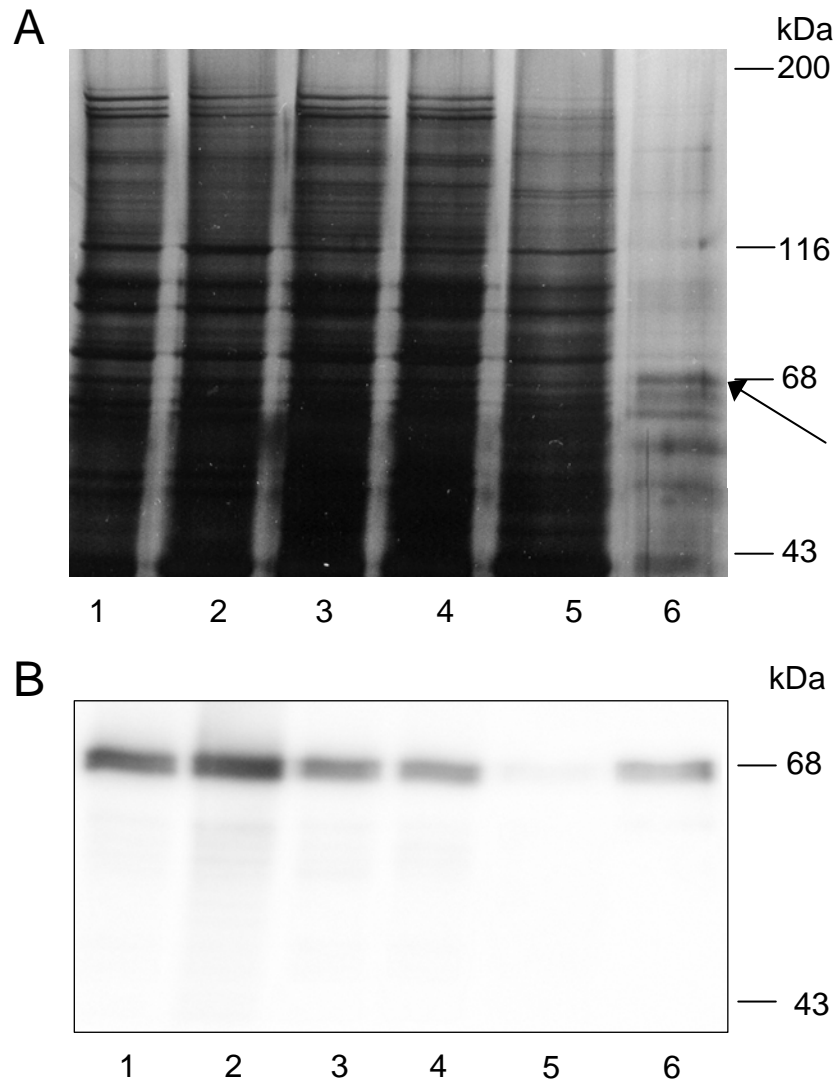


Abb. 4.34: Aufreinigung von ABCG2 mit 2 % FC-16. (A) SDS-PAGE und Silberfärbung von Proben des Aufreinigungsprozesses (2 μ g in Bahnen 1–5, 15 μ l in Bahn 6): Ausgangsmembranen (Bahn 1), nicht-solubilierte Proteine (Bahn 2), mit FC-16 solubilierte Proteine (Bahn 3), nicht an Ni-NTA gebundene Proteine (Bahn 4), Waschschrift Ni-NTA (Bahn 5), von Ni-NTA eluiertes ABCG2 (Bahn 6); (B) Western Blot der Proben aus dem Aufreinigungsprozess in der gleichen Reihenfolge und Konzentration wie bei (A).

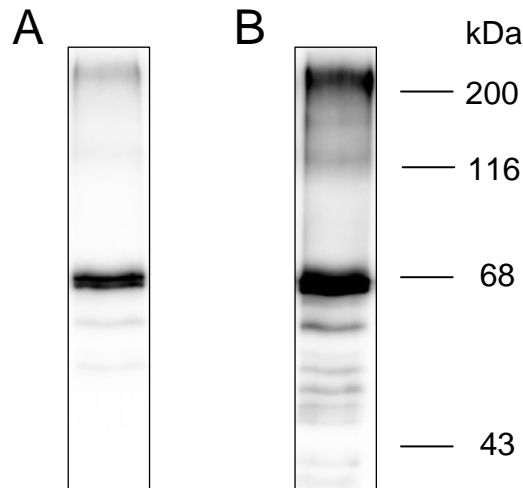


Abb. 4.35: Verwendung unterschiedlicher Antikörper bei der Untersuchung des Eluats der Affinitätschromatographie nach Solubilisierung mit FC-16 mittels Western Blot (15 μ l pro Bahn). (A) BXP-21; (B) Myc-Antikörper.

im Gegensatz zu Octylglucosid nicht bei der Dialyse entfernt wird, sondern in den Liposomen verbleibt und dort die Bildung kleinerer und einheitlicher Vesikel verhindert. Dies wird im nächsten Unterkapitel ausführlicher diskutiert.

ATPase Aktivität des mit FC-16 aufgereinigten ABCG2

Zur Untersuchung der Funktionalität des mit FC-16 aufgereinigten ABCG2 wurde der in Kapitel 4.3.5 beschriebene ATPase Assay eingesetzt. Die basale Vanadat-sensitive Aktivität lag im Mittel bei 0,38 μ mol P_i /mg/min und war damit doppelt so hoch wie im Fall von mit OG aufgereinigtem Protein. Durch Zusatz von 100 μ M Prazosin konnte keine Stimulation erreicht werden (siehe Abbildung 4.36). Somit konnte ABCG2 zwar mit FC-16 erfolgreich aufgereinigt werden, jedoch wahrscheinlich in einer nicht-aktivierbaren, also nicht-funktionalen Konformation.

Für dieses Ergebnis sind verschiedene Gründe denkbar. Eine Möglichkeit ist zum Beispiel, dass durch FC-16 bevorzugt die untere der beiden ABCG2-Spezies solubilisiert würde. Wie bereits in Kapitel 4.3.1 erläutert soll es sich laut Literatur bei der geringfügig kleineren Spezies um ein unreifes und inaktives Intermediat mit einer inkorrekten Tertiärstruktur handeln [120]. Beide Spezies werden von FC-16 jedoch etwa gleich stark solubilisiert, wie die Abbildungen 4.32 und 4.34 zeigen. Nur in Abbildung 4.33 könnte eventuell die Chemolumineszenz der unteren Bande von ABCG2 etwas stärker sein. Insgesamt ist dieser Unterschied aber so gering, dass er nicht zur Erklärung der Inaktivität des Proteins ausreicht.

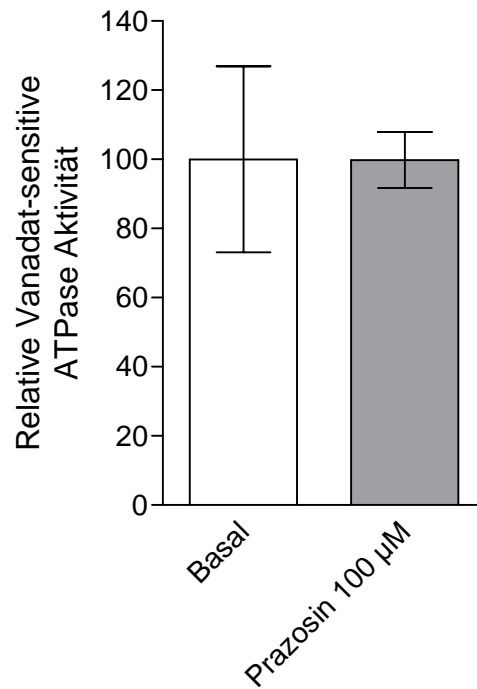


Abb. 4.36: ATPase Aktivität von mit 2 % FC-16 aufgereinigtem ABCG2. Relative Vanadat-sensitive ATPase Aktivität in Ab- (Basal) und Anwesenheit von 100 µM Prazosin. Die Experimente wurden mindestens zweimal in Triplikaten durchgeführt.

Da es keinen Unterschied zwischen basaler und stimulierter Aktivität gibt, wäre eine andere mögliche Erklärung, dass ABCG2 durch das in der Proteoliposomen-Suspension vorhandene Detergenz FC-16 bereits voll stimuliert wird. In diesem Fall ließe sich die Aktivität durch den Zusatz von Prazosin nicht weiter steigern. Auch wenn also laut dieser Theorie hier aktives Protein vorliegen würde, wäre es jedoch für Messungen ungeeignet.

Ein weiterer Grund könnte in den spezifischen Eigenschaften des Detergenzes Fos-cholin 16 liegen, welches eine „lipid-ähnliche“ Struktur aufweist. Verhielte sich FC-16 wie ein Lipid, so würde es bei der Rekonstitution in die Lipidumgebung während der Dialyse an ABCG2 angeheftet bleiben. In diesem Fall könnte das Detergenz mit der Bildung der Proteoliposomen interferieren, indem sich die anderen Lipide, darunter auch das für die Funktion wichtige Cholesterol, nicht korrekt an das Protein anlagern könnten. Aufgrund der bereits zuvor erwähnten inhomogenen Größenverteilung der Liposomen ist dies sehr wahrscheinlich. Da die Rekonstitution aber ein wichtiger Schritt des Aufreinigungsprozesses ist, um natives und aktives Protein zu erhalten [64, 137], könnte die fehlende Dialysierbarkeit von FC-16 für die Nicht-Funktionalität des aufgereinigten Proteins mit verantwortlich sein.

Vergleicht man die Struktur von FC-16 mit der von Octylglucosid, so zeigt sich ein deutlicher Unterschied (siehe Abbildung 4.37). Bei ersterem handelt es sich um eine lange aliphatische

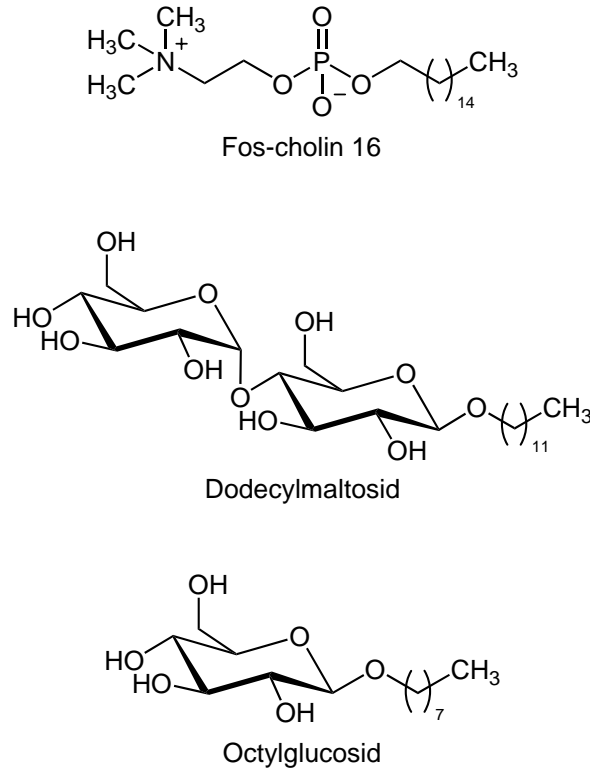


Abb. 4.37: Struktureller Vergleich verschiedener Detergenzien zur Solubilisation von ABCG2. Fos-cholin 16 (FC-16), Dodecylmaltosid (DDM) und Octylglucosid (OG).

Kohlenstoffkette, die an einem Ende eine zwitterionische Struktur enthält. Letzteres ist ein nicht-ionisches Detergenz und weist neben einer kürzeren Kohlenstoffkette eine Zuckerstruktur auf, die den hydrophilen Teil des Moleküls darstellt.

Aufgrund dieses Unterschiedes wurden die Ergebnisse des Detergenzienscreenings (Abbildung 4.32) erneut daraufhin untersucht, ob noch ein weiteres, strukturell mit OG verwandtes Detergenz in der Lage war, ABCG2 zu solubilisieren. n-Decyl- β -D-maltopyranosid (Decylmaltosid, DM) und n-Dodecyl- β -D-maltopyranosid (Dodecylmaltosid, DDM) wiesen die gesuchte Strukturähnlichkeit auf und waren daneben in der Lage, ABCG2 aus LPY11-Membranen herauszulösen. Da DDM eine etwas bessere Effektivität zeigte, wurde dieses für die weiteren Aufreinigungsversuche ausgewählt.

Aufreinigung mit Dodecylmaltosid

Um die optimale Konzentration von Dodecylmaltosid für die Solubilisation von ABCG2 festzustellen, wurden Proben einer Membranpräparation von LPY11-ABCG2 mit verschiedenen DDM-Mengen versetzt. Der Versuch wurde analog zur Konzentrationsoptimierung von FC-

16 durchgeführt. Nur die Proben des solubilisierten Materials wurden mittels Western Blot untersucht, das Ergebnis ist in Abbildung 4.38 dargestellt. Zum einen konnte hier gezeigt werden, dass mit 1,5 % DDM die größte Proteinmenge aus den Membranen herausgelöst werden konnte. Zum anderen wurde deutlich, dass DDM in der Lage ist, die obere, also aktive Spezies von ABCG2 nahezu selektiv zu solubilisieren.

Für die Aufreinigung mit 1,5 % DDM wurden mit einer Ausgangsproteinkonzentration von 5 mg/ml und einer Solubilisationszeit von 60 min die gleichen Bedingungen gewählt wie für die Aufreinigung mit 2 % FC-16. Abbildung 4.39 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse, die nach SDS-PAGE und Silberfärbung bzw. Western Blot erhalten wurden. Die densitometrische Analyse der Banden des Blots zeigte, dass etwa 50 % des im Ausgangsmaterial enthaltenen ABCG2 von DDM solubilisiert werden konnten. Genauso wie schon bei der Aufreinigung mit FC-16 war auch hier die Binding an das Nickel-Harz nicht optimal (Bahn 4).

Die Silberfärbung des Eluats (A, Bahn 6) macht deutlich, dass ABCG2 nicht vollständig aufgereinigt werden konnte. Die Ergebnisse eines Western Blots mit dem Myc-Antikörper und BXP-21 sind in Abbildung 4.40 dargestellt. Wie bereits für das Detergenz OG beschrieben zeigte sich, dass beide Antikörper eine Hauptbande von 68 kDa markieren. Daneben werden zwei zusätzliche schmale Banden durch den Myc-Antikörper erkannt, bei denen es sich um Bruchstücke des Proteins handelt. Auf diese Weise können jedoch nicht alle der in der Silberfärbung zusätzlich detektierten Banden erklärt werden. Daneben scheinen auch noch andere Proteine vorhanden zu sein, welche mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert werden könnten. Mittels Dialyse wurde das Protein jedoch erfolgreich in Proteoliposomen rekonstituiert, die finale Konzentration betrug 0,35 mg/ml.

ATPase Aktivität des mit DDM aufgereinigten ABCG2

Die Untersuchung der Funktionalität des aufgereinigten Proteins mit Hilfe des ATPase Assays wurde so durchgeführt, wie für das mit OG aufgereinigte Protein beschrieben (siehe Kapitel 4.3.5). Die basale Vanadat-sensitive ATPase Aktivität betrug 0,16 $\mu\text{mol P}_i/\text{mg}/\text{min}$ und konnte durch 100 μM Prazosin ca. 1,7fach stimuliert werden (siehe Abbildung 4.41). Also lag auch das mit DDM solubilierte ABCG2 in einer aktiven Konformation vor.

Zusätzlich konnte eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Prazosin generiert werden, der EC_{50} -Wert lag bei 4,57 μM . Daneben stimulierten auch 5 μM GF120918 und 31,6 μM Sulfasalazin die ATPase Aktivität des mit DDM aufgereinigten Proteins 2 bzw. 1,5fach (siehe Abbildung 4.41). Alle Werte für mit DDM aufgereinigtes ABCG2 stimmten mit denen für mit OG solubiliertes Protein und mit der dort zitierten Literatur überein.

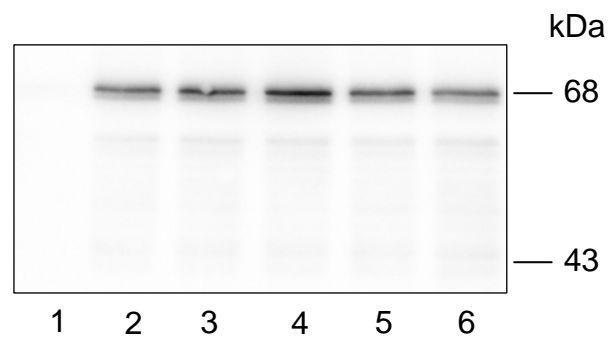


Abb. 4.38: Solubilisation von ABCG2 mit verschiedenen Konzentrationen von Dodecylmalto-
sid. Western Blot der Proben von solubilierten Proteinen mit den folgenden Konzentrationen
von DDM (5 μg pro Bahn): 0 % (Bahn 1), 0,5 % (Bahn 2), 1,0 % (Bahn 3), 1,5 % (Bahn 4),
2,0 % (Bahn 5), 2,5 % (Bahn 6).

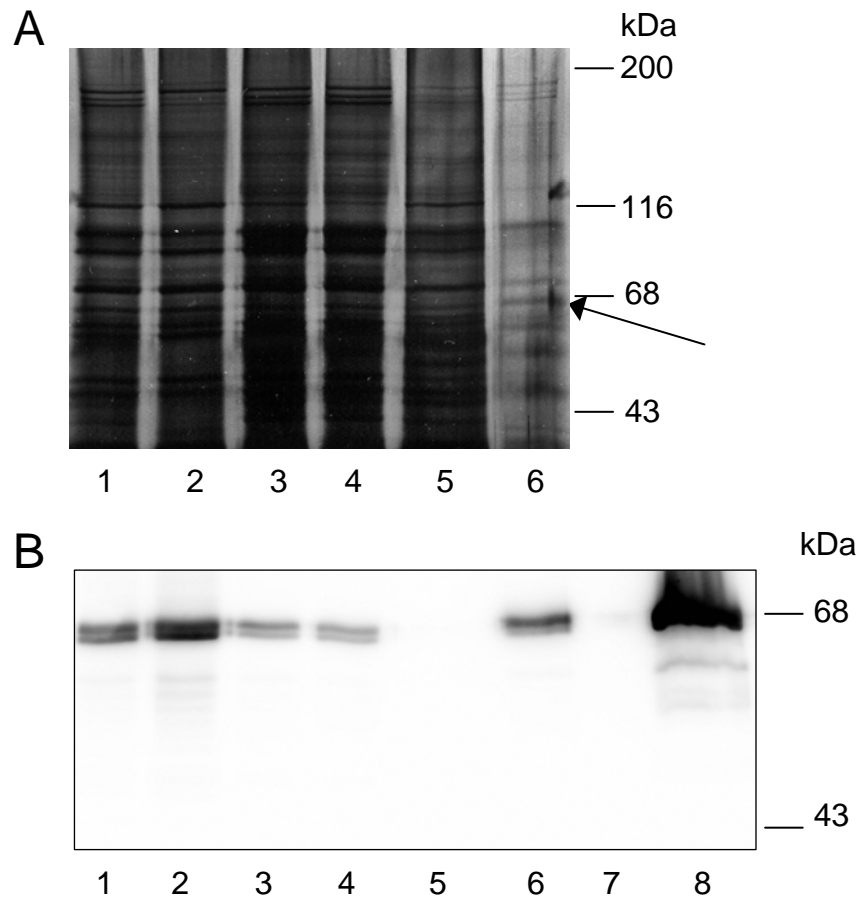


Abb. 4.39: Aufreinigung von ABCG2 mit 1,5 % DDM. (A) SDS-PAGE und Silberfärbung von Proben des Aufreinigungsprozesses (2 μg in Bahnen 1–5, 15 μl in Bahn 6): Ausgangsmembranen (Bahn 1), nicht-solubilisierete Proteine (Bahn 2), mit DDM solubilisierete Proteine (Bahn 3), nicht an Ni-NTA gebundene Proteine (Bahn 4), Waschschrift Ni-NTA (Bahn 5), von Ni-NTA eluiertes ABCG2 (Bahn 6); (B) Western Blot der Proben aus dem Aufreinigungsprozess (5 μg in Bahnen 1–4 & 8, 15 μl in Bahnen 5–7) in der gleichen Reihenfolge wie bei (A), zusätzlich Überstand nach Ultrazentrifugation der Proteoliposomen (Bahn 7), rekonstituiertes Protein (Bahn 8).

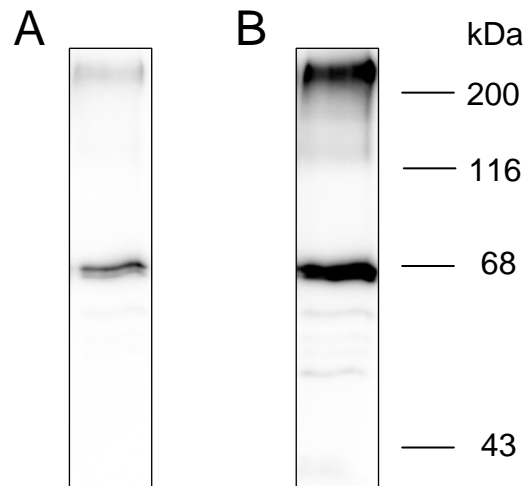


Abb. 4.40: Verwendung unterschiedlicher Antikörper bei der Untersuchung des Eluats der Affinitätschromatographie nach Solubilisation mit DDM mittels Western Blot (15 μ l pro Bahn). (A) BXP-21; (B) Myc-Antikörper.

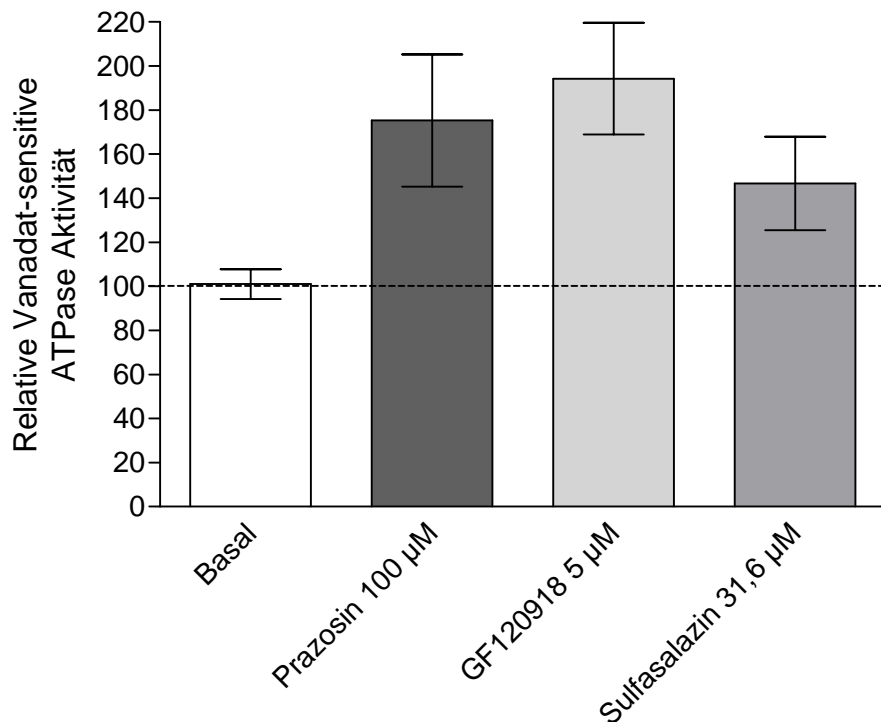


Abb. 4.41: Bestätigung der Aktivität von mit 1,5 % DDM aufgereinigtem ABCG2. Relative Vanadat-sensitive ATPase Aktivität in Abwesenheit (Basal) und Anwesenheit der bekannten Stimulatoren Prazosin, GF120918 und Sulfasalazin in der jeweils angegebenen Konzentration. Alle Experimente wurden mindestens zweimal in Triplikaten durchgeführt.

Optimierung der eingesetzten Proteinkonzentration

Als nächster Optimierungsschritt wurde überprüft, ob die Proteinkonzentration im Solubilisationspuffer zu Beginn einer Aufreinigung verringert werden könnte. Auf diese Weise könnten mit der Biomasse aus einem Fed-Batch Prozess bzw. einer Membranpräparation mehr Versuche durchgeführt werden. Es wäre also eine effektivere Nutzung des vorhandenen Ausgangsmaterials möglich. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden LPY11-ABCG2 Membranen in verschiedenen Ausgangskonzentrationen mit 1,5 % DDM solubilisiert. Da bisher in den Versuchen eine Konzentration von 5 mg/ml eingesetzt worden war, wurden hier 2, 3 und 4 mg/ml verwendet.

Nach Trennung von solubilisiertem und nicht-solubiliertem Material durch Ultrazentrifugation wurden nur die Proben der solubilierten Proteine auf einem Western Blot untersucht. Wie in Abbildung 4.42 zu sehen nahm die ABCG2-Menge mit steigender Ausgangsproteinkonzentration zu, das meiste ABCG2 war in der Probe für 4 mg/ml vorhanden. Das Transportprotein konnte in dieser Probe also stärker angereichert werden als bei Verwendung geringerer Ausgangsmengen an Gesamtprotein. Aus diesem Grund kann in zukünftigen Versuchen die Gesamtproteinkonzentration im Solubilisationspuffer nicht verringert werden, sondern sollte bei mindestens 4 mg/ml liegen.

Optimierung der Reinheit des aufgereinigten Proteins

Zur Verbesserung der Reinheit von mit DDM aufgereinigtem ABCG2 wurde in der Affinitätschromatographie statt dem bisher verwendeten Nickel-Harz nun Cobalt-Harz eingesetzt.

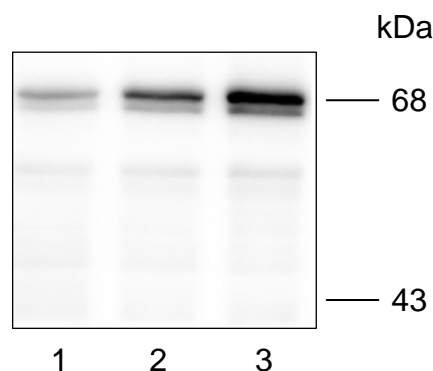


Abb. 4.42: Optimierung der Ausgangsproteinkonzentration bei der Solubilisation von ABCG2 mit 1,5 % DDM. Western Blot der Proben von solubilierten Proteinen bei den folgenden Ausgangskonzentrationen an Protein (5 μ g pro Bahn): 2 mg/ml (Bahn 1), 3 mg/ml (Bahn 2), 4 mg/ml (Bahn 3).

Diesem Harz wird in der Literatur eine sehr hohe Selektivität für mit einem His-Tag markierte Proteine zugesprochen [171]. Um dies zu untersuchen wurden Membranen von LPY11-ABCG2 nach 60minütiger Solubilisation mit 1,5 % DDM für 5 h mit Cobalt-Harz inkubiert. Die weitere Durchführung der Aufreinigung wurde nicht verändert und wie bisher wurden an verschiedenen Stellen im Prozess Proben entnommen.

Die in den Proben enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und dann entweder durch Silberfärbung oder durch Western Blot detektiert. Abbildung 4.43 stellt nur jene Ergebnisse dar, die für die Beurteilung der Affinitätschromatographie relevant sind. Mittels Densitometrie konnte festgestellt werden, dass etwa 60 % des von DDM solubilisierten ABCG2 an das Cobalt-Harz gebunden wurden. Zusätzlich wurde bei dem nachfolgenden Waschschrift sehr viel Protein entfernt. In dieser und der Probe des Eluats lag die Proteinkonzentration unterhalb der Detektionsgrenze des Amido Black Assays, so dass keine identischen Proteinmengen aufgetragen werden konnten. Da dies aber eine Voraussetzung für den densitometrischen Vergleich ist, konnte dieser hier nicht durchgeführt werden. Aussagen zum Trend der Ergebnisse können jedoch getroffen werden. Die Reinheit des Eluats wurde verbessert, aber es war nur sehr wenig ABCG2 vorhanden. Dies zeigte sich auch bei der anschließenden Rekonstitution des Proteins in Liposomen. Die Gesamtproteinkonzentration lag bei 0,03 mg/ml und somit 10fach niedriger als bei den zuvor mit Ni-NTA durchgeführten Aufreinigungen.

In der Liposomensuspension wurde eine leichte Braunfärbung beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Cobaltionen mit im Puffer enthaltenen Zusätzen reagiert haben könnten und deswegen aus dem Chelatkomplex des Harzes entfernt wurden. Durch Abnahme der Cobaltionenkonzentration im Harz würde auch die Bindungskapazität des Harzes abnehmen. So könnte die hier beobachtete herabgesetzte Bindung von ABCG2 über den His-Tag und die geringe Menge des Proteins im Eluat erklärt werden. Laut Herstellerangaben ist auch die Glycerolkonzentration im hier verwendeten Puffer an der Grenze der Kompatibilität. Als ebenfalls problematisch wird die Verwendung von Reduktionsmitteln wie β -Mercaptoethanol beschrieben, welches in den hier verwendeten Puffern enthalten war. Um dieses Problem zu umgehen, sollten bei Einsatz des Cobalt-Harzes andere Pufferlösungen gewählt werden und die Äquilibrierung in Anwesenheit von β -Mercaptoethanol erst kurz vor Verwendung stattfinden.

Für das hier aufgereinigte ABCG2 konnte mit Hilfe des ATPase Assays keine Aktivität bestimmt werden. Dies kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Sehr wahrscheinlich ist, dass die Menge an hydrolysiertem freien Phosphat aufgrund der sehr geringen Proteinkonzentration in der Liposomensuspension unter der Bestimmungsgrenze lag.

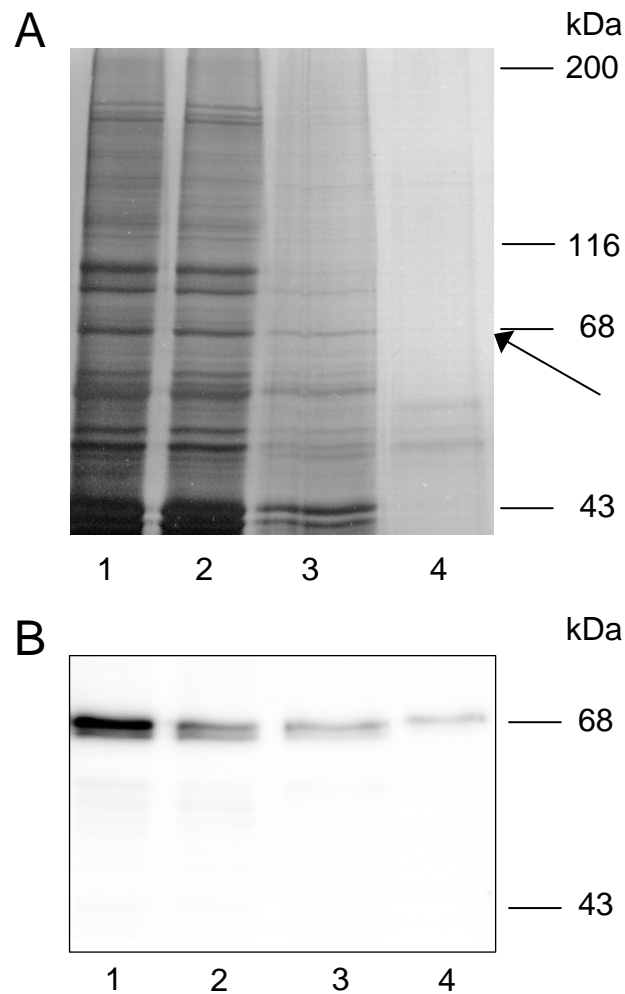


Abb. 4.43: Affinitätschromatographie mit Cobalt-Harz bei Aufreinigung von ABCG2. (A) SDS-PAGE und Silberfärbung von Proben des Affinitätschromatographieprozesses (5 μ g in Bahnen 1 & 2, 15 μ l in Bahnen 3 & 4): mit 1,5 % DDM solubilisierete Proteine (Bahn 1), nicht an Cobalt-Harz gebundene Proteine (Bahn 2), Waschschrift Cobalt-Harz (Bahn 3), von Cobalt-Harz eluiertes ABCG2 (Bahn 4); (B) Western Blot der Proben aus dem Affinitätschromatographieprozess in der gleichen Reihenfolge und Konzentration wie bei (A).

Fazit

Zur Optimierung der Aufreinigung von ABCG2 wurden zwei verschiedene Detergenzien eingesetzt, Fos-cholin 16 und Dodecylmaltosid. Fos-cholin 16 war in der Lage, ABCG2 mit guter Effizienz zu solubilisieren. Jedoch zeigte sich, dass das mit diesem Detergenz aufgereinigte Protein keine stimulierbare ATPase Aktivität aufwies. Ein möglicher Grund für die Inaktivität könnte in der „lipid-ähnlichen“ Struktur von FC-16 liegen. Da FC-16 nicht dialysierbar ist, würde es bei der Rekonstitution die Bildung einer korrekten Lipidumgebung stören. In dieser Umgebung läge ABCG2 nicht nativ vor und wäre somit inaktiv.

Dodecylmaltosid besitzt eine sehr große strukturelle Ähnlichkeit zu Octylglucosid, mit dem ABCG2 funktionell aufgereinigt werden konnte (siehe Kapitel 4.3.5) und war zudem in der Lage, das Protein zu solubilisieren. Ein großer Vorteil von DDM war, dass es selektiv die obere, aktive der beiden ABCG2-Spezies aus LPY11-ABCG2 Membranen herauslöste. Daneben wies dieses Detergenz eine erhöhte Effektivität auf, weil es im Vergleich zu OG mehr Protein aus den Zellmembranen solubilisieren konnte. Bei der Optimierung der Konzentration des Ausgangsmaterials im Solubilisationspuffer zeigte sich, dass die bisher verwendete Konzentration von 5 mg/ml beibehalten werden sollte.

Nach Solubilisierung von ABCG2 mit 1,5 % DDM wurde das Protein affinitätschromatographisch aufgereinigt. Dabei ging eine größere Menge an ABCG2 verloren, da das Harz wahrscheinlich überladen war. Deswegen sollte zukünftig mehr Nickel-Harz verwendet werden.

Insgesamt war die Reinheit des Eluats nicht optimal, sie konnte aber durch den Wechsel des Detergenzes von OG zu DDM etwas verbessert werden. Neben Nickel-basierter Affinitätschromatographie wurde ein Cobalt-Harz verwendet. Dieses Harz sollte wie bereits erwähnt laut Literatur Histidin-markierte Proteine sehr selektiv binden [171] und so zur Erhöhung der Reinheit beitragen. Es zeigte sich jedoch, dass dieses Harz nicht mit dem Puffer kompatibel war, der bisher routinemäßig für das Nickel-Harz verwendet wurde.

Beim Waschen des Harzes wurde ein Teil des gebundenen ABCG2 entfernt. Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Bindung des His-Tags an Cobalt-Harz wäre eine Verringerung der Imidazol-Konzentration im Waschpuffer. Aufgrund ihrer Imidazol-Partialstruktur würden in Proteinen einzeln vorliegende Histidine durch Imidazol aus der Bindung an Affinitätschromatographie-Harze verdrängt. Da ein His-Tag aus mehreren Histidinen besteht, ist dessen Bindung an das Harz prinzipiell stärker. Je höher jedoch die Imidazol-Konzentration im Waschpuffer, desto mehr werden auch Moleküle mit His-Tag (hier ABCG2) aus ihrer Bindung an das Harz verdrängt. Dieses Phänomen ist beim Waschen des Harzes nicht erwünscht, sondern erst bei der Elution.

Nach erfolgreicher Rekonstitution von ABCG2 in Proteoliposomen konnte sowohl für mit OG als auch mit DDM aufgereinigtes Protein eine von Prazosin stimulierte Vanadat-sensitive ATPase Aktivität festgestellt werden. In Abbildung 4.44 wird der Stimulationsfaktor der ABCG2-Chargen verglichen, die mit den drei Detergenzien OG, FC-16 und DDM aufgereinigt wurden. Ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test zeigte, dass die Faktoren für die Aktivierbarkeit von mit OG und mit DDM solubiliertem Protein gleich waren. Dagegen waren beide Stimulationswerte signifikant verschieden von der basalen Aktivität.

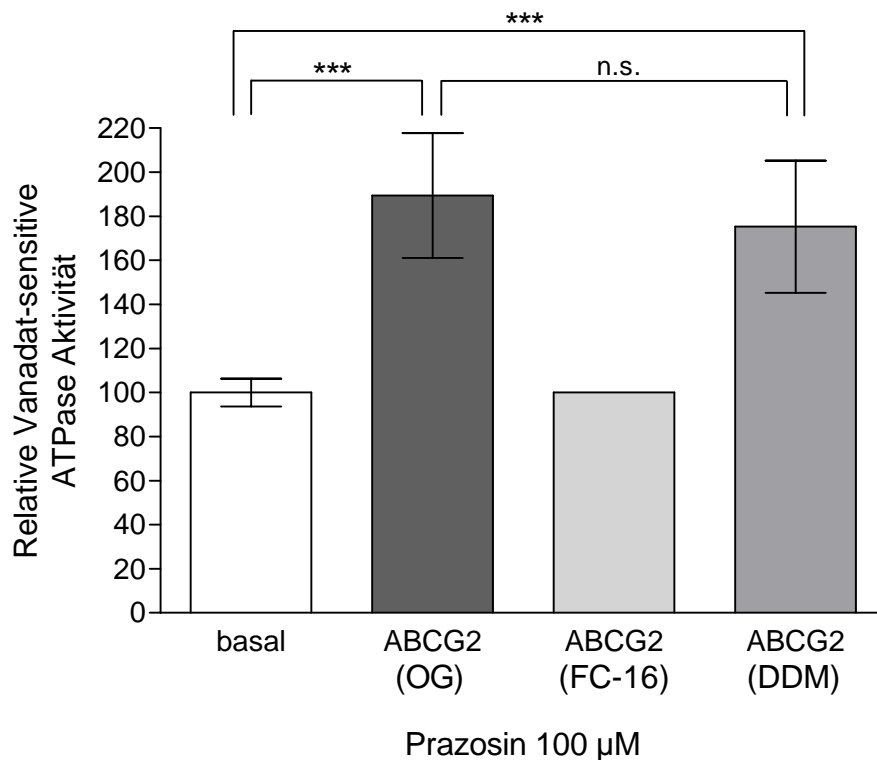


Abb. 4.44: Vergleich der relativen Vanadat-sensitiven ATPase Aktivität von mit 2 % OG, 2 % FC-16 bzw. 1,5 % DDM aufgereinigtem ABCG2 (n.s. = nicht signifikant). Alle Experimente wurden mindestens zweimal in Triplikaten durchgeführt.

4.3.8 Gewinnung von ABCG2 aus *S. cerevisiae* – Fazit

Zusammenfassend geht aus den in diesem Kapitel dargestellten Ergebnissen hervor, dass ABCG2 im *S. cerevisiae* Stamm LPY11-ABCG2 funktionell exprimiert wurde. Aus der Zellmembran dieses Hefestammes konnte das Protein mit Hilfe von 2 % Octylglucosid oder 1,5 % Dodecylmaltosid in seiner nativen und aktiven Konformation solubilisiert werden.

Zur weiteren Aufreinigung wurden zwei verschiedene Affinitätschromatographie-Harze verwendet. Dabei zeigte Nickel-Harz eine gute Bindung für Histidin-markiertes ABCG2, jedoch auch für andere Proteine. Cobalt-Harz war zwar im Gegensatz zu Ni-NTA relativ empfindlich gegenüber Pufferzusätzen wie Glycerol oder β -Mercaptoethanol, es konnte ABCG2 aber selektiver binden. Die Optimierungsvorschläge für die Pufferlösungen in der Affinitätschromatographie können der Diskussion in den einzelnen Unterkapiteln entnommen werden.

Die Rekonstitution des Proteins nach Aufreinigung verlief stets erfolgreich, die gewählte Lipidumgebung war also dazu geeignet, ABCG2 in seiner funktionellen Konformation aufzunehmen und auch in dieser zu stabilisieren.

Insgesamt gibt es verschiedene Vor- und Nachteile der Verwendung von *S. cerevisiae* als Expressionssystem des ABC-Transporters ABCG2. Vorteilhaft ist die hohe Teilungsrate der Zellen, durch die in kurzer Zeit große Mengen an Biomasse hergestellt werden können. Daneben ist die Kultivierung dieser großen Menge an Zellen relativ preisgünstig, da die Lösungen für das Kulturmedium selbst zusammengestellt werden können. Diese große Menge an Biomasse wurde für die Versuche benötigt, da der hier neu etablierte Hefestamm nur eine sehr geringe Expression des gewünschten Proteins aufwies. Ebenfalls von Nachteil ist, dass Hefen in ihrer Zellmembran endogene ATPasen exprimieren. Daher konnte die Aktivität von ABCG2 nicht bereits in den isolierten Membranen, sondern erst nach Solubilisierung, Aufreinigung und Rekonstitution des Proteins überprüft werden.

Prinzipiell stellte sich also die Frage, ob ABCG2 auch aus einem anderen Expressionssystem mit höherer Expressionsrate aufgereinigt werden könnte. Bisher wurden nur drei andere Studien zur Aufreinigung dieses Proteins veröffentlicht. In einem Fall wurde die Hefe *Pichia pastoris* [82], in den beiden anderen Fällen die Insektenzelllinie High Five (Hi5) verwendet [64, 119]. Vorteile des Insektenzellsystems sind vor allem die hohe Expressionsrate und eine geringere Menge an endogenen ATPasen in der Zellmembran. So könnte die Aktivität des exprimierten Proteins schon auf der Stufe der Membranpräparation überprüft werden. Daneben würde weniger Biomasse zur Aufreinigung der gleichen Menge an ABCG2 benötigt. Ergebnisse zur Expression von ABCG2 in Insektenzellen werden in den folgenden Kapiteln dargestellt.

4.4 ABCG2 aus Insektenzellen

4.4.1 Insektenzellen als Expressionssystem für ABCG2

Für die Expression von ABCG2 standen zu Beginn der Arbeiten die beiden Insektenzelllinien Sf9 und High Five (Hi5) zur Auswahl. Sowohl Sf9 als auch Hi5 Zellen wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen zur ABCG2-Expression mit Hilfe des Baculovirus Expressionssystems verwendet [64, 67, 71, 114–119]. Eine erfolgreiche Aufreinigung wurde jedoch bisher nur aus der Zelllinie Hi5 berichtet [64, 119, 120]. Der große Vorteil dieses Systems ist die hohe Expressionsrate des Zielproteins. Zudem sind in der Zellmembran dieser Zellen weniger endogene ATPasen vorhanden, so dass die Aktivität des exprimierten ABC-Transporters bereits in der Membranpräparation nachgewiesen werden kann. Weitere Vor- und Nachteile werden in der Einleitung in Kapitel 1.5 dargestellt.

In dieser Arbeit wurde ein Baculovirus (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcMNPV) verwendet, dessen DNA bereits das ABCG2-Gen (R482 = Wildtyp) enthielt. Mit diesem Virus konnten beide Insektenzelllinien ohne weitere Vorarbeiten infiziert werden. Vor das ABCG2-Gen war N-terminal ein His-Tag aus zehn Histidinen angefügt worden, genauso wie im Plasmid zur Transformation von *S. cerevisiae*. Die Vorteile der Markierung des Gens am N-Terminus, also an der ATP-Bindungsstelle, wurden ausführlich in Kapitel 4.3.1 besprochen.

4.4.2 Membranpräparation von Insektenzellen

Prinzipiell sind die beiden Zelllinien Sf9 und Hi5 zur Expression von ABCG2 geeignet. Um die korrekte Expression des Proteins in diesen Zellen zu etablieren und eventuelle Unterschiede in der Proteinexpressionsrate zu überprüfen, wurden beide Zelllinien mit dem in den Kapiteln 3.3.1 und 4.4.1 beschriebenen Virus infiziert und nach ca. 72 h geerntet. Sowohl die Virusmenge als auch die Infektionszeit wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit optimiert, Ergebnisse dazu werden in Kapitel 4.4.4 vorgestellt. Zu einem ersten Vergleich der ABCG2-Expression reichte es jedoch aus, eine identische Zellzahl beider Zelllinien mit der gleichen Virusmenge über den gleichen Zeitraum zu inkubieren. Die allgemeine Durchführung einer Infektion von Insektenzellen zur Proteinexpression ist ausführlich in Kapitel 3.3.3 beschrieben.

Nach Ernte der infizierten Insektenzellen wurden diese jeweils mit einem Dounce Hand-Homogenisator aufgeschlossen und die Zellmembranfraktion mittels Ultrazentrifugation iso-

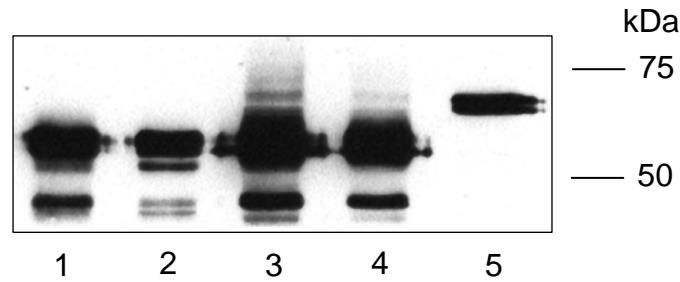


Abb. 4.45: Vergleich der Expressionslevel von ABCG2 in Sf9 und Hi5 Insektenzellen. Mittels Western Blot wurde eine Membranpräparation von mittels Baculovirus infizierten Zellen auf die Expression des Proteins untersucht: Sf9 Membranpräparation 1 (2 µg, Bahn 1), Sf9 Membranpräparation 2 (2 µg, Bahn 2), Hi5 Membranpräparation (2 µg in Bahn 3, 1 µg in Bahn 4), LPY11-ABCG2 Membranpräparation (2 µg, Bahn 5).

liert (siehe Kapitel 3.3.4). Die Gesamtproteinkonzentration wurde im Amido Black Assay bestimmt, danach wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression von ABCG2 mit Hilfe eines Western Blots überprüft. Zum Vergleich mit der Expression von ABCG2 in LPY11-ABCG2 wurde zusätzlich eine Probe einer entsprechenden Membranpräparation in den Versuch mit eingeschlossen.

Abbildung 4.45 zeigt, dass in allen untersuchten Membranpräparationen ABCG2 enthalten ist. Beide Sf9 Membranproben (Bahnen 1 & 2) enthalten weniger Zielprotein als die Probe der Hi5 Zellen, für welche die gleiche Gesamtproteinmenge aufgetragen worden war (Bahn 3). Dieses Ergebnis wird durch einen Bericht in der Literatur unterstützt, dass Hi5 Zellen eine höhere Expressionsrate als Sf9 Zellen aufweisen [119].

Daneben wurde die Expression in den Insektenzellen mit der in LPY11-ABCG2 (Bahn 5) verglichen. Die Vermutung, dass Hefemembranen eine deutlich geringere Expression als Sf9 oder Hi5 Zellen aufweisen, konnte anhand dieses Western Blots belegt werden. Für ABCG2 aus Insekten- und aus Hefezellen zeigt sich ein Unterschied im Molekulargewicht. Der Grund für diesen Unterschied liegt wahrscheinlich im verschiedenen Glykosylierungsmuster des Proteins bei Expression in den beiden Systemen. Das Transportprotein liegt natürlicherweise in humanen Zellen hauptsächlich N-glykosyliert vor. Hefen können weniger posttranslationale N-Glykosylierungen durchführen als humane Zellen. Daher ist das dort exprimierte Protein unterglykosyliert und weist deswegen ein geringeres Molekulargewicht auf (siehe Kapitel 4.3.1). In Insektenzellen finden noch weniger N-Zuckerverknüpfungen statt, daraus resultiert wahrscheinlich das hier beobachtete wiederum geringere Molekulargewicht von ABCG2 bei Expression in diesem System. Laut Literatur ist der Glykosylierungsstatus von ABCG2 jedoch nicht essentiell für dessen Funktionsfähigkeit, somit kann das hier gewonnene Protein für weitere Versuche verwendet werden [65–67].

Wie in *S. cerevisiae* wurde ABCG2 auch in beiden Insektenzelllinien als zwei Spezies mit einem leicht unterschiedlichen Molekulargewicht exprimiert. Diese Beobachtung ist bereits für die Expression des Proteins sowohl in Sf9 als auch in Hi5 Zellen literaturbeschrieben [119, 120]. Es soll sich bei der oberen Spezies um reifes und funktionelles Protein und bei der unteren Spezies um ein inaktives Faltungsintermediat handeln. Auf dem Western Blot wurden zusätzlich auch noch Banden vom Antikörper BXP-21 markiert, die kleiner als 50 kDa waren. Hierbei könnte es sich um nicht vollständig synthetisiertes ABCG2 handeln. Dieses Phänomen kann möglicherweise durch die stark forcierte Proteinexpression in Insektenzellen hervorgerufen werden. Neben korrekt exprimiertem Protein würden in geringer Konzentration inaktive Nebenprodukte entstehen.

Fazit

ABCG2 wurde in den Insektenzelllinien Sf9 und Hi5 erfolgreich exprimiert und in einer Membranpräparation angereichert. Das Protein wird als zwei Spezies mit geringem Molekulargewichtsunterschied exprimiert, wie es auch bereits bei der Expression in Hefen im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurde. Im Vergleich zeigte sich, dass ABCG2 weniger N-glykosyliert ist als in *S. cerevisiae* exprimiertes Protein. Aufgrund der höheren Expressionsrate erscheint die Zelllinie Hi5 für weitere Studien besser geeignet. Als nächstes stellte sich jedoch die Frage, ob das hier exprimierte ABCG2 in einer aktiven Konformation vorlag und ob es Unterschiede in der Aktivität zwischen dem in den beiden Insektenzelllinien exprimierten Transportprotein gab.

4.4.3 Aktivitätsbestimmung von ABCG2 in verschiedenen Insektenzellmembranen

Um die Funktionalität des in Sf9 bzw. Hi5 Zellen exprimierten ABCG2 zu untersuchen und Unterschiede in der Aktivität auszuschließen, wurde der in Kapitel 3.3.5 beschriebene ATPase Assay verwendet. Hier wurde im Vergleich zum bei der Aktivitätsbestimmung von aufgereinigtem ABCG2 eingesetzten ATPase Assay (Kapitel 3.2.15) nur die Phosphatliberation nach 20 min bestimmt. Daneben wurden andere Konzentrationen sowohl von Prazosin zur Stimulation als auch von Vanadat zur Inhibition eingesetzt. Zur Quantifizierung des freien Phosphats (P_i) in den Proben wurde desweiteren eine andere Detektionsmethode angewendet. Diese Veränderungen ergaben sich daraus, dass der in diesem Kapitel verwendete Assay im Labor von Dr. Christine Hrycyna (Purdue University, Indiana, USA) erlernt und

durchgeführt wurde. Diese Methode wurde dort standardmäßig für Aktivitätsbestimmungen eingesetzt und ist ebenfalls in der Literatur beschrieben [172].

Die Aktivität von ABCG2 in Membranpräparationen infizierter Zellen beider Zelllinien wurden mittels des oben beschriebenen ATPase Assays in Ab- (basal) und Anwesenheit von 40 μM Prazosin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.46 zusammengefasst. Für ABCG2 in Sf9 Membranen betrug die basale Vanadat-sensitive Aktivität $25,5 \pm 0,8$ nmol $\text{P}_i/\text{mg}/\text{min}$, für ABCG2 in Hi5 Membranen $20,9 \pm 2,7$ nmol $\text{P}_i/\text{mg}/\text{min}$. Beide Werte liegen im gleichen Bereich. Die Stimulierbarkeit der ATPase Aktivität war für das Protein in Hi5 Membranen (2,8fach) etwas besser als in Sf9 Membranen (2,3fach).

Insgesamt sind die hier beschriebenen Werte für die basale Aktivität von ABCG2 in Hi5 Membranen viel geringer als für das aus Hefemembranen aufgereinigte Protein. Ein möglicher Grund dafür wäre, dass es aufgrund der Expression von ABCG2 in den beiden Spezies Hefe und Insektenzellen Unterschiede in der Aktivität gibt. Dies ist für ABCB1 bereits literatur-beschrieben [121]. Im Fall von ABCG2 ist die Anwesenheit von Cholesterol ein wichtiger Faktor für die Aktivität des Proteins [116, 123]. In den Insektenzellen liegt laut der genannten Literatur jedoch nur eine sehr geringe Konzentration von Cholesterol vor. Das aus den Hefemembranen isolierte Protein ist dagegen in eine Cholesterol-haltige Lipidumgebung rekonstituiert worden. Dies würde die hier bestimmten Unterschiede im Level der basalen Aktivität von ABCG2 erklären. Außerdem liegt das aus Hefemembranen aufgereinigte Protein in Liposomen definierter Zusammensetzung vor. Im Gegensatz dazu befindet sich ABCG2 aus den Insektenzellmembranen in einer Umgebung aus sehr unterschiedlichen Lipiden und anderen Proteinen, wodurch die Aktivität von ABCG2 möglicherweise beeinträchtigt wird.

Fazit

ABCG2 lag nach Expression in beiden Zelllinien in der Membranpräparation funktionell vor. Jedoch war das Protein in Hi5 Membranen etwas besser stimulierbar. Deswegen und aufgrund der höheren Expressionsrate wurde diese Zelllinie für die weiteren Experimente ausgewählt. An dieser Stelle zeigt sich der besondere Vorteil der Verwendung von Insektenzellen als Expressionssystem für ABCG2, da die Aktivität des Proteins vor Beginn der Aufreinigungsprozedur überprüft werden kann. Auf diese Weise kann bereits an diesem Punkt des Prozesses über die weitere Vorgehensweise entschieden und somit gegebenenfalls Kosten einer Aufreinigung von inaktivem Protein vermieden werden.

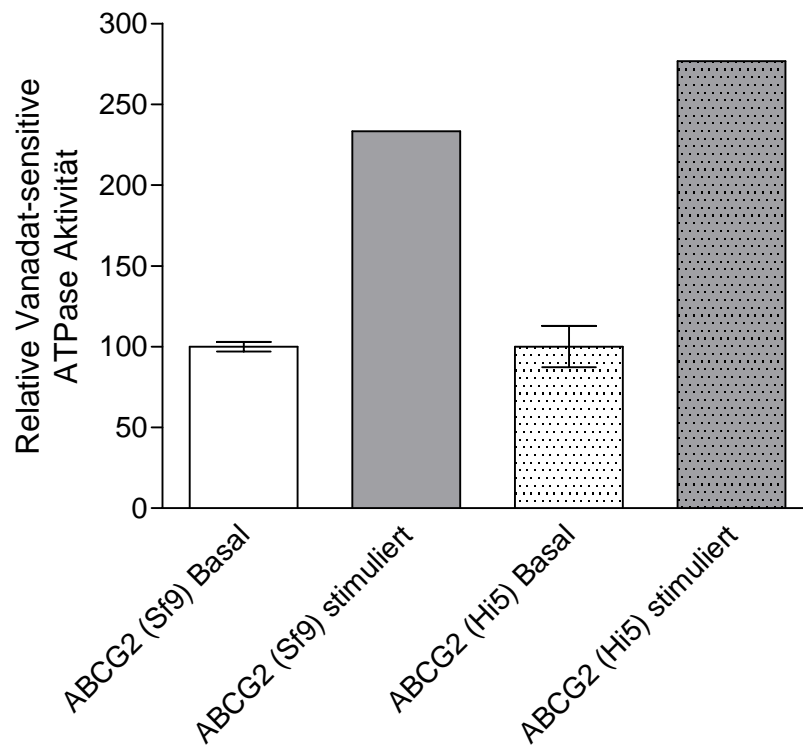


Abb. 4.46: Vergleich der Aktivierbarkeit von ABCG2 in Membranen von Sf9 bzw. Hi5 Zellen. Relative Vanadat-sensitive ATPase Aktivität in Abwesenheit (Basal, farblos) und Gegenwart von 40 μ M Prazosin (Stimuliert, grau) für Sf9 (ohne Muster) und Hi5 Zellen (gepunktet). Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

4.4.4 Optimierung der Proteinexpression

Da der Titer der hier verwendeten Viruslösung unbekannt war, wurden die optimalen Bedingungen für die Proteinexpression in Hi5 Zellen empirisch ermittelt. Es gibt zwei verschiedene Parameter, die die Expression von Proteinen in Insektenzellen beeinflussen können. Zum einen ist die bei der Infektion eingesetzte Virusmenge entscheidend, zum anderen die Inkubationszeit der Zellen in Anwesenheit des Baculovirus. Die Versuche wurden prinzipiell wie in Kapitel 3.3.3, jedoch statt in Gewebekulturschalen in 6-Well-Platten mit 10^6 Zellen pro Well durchgeführt.

Zuerst wurde das für die Proteinexpression der Hi5 Zellen optimale Volumen der Viruslösung ermittelt. Dazu wurden verschiedene Volumina der Lösung (0, 50, 100, 150, 200 und 300 μ l) zu der oben genannten Anzahl an Zellen gegeben. Nach 62 h wurden die infizierten Zellen geerntet und jeweils eine Membranpräparation angefertigt. Mittels Amido Black Assay wurde die Gesamtproteinkonzentration aller Ansätze bestimmt, die Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend ein Western Blot durchgeführt.

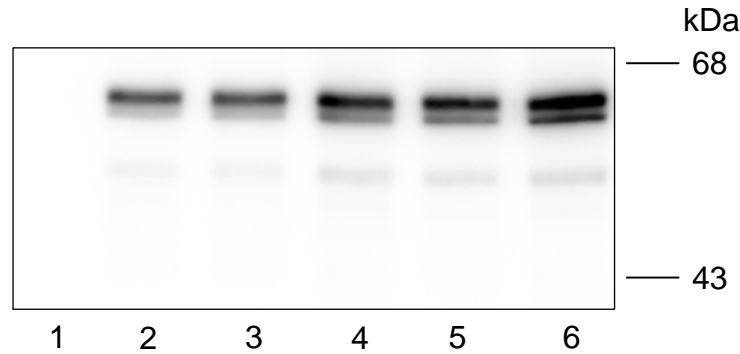


Abb. 4.47: Optimierung des zur Proteinexpression von Hi5 Zellen benötigten Volumens der Viruslösung. Mittels Western Blot wurden Membranpräparationen von mit den folgenden Viruslösungsvolumina infizierten Zellen auf die Expression des Proteins untersucht (5 µg pro Bahn): ohne Virus (Bahn 1), 50 µl (Bahn 2), 100 µl (Bahn 3), 150 µl (Bahn 4), 200 µl (Bahn 5), 300 µl (Bahn 6).

In Abbildung 4.47 ist das Ergebnis zu sehen, welches deutlich macht, dass das größte Volumen an Viruslösung (300 µl, Bahn 6) zur höchsten Expression von ABCG2 führte. Würde zu wenig Virus eingesetzt, würden nicht alle Zellen infiziert werden und die in der Membranpräparation resultierende ABCG2-Konzentration wäre gering.

Jedoch ist auch die Verwendung von zu vielen Viren pro Zelle ungünstig, da auf diese Weise sehr viel Viruslösung verbraucht werden würde. Durch die Gegenwart sehr vieler Viren würde die Proteinexpression insgesamt sehr stark angeregt werden und es käme verstärkt zur Bildung von nicht vollständigem und aus diesem Grund nicht aktivem ABCG2, wie es in Kapitel 4.4.2 beschrieben wurde. In der Abbildung zeigt sich zwar eine dünne Bande unterhalb der Banden von ABCG2, jedoch ist diese nur sehr schwach ausgeprägt. Also wurde bei Verwendung von 300 µl Viruslösung kaum unvollständiges Protein produziert.

Ein weiterer Nachteil des Einsatzes von sehr viel Viruslösung wird deutlich, wenn man die Bildung der unteren der beiden ABCG2-Spezies betrachtet (vor allem Bahnen 5 & 6). Diese Spezies war in der Probe von 300 µl überproportional stärker vertreten als bei Verwendung von 200 µl Viruslösung. Um eine weitere Bildung dieser inaktiven Spezies zu verhindern, sollte in zukünftigen Versuchen nicht mehr als 300 µl Viruslösung eingesetzt werden. Aus den genannten Gründen wurde dieses Volumen an Viruslösung zur Bestimmung der optimalen Inkubationszeit für die Proteinexpression verwendet.

Zur Optimierung der Inkubationszeit wurden 10^6 Zellen pro Well eingesetzt und je ein Well nach 24, 48, 72, 96 und 120 h geerntet. Alle Ansätze wurden nach Membranpräparation und Proteinbestimmung mittels Western Blot untersucht, dieser ist in Abbildung 4.48 dargestellt.

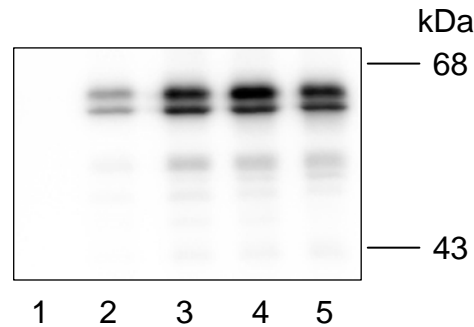


Abb. 4.48: Ermittlung der Inkubationszeit zur optimalen Proteinexpression von Hi5 Zellen. Western Blot von Membranpräparationen von mit 300 μ l Viruslösung infizierten Zellen, die zu folgenden Zeitpunkten geerntet wurden (5 μ g pro Bahn): 24 h (Bahn 1), 48 h (Bahn 2), 72 h (Bahn 3), 96 h (Bahn 4), 120 h (Bahn 5).

Nach 24 h (Bahn 1) war noch kein ABCG2 gebildet worden. Es zeigte sich weiter, dass die Proteinexpression nach 48 h (Bahn 2) sehr gering, jedoch nach 72 h (Bahn 3) deutlich angestiegen war. Zwischen 72 und 96 h (Bahn 4) kam es noch einmal zu einer Zunahme, während die Expression nach 120 h (Bahn 5) wieder etwas zurückgegangen war.

Prinzipiell sollten die Zellen den Viren also nicht zu lange ausgesetzt werden. Da es nach vollständiger Infektion der Zellen durch das hier verwendete Baculovirus zur Zellyse kommt, würde das exprimierte Protein in das die Zellen umgebende Nährmedium gelangen und dabei möglicherweise degradiert werden. Aus diesem Überstand könnte es nicht mehr in seiner nativen Konformation isoliert werden und wäre für weitere Versuche verloren. Zusätzlich wäre die Konzentration von ABCG2 in den Zellmembranen, die aus noch intakten Zellen isoliert würden, dadurch geringer. Dies konnte auch in dem hier dargestellten Versuch beobachtet werden (Bahn 5).

Fazit

Die optimierten Parameter für die Proteinexpression von ABCG2 in Hi5 Zellen waren folglich ein Viruslösungsvolumen von 300 μ l pro 10^6 Zellen bei einer Inkubationsdauer von maximal 96 h. Das genannte Volumen konnte dann auf die für die verschiedenen Gewebekulturschalen benötigten Zellzahlen umgerechnet werden.

Die mit der hier beschriebenen Methode gewonnen Membranen wiesen einen hohen ABCG2-Gehalt auf, der den von LPY11-ABCG2 bei weitem überstieg (siehe Abbildung 4.45). Aus diesem Grund waren diese Membranen sehr gut als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung von ABCG2 geeignet.

4.4.5 Detergenzscreening für ABCG2 in Insektenzellmembranen

Werden Membranen unterschiedlicher Spezies betrachtet, können durch die unterschiedlichen Membraneigenschaften jeweils andere Detergenzien zu optimalen Ergebnissen bei der Proteinaufreinigung führen. Es konnte also nicht vorausgesetzt werden, dass das für die Hefemembranen als optimal ermittelte Detergenz DDM auch für die Solubilisation von ABCG2 aus Insektenzellmembranen geeignet sein würde. Aus diesem Grund wurden verschiedene Detergenzien auf ihre Fähigkeit zur Solubilisation von ABCG2 aus Insektenzellmembranen hin untersucht.

Solubilisation von ABCG2 aus Hi5 Membranen

Da die Hi5 Membranen eine höhere Expression von ABCG2 aufwiesen als solche von Sf9 Zellen, wurde mit diesen ein Screening von sechs verschiedenen Detergenzien durchgeführt, die aus den bei der Solubilisation von ABCG2 aus Hefemembranen verwendeten Verbindungen ausgewählt worden waren. Aus den beiden Gruppen der nicht-ionischen (Brij 35, DDM, OG und Cymal 7) und der zwitterionischen Detergenzien (CHAPS, FC-16) waren Substanzen vertreten.

Für jedes Detergenz wurde ein Ansatz von 1 ml, der Hi5 Membranen in einer Gesamtproteinkonzentration von 2 mg/ml enthielt, mit 1 % der oben genannten Verbindungen versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurden die Ansätze ultrazentrifugiert, um solubilierte von nicht-solubilierten Proteinen zu trennen. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 3.3.6 dargestellt.

Die auf diese Weise erhaltenen Proben wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht (siehe Abbildung 4.49). Bis auf Cymal 7, welches das Protein nur in geringem Umfang aus der Zellmembran herauslösen konnte, waren alle verwendeten Detergenzien zur Solubilisation von ABCG2 in der Lage. Aus der Gruppe der nicht-ionischen Detergenzien zeigte Brij 35 die höchste Effektivität (Bahn 1).

Sowohl CHAPS als auch FC-16, die beiden Vertreter der zwitterionischen Gruppe, solubilierten ABCG2, jedoch zeigten sich dabei einige Unterschiede. FC-16 wies im Vergleich zu CHAPS nur eine sehr geringe Solubilitätsfähigkeit auf. Des Weiteren war CHAPS in der Lage, die obere der beiden Proteinspezies nahezu selektiv zu solubilisieren, dagegen wurden durch FC-16 beide Spezies in gleicher Menge aus den Hi5 Membranen herausgelöst. Brij 35 und CHAPS besaßen eine vergleichbare Effektivität, ersteres zeigte jedoch eine etwas geringere Selektivität für die aktive, obere Spezies.

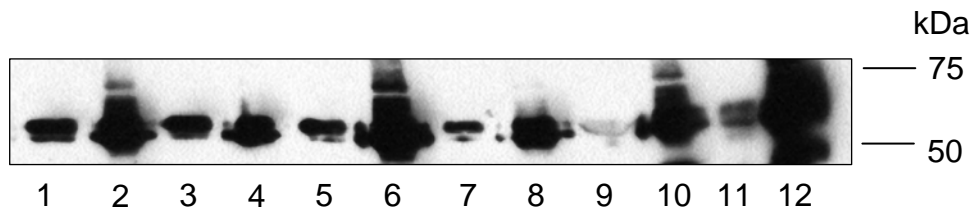


Abb. 4.49: Solubilisierungsscreening für ABCG2 aus Hi5 Membranen. Proben von durch 1 % der angegebenen Detergenzien solubilierten („S“) und nicht-solubilierten („P“) Proteinen wurden mittels Western Blot untersucht (4 µg pro Bahn): Brij 35 S & P (Bahnen 1 & 2), CHAPS S & P (Bahnen 3 & 4), DDM S & P (Bahnen 5 & 6), OG S & P (Bahnen 7 & 8), Cymal 7 S & P (Bahnen 9 & 10), Fos-cholin 16 S & P (Bahnen 11 & 12).

Solubilisation von ABCG2 aus Sf9 Membranen

Um die Erkenntnisse zu bestätigen, die zuvor für die Hi5 Membranen gewonnen werden konnten, wurden auch Sf9 Membranen mit den beiden Detergenzien CHAPS und FC-16 behandelt. Die Untersuchung dieser beiden Verbindungen war besonders interessant, weil sie in der Literatur bereits zur Solubilisation und Aufreinigung von ABCG2 verwendet worden waren [64, 119, 120].

Da diese Membranen eine etwas geringere ABCG2-Expression aufwiesen (siehe Kapitel 4.4.2), wurde in den Ansätzen von 1 ml eine erhöhte Gesamteprotein-Konzentration von 2,5 mg/ml eingesetzt. Die weiteren Parameter wurden genauso gewählt, wie es zuvor für Hi5 Membranen beschrieben wurde. In Abbildung 4.50 sind die Ergebnisse des Western Blots dargestellt. Es zeigte sich, dass ABCG2 auch aus Sf9 Membranen von beiden Detergenzien herausgelöst werden konnte. Hier war der Unterschied in der Solubilisierungseffektivität genauso deutlich zu sehen, wie bei Verwendung der Hi5 Membranen (Abbildung 4.49). Anhand des Blots kann allerdings keine finale Aussage bezüglich der Selektivität von CHAPS für eine bestimmte Spezies getroffen werden, da nicht eindeutig zu erkennen ist, welche der beiden Spezies hier vorwiegend solubilisiert wurde.

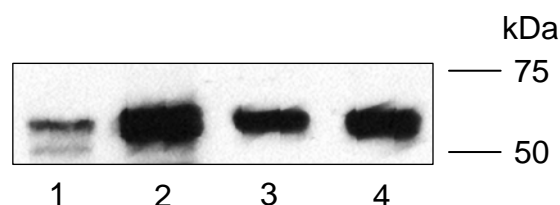


Abb. 4.50: Solubilisation von ABCG2 aus Sf9 Membranen. Proben von durch 1 % der angegebenen Detergenzien solubilierten („S“) und nicht-solubilierten („P“) Proteinen wurden mittels Western Blot untersucht (2 µg pro Bahn): FC-16 S & P (Bahnen 1 & 2), CHAPS S & P (Bahnen 3 & 4).

Fazit

Für das Detergenzscreening der Insektenzellmembranen konnte erfolgreich eine geringere Gesamtproteinkonzentration eingesetzt werden, als bei der Solubilisierung von Hefemembranen. Insgesamt können diese Membranen also effektiver genutzt werden, da die ABCG2-Konzentration hier höher ist als in Hefemembranen. Dadurch wird zum Beispiel weniger Ausgangsmaterial für eine Aufreinigung benötigt. An dieser Stelle zeigte sich somit erneut ein Vorteil der Verwendung von Insektenzellmembranen gegenüber Membranen von *S. cerevisiae* für die Expression von ABCG2.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass das Detergenz CHAPS in der Lage war, ABCG2 sowohl aus Hi5 als auch aus Sf9 Membranen mit guter Effektivität herauszulösen. Bei Verwendung der Hi5 Membranen konnte CHAPS zudem selektiv die obere Spezies des Proteins solubilisieren. Fos-cholin 16 konnte das Protein zwar ebenfalls lösen, jedoch im Fall der Hi5 Membranen beide Spezies in gleichem Maß und mit insgesamt geringerer Effektivität.

In der Literatur wurde für die beiden Detergenzien Fos-cholin 16 und CHAPS eine sehr gute Solubilisierung von ABCG2 aus Hi5 Membranen beschrieben [64, 119, 120]. Jedoch wurden in den Studien widersprüchliche Ergebnisse erzielt. Auf der einen Seite zeigten McDevitt *et al.* bei der Verwendung von 2 % FC-16 eine sehr effektive Solubilisierung, wohingegen CHAPS nicht in der Lage war, das Protein zu lösen [64]. Auf der anderen Seite erzielten Pozza und Mitarbeiter mit 1,1 % CHAPS sehr gute Ergebnisse [119].

In einer weiteren Veröffentlichung der zuletzt genannten Arbeitsgruppe wurden die beiden Detergenzien genauer untersucht [120]. Für beide wurde prinzipiell eine Solubilisierung von ABCG2 gezeigt, CHAPS wies jedoch im Gegensatz zu FC-16 bei allen eingesetzten Konzentrationen eine Selektivität für die obere Proteinspezies auf. Ein Vergleich der Effektivität wurde in dieser Veröffentlichung nicht durchgeführt. Neben CHAPS und FC-16 wurde zusätzlich eine Solubilisierung des Proteins durch DDM beschrieben. Dagegen wurde durch McDevitt *et al.* weder für DDM noch für OG eine Solubilisierung gezeigt [64].

Zusammengefasst unterstützen die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Pozza, da eine erfolgreiche Solubilisierung von ABCG2 durch CHAPS nachgewiesen wurde. Daneben stimmten auch die Ergebnisse zur Solubilisierung des Proteins durch die Detergenzien FC-16, DDM und OG mit der genannten Literatur überein.

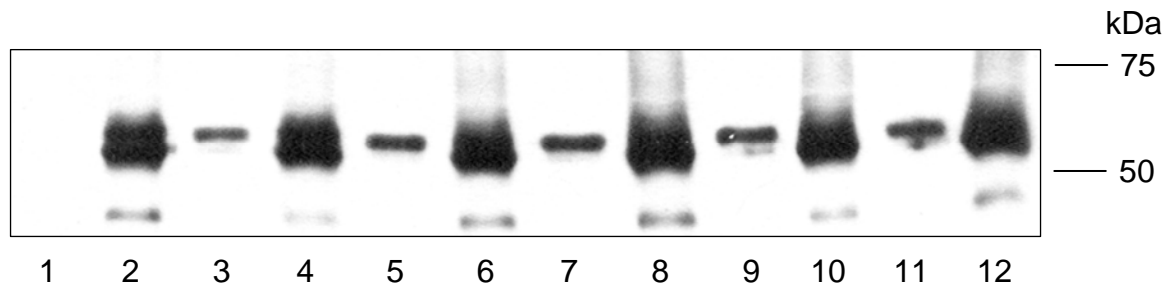


Abb. 4.51: Solubilisation von ABCG2 aus Hi5 Membranen mit verschiedenen Konzentrationen von CHAPS. Western Blot der Proben von solubilisierten („S“) und nicht-solubilisierten („P“) Proteinen mit den folgenden CHAPS-Konzentrationen (4 μg pro Bahn): 0 % S & P (Bahnen 1 & 2), 0,5 % S & P (Bahnen 3 & 4), 1,0 % S & P (Bahnen 5 & 6), 1,5 % S & P (Bahnen 7 & 8), 2,0 % S & P (Bahnen 9 & 10), 2,5 % S & P (Bahnen 11 & 12).

4.4.6 Aufreinigung von ABCG2

Um die minimal nötige Konzentration von CHAPS für die maximal mögliche Solubilisation von ABCG2 aus Hi5 Membranen zu bestimmen, wurden die gleichen Versuchsbedingungen wie für das Detergenzscreening gewählt, aber dabei CHAPS-Konzentrationen zwischen 0 und 2,5 % verwendet. Mittels Western Blot wurden die auf diese Weise gewonnenen Proben untersucht, dieser ist in Abbildung 4.51 dargestellt. Da sich die Menge an solubiliertem Protein mit 1,5 % CHAPS (Bahn 7) gegenüber 1 % nicht weiter steigern ließ, wurde die Detergenz-Konzentration von 1 % für die weiteren Versuche ausgewählt.

Aufreinigung mit CHAPS

Zur Aufreinigung von ABCG2 mit 1 % CHAPS aus Hi5 Membranen wurde die Methode von Anderson und Mitarbeitern angewandt, bei welcher Cobalt-Harz für die Affinitätschromatographie verwendet wird (siehe Kapitel 3.3.7) [141]. Statt des in dieser Veröffentlichung eingesetzten Lysispuffers wurde jedoch als Grundlage aller Puffer der Solubilisationspuffer von Pozza *et al.* verwendet [119]. Dieser Solubilisationspuffer war bereits in der zitierten Veröffentlichung im Zusammenhang mit Hi5 Membranen, dem Detergenz CHAPS, Nickel-Harz und dem aufzureinigenden Protein ABCG2 erprobt worden. In der vorliegenden Arbeit enthielt der Puffer jedoch statt 5 mM nur 1 mM DTT, da das verwendete Cobalt-Harz laut Hersteller durch höhere DTT-Konzentrationen inaktiviert wird.

7,5 mg einer Membranpräparation von ABCG2 exprimierenden Hi5 Zellen wurden für die Aufreinigung eingesetzt und an mehreren Stellen im Prozess Proben entnommen. Abbildung 4.52 veranschaulicht das Ergebnis der Untersuchung dieser Proben mittels SDS-PAGE

und Silberfärbung bzw. Western Blot. Es zeigte sich, dass das eingesetzte ABCG2 vollständig an das Cobalt-Harz gebunden wurde (Bahnen 4 & 6). Jedoch wurde durch den Waschpuffer wieder eine geringe Menge an Zielprotein herausgelöst (Bahnen 5 & 7). Dies könnte anhand der im Vergleich zum Solubilisationspuffer von 10 mM auf 40 mM erhöhten Imidazol-Konzentration erklärt werden.

Betrachtet man die Bahnen 5 und 7 in der Silberfärbung, so wird deutlich, dass zusätzlich zu der geringen Menge an ABCG2 eine große Anzahl anderer Proteine aus dem Harz herausgewaschen wurde. Der Einsatz von 40 mM Imidazol sollte also beibehalten werden, da hierdurch unspezifisch gebundene Proteine vom aufzureinigenden Protein abgetrennt werden können und sich dadurch die Reinheit des Eluats erhöht. Im Unterschied zur Aufreinigung von ABCG2 aus Hefemembranen wurde das Eluat hier durch Ultrafiltration aufkonzentriert und wies danach eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml auf. Die Silberfärbung des Eluats (Bahn 8) belegt, dass das Protein hier fast vollständig rein vorlag.

Fazit

Mit Hilfe des Detergenzes CHAPS in einer Konzentration von 1 % konnte ABCG2 erfolgreich aus Hi5 Membranen aufgereinigt werden. Das Eluat enthielt hauptsächlich das Zielprotein und nur sehr wenige Verunreinigungen. Da das Volumen und auch die Proteinkonzentration des Eluats zu gering für weitere Untersuchungen waren, sollte dieser Versuch mit einer größeren Menge an Ausgangsmaterial wiederholt werden. Um das eluierte Protein mittels Dialyse rekonstituieren zu können, müssten den in der Affinitätschromatographie verwendeten Puffern Lipide zugesetzt werden. Nur rekonstituiertes ABCG2 könnte anschließend mittels ATPase Assay auf Funktionalität untersucht werden. Die Ergebnisse der genannten Vorschläge zur Optimierung der Methode sind im folgenden Kapitel dargestellt.

Während der Äquilibrierung des Cobalt-Harzes wurde beobachtet, dass eine leichte Farbänderung des Harzes auftrat. Zudem wies das Eluat eine leichte Braunfärbung auf. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass DTT trotz seiner geringen Konzentration mit den Cobalt-Ionen interagiert und diese dabei aus der koordinativen Bindung mit dem Harz entfernt werden. Somit stünden insgesamt weniger Cobaltionen für eine Bindung des His-Tags zur Verfügung, die bei diesem kleinen Ansatz jedoch noch ausreichten, um das gesamte solubilierte ABCG2 zu binden. Um diese Interaktion von DTT und Cobalt-Harz zu verhindern und dennoch nicht auf die Anwesenheit eines Reduktionsmittels zu verzichten, sollte für weitere Versuche, vor allem bei größeren Ansätzen, β -Mercaptoethanol eingesetzt werden.

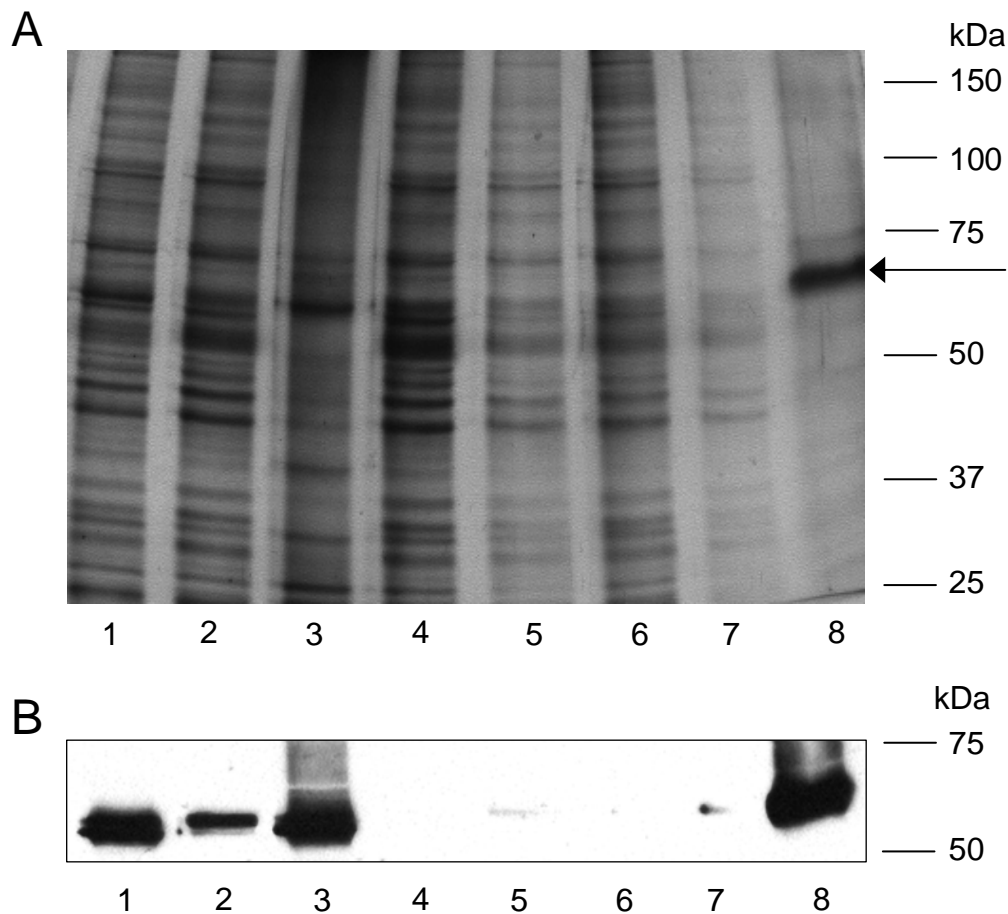


Abb. 4.52: Aufreinigung von ABCG2 mit 1 % CHAPS. (A) SDS-PAGE und Silberfärbung von Proben des Aufreinigungsprozesses (2 µg in Bahnen 1–7, 20 µl in Bahn 8): Ausgangsmembranen (Bahn 1), mit CHAPS solubilisierete Proteine (Bahn 2), nicht-solubilisierete Proteine (Bahn 3), nicht an Harz-1 gebundene Proteine (Bahn 4), Waschschrift Harz-1 (Bahn 5), nicht an Harz-2 gebundene Proteine (Bahn 6), Waschschrift Harz-2 (Bahn 7), Gesamteluat nach Aufkonzentrierung (Bahn 8); (B) Western Blot der Proben aus dem Aufreinigungsprozess in der gleichen Reihenfolge und Konzentration wie bei (A).

4.4.7 Optimierung der Aufreinigung mit CHAPS

Um die Aufreinigung von ABCG2 aus Hi5 Membranen zu optimieren, wurden die Vorschläge aus dem vorhergehenden Kapitel aufgegriffen. Es wurde eine etwas größere Menge an Membranen als Startmaterial verwendet. Statt DTT wurde in allen Pufferlösungen β -Mercaptoethanol eingesetzt. Daneben wurden den Puffern in der Affinitätschromatographie jetzt die gemischten Lipide zugesetzt, die CHAPS-Konzentrationen wurden aber jeweils beibehalten. Es wurde die Menge an Lipiden verwendet, die bereits erfolgreich bei der Aufreinigung von ABCG2 aus Hefemembranen eingesetzt worden war. Auf diese Weise war eine Rekonstitution des Proteins mittels Dialyse im Anschluss an die Affinitätschromatographie

möglich. Die Aufkonzentrierung des Eluats mittels Ultrafiltration wurde nicht durchgeführt, da das Protein bereits im Rahmen der neu eingeführten Dialyse aufkonzentriert werden würde.

Die Bestandteile des Solubilisationsansatzes, der 11,8 mg Hi5 Membranen enthielt, sind in Tabelle 3.41 zusammengefasst. Wiederum wurden an verschiedenen Stellen im Aufreinigungsprozess Proben entnommen und nach SDS-PAGE mittels Silberfärbung und Western Blot untersucht. Aus Abbildung 4.53 geht hervor, dass ein großer Anteil des durch CHAPS solubilisierten ABCG2 (Bahn 2) an das Cobalt-Harz gebunden werden konnte. Nur eine kleine Menge blieb in der Fraktion der ungebundenen Proteine zurück (Bahn 4). Jedoch wurde ein gewisser Anteil des über den His-Tag gebundenen Proteins durch den Waschpuffer wieder entfernt (Bahn 5). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.4.6 überein und wurde wahrscheinlich durch das im Waschpuffer enthaltene Imidazol ausgelöst.

Nach Elution vom Affinitätschromatographie-Harz lag ABCG2 nahezu rein vor, es waren nur sehr wenige andere Proteine in der Lösung vorhanden. Der Western Blot des rekonstituierten Proteins macht deutlich, dass ABCG2 in den Proteoliposomen erfolgreich aufkonzentriert werden konnte. Die finale Proteinkonzentration betrug 0,05 mg/ml, für die Liposomen konnte ein mittlerer Durchmesser von $127,1 \pm 3,7$ nm (Polydispersitätsfaktor $0,208 \pm 0,011$) ermittelt werden.

Fazit

Mit Hilfe der optimierten Methode zur Aufreinigung von ABCG2 aus Hi5 Membranen konnte nicht nur sehr reines Protein gewonnen werden, sondern dieses auch erfolgreich in Proteoliposomen rekonstituiert werden. Da das Prinzip also mit diesem Ansatz funktioniert hat, kann es zukünftig auch auf wesentlich größere Membranmengen übertragen werden. Auf diese Weise wäre die finale Proteinkonzentration dann auch geeignet, um die Funktionalität des aufgereinigten Proteins zu untersuchen.

Daneben wurde erneut eine leichte Braunfärbung des Eluats beobachtet. Folglich ist nicht nur die gemeinsame Verwendung von Cobalt-Harz und DTT ungünstig, sondern auch der Einsatz von β -Mercaptoethanol. Es wäre zu überlegen, ob die Konzentration des zugesetzten Reduktionsmittels weiter verringert werden könnte. Da dieses die Bildung von nicht-nativen Disulfid-Brücken während des Aufreinigungsvorgangs verhindert, kann jedoch nicht vollständig darauf verzichtet werden.

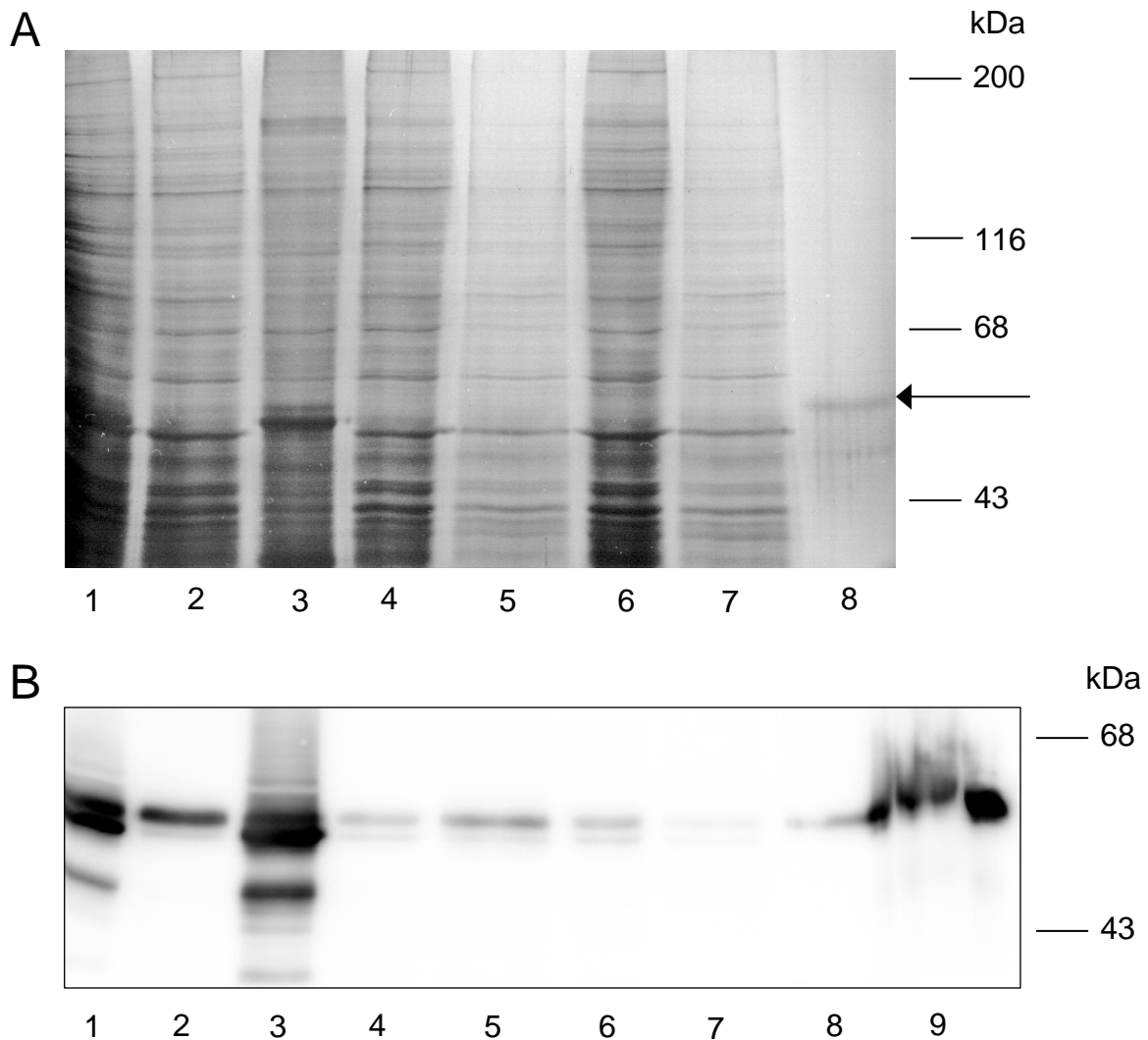


Abb. 4.53: Aufreinigung von ABCG2 mit 1 % CHAPS. (A) SDS-PAGE und Silberfärbung von Proben des Aufreinigungsprozesses (5 μ g in Bahnen 1–4 & 6, 15 μ l in Bahnen 5 & 7–9): Ausgangsmembranen (Bahn 1), mit CHAPS solubilisierte Proteine (Bahn 2), nicht-solubilierte Proteine (Bahn 3), nicht an Harz-1 gebundene Proteine (Bahn 4), Waschschrift Harz-1 (Bahn 5), nicht an Harz-2 gebundene Proteine (Bahn 6), Waschschrift Harz-2 (Bahn 7), Gesamteluat nach Aufkonzentrierung (Bahn 8); (B) Western Blot der Proben aus dem Aufreinigungsprozess in der gleichen Reihenfolge und Konzentration wie bei (A), zusätzlich rekonstituiertes Protein (Bahn 9).

4.4.8 Gewinnung von ABCG2 aus Insektenzellen – Fazit

ABCG2 konnte in den beiden Insektenzelllinien Hi5 und Sf9 mit Hilfe eines Baculovirus erfolgreich exprimiert werden. Das Protein wurde in beiden Zelllinien als zwei Spezies mit sehr geringem Molekulargewichtsunterschied hergestellt, wie es auch bei Expression in Hefen beobachtet wurde. Membranpräparationen aus beiden Zelllinien wiesen eine durch Prazosin stimulierbare Vanadat-sensitive ATPase Aktivität auf. Im Vergleich zu Sf9 Zellen zeigten Hi5 Zellen eine höhere Expressionsrate und wurden aus diesem Grund für die weiteren Studien verwendet.

Die zwitterionische Verbindung CHAPS war in der Lage, ABCG2 aus Hi5 Membranen sehr effektiv zu solubilisieren. Dabei wurde deutlich, dass das Detergenz in der Lage war, selektiv die obere, laut Literatur aktive Proteinspezies aus den Zellmembranen herauszulösen [120]. Der genaue Grund für dieses Phänomen der selektiven Solubilisierung ist bisher unbekannt, jedoch werden in der zuvor genannten Literatur zwei verschiedene Ursachen diskutiert. Eine Möglichkeit ist, dass es einen lokalen Unterschied in der Zusammensetzung der Membran gibt, der zur Bildung Detergenzien-resistenter Domänen führen würde. Da Insektenzellmembranen jedoch keine Sphingolipide und nahezu kein Cholesterol enthalten, aus denen solche Domänen aufgebaut wären, ist diese Theorie eher unwahrscheinlich.

Die Solubilisierung von Membranproteinen wird unter anderem auch durch Protein–Protein Wechselwirkungen beeinflusst. Eine Zusammenlagerung von nur teilweise korrekt gefaltetem ABCG2 über hydrophobe Protein–Protein Interaktionen in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, die durch milde Detergenzien wie CHAPS nicht zerstört werden kann, wäre eine andere Erklärung. Auch DDM oder OG wären nicht in der Lage, ABCG2 aus solchen Klustern herauszulösen. Dass diese beiden Detergenzien im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine gewisse Selektivität für die obere Spezies zeigten, unterstützt diese Theorie zusätzlich.

ABCG2 konnte nach Solubilisierung mit 1 % CHAPS durch eine Cobalt-basierte Affinitätschromatographie in sehr guter Reinheit extrahiert werden. Von Nachteil war, dass die Bindungsfähigkeit dieses Harzes durch Verwendung von Reduktionsmitteln in den eingesetzten Puffern negativ beeinflusst wurde. Zukünftig sollte die Konzentration von DTT bzw. β -Mercaptoethanol so gering wie möglich gehalten werden und das Harz erst kurz vor Gebrauch mit den reduktionsmittelhaltigen Puffern in Kontakt kommen. Eine andere Möglichkeit wäre, in der Affinitätschromatographie statt Cobalt-Harz das gegenüber Pufferzusätzen weniger empfindliche Nickel-Harz einzusetzen.

Insgesamt war die Zelllinie Hi5 sehr gut zur Gewinnung von aktivem ABCG2 geeignet, die beobachtete Unterglykosylierung hatte keinen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins. Im Vergleich zu Hefen wiesen diese Zellen eine deutlich erhöhte Expression des Zielproteins auf, so dass geringere Mengen an Ausgangsmaterial für die Aufreinigung benötigt wurden. Ein weiterer Vorteil war die Möglichkeit der Aktivitätsbestimmung in der Membranpräparation. Dadurch kann zukünftig im Vorfeld des Aufreinigungsprozesses aktives Protein von inaktivem Protein unterschieden und so unnötiger Arbeitsaufwand und Kosten vermieden werden. Dies war bei Expression von ABCG2 in *S. cerevisiae* nicht möglich.

Zukünftig können also Membranpräparationen von ABCG2-exprimierenden Hi5 Zellen verwendet werden, um daraus nahezu reines Protein zu gewinnen. Mit Hilfe von aufgereinigtem und in Proteoliposomen rekonstituiertem ABCG2 könnte eine funktionelle Charakterisierung von Substraten und Modulatoren des Proteins im ATPase Assay durchgeführt werden. Daneben könnte dieses Protein in Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten eingesetzt werden. Mit diesen Experimenten könnten Erkenntnisse über die Anzahl und Lokalisation von Bindungsstellen innerhalb des Proteins erzielt werden, über die bisher in der Literatur noch sehr wenig berichtet wurde. Darüber hinaus gäbe es viele weitere offene Fragestellungen zur genauen Struktur und zum Aufbau von ABCG2, die durch biophysikalische Studien an aufgereinigtem Protein beantwortet werden könnten.

5 Zusammenfassung

Die ABC-Transporter ABCB1 und ABCG2 beeinflussen aufgrund ihrer ubiquitären Expression in physiologischen Barrieren und ihrer breiten Substraterkennung die Pharmakokinetik vieler unterschiedlicher Arzneistoffe. Außerdem sind sie in die klassische Form der Multidrug Resistenz von Tumorzellen involviert. Trotz langjähriger Forschung auf dem Gebiet dieser Transportproteine fehlen noch immer Antworten auf einige wichtige Fragestellungen. Im Fokus der aktuellen Forschung stehen vor allem die Mechanismen des Substrattransportes sowie der Polyspezifität. Durch Untersuchungen in diesen Bereichen können grundlegende Erkenntnisse über ABCB1 und ABCG2 gewonnen werden, welche zukünftig dazu beitragen, beispielsweise Arzneistoffinteraktionen zu vermeiden oder die Weiterentwicklung von Wirkstoffkandidaten effektiver zu gestalten.

Untersuchungen an den aufgereinigten Proteinen sind neben funktionellen Assays mit lebenden Zellen wichtige Werkzeuge zur Charakterisierung von ABC-Transportern. Der große Vorteil gegenüber zellbasierten Systemen ist, dass Interaktionen mit dem isolierten Protein in einer genau definierten Umgebung betrachtet werden können. Dies bedeutet, dass die Versuchsparameter im Hinblick auf eventuelle Störeinflüsse anderer Proteine vollständig kontrolliert werden können. Um derartige Untersuchungen durchzuführen, werden große Mengen an reinem und funktionellem Protein benötigt, die vor allem aus heterologen Expressionssystemen gewonnen werden können. Die Evaluierung und Etablierung neuer Expressionssysteme für ABCG2 sowie die Optimierung eines vorhandenen Systems für ABCB1 standen ebenso im Vordergrund dieser Arbeit wie die Etablierung und Verbesserung von Methoden zur Aufreinigung beider Transportproteine.

Ein bereits vorhandenes heterologes Expressionssystem für ABCB1 im *Saccharomyces cerevisiae* Stamm BJ5457-ABCB1 wurde so optimiert, dass es zukünftig für die routinemäßige Anwendung eingesetzt werden kann. Zur Steigerung der Expression des ABC-Transporters in diesem Hefestamm wurde der Einsatz von zwei verschiedenen Selektionsantibiotika (Valinomycin und Aureobasidin A) evaluiert. Insgesamt war Aureobasidin A deutlich besser geeignet als Valinomycin, um BJ5457-ABCB1 Klone mit hohem Expressionslevel zu selektieren.

Membranpräparationen dieser Klone wurden im Weiteren verwendet, um daraus ABCB1 aufzureinigen und in Proteoliposomen zu rekonstituieren. Verschiedene Parameter des Aufreinigungsprozesses wurden optimiert, um die Ausbeute an rekonstituiertem Protein zu erhöhen. Zunächst wurde die Solubilisierungseffizienz der beiden Detergenzien Taurodesoxycholat (TDOC) und Lysophosphatidylcholin (LPC) verglichen. LPC war in der Lage, doppelt so viel ABCB1 aus dem Proteingemisch der Membranpräparation zu solubilisieren wie TDOC. Die Gesamtausbeute betrug bei Verwendung von LPC 20 %, wohingegen mit TDOC nur 4 % des solubilisierten ABCB1 isoliert wurden. Außerdem konnte die Konzentration von ABCB1 in der als Ausgangsmaterial eingesetzten Membranpräparation erhöht werden, indem bei deren Herstellung ein Zentrifugationsschritt weggelassen wurde. Die Verwendung von LPC zur Solubilisierung von ABCB1 in Kombination mit dem modifizierten Protokoll zur Membranpräparation ermöglichte die Isolation von großen Mengen des Proteins. Die Funktionalität des aufgereinigten ABCB1 wurde über die Stimulierbarkeit der basalen ATPase Aktivität durch den Modulator Verapamil nachgewiesen.

Das auf diese Weise aufgereinigte Protein wurde für Untersuchungen mittels ATPase Assay eingesetzt. Dabei wurden zwei Verbindungen verwendet, die in zellbasierten Testsystemen den Substrattransport durch ABCB1 stimulieren. Der genaue Mechanismus dieser Stimulation war bisher jedoch nicht bekannt und wurde hier eingehend betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass die ATP-Bindungsstellen am Mechanismus der Verstärkung des Substrat-Transportes nicht beteiligt sind, da weder ein erhöhter ATP-Umsatz noch eine gesteigerte Affinität von ATP zu den NBDs beobachtet wurde. Aus diesem Grund erscheint es eher wahrscheinlich, dass Substanzen dieser Klasse in den transmembranären Regionen des Proteins binden und dadurch Konformationsänderungen hervorrufen, die zu einer erhöhten Affinität des transportierten Substrates zu seiner Bindungsstelle führen, und somit den verstärkten Transport bewirken.

Neben den Verbindungen QB102 und LM 8.1 wurde auch der Einfluss des aus der Literatur bekannten Aktivators Hoechst 33342 auf die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Rhodamin 123 bzw. Verapamil untersucht. Es wurde deutlich, dass steigende Konzentrationen von Hoechst den pEC_{50} -Wert von Rhodamin 123 erniedrigten. Dies deutet auf eine durch Hoechst ausgelöste Steigerung der Affinität von Rhodamin zu ABCB1 hin. Auf die Affinität von Verapamil zu ABCB1 hatte Hoechst jedoch keinen Einfluss. Aufgrund dieser unterschiedlichen Ergebnisse für Rhodamin und Verapamil kann vermutet werden, dass die beiden Substanzen nicht an die gleiche Bindungsstelle von ABCB1 binden. Dies steht in Übereinstimmung mit den Berichten aus der Literatur zu Unterschieden in der Lokalisation der Bindungsareale der beiden Verbindungen.

Die für die Expression von ABCB1 in Hefen gewonnenen Erkenntnisse wurden auf ABCG2 übertragen. Hierbei wurde der *Saccharomyces cerevisiae* Stamm LPY11-ABCG2 als Expressionssystem etabliert, welcher das Protein in allen untersuchten Klonen auf einem vergleichbaren Level exprimierte. Das Protein lag als zwei Spezies mit sehr geringem Molekulargewichtsunterschied vor. Die aus LPY11-ABCG2 Zellen hergestellten Membranpräparationen wiesen einen homogenen ABCG2-Gehalt auf und waren somit für die weitere Aufreinigung sehr gut geeignet. Daneben wurden Untersuchungen durchgeführt, deren Ergebnisse darauf hinweisen, dass ABCG2 in den Hefezellen und auch nach Membranpräparation als Dimer und somit in seiner kleinsten funktionellen Einheit vorliegt.

Auch die Techniken zur Proteinaufreinigung wurden für ABCG2 etabliert und optimiert. ABCG2 konnte mit Hilfe des Detergenzes Octylglucosid (OG) erfolgreich aus Membranen des Hefestammes LPY11-ABCG2 solubilisiert werden. Es wurde zudem eine gewisse Präferenz für diejenige der beiden Proteinspezies deutlich, welche laut Literatur Funktionalität aufweist. Jedoch lag ABCG2 nach Nickel-basierter Affinitätschromatographie nicht vollständig rein vor. Im ATPase Assay zeigte sich eine durch Prazosin und weitere literaturbekannte Verbindungen stimulierte Zunahme der Vanadat-sensitiven ATPase Aktivität. Damit konnte gezeigt werden, dass ABCG2 in seiner aktiven Konformation aus den Hefemembranen extrahiert wurde.

ABCG2 konnte zwar prinzipiell durch Octylglucosid in seiner nativen Konformation aus LPY11-ABCG2 Membranen solubilisiert werden, jedoch nur mit einem Anteil von etwa 20 % der ursprünglich eingesetzten ABCG2-Menge. Aus diesem Grund wurde ein Screening mit insgesamt 16 nicht-ionischen und zwitterionischen Detergenzien durchgeführt. Zur Optimierung der Aufreinigung von ABCG2 wurden aus dem Screening zwei verschiedene Detergenzien ausgewählt, Fos-cholin 16 und Dodecylmaltosid (DDM). Fos-cholin 16 war in der Lage, ABCG2 mit guter Effizienz zu solubilisieren. Jedoch zeigte sich, dass das mit diesem Detergenz aufgereinigte Protein keine stimulierbare ATPase Aktivität aufwies.

DDM war ebenfalls in der Lage, das Protein zu solubilisieren. Ein großer Vorteil dieses Detergenzes war, dass es selektiv die aktive der beiden ABCG2 Spezies aus LPY11-ABCG2 Membranen herauslöste. Daneben wies DDM eine erhöhte Effektivität auf, weil es im Vergleich zu OG mehr Protein aus den Zellmembranen solubilisieren konnte. Insgesamt war die Reinheit des aufgereinigten Proteins nicht optimal, sie konnte aber durch den Wechsel des Detergenzes von OG zu DDM etwas verbessert werden. Nach erfolgreicher Rekonstitution von ABCG2 in Proteoliposomen konnte für das mit DDM aufgereinigte Protein eine durch Prazosin stimulierte Vanadat-sensitive ATPase Aktivität festgestellt werden. Insgesamt konnte ABCG2 also aus der Zellmembran des Hefestammes LPY11-ABCG2 mit Hilfe

von Octylglucosid oder Dodecylmaltosid in seiner nativen und aktiven Konformation solubilisiert werden.

Alternativ zu *Saccharomyces cerevisiae* wurde die Verwendung von Insektenzellen als heterologes Expressionssystem für ABCG2 evaluiert. Die beiden zur Verfügung stehenden Zelllinien High Five (Hi5) und Sf9 wurden in Bezug auf Expressionslevel und Aktivität des exprimierten Proteins verglichen. ABCG2 konnte in den beiden Insektenzelllinien mit Hilfe eines Baculovirus erfolgreich exprimiert werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen für die Expression in Hefen wurde das Protein in beiden Zelllinien als zwei Spezies mit sehr geringem Molekulargewichtsunterschied gebildet. Membranpräparationen aus beiden Zelllinien wiesen eine durch Prazosin stimulierbare Vanadat-sensitive ATPase Aktivität auf. Im Vergleich zu Sf9 Zellen zeigten Hi5 Zellen eine höhere Expressionsrate und wurden aus diesem Grund für die weiteren Studien verwendet.

Für die Aufreinigung von ABCG2 aus Hi5 Membranpräparationen wurde zunächst ein Screening von sechs verschiedenen Detergenzien durchgeführt, in welchem aus den beiden Gruppen der nicht-ionischen und der zwitterionischen Detergenzien Substanzen vertreten waren. Die zwitterionische Verbindung CHAPS war in der Lage, ABCG2 aus Hi5 Membranen sehr effektiv zu solubilisieren. Dabei wurde deutlich, dass das Detergenz in der Lage war, selektiv die aktive Proteinspezies aus den Zellmembranen herauszulösen. ABCG2 konnte im Weiteren durch eine Cobalt-basierte Affinitätschromatographie in sehr guter Reinheit extrahiert werden.

Im Vergleich zu Hefen wies die Insektenzelllinie Hi5 den Vorteil einer deutlich erhöhten Expression des Zielproteins auf, so dass geringere Mengen an Ausgangsmaterial für die Aufreinigung benötigt wurden.

Aus Membranpräparationen dieser Zellen kann also nahezu reines Protein gewonnen werden. Mit Hilfe von aufgereinigtem und in Proteoliposomen rekonstituiertem ABCG2 können zukünftig biophysikalische Studien durchgeführt werden, durch welche die offenen Fragestellungen zur genauen Struktur und zum Aufbau von ABCG2 beantwortet werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Higgins, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1992**, *8*, 67–113.
- [2] Dean, M.; Rzhetsky, A.; Allikmets, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1156–1166.
- [3] Higgins, C. F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* **2007**, *446*, 749–757.
- [4] Dean, M.; Allikmets, R. Complete characterization of the human ABC gene family. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2001**, *33*, 475–479.
- [5] Borst, P.; Elferink, R. O. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 537–592.
- [6] Szakács, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 219–234.
- [7] Schinkel, A. H.; Jonker, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 3–29.
- [8] Alvarez, A. I.; Pérez, M.; Prieto, J. G.; Molina, A. J.; Real, R.; Merino, G. Fluoroquinolone efflux mediated by ABC transporters. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 3483–3493.
- [9] Henry, M.; Alibert, S.; Rogier, C.; Barbe, J.; Pradines, B. Inhibition of efflux of quinolines as new therapeutic strategy in malaria. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 563–578.
- [10] Glavinas, H.; Krajcsi, P.; Cserepes, J.; Sarkadi, B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Curr. Drug Deliv.* **2004**, *1*, 27–42.
- [11] Szakács, G.; Váradi, A.; Özvegy-Laczka, C.; Sarkadi, B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 379–393.

- [12] Deeken, J. F.; Löscher, W. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 1663–1674.
- [13] Upton, R. N. Cerebral uptake of drugs in humans. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2007**, *34*, 695–701.
- [14] Reddy, M. M.; Light, M. J.; Quinton, P. M. Activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) requires CFTR Cl⁻ channel function. *Nature* **1999**, *402*, 301–304.
- [15] Takahashi, K.; Kimura, Y.; Nagata, K.; Yamamoto, A.; Matsuo, M.; Ueda, K. ABC proteins: key molecules for lipid homeostasis. *Med. Mol. Morphol.* **2005**, *38*, 2–12.
- [16] Gottesman, M. M.; Fojo, T.; Bates, S. E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 48–58.
- [17] Ambudkar, S. V.; Dey, S.; Hrycyna, C. A.; Ramachandra, M.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1999**, *39*, 361–398.
- [18] Doyle, L. A.; Ross, D. D. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2). *Oncogene* **2003**, *22*, 7340–7358.
- [19] Kruh, G. D. Introduction to resistance to anticancer agents. *Oncogene* **2003**, *22*, 7262–7264.
- [20] Juliano, R. L.; Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *455*, 152–162.
- [21] Higgins, C. F.; Gottesman, M. M. Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 18–21.
- [22] Gottesman, M. M.; Pastan, I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* **1993**, *62*, 385–427.
- [23] Loo, T. W.; Clarke, D. M. Do drug substrates enter the common drug-binding pocket of P-glycoprotein through "gates"? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *329*, 419–422.
- [24] Pleban, K.; Kopp, S.; Csaszar, E.; Peer, M.; Hrebicek, T.; Rizzi, A.; Ecker, G. F.; Chiba, P. P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 365–374.

- [25] Crowley, E.; Callaghan, R. Multidrug efflux pumps: drug binding-gates or cavity? *FEBS J.* **2010**, *277*, 530–539.
- [26] Loo, T. W.; Clarke, D. M. Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 44332–44338.
- [27] Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M. Substrate-induced conformational changes in the transmembrane segments of human P-glycoprotein. Direct evidence for the substrate-induced fit mechanism for drug binding. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 13603–13606.
- [28] Shapiro, A. B.; Ling, V. Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 130–137.
- [29] Shapiro, A. B.; Fox, K.; Lam, P.; Ling, V. Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *Eur. J. Biochem.* **1999**, *259*, 841–850.
- [30] Martin, C.; Berridge, G.; Higgins, C. F.; Mistry, P.; Charlton, P.; Callaghan, R. Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 624–632.
- [31] Wang, E.; Casciano, C. N.; Clement, R. P.; Johnson, W. W. Two transport binding sites of P-glycoprotein are unequal yet contingent: initial rate kinetic analysis by ATP hydrolysis demonstrates intersite dependence. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1481*, 63–74.
- [32] Safa, A. R. Identification and characterization of the binding sites of P-glycoprotein for multidrug resistance-related drugs and modulators. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* **2004**, *4*, 1–17.
- [33] Pajeva, I. K.; Globisch, C.; Wiese, M. Structure-function relationships of multidrug resistance P-glycoprotein. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2523–2533.
- [34] Globisch, C.; Pajeva, I. K.; Wiese, M. Identification of putative binding sites of P-glycoprotein based on its homology model. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 280–295.
- [35] Aller, S. G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P. M.; Trinh, Y. T.; Zhang, Q.; Urbatsch, I. L.; Chang, G. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* **2009**, *323*, 1718–1722.

- [36] Ritchie, T. K.; Grinkova, Y. V.; Bayburt, T. H.; Denisov, I. G.; Zolnerciks, J. K.; Atkins, W. M.; Sligar, S. G. Chapter 11 - Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs. *Methods Enzymol.* **2009**, *464*, 211–231.
- [37] Senior, A. E.; Al-Shawi, M. K.; Urbatsch, I. L. The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett.* **1995**, *377*, 285–289.
- [38] Al-Shawi, M. K.; Polar, M. K.; Omote, H.; Figler, R. A. Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 52629–52640.
- [39] Higgins, C. F.; Linton, K. J. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 918–926.
- [40] Callaghan, R.; Ford, R. C.; Kerr, I. D. The translocation mechanism of P-glycoprotein. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1056–1063.
- [41] Wiese, M.; Pajeva, I. K. Structure-activity relationships of multidrug resistance reversers. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 685–713.
- [42] Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.* **1981**, *41*, 1967–1972.
- [43] Martin, C.; Berridge, G.; Mistry, P.; Higgins, C.; Charlton, P.; Callaghan, R. The molecular interaction of the high affinity reversal agent XR9576 with P-glycoprotein. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *128*, 403–411.
- [44] Hyafil, F.; Vergely, C.; Vignaud, P. D.; Grand-Perret, T. In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 4595–4602.
- [45] Kondratov, R. V.; Komarov, P. G.; Becker, Y.; Ewenson, A.; Gudkov, A. V. Small molecules that dramatically alter multidrug resistance phenotype by modulating the substrate specificity of P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 14078–14083.
- [46] Sterz, K.; Möllmann, L.; Jacobs, A.; Baumert, D.; Wiese, M. Activators of P-glycoprotein: Structure-activity relationships and investigation of their mode of action. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1897–1911.

- [47] Doyle, L. A.; Yang, W.; Abruzzo, L. V.; Krogmann, T.; Gao, Y.; Rishi, A. K.; Ross, D. D. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 15665–15670.
- [48] Ross, D. D.; Yang, W.; Abruzzo, L. V.; Dalton, W. S.; Schneider, E.; Lage, H.; Dietel, M.; Greenberger, L.; Cole, S. P.; Doyle, L. A. Atypical multidrug resistance: breast cancer resistance protein messenger RNA expression in mitoxantrone-selected cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1999**, *91*, 429–433.
- [49] Miyake, K.; Mickley, L.; Litman, T.; Zhan, Z.; Robey, R.; Cristensen, B.; Brangi, M.; Greenberger, L.; Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S. E. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 8–13.
- [50] Ishii, M.; Iwahana, M.; Mitsui, I.; Minami, M.; Imagawa, S.; Tohgo, A.; Ejima, A. Growth inhibitory effect of a new camptothecin analog, DX-8951f, on various drug-resistant sublines including BCRP-mediated camptothecin derivative-resistant variants derived from the human lung cancer cell line PC-6. *Anticancer Drugs* **2000**, *11*, 353–362.
- [51] Maliepaard, M.; Scheffer, G. L.; Faneyte, I. F.; van Gastelen, M. A.; Pijnenborg, A. C.; Schinkel, A. H.; van De Vijver, M. J.; Scheper, R. J.; Schellens, J. H. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 3458–3464.
- [52] Allikmets, R.; Schriml, L. M.; Hutchinson, A.; Romano-Spica, V.; Dean, M. A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5337–5339.
- [53] Litman, T.; Druley, T. E.; Stein, W. D.; Bates, S. E. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 931–959.
- [54] Cervenak, J.; Andrikovics, H.; Özvegy-Laczka, C.; Tordai, A.; Németh, K.; Váradi, A.; Sarkadi, B. The role of the human ABCG2 multidrug transporter and its variants in cancer therapy and toxicology. *Cancer Lett.* **2006**, *234*, 62–72.
- [55] Wang, H.; Lee, E.-W.; Cai, X.; Ni, Z.; Zhou, L.; Mao, Q. Membrane topology of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) determined by epitope insertion and immunofluorescence. *Biochemistry* **2008**, *47*, 13778–13787.

- [56] Kage, K.; Tsukahara, S.; Sugiyama, T.; Asada, S.; Ishikawa, E.; Tsuruo, T.; Sugimoto, Y. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S–S dependent homodimerization. *Int. J. Cancer* **2002**, *97*, 626–630.
- [57] Litman, T.; Jensen, U.; Hansen, A.; Covitz, K.-M.; Zhan, Z.; Fetsch, P.; Abati, A.; Hansen, P. R.; Horn, T.; Skovsgaard, T.; Bates, S. E. Use of peptide antibodies to probe for the mitoxantrone resistance-associated protein MXR/BCRP/ABCP/ABCG2. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1565*, 6–16.
- [58] Henriksen, U.; Gether, U.; Litman, T. Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 1417–1426.
- [59] Bhatia, A.; Schäfer, H.-J.; Hrycyna, C. A. Oligomerization of the human ABC transporter ABCG2: evaluation of the native protein and chimeric dimers. *Biochemistry* **2005**, *44*, 10893–10904.
- [60] Henriksen, U.; Fog, J. U.; Litman, T.; Gether, U. Identification of intra- and intermolecular disulfide bridges in the multidrug resistance transporter ABCG2. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 36926–36934.
- [61] Kage, K.; Fujita, T.; Sugimoto, Y. Role of Cys-603 in dimer/oligomer formation of the breast cancer resistance protein BCRP/ABCG2. *Cancer Sci.* **2005**, *96*, 866–872.
- [62] Liu, Y.; Yang, Y.; Qi, J.; Peng, H.; Zhang, J.-T. Effect of cysteine mutagenesis on the function and disulfide bond formation of human ABCG2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2008**, *326*, 33–40.
- [63] Xu, J.; Liu, Y.; Yang, Y.; Bates, S.; Zhang, J.-T. Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 19781–19789.
- [64] McDevitt, C. A.; Collins, R. F.; Conway, M.; Modok, S.; Storm, J.; Kerr, I. D.; Ford, R. C.; Callaghan, R. Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2. *Structure* **2006**, *14*, 1623–1632.
- [65] Mao, Q.; Conseil, G.; Gupta, A.; Cole, S. P. C.; Unadkat, J. D. Functional expression of the human breast cancer resistance protein in *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *320*, 730–737.

- [66] Diop, N. K.; Hrycyna, C. A. N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane. *Biochemistry* **2005**, *44*, 5420–5429.
- [67] Özvegy, C.; Váradi, A.; Sarkadi, B. Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 47980–47990.
- [68] Honjo, Y.; Hrycyna, C. A.; Yan, Q. W.; Medina-Pérez, W. Y.; Robey, R. W.; van de Laar, A.; Litman, T.; Dean, M.; Bates, S. E. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6635–6639.
- [69] Robey, R. W.; Honjo, Y.; Morisaki, K.; Nadjem, T. A.; Runge, S.; Risbood, M.; Poruchynsky, M. S.; Bates, S. E. Mutations at amino-acid 482 in the ABCG2 gene affect substrate and antagonist specificity. *Br. J. Cancer* **2003**, *89*, 1971–1978.
- [70] Ejendal, K. F. K.; Diop, N. K.; Schweiger, L. C.; Hrycyna, C. A. The nature of amino acid 482 of human ABCG2 affects substrate transport and ATP hydrolysis but not substrate binding. *Protein Sci.* **2006**, *15*, 1597–1607.
- [71] Clark, R.; Kerr, I. D.; Callaghan, R. Multiple drugbinding sites on the R482G isoform of the ABCG2 transporter. *Br. J. Pharmacol.* **2006**, *149*, 506–515.
- [72] Gupta, A.; Dai, Y.; Vethanayagam, R. R.; Hebert, M. F.; Thummel, K. E.; Unadkat, J. D.; Ross, D. D.; Mao, Q. Cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus are potent inhibitors of the human breast cancer resistance protein (ABCG2) and reverse resistance to mitoxantrone and topotecan. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2006**, *58*, 374–383.
- [73] Robey, R. W.; Steadman, K.; Polgar, O.; Morisaki, K.; Blayney, M.; Mistry, P.; Bates, S. E. Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 1242–1246.
- [74] de Bruin, M.; Miyake, K.; Litman, T.; Robey, R.; Bates, S. E. Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett.* **1999**, *146*, 117–126.
- [75] Rabindran, S. K.; Ross, D. D.; Doyle, L. A.; Yang, W.; Greenberger, L. M. Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 47–50.

- [76] Allen, J. D.; van Loevezijn, A.; Lakhai, J. M.; van der Valk, M.; van Tellingen, O.; Reid, G.; Schellens, J. H. M.; Koomen, G.-J.; Schinkel, A. H. Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol. Cancer Ther.* **2002**, *1*, 417–425.
- [77] Ahmed-Belkacem, A.; Pozza, A.; Muñoz-Martínez, F.; Bates, S. E.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Di Pietro, A.; Pérez-Victoria, J. M. Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 4852–4860.
- [78] Takenaka, K.; Morgan, J. A.; Scheffer, G. L.; Adachi, M.; Stewart, C. F.; Sun, D.; Leggas, M.; Ejendal, K. F. K.; Hrycyna, C. A.; Schuetz, J. D. Substrate overlap between Mrp4 and Abcg2/Bcrp affects purine analogue drug cytotoxicity and tissue distribution. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 6965–6972.
- [79] Matsson, P.; Englund, G.; Ahlin, G.; Bergström, C. A. S.; Norinder, U.; Artursson, P. A global drug inhibition pattern for the human ATP-binding cassette transporter breast cancer resistance protein (ABCG2). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *323*, 19–30.
- [80] Hazai, E.; Bikádi, Z. Homology modeling of breast cancer resistance protein (ABCG2). *J. Struct. Biol.* **2008**, *162*, 63–74.
- [81] Giri, N.; Agarwal, S.; Shaik, N.; Pan, G.; Chen, Y.; Elmquist, W. F. Substrate-dependent breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2)-mediated interactions: consideration of multiple binding sites in in vitro assay design. *Drug Metab. Dispos.* **2009**, *37*, 560–570.
- [82] Rosenberg, M. F.; Bikadi, Z.; Chan, J.; Liu, X.; Ni, Z.; Cai, X.; Ford, R. C.; Mao, Q. The human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) shows conformational changes with mitoxantrone. *Structure* **2010**, *18*, 482–493.
- [83] Jonker, J. W.; Buitelaar, M.; Wagenaar, E.; van der Valk, M. A.; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; Plosch, T.; Kuipers, F.; Oude Elferink, R. P. J.; Rosing, H.; Beijnen, J. H.; Schinkel, A. H. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 15649–15654.
- [84] Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 275–284.

- [85] Wu, C.; Alman, B. A. Side population cells in human cancers. *Cancer Lett.* **2008**, *268*, 1–9.
- [86] Chen, Z.; Liu, F.; Ren, Q.; Zhao, Q.; Ren, H.; Lu, S.; Zhang, L.; Han, Z. Suppression of ABCG2 inhibits cancer cell proliferation. *Int. J. Cancer* **2009**, *126*, 841–851.
- [87] Katayama, R.; Koike, S.; Sato, S.; Sugimoto, Y.; Tsuruo, T.; Fujita, N. Dofequidar fumarate sensitizes cancer stem-like side population cells to chemotherapeutic drugs by inhibiting ABCG2/BCRP-mediated drug export. *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 2060–2068.
- [88] Urbatsch, I. L.; Al-Shawi, M. K.; Senior, A. E. Characterization of the ATPase activity of purified Chinese hamster P-glycoprotein. *Biochemistry* **1994**, *33*, 7069–7076.
- [89] Mao, Q.; Scarborough, G. A. Purification of functional human P-glycoprotein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1327*, 107–118.
- [90] Cai, J.; Gros, P. Overexpression, purification, and functional characterization of ATP-binding cassette transporters in the yeast, *Pichia pastoris*. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1610*, 63–76.
- [91] Shapiro, A. B.; Ling, V. Using purified P-glycoprotein to understand multidrug resistance. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1995**, *27*, 7–13.
- [92] Polli, J. W.; Wring, S. A.; Humphreys, J. E.; Huang, L.; Morgan, J. B.; Webster, L. O.; Serabjit-Singh, C. S. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *299*, 620–628.
- [93] Hegedus, C.; Szakács, G.; Homolya, L.; Orbán, T. I.; Telbisz, A.; Jani, M.; Sarkadi, B. Ins and outs of the ABCG2 multidrug transporter: an update on in vitro functional assays. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 47–56.
- [94] Lee, S. H.; Altenberg, G. A. Expression of functional multidrug-resistance protein 1 in *Saccharomyces cerevisiae*: effects of N- and C-terminal affinity tags. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *306*, 644–649.
- [95] Loo, T. W.; Clarke, D. M. Rapid purification of human P-glycoprotein mutants expressed transiently in HEK 293 cells by nickel-chelate chromatography and characterization of their drug-stimulated ATPase activities. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 21449–21452.
- [96] Doige, C. A.; Sharom, F. J. Strategies for the purification of P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Protein Expr. Purif.* **1991**, *2*, 256–265.

- [97] Al-Shawi, M. K.; Senior, A. E. Characterization of the adenosine triphosphatase activity of Chinese hamster P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 4197–4206.
- [98] Shapiro, A. B.; Ling, V. ATPase activity of purified and reconstituted P-glycoprotein from Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 3745–3754.
- [99] Callaghan, R.; Berridge, G.; Ferry, D. R.; Higgins, C. F. The functional purification of P-glycoprotein is dependent on maintenance of a lipid-protein interface. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1328*, 109–124.
- [100] Urbatsch, I. L.; Wilke-Mounts, S.; Gimi, K.; Senior, A. E. Purification and characterization of N-glycosylation mutant mouse and human P-glycoproteins expressed in *Pichia pastoris* cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *388*, 171–177.
- [101] Chloupková, M.; Pickert, A.; Lee, J.-Y.; Souza, S.; Trinh, Y. T.; Connelly, S. M.; Dumont, M. E.; Dean, M.; Urbatsch, I. L. Expression of 25 human ABC transporters in the yeast *Pichia pastoris* and characterization of the purified ABCC3 ATPase activity. *Biochemistry* **2007**, *46*, 7992–8003.
- [102] Kuchler, K.; Thorner, J. Functional expression of human *mdr1* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 2302–2306.
- [103] Figler, R. A.; Omote, H.; Nakamoto, R. K.; Al-Shawi, M. K. Use of chemical chaperones in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to enhance heterologous membrane protein expression: high-yield expression and purification of human P-glycoprotein. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *376*, 34–46.
- [104] Howard, E. M.; Roepe, P. D. Purified human MDR 1 modulates membrane potential in reconstituted proteoliposomes. *Biochemistry* **2003**, *42*, 3544–3555.
- [105] Germann, U. A.; Willingham, M. C.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. Expression of the human multidrug transporter in insect cells by a recombinant baculovirus. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2295–2303.
- [106] Sarkadi, B.; Price, E. M.; Boucher, R. C.; Germann, U. A.; Scarborough, G. A. Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 4854–4858.
- [107] Ramachandra, M.; Gottesman, M. M.; Pastan, I. Recombinant vaccinia virus vectors for functional expression of P-glycoprotein in mammalian cells. *Methods Enzymol.* **1998**, *292*, 441–455.

- [108] Kodan, A.; Shibata, H.; Matsumoto, T.; Terakado, K.; Sakiyama, K.; Matsuo, M.; Ueda, K.; Kato, H. Improved expression and purification of human multidrug resistance protein MDR1 from baculovirus-infected insect cells. *Protein Expr. Purif.* **2009**, *66*, 7–14.
- [109] Kerr, K. M.; Sauna, Z. E.; Ambudkar, S. V. Correlation between steady-state ATP hydrolysis and vanadate-induced ADP trapping in human P-glycoprotein. Evidence for ADP release as the rate-limiting step in the catalytic cycle and its modulation by substrates. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 8657–8664.
- [110] Shukla, S.; Robey, R. W.; Bates, S. E.; Ambudkar, S. V. The calcium channel blockers, 1,4-dihydropyridines, are substrates of the multidrug resistance-linked ABC drug transporter, ABCG2. *Biochemistry* **2006**, *45*, 8940–8951.
- [111] Nakanishi, T.; Doyle, L. A.; Hassel, B.; Wei, Y.; Bauer, K. S.; Wu, S.; Pumplin, D. W.; Fang, H.-B.; Ross, D. D. Functional characterization of human breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) expressed in the oocytes of *Xenopus laevis*. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *64*, 1452–1462.
- [112] Janvilisri, T.; Venter, H.; Shahi, S.; Reuter, G.; Balakrishnan, L.; van Veen, H. W. Sterol transport by the human breast cancer resistance protein (ABCG2) expressed in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 20645–20651.
- [113] Cooray, H. C.; Shahi, S.; Cahn, A. P.; van Veen, H. W.; Hladky, S. B.; Barrand, M. A. Modulation of p-glycoprotein and breast cancer resistance protein by some prescribed corticosteroids. *Eur. J. Pharmacol.* **2006**, *531*, 25–33.
- [114] Özvegy, C.; Litman, T.; Szakács, G.; Nagy, Z.; Bates, S.; Váradi, A.; Sarkadi, B. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 111–117.
- [115] Telbisz, A.; Müller, M.; Özvegy-Laczka, C.; Homolya, L.; Szente, L.; Váradi, A.; Sarkadi, B. Membrane cholesterol selectively modulates the activity of the human ABCG2 multidrug transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 2698–2713.
- [116] Pál, A.; Méhn, D.; Molnár, E.; Gedey, S.; Mészáros, P.; Nagy, T.; Glavinas, H.; Janáky, T.; von Richter, O.; Báthori, G.; Szente, L.; Krajcsi, P. Cholesterol potentiates ABCG2 activity in a heterologous expression system: improved in vitro model to study function of human ABCG2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *321*, 1085–1094.
- [117] Glavinas, H.; Kis, E.; Pál, A.; Kovács, R.; Jani, M.; Vági, E.; Molnár, E.; Bánsághi, S.; Kele, Z.; Janáky, T.; Báthori, G.; von Richter, O.; Koomen, G.-J.; Krajcsi, P. ABCG2

- (breast cancer resistance protein/mitoxantrone resistance-associated protein) ATPase assay: a useful tool to detect drug-transporter interactions. *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35*, 1533–1542.
- [118] Trometer, C.; Falson, P. Mammalian membrane protein expression in baculovirus-infected insect cells. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *601*, 105–117.
- [119] Pozza, A.; Pérez-Victoria, J. M.; Sardo, A.; Ahmed-Belkacem, A.; Di Pietro, A. Purification of breast cancer resistance protein ABCG2 and role of arginine-482. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 1912–1922.
- [120] Pozza, A.; Pérez-Victoria, J. M.; Di Pietro, A. Overexpression of homogeneous and active ABCG2 in insect cells. *Protein Expr. Purif.* **2009**, *63*, 75–83.
- [121] Evans, G. L.; Ni, B.; Hrycyna, C. A.; Chen, D.; Ambudkar, S. V.; Pastan, I.; Germann, U. A.; Gottesman, M. M. Heterologous expression systems for P-glycoprotein: E. coli, yeast, and baculovirus. *J. Bioenerg. Biomembr.* **1995**, *27*, 43–52.
- [122] McDevitt, C. A.; Collins, R.; Kerr, I. D.; Callaghan, R. Purification and structural analyses of ABCG2. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 57–65.
- [123] Storch, C. H.; Eehalt, R.; Haefeli, W. E.; Weiss, J. Localization of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in lipid rafts/caveolae and modulation of its activity by cholesterol in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *323*, 257–264.
- [124] Kaplan, R. S.; Pedersen, P. L. Determination of microgram quantities of protein in the presence of milligram levels of lipid with amido black 10B. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 97–104.
- [125] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [126] Van Veldhoven, P. P.; Mannaerts, G. P. Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range. *Anal. Biochem.* **1987**, *161*, 45–48.
- [127] Meyer, J. U. Untersuchung der Protein/Substrat-Interaktion an rekombinantem P-Glykoprotein. Dissertation, Universität Bonn, 2008.
- [128] Palermo, L. M.; Leak, F. W.; Tove, S.; Parks, L. W. Assessment of the essentiality of ERG genes late in ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **1997**, *32*, 93–99.
- [129] Jones, E. W. Tackling the protease problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **1991**, *194*, 428–453.

- [130] Sievers, J. G. Optimierung der Aufreinigung und Rekonstitution von humanem P-Glykoprotein in *S. cerevisiae* zur Charakterisierung neuer Modulatoren. Dissertation, Universität Bonn, 2007.
- [131] Kino, K.; Taguchi, Y.; Yamada, K.; Komano, T.; Ueda, K. Aureobasidin A, an antifungal cyclic depsipeptide antibiotic, is a substrate for both human MDR1 and MDR2/P-glycoproteins. *FEBS Lett.* **1996**, *399*, 29–32.
- [132] Gietz, R. D.; Schiestl, R. H. Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier. *Yeast* **1991**, *7*, 253–263.
- [133] Zwietering, M. H.; Jongenburger, I.; Rombouts, F. M.; van 't Riet, K. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 1875–1881.
- [134] Wach, A.; Gräber, P. The plasma membrane H(+)-ATPase from yeast. Effects of pH, vanadate and erythrosine B on ATP hydrolysis and ATP binding. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *201*, 91–97.
- [135] Nunes, P. A.; Tenreiro, S.; Sá-Correia, I. Resistance and adaptation to quinidine in *Saccharomyces cerevisiae*: role of QDR1 (YIL120w), encoding a plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily required for multidrug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 1528–1534.
- [136] Hjelmeland, L. M. Solubilization of native membrane proteins. *Methods Enzymol.* **1990**, *182*, 253–264.
- [137] Eytan, G. D. Use of liposomes for reconstitution of biological functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *694*, 185–202.
- [138] le Maire, M.; Champeil, P.; Moller, J. V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1508*, 86–111.
- [139] Schmitt, J.; Hess, H.; Stunnenberg, H. G. Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol. Biol. Rep.* **1993**, *18*, 223–230.
- [140] Paternostre, M. T.; Roux, M.; Rigaud, J. L. Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1. Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate. *Biochemistry* **1988**, *27*, 2668–2677.

- [141] Anderson, J. L.; Frase, H.; Michaelis, S.; Hrycyna, C. A. Purification, functional reconstitution, and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase Ste14p. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 7336–7345.
- [142] Wätzig, H.; Mehnert, W.; Bühler, W. *Mathematik und Statistik kompakt*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 2009.
- [143] van den Elsen, J. M.; Kuntz, D. A.; Hoedemaeker, F. J.; Rose, D. R. Antibody C219 recognizes an alpha-helical epitope on P-glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 13679–13684.
- [144] Jeong, H.; Herskowitz, I.; Kroetz, D. L.; Rine, J. Function-altering SNPs in the human multidrug transporter gene ABCB1 identified using a *Saccharomyces*-based assay. *PLoS Genet.* **2007**, *3*, e39.
- [145] Kurome, T.; Takesako, K.; Kato, I. Aureobasidins as new inhibitors of P-glycoprotein in multidrug resistant tumor cells. *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 353–358.
- [146] Walworth, N. C.; Goud, B.; Ruohola, H.; Novick, P. J. Fractionation of yeast organelles. *Methods Cell Biol.* **1989**, *31*, 335–356.
- [147] Zinser, E.; Daum, G. Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1995**, *11*, 493–536.
- [148] Wang, E.; Barecki-Roach, M.; Johnson, W. W. Elevation of P-glycoprotein function by a catechin in green tea. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *297*, 412–418.
- [149] Sharom, F. J.; Yu, X.; DiDiodato, G.; Chu, J. W. Synthetic hydrophobic peptides are substrates for P-glycoprotein and stimulate drug transport. *Biochem J.* **1996**, *320*, 421–428.
- [150] Qu, Q.; Sharom, F. J. Proximity of bound Hoechst 33342 to the ATPase catalytic sites places the drug binding site of P-glycoprotein within the cytoplasmic membrane leaflet. *Biochemistry* **2002**, *41*, 4744–4752.
- [151] Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M. Methanethiosulfonate derivatives of rhodamine and verapamil activate human P-glycoprotein at different sites. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 50136–50141.
- [152] Urbatsch, I. L.; Sankaran, B.; Bhagat, S.; Senior, A. E. Both P-glycoprotein nucleotide-binding sites are catalytically active. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 26956–26961.

- [153] Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M. Drug binding in human P-glycoprotein causes conformational changes in both nucleotide-binding domains. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1575–1578.
- [154] Seeger, M. A.; van Veen, H. W. Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1794*, 725–737.
- [155] Rosenberg, M. F.; Kamis, A. B.; Callaghan, R.; Higgins, C. F.; Ford, R. C. Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 8294–8299.
- [156] Pajeva, I. K.; Wiese, M. Pharmacophore model of drugs involved in P-glycoprotein multidrug resistance: explanation of structural variety (hypothesis). *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5671–5686.
- [157] Mukhopadhyay, K.; Kohli, A.; Prasad, R. Drug susceptibilities of yeast cells are affected by membrane lipid composition. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3695–3705.
- [158] Polgar, O.; Deeken, J. F.; Ediriwickrema, L. S.; Tamaki, A.; Steinberg, S. M.; Robey, R. W.; Bates, S. E. The 315-316 deletion determines the BXP-21 antibody epitope but has no effect on the function of wild type ABCG2 or the Q141K variant. *Mol. Cell. Biochem.* **2009**, *322*, 63–71.
- [159] Endo, M.; Takesako, K.; Kato, I.; Yamaguchi, H. Fungicidal action of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic, against *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1997**, *41*, 672–676.
- [160] Sanglard, D.; Kuchler, K.; Ischer, F.; Pagani, J. L.; Monod, M.; Bille, J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 2378–2386.
- [161] Merino, G.; Alvarez, A. I.; Pulido, M. M.; Molina, A. J.; Schinkel, A. H.; Prieto, J. G. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) transports fluoroquinolone antibiotics and affects their oral availability, pharmacokinetics, and milk secretion. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, *34*, 690–695.
- [162] Ando, T.; Kusuvara, H.; Merino, G.; Alvarez, A. I.; Schinkel, A. H.; Sugiyama, Y. Involvement of breast cancer resistance protein (ABCG2) in the biliary excretion mechanism of fluoroquinolones. *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35*, 1873–1879.

- [163] Rogers, B.; Decottignies, A.; Kolaczowski, M.; Carvajal, E.; Balzi, E.; Goffeau, A. The pleiotropic drug ABC transporters from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *3*, 207–214.
- [164] Jungwirth, H.; Kuchler, K. Yeast ABC transporters– a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 1131–1138.
- [165] Kolaczowski, M.; Kolaczowska, A.; Luczynski, J.; Witek, S.; Goffeau, A. In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb. Drug Resist.* **1998**, *4*, 143–158.
- [166] Jeong, J.-M.; Choi, C.-H. Enhancement of paclitaxel transport and cytotoxicity by 7,3',4'-trimethoxyflavone, a P-glycoprotein inhibitor. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2007**, *10*, 547–553.
- [167] De Nobel, J. G.; Barnett, J. A. Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. *Yeast* **1991**, *7*, 313–323.
- [168] Fernandes, A. R.; Sá-Correia, I. Transcription patterns of PMA1 and PMA2 genes and activity of plasma membrane H⁺-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* during diauxic growth and stationary phase. *Yeast* **2003**, *20*, 207–219.
- [169] Polgar, O.; Robey, R. W.; Morisaki, K.; Dean, M.; Michejda, C.; Sauna, Z. E.; Ambudkar, S. V.; Tarasova, N.; Bates, S. E. Mutational analysis of ABCG2: role of the GXXXG motif. *Biochemistry* **2004**, *43*, 9448–9456.
- [170] Ishikawa, T.; Kasamatsu, S.; Hagiwara, Y.; Mitomo, H.; Kato, R.; Sumino, Y. Expression and functional characterization of human ABC transporter ABCG2 variants in insect cells. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2003**, *18*, 194–202.
- [171] Kasher, M. S.; Wakulchik, M.; Cook, J. A.; Smith, M. C. One-step purification of recombinant human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein and its binding to the retinoblastoma gene product. *Biotechniques* **1993**, *14*, 630–641.
- [172] Hrycyna, C. A.; Ramachandra, M.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. Functional expression of human P-glycoprotein from plasmids using vaccinia virus-bacteriophage T7 RNA polymerase system. *Methods Enzymol.* **1998**, *292*, 456–473.

Publikationen

Wissenschaftliche Originalarbeiten

Jacobs, A.; Emmert, D.; Hrycyna, C. A.; Wiese, M. Purification and functional reconstitution of human ABCG2 expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* **2010**, submitted.

Sterz, K.; Möllmann, L.; Jacobs, A.; Baumert, D.; Wiese, M. Activators of P-glycoprotein: structure-activity relationships and investigation of their mode of action. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1879–1911.

Buchbeiträge

Jacobs, A. Arzneistoffprofile: Dimetinden, Terfenadin. In: Ammon, Mutschler, Scholz. Arzneimittelinformation und -beratung, 5. Aktualisierungslieferung, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, 2009.

Jacobs, A. Arzneistoffprofile: Azelastin, Cetirizin, Clemastin, Desloratadin, Diphenhydramin, Doxylamin, Fexofenadin, Ketotifen, Levocabastin, Levocetirizin, Loratadin, Mizolastin, Ritonavir. In: Ammon, Mutschler, Scholz. Arzneimittelinformation und -beratung, 5. Aktualisierungslieferung, Deutscher Apothekerverlag, Stuttgart, 2009.

Poster und Kongressbeiträge

Jacobs, A.; Müller, H.; Klinkhammer, W.; Wiese, M. Characterization of the binding properties of a third-generation modulator of P-glycoprotein. *CESAR-APOH Jahrestagung*, Wien, **2005**. (Poster)

Jacobs, A.; Müller, H.; Wiese, M. The usefulness of modified Schild and Clark analyses in predicting binding features of P-glycoprotein inhibitors. *FEBS Special Meeting*, Innsbruck, **2006**. (Poster)

Jacobs, A.; Wiese, M. Expression, purification, and functional investigations of BCRP in *Saccharomyces cerevisiae*. *DPhG Jahrestagung*, Erlangen, **2007**. (Poster)

Jacobs, A.; Meyer, J.; Wiese, M. Potential ligands of the Hoechst 33342 binding site of P-glycoprotein and their effect on substrate stimulated ATPase activity. *FEBS Special Meeting*, Innsbruck, **2008**. (Poster)

Jacobs, A.; Emmert, D.; France, A.; Hrycyna, C. A.; Wiese, M. Purification and functional reconstitution of human ABCG2 expressed in the yeast *S. cerevisiae*. *6th Annual North American ABC Meeting*, Frederick (Maryland, USA), **2009**. (Poster)

Verfassererklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet.

Bonn,

Anna Jacobs