

Untersuchung der Protein/Substrat-Interaktion an rekombinantem P-Glykoprotein

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Dipl. Pharm. Jens Uwe Meyer

aus

Aachen

Bonn, Februar 2008

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. Referent: Prof. Dr. Michael Wiese

2. Referent: Prof. Dr. Gerd Bendas

Tag der mündlichen Prüfung: 17. 06. 2008

Erscheinungsjahr: 2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Verfassererklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Bonn, 29. Februar 2008

Jens Uwe Meyer

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Wiese für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit, eine Vielzahl von Techniken zu erlernen und anzuwenden.

Herrn Prof. Dr. G. Bendas danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Korreferates.

Herr Dr. C. Tränkle unterstützte mich während der Planung, Durchführung und Auswertung der Radioligandbindungsexperimente und hat in vielen Diskussionen und durch konstruktive Anregungen sehr zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen. Weiterhin danke ich ihm für die Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Herrn Prof. Dr. H. Häberlein möchte ich für seine Mitwirkung in der Prüfungskommission danken.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. M. Zabe-Kühn, Leiter der Arbeitsgruppe *Functional Peptides* der Stiftung Caesar in Bonn, und seinen Mitarbeitern für die langjährige Kooperation. Insbesondere Frau Jessica Hierer trug durch die Validierung und Durchführung der Peptidanalytik zum Gelingen der Photoaffinitätsmarkierungsversuche bei.

Herrn Dr. Jürgen Sievers danke ich für die Einführung in die Arbeit mit *Saccharomyces cerevisiae* und die Techniken zur Proteinaufreinigung.

Herrn Dipl. Pharm. Christoph Globisch möchte ich an dieser Stelle für geduldige Einführung in das Gebiet der QSAR danken.

Desweiteren bedanke ich mich an dieser Stelle für die exzellente praktische Unterstützung durch die technischen Angestellten Frau Iris Jusen und Herrn Dieter Baumert.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Dipl. Pharm. Anna Jacobs für ihre stetige Hilfsbereitschaft bei den Arbeiten im Hefelabor.

Allen Mitarbeitern des Pharmazeutischen Instituts möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Atmosphäre danken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	ATP-Binding-Cassette(ABC)-Transportproteine	1
1.2	ABC-Transportprotein vermittelte Multidrug-Resistenz	3
1.3	P-Glykoprotein (P-gp)	4
1.3.1	Funktion von P-Glykoprotein	5
1.3.2	Der katalytische Zyklus von P-Glykoprotein	7
1.3.3	Bindungsstellen von P-Glykoprotein	10
1.3.4	Modulatoren und Substrate	12
1.4	Aufgabenstellung dieser Arbeit	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Allgemeine Methoden	17
2.1.1	Sterilisation von Geräten und Lösungen	17
2.1.2	Herstellung von Stammlösungen und Puffern	17
2.1.3	Proteinbestimmung	18
2.1.4	Elektrophoretische Verfahren	20
2.2	Arbeiten mit adhärent wachsenden Zellen	26
2.2.1	Kulturbedingungen	26
2.2.2	Inkulturnahme	26
2.2.3	Kultivierung	27
2.2.4	Kryokonservierung	28
2.2.5	Transfektion von CHO-K1 Zellen	29
2.2.6	Antikörpervermittelte P-Glykoprotein Detektion	31
2.2.7	Calcein-AM Transportassay	32
2.2.8	Membranpräparation	35
2.3	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
2.3.1	Herstellung der Nährmedien	39
2.3.2	Inkulturnahme	41
2.3.3	Kultivierung	42
2.3.4	Kryokonservierung	44

2.3.5	Membranpräparation	45
2.4	Aufreinigung und Rekonstitution von P-Glykoprotein	49
2.4.1	Herstellung der Lipidmischung für die Rekonstitution	49
2.4.2	Solubilisierung der Hefemembranen	50
2.4.3	Aufreinigung durch Nickelaффinitätschromatografie	52
2.4.4	Rekonstitution	54
2.5	ATPase-Assay	56
2.5.1	Herstellung der ATP-Stammlösung	56
2.5.2	Durchführung der Aktivitätsbestimmung	57
2.5.3	Bestimmung der apparenten P-Glykoprotein Expressionsrate in Hefemembranen	61
2.5.4	Aktivitätsbestimmung von aufgereinigtem P-Glykoprotein	61
2.5.5	Bestimmung der P-Glykoprotein Orientierung in Liposomenmembranen	62
2.5.6	Erstellung eines ATPase-Aktivierungsprofils	63
2.6	Analyse der quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen	65
2.6.1	Geometrieoptimierung und Berechnung der Elementarladungen	65
2.6.2	Konformationsanalyse	68
2.6.3	Dreidimensionale Struktur-Wirkungsbeziehungen	69
2.7	Radioligandbindungsstudien	74
2.7.1	Allgemeine Grundlagen	74
2.7.2	Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente	76
2.7.3	Bestimmung der Oberflächenadsorption des Radioliganden an das Arbeitsmaterial	79
2.8	Photoaffinitätsmarkierung	81
2.8.1	Durchführung	81
2.9	Strukturformeln untersuchter Substanzen	87
2.10	Allgemeine Methoden der Datenanalyse	90
2.10.1	Statistische Kennzahlen	90
2.10.2	Statistische Tests	90
2.10.3	Korrelation	93
2.11	Eingesetzte Computerprogramme	94
2.12	Chemikalien und Reagenzien	94
2.13	Verbrauchsmaterialien	96
2.14	Geräte und Zubehör	97
3	Ergebnisse und Diskussion	101
3.1	Etablierung der Zelllinie CHO-K1 M403	101

3.1.1	Selektion der Zelllinie	101
3.1.2	Funktionelle Charakterisierung der Zelllinie	105
3.1.3	Membranpräparation	111
3.1.4	Schlussfolgerungen	114
3.2	Etablierung des <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Expressionssystems	116
3.2.1	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	116
3.2.2	Membranpräparation	117
3.2.3	Schlussfolgerungen	119
3.3	Aufreinigung von rekombinantem P-Glykoprotein aus Hefemembranen . .	120
3.3.1	Aufreinigung und Rekonstitution	120
3.3.2	Charakterisierung der Proteoliposomen	123
3.3.3	Funktionelle Untersuchungen an aufgereinigtem P-Glykoprotein . .	124
3.3.4	Schlussfolgerungen	133
3.4	Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen der P-gp Modulatoren vom XR- und WK-X-Typ	135
3.4.1	Dreidimensionale Struktur-Wirkungsbeziehungen	135
3.4.2	Schlussfolgerungen	145
3.5	Radioligandbindungsstudien	146
3.5.1	Validierung der Versuchsparameter	147
3.5.2	Homologe und heterologe Konkurrenzexperimente	151
3.5.3	Korrelation mit funktionellen Daten	161
3.5.4	Schlussfolgerungen	163
3.6	Photoaffinitätsmarkierung	165
3.6.1	Photochemische Eigenschaften der ausgewählten Modulatoren . . .	165
3.6.2	Photoinaktivierungsexperimente	167
3.6.3	LC-MS Analytik und Datenanalyse	173
3.6.4	Schlussfolgerungen	184
4	Zusammenfassung	187
	Literaturverzeichnis	191

1 Einleitung

1.1 ATP-Binding-Cassette(ABC)-Transportproteine

ATP-Binding-Cassette(ABC)-Transporter sind Membranproteine, die für den Transport unterschiedlichster Substanzen, wie z. B. Phospholipide, Polysaccharide, Ionen und Peptide, durch die zellulären Lipidmembranen verantwortlich sind [1]. Sie werden durch die Gene der ABC-Superfamilie kodiert und konnten bisher in jedem sequenzierten Genom nachgewiesen werden [2]. ABC-Transporter spielen eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Nährstoffen in die Zelle, der Exkretion giftiger Metabolite, der Energiegewinnung und der Zell-Signaltransduktion [3]. Die für den Transport nötige Energie wird dabei durch die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P_i) gewonnen [1].

Funktionelle Bereiche, die für die Bindung und Hydrolyse von ATP verantwortlich sind, werden als ATP-bindende Domänen oder Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD) bezeichnet und dienen gleichzeitig als Namensgeber für diese Proteinfamilie. Mit dem Walker A Motiv, dem Walker B Motiv, dem Q-Loop und dem His-Switch enthält jede NBD vier hochkonservierte Aminosäuresequenzen [2]. Zwischen dem Walker A und Walker B Motiv liegt das ABC-Signatur Motiv, das die Zuordnung zur ABC-Superfamilie erlaubt [2]. Die Überlagerung der NBD-Sequenzen der Mitglieder dieser Superfamilie und die anschließende phylogenetische Analyse führt zu insgesamt acht Unterfamilien (ABCA bis ABCG) [4].

ABC-Transporter, die Substanzen aktiv aus einer Zelle heraus transportieren können, setzen sich aus vier Kerndomänen zusammen [3]. Die Anordnung dieser Kernelemente ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Neben zwei Nukleotid-Bindungsdomänen ist die Anwesenheit von zwei transmembranären Domänen (TMD) erforderlich, welche die Ligand-Bindungsstellen beinhalten und so für die Spezifität des Transporters

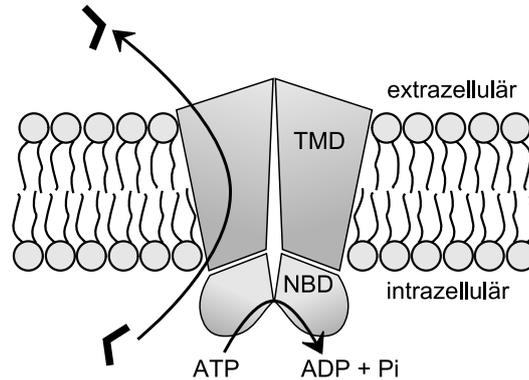


Abb. 1.1: Minimale strukturelle Merkmale eines ABC-Transporters. Die Abbildung illustriert den Aufbau aus mindestens zwei Nukleotid-Bindungsdomänen (NBD) und zwei transmembranären Domänen (TMD).

verantwortlich sind [3]. Transporter, die für den Transport von Substanzen in die Zelle zuständig sind, scheinen auf die zusätzliche Anwesenheit einer periplasmatischen Bindungsdomäne angewiesen zu sein [3].

In den bisher sequenzierten Genomen von Wirbeltieren wurden bisher insgesamt 56 Gene der ABC-Superfamilie identifiziert. Ein Großteil dieser Gene, nämlich 38, wurde dabei in jedem Genom gefunden [1]. Die hohe Konservierung dieser Gene unterstreicht die Bedeutung der ABC-Transporter für die untersuchten Organismen.

Das menschliche Genom enthält insgesamt 49 Gene, die für ABC-Transporter kodieren [5]. Die physiologischen Funktionen dieser Proteine sind vielfältig. So dient die starke Expression der Transporter P-Glykoprotein (P-gp oder ABCB1), Multidrug-resistance-associated-Protein1 (MRP1 oder ABCC1) und Breastcancer-resistance-Protein (BCRP, MXR oder ABCG2) in Darm, Leber und Nieren dem Schutz des menschlichen Körpers vor zytotoxischen Substanzen [3]. P-gp und BCRP übernehmen zusätzlich eine wichtige Barrierefunktion im Epithel besonders sensibler Gewebe, wie Gehirn oder Placenta [2]. Durch die Interaktion mit einer Vielzahl pharmakologisch wirksamer Substanzen erlangen die genannten ABC-Transporter zusätzliche Bedeutung. Werden doch pharmakokinetische Parameter, wie Absorption, Distribution, Metabolisierung und Elimination maßgeblich durch diese Interaktion mitbestimmt [6].

Die Relevanz der ABC-Transporter für den menschlichen Organismus wird auch an den z. T. dramatischen Auswirkungen von Mutationen deutlich, die in 17 der insgesamt 49 menschlichen ABC-Gene entdeckt wurden [1]. Die zystische Fibrose ist z. B. auf eine Mutation des Gens ABCC7 zurückzuführen.

1.2 ABC-Transportprotein vermittelte Multidrug-Resistenz

Die Resistenz gegen das verwendete Chemotherapeutikum kann die erfolgreiche Behandlung eines malignen Tumors verhindern [7]. Die in diesem Zusammenhang beobachtete Kreuzresistenz gegenüber Arzneistoffen, die sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrem Wirkungsmechanismus von der anfangs eingesetzten Substanz unterscheiden, wird auch als Multidrug-Resistenz (MDR) bezeichnet. Die klassische MDR basiert auf der Überexpression von ABC-Transportern und dem damit verbundenen verstärkten Transport der Arzneistoffe aus der Zelle [8]. Auf diese Weise werden zytotoxisch wirksame Konzentrationen innerhalb der Zelle verhindert. Die vier wichtigsten ABC-Transporter, die mit dem Auftreten der MDR bei der Therapie maligner Tumore in Verbindung gebracht werden, sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst. Demnach sind vor allem die Transporter für die MDR verantwortlich, die unter physiologischen Bedingungen eine Schutzfunktion übernehmen (siehe Kapitel 1.1). Unabhängig von der systematischen Einordnung der Proteine sind Überlappungen in der Substratspezifität möglich. Die aufgelisteten Substrate veranschaulichen die außerordentliche strukturelle und funktionelle Diversität der betroffenen Chemotherapeutika. Häufig liegt ihre einzige Gemeinsamkeit in einer gewissen Hydrophobie in Verbindung mit einem insgesamt amphiphilen Charakter [7].

Auch die Therapie infektiöser Krankheiten mit Antibiotika wird durch das Auftreten resistenter Krankheitserreger erschwert [9]. Eine solche Resistenz kann durch die Überexpression bakterieller ABC-Transporter hervorgerufen werden. Beispielsweise wurde in *Lactococcus lactis* das Auftreten einer bakteriellen MDR auf die Expression

Tab. 1.1: Zusammenstellung der vier wichtigsten ABC-Transporter, deren Überexpression die MDR maligner Tumore vermittelt [7].

Name	systematischer Name	Substrate
P-gp	ABCB1	Doxorubicin, Etoposid, Mitoxantron, Paclitaxel, Topotecan, Vinblastin
MRP1	ABCC1	Doxorubicin, Etoposid, Methotrexat, Paclitaxel
MRP2	ABCC2	Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid, Methotrexat, Paclitaxel
BCRP	ABCG2	Camptothecin, Mitoxantron, Topotecan

von lactococcal multidrugresistant protein ATP (lmrA) zurückgeführt [10]. Obwohl das Forschungsgebiet der ABC-Transportproteine vermittelten MDR in Bakterien noch relativ neu ist, gewinnt es durch die vermehrt beobachteten Antibiotikaresistenzen zunehmend an Bedeutung [9].

1.3 P-Glykoprotein (P-gp)

P-Glykoprotein (P-gp) ist vermutlich das am besten untersuchte und unter medizinischen Gesichtspunkten wichtigste Mitglied der ABC-Superfamilie [11]. Es wurde erstmals 1976 von Juliano und Ling in colchicinresistenten Zellen aus den Ovarien eines chinesischen Hamsters nachgewiesen und für die herabgesetzte Permeabilität der Plasmamembran gegenüber zytotoxischen Substanzen verantwortlich gemacht [12]. Diese Beobachtung führte auch zur Benennung des Proteins, so steht „P“ für Permeability. Mäuse, Ratten und Hamster verfügen durch eine Genduplizierung über zwei P-Glykoproteine [1]. Die Benennung der Proteine ist uneinheitlich. Sie erfolgt bei Hamstern mit *pgp1* bzw. *pgp2* und bei Mäusen und Ratten mit *mdr1a* sowie *mdr1b*. In den restlichen bisher untersuchten Säugetier Genomen konnte jeweils nur ein Gen nachgewiesen werden, welches für P-gp kodiert [1]. Das verbreitete Vorkommen von P-gp in verschiedenen Spezies lässt auf eine wichtige und ähnliche Funktion in allen Säugetieren schließen [1]. Im menschlichen Organismus wurde P-gp erstmals 1986 nachgewiesen [13].

Obwohl seit der Entdeckung von P-gp eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt wurden, konnte bisher die Funktionsweise des Proteins nicht vollständig aufgeklärt werden. Nachdem der Schwerpunkt zunächst auf der P-gp-vermittelten MDR lag, gewinnt die physiologische Funktion von P-gp und ihre Auswirkung auf die Pharmakokinetik von Arzneistoffen in der pharmazeutischen Forschung zunehmend an Bedeutung [14].

P-gp setzt sich aus insgesamt 1280 Aminosäuren zusammen und besitzt in der glykosylierten Form ein Molekulargewicht von etwa 170 kDa [15], in der unglykosylierten Form von 140 kDa [16]. In Abbildung 1.2 ist die Topologie des Proteins skizziert. Es besitzt den typischen vierteiligen Aufbau eines auf den Export von Substanzen ausgelegten ABC-Transporters (siehe Kapitel 1.1). Jeweils eine transmembranäre Domäne (TMD) und eine Nukleotid-Bindungsdomäne (NBD) bilden

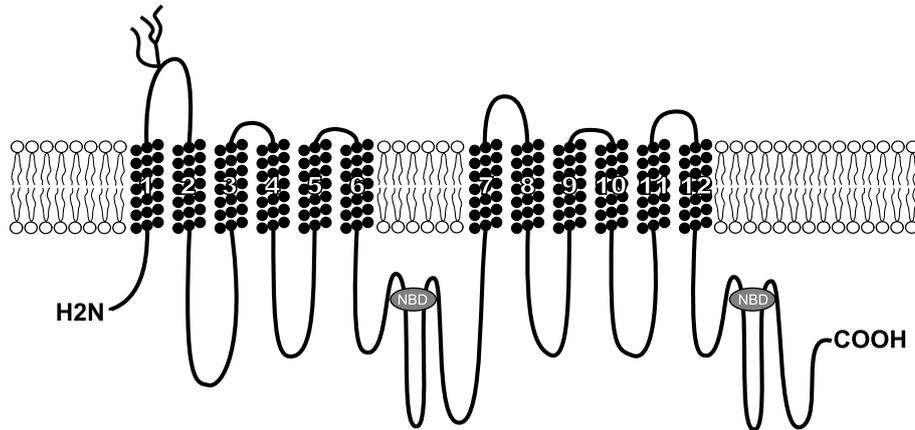


Abb. 1.2: Topologie von P-Glykoprotein

eine Transporterhälfte. Jede TMD enthält ihrerseits sechs transmembranäre Helices (TM). Ein 60 Aminosäuren langes Peptid verbindet die beiden Transporterhälften [13]. Die N-Glykosylierung des Proteins erfolgt über drei Asparaginsäuren in der extrazellulären Schleife zwischen TM1 und TM2. Anhand von Mutationsstudien konnte nachgewiesen werden, dass dieses Strukturmerkmal keinen Einfluss auf die Funktion oder Substratspezifität des Proteins hat [17, 18]. Jedoch wirkt sich das Ausmaß der Glykosylierung auf die P-gp Stabilität aus, wie der erleichterte Abbau des unvollständig glykosylierten P-gps durch die Protease Trypsin belegt [19].

1.3.1 Funktion von P-Glykoprotein

Zur Erklärung der P-gp Funktion existieren verschiedene allgemeine Modelle. Diese beschreiben den Ort der Substraterkennung und das Zielkompartiment des Transports. Einzelheiten, wie Verknüpfung von ATP-Hydrolyse und Substrattransport oder Konformationsänderungen des Proteins, werden jedoch nicht berücksichtigt.

Abbildung 1.3 zeigt die drei wichtigsten Modelle zur Beschreibung des P-gp-vermittelten Substanztransports. Aufgrund der Homologie zwischen P-gp und dem bakteriellen Hämolyisin-Transporter HlyB postulierten Gerlach et al. [20] das Porenmodell. Demzufolge bilden die beiden transmembranären Domänen einen Kanal durch die Plasmamembran und ermöglichen so den Export der P-gp Substrate. Später fanden Raviv et al. [21] Hinweise darauf, dass die Bindung des Substrats innerhalb der Plasmamembran erfolgt und leiteten daraus das „Hydrophobic vacuum cleaner (HVC)“-Modell ab. Nach dieser Theorie wird das Substrat in der

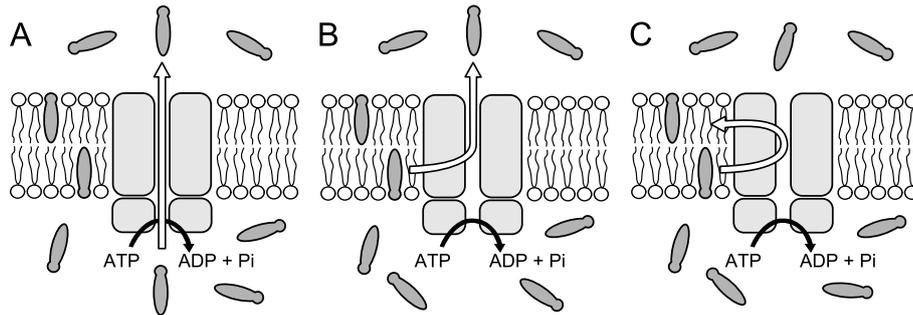


Abb. 1.3: Modelle zur Funktionsweise von P-gp: (A) Poren-Modell nach Gerlach et al. [20], (B) „Hydrophobic vacuum cleaner (HVC)“-Modell nach Raviv et al. [21] und (C) Flippase-Modell nach Higgins und Gottesmann [22].

Plasmamembran in der dem Zytosol zugewandten Phospholipidschicht erkannt und anschließend in den extrazellulären Raum transportiert. Das Flippase-Modell von Higgins und Gottesmann [22] ist mit dem HVC-Modell eng verwandt. Auch hier wird die transportierte Substanz in der dem Zytosol zugewandten Phospholipidschicht der Plasmamembran erkannt. Von dort wird das Substrat jedoch nicht in den extrazellulären Raum ausgeschleust, sondern in die äußere Phospholipidschicht der Membran transportiert. Das Modell ist nach der Enzymklasse der Flippasen benannt, die durch den Transport von Phospholipiden über einen ähnlichen Mechanismus eine asymmetrische Phospholipidzusammensetzung von Membranen ermöglichen [23].

Da eine Gemeinsamkeit der von P-gp transportierten Substanzen in ihrer Lipophilie und der damit verbundenen Anreicherung in der Plasmamembran besteht, werden das HVC-Modell und das Flippase-Modell gegenüber dem Poren-Modell favorisiert [24]. Unabhängig davon, welches der beiden Modelle zur Beschreibung der P-gp Funktion gewählt wird, muss ein Substrat vor dem Transport zunächst mit der Plasmamembran interagieren. Vorgänge, wie die Verteilung zwischen wässrigem Medium und der Membran oder die Diffusion einer Substanz durch die Membran, haben daher ebenfalls Einfluss auf den P-gp vermittelten Transport und sollten bei der Untersuchung der P-gp Funktion berücksichtigt werden [25].

1.3.2 Der katalytische Zyklus von P-Glykoprotein

Der vollständige Transportzyklus von P-gp, auch als katalytischer Zyklus bezeichnet, konnte bis heute nicht gänzlich aufgeklärt werden. Jedoch wurden auf Basis der bisher durchgeführten Untersuchungen einige detaillierte Modelle publiziert, von denen zwei im Folgenden vorgestellt werden.

Al-Shawi et al. [26] publizierten 2003 ein Modell des katalytischen Zyklus von P-gp, das erstmals auch die basale ATPase-Aktivität, also die ATPase-Aktivität in Abwesenheit eines Substrats, mit einbezog. Eine schematische Darstellung dieses Modells ist in Abbildung 1.4 gegeben. Im Zentrum der Abbildung ist das bindungskompetente P-Glykoprotein dargestellt. In diesem Zustand ist eine NBD mit ATP besetzt und die

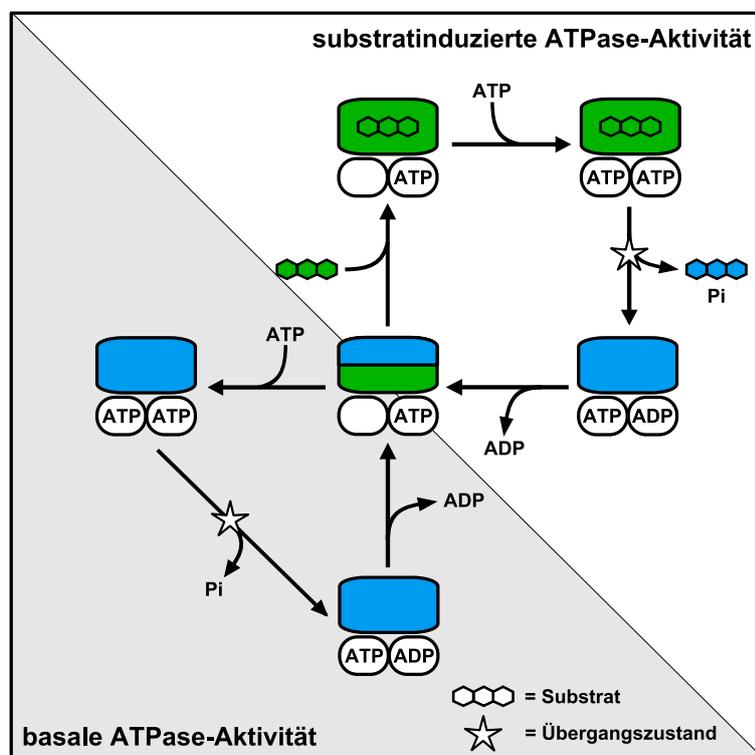


Abb. 1.4: Der katalytische Zyklus von P-gp nach Al-Shawi et al. ([26], verändert). Unten links ist der Zyklus für die basale ATPase-Aktivität in Abwesenheit eines Substrats dargestellt. Der Zyklus oben rechts beschreibt die substratinduzierte ATPase-Aktivität. Konformationen, die eine Interaktion mit den hochaffinen Bindungsstellen zulassen, sind grün eingefärbt, die blaue Kennzeichnung entspricht einer Konformation, in der die niedrigaffinen Bindungsstellen zugänglich sind. Analog dazu wurde das Substrat entsprechend der für die Interaktion zugrundeliegenden Bindungsstelle gefärbt. Der jeweils geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Zyklen ist durch ein Sternsymbol gekennzeichnet.

Substrat-Bindungsstellen mit hoher und niedriger Affinität liegen im Gleichgewicht vor. Die Bindung eines P-gp Substrats an eine hochaffine Substrat-Bindungsstelle oder die Bindung eines weiteren ATPs an die zweite Nukleotidsbindungsstelle erfolgt nun zufällig und entscheidet über den Zyklus, der durchlaufen wird.

Nach der erfolgreichen Bindung eines Substrats wird auch die zweite NBD mit ATP besetzt. Durch die folgende Hydrolyse eines ATPs zu ADP und P_i erfolgt eine Konformationsänderung, welche die Umwandlung der hochaffinen Substrat-Bindungsstelle in eine Bindungsstelle niedriger Affinität bewirkt. Diese Bindungsstelle ist in den extrazellulären Raum gerichtet, so dass der Zerfall des Substrat/Protein-Komplexes gleichzeitig den Abschluss des Transports bedeutet. Auch das gebildete Phosphation dissoziiert von seiner Bindungsstelle. Das Protein verbleibt in einer Konformation niedriger Substrataffinität bis die Freisetzung des gebundenen ADP eine erneute Konformationsänderung hin zum bindungskompetenten Grundzustand erlaubt.

Die Bindung eines zweiten ATP-Moleküls an das bindungskompetente P-gp leitet den katalytischen Zyklus ein, der der basalen ATPase-Aktivität entspricht. Erneut führt eine Konformationsänderung zur Herabsetzung der Affinität von P-gp für seine Substrate. In diesem Zustand kann das Protein seine Transportfunktion nicht übernehmen. Damit der bindungskompetente Zustand wieder erreicht wird, muss ein ATP hydrolysiert werden. Die anschließende sequenzielle Freisetzung von Phosphat und ADP bewirkt die Rückkehr des Transportproteins in die bindungskompetente Form. Bei Abwesenheit eines Substrats kann nur der katalytische Zyklus für die basale ATPase-Aktivität durchlaufen werden, während in Anwesenheit eines Substrats beide Zyklen möglich sind. Mit steigender Substratkonzentration wird das Gleichgewicht jedoch zunehmend auf die Seite des substratinduzierten katalytischen Zyklus verschoben, bis die basale Aktivität völlig zum Erliegen kommt.

Während das Modell von Al-Shawi et al. primär den vollständigen katalytischen Zyklus von P-gp erklärt, entwickelten Higgins und Linton [27] mit dem ATP-Switch Modell ein allgemeines Modell zur Beschreibung des katalytischen Zyklus von ABC-Transportern. Dieses Modell verknüpfte erstmals die Ergebnisse einer Vielzahl funktionseller Experimente mit den durch Kristallisationsversuche gewonnenen strukturellen Daten von Nukleotidbindungsdomänen und vollständigen ABC-Transportern. In Abbildung 1.5 ist der katalytische Zyklus nach dem ATP-Switch Modell schematisch dargestellt. Im Gegensatz zum Modell von Al-Shawi et al. liegt der ABC-Transporter

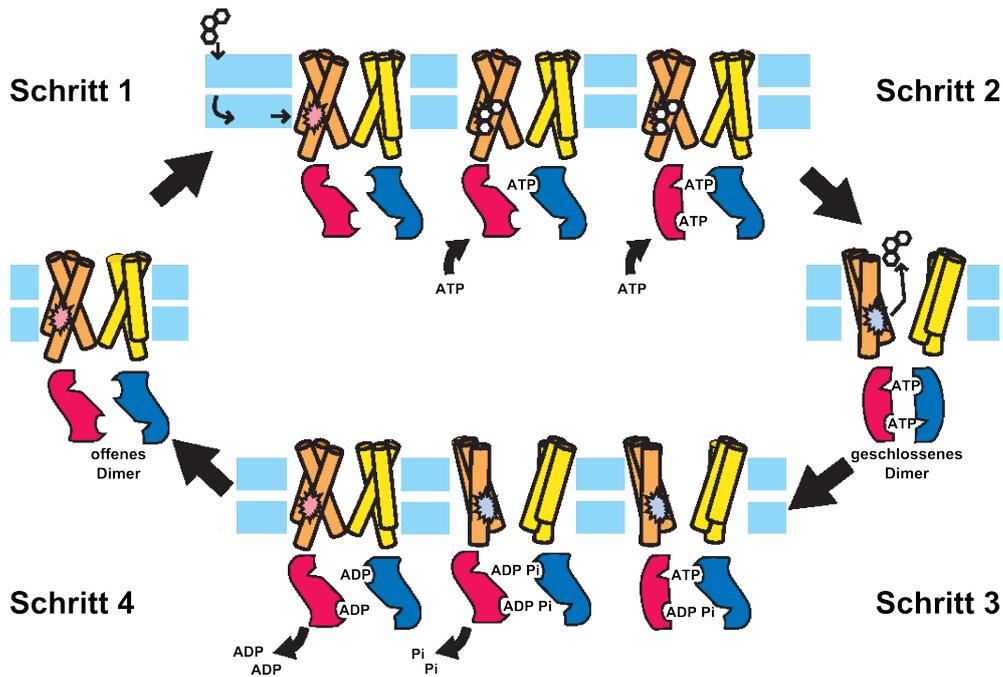


Abb. 1.5: ATP-Switch Modell nach Higgins und Linton ([27], verändert).

zu Beginn des Zyklus frei vor, d. h. weder NBD noch Substratbindungsstelle sind besetzt. Durch die Bindung eines Substratmoleküls erfolgt eine Konformationsänderung in den NBDs. Dadurch steigt die Affinität für ATP und die für die Dimerisierung der NBDs nötige Aktivierungsenergie nimmt ab. Nach der kooperativen Bindung von zwei ATP-Molekülen erfolgt im zweiten Schritt eine erneute Konformationsänderung, die durch die Dimerisierung der NBDs ausgelöst wird. Diese führt zu einer Reorientierung der Substratbindungsstelle und gleichzeitig zu einer Herabsetzung der Affinität des Transportproteins zu dem Substrat. Der Protein/Substrat-Komplex zerfällt und das Substrat diffundiert in den extrazellulären Raum. Die darauf folgende schrittweise Hydrolyse beider ATP-Moleküle im dritten Schritt ermöglicht die Dissoziation des NBD-Dimers. Die schrittweise Freisetzung des gebildeten Phosphats und ADPs ermöglicht die abschließende Konformationsänderung zum erneut bindungskompetenten Transporter. Im ATP-Switch Modell führt, anders als bei dem Modell nach Al-Shawi, bereits die Besetzung der ATP-Bindungsstellen und die daraus resultierende Dimersierung der NBDs zu einem erfolgreichen Transport. Ein weiterer Unterschied der beiden Modelle liegt in der Stöchiometrie der ATP-Hydrolyse. Während das Modell von Al-Shawi für den vollständigen Durchlauf eines katalytischen Zyklus die Hydrolyse eines ATP-Moleküls vorsieht, wird im ATP-

Switch Modell die Hydrolyse von zwei ATP-Molekülen postuliert. Jedoch erwähnen die Autoren Higgins und Linton ausdrücklich die Möglichkeit, dass einige Transporter zwei ATP-Moleküle binden aber nur ein Molekül hydrolysiert wird [27].

1.3.3 Bindungsstellen von P-Glykoprotein

Die Frage nach der Topologie und Anzahl der Bindungsstellen, die es P-Glykoprotein ermöglichen, mit strukturell unterschiedlichsten Substanzen zu interagieren, konnte bis heute nicht geklärt werden. Die Beantwortung dieser Frage wird auch zukünftig von größter Wichtigkeit sein, da sie nicht nur weitere Einblicke in die Funktion des Proteins gewähren, sondern auch die Suche nach neuen potenten Inhibitoren der Transportfunktion erleichtern würde. In der Vergangenheit wurden verschiedene Bindungsstellen mit teilweise unterschiedlichen Funktionen postuliert. Die wichtigsten Ergebnisse sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Die von Shapiro und Ling [28] durchgeführte Untersuchung der Kinetik des P-gp-vermittelten Transports von Rhodamin 123 und Hoechst 33342 führte zu dem Schluss, dass beide Substrate an unterschiedlichen Bindungsstellen binden, die sich zudem gegenseitig positiv kooperativ beeinflussen. In Anlehnung an die verwendeten Substrate wurden die Bindungsstellen R(Rhodamin)- und H(Hoechst)-Seite genannt. Zusätzlich wurde in Übereinstimmung mit dem HVC-Modell (siehe Kapitel 1.3.1) die H-Seite in der dem Zytoplasma zugewandten Phospholipidschicht der Plasmamembran lokalisiert und ein Transport von Hoechst 33342 aus der Membran heraus beobachtet [29, 30]. Colchicin und Quercetin wurden im Anschluß der H-Seite zugeordnet, während Anthrazykline, wie Doxorubicin oder Daunorubicin, mit der R-Seite interagierten. Die Substanzen Vinblastin, Actinomycin D und Etoposid zeigten hingegen keine Prävalenz für eine der beiden Bindungsstellen. Diese Modell wurde später noch um eine dritte Bindungsstelle mit rein regulatorischer Funktion erweitert [31]. Die Interaktion von Progesteron oder Prazosin mit dieser Bindungsstelle führte ebenfalls im Sinne einer positiven Kooperativität zur Stimulation des P-gp-vermittelten Transports sowohl von Rhodamin 123 als auch Hoechst 33342.

Martin et al. [32] wählten Radioligandbindungsexperimente zur Untersuchung der Bindungsstellen von P-gp. Die Ergebnisse dieser Versuche führten zu einem Modell mit mindestens vier unterschiedlichen Bindungsstellen. In Übereinstimmung mit dem zuvor vorgestellten Modell wurde erneut eine Bindungsstelle für Hoechst 33342

postuliert. Mit dieser Bindungsstelle interagierten auch die Substanzen XR9576 und XR9051. Diese Modulatoren der dritten Generation (siehe Kapitel 1.3.4) wurden jedoch scheinbar nicht transportiert. Zusätzlich wurden noch jeweils eine transportkompetente Bindungsstelle für Vinblastin und Paclitaxel sowie eine vierte Bindungsstelle mit regulatorischer Funktion für die Substanzen GF120918 und Nicardipin vorgeschlagen. Der Versuch, auch für Rhodamin 123 eine Bindungsstelle festzulegen, blieb erfolglos. Sowohl die Möglichkeit einer Interaktion mit der Paclitaxel- als auch mit der GF120918-Bindungsstelle wurde diskutiert. Jedoch konnte auch eine weitere unabhängige Bindungsstelle für Rhodamin 123 nicht ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zum Modell von Shapiro und Ling [28, 31] beeinflussen sich die Bindungsstellen hier negativ kooperativ.

Die Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse und Modelle zur Spezifität und Anzahl der Bindungsstellen führte schließlich zu insgesamt sieben verschiedenen Bindungsstellen [33]. Neben den Erkenntnissen, die durch die bereits beschriebenen Methoden gewonnen worden waren, wurden auch Daten aus Photoaffinitätsmarkierungen zur Identifizierung und Charakterisierung der Bindungsstellen herangezogen. Auch in diesem Modell ist eine Interaktion verschiedener Bindungsstellen im Sinne einer positiven oder negativen Kooperation möglich.

Versuche, einzelne hochspezifische Bindungsstellen zu definieren, führten zu einer Vielzahl verschiedener hypothetischer Bindungsstellen, die zudem untereinander teilweise widersprüchliche Interaktionsmuster zeigten. Eine mögliche Erklärung ist, dass P-gp nicht über einzelne Bindungsstellen verfügt, sondern über große Bindungsdomänen [34]. Wie in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt, können die bisherigen Ergebnisse auch durch eine solche Bindungsdomäne erklärt werden. Diese Theorie wird durch verfügbare Kristallstrukturen anderer Multidrug-Transporter, die jedoch nicht zur Familie der ABC-Transporter gehören, gestützt [34]. P-gp besitzt möglicherweise zwei dieser Bindungsdomänen. So postulierten Loo und Clarke [35] aufgrund von Affinitätsmarkierungen an P-gp Einzel-Cystein-Mutanten mit thiolreaktiven Substraten zwei große Bindungsdomänen, die an den Schnittstellen der beiden transmembranären Domänen liegen. Bei Photoaffinitätsmarkierungen mit Propafenon-Derivaten wurde dieser Bereich ebenfalls als Bindungsdomäne identifiziert [36].

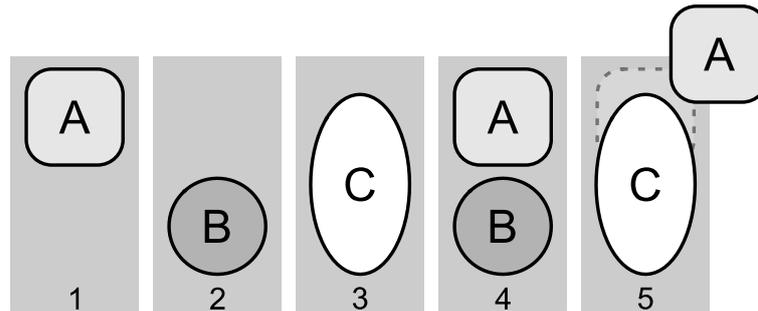


Abb. 1.6: P-gp Bindungsdomänen nach Higgins ([34], verändert). Eine große Bindungsdomäne kann jeweils die Substanz A (1), Substanz B (2) oder Substanz C (3) einzeln aufnehmen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, zwei kleinere Moleküle gleichzeitig zu binden (4). Dieses Verhalten könnte bei der Untersuchung der Bindungsstellen zu Ergebnissen führen, die die Existenz von unabhängigen Bindungsstellen nahelegen. Überlappen sich die Bindungsareale zweier Substanzen (5), könnte dies als Konkurrenz der beiden Substanzen um die gleiche Bindungsstelle interpretiert werden.

1.3.4 Modulatoren und Substrate

Ursprünglich wurden Zytostatika, die durch den P-gp-vermittelten Transport aus den Zellen ihre Wirkung verloren, als Substrate bezeichnet. Im Laufe der Zeit wurde die Gruppe der Substrate um fluoreszierende Substanzen, wie z. B. Calcein-AM, Rhodamin 123 oder Hoechst 33342, erweitert [37]. Substanzen, die die Transportfunktion *in vitro* einschränkten und so die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den Zytostatika wieder herstellen konnten, ohne dabei selbst eine zytotoxische Wirkung auf die Zellen zu zeigen, wurden in die Kategorie der MDR-Modulatoren oder kurz Modulatoren eingeordnet. Neben der Bezeichnung Modulator sind auch Inhibitor, Reverser, Modifier oder Chemosensitizer gebräuchlich [15]. Als einer der ersten klassischen Modulatoren wurde Verapamil 1981 von Tsuruo et al. identifiziert [38]. Aus dieser Entdeckung resultiert auch die Idee das klinische Problem der MDR, durch den Einsatz von Modulatoren zu lösen.

In Tabelle 1.2 sind einige Substrate und Modulatoren aufgeführt. Aus der Tabelle geht hervor, dass die P-gp Expression in Tumorzellen eine Resistenz gegen einen Großteil der zur Verfügung stehenden Zytostatika bewirkt. Im Laufe der Zeit wurde jedoch auch eine Vielzahl von Modulatoren entdeckt. Die Modulatoren der ersten Generation sind Arzneistoffe, deren Indikation ursprünglich nicht die Therapie maligner Tumore beinhaltete [39]. Neben Calcium-Antagonisten, wie Verapamil oder Nifedipin, umfasst diese Gruppe z. B. auch das immunsuppressiv wirkende Cyclosporin A oder

Tab. 1.2: Zusammenstellung von P-gp Substraten und Modulatoren (Tabelle modifiziert nach [39]).

Substrate		Modulatoren	
Substanzklasse	Substanz	Substanzklasse	Substanz
Vincaalkaloide	Vinblastin	1. Generation	Amiodaron
	Vincristin		Chinidin
Anthrazykline	Doxorubicin	2. Generation	Chinin
	Daunorubicin		Cyclosporin A
	Epirubicin		Nifedipin
Epipodophyllotoxine	Etoposid		Verapamil
	Teniposid		Dexniguldipin
Taxane	Docetaxel	Dexverapamil	
	Paclitaxel	PSC-833 (Valspodar)	
Kinaseinhibitoren	Imatinib	3. Generation	GF120918 (Elacridar)
	Camptothecine		Irinotecan
Topotecan			LY335979 (Zosuquidar)
SN-38			XR9576 (Tariquidar)
Verschiedene	Actinomycin D		V-104
	Colchicin	VX-710 (Biricodar)	
	Methotrexat	R101933 (Laniquidar)	
	Mitoxantron		

die Antimalariamittel Chinidin und Chinin. Die Hoffnung, dass die gleichzeitige Anwendung dieser Modulatoren mit den von der MDR betroffenen Zytostatika zur Aufhebung der MDR führt, bestätigte sich in klinischen Studien jedoch größtenteils nicht. Diese Modulatoren zeigten meist keine Wirkung oder mussten in solch hohen Dosen eingesetzt werden, dass die durch die pharmakologische Eigenwirkung verursachten Nebenwirkungen zum Abbruch der Therapie führten. Einzig bei der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML) konnte ein therapeutischer Nutzen für Cyclosporin A [40] und bei der Behandlung des myelodysplastischen Syndroms ein therapeutischer Nutzen für Chinin festgestellt werden [41].

Die Weiterentwicklung der Modulatoren der ersten Generation führte zu den Modulatoren der zweiten Generation. So ist beispielsweise Dexverapamil das R-Enantiomer von Verapamil. Seine Wirksamkeit als Calcium-Antagonist ist deutlich herabgesetzt und die zuvor für Verapamil beobachteten Nebenwirkungen dadurch stark vermindert. Ein weiteres Beispiel ist PSC-388 (Valspodar), bei dem es sich um ein Derivat von Cyclosporin A handelt, welches neben einer verminderten immunsuppressiven Wirkung *in vitro* auch eine bessere P-gp Inhibition zeigt [42]. In klinischen Studien wurden jedoch erhebliche Auswirkungen auf die Pharmakokinetik der eingesetzten

Zytostatika beobachtet. Diese wurden auf eine Interaktion mit Cytochrom P450 3A4 zurückgeführt. Da das Ausmaß dieser unerwünschten Wechselwirkung unberechenbar war, führte dies schließlich zur Einstellung der klinischen Untersuchung von PSC-833 [39].

Die dritte Generation setzt sich aus Substanzen zusammen, die speziell für den Einsatz als MDR-Modulator konzipiert wurden [39]. Sie verfügen über eine hohe Affinität zu P-gp bei gleichzeitig nur geringfügig ausgeprägten Effekten auf die Pharmakokinetik der eingesetzten Zytostatika [39]. Trotz dieser vielversprechenden Eigenschaften mussten auch bei diesen Substanzen klinische Studien aufgrund erhöhter Toxizität abgebrochen werden.

Neben der vorgestellten klassischen Einteilung werden auch alternative Möglichkeiten zur Definition typischer Substrat- und Modulatoreigenschaften diskutiert. Nach Eytan et al. [43] lassen sich Substrate und Modulatoren mechanistisch anhand der Geschwindigkeit unterscheiden, mit der sie die Zellmembran überwinden. Substrate diffundieren demnach langsam durch die Membran und werden daher effektiv transportiert. Modulatoren hingegen weisen eine hohe Diffusionsgeschwindigkeit auf. Dies führt zu einer raschen Absättigung der P-gp Transportfunktion durch den Modulator und damit zu einem ungehinderten Einstrom des Substrats.

Eine weitere Alternative bietet das System nach Polli et al. [44]. Es löst sich völlig vom Begriff des Modulators und die Klassifizierung einer Substanz erfolgt nach der Untersuchung ihrer Auswirkung auf die P-gp Funktion mit drei verschiedenen *in vitro* Testsystemen. Zwei dieser Testsysteme wurden auch in dieser Arbeit eingesetzt. Sie werden in Kapitel 2 näher beschrieben. Das dritte Testsystem, der sogenannte Monolayer-Transportassay, ermöglicht die direkte Bestimmung des P-gp-vermittelten Substanztransports [45]. Tabelle 1.3 zeigt die möglichen Kategorien.

Tab. 1.3: Funktionelle Charakterisierung von Substanzen bezüglich ihrer Interaktion mit P-gp nach Polli et al. [44].

Kategorie	Monolayer-Transportassay	ATPase-Assay	Calcein-AM Transportassay
eindeutiges Substrat	+	+	+
transportiertes Substrat	+	+/-	+/-
nicht transportiertes Substrat	-	+	+
Inhibitor	-	-	+
kein Substrat	-	-	-

1.4 Aufgabenstellung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Zunächst liegt der Fokus auf der Etablierung heterologer Expressionssysteme und deren Nutzen für funktionelle Untersuchungen an P-gp. Der zweite Teil beschäftigt sich vor allem mit der Frage, wie die Bindung von Substanzen an P-gp mit Hilfe der etablierten Expressionssysteme genauer untersucht werden kann.

Funktionelle Untersuchungen an P-Glykoprotein werden häufig an Zelllinien durchgeführt, die den MDR-Phänotyp durch Selektion mittels Zytostatikum entwickelten. Jedoch kann der Resistenzgrad dieser Zellen häufig nicht allein durch die Überexpression von P-gp erklärt werden [46]. Weiterhin besteht unter Selektionsdruck die Gefahr der Einführung von Punktmutationen, die zu einer veränderten Substratspezifität des Transporters führen können und im Folgenden die Ergebnisse aus funktionellen Tests verfälschen [47, 48]. Beide Phänomene treten bei der heterologen Expression von P-gp nicht auf. Ein Ziel dieser Arbeit ist daher die Etablierung zweier Expressionssysteme und deren Einsatz in funktionellen Testsystemen.

Zunächst werden Ovarienzellen des chinesischen Hamsters mit humaner *mdr1* cDNA transfiziert und charakterisiert. Mit dem Calcein-AM Transportassay werden funktionelle Daten für einen Testsatz von neun Substanzen erhoben. Dieser Datensatz wird mit den bisher unter Verwendung der resistenten Zelllinie A2780adr erhobenen Daten verglichen und auf Abweichungen, die auf die oben genannten Phänomene zurückzuführen sind, untersucht.

Mit der Etablierung des auf *Saccharomyces cerevisiae* basierenden Expressionssystems von Figler et al. [49] sollte die Möglichkeit geschaffen werden, humanes P-gp in größeren Mengen aufzureinigen und in einer chemisch definierten Umgebung zu rekonstituieren. Die so erhaltenen P-gp-haltigen Proteoliposomen bieten die Möglichkeit, funktionelle Untersuchungen ohne störende zelluläre Einflüsse durchzuführen. Dazu wird mit dem ATPase-Assay ein weiteres Testsystem etabliert und anschließend zur Charakterisierung einer Reihe in der Arbeitsgruppe neu synthetisierter Modulatoren eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen mit den Ergebnissen bestehender funktioneller Testsysteme verglichen werden. Abschließend sollen die quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen der untersuchten Modulatoren analysiert werden.

Bei den bisher verwendeten Testsystemen handelt es sich ausnahmslos um indirekte Testsysteme. Der Effekt einer Testsubstanz auf P-gp wird indirekt durch die erhöhte Konzentration einer Substanz in der Zelle oder durch Anstieg der ATPase-Aktivität nachgewiesen. Keines der Testsysteme lässt die Untersuchung der Testsubstanzen direkt an der Bindungsstelle zu.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich daher mit Methoden zur direkten Untersuchung der Bindung von Substanzen an P-gp oder aber dem Aufbau der Bindungsstellen selbst. Die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor wird klassischerweise mit Radioligand-Bindungsexperimenten untersucht. Aufbauend auf der Arbeit von Martin et al. [32] soll daher die Möglichkeit geprüft werden, Gleichgewichtsbindungsexperimente im Mikrotiterplattenformat durchzuführen. Das für diese Experimente verwendete Homogenat wird dabei sowohl aus den Zellen der Expressionssysteme als auch aus A2780adr Zellen gewonnen.

Der Aufbau von Bindungsstellen kann durch sogenannte Photoaffinitätsmarkierungen in Kombination mit massenspektrometrischen Methoden untersucht werden. Hierbei wird ein Rezeptor, in diesem Fall P-gp, in Anwesenheit eines photoaktivierbaren Liganden mit UV-Licht bestrahlt. Es folgt die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Ligand und Rezeptor. Da dies in der Regel sehr schnell abläuft, wird der Ligand in unmittelbarer Nähe seiner Bindungsstelle mit dem Protein verknüpft. Wird das Protein anschließend enzymatisch verdaut und einer massenspektrometrischen Analyse zugeführt, können markierte Bereiche durch Massendifferenzanalyse ermittelt werden. In Kombination mit computergestützten Modellen lassen sich daraus Rückschlüsse über Art und Lage der Bindungsstellen ziehen. Bei den in der Literatur beschriebenen Photoaffinitätsmarkierungen werden meist P-gp-haltige Membranpräparationen verwendet [50]. Durch die Verwendung von tritiierten Sonden kann das markierte P-gp mit Hilfe der Autoradiografie in der Vielzahl der Membranproteine detektiert und anschließend weiter analysiert werden. Die Verwendung von aufgereinigtem P-gp könnte die nachträgliche Detektion des markierten Proteins unnötig machen. Es sollen daher Versuche mit den nicht radioaktiv markierten Substanzen H19, Progesteron und WK-X-87 durchgeführt werden. Nach enzymatischem Verdau und massenspektrometrischer Analyse soll überprüft werden, inwieweit sich bestimmte Bindungsbereiche identifizieren lassen und ob die Ergebnisse mit Literaturdaten vergleichbar sind.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemeine Methoden

2.1.1 Sterilisation von Geräten und Lösungen

Das Risiko einer mikrobiologischen Kontamination der in dieser Arbeit kultivierten Organismen wurde durch Sterilisation der verwendeten Glasgeräte und Lösungen reduziert. Thermostabiles Sterilisiergut wurde im Autoklaven für 30 min bei 121 °C und 2 bar dampfsterilisiert. Lösungen, die thermolabile Stoffe enthielten, wurden durch einen bakterienzurückhaltenden Aufschraubmembranfilter in eine zuvor autoklavierte Glasflasche sterilfiltriert.

2.1.2 Herstellung von Stammlösungen und Puffern

Stammlösungen und Puffer wurden stets auf die gleiche Weise hergestellt. Zunächst wurden alle flüssigen Bestandteile in einem Becherglas vorgelegt und mit dem Lösungsmittel auf etwa 90 % des Gesamtvolumens aufgefüllt. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die festen Bestandteile unter Rühren gelöst und gegebenenfalls der pH-Wert eingestellt. Als Elektrode wurde eine Kalomel-Elektrode verwendet, da die häufig eingesetzte Puffersubstanz Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris) Inkompatibilitäten mit herkömmlichen Silber-/Silberchlorid-Elektroden zeigt. Vor der Messung wurde das pH-Meter mit Standardpuffern im Zweipunktverfahren kalibriert. Die Standardpuffer wurden dafür wie die zu vermessende Lösung temperiert. Anschließend wurde die Lösung in einen geeigneten Messkolben überführt, bei Raumtemperatur (RT) mit Lösungsmittel auf das gewünschte Volumen ergänzt und in das Lagergefäß umgefüllt. Nun wurde der pH-Wert ein letztes Mal kontrolliert und wenn nötig rejustiert. Bis zur weiteren Verwendung lagerten die so hergestellten Puffer und Stammlösungen unter den jeweils angegebenen Bedingungen.

2.1.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts einer Probe erfolgte nach der Methode von Kaplan et al. [51]. Diese Methode beruht auf der Adsorption des Farbstoffs Amidoschwarz 10B an Proteine. Die adsorbierte Farbstoffmenge wird photometrisch bestimmt und korreliert mit dem Proteingehalt. Im Gegensatz zu anderen häufig verwendeten Methoden, wie z. B. den Methoden nach Bradford oder Lowry, ist diese weniger störanfällig gegenüber hohen Lipidkonzentrationen und häufig verwendeten Pufferzusätzen, wie Thiolreagenzien oder EDTA.

Verwendete Lösungen

Stammlösungen in Wasser

100 ml	100 % Trichloressigsäure(TCA)-Lösung	100 % (m/V)
100 ml	6 % Trichloressigsäure(TCA)-Lösung	6 % (m/V)

Zur Herstellung der Lösungen wurden 100 g TCA in einem 100 ml Messkolben vorgelegt und in Wasser gelöst. Die 6 % TCA-Lösung wurde durch Verdünnung aus der 100 % TCA-Lösung gewonnen. Die Lagerung erfolgte in 100 ml Medizinalgläsern bei 4–8 °C.

Amidoschwarz-Färbelösung

50 ml	Eisessig	10 % (V/V)
225 ml	Methanol	45 % (V/V)
1,25 g	Amidoschwarz 10B	0,25 % (m/V)
ad 500 ml	Wasser	

Entfärbelösung

10 ml	Eisessig	2 % (V/V)
450 ml	Methanol	90 % (V/V)
ad 500 ml	Wasser	

Tris-SDS-Lösung

pH 7,5 bei RT

12,1 g	Tris	1 mol/l
2 g	Natriumdodecylsulfat (SDS)	2 % (m/V)
ad 100 ml	Wasser	

Die Lagerung der Tris-SDS-Lösung erfolgte bei RT in einem 100 ml Medizinalglas.

Elutionslösung

125 µl	EDTA-Na pH 8,0	0,05 mmol/l
0,5 g	Natriumhydroxid	25 mmol/l
ad 500 ml	50 % (V/V) Ethanol	

Alle drei Stammlösungen wurden in 500 ml Duranglasflaschen bei RT gelagert.

Durchführung

Die Probelösungen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt. Dabei wurden Volumina gewählt, die einen Proteingehalt zwischen 5 und 10 µg erwarten liessen. Zusätzlich wurde mit einer BSA-Stammlösung eine Kalibriergerade, bestehend aus neun Messpunkten im Bereich von 0 bis 15 µg Gesamtprotein, hergestellt. Nun wurden die Ansätze in allen Reaktionsgefäßen mit Wasser auf ein Endvolumen von 225 µl ergänzt.

Die im Folgenden aufgeführten Reaktionslösungen wurden mit dem Handdispenser pipettiert. Zunächst wurden die Proteine durch Zugabe von je 30 µl der Tris-SDS-Lösung und Mischen mit dem Vortexschüttler solubilisiert. Die Ansätze wurden dann mit 50 µl eiskalter 100 % TCA-Lösung versetzt, gemischt und mindestens 2 min bei RT inkubiert. Dies führte zur Präzipitation der Proteine.

Während der Inkubation wurde der Vakuumblock vorbereitet. Ein zuvor zurechtgeschnittenes Stück Polyvinylidendifluorid(PVDF)-Membran wurde 15 s mit Methanol benetzt und anschließend 2 min im Wasserbad befeuchtet. Danach wurde ein mit Wasser getränktes Stück Filterpapier in den Vakuumblock eingelegt, die Membran auf dem Filterpapier platziert und das Gerät vollständig zusammengebaut. Der Vakuumblock wurde an die Membranpumpe angeschlossen und ein Unterdruck von 600 mbar angelegt. Nun wurden die Proben in die dafür vorgesehenen Kammern pipettiert. Anschließend wurden alle Reaktionsgefäße mit 200 µl eiskalter 6 % TCA-Lösung nachgespült und die Spüllösung erneut in die entsprechenden Kammern pipettiert. Danach erfolgte eine letzte Spülung der Probenkammern mit 200 µl 6 % TCA-Lösung und die Membran wurde aus der Apparatur entnommen.

Die anschließenden Färbe- und Entfärbeschritte wurden unter ständigem Schütteln der mit der jeweiligen Flüssigkeit bedeckten Membran auf dem Horizontalschüttler bei RT durchgeführt. Zunächst wurde die Membran für 20 min in 25 ml Amidoschwarz-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran entnommen und überschüssige Färbelösung innerhalb 1 min im Wasserbad abgewaschen. Unspezifisch gebundener Farbstoff wurde durch Inkubation der Membran in 25 ml Entfärbelösung für 3 min entfernt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, wobei die Entfärbelösung jeweils erneuert wurde. Verbleibende Reste der Entfärbelösung wurden durch die sich anschließende dreiminütige Inkubation der Membran in Wasser abgewaschen. Danach wurde die Membran bei RT getrocknet.

Die einzelnen Proben wurden mit einer Einloch-Zange aus der Membran in Pyrex-Glasröhrchen ausgestanzt und der Farbstoff in 1,0 ml Elutionslösung innerhalb von 15 min unter regelmäßigem Schütteln gelöst. Die Absorption der Proben wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 630 \text{ nm}$ gegen Wasser als Referenz gemessen.

2.1.4 Elektrophoretische Verfahren

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmler [52] ermöglicht die Trennung eines Proteingemischs nach dem Molekulargewicht der einzelnen Proteine im elektrischen Feld. Die Proteine werden zunächst mit Dithiothreitol (DTT) reduziert und mit SDS solubilisiert. Diese beiden Vorgänge bewirken eine weitgehende Aufhebung proteinspezifischer Strukturen und die Maskierung der Proteineigenladungen. Hierdurch wird eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht ermöglicht.

Die Technik des Western-Blots oder Immuno-Blots bietet die Möglichkeit des spezifischen Nachweises eines Proteins mit Hilfe eines Antikörpers. Dazu müssen die Proteine zunächst aus dem Polyacrylamidgel eluiert werden. Dies geschieht durch Anlegen eines elektrischen Felds senkrecht zur Geloberfläche. Die Proteine bewegen sich entlang dem elektrischen Feld aus dem Gel heraus. Nachdem sie das Gel verlassen haben, kommt es zu starken hydrophoben Wechselwirkungen mit einer auf dem Gel platzierten Membran. Dies führt zu einer Immobilisierung der Proteine auf dieser Membran.

Einzelne Proteine können nun mit einem sogenannten primären Antikörper spezifisch markiert werden. Anschließend erfolgt der Nachweis des gebundenen Antikörpers mit einem gegen das F_C -Fragment des primären Antikörpers gerichteten sekundären Antikörper. Durch Reaktion eines kovalent an den sekundären Antikörper gebundenen Enzyms mit seinem Substrat kann der Antikörperkomplex schließlich detektiert werden.

Verwendete Lösungen**Stammlösungen in Wasser**

100 ml	Tris-HCl pH 8,8	1 mol/l
100 ml	Tris-HCl pH 6,8	1 mol/l
10 ml	10 % SDS-Lösung	10 % (m/V)
10 ml	Tris-Lösung	20 mmol/l
1 ml	Ammoniumpersulfat(APS)-Lösung	10 % (m/V)
1 ml	Dithiothreitol(DTT)-Lösung	3,2 mol/l

Die Tris-Stammlösungen wurden bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Die SDS-Lösung wurde bei RT gelagert. Die APS-Lösung und DTT-Lösung sind instabil. Sie wurden daher erst am Versuchstag hergestellt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

Elektrophoresepuffer-Stammlösung

pH 8,9 bei RT

144 g	Glycin	1,92 mol/l
30 g	Tris	0,25 mol/l
10 g	SDS	1 % (m/V)
ad 1 000 ml	Wasser	

Die Elektrophoresepuffer-Stammlösung wurde bis zur weiteren Verwendung in einer 1 000 ml Duranglasflasche bei 4–8 °C gelagert.

Coomassieblau-Färbelösung

250 ml	Methanol	50 % (V/V)
50 ml	Eisessig	10 % (V/V)
1,25 g	Coomassie Brilliant Blau R250	0,25 % (m/V)
ad 500 ml	Wasser	

Coomassieblau-Entfärbelösung

200 ml	Methanol	20 % (V/V)
100 ml	Eisessig	10 % (V/V)
ad 1 000 ml	Wasser	

Die Coomassieblau-Färbelösung und -Entfärbelösung wurden in Duranglasflaschen bei RT gelagert. Coomassieblau-Färbelösung wurde mehrfach verwendet.

Bromphenolblau-Lösung

10 µl	96 % (V/V) Ethanol	0,1 % (V/V)
~ 1 mg	Bromphenolblau	gesättigt
ad 10 ml	Wasser	

Die Bromphenolblau-Lösung wurde in einem 15 ml PP-Röhrchen hergestellt. Es handelte sich um eine gesättigte Lösung. Ungelöster Farbstoff wurde durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand zur Herstellung des Probenauftragspuffers verwendet. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C.

Probenauftragpuffer (PAP)

1,75 ml	Tris-HCl pH 6,8	175 mmol/l
1,5 ml	Glycerol	15 % (V/V)
5 ml	10 % SDS-Lösung	5 % (m/V)
1,25 ml	Bromphenolblau-Lösung	12,5 % (V/V)

Der Probenauftragpuffer wurde ebenfalls in einem 15 ml PP-Röhrchen hergestellt, aliquotiert (475 µl) und in 1,5 ml PP-Reaktionsgefäßen bei -20°C gelagert. Der PAP wurde kurz vor der Verwendung durch Zugabe von 25 µl DTT-Lösung (Endkonzentration: 160 mmol/l) vervollständigt. Die Konzentrationsangaben der Bestandteile entsprechen denen der finalen Konzentrationen im gebrauchsfertigen Puffer.

Transferpuffer

pH 8,2–8,4 bei RT

28,80 g	Glycin	192 mmol/l
6,06 g	Tris	25 mmol/l
ad 2 000 ml	Wasser	

Der Transferpuffer wurde am Tag vor der Durchführung des Western-Blots hergestellt. Nach dem Lösen der Substanzen im Wasser sollte der pH-Wert im Bereich von pH 8,2–8,4 liegen. Die Lösung wurde dann bis zur Verwendung auf $4-8^{\circ}\text{C}$ gekühlt.

TBS¹-Stammlösung

pH 7,3 bei RT

40 g	Natriumchlorid	1,37 mol/l
6,06 g	Tris	100 mmol/l
ad 500 ml	Wasser	

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Salzsäure eingestellt und die Lösung in einer 500 ml Duranglasflasche bei $4-8^{\circ}\text{C}$ gelagert.

TBS-Stammlösung diente zur Herstellung von:

TBS	TBS-Stammlösung und Wasser im Verhältnis 1:9
TBST²	TBS mit 0,2 % (V/V) Tween20
Blockierungslösung	TBST mit 5 % (m/V) Magermilchpulver

Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die zu untersuchenden Proteinproben, ein Aliquot Protein-Größenstandard und ein Aliquot Probenauftragpuffer (PAP) wurden auf Eis aufgetaut. Zwei 25 ml Rundkolben wurden mit einem 1,5 cm Rührfisch versehen. Für das Trenngel mit einer Acrylamid-Endkonzentration von 7,5 % (m/V) wurden 3,750 ml Acrylamid-Lösung (30 % (m/V)), 5,625 ml Tris-HCl pH 8,8 und 5,365 ml Wasser in einen der Rund-

¹Trisgepufferte Salzlösung, engl.: Tris buffered saline

²Trisgepufferte Salzlösung mit Tween20, engl.: Tris buffered saline with Twain20

kolben pipettiert. Der Ansatz wurde anschließend unter ständigem Rühren durch Anlegen eines Unterdrucks (50 mbar) für 15 min entgast. Auf diese Weise wurde gelöster Sauerstoff entfernt, der die Polymerisation des Acrylamids verhindern würde. Nach dem Entgasen wurde der Ansatz durch rasche Zugabe von 150 μl der SDS-Lösung, 12 μl TEMED und 100 μl der APS-Lösung komplettiert und unter Vermeidung von Schaumbildung gemischt. Nun wurde der Trenngelansatz mit Hilfe einer Plastikeinmalpipette in die Gießvorrichtung eingebracht und mit Wasser überschichtet. Innerhalb einer Polymerisationszeit von 30 min bildete sich das feste Trenngel. Währenddessen wurde der PAP durch Zugabe von 25 μl DTT-Lösung (Endkonzentration DTT: 16 mmol/l) vervollständigt und weiterhin auf Eis gelagert.

Für das Sammelgel wurden für eine Acrylamid-Endkonzentration von 5 % (m/V) 833 μl Acrylamid-Lösung, 625 μl Tris-HCl pH 6,8 und 3,465 ml Wasser in den Rundkolben pipettiert. Die Lösung wurde ebenfalls mindestens 15 min entgast. Nach Ablauf der Polymerisationszeit wurde der Sammelgelansatz durch Zugabe von 50 μl SDS-Lösung, 5 μl TEMED und 20,8 μl APS-Lösung vervollständigt und vorsichtig gemischt. Das Wasser wurde nun vom Trenngel abgegossen und die Gießvorrichtung vollständig mit dem Sammelgelansatz aufgefüllt. Anschließend wurde unter Vermeidung von Lufteinschlüssen die Probestaschen-Schablone eingesetzt. Nach 30 min erreichte das Sammelgel eine ausreichende Festigkeit und die Schablone konnte entfernt werden.

Das Gel wurde der Gießvorrichtung entnommen und in die Gelkammer eingesetzt. Nun wurden 100 ml Elektrophoresepuffer-Stammlösung mit Wasser auf ein Volumen von 1 l verdünnt und die Elektrophoresekammer mit dieser Lösung befüllt. Abschließend wurden alle Probestaschen mit Elektrophoresepuffer gespült.

Während der Polymerisation des Sammelgels wurden die Proteinproben auf die gewünschte Konzentration verdünnt und im Verhältnis 1:1 mit PAP versetzt. Die Konzentrationen wurden dabei so gewählt, dass schließlich 3 bis 5 μg Gesamtprotein pro Bahn auf dem Gel aufgetragen waren. Der Standard wurde ebenfalls mit PAP versetzt. Durch Inkubation der Proben und des Standards für 30 min bei 37 °C im Thermostat wurden die Disulfidbrücken der Proteine reduziert. Nun wurde das Gel mit den Proben und dem Proteinstandard beladen und die elektrophoretische Trennung durch Anlegen einer Spannung von 200 V gestartet. Sobald die Bromphenolblaubande das Ende des Gels erreichte, wurde die Elektrophorese beendet. Dies geschah in der Regel nach etwa 40 min.

Nun wurde das Gel der Apparatur entnommen und das Sammelgel mit einem Spatel abgetrennt. Im verbleibendem Trenngel konnten dann entweder alle Proteine mit Coomassieblau angefärbt oder, unter Auslassung der Coomassieblaufärbung, einzelne Proteine mit Hilfe des Western-Blots (s.u.) spezifisch nachgewiesen werden.

Für die Färbung mit Coomassieblau wurde das Trenngel zunächst dreimal 5 min in Wasser inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte innerhalb einer Stunde die Färbung mit Coomassieblau. Die unspezifische Färbung der Gel-Matrix wurde durch Inkubation in Wasser für 12–16 h oder durch dreimalige Inkubation in Entfärbelösung für je 30 min entfernt. Alle beschriebenen Inkubationsschritte wurden bei RT auf dem Horizontalschüttler durchgeführt. Das so erhaltene Gel wurde mit dem Scanner dokumentiert.

Durchführung des Western-Blots

Ein Stück PVDF-Membran wurde auf die Trenngelgröße zugeschnitten, 20 s mit Methanol benetzt und anschließend bis zur Verwendung unter Schütteln in Transferpuffer aufbewahrt. Vor der Durchführung des Western-Blots wurde das Trenngel für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Währenddessen wurde der am Vortag vorbereitete Kühlakku in den Blotting-Tank eingesetzt, der Tank bis zur Hälfte mit Transferpuffer gefüllt und ein Rührfisch hinzugefügt. Die gesamte Apparatur wurde auf einem Magnetrührer platziert. Die Durchführung des nächsten Arbeitsschrittes erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Entwicklerschale. Das Gel und die Membran wurden nun gemäß der Herstellerangabe in die Blot-Kassette eingesetzt. Alle Bestandteile waren dabei immer vollständig mit Transferpuffer bedeckt. Eventuell eingeschlossene Luftblasen wurden durch leichten Druck mit einem Glasstab entfernt. Anschließend wurden die Kassetten in die Apparatur eingesetzt und fehlender Transferpuffer im Tank ergänzt. Die Apparatur wurde verschlossen und eine Spannung von 100 V bei einer Stromstärke von 350 mA angelegt. In den folgenden 60 min wurden die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen.

Nach Abschluss des Elektrobots und der Entnahme der Membranen aus der Apparatur wurde die Antigen-Antikörper-Reaktion durchgeführt. Dies erforderte die Inkubation der Membranen in verschiedenen Lösungen. Alle diese Inkubationsschritte fanden bei RT auf dem Horizontalschüttler (Intensitätsstufe „4“) statt. In einem

geeigneten Gefäß wurden zunächst 50 ml Blockierungslösung vorgelegt. Durch Inkubation der Membran in Blockierungslösung für 1 h wurde die Membranoberfläche mit Milchproteinen abgesättigt und so die unspezifische Antikörperbindung minimiert. Überschüssige Blockierungslösung wurde durch dreimaliges Spülen mit 50 ml TBST für je 10 min abgetrennt. Die Bindung des primären Antikörpers C219 erfolgte während der einstündigen Inkubation der Membran in 10 ml Antikörperlösung. Anschließend wurde der Blot in der Antikörperlösung über Nacht im Kühlschrank gelagert. Vor der Verwendung wurde der Antikörper C219 in einer Lösung aus 5 % (m/V) bovinem Serumalbumin (BSA) und 0,1 % (m/V) Natriumazid in TBS im Verhältnis 1:640 verdünnt. Bei C219 handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der mit Hilfe von Mäusen gewonnen wurde. Er richtet sich gegen ein hoch konserviertes Epitop und kann daher neben humanem P-gp auch P-gp aus anderen Spezies wie z. B. Hamstern detektieren [53].

Nach der Inkubation wurde die Antikörperlösung in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt. Da der Zusatz von Azid die Lösung vor mikrobiologischen Kontaminationen schützt, konnte sie über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten wiederverwendet werden. Die Lagerung erfolgte bei 4–8 °C.

Die Membran wurde nun dreimal für je 10 min mit je 40 ml neu hergestellter TBST gewaschen. Währenddessen wurden 20 ml einer Lösung von 5 % (m/V) Magermilchpulver in TBST hergestellt. Der sekundäre Antikörper wurde mit dieser Lösung im Verhältnis von 1:20 000 verdünnt. Jede Membran wurde nun mit 10 ml der Lösung versetzt und 1,5 h bei RT inkubiert. Die Antikörperlösung wurde dann verworfen und die Membranen zweimal 10 min mit je 40 ml TBST gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift verblieben die Membranen bis zur Detektion in TBST. Der sekundäre Antikörper richtet sich gegen das F_C-Fragment des primären Antikörpers und ist mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase konjugiert.

Zur Detektion wurden 4 ml ECL-Reagenz (engl. Enhanced Chemiluminescence) gemäß der Herstellerangaben hergestellt. Die TBST-Lösung wurde von der Membran entfernt und 2 ml ECL-Reagenz auf den Rand der Membran pipettiert. Durch leichtes Schwenken verteilte sich das Reagenz gleichmäßig über die gesamte Membran. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min bei RT inkubiert. Die Reaktion der mit dem sekundären Antikörper konjugierten Meerrettich-Peroxidase mit dem ECL-Reagenz führte zur Chemilumineszenz, welche abschließend mit der Geldokumentationseinheit detektiert wurde.

2.2 Arbeiten mit adhären wachsenden Zellen

Die verwendeten Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) und der European Collection of Cell Cultures (ECACC) bezogen. Für diese Arbeit wurden die Zelllinien A2780sens (ECACC-Nr. 93112519), A2780adr (ECACC-Nr. 93112520) und CHO-K1 (DSMZ-Nr. ACC110) eingesetzt.

Die A2780-Zelllinien wurden aus humanem Ovarialkarzinomgewebe gewonnen. Durch Selektion mit dem Zytostatikum Doxorubicin zeigen die Zellen der Zelllinie A2780adr eine hauptsächlich durch P-gp vermittelte multiple Zytostatikaresistenz. Die Säugerzelllinie CHO-K1 wurde durch eine Ovarienbiopsie eines ausgewachsenen chinesischen Hamsters gewonnen. Die im Folgenden beschriebenen Kultivierungstechniken gelten gleichermaßen für alle verwendeten Zelltypen.

Alle Arbeiten, die eine Fortführung der Kultivierung zum Ziel hatten, wurden unter aseptischen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom vorgenommen.

2.2.1 Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator bei 37 °C unter CO₂ Begasung (CO₂-Anteil der Atmosphäre: 5 % (V/V)) und einer relativen Luftfeuchte von 96 %. Die A2780 Zelllinien wurden in RPMI-1640 Medium kultiviert, dem 10 % (V/V) fötales Kälberserum (FKS) und 1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin(P/S)-Lösung zugesetzt worden waren. Die CHO-K1 Zellen wurden in Ham's F12 Medium mit 10 % (V/V) FKS, 1 % (V/V) P/S-Lösung und 1 % (V/V) L-Glutamin-Lösung kultiviert. Die Expression von P-gp in transfizierten CHO-K1 Zellen wurde durch Supplementierung des Nährmediums mit 0,2 mg/ml Geneticin (G418) aufrechterhalten.

2.2.2 Inkulturnahme

Vor Beginn der Arbeiten wurde das Nährmedium im Wasserbad auf 37 °C temperiert. Zur Inkulturnahme wurde dann ein Aliquot Zellsuspension im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt. Nun wurde mit Nährmedium auf ein Volumen von 10 ml ergänzt und die Zellen durch Zentrifugation in der

Laborzentrifuge (Ausschwingrotor) für 4 min bei $266 \times g$ und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren in 20 ml frischem Nährmedium resuspendiert. Die Suspension wurde in eine Kulturflasche mit 75 cm^2 Bodenfläche überführt. Nach einer Inkubationszeit von drei bis vier Tagen war der Kulturansatz konfluent und musste subkultiviert werden.

2.2.3 Kultivierung

Verwendete Lösungen

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS ³)		pH 7,4 bei RT
4 g	Natriumchlorid	137 mmol/l
0,1 g	Kaliumchlorid	2,7 mmol/l
0,9 g	Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	10,1 mmol/l
0,12 g	Kaliumdihydrogenphosphat	1,8 mmol/l
ad 500 ml	Wasser	

Abweichungen des pH-Wertes wurden mit Salzsäure oder Natronlauge ausgeglichen. Danach wurde der Puffer in einer verschlossenen 500 ml Duranglasflasche autoklaviert und nach dem Abkühlen bei $4-8^\circ\text{C}$ gelagert.

Durchführung

Die Kultivierung der Zellen fand unter den beschriebenen Bedingungen (Kapitel 2.2.1) statt. Alle zwei bis drei Tage wurden die Kulturen überprüft und gegebenenfalls verbrauchtes Nährmedium ersetzt. Sobald der Zellrasen etwa 90 % Konfluenz erreichte, wurden die Zellen subkultiviert.

Vor Beginn der Arbeiten wurden das Nährmedium, PBS und die Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % und 0,02 % (m/V)) im Wasserbad auf 37°C temperiert. Das verbrauchte Nährmedium wurde abgesaugt und Reste des Nährmediums mit PBS (halbes Kulturvolumen) vom Zellrasen gewaschen. Anschließend wurde der Zellkultur Trypsin-EDTA-Lösung (1/10 des Kulturvolumens) zugesetzt und diese durch Schwenken des Kulturgefäßes gleichmäßig verteilt. Nach Inkubation im Brutschrank für 2–3 min bei 37°C wurde die proteolytische Reaktion durch Zugabe von Nährmedium (halbes Kulturvolumen) beendet. Die mehrfache Aufnahme der Lösung mit

³engl. Phosphate buffered saline

einer Pipette und die anschließende Abgabe gegen die Kulturfläche führte zu einer vollständigen Ablösung des Zellrasens. Die resultierende Zellsuspension wurde in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt und 4 min bei 4 °C und $266 \times g$ (Laborzentrifuge, Ausschwingrotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das verbleibende Zellpellet wurde in Nährmedium (halbes Kulturvolumen) resuspendiert und die Zellzahl pro Milliliter Suspension mit dem Zellzähler bestimmt.

In einem neuen Kulturgefäß wurde dann Nährmedium vorgelegt und die Kultur mit der Zellsuspension angeimpft. Für Zellen vom CHO-K1 Typ wurde dabei eine Zelldichte von 6 000–7 000 Zellen/cm² für A2780 Kulturen von 20 000–30 000 Zellen/cm² eingesetzt. Die Kulturvolumina richteten sich nach den verwendeten Kulturgefäßen und sind Tabelle 2.1 zuzunehmen.

Tab. 2.1: Verwendete Kulturgefäße und Volumina

Kulturgefäß	Kulturfläche	Kulturvolumen
Kulturflasche	75 cm ²	15 ml
	175 cm ²	25 ml
Kulturschale	145 cm ²	20 ml
Kulturplatte	6 × 9,6 cm ²	3 ml
	24 × 1,9 cm ²	1 ml
	96 × 0,3 cm ²	0,2 ml

2.2.4 Kryokonservierung

Die Zellen wurden in einer Kulturflasche mit 175 cm² Bodenfläche kultiviert, bis sie etwa 90 % Konfluenz erreichten. Dann wurde, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, ein Zellpellet gewonnen. Anschließend erfolgte die Resuspension dieses Pellets in 10 ml Nährmedium, das mit 10 % (V/V) Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt war. Jeweils 1,8 ml dieser Suspension wurden in sterile Kryo-Röhrchen über Nacht bei –80 °C eingefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung (siehe Kapitel 2.2.2) in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.5 Transfektion von CHO-K1 Zellen

Für die heterologe Expression von Proteinen in Säugerzellkulturen muss zunächst die für das Protein kodierende Desoxyribonukleinsäure (DNS) in die Zellen eingebracht werden. Dieser Vorgang wird mit dem Oberbegriff Transfektion bezeichnet. Für eine erfolgreiche Expression des Proteins sind neben der kodierenden DNS weitere funktionelle DNS-Abschnitte, wie z. B. ein Promoter nötig. Daher wird die kodierende DNS vor der Transfektion mit molekularbiologischen Methoden in ein Plasmid integriert, welches über die für die Expression nötigen DNS-Sequenzen verfügt. Häufig enthalten diese Plasmide zusätzlich einen Bereich, der zur Koexpression eines zweiten Proteins führt. Dieser sogenannte Marker ermöglicht später, erfolgreich transfizierte Zellen von nicht transfizierten Zellen zu unterscheiden.

Wie die DNS bei der Transfektion in die Zellen gelangt, ist von der verwendeten Methode abhängig. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Lipofektion durchgeführt. Dabei wird die Plasmid-DNS zunächst mit einer Liposomenformulierung aus einem kationischen Lipid und einem neutralen Kolipid in einen Lipid/DNS-Komplex überführt. Durch Fusion dieser Liposomen mit der Zellmembran wird die DNS anschließend in die Zelle aufgenommen. Nachdem die DNS das Zytoplasma der Zelle erreicht, gelangt sie über einen bisher ungeklärten Mechanismus in den Zellkern und vermittelt von dort die Expression des Proteins [54].

Durchführung

In einer sechsfach Kulturplatte wurden drei CHO-K1 Kulturen aus je 20 000 Zellen angelegt (siehe Kapitel 2.2.3) und für 18–24 h unter Standardbedingungen kultiviert. Etwa eine Stunde vor Ablauf der Inkubationszeit wurden die Plasmid-Lösungen und das Roti-Fect™-Transfektionsreagenz auf RT temperiert. In ein 1,5 ml PP-Reaktionsgefäß wurden 10 µg pcDNA3.1(+)-mdr1 [55] Plasmid-DNS pipettiert. In ein weiteres Reaktionsgefäß wurden 10 µl Transfektionsreagenz vorgelegt. Beide Lösungen wurden mit Nährmedium, welches weder FKS noch Antibiotika enthielt, auf ein Volumen von 60 µl ergänzt. Nun wurden die Lipidlösung und mit der DNS-Lösung vereinigt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt. Für Kontrollversuche wurde zusätzlich jeweils ein Ansatz mit dem Ausgangsplasmid pcDNA3.1(+) und ein Ansatz ohne DNS hergestellt. Die Ausbildung des DNS/Lipid-Komplexes erfolgte während der sich anschließenden Inkubation (40 min) bei RT. Kurz vor Ende der Inkubation wurde das Medium von den Zellkulturen abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit je 2 ml

PBS gewaschen und die Zellen mit 0,8 ml serumhaltigem Medium (ohne Antibiotika) versetzt. Jeder der drei Ansätze wurde in eine der Zellkulturkammern pipettiert. Die Transfektionsansätze wurden für 6 h im Brutschrank inkubiert. Dann wurde in jeder Kulturkammer 1,2 ml vollständiges Nährmedium ergänzt und erneut für 16 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Nährmedium ausgetauscht und die Zellen für weitere 48 h kultiviert.

Nach dieser Inkubationsphase begann die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen. Durch die Supplementierung des Nährmediums mit 0,2 mg/ml G418 konnten sich nur noch Zellen vermehren, die das Plasmid erfolgreich aufgenommen hatten. Der Austausch des Nährmediums erfolgte während dieser Zeit alle zwei bis drei Tage. Sobald die Kulturen etwa 80–90 % Konfluenz erreichten, wurden sie, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, subkultiviert. Die Kultivierung erfolgte weiterhin in sechsfach Zellkulturplatten. Nach drei Wochen wurden aus den Transfektionsansätzen Nebenkulturen in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Kulturfläche angelegt. Diese wurden, wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben, kryokonserviert.

Die Zellen aus den Hauptkulturen wurden mit Hilfe der Grenzwertverdünnung (limiting dilution) kloniert [56]. Dazu wurde eine 80–90 % konfluente Kultur wie gewohnt subkultiviert. Ein Teil der Zellen wurde nach der Resuspendierung in frischem Nährmedium so verdünnt, dass sich eine Zellkonzentration von 10 Zellen/ml, 3 Zellen/ml bzw. 1 Zelle/ml ergab. Mit einer Multikanalpipette wurden dann jeweils 32 Kammern einer 96fach Zellkulturplatte mit je 100 µl der Verdünnungen versehen und abschließend in jeder Kammer 100 µl Nährmedium ergänzt. Dieses Vorgehen führte statistisch zu 1 Zelle/Kammer bei einer Ausgangskonzentration von von 10 Zellen/ml (analog für die anderen Verdünnungen: 0,3 Zellen/Kammer bzw. 0,1 Zellen/Kammer). Nach vier Tagen Inkubation im Brutschrank wurden alle Kulturkammern am Mikroskop auf Zellkolonien überprüft und 50 % des Nährmediums erneuert. Vier Tage später wurde dieser Vorgang wiederholt. Kammern, die auch bei der zweiten Überprüfung nur eine Kolonie enthielten, wurden markiert. Nachdem die Kolonien aus den markierten Kammern Konfluenz erreichten, wurden sie bei der folgenden Subkultivierung vollständig in eine 24fach Zellkulturplatte überführt. Beim nächsten Subkultivierungsschritt wurden die klonierten Zellen vollständig in 6fach Zellkulturplatten ausplattiert. Nachdem die Kulturen erneut Konfluenz erreichten, wurden sie in Zellkulturflaschen mit 75 cm² Kulturfläche weiter kultiviert. Dann wurde jeder Klon kryokonserviert (vergleiche Kapitel 2.2.4).

2.2.6 Antikörpervermittelte P-Glykoprotein Detektion

Die Expression von P-Glykoprotein (P-gp) in lebenden Zellen wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers 17F9 nachgewiesen. Der Antikörper richtet sich gegen ein extrazelluläres Epitop des Proteins [53]. Durch die zusätzliche Markierung des Antikörpers mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC), lässt sich die P-gp Expression direkt durch Bestimmung der zellgebundenen Fluoreszenz am Durchflusszytometer nachweisen.

Verwendete Lösungen

Waschpuffer

0,5 g	BSA	0,5 % (m/V)
100 ml	PBS	

Inkubationspuffer

0,5 g	BSA	0,5 % (m/V)
0,1 g	Natriumazid	0,1 % (m/V)
100 ml	PBS	

Die PBS Herstellung ist in Kapitel 2.2.3 beschrieben. Beide Puffer wurden vor jedem Versuch hergestellt und auf 4–8 °C gekühlt.

Durchführung

Das vorliegende Protokoll basiert auf einer im Internet publizierten Methode [57]. Zunächst wurde eine Zellsuspension, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, hergestellt. Je eine Million Zellen wurden in zwei 15 ml PP-Röhrchen überführt. Von diesem Zeitpunkt an wurden die Zellen zwischen den einzelnen Arbeitsschritten auf Eis gekühlt. Durch Zentrifugation in der Laborzentrifuge (Ausschwingrotor mit Adaptern für 15 ml PP-Röhrchen) für 4 min bei $266 \times g$ und 4 °C, Resuspendierung in 1 ml Waschpuffer und erneute Zentrifugation wurden die Zellen von Nährmedium befreit. Anschließend wurde ein zweiter Waschschrift mit 1 ml Inkubationspuffer durchgeführt. Die resultierenden Zellpellets wurden in jeweils 100 µl Inkubationspuffer resuspendiert.

Danach wurde ein Ansatz mit 20 μl Antikörperlösung versetzt, der andere mit 20 μl Inkubationspuffer. Beide Ansätze wurden für 40 min in der Dunkelheit auf Eis inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch einen weiteren Waschschrift mit 2 ml Inkubationspuffer abgetrennt, die Zellen in 1 ml Waschpuffer resuspendiert und die Suspensionen in FACS-Teströhrchen überführt.

Die Proben wurden dann am Durchflusszytometer vermessen. Die Anregung des Fluorophors erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 488 \text{ nm}$. Das resultierende Signal wurde im Fluoreszenzkanal 1 (Filter: $530 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$, Spannung: 550 V) mit logarithmischer Verstärkung gemessen. Der Messwert des ersten Ansatzes entsprach dem geometrischen Mittelwert der gemessenen Fluoreszenzintensitäten von 15000 antikörpermarkierten Einzelzellen. Der zweite Ansatz lieferte die Autofluoreszenz der Zellen. Aus der Differenz der beiden Messwerte ergab sich schließlich die antikörpervermittelte Fluoreszenz.

2.2.7 Calcein-AM Transportassay

Beim Calcein-AM Transportassay handelt es sich um einen funktionellen Test, der auf den besonderen Eigenschaften des Calcein-Acetoxy-methylesters (Calcein-AM) aufbaut. Aufgrund seiner Lipophilie kann der Ester die Zellmembran überwinden und durch passive Diffusion in das Zytoplasma der Zelle gelangen. Dort wird die Esterfunktion durch unspezifische Esterasen gespalten. Das entstandene fluoreszierende Calcein kann aufgrund seiner durch die deprotoniert vorliegenden Carbonsäuregruppen bedingten Ladung die Zellmembran nicht mehr durch passive Diffusion überwinden.

Da es sich bei Calcein-AM um ein P-gp Substrat handelt, akkumuliert in P-gp exprimierenden Zellen wesentlich weniger Calcein. Wird nun ein P-gp Modulator zugesetzt, führt dieser, bedingt durch die Hemmung des P-gp vermittelten Calcein-AM Transports, zu einer verstärkten Calcein-Akkumulation und somit zu einer größeren Fluoreszenzintensität. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig und wird in diesem Testsystem zur Untersuchung der P-gp Funktion und zur Charakterisierung von Modulatoren genutzt.

Die Durchführung und Auswertung des Calcein-AM Transportassays erfolgte weitgehend nach dem von Henrik Müller [58] etablierten Protokoll.

Verwendete Lösungen

Krebs-HEPES-Puffer (KHP)		pH 7,4 bei RT
3,48 g	Natriumchlorid	119 mmol/l
0,175 g	Kaliumchlorid	4,7 mmol/l
0,082 g	Kaliumdihydrogenphosphat	1,2 mmol/l
2,64 g	D-Glucose	29,3 mmol/l
1,19 g	HEPES	10 mmol/l
0,072 g	Calciumchlorid-Dihydrat	1,3 mmol/l
0,148 g	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	1,2 mmol/l
ad 500 ml	Wasser	

Der pH-Wert wurde mit 1 mol/l Natronlauge eingestellt. Der vollständige Puffer wurde aliquotiert (25 ml) und bis zur weiteren Verwendung in 50 ml PP-Röhrchen bei -20°C gelagert.

Durchführung

Aus einer 90 % konfluenten Kultur wurde, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, eine Zellsuspension gewonnen und die Zellzahl pro Milliliter bestimmt. Der Calcein-AM Transportassay wurde mit insgesamt drei Millionen Zellen in einer 96fach PS-Mikrotiterplatte durchgeführt. Dazu wurde das der Zellzahl entsprechende Volumen in 1,5 ml PP-Reaktionsgefäße überführt und die Zellen durch Zentrifugation in der Tischzentrifuge für 5 s bei $10\,600 \times g$ und RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml Krebs-Hepes-Puffer (KHP) überschichtet und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml KHP resuspendiert und die Suspension in einer Pipettierschale mit weiteren 9 ml KHP versetzt.

Die Suspension wurde in der Pipettierschale mit Hilfe einer Multikanalpipette homogenisiert und in die 96fach PS-Mikrotiterplatte überführt (90 μl Suspension pro Kulturkammer). In Abweichung zum Standardprotokoll wurden die CHO-K1 Zellen nun für 90 min unter Standardkulturbedingungen (vergleiche Kapitel 2.2.1) inkubiert. Anschließend wurden 10 μl Modulatorlösung in Duplikaten und aufsteigender Konzentration zu der Zellsuspension pipettiert. Zusätzlich wurden zur Bestimmung des ungehemmten Calcein-AM Transports zwei Kammern mit 10 μl Puffer versehen. Auf diese Weise konnten pro Mikrotiterplatte bis zu vier Modulatoren untersucht werden. Anschließend wurde erneut für 30 min unter Standardkulturbedingungen

inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Messkammer des POLARSTAR Galaxy Microplate-Readers auf 37 °C temperiert.

Nach dieser Inkubationsphase wurden die Zellen mit je 33 µl einer 1,75 µmol/l Calcein-AM-Stammlösung in KHP versetzt (Endkonzentration: 0,43 µmol/l Calcein-AM) und der Anstieg der Fluoreszenz mit Hilfe des Microplatereaders gemessen. Die Parameter für die Messung wurden wie folgt festgelegt: Für die Messung wurde ein „Required value“ von 20 % und der „Gain-Wert“ auf 35 eingestellt. Die gesamte Platte wurde im „Platemode“ über einen Zeitraum von 2760 s bei einer Exzitationswellenlänge von 485 nm ± 6 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm ± 17,5 nm vermessen. Bei diesen Einstellungen wurden für jede Kammer 23 Fluoreszenzwerte im Abstand von je 120 s bestimmt. Die Vermessung der Mikrotiterplatte erfolgte horizontal mit einer Intervallzeit von 0,5 s zwischen zwei Reihen. Die Lichtblitzfrequenz bei der Messung betrug 10 s⁻¹.

Datenanalyse

Mit Hilfe der linearen Regression wurde zunächst für jede Messreihe der Fluoreszenzanstieg pro Zeit in Form der Steigung der ermittelten Geraden bestimmt. Diese Steigung wurde nun auf der Ordinate (bezeichnet als Effekt) gegen den Logarithmus der eingesetzten Modulatorenkonzentration auf der Abzisse aufgetragen. Aus diesen Daten wurde unter Verwendung von Gleichung (1) mit Hilfe der nichtlinearen Regression eine sigmoidale Kurve generiert.

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{(\log EC_{50} - \log X) \cdot n_H}} \quad (1)$$

Bei der Gleichung handelt es sich um die klassische vier-Parameter-logistische-Gleichung. Die Variable y beschreibt den Fluoreszenzanstieg pro Zeit. Sie ist abhängig von dem Logarithmus der eingesetzten Substanzkonzentration ($\log X$). Die Werte \min und \max definieren den minimalen Fluoreszenzanstieg in Abwesenheit der Testsubstanz, beziehungsweise den durch die Testsubstanz maximal erreichbaren Fluoreszenzanstieg. Der EC₅₀-Wert gibt die Konzentration an, die einen halbmaximalen Effekt auslöst und entspricht dem Wendepunkt der Kurve. Der Hillkoeffizient n_H beschreibt die Steilheit der Kurve. Ein von $n_H = 1$ abweichender Hillkoeffizient kann erste Hinweise auf einen nicht rein kompetitiven Mechanismus liefern. Die Auswertung mit einem variablen Hillkoeffizienten erfolgte nur, nachdem diese

Entscheidung mit einem F-Test (vgl. Kapitel 2.10.2) abgesichert wurde. Ansonsten wurde ein konstanter Hillkoeffizient von $n_H = 1$ eingesetzt. Die Gleichung entsprach dann der drei Parameter logistischen Gleichung.

2.2.8 Membranpräparation

Zur Herstellung einer Membranpräparation müssen die Zellen zunächst aufgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dies mit Hilfe eines Messerhomogenisators bewerkstelligt. Nach dieser sogenannten Homogenisierung können die verschiedenen Zellorganellen durch differenzielle Zentrifugation fraktioniert werden. Diese Technik beruht darauf, dass Partikel, unter Vernachlässigung von Dichteunterschieden, mit abnehmender Größe in einer Flüssigkeit langsamer sedimentieren. Durch aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte mit steigenden g -Zahlen lassen sich die Organellen so grob nach ihrer Größe trennen. Die im folgenden Protokoll beschriebene Zentrifugation über einem Saccharosekissen soll eine zusätzliche Reinigung der Plasmamembranfraktion bewirken. Das Saccharosekissen bewirkt eine Auftrennung von Partikeln ähnlicher Größe aufgrund ihrer Dichte. So werden Membranpartikel von Partikeln mit höherer Dichte abgetrennt, da sie durch das Saccharosekissen stärker gebremst werden [54].

Verwendete Lösungen

Stammlösungen in Wasser

10 ml	Magnesiumchlorid-Hexahydrat-Stammlösung	1 mol/l
10 ml	Calciumchlorid-Stammlösung	1 mol/l
50 ml	EDTA-Na pH 7,4	0,2 mol/l

Der pH-Wert der EDTA-Lösung wurde mit 10 mol/l Natronlauge eingestellt und die Lösung in einem 50 ml PP-Röhrchen bei 4–8 °C gelagert. Die beiden anderen Lösungen wurden in 15 ml PP-Röhrchen bei –20 °C gelagert.

Erntepuffer		pH 7,5 bei RT
6,80 g	Kaliumdihydrogenphosphat	50 mmol/l
0,373 g	Kaliumchlorid	5 mmol/l
8,77 g	Natriumchlorid	150 mmol/l
ad 1 000 ml	Wasser	

Der pH-Wert wurde mit 1 mol/l Natronlauge eingestellt und der Puffer in einer 1 000 ml Duranglasflasche bei 4–8 °C gelagert.

Waschpuffer		pH 7,5 bei 4 °C
21,39 g	Saccharose	0,25 mol/l
0,3 g	Tris	10 mmol/l
50 µl	Magnesiumchlorid-Hexahydrat-Stammlösung	0,2 mmol/l
ad 250 ml	Wasser	

Der pH-Wert wurde mit 1 mol/l Salzsäure eingestellt und der Puffer in einer 1000 ml Duranglasflasche bei 4–8 °C gelagert.

Homogenisierungspuffer nach Lever		pH 7,5 bei 4 °C
21,39 g	Saccharose	0,25 mol/l
0,3 g	Tris	10 mmol/l
50 µl	Calciumchlorid-Stammlösung	0,2 mmol/l
ad 250 ml	Wasser	

Saccharosekissen		pH 7,5 bei 4 °C
87,5 g	Saccharose	35 % (m/V)
0,3 g	Tris	10 mmol/l
73 mg	EDTA	1 mmol/l
ad 250 ml	Wasser	

Verdünnungspuffer		pH 7,5 bei 4 °C
42,79 g	Saccharose	0,25 mol/l
0,6 g	Tris	10 mmol/l
ad 500 ml	Wasser	

Resuspensionspuffer nach Lever		pH 7,4 bei 4 °C
8,56 g	Saccharose	0,25 mol/l
0,12 g	Tris	10 mmol/l
ad 100 ml	Wasser	

Alle Puffer auf Tris-Basis wurden im Kühlkammerlabor mit 1 mol/l Salzsäure auf den gewünschten pH-Wert eingestellt und in geeigneten Duranglasflaschen bei 4–8 °C gelagert.

Durchführung

Eine ausreichende Ausbeute bei der Membranpräparation wurde nur erreicht, wenn die Zellen zunächst im großen Maßstab vermehrt worden waren. Dazu wurde zunächst, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, eine Kultur in zwei Gewebekulturschalen mit 145 cm² Bodenfläche angelegt. In den folgenden Subkultivierungsschritten wurde die Kultur dann auf zehn Kulturschalen und schließlich auf 40 Kulturschalen vergrößert. Die

Membranpräparation erfolgte mit der etwa 90 % konfluenten Kultur in Anlehnung an das Protokoll von Lever et al. [59].

Zunächst wurde das Nährmedium von jeder Kulturplatte abgesaugt und durch 3 ml Erntepuffer ersetzt. Anschließend wurde der Zellrasen mit Hilfe eines Zellschabers von der Kulturfläche gelöst. Die Zellsuspension von je zehn Kulturschalen wurde in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt.⁴ Zur Erhöhung der Ausbeute wurden jeweils fünf Kulturschalen mit 5 ml Erntepuffer nachgespült. Der Puffer wurde dabei von einer Schale in die nächste überführt und schließlich gleichmäßig auf die 50 ml PP-Röhrchen verteilt. Auf diese Weise ergaben sich schließlich viermal je 40 ml Zellsuspension. Durch die durchgehende Kühlung dieser Suspension auf Eis sollte der proteolytischen Abbau der Membranproteine während der Präparation verhindert werden. Nun wurden die Zellen durch zehnmütige Zentrifugation in der Laborzentrifuge (Ausschwingrotor) bei $4\,000 \times g$ und 4°C pelletiert. Jedes Pellet wurde mittels eines Vortexschüttlers in 20 ml Erntepuffer resuspendiert und die Zentrifugation wiederholt. Danach wurde das Pellet in 20 ml Homogenisierungspuffer nach Lever resuspendiert.

Im darauf folgenden Schritt wurden die Zellen mit Hilfe des Polytron-Homogenisators durch fünf Hübe auf Stufe "6" von jeweils 15 s Dauer zerkleinert und so die Membranfragmente gewonnen. Zwischen den Hüben wurde für 3 min auf Eis gekühlt, um eine Überhitzung der Suspension zu verhindern.

Nach der Homogenisierung wurde mit der EDTA-Stammlösung in der Suspension eine EDTA-Konzentration von 1 mmol/l eingestellt und einige 100 μl Proben des Homogenats zur späteren Untersuchung bei -80°C eingefroren. Anschließend wurde das Homogenat für 10 min bei $800 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Das resultierende Pellet (P1) wurde in 5 ml Resuspensionspuffer nach Lever aufgenommen und Proben der Suspension bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Der Überstand wurde in vier neue 50 ml PP-Röhrchen überführt, mit 5 ml des Saccharosekissens unterschichtet und abermals für 60 min bei $10\,000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Auch hier wurden von dem erhaltenen Pellet (P2) Proben genommen. Der verbleibende Überstand wurde in vier Ultrazentrifugengläser überführt. Die Zentrifugengläser wurden mit Verdünnungspuffer aufgefüllt und die Membranfraktion durch Zentrifugation in der Ultrazentrifuge für 60 min bei $100\,000 \times g$ und 4°C pelletiert.

⁴Im Verlauf dieser Arbeit stellte sich heraus, dass eine Verdopplung der Zelldichte zu einer Erhöhung der Proteinausbeute führte (siehe Kapitel 3.1.3).

Die folgenden Arbeitsschritte wurden im Kühlkammerlabor bei 4 °C durchgeführt. Einige Proben des Überstandes (S1) wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert, der Rest verworfen. Die Pellets (P3) wurden mit Hilfe eines Pinsels in je 1 ml Resuspensionspuffer nach Lever resuspendiert und die resultierende Suspension in einen Potter Elvehjem Glashomogenisator (Volumen: 5 ml) überführt. Anschließend wurden alle Zentrifugengläser zweimal mit 1 ml Resuspensionspuffer nachgespült. Die vereinigten Suspensionen wurden durch fünf Hübe bei 1500Upm homogenisiert. Insgesamt ergaben sich auf diese Weise etwa 6 ml Membranhomogenat, das in 0,25 ml Aliquota dispensiert und in 1,5 ml PP-Reaktionsgefäßen bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert wurde.

Im Verlauf dieser Arbeit stellte sich heraus, dass sich eine Erhöhung der Zelldichte bei der Homogenisierung positiv auf die Gesamtausbeute auswirkt (siehe Kapitel 3.1.3). Das hier beschriebene Protokoll sollte daher zukünftig angepasst werden und die Zellen von 20 Kulturschalen in einem 50 ml PP-Röhrchen vereint werden.

2.3 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

Der für diese Arbeiten verwendete *S. cerevisiae* Stamm BJ5457 RAF#13 [49] wurde dankenswerterweise von Prof. Al-Shawi (Department of Molecular Physiology and Biological Physics, University of Virginia Health Sciences) zur Verfügung gestellt. Dieser Stamm wurde mit humaner P-gp DNS transformiert. Eine ausgeprägte Expression des Zielproteins konnte nachgewiesen werden [49]. Am carboxyterminalen Ende des rekombinanten Proteins wurde ein zehnfacher Histidin-Tag eingefügt und so eine Aufreinigung des Proteins unter Verwendung der Nickelaffinitätschromatografie (siehe Kapitel 2.4.3) ermöglicht.

Alle Kulturtechniken wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Lösungen für das Nährmedium wurden nach der Herstellung sterilfiltriert. Die Kulturgefäße wurden vor Verwendung autoklaviert. Für die Handhabung der Hefekulturen wurden ausschließlich sterile Verbrauchsmaterialien verwendet.

2.3.1 Herstellung der Nährmedien

Verwendete Lösungen

Stammlösungen

1 ml	Biotin gelöst in DMSO	10 mg/ml
1 ml	Folsäure gelöst in 1 mol/l NaOH	10 mg/ml
500 ml	Calciumchlorid gelöst in Wasser	0,9 mol/l
500 ml	Eisen(III)chlorid gelöst in Wasser	1,2 mmol/l
500 ml	Glucose gelöst in Wasser bei 60 °C	40 % (m/V)

Die Vitamin-Stammlösungen wurden immer frisch hergestellt. Die restlichen Lösungen wurden in zuvor autoklavierte Duranglasflaschen sterilfiltriert und bei 4–8 °C gelagert. Da Eisen(III)chlorid lichtempfindlich ist, wurde zur Lagerung dieser Lösung eine Braunglasflasche verwendet.

1 000 × Spurenelemente-Stammlösung

250 mg	Borsäure	8,1 mmol/l
31 mg	Kupfersulfat-Pentahydrat	31,3 mmol/l
50 mg	Kaliumiodid	0,6 mmol/l
224 mg	Mangansulfat-Monohydrat	2,7 mmol/l
117 mg	Natriummolybdat-Dihydrat	1,0 mmol/l
357 mg	Zinksulfat-Heptahydrat	2,5 mmol/l
ad 500 ml	Wasser	

10 × Aminosäuren(AS)-Stammlösung -H, L

200 mg	Adenin Hemisulfat	200 mg/l
200 mg	L-Arginin Hydrochlorid	200 mg/l
300 mg	L-Isoleucin	300 mg/l
300 mg	L-Lysin Hydrochlorid	300 mg/l
200 mg	L-Methionin	200 mg/l
500 mg	L-Phenylalanin	500 mg/l
2 000 mg	L-Threonin	2 000 mg/l
200 mg	L-Tryptophan	200 mg/l
300 mg	L-Tyrosin	300 mg/l
1 500 mg	L-Valin	1 500 mg/l
200 mg	Uracil	200 mg/l
ad 1 000 ml	Wasser	

100 × Vitamin-Stammlösung

20 µl	Biotin-Lösung	0,2 mg/l
40 mg	D-Panthothensäure Hemicalciumsalz	40 mg/l
20 µl	Folsäure-Lösung	0,2 mg/l
200 mg	myo-Inositol	200 mg/l
40 mg	Nicotinsäure	40 mg/l
20 mg	p-Aminobenzoesäure	20 mg/l
40 mg	Pyridoxin Hydrochlorid	40 mg/l
20 mg	Riboflavin	20 mg/l
40 mg	Thiamin Hydrochlorid	40 mg/l
ad 1 000 ml	Wasser	

10 × YNB⁵

pH 5,4 bei RT

50 g	Ammoniumsulfat	378 mmol/l
10 g	Kaliumdihydrogenphosphat	73,5 mmol/l
10 g	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	41,5 mmol/l
1 g	Natriumchlorid	17,1 mmol/l
10 ml	Calciumchlorid-Stammlösung	9 mmol/l
10 ml	Eisen(III)chlorid-Stammlösung	12 µmol/l
10 ml	1 000 × Spurenelemente-Stammlösung	10 ×
100 ml	100 × Vitamin-Stammlösung	10 ×
ad 1 000 ml	Wasser	

Alle vier Lösungen wurden in zuvor autoklavierte Duranglasflaschen sterilfiltriert und bei 4–8 °C gelagert. Da einige Vitamine lichtempfindlich sind, wurden für vitaminhaltige Lösungen Braunglasflaschen verwendet. Aufgrund der Instabilität einiger Vitamine in wässriger Lösung, wurden vitaminhaltige Lösungen nicht länger als 4 Wochen verwendet. Die restlichen Lösungen waren mindestens drei Monate stabil. Für die Fed-Batch Kultivierung wurde 1,5 l AS-Stammlösung mit doppelter Konzentration hergestellt. In diesem Fall gelang das Lösen der Aminosäuren nur durch Erwärmen auf 50 °C.

⁵engl. Yeast Nitrogen Base

Durchführung

Als Nährmedium diente dem Hefestamm BJ5457 RAF#13 ein chemisch definiertes, vollständiges Minimalmedium ohne Histidin und Leucin (kurz: CM-Medium –His, Leu). Das Medium wurde bei Bedarf aus jeweils 10 % (V/V) YNB-Lösung und AS-Stammlösung sowie 5 % (V/V) Glucosestammlösung hergestellt. Dazu wurde in einem geeigneten Kulturgefäß das entsprechende Volumen Wasser vorgelegt, das Gefäß mit Aluminiumfolie verschlossen und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die Stammlösungen unter aseptischen Bedingungen zugesetzt. Bei einigen Kulturen wurde dem Nährmedium Glycerol in einer Endkonzentration von 10 % (V/V) zugesetzt. In diesem Fall wurde die benötigte Glycerolmenge zuvor mit Wasser gemischt und dann das Glycerol/Wasser-Gemisch autoklaviert.

Kulturschalen mit festem Nährmedium wurden auf ähnliche Weise hergestellt. In eine 250 ml Duranglasflasche mit Schraubverschluss wurden 4 g Agar-Agar (Endkonzentration 2 % (m/V)) eingewogen. Der Agar-Agar wurde in 150 ml Wasser suspendiert. Anschließend wurde das verschlossene Gefäß autoklaviert und mit dem Kühlprogramm des Autoklaven auf 65 °C abgekühlt. Während der Autoklavierung löste sich der Agar-Agar vollständig auf. Nun wurden unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer bei mittlerer Geschwindigkeit 20 ml YNB-Lösung, 20 ml AS-Lösung und 10 ml Glucosestammlösung hinzugegeben. Jeweils 20–25 ml der homogenen Lösung wurden zügig in Plastikculturschalen ausgegossen. Eventuell entstandene Luftblasen wurden durch kurzes Abflämmen der Flüssigkeitsoberfläche mit der Bunsenbrennerflamme entfernt und die Platten sofort abgedeckt. Nach dem Erkalten bildete sich das feste Nährmedium. Die Platten wurden für zwei Tage bei RT zwischen Zellstoff aufbewahrt, damit überschüssige Feuchtigkeit verdampfen konnte. Anschließend wurde bei jeder Platte der Spalt zwischen Deckel und Unterschale mit einem Streifen Parafilm verschlossen. Die Kulturplatten wurden bis zur Verwendung für maximal vier Wochen bei 4–8 °C gelagert.

2.3.2 Inkulturnahme

Von drei bis vier Kulturplatten wurde der Parafilm entfernt. Nun wurden die Nährböden im Inkubator auf 30 °C temperiert. Mit einer sterilen Impföse wurden einige Zellen von der Oberfläche einer gefrorenen Glycerol-Stammkultur gekratzt und auf einer der Platten ausgestrichen. Mit den restlichen Platten wurde auf gleiche

Weise verfahren. Alle Platten wurden dann für vier bis sechs Tage im Brutschrank bei 30 °C inkubiert. Nach dieser Zeit waren weiße Kolonien sichtbar, die für die weitere Kultivierung verwendet wurden. Ein Überwachsen dieser Vorkulturen wurde durch die Lagerung der erneut mit Parafilm verschlossenen Agarplatten bei 4–8 °C verhindert. Unter diesen Bedingungen konnten die Kolonien für maximal vier Wochen verwendet werden.

2.3.3 Kultivierung

Die Kultivierung von Saccharomyces cerevisiae erfolgt in Suspensionskulturen. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet. Zum einen die Batch-Kultivierung, die der laborüblichen Kultivierungstechnik entspricht. Zum anderen die Fed-Batch-Kultivierung, die darauf abzielt, das Biomasse/Kulturvolumen-Verhältnis zu verbessern. Bei der Batch-Kultivierung wird das Nährmedium zu Beginn der Kultur vollständig vorgelegt. Sind die Nährstoffe verbraucht, muss die Kultivierung beendet werden. Die Fed-Batch-Kultivierung beginnt zunächst mit einem kleineren Volumen Nährmedium, das zudem nährstoffreicher ist. Bei Erreichen einer bestimmten Kultur-dichte, wird frisches Nährmedium zugeführt und die Kultivierung fortgesetzt. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis das endgültige Kulturvolumen erreicht ist. Auf diese Weise lassen sich im Vergleich zur Batch-Kultivierung höhere Biomasse-Ausbeuten erlangen.

Batch-Kultivierung

Drei 250 ml Weithals-Erlenmeyerkolben wurden mit je 50 ml CM-Medium –His, Leu beschickt und im Schüttelinkubator bei 250 Upm auf 25 °C temperiert. In jedem Kolben wurde durch Zugabe einer einzelnen Kolonie von einer Kulturplatte eine Vorkultur angelegt.

Nach ein bis zwei Tagen Inkubation unter den genannten Bedingungen trat eine deutliche Trübung der Kulturen ein. Von allen drei Kulturen wurden Proben genommen und die optische Dichte der unverdünnten, der vierfach- und der zehnfachverdünnten Probe bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600 \text{ nm}$ (OD_{600}) gegen Wasser als Referenzmedium bestimmt. Die OD_{600} korreliert mit der Zellzahl und dient daher als direktes Maß für den Wachstumsfortschritt der Kultur. Da mit Fortschritt der Kultivierung die

optische Dichte bei zu schwacher Verdünnung zunehmend unterschätzt wurde, wurde jeweils der Messwert zur Beurteilung der Kultur herangezogen, der der maximalen optischen Dichte entsprach.

Das Kulturvolumen wurde nun vergrößert. Dazu wurden in einem 2l Weithals-Erlenmeyerkolben 500 ml CM-Medium –His, Leu, das zusätzlich 10 % (V/V) Glycerol enthielt, angesetzt und auf 25 °C temperiert. Eine der Vorkulturen wurde in den 2l Erlenmeyerkolben überführt und die Kultivierung unter den beschriebenen Bedingungen fortgesetzt. Ausgewählt wurde eine Vorkultur in der exponentiellen Wachstumsphase. Dies entsprach einem OD₆₀₀-Wert von 0,8 bis 1,2. Das Wachstum der neuen Kultur wurde durch regelmäßige Messung der optischen Dichte kontrolliert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 1,2 wurde die Kultur in ein 500 ml Zentrifugenglas überführt und die Zellen für 4 min bei 1 000 × g und 20 °C (Laborzentrifuge, Festwinkelrotor JLA-10.500) pelletiert. Das resultierende Zellpellet wurde in 100 ml CM-Medium –His, Leu, welches zusätzlich 10 % (V/V) Glycerol enthielt, resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde für die Fed-Batch-Kultivierung weiterverwendet.

Fed-Batch-Kultivierung

Vor Kulturbeginn wurde zunächst ein Gemisch aus Wasser und 86 % (V/V) Glycerol (siehe Tabelle 2.2) im Fermenter vorgelegt. Anschließend wurde der Flügelrührer und die Belüftungsvorrichtung eingesetzt und die gesamte Apparatur autoklaviert. Unter Verwendung des Kühlprogramms des Autoklaven wurde auf 65 °C abgekühlt und der Fermenter auf dem Magnetrührer platziert. Die Belüftungseinheit wurde über den Membranfilter mit der Pumpe verbunden. Die Ableitung der Abluft erfolgte

Tab. 2.2: Eingesetzte Volumina für die Fed-Batch-Kultivierung des Hefestamms BJ5457 RAF#13

	Kulturbeginn	1. Zugabe	2. Zugabe
20 × AS-Lösung	1 500 ml	-	-
10 × YNB-Lösung	670 ml	920 ml	1 380 ml
20 × Glucose-Lösung	330 ml	-	500 ml
86 % (V/V) Glycerol	780 ml	130 ml	260 ml
Wasser	3 390 ml	90 ml	60 ml
Kulturvolumen	6 670 ml	7 810 ml	10 010 ml

durch eine Gaswaschflasche, die 100 ml eines Gemischs aus 0,5 % (V/V) Melsept und 0,01 % (V/V) Antifoam A in Wasser enthielt. Schließlich wurde die Heizmanschette angelegt und der Temperaturfühler eingesetzt. Unter ständigem Rühren bei 100 Upm und Belüftung mit sterilfiltrierter Luft wurde das Gemisch auf RT abgekühlt. Kurz vor Beginn der Kultivierung wurden die restlichen Lösungen gemäß Tabelle 2.2 unter aseptischen Bedingungen hinzugegeben und der gesamte Ansatz mit Hilfe der elektronisch gesteuerten Temperaturregelung auf 25 °C temperiert.

Durch Zugabe der durch die Batch-Kultivierung erhaltenen Zellsuspension wurde die Kultur gestartet. Wie schon bei der 500 ml Vorkultur wurde das Wachstum durch Trübungsmessungen kontrolliert. In einem OD₆₀₀-Bereich von 0,8 bis 1,2 erfolgte die erste Zugabe von neuen Nährstoffen, die zweite Zugabe in einem Bereich von 1,6 bis 1,8. Vor der Zugabe wurden jeweils Wasser und Glycerol gemischt und autoklaviert. Alle Lösungen wurden vor der Zugabe in einem Trockenschrank auf 25 °C temperiert. Nach der zweiten Zugabe wurde die Kultivierung bis zu einer OD₆₀₀ von 2,6 bis 2,7 fortgesetzt.

Anschließend wurde die Hefe-Suspension in 500 ml Zentrifugengläser überführt und die Hefen für 10 min bei 10 000 × g und 4 °C (Laborzentrifuge, Festwinkelrotor JLA-10.500) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit einem Löffel in ein 400 ml Becherglas mit flüssigem Stickstoff überführt. Nachdem auf diese Weise die gesamte Biomasse schockgefroren worden war, wurde der restliche Stickstoff abdekantiert, die Biomasse gewogen und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert.

2.3.4 Kryokonservierung

Für die Kryokonservierung wurden 700 µl einer exponentiell wachsenden 50 ml Vorkultur in ein steriles Kryoröhrchen pipettiert. Die Kultur wurde durch Mischen mit 300 µl sterilem 50 % (V/V) Glycerol auf eine Glycerolkonzentration von 15 % (V/V) eingestellt. Eine auf diese Weise gewonnene Glycerol-Stammkultur wurde bei –80 °C bis zur erneuten Inkulturnahme (siehe Kapitel 2.3.2) gelagert.

2.3.5 Membranpräparation

Im Gegensatz zu Säugetierzellen verfügen Hefen über eine Zellwand. Diese schützt sehr effektiv gegen Scherkräfte und macht den Einsatz drastischerer Methoden bei der Homogenisierung der Hefen notwendig. Im vorliegenden Protokoll wurde daher ein Beadbeater eingesetzt. Dieses Gerät arbeitet nach dem Prinzip der Kugelmühle. Der Aufschluss erfolgt durch kleine Glaskugeln, die der Hefesuspension zugesetzt werden. Es entstehen verschiedene Fraktionen, die, wie schon bei der Membranpräparation nach Lever [59] (siehe Kapitel 2.2.8), nach dem Prinzip der differentiellen Zentrifugation getrennt werden können.

Verwendete Lösungen

Stammlösungen in Wasser

500 ml	EDTA-Na pH 8,0	0,2 mol/l
500 ml	EGTA-Na pH 8,0	0,2 mol/l
500 ml	50 % Glycerol	50 % (V/V)
250 ml	Tris-HCl pH 7,5 bei 4 °C	10 mg/ml
100 ml	Tris-Lösung	1 mol/l

Die EDTA-Na- und EGTA-Na-Lösung wurden in Plastikgefäßen aufbewahrt. Die restlichen Lösungen wurden in Duranglasflaschen abgefüllt. Alle Stammlösungen wurden bei 4–8 °C gelagert.

Proteaseinhibitoren-Stammlösungen

2,5 ml	Benzamidin gelöst in Wasser	0,5 mol/l
10 ml	Leupeptin gelöst in DMSO	1 mmol/l
10 ml	Pepstatin A gelöst in DMSO/Eisessig (9:1)	2 mmol/l
15 ml	Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) in Isopropanol	10 mg/ml

Die Benzamidin-Lösung wurde stets frisch hergestellt. Die Lösungen der Proteaseinhibitoren Leupeptin und Pepstatin A wurden in 1 ml Aliquota dispensiert und bei –20 °C in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die PMSF-Lösung wurde am Tag vor dem Versuch hergestellt. Dazu wurde der Feststoff bei 40 °C auf dem Wasserbad in einem mit Parafilm fest verschlossenen und mit Aluminiumfolie umwickelten 50 ml PP-Röhrchen gelöst. Die Lösung wurde bei RT unter Lichtausschluss bis zur Verwendung aufbewahrt.

Homogenisierungspuffer

2,5 g	BSA	5 mg/ml
51,35 g	Saccharose	0,3 mol/l
0,88 ml	β -Mercaptoethanol	25 mmol/l
0,5 ml	Leupeptin-Stammlösung	1 μ mol/l
0,5 ml	Pepstatin A-Stammlösung	2 μ mol/l
1 ml	Benzamidin-Stammlösung	1 mmol/l
5 ml	PMSF-Stammlösung	1 mmol/l
87 μ l	Diisopropylfluorophosphat (DFP)	1 mmol/l
12,5 ml	EDTA-Na pH 8,0	5 mmol/l
2,5 ml	EGTA-Na pH 8,0	1 mmol/l
25 ml	Tris-HCl pH 7,5	50 mmol/l
ad 500 ml	Wasser	

Die Feststoffe wurden in einen 500 ml Mischzylinder eingewogen und mit den 4–8 °C kalten, grau unterlegten Bestandteilen versetzt. Nun wurde mit vorgekühltem Wasser auf etwa 480 ml aufgefüllt und die festen Bestandteile unter kräftigem Schütteln gelöst. Die restlichen Lösungen wurden in der tabellierten Reihenfolge unter Rühren auf dem Magnetrührer hinzugegeben. Der Rührfisch wurde entfernt und schließlich mit Wasser auf 500 ml Gesamtvolumen ergänzt. Der fertiggestellte Homogenisierungspuffer wurde in einer 500 ml Duranglasflasche auf Eis gekühlt.

Waschpuffer

51 μ l	β -Mercaptoethanol	2 mmol/l
0,36 ml	Leupeptin-Stammlösung	1 μ mol/l
0,36 ml	Pepstatin A-Stammlösung	2 μ mol/l
0,72 ml	Benzamidin-Stammlösung	1 mmol/l
3,6 ml	PMSF-Stammlösung	1 mmol/l
63 μ l	DFP	1 mmol/l
1,8 ml	EGTA-Na pH 8,0	1 mmol/l
72 ml	50 % Glycerol	10 % (V/V)
3,6 ml	Tris-HCl pH 7,5	10 mmol/l
277,5 ml	Wasser	

Die grau unterlegten Bestandteile wurden am Tag vor der Membranpräparation in eine 500 ml Duranglasflasche pipettiert und über Nacht auf 4–8 °C gekühlt. Kurz vor der Verwendung wurden die restlichen Bestandteile unter Rühren auf dem Magnetrührer in der tabellierten Reihenfolge zugeben. Der Puffer wurde stets auf Eis gekühlt.

Lagerpuffer

7 μ l	β -Mercaptoethanol	2 mmol/l
0,5 ml	PMSF-Stammlösung	1 mmol/l
0,25 ml	EGTA-Na pH 8,0	1 mmol/l
25 ml	50 % Glycerol	25 % (V/V)
0,5 ml	Tris-HCl pH 7,5	10 mmol/l
23,7 ml	Wasser	

Die Herstellung erfolgte analog zur Waschpufferherstellung in einer 100 ml Duranglasflasche. Der Puffer wurde nach der Fertigstellung stets auf Eis gekühlt.

Durchführung

In ein 500 ml Zentrifugenglas wurden 300 ml 4 °C kaltes Wasser, 5 ml der PMSF-Stammlösung und ein Rührfisch gegeben. Anschließend wurde unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer die tiefgefrorene Hefemasse (siehe Kapitel 2.3.3) eingebracht. Sobald sich eine homogene Suspension bildete, wurde der Rührfisch entfernt, das Zentrifugenglas mit Wasser aufgefüllt und die Biomasse durch Zentrifugation für 10 min bei $15\,000 \times g$ und 4 °C (Laborzentrifuge, Festwinkelrotor JLA-10.500) pelletiert. Das Gewicht des Pellets wurde durch Differenzwägung bestimmt. Anschließend wurde das Pellet in 35 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert. Während der folgenden Arbeitsschritte wurde die Suspension und alle verwendeten Lösungen stets auf Eis gekühlt.

Die Suspension wurde in die vorgekühlte Edelstahl-Beadbeater-Kammer überführt, in die zuvor 180 ml zirkonisierte Glaskugeln vorgelegt worden waren. Durch zwei- bis dreimaliges Spülen mit je 20 ml Homogenisierungspuffer wurden die Hefen vollständig aus dem Zentrifugenglas in die Kammer überführt. Nun wurde der pH-Wert der Zellsuspension mit Hilfe von Indikatorpapier überprüft und gegebenenfalls mit Tris-Lösung auf pH 7,5 rejustiert. Schließlich wurde die Kammer vollständig mit Homogenisierungspuffer aufgefüllt und verschlossen. Dabei wurde darauf geachtet, keine Luft in der Kammer einzuschließen. Nun wurden die Hefen für 4 min im Bead-Beater mechanisch unter ständiger Eiswasserkühlung aufgebrochen. Durch Reibung kam es dennoch zu einer Erwärmung, so dass das Homogenat anschließend für weitere 4 min auf Eis gekühlt wurde. Der Zyklus aus Homogenisierung und Kühlung wurde zweimal wiederholt. Vor jedem neuen Zyklus wurde dem Homogenat 31 µl Diisopropylfluorophosphat (DFP) zugesetzt. Nach dem Abschluss der Homogenisierung erfolgte erneut die Einstellung des pH-Werts des Homogenats mit Tris-Lösung auf pH 7,5.

Das Homogenat wurde nun zu gleichen Teilen in acht 50 ml Zentrifugengläser pipettiert. Nach der Überführung der zirkonisierten Glaskugeln in einen 500 ml Iodzahlkolben, wurden Reste des Homogenats durch Zugabe von 20 ml Homogenisierungspuffer von den Glaskugeln gewaschen und ebenfalls in die Zentrifugengläser überführt. Dieser Arbeitsschritt wurde wiederholt, bis alle Zentrifugengläser vollständig gefüllt waren. Die Suspension wurde für 5 min bei $3\,500 \times g$ und 4 °C (Laborzentrifuge, Festwinkelrotor JA-25.50) zentrifugiert und der Überstand in acht weitere 50 ml Zentrifugengläser überführt. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 20 min bei

14 000 \times g und 4 °C. Mit dem resultierenden Überstand wurden sechs Ultrazentrifugengläser gleichmäßig befüllt und die Membranfraktion in der Ultrazentrifuge für 80 min bei 200 000 \times g und 2 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und jedes Pellet mit Hilfe eines Pinsels in 5 ml Waschpuffer resuspendiert. Die Suspensionen wurden in einem Potter Elvehjem Glashomogenisator (50 ml) zusammengeführt. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurden die Ultrazentrifugengläser zweimal mit je 5 ml Waschpuffer gewaschen. Das Gesamtvolumen der Suspension betrug etwa 40 ml. Anschließend wurde die Membranfraktion im Glashomogenisator durch zehn Hübe bei 1 500 Upm homogenisiert. Das Homogenat wurde gleichmäßig auf vier neue Ultrazentrifugengläser verteilt. Nun wurde mit Waschpuffer auf das Nennvolumen der Zentrifugengläser aufgefüllt und erneut für 80 min bei 200 000 \times g und 2 °C zentrifugiert. Die Resuspendierung in Lagerpuffer erfolgte analog zum ersten Resuspendierungsschritt.

Aliquota des Hefe-Membranhomogenats zu je 14 ml wurden in 15 ml PP-Röhrchen bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zwei weitere 0,1 ml Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden zur Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe Kapitel 2.1.3) und zur Bestimmung der scheinbaren P-gp Expressionsrate (vergleiche Kapitel 2.5.3) ebenfalls bei -80 °C aufbewahrt.

2.4 Aufreinigung und Rekonstitution von P-Glykoprotein

Die Solubilisation, Aufreinigung und Rekonstitution von P-Glykoprotein aus der *Saccharomyces cerevisiae* Membranfraktion wurde im Kühlkammerlabor bei 4 °C durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden vor ihrer Verwendung ebenfalls auf 4 °C temperiert.

2.4.1 Herstellung der Lipidmischung für die Rekonstitution

Verwendete Lösungen

Stammlösungen in Wasser

1 ml	6-Aminohexansäure-Stammlösung	0,5 mol/l
10 ml	Natriumazid-Stammlösung	0,1 mol/l
40 ml	Octylglucosid(OG)-Stammlösung	20 % (m/V)
100 ml	Tris-HCl pH 7,4 bei 4 °C	1 mol/l

Die 6-Aminohexansäure-Stammlösung wurde vor Versuchsbeginn hergestellt und auf Eis gekühlt. Natriumazid-Stammlösung wurde in 1 ml Aliquota dispensiert und bei –20 °C in 1,5 ml PP-Reaktionsgefäßen gelagert. Die OG-Stammlösung wurde in einem 50 ml PP-Röhrchen hergestellt und ebenfalls bei –20 °C gelagert. Die Tris-HCl-Stammlösung wurde bei 4–8 °C in einer Duranglasflasche gelagert.

Rehydrierungspuffer

0,4 ml	6-Aminohexansäure-Stammlösung	5 mmol/l
16 ml	50 % Glycerol	20 % (V/V)
0,4 ml	Natriumazid-Stammlösung	1 mmol/l
4 ml	OG-Stammlösung	2 % (m/V)
3,42 g	Saccharose	0,25 mol/l
2 ml	Tris-HCl pH 7,4 bei 4 °C	50 mmol/l
17,2 ml	Wasser	

Zunächst wurden alle Bestandteile bis auf die OG-Stammlösung in eine 100 ml Duranglasflasche pipettiert und die Saccharose unter Rühren gelöst. Die Lösung wurde 30 min unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer im Vakuum entgast, die OG-Stammlösung zugeben und schließlich für weitere 30 min mit Argon begast. Anschließend wurde der Puffer bis zur Verwendung auf Eis gekühlt.

Durchführung

Vor der eigentlichen Aufreinigung wurde eine Lipidsuspension für die Rekonstitution des aufgereinigten P-gps hergestellt. Zunächst wurden 870 mg Phosphatidylcholin (PC), 130 mg Phosphatidylsäure (PA) und 300 mg Cholesterol (Ch) in 26 ml Chloroform gelöst. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter einem kontinuierlichen Argonstrom entfernt. Es bildete sich eine feste Lipidmasse. Lösungsmittelreste wurden nun innerhalb von 60 min in einer Vakuumzentrifuge vollständig entfernt. Die getrockneten Lipide wurden gewogen und mit Rehydrierungspuffer in einem Verhältnis von 1 ml Puffer pro 50 mg Lipide versetzt. Durch Rühren bei RT für 60 min, unter kontinuierlicher Argonzufuhr, wurden die Lipide rehydriert. Nun wurde die Suspension 2 min mit einem Ultraschallstab (Geräteeinstellung: Cycle $5 \times 10\%$, Power 70 %) unter Eiskühlung und ständiger Argonbegasung homogenisiert. Ein Ruheintervall von 2 min Dauer nach jeder Ultraschallbehandlung verhinderte die Überhitzung der Lipidsuspension. Der Wechsel zwischen Beschallungs- und Ruhezyklen wurde fortgesetzt, bis keine ungelösten Lipidpartikel mehr beobachtet werden konnten und die Suspension eine deutliche Opaleszenz aufwies. Abschließend wurden je zwei 5,76 ml und 7,30 ml Aliquota in 15 ml PP-Röhrchen überführt, Umgebungsluft gegen Argon ausgetauscht und die Lipidsuspension bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.4.2 Solubilisierung der Hefemembranen

Soll ein integrales Membranprotein aufgereinigt werden, so ist der erste Schritt stets die Solubilisierung. Darunter wird das Herauslösen des Membranproteins aus seiner Lipidumgebung in seiner nativen Konformation verstanden. Möglich wird dies durch ein geeignetes Detergenz, das sich mit seinem hydrophoben Teil an die hydrophoben Bereiche des Membranproteins anlagert, ohne dabei die tertiäre oder sekundäre Struktur zu zerstören. Ist die Anzahl der angelagerten Detergenzmoleküle groß genug, löst sich das Membranprotein in einem Komplex aus Lipid- und Detergenzmolekülen aus der Membran. Ein solcher Komplex wird auch nach einer Stunde Zentrifugation bei $100\,000 \times g$ nicht pelletiert. Das Protein gilt nun als solubilisiert. Die Solubilisierung erfolgt nicht selektiv, so dass ein Gemisch aus solubilisierten Membranproteinen resultiert [60].

Verwendete Lösungen**Stammlösungen in Wasser**

100 ml	Imidazol-Stammlösung pH 7,4	2 mol/l
100 ml	Imidazol-Stammlösung pH 8,0	2 mol/l
100 ml	Magnesiumsulfat-Stammlösung	1 mol/l
250 ml	Natriumsulfat-Stammlösung	2 mol/l
100 ml	Tris-Stammlösung	1 mol/l

Der pH-Wert der Imidazol-Stammlösungen wurde mit 1 mol/l Salzsäure eingestellt und die fertigen Lösungen in Duranglasflaschen bei 4–8 °C gelagert. Die Magnesiumsulfat-Lösung wurde auf gleiche Weise gelagert. Das Natriumsulfat wurde unter Rühren in der Hitze gelöst, die Lösung langsam auf RT abgekühlt und das gewünschte Volumen eingestellt. Kristallisationskeime wurden durch Sterilfiltration entfernt und die Lösung bei RT in einer 250 ml Duranglasflasche gelagert.

Tris/Glycerol-Stammlösung pH 8,0 bei 4 °C

1,5 g	Tris	50 mmol/l
100 ml	Glycerol	40 % (V/V)
ad 250 ml	Wasser	

Tris/Glycerol-Stammlösung pH 7,4 bei 4 °C

6,1 g	Tris	50 mmol/l
400 ml	Glycerol	40 % (V/V)
ad 1 000 ml	Wasser	

Der pH-Wert der Tris/Glycerol-Stammlösungen wurde mit 1 mol/l Salzsäure eingestellt. Die fertiggestellten Stammlösungen wurden bei 4–8 °C in Duranglasflaschen gelagert.

350 ml Solubilisierungspuffer

25 µl	β-Mercaptoethanol	1 mmol/l
0,35 ml	Leupeptin-Stammlösung	1 µmol/l
0,35 ml	Pepstatin A-Stammlösung	2 µmol/l
0,7 ml	Benzamidin-Stammlösung	1 mmol/l
3,5 ml	PMSF-Stammlösung	1 mmol/l
61 µl	Diisopropylfluorophosphat (DFP)	1 mmol/l
875 µl	ATP-Stammlösung (400 mmol/l)	1 mmol/l
35 ml	Membranpräparation (20 mg/ml)	2 mg/ml
175 ml	Tris/Glycerol-Stammlösung pH 8,0 bei 4 °C	
	Glycerol	20 % (V/V)
	Tris	25 mmol/l
0,88 ml	Imidazol-Stammlösung pH 8,0	1 mmol/l
0,35 ml	Magnesiumsulfat-Stammlösung	1 mmol/l
8,75 ml	Natriumsulfat-Stammlösung	50 mmol/l
124 ml	Wasser	

Die grau unterlegten Bestandteile wurden einen Tag vor der Aufreinigung in eine 500 ml Duranglasflasche pipettiert und 30 min im Vakuum unter Rühren auf dem Magnetrührer entgast. Anschließend wurde für weitere 30 min mit Argon begast und der Ansatz in der fest verschlossenen Flasche bis zur Verwendung auf 4–8 °C gekühlt. Kurz vor der Verwendung wurden die restlichen Bestandteile in der tabellierten Reihenfolge hinzugeben. Einzelheiten zur Herstellung und Lagerung der Proteaseinhibitor-Stammlösungen sind Kapitel 2.3.5 zuzunehmen. Die Herstellung der ATP-Stammlösung ist in Kapitel 2.5.1 beschrieben. Der fertiggestellte Puffer wurde stets auf Eis gekühlt. Das verwendete Volumen des Puffers richtete sich nach dem Volumen und der Proteinkonzentration der verwendeten Membranpräparation. Die tabellierten Werte wurden für 35 ml Membranpräparation bei einer angenommenen Proteinkonzentration von 20 mg/ml berechnet und entsprechen einem Gesamtvolumen von 350 ml.

Durchführung der Solubilisierung

Die Membranfraktion wurde im Kühlkammerlabor aufgetaut und unter Rühren auf dem Magnetrührer bei mittlerer Geschwindigkeit im Solubilisierungspuffer dispergiert. Dabei wurde das Volumen des Puffers so gewählt, dass sich eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml einstellte. Die Solubilisierung der Membranproteine wurde dann entweder mit Lysophosphatidylcholin (LPC, 1 % (m/V)) oder mit Natriumtaurodeoxycholat (TDOC, 2 % (m/V)) durch Inkubation für 20 min unter ständigem Rühren bei mittlerer Geschwindigkeit durchgeführt. Unlösliche Bestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation in der Ultrazentrifuge für 70 min bei $100\,000 \times g$ und 2 °C abgetrennt. Der Überstand wurde in ein Becherglas überführt und mit Natriumsulfat-Stammlösung auf eine Natriumsulfat-Endkonzentration von 0,2 mol/l eingestellt. Abschließend wurde der pH-Wert mit Indikatorpapier überprüft und gegebenenfalls mit Tris-Stammlösung auf pH 8,0 rejustiert.

2.4.3 Aufreinigung durch Nickelaffinitätschromatografie

Verfügt ein Protein über einen sogenannten Histidin-Tag, kann es mit Hilfe der Nickelaffinitätschromatografie aufgereinigt werden. Dabei wird die komplexierende Eigenschaft der Imidazol-Partialstruktur von Histidin ausgenutzt. Zunächst wird das Säulenmaterial mit den immobilisierten Nickelkationen in der Proteinlösung suspendiert. Während der sich anschließenden Inkubation erfolgt die Bindung des Proteins durch Ausbildung eines Komplexes aus jeweils zwei Histidinen und einem immobilisierten Nickelkation. Auf gleiche Weise können jedoch auch von Natur aus

histidinreiche Proteine und Metalloproteasen gebunden werden. Da die Wechselwirkung dieser Proteine mit den Nickelkationen jedoch schwächer ausgeprägt ist, können sie, nachdem die Matrix in eine Säule überführt wurde, durch Erhöhung der Ionenstärke oder mit niedrigen Imidazolkonzentrationen im Waschpuffer entfernt werden. Schließlich wird das aufgereinigte Protein durch hohe Imidazolkonzentrationen kompetitiv aus der Bindung verdrängt und eluiert [61].

Verwendete Lösungen

360 ml Waschpuffer

25 µl	β-Mercaptoethanol	1 mmol/l
0,36 ml	Leupeptin-Stammlösung	1 µmol/l
0,36 ml	Pepstatin A-Stammlösung	2 µmol/l
0,72 ml	Benzamidin-Stammlösung	1 mmol/l
3,6 ml	PMSF-Stammlösung	1 mmol/l
1,8 ml	ATP-Stammlösung (400 mmol/l)	2 mmol/l
25,2 ml	OG-Stammlösung	1,4 % (m/V)
7,2 ml	Lipidmischung	0,1 % (m/V)
180 ml	Tris/Glycerol-Stammlösung pH 8,0 bei 4 °C	
	Glycerol	20 % (V/V)
	Tris	25 mmol/l
9 ml	Imidazol-Stammlösung pH 8,0	50 mmol/l
0,72 ml	Magnesiumsulfat-Stammlösung	2 mmol/l
36 ml	Natriumsulfat-Stammlösung	0,2 mmol/l
95 ml	Wasser	

72 ml Elutionspuffer

10 µl	β-Mercaptoethanol	1 mmol/l
0,72 ml	PMSF-Stammlösung	1 mmol/l
0,36 ml	ATP-Stammlösung (400 mmol/l)	2 mmol/l
5 ml	OG-Stammlösung	1,4 % (m/V)
5,76 ml	Lipidmischung	0,1 % (m/V)
36 ml	Tris/Glycerol-Stammlösung pH 7,4 bei 4 °C	
	Glycerol	20 % (V/V)
	Tris	25 mmol/l
9 ml	Imidazol-Stammlösung pH 7,4	250 mmol/l
0,14 ml	Magnesiumsulfat-Stammlösung	2 mmol/l
1,8 ml	Natriumsulfat-Stammlösung	50 mmol/l
13,2 ml	Wasser	

Die Herstellung der Puffer erfolgte analog zum Solubilisierungspuffer.

Durchführung

Das eingesetzte Volumen der Nickel-NTA-Matrix entsprach 5 % des Solubilisierungsansatzes. Vor der Verwendung wurde die Nickel-NTA-Matrix gleichmäßig auf zwei Chromatographiesäulen verteilt und das Gelbett mit dem 20fachen Volumen einer Lösung aus 25 mmol/l Tris-HCl und 20 % (V/V) Glycerol (pH 8,0) äquilibriert. Dann wurde die Matrix in zwei 50 ml PP-Röhrchen überführt und Reste der Lösung durch Zentrifugation (Laborzentrifuge, Ausschwingrotor) für 4 min bei $266 \times g$ und 4°C abgetrennt. Nun wurde die Matrix unter Vermeidung von Schaumbildung im Solubilisat unter Rühren resuspendiert. Mit dieser Matrix-Suspension wurden 50 ml PP-Röhrchen vollständig gefüllt, verbleibende Luft wurde durch Argon ausgetauscht. Die Röhrchen wurden liegend auf einem Horizontalschüttler befestigt und der Ansatz auf Stufe 6 für 5 h inkubiert. Danach wurden beide Chromatographiesäulen vollständig mit der homogenen Suspension befüllt und die Fließgeschwindigkeit auf etwa einen Tropfen pro Sekunde eingestellt. Der Rest der Suspension wurde nach und nach gleichmäßig auf beide Säulen verteilt und der Durchlauf verworfen. Im Anschluss wurde jede Säule dreimal mit je 60 ml Waschpuffer gespült. Schließlich wurde das gebundene Protein mit 18 ml Elutionspuffer je Säule eluiert. Das Eluat wurde in 50 ml PP-Röhrchen aufgefangen. Für eine möglichst vollständige Elution, wurde in Übereinstimmung mit dem Originalprotokoll das aufgefangene Eluat noch zweimal auf die Säulen aufgebracht und erneut in den PP-Röhrchen aufgefangen. Anschließend wurde das Gelbett ein weiteres Mal mit je 18 ml frischem Elutionspuffer gewaschen. In den vereinigten Eluaten wurde mit 1 mol/l DTT-Lösung eine DTT-Konzentration von 2 mmol/l eingestellt.

2.4.4 Rekonstitution

Unter Rekonstitution wird das Einfügen des reinen, funktionsfähigen Membranproteins in eine Phospholipidmembran verstanden. Im vorliegenden Fall geschah dies durch Dialyse einer Detergenz-Lipid-Protein Lösung. Hier liegen Detergenz, Lipide und Membranprotein zunächst in Form von Mischmizellen vor. Während der Dialyse verringert sich die Detergenzkonzentration kontinuierlich, bis schließlich eine kritische Konzentration erreicht wird. An diesem Punkt lagern sich Membranproteine und Phospholipide spontan zu Proteoliposomen zusammen. Der Mechanismus ist dabei vergleichbar mit einer „rückwärts“ ablaufenden Solubilisierung [62, 63].

Verwendete Lösungen

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

Der Puffer wurde am Tag der Aufreinigung hergestellt. Dazu wurden die ersten drei Bestandteile gelöst und der pH-Wert eingestellt. Das DTT wurde erst kurz vor dem Start zugesetzt und gelöst.

Durchführung

Das Eluat wurde in zwei Dialyseschläuche überführt. Pro Milliliter Eluat wurden 0,6 cm Dialyseschlauch verwendet. Vor der Verwendung musste das Material zunächst 1 h bei RT in Wasser quellen. Anschließend wurde der Ansatz über Nacht in 5 l Rekonstitutionspuffer dialysiert. Am nächsten Morgen wurde der Puffer erneuert und nochmals für 5 h dialysiert. Dann wurde das Dialysat in zwei Ultrazentrifugengläser überführt und mit Rekonstitutionspuffer aufgefüllt. Die entstandenen Proteoliposomen wurden durch Ultrazentrifugation für 3 h bei $186\,000 \times g$ pellertiert. Mit Hilfe eines Pinsels wurden die resultierenden Proteoliposomen-Pellets in je 0,5 ml Rekonstitutionspuffer resuspendiert und in einen 2 ml Glashomogenisator überführt. Anschließend wurde jedes Zentrifugenglas erneut mit 0,2 ml Rekonstitutionspuffer nachgespült. Die Homogenisierung der Suspension erfolgte durch vier Hübe bei 750 Upm. Anschließend wurde zu je 50 μ l in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und die Aliquota bei -80 °C gelagert. Die Proteinausbeute wurde mit Hilfe der Amidoschwarz-Proteinbestimmung (siehe Kapitel 2.1.3) ermittelt und die Aktivität des aufgereinigten P-gps, wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben, mit dem ATPase-Assay weiter charakterisiert.

2.5 ATPase-Assay

Die Hydrolyse von Adenosintriposphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (P_i) liefert die Energie, die für die Funktion von P-gp notwendig ist. Das freigesetzte P_i kann mit der Methode von Veldhoven und Mannaerts [64] kolorimetrisch im nanomolaren Bereich detektiert werden. Die Phosphatbestimmung erfolgt diskontinuierlich an Proben, die dem Reaktionsansatz in regelmäßigen Abständen entnommen werden. Aus dem Phosphatgehalt der einzelnen Proben zum Entnahmezeitpunkt t und der eingesetzten Proteinmenge wird anschließend die spezifische Enzymaktivität in U/mg ermittelt.

2.5.1 Herstellung der ATP-Stammlösung

Die Herstellung der ATP-Stammlösung wurde im Kühlkammerlabor bei 4 °C durchgeführt. In einem 25 ml Becherglas wurden 15 ml Wasser vorgelegt. Das Becherglas wurde in einem Eisbad auf einem Magnetrührer platziert und ein Rührfisch hinzugefügt. Nach der Zugabe von 5 g ATP wurde mit vorgekühlter 5 mol/l Natronlauge rasch auf etwa pH 7 eingestellt. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich der Ansatz nicht über 10 °C erwärmte und der pH-Wert nicht den Neutralpunkt überschritt.

Danach wurde die Lösung in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt und das Volumen anhand der aufgedruckten Skala abgeschätzt. Drei 20 μ l Proben dieser Lösung wurden mit Wasser um den Faktor 100 verdünnt. Anschließend wurden je 20 μ l dieser Verdünnungen erneut in Wasser 150fach verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 259$ nm gegen Wasser bestimmt. Aus dem Mittelwert der Messwerte wurde die ATP-Konzentration der Lösung berechnet. Der molare Absorptionskoeffizient für ATP beträgt $\epsilon_{\text{ATP}} = 15,41/(\text{mol}\cdot\text{cm})$. Lag die Konzentration über 400 mmol/l wurde die Stammlösung weiter mit Wasser verdünnt und die Konzentrationsbestimmung wiederholt. Der benötigte Verdünnungsfaktor wurde anhand des zuvor notierten Volumens berechnet. Abschließend wurde die Stammlösung in 400 μ l Aliquota dispensiert und in 1,5 ml PP-Reaktionsgefäßen bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.5.2 Durchführung der Aktivitätsbestimmung

Verwendete Lösungen

Stammlösungen

10 ml	CHAPS gelöst in Wasser	150 mmol/l
10 ml	Dinatriumhydrogenphosphat in Wasser	1 mmol/l
500 ml	EDTA-Na pH 8,0	8 mmol/l
500 ml	EGTA-Na pH 8,0	0,2 mol/l
10 ml	Natriumazid in Wasser	0,1 mol/l
1 ml	Verapamil-Hydrochlorid gelöst in DMSO	10 mmol/l

Die Natriumazid-Lösung wurde in Aliquota zu je 1 ml dispensiert. Mit Ausnahme der EDTA-Lösung (Lagerung bei RT) und der EGTA-Lösung (Lagerung bei 4–8 °C) erfolgte die Lagerung bei –20 °C.

Pufferbasislösung I

pH 7,4 bei 37 °C

0,97 g	Tris	80 mmol/l
0,1 ml	EGTA-Na pH 8,0	0,2 mmol/l
0,74 g	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	30 mmol/l
ad 100 ml	Wasser	

Pufferbasislösung II

pH 8,5 bei 37 °C

0,97 g	Tris	80 mmol/l
0,1 ml	EGTA-Na pH 8,0	0,2 mmol/l
1,48 g	Magnesiumsulfat-Heptahydrat	60 mmol/l
ad 100 ml	Wasser	

Zur Herstellung der Pufferstammlösungen wurde die Puffersubstanz Tris in etwa 90 ml Wasser gelöst. Anschließend wurde die EGTA-Lösung hinzupipettiert und mit 0,6 mol/l Schwefelsäure bei 37 °C der gewünschte pH-Wert eingestellt. Nun wurde das Magnesiumsulfat-Heptahydrat gelöst und bei RT auf das Endvolumen ergänzt. Der pH-Wert wurde erneut überprüft und gegebenenfalls rejustiert. Nach der Überführung in je zwei 50 ml PP-Röhrchen wurden die Pufferstammlösungen bei 4–8 °C gelagert.

Reagenz A

8,75 g	Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	1,75 % (m/V)
87,5 ml	konzentrierte Schwefelsäure	12,6 mol/l
ad 500 ml	Wasser	

Die Lagerung der Lösung erfolgte in einer 500 ml Duranglasflasche bei RT.

Reagenz C

0,175 g	Malachitgrün-Hydrochlorid	0,035 % (m/V)
1,75 g	Polyvinylalkohol	0,35 % (m/V)
ad 500 ml	Wasser	

Der Polyvinylalkohol wurde zunächst unter Rühren bei etwa 80 °C Wassertemperatur gelöst. Nach dem Abkühlen auf RT wurde auf das Zielvolumen ergänzt und schließlich der Farbstoff unter Rühren gelöst. Die Lagerung der Lösung erfolgte in einem PP-Gefäß bei RT.

Durchführung

Je nach Wahl des Reaktionspuffers und der Proteinfraction lassen sich mit Hilfe des ATPase-Assays verschiedenste Parameter bestimmen:

- Apparente P-gp Expressionsrate in Hefemembranen
- Enzymatische Aktivität von aufgereinigtem P-gp
- P-gp Orientierung in der Liposomenmembran
- Aktivierungsprofile für P-gp Substrate

Die Basis dieser Vielseitigkeit bildet ein modular aufgebautes Puffersystem. Ausgehend von den Pufferbasislösungen I und II werden durch Zusatz der Natriumazid-Stammlösung und Verdünnung mit Wasser zwei Reaktionspuffer erhalten, die sich in ihrer Ionenstärke und in ihren pH-Werten unterscheiden. Die genaue Zusammensetzung dieser Puffer ist Tabelle 2.3 zu entnehmen. Die beiden Puffer wurden in Abhängigkeit von dem zu bestimmenden Parameter mit verschiedenen weiteren Bestandteilen supplementiert. Die Tabelle 2.4 gibt eine Übersicht über die sieben unterschiedlichen Puffer, die auf diese Weise erhalten wurden.

Welche Puffer für die einzelnen Aktivitätsbestimmungen verwendet wurden, die eingesetzte Proteinfraction, Zeitpunkte der Probenentnahme und Datenauswertung

Tab. 2.3: Basiszusammensetzung der Reaktionspuffer I und II.

	Puffer I pH 7,4 bei 37 °C	Puffer II pH 8,5 bei 37 °C
Tris	40 mmol/l	40 mmol/l
EGTA	0,1 mmol/l	0,1 mmol/l
Magnesiumsulfat	15 mmol/l	30 mmol/l
Natriumazid-Stammlösung	2 mmol/l	2 mmol/l

Tab. 2.4: Zusammensetzung der Reaktionspuffer zur Charakterisierung von aufgereinigtem P-gp

	ATP [mmol/l]	Verapamil [μ mol/l]	CHAPS [mmol/l]	Glycerol [% (V/V)]	DMSO [% (V/V)]
Puffer Ia	10	—	—	—	1
Puffer II	10	80	—	—	1
Puffer Ib	10	130	—	20	—
Puffer Ic	10	130	25	20	—
Puffer Id	—	130	—	—	—
Puffer Ie	10	130	—	—	—
Puffer If	10	—	—	—	—

werden in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben. Die experimentelle Durchführung der eigentlichen ATPase-Aktivitätsbestimmung erfolgte unabhängig von der Zielsetzung immer gleich und wie folgt:

Zunächst wurde(n) der/die Reaktionspuffer aus Stammlösungen angesetzt. Da die P-gp Aktivität vom pH-Wert und von der Ionenstärke des Puffers abhängig ist [65], wurden die eingesetzten Volumina der Stammlösungen mit einem Korrekturfaktor f multipliziert. Auf diese Weise wurden Verdünnungseffekte, die durch die Zugabe der Proteinfraction oder der Substratstammlösungen auftraten, ausgeglichen.

$$f = \frac{V_{\text{Reaktion}}}{V_{\text{Puffer}}} \quad (1)$$

Das Puffervolumen V_{Puffer} entspricht der Differenz aus Reaktionsvolumen V_{Reaktion} und den Volumina der eingesetzten Proteinfraction und Substratstammlösung.

Vor der eigentlichen Aktivitätsbestimmung wurde die benötigte Anzahl an Pyrex-Glasröhrchen mit 1 ml 8 mmol/l EDTA-Lösung beschickt und auf Eis gekühlt. In zehn weiteren Pyrex-Glasröhrchen wurde mit Hilfe der Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung eine Kalibriergerade aus sieben Messpunkten im Bereich von 2,5 bis 25 nmol P_i und drei Nullwerten angelegt. Dann wurde mit der EDTA-Lösung auf ein Volumen von 1 ml ergänzt, jedes Röhrchen der Kalibriergeraden mit 50 μ l ATP-haltigem Reaktionspuffer versetzt und bis zur Detektionsreaktion ebenfalls auf Eis gekühlt.

Die Enzymreaktion wurde in einem Volumen von 250 μ l in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 37 °C durchgeführt. Der Ansatz wurde dazu 5–10 min auf dem Thermostat auf 37 °C temperiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe der Proteinfraction

mit einer 10 μl -Hamiltonspritze gestartet. Nach der Homogenisierung des Ansatzes für 3 s auf einem Vortexschüttler wurde sofort eine Probe von 50 μl ($t_1 = 0$ min) entnommen. Anschließend wurde die Enzymreaktion gestoppt, indem die Probe, unter ständigem Schütteln auf dem Vortexschüttler, in 1 ml eiskalte EDTA-Lösung eingebracht wurde. Bis zur Phosphatdetektion wurde die Probe auf Eis gekühlt. Auf gleiche Weise wurden drei weitere Proben zu den Zeitpunkten t_2 , t_3 und t_4 genommen. Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Messpunkten richtete sich dabei nach dem Ziel der Aktivitätsbestimmung.

Nach Beenden der enzymatischen Reaktion wurde die Detektionsreaktion durchgeführt. Dazu wurde zunächst jede Probe unter Vortexen mit 200 μl Reagenz A versetzt und 10–15 min im Wasserbad bei RT inkubiert. Die Inkubation im Wasserbad gewährleistete eine schnelle und gleichmäßige Erwärmung der Proben. Nun wurden 200 μl Reagenz C zugesetzt und für weitere 20 min inkubiert. Die Farbreaktion wurde schließlich durch Zugabe von 200 μl 4 mol/l Schwefelsäure gestoppt und die Absorption der Lösung sofort bei $\lambda = 610$ nm bestimmt.

Mit Hilfe der linearen Regression wurde nun aus den vier Messwerten einer jeden Reaktion die Reaktionsrate in Form der Steigung m_R der Regressionsgeraden berechnet. Auch die Steigung m_K der Kalibriergeraden wurde auf diese Weise ermittelt. Aus diesen beiden Werten sowie der Konzentration c_{Protein} und dem Volumen V_{Protein} der eingesetzten Proteinsuspension wurde anhand von Gleichung (2) die spezifische Aktivität v in U/mg errechnet.

$$v = \frac{m_R}{m_K} \cdot \frac{5}{V_{\text{Protein}} \cdot c_{\text{Protein}}} \quad (2)$$

Die weitere Auswertung war abhängig von der Art des durchgeführten ATPase-Assays und wird in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

2.5.3 Bestimmung der apparenten P-Glykoprotein Expressionsrate in Hefemembranen

Die apparente P-gp Expressionsrate in BJ5457-Hefemembranen wurde mit dem von Figler et al. [49] entwickelten Verfahren bestimmt. Zunächst wurden die Puffer Ia und II gemäß Tabelle 2.4 aus den Stammlösungen hergestellt. Dann wurde die ATPase-Aktivität von 1 μl (entsprach etwa 20 μg Protein) Membranfraktion in Triplikaten in beiden Puffern bestimmt, wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben. Die Probenentnahme erfolgte in Puffer Ia alle 3 min, in Puffer II alle 15 min. Durch Einsetzen der gemittelten Werte in die Gleichung (3) wurde die basale P-gp Aktivität B in U/mg berechnet.

$$B = \frac{v_{(\text{Reaktionspuffer II})} - 0,038 \cdot v_{(\text{Reaktionspuffer I})}}{4,562} \quad (3)$$

Da reines P-gp eine basale Aktivität von 0,7 U/mg zeigt, konnte nun anhand der experimentell bestimmten basalen Aktivität B , die apparente Expressionsrate berechnet werden.

2.5.4 Aktivitätsbestimmung von aufgereinigtem P-Glykoprotein

Aufgereinigtes und in Proteoliposomen rekonstituiertes P-gp wurde mit Hilfe des ATPase-Assays charakterisiert. Zum Einen wurde in Gegenwart von 130 $\mu\text{mol/l}$ Verapamil der K_m -Wert und die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit v_{max} von ATP nach Michaelis-Menten bestimmt. Zum Anderen wurde die Steigerung der ATP-Umsetzung durch 130 $\mu\text{mol/l}$ Verapamil im Vergleich zur basalen ATPase-Aktivität bestimmt.

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten Parameter wurden die Puffer Id und Ie gemäß Tabelle 2.4 hergestellt. Das Mischungsverhältnis der beiden Puffer wurde in den Reaktionsansätzen so variiert, dass ATP-Konzentrationen bis maximal 10 mmol/l erhalten wurden. Alle Ansätze wurden als Duplikate angelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von etwa 1 μg P-gp in Proteoliposomen gestartet und wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben durchgeführt. Die Probenentnahme erfolgte alle 20 min. Zur Auswertung wurde die spezifische ATPase-Aktivität v gegen die ATP-Konzentration c aufgetragen und die Daten mit Hilfe der nichtlinearen Regression anhand von Gleichung (4) analysiert.

$$v = \frac{v_{\text{max}} \cdot c}{K_m + c} \quad (4)$$

Zur Bestimmung der maximalen ATP-Umsetzung in Gegenwart von 130 $\mu\text{mol/l}$ Verapamil wurden die Reaktionspuffer Ie und If (siehe Tabelle 2.4) verwendet. Die Bestimmung der ATPase-Aktivität erfolgte in beiden Puffern in Triplikaten. Für jede Reaktion wurde 1 μg reines P-gp verwendet, die Probenentnahme erfolgte alle 20 min. Nach der Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde der Quotient aus der durch Verapamil stimulierten und der basalen ATPase-Aktivität gebildet. Er diente als Maß für die Güte der Präparation.

2.5.5 Bestimmung der P-Glykoprotein Orientierung in Liposomenmembranen

Die Bestimmung der P-gp Orientierung in den Liposomenmembranen wurde in Mischungen aus Reaktionspuffer Ib und Ic (siehe Tabelle 2.4) durchgeführt. Dabei wurden durch Variation des Mischungsverhältnisses der beiden Puffer in den Reaktionsansätzen CHAPS-Konzentrationen von 0 bis 25 mmol/l eingestellt. Alle Ansätze wurden als Duplikate angelegt. Nach dem Start der Reaktion durch Zugabe von etwa 1 μg P-gp in Proteoliposomen erfolgte alle 20 min eine Probenentnahme. Die praktische Durchführung des Versuchs ist in Kapitel 2.5.2 beschrieben.

Zur Auswertung wurde die spezifische Aktivität gegen die CHAPS-Konzentration aufgetragen. Die ATPase-Aktivität nahm mit steigender CHAPS-Konzentration exponentiell ab. Mit Hilfe der nichtlinearen Regression wurde eine Lösung für Gleichung (5) für die Messwerte vor Erreichen der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) von 9 mmol/l CHAPS ermittelt (Funktion 1). Die ATPase-Aktivität der P-gp Moleküle, deren Nukleotidbindungsstellen nach außen gerichtet waren („inside-out“-Orientierung), wurde durch diese Funktion beschrieben.

$$v = ae^{-b \cdot c_{\text{CHAPS}}} \quad (5)$$

Dann wurde die nichtlineare Regression für Messwerte wiederholt, die bei CHAPS-Konzentrationen > 10 mmol/l ermittelt wurden (Funktion 2). Nachdem die CMC überschritten worden war, wurde die Liposomenmembran durchlässig für ATP. Die zweite Funktion beschrieb daher die ATPase-Aktivität aller P-gp Moleküle. Nun wurde für beide Funktionen die ATPase-Aktivität bei einer CHAPS-Konzentration

von 7,5 mmol/l bestimmt und der Quotient aus den Aktivitäten ($v_{\text{Fkt1}}/v_{\text{Fkt2}}$) gebildet. Anschließend wurde die Berechnung für eine CHAPS-Konzentration von 12,5 mmol/l wiederholt. Die jeweils erhaltenen Quotienten wurden gemittelt und mit dem Faktor Hundert multipliziert. Das Ergebnis entspricht dem prozentualen Anteil der nach außen gerichteten Nukleotidbindungsstellen.

2.5.6 Erstellung eines ATPase-Aktivierungsprofils

Zur Erstellung eines Aktivierungsprofils wurde zunächst die ATPase-Aktivität in Proben mit aufsteigender Substratkonzentration bestimmt, wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben. Die Zusammensetzung des Reaktionspuffers entsprach Puffer If und ist Tabelle 2.4 zu entnehmen. Die zu charakterisierende Substanz wurde in DMSO gelöst und die Stammlösung seriell in DMSO verdünnt. Mit Hilfe einer 10 μl -Hamiltonspritze wurden jeweils 2,5 μl der Substanz-Lösungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt, mit Reaktionspuffer versetzt und 3 s auf einem Vortexschüttler gemischt. Die basale ATPase-Aktivität wurde dreifach in Gegenwart von 2,5 μl DMSO bestimmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1–2 μg aufgereinigtem P-gp gestartet und die Probenentnahme alle 30 min durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte durch Auftragen der spezifischen ATPase-Aktivität v gegen den Logarithmus der eingesetzten Substanzkonzentration c und die sich anschließende Analyse der Daten mit Hilfe der nichtlinearen Regression unter Anwendung von Gleichung (6).

$$v = \left(B + (D - B) \cdot \frac{c}{K_{m(D)} + c} \right) \cdot \left(1 - \frac{c}{K_i + c} \right) \quad (6)$$

Die Wechselwirkung zwischen dem Transportprotein und der Substanz wird durch die drei Konstanten D , $K_{m(D)}$ und K_i charakterisiert. Die Konstante D beschreibt die maximale ATPase-Aktivität. Die Konstanten $K_{m(D)}$ und K_i entsprechen der Substanzkonzentration bei halbmaximaler Stimulation bzw. halbmaximaler Inhibition der ATPase-Aktivität. Die vierte Konstante B liefert die basale ATPase-Aktivität in Abwesenheit der Testsubstanz.

Da in unabhängigen Experimenten zum Teil erhebliche Schwankungen bei der Konstanten D beobachtet wurden, mussten die Daten vor einer kombinierten Auswertung

anhand von Gleichung (7) normalisiert werden.

$$v = \frac{v - B}{D - B} \cdot (D_{\text{mittel}} - B_{\text{mittel}}) + B_{\text{mittel}} \quad (7)$$

Die Variablen B_{mittel} und D_{mittel} entsprechen dabei den Mittelwerten der in Einzelexperimenten ermittelten Werte für B und D .

2.6 Analyse der quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen

Verfahren zur Ermittlung von quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen dienen der Untersuchung von Zusammenhängen zwischen der chemischen Struktur der Substanzen und ihrer biologischen Wirkung. Sie beruhen auf der Annahme, dass die Unterschiede in der biologischen Aktivität mit den unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der einzelnen Substanzen korrelieren. In dieser Arbeit wurden Methoden zur Beschreibung von dreidimensionalen Struktur-Wirkungsbeziehungen (3D-QSAR) eingesetzt.

Für die 3D-QSAR [66] ist zunächst die Kenntnis der räumlichen Struktur eines jeden untersuchten Moleküls notwendig. Im günstigsten Fall liegen Kristallstrukturen der untersuchten Substanzen vor. Ist dies nicht der Fall, muss aus der bekannten 2D-Struktur zunächst ein dreidimensionales Modell erstellt werden. So wurden in der vorliegenden Arbeit die Strukturen der einzelnen Verbindungen mit dem Programm MOE erstellt. Als Basis dienten zwei Grundgerüste, die von der Substanz Tariquidar (XR9576) in einer auf das Hoechst 33342-Pharmakophor angepassten Konformation abgeleitet worden waren [67]. Durch Anfügen der entsprechenden Substituenten an diese Grundgerüste (siehe Kapitel 3.4.1, Tabelle 3.8) wurden die räumlichen Strukturen der untersuchten Substanzen erhalten.

2.6.1 Geometrieoptimierung und Berechnung der Elementarladungen

Die so entworfenen Strukturen sind im Hinblick auf die Bindungswinkel, Bindungslängen, die Torsion bestimmter Bindungen und die van-der-Waals-Energie noch nicht optimal. Dies schlägt sich in einem hohen Gesamtenergieinhalt der einzelnen Moleküle nieder. Zur Minimierung der Gesamtenergie muss daher die Geometrie optimiert werden. Zusätzlich muss die Ladungsverteilung innerhalb der molekularen Strukturen durch Berechnung der Partiaalladungen ermittelt werden, damit neben sterischen auch elektrostatische Einflüsse bei der Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehungen berücksichtigt werden können.

Kraftfeldmethoden

Eine Möglichkeit zur Geometrieoptimierung bieten Kraftfeldmethoden. Es handelt sich hierbei um parametrisierte Verfahren zur Berechnung des theoretischen Energieinhalts eines Moleküls. Die Gesamtenergie entspricht dabei der Summe mehrerer Terme, die jeweils für ein bestimmtes Phänomen stehen. Zur Berechnung der einzelnen Beiträge werden die Bindungen als Federn und die einzelnen Atome als Kugeln mit verschiedenen Massen betrachtet. Jede Feder strebt eine bestimmte (optimale) Länge und damit ein Energieminimum an. Durch jede Veränderung der Bindungslängen im Molekül werden einige Federn gedehnt, andere gestaucht. Die dazu nötige Energie lässt sich mit Hilfe des Hooke'schen Gesetzes berechnen [66]. Auf Grundlage der gleichen Überlegungen wird der durch Änderung der Bindungswinkel verursachte Energieanteil beschrieben. Der Beitrag der Torsionswinkel zum Gesamtenergiegehalt lässt sich anhand einer harmonischen Schwingung berechnen. Die van-der-Waals-Energie wird schließlich mit Hilfe des Lennard-Jones-Potenzials ermittelt. Da alle diese Berechnungen auf Gesetze der klassischen Mechanik zurückgreifen, wird diese Methode auch als Molekülmechanik bezeichnet [68]. Ausgehend von der jeweiligen Startkonformation können mit iterativen Methoden die Koordinaten der Atome hinsichtlich eines minimalen Gesamtenergieinhalts angepasst werden. Die Zuweisung der Partialladung erfolgt anhand der für den jeweiligen Atomtyp vorgegebenen Parameter. Im vorliegenden Fall wurde das Kraftfeld MMFF94x (Merck molecular force field) [69] verwendet. Das bereits energieoptimierte Grundgerüst der Verbindungen wurde von der Energieminimierung ausgeschlossen.

Kraftfeldmethoden sind den im Folgenden vorgestellten quantenmechanischen und semiempirischen Methoden hinsichtlich ihrer Genauigkeit unterlegen. Auch ist bei der Auswahl des Kraftfelds auf die Eignung für die jeweilige Anwendung zu achten. Der große Vorteil dieser Methode liegt in den niedrigen Anforderungen an die Rechenleistung. Auf diese Weise können Energieminimierungen an sehr großen Molekülen durchgeführt werden, die z. B. für quantenmechanische Methoden aufgrund unzureichender Rechenkapazitäten noch nicht zugänglich sind.

Quantenmechanische Verfahren

Eine weitere Möglichkeit zur Geometrieoptimierung und Berechnung der Elementarladungen ist die Anwendung quantenmechanischer Rechenverfahren. Diese nutzen die

Schrödinger-Gleichung zur Berechnung der elektronischen Struktur eines Moleküls [68]. Allein durch die Verwendung von Naturkonstanten können im sogenannten *ab initio* Verfahren Struktur und elektronische Eigenschaften einer Substanz ermittelt werden. Dies führt zu einer breiten Einsetzbarkeit der Methode, da sie nicht an empirische Daten für die untersuchten Strukturen gebunden ist. Die exakte Lösung der Schrödinger-Gleichung ist jedoch nur für einfache Eielektronensysteme, wie z. B. das Wasserstoff-Molekülion, möglich. Für komplexere Strukturen mit mehreren Elektronen werden Näherungsverfahren eingesetzt. Bei der häufig verwendeten Hartree-Fock-Methode wird die Summe der Elektron-Elektron-Wechselwirkungen durch ein effektives Feld ersetzt. Der Zustand jedes Elektrons lässt sich so auf eine Einteilchenfunktion zurückführen, die auf der Wechselwirkung mit dem Potenzial des Atomkerns und dem gemittelten Potenzial der restlichen Elektronen beruht. Durch die resultierende Funktion wird das Molekülorbital beschrieben. Mathematisch wird diese Funktion durch die Kombination verschiedener Gauss-Funktionen angenähert. Mit dem sogenannten SCF-Verfahren (self consistent field) wird die Funktion schrittweise verfeinert, bis die Berechnung konvergiert, d. h. die Funktion ein Molekülorbital mit minimalem Energieinhalt beschreibt. Die Anzahl der zur Beschreibung des Molekülorbitals eingesetzten Gauss-Funktionen wird im sogenannten Basissatz festgelegt. Die Genauigkeit und die für die Berechnung benötigte Zeit steigen mit der Anzahl der verwendeten Gauss-Funktionen.

Die beschriebene Hartree-Fock-Methode ist eines der einfachsten und ungenauesten quantenmechanischen Rechenverfahren. Ihre größte Schwäche liegt in der Vereinfachung der Elektron-Elektron-Wechselwirkung allein durch das beschriebene Feld. Aus diesem Grund wurden Methoden entwickelt, die die Korrelation der Elektronen berücksichtigen. Sie werden auch als post-Hartree-Fock-Methoden bezeichnet.

Einen Kompromiss zwischen den aufwändigen *ab initio* Berechnungen und den relativ ungenauen Kraftfeldmethoden stellen semiempirische Methoden dar. Dabei werden Teilrechnungen im *ab initio* Verfahren durch einfache Näherungen ersetzt, die auf experimentellen Daten beruhen. Dies führt zur drastischen Reduzierung der Rechenzeit, allerdings auf Kosten der Genauigkeit. Dieses Verfahren wurde zur Berechnung der Partialladungen der Moleküle vor der Überlagerung eingesetzt. Dabei kam das Programm MOPAC2007 und die Methode PM6 zum Einsatz [70]. Die Parameter wurden wie folgt definiert: Die Berechnung wurde mit kartesischen Koordinaten (Parameter: XYZ) durchgeführt und auf eine maximale Dauer von

3 600 s begrenzt. Die Fehlerkorrektur für molekülmechanische Berechnungen an Amid-Funktionen (Parameter: MMOK) wurde genutzt. Die Moleküle verfügten über keine Nettoladung. Die Berechnungen wurden für den Singulettzustand der Moleküle mit der SCF-Methode durchgeführt.

2.6.2 Konformationsanalyse

Bei Raumtemperatur liegen Moleküle nicht in einer einzigen energetisch günstigen Konformation vor. Die einzelnen Atome können ihre Position innerhalb eines bestimmten Bereichs verändern. Zum Beispiel führt die freie Drehbarkeit einer Einfachbindung zu einer Vielzahl von Strukturen, sogenannten Rotameren oder Konformeren, die sich in der relativen räumlichen Anordnung der Substituenten unterscheiden [66]. Die Veränderung von Bindungslängen und Bindungswinkeln spielt bei diesen Konformationsänderungen dagegen eine untergeordnete Rolle. Insgesamt liegt eine Substanz bei Raumtemperatur in einer Vielzahl von Konformationen vor, wobei ein Großteil energetisch günstigen Strukturen entspricht. Die potenzielle Energie der einzelnen möglichen Strukturen lässt sich in Form einzelner Punkte auf einer multidimensionalen Fläche beschreiben. Konformationsänderungen entsprechen dann Bewegungen von einem Punkt zum nächsten. Stabile Konformationen führen zu lokalen Minima auf dieser Fläche. Das globale Minimum des Konformationsraums entspricht der Konformation mit der geringsten potenziellen Energie [66].

Die beschriebenen Methoden zur Geometrieoptimierung liefern nur eine energetisch günstige Konformation. Sie ist abhängig von der Startkonformation und entspricht aller Wahrscheinlichkeit nach nicht dem globalen Minimum. Die erhaltene Konformation muss auch nicht dem biologisch aktivem Zustand des Moleküls entsprechen. Ziel der Konformationsanalyse ist es daher, möglichst viele der energetisch günstigen Konformationen zu ermitteln. Durch Vergleiche mit bestehenden Pharmakophoren oder Kristallstrukturen kann dann aus den erhaltenen Konformeren die Struktur ausgewählt werden, die der biologisch aktiven Form am ähnlichsten ist [68].

In dieser Arbeit wurde zur Konformationsanalyse eine moleküldynamische Methode, das sogenannte „Simulated Annealing“, verwendet. Dabei wurde dem Molekül durch die simulierte Erhitzung auf 1 000 K Bewegungsenergie zugeführt. Mit Hilfe dieser Energie können Energiebarrieren überwunden und viele verschiedene Konformationen erreicht werden. Nach 2 000 fs wurde das System innerhalb von 10 000 fs, entsprechend

einer exponentiellen Funktion, bis auf 0 K abgekühlt. Dabei nimmt das untersuchte Molekül eine energetisch günstige Konformation ein. Durch vielfache Wiederholung ($100 \times$) dieses Vorgangs kann ein großer Teil des Konformationsraums abgedeckt werden. Mit den auf diese Weise erhaltenen Strukturen wurde abschließend eine Geometrieoptimierung (Kraftfeld: MMFF94 [69], siehe Kapitel 2.6.1) durchgeführt. Neben der potenziellen Energie erlaubt auch die Häufigkeit, mit der eine bestimmte Struktur gefunden wird, Rückschlüsse auf die bevorzugte Geometrie. Schließlich wurde jeweils die Struktur mit dem geringsten Energieinhalt ausgewählt und die Energieminimierung mit quantenmechanischen Methoden fortgesetzt.

2.6.3 Dreidimensionale quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (3D-QSAR)

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Verfahren zur Analyse der dreidimensionalen Struktur-Wirkungsbeziehungen (3D-QSAR) angewendet. Dabei handelte es sich um die von Cramer et al. [71] entwickelte vergleichende Molekülfeld-Analyse (CoMFA = Comparative Molecular Field Analysis) und um die von Klebe et al. [72] entwickelte CoMSIA-Methode (Comparative Molecular Similarity Indices Analysis), die auf dem Vergleich molekularer Ähnlichkeits-Indizes beruht. Die Vorgehensweise ist bei beiden Methoden ähnlich. Zunächst wird für jede Verbindung eine Konformation gewählt, die möglichst auch der biologisch aktiven Konformation entspricht. Im Anschluss daran erfolgt die Überlagerung der einzelnen Strukturen. Da die 3D-Eigenschaften bei der 3D-QSAR explizit in die Analyse eingebunden werden, ist dieser Schritt für beide Verfahren essenziell. Die überlagerten Strukturen werden anschließend einzeln in ein dreidimensionales Gitter eingebracht und die Molekülfelder berechnet. Aus den Molekülfeld-Variablen werden schließlich mit einer statistischen Methode die Variablen extrahiert, die signifikant zur Erklärung der Unterschiede der biologischen Aktivitäten der untersuchten Substanzen beitragen.

Überlagerung der Verbindungen

Vor der Analyse der dreidimensionalen Struktur-Wirkungsbeziehungen (3D-QSAR) müssen die so erstellten Strukturen zunächst überlagert werden. Dazu werden sie so angeordnet, dass Molekülteile, die im Rahmen eines Pharmakophormodells als

gleichwertig anzusehen sind, möglichst den gleichen Raum einnehmen [68]. Dies geschah mit dem Programm **FlexS** [73]. Die Überlagerung der Verbindungen findet dabei anhand einer vorgegebenen starren Strukturvorlage statt. Im vorliegenden Fall handelte es sich um die Substanz XR9576 in einer auf das Hoechst 33342-Pharmakophor angepassten Struktur [67]. Die Tetrahydroisochinolin-Ethyl-Phenylamid-Teilstrukturen der untersuchten Substanzen und des Tariquidars wurden zur Deckung gebracht. Für die Überlagerung wurde die RIGFIT Methode gewählt. Der Parameter für die minimale Überlappung der van-der-Waals-Volumina wurde auf 0,6 festgesetzt und die Ladungen mit dem MMFF94s Kraftfeld berechnet. Da eine Energieminimierung bereits vor der Überlagerung durchgeführt worden war, konnte auf eine erneute Minimierung verzichtet werden. Nach der Überlagerung mit **FlexS** wurden abschließend für die erhaltenen Konformere die Partialladungen mit dem Programm **MOPAC2007** unter Verwendung der Methode PM6 semiempirisch berechnet. Dabei wurde auf eine erneute Geometrieoptimierung verzichtet.

Berechnung der Molekülfelder

Die Berechnung der Molekülfelder erfolgt nach der Platzierung der untersuchten Strukturen in einem dreidimensionalen Gitter mit einer bestimmten Maschenweite (hier: 2 Å). Nun werden an den Schnittpunkten innerhalb des Gitters mit Hilfe sogenannter Sonden Wechselwirkungsenergien berechnet, die in ihrer Gesamtheit auch als Molekülfeld oder molekulares Feld bezeichnet werden. Dieses Feld ist für jede untersuchte Struktur spezifisch und wird durch eine Vielzahl von Variablen beschrieben.

Zur Untersuchung sterischer Effekte wird ein ungeladenes Kohlenstoff-Atom als Sonde eingesetzt. Für die CoMFA dient hier das Lennard-Jones-Potenzial, wie schon bei den Kraftfeld-Methoden, als Grundlage der Berechnung. Elektrostatische Wechselwirkungen werden bei der CoMFA durch ein Coulomb-Potenzial mit einer einfach positiv geladenen Probe bestimmt. In Abbildung 2.1 sind die Funktionen zur Berechnung der sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungsenergien dargestellt. Es wird deutlich, dass die Energiebeiträge für kleine Abstände r zwischen Sonde und Molekül schnell sehr groß werden. Dies kann die Datenanalyse erschweren und wird daher durch Einführung von Grenzwerten unterdrückt.

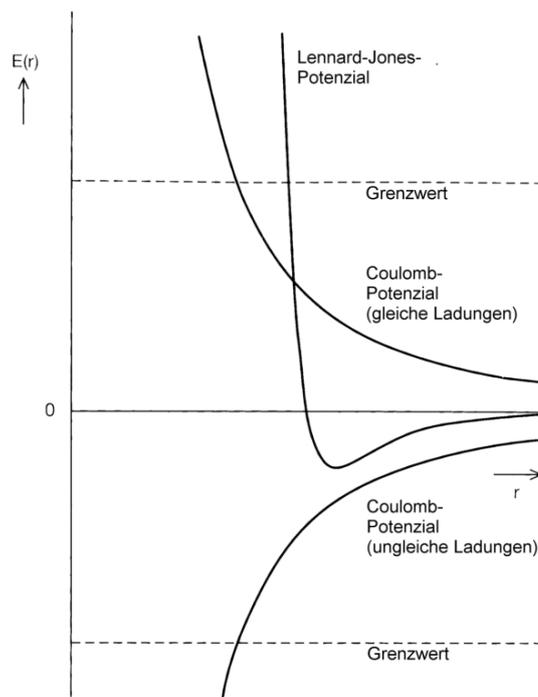


Abb. 2.1: Verwendung von Potenzialen zur Beschreibung zwischenmolekularer Wechselwirkungen in der CoMF-Analyse [68].

Die CoMSI-Analyse (comparative molecular similarity indices) wurde von Klebe et al. [72] entwickelt und beruht auf der Analyse der Ähnlichkeit der untersuchten Moleküle. Auch hier werden die Strukturen zunächst in einem dreidimensionalen Gitter platziert. Nun werden an jedem Gitterpunkt die Ähnlichkeitsindizes auf Grundlage einer Gauss-Funktion berechnet. Diese ist in Abbildung 2.2 zusammen mit den für die CoMFA verwendeten Potenzialen dargestellt.

Der endliche Verlauf der Gauss-Funktion macht den Einsatz von Grenzwerten im Gegensatz zur CoMFA unnötig. Auch erfolgt der Anstieg der Werte für die Ähnlichkeitsindizes mit abnehmendem Abstand r gleichmäßiger als z. B. bei den mit dem Lennard-Jones-Potenzial berechneten Wechselwirkungsenergien. Dies führt im Vergleich zur CoMFA zu weniger „zerrissenen“ Konturdiagrammen [68] und macht die Auswertung der CoMSIA insgesamt leichter.

Erstellung des 3D-QSAR-Modells

Bei der CoMFA und bei der CoMSIA wird jedes Molekül durch eine Vielzahl unabhängiger Variablen charakterisiert. Dem stehen nur wenige abhängige Variablen

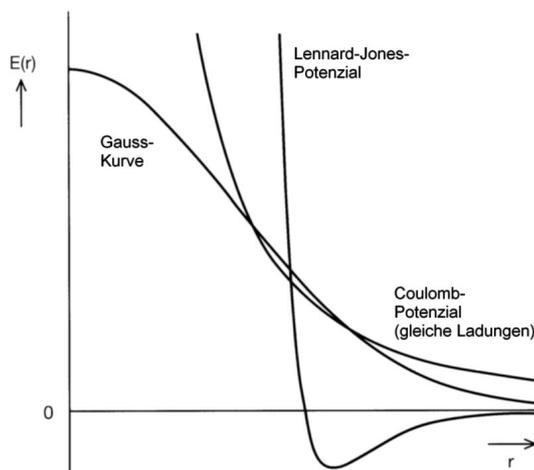


Abb. 2.2: Vergleich der in der CoMSI-Analyse verwendeten Gauss-Funktion mit den in der CoMF-Analyse verwendeten Potenzialen [68].

in Form von Aktivitätsdaten gegenüber. Zur Entwicklung eines brauchbaren statistischen Modells muss die Zahl der Molekülfeld-Variablen daher deutlich reduziert werden. Hierzu wird die PLS-Methode (partial least squares) eingesetzt [74]. Mit dieser Methode werden aus den unabhängigen Variablen sogenannte latente Variablen in Form von Vektoren extrahiert. Diese Vektoren sind orthogonal zueinander, also unkorreliert, und erklären einen Großteil der beobachteten Varianz der unabhängigen Variablen. Die PLS-Methode ähnelt einer Hauptkomponentenanalyse, die latenten Variablen werden jedoch so ausgewählt, dass sie maximal mit den abhängigen Variablen korrelieren [75].

Für die mit dem PLS-Verfahren ermittelten Modelle stehen verschiedene Validierungsmethoden zur Verfügung. Bei der sogenannten Leave-One-Out-Methode (LOO) wird jeweils eine Verbindung aus dem Datensatz entfernt und auf Grundlage der restlichen Verbindungen ein neues Modell erstellt. Dieses dient dann zur Vorhersage der Aktivität der ausgelassenen Verbindung. Der Vorgang wird wiederholt, bis für alle Verbindungen im Datensatz einmal die Aktivität vorhergesagt wurde. Je besser das Modell, desto geringer wird die Diskrepanz zwischen den tatsächlichen und den berechneten Aktivitäten der Substanzen sein. Mathematisch lässt sich dies, unter Einbeziehung der Anzahl der untersuchten Verbindungen n und der ermittelten Komponenten c , durch die kreuzvalidierte Standardabweichung s_{PRESS} (Standard deviation of Predictive of Sum of Square = s_{PRESS}) beschreiben:

$$s_{PRESS} = \sqrt{\frac{\sum (Y_{\text{beobachtet}} - Y_{\text{berechnet}})^2}{n - c - 1}} \quad (1)$$

Ein weiteres Maß für die Vorhersagekraft des Modells ist der quadrierte Korrelationskoeffizient der Vorhersage q^2 :

$$q^2 = 1 - \left(\frac{\sum (Y_{\text{beobachtet}} - Y_{\text{berechnet}})^2}{\sum (Y_{\text{beobachtet}} - \bar{Y})^2} \right) \quad (2)$$

Der quadrierte Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen $-\infty$ und 1 annehmen und charakterisiert die Güte des statistischen Modells. So verfügen Modelle mit $q^2 \leq 0,4$ nur über eine schlechte Aussagekraft, im Bereich $0,4 < q^2 \leq 0,6$ ist der Nutzen eines Modells fraglich und ab $q^2 > 0,6$ handelt es sich unter statistischen Gesichtspunkten um ein gutes Modell [76].

Eine weitere Möglichkeit der Validierung ist die Leave-Many-Out-Methode (LMO). Hier werden die Verbindungen zufällig in mehrere Gruppen unterteilt. Eine Gruppe wird aus dem Datensatz entfernt und eine PLS-Analyse basierend auf den restlichen Gruppen durchgeführt. Das erhaltene Modell wird zur Vorhersage der Aktivitäten der Substanzen in der nicht berücksichtigten Gruppe verwendet. Zur Beurteilung des Modells werden erneut die oben beschriebenen Parameter berechnet. Da die Zusammensetzung der Gruppen Auswirkungen auf das Ergebnis dieser Validierung hat, wird sie im Gegensatz zur LOO-Validierung nicht einmalig durchgeführt, sondern mehrfach wiederholt und die erhaltenen Werte gemittelt. Die beiden beschriebenen Verfahren werden unter dem Oberbegriff Kreuzvalidierung zusammengefasst.

Nach der erfolgreichen Validierung können sogenannte Konturdiagramme erstellt werden. Hierfür werden Bereiche mit Gitterpunkten, die signifikant zur Erklärung der biologischen Aktivität der untersuchten Strukturen beitragen, grafisch dargestellt. In Abhängigkeit der verschiedenen Sonden können dabei unterschiedliche molekulare Eigenschaften betrachtet werden.

2.7 Radioligandbindungsstudien

2.7.1 Allgemeine Grundlagen

Gemäß der Okkupationstheorie nach Clark [77] folgt die reversible Bindung eines Liganden L an einen monomeren Rezeptor R dem Massenwirkungsgesetz. Im Bindungsgleichgewicht gilt:



Die Bindung erfolgt in einer Assoziationsreaktion durch Ausbildung eines Ligand-Rezeptor-Komplexes RL . Dieser Vorgang ist reversibel und der Komplex kann wieder in Ligand und Rezeptor dissoziieren. Beide Reaktionen werden durch ihre jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten k_{+1} , der Assoziation, und k_{-1} , der Dissoziation, charakterisiert. Für die Geschwindigkeit der Assoziationsreaktion v_{hin} gilt bei gegebenen Konzentrationen $[L]$ und $[R]$:

$$v_{\text{hin}} = k_{+1} \cdot [L] \cdot [R] \quad (2)$$

Analog gilt bei einer gegebenen Konzentration von Rezeptorligandkomplexen $[RL]$ für die Geschwindigkeit der Dissoziation $v_{\text{rück}}$:

$$v_{\text{rück}} = k_{-1} \cdot [RL] \quad (3)$$

Wenn die Reaktion dem Massenwirkungsgesetz folgt, stellt sich nach einiger Zeit ein Gleichgewicht zwischen der Hin- und Rückreaktion ein. Nach den Gleichungen (2) und (3) gilt dann:

$$v_{\text{hin}} = v_{\text{rück}} = k_{+1} \cdot [L] \cdot [R] = k_{-1} \cdot [RL] \quad (4)$$

Aus Gleichung (4) lässt sich die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D ableiten:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[L] \cdot [R]}{[RL]} = \frac{1}{K_A} \quad (5)$$

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D entspricht derjenigen Konzentration des Liganden, bei der die Hälfte der vorhandenen Rezeptoren besetzt sind. Sie ist

somit ein Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor. Der Kehrwert der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D wird als Gleichgewichtsassoziationskonstante K_A bezeichnet und kann ebenfalls zur Beschreibung der Affinität genutzt werden.

Für die Berechnung des K_D -Wertes ist die Kenntnis der spezifischen Bindung des Liganden L an den Rezeptor R nötig, d. h. die Konzentration der Rezeptorligandkomplexe $[RL]$. Diese Größe kann experimentell nicht direkt ermittelt werden. Stattdessen wird in unterschiedlichen Reaktionsansätzen die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung bestimmt und die spezifische Bindung durch Subtraktion beider Werte berechnet.

Die unspezifische Bindung des Liganden ist eine nicht sättigbare Bindung, die mit steigenden Radioligandkonzentrationen $[L]$ linear ansteigt. Sie kann sich aus verschiedenen Komponenten zusammensetzen: dazu gehört die unspezifische Bindung an die Nicht-Rezeptor-Bindungsstellen in der Membranpräparation aber auch die Bindung an den verwendeten Filter.

Theoretische Grundlagen heterologer und homologer Kompetitionsexperimente

Als Kompetitionsexperimente werden Bindungsexperimente unter Gleichgewichtsbedingungen bezeichnet, die in Gegenwart einer fixen Radioligandkonzentration $[L]$ und mit steigenden Konzentrationen eines Kompetitors durchgeführt werden. Bei der Ausbildung des Bindungsgleichgewichts konkurrieren Radioligand und Kompetitor um die Besetzung des Rezeptors. Eine Kompetition wird als heterolog bezeichnet, wenn sich Kompetitor und Ligand strukturell unterscheiden. Heterologe Kompetitionen werden zur Bestimmung der Affinität des Kompetitors zum Rezeptor in Form der Gleichgewichtsbindungskonstanten K_i genutzt. Ist der Kompetitor mit dem Radioliganden strukturell identisch, handelt es sich um eine homologe Kompetition. Mit Hilfe einer homologen Kompetition können die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D des Radioliganden und die Gesamtzahl der vorhandenen Bindungsstellen B_{\max} bestimmt werden.

Nach Cheng und Prusoff [78] lässt sich für Kompetitionen aus dem ermittelten IC_{50} -Wert die Gleichgewichtsbindungskonstante K_i berechnen. Der IC_{50} -Wert bezeichnet diejenige Konzentration des Kompetitors, in deren Gegenwart die spezifische Bindung des Radioliganden auf 50 % ihres Ausgangswertes reduziert ist.

Sind die Dissoziationskonstante K_D und die Konzentration $[L]$ des Radioliganden bekannt, lässt sich K_i mit der folgenden Gleichung berechnen.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad (6)$$

An die Anwendung dieser Gleichung sind verschiedene Voraussetzungen geknüpft, u. a. darf die Kurvensteilheit (s. u.) nicht signifikant unterschiedlich von $n = -1$ sein [78].

Für homologe Kompetitionen vereinfacht sich nach DeBlasi et al. [79] die Beziehung, es gilt $K_i = K_D$. Durch Einsetzen und Auflösen nach K_D vereinfacht sich Gleichung (6) zu:

$$K_D = IC_{50} - [L] \quad (7)$$

Weiterhin kann, ausgehend von Gleichung (6), die Anzahl der Bindungsstellen B_{\max} aus den Parametern einer homologen Kompetition berechnet werden [79].

$$B_{\max} = \frac{[RL] \cdot IC_{50}}{[L]} \quad (8)$$

Die Konzentration $[RL]$ bezeichnet in diesem Zusammenhang die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Kompetitors.

2.7.2 Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente

Verwendete Lösungen

Stammlösungen in Wasser		
10 ml	BSA-Stammlösung	1 % (m/V)
100 ml	Hepes-Na pH 7,4	1 mol/l
500 ml	Magnesiumsulfat-Stammlösung	1 mol/l
100 ml	Natriumchlorid-Stammlösung	1 mol/l
250 ml	Tris-HCl pH 7,4	1 mol/l

Aus den aufgeführten Stammlösungen wurden bei Bedarf der Inkubationspuffer, der Waschpuffer hergestellt. Die BSA-Stammlösung wurde für die Pufferherstellung stets frisch hergestellt. Die restlichen Stammlösungen wurden in Duranglasflaschen bei 4–8 °C gelagert.

Durchführung der Bindungsversuche

Die Bindungsexperimente mit Membranpräparationen aus CHO-K1 M403 und A2780adr Zellen wurden in PP-Mikrotiterplatten durchgeführt, deren 96 Vertiefungen jeweils 1,2 ml Probenvolumen aufnehmen konnten. Die membrangebundene Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Tomtech Harvesters abgetrennt. In Tabelle 2.5 ist die Zusammensetzung der einzelnen Reaktionsansätze aufgeführt. Die grau unterlegte Komponente wurde in einer Vertiefung der Mikrotiterplatte vorgelegt. Die restlichen Komponenten wurden in einem 50 ml PP-Röhrchen vorgemischt, um den Pipettierfehler zu reduzieren. Dabei richteten sich die eingesetzten Volumina nach der Gesamtzahl der geplanten Reaktionen. Anschließend wurden je 180 μl dieser Mischung in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert, um damit ein Endvolumen von 200 μl pro Ansatz zu erreichen.

Anschließend wurde die Mikrotiterplatte sorgfältig mit Parafilm M abgedeckt und die Ansätze vorsichtig durch Schütteln auf einem Vortexschüttler durchmischt. Es folgte eine zweistündige Inkubationsphase im Schüttelwasserbad in der Dunkelheit bei 23 °C und 80 Upm. Die Inkubationsdauer (2 h) wurde in Anlehnung an publizierte Methoden gewählt, die für Gleichgewichtsbindingsexperimente mit [^3H]Vinblastin unabhängig von der verwendeten Zelllinie zwischen 1 und 2 h lag [32, 80–82]. Danach wurde der gesamte Versuchsansatz mit Hilfe des Harvesters über eine Filtermatte vakuumfiltriert. Zur Minderung der unspezifischen Bindung war die Filtermatte während der Inkubationszeit mit 0,1 % (m/V) Polyethylenimin-Lösung imprägniert worden. Nach der Filtration wurde ohne Verzögerung dreimal mit je 0,9 ml Wasch-

Tab. 2.5: Zusammensetzung eines 200 μl enthaltenden Reaktionsansatzes für Gleichgewichtsbindingsexperimente mit Membranpräparation aus P-gp exprimierenden Zellen

Vol. (μl)	Komponente	Endkonzentration
20	Wasser (Gesamtbindung) <i>oder</i> Verapamil (unspezifische Bindung) <i>oder</i> Testsubstanz	10 $\mu\text{mol/l}$ 0,1–10 000 nmol/l
40	Homogenat aus P-gp haltigen Zellen verdünnt mit Inkubationspuffer	50–100 $\mu\text{g/ml}$
20	Radioligand in 20 mmol/l NaCl, 0,01 % (m/V) BSA	8 nmol/l
120	Inkubationspuffer	

puffer (20 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l MgSO₄, pH 7,4) pro Vertiefung gespült. Dann wurde die Filtermatte entnommen und auf einer mit haushaltsüblicher Aluminiumfolie abgedeckten und auf 90 °C vortemperierten Heizplatte für 5–10 min getrocknet.

Daraufhin wurde eine Szintillationsreagenzien enthaltende Wachsplatte passgenau auf die vollständig getrocknete Filtermatte aufgelegt. Durch erneutes Erhitzen wurde die Filtermatte mit dem Wachs verschmolzen und die nun mit Wachs getränkte Filtermatte mit Hilfe der Aluminiumfolie von der Heizplatte entfernt. Nach dem Erkalten wurde die Filtermatte vorsichtig von der Aluminiumfolie gelöst, in eine Schutzhülle eingebracht und in eine Zählkassette eingelegt. Abschließend erfolgte die Bestimmung der membrangebundenen β -Aktivität durch Szintillationsspektrometrie in einem Microbeta-Trilux 1450 Counter.

Datenanalyse

Zur Auswertung von Konkurrenzexperimenten wurde die Radioligandgesamtbindung B gegen den Logarithmus der Konzentration X des Kompetitors aufgetragen. Diese Daten wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse unter Verwendung der vier Parameter logistischen Gleichung (siehe Gleichung (9)) analysiert. Dabei wurden alle Parameter als Variablen behandelt; parallel dazu erfolgte eine weitere Regressionsanalyse, bei der die Kurvensteilheit auf $n = -1$ konstant gesetzt wurde. Beide Ergebnisse wurden mit Hilfe eines F-Tests (vgl. Kapitel 2.10.2) verglichen. Anhand dieses Tests wurde entschieden, welches Modell die Daten besser beschrieb.

$$B = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{(\log IC_{50} - \log X) \cdot n}} \quad (9)$$

Die Variable B beschreibt die jeweils betrachtete Bindung, \min und \max beschreiben das untere und obere Plateau der Kurve, X die Konzentration des Kompetitors und n die Steilheit der sigmoidalen Kurve am Wendepunkt. Der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve wird als IC_{50} -Wert bezeichnet und gibt die Konzentration des Kompetitors an, die nötig ist, um die Bindung des Radioliganden auf die Hälfte zu reduzieren. Der IC_{50} -Wert lässt also Rückschlüsse auf die Affinität des Inhibitors zum Rezeptor zu. Der \max -Wert gibt die Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Kompetitors an. Wenn die unspezifische Bindung separat bestimmt und in die Analyse der Gesamtbindung mit aufgenommen wird, erlaubt es die Kurvenanalyse über den resultierenden \min -Wert die unspezifische Bindung abzuschätzen. Anhand

von derart bestimmten *min*- und *max*-Werten für die Gesamt- und unspezifische Bindung wurden die Versuchsergebnisse normalisiert und als %-spezifische Bindung ausgedrückt.

Das Steilheitsmaß der Kurve n ist interpretierbar wie der Hillkoeffizient n_H [83]. Ein Wert von $n_H = 1$ ist vereinbar mit einer Kompetition von Radioligand und Inhibitor an einer einheitlichen Rezeptorpopulation. In der Theorie wäre aber auch das Vorliegen mehrerer nicht miteinander interagierender Bindungsstellen, die alle dieselbe Affinität für den Liganden besitzen, möglich. Eine steil abfallende Kurve mit einem Hillkoeffizienten von $n_H > 1$ kann erste Hinweise auf eine Erhöhung der Rezeptoraffinität durch bereits gebundene Kompetitormoleküle im Sinne einer homotropen (also zwischen den Inhibitor-molekülen) positiven Kooperativität liefern. Im umgekehrten Fall liefern flache Kurven mit Hillkoeffizienten von $n_H < 1$ Hinweise auf bindungsmindernde Effekte durch bereits gebundene Moleküle (homotrope negative Kooperativität). Eine zweite Möglichkeit der Interpretation flacher Kurven ist die Existenz mehrerer, nicht miteinander interagierender Bindungsstellen mit jeweils unterschiedlicher Affinität zum untersuchten Inhibitor. Ein solches Phänomen könnte durch die Anwesenheit verschiedener Rezeptorsubtypen oder unterschiedlicher Konformationszustände eines Rezeptors hervorgerufen werden. Letztere werden häufig in Gegenwart von Agonisten beschrieben [84].

2.7.3 Bestimmung der Oberflächenadsorption des Radioliganden an das Arbeitsmaterial

Zur Bestimmung der Oberflächenadsorption des Radioliganden an das verwendete Arbeitsmaterial wurden in vier Gefäße A bis D 360 μl des zu untersuchenden Puffers bzw. Wasser in Gefäß A vorgelegt. Der Ansatz wurde mit 40 μl einer frisch hergestellten Verdünnung von 5 μl Radioligandstammlösung in 445 μl Wasser versetzt. Nach Durchmischen der Flüssigkeiten für 5 s auf dem Vortexschüttler wurden drei Proben zu je 20 μl in Szintillationsgefäße pipettiert. Die restliche Flüssigkeit wurde quantitativ von Gefäß A in Gefäß B überführt. Nach erneutem Schütteln auf dem Vortexschüttler für 5 s wurde die Probenentnahme wiederholt. Die beschriebenen Arbeitsschritte wurden mit den Gefäßen C und D fortgesetzt. Abschließend wurden alle Proben mit 5 ml Szintillationscocktail vermischt und die Radioaktivität im Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt. Nach diesem Protokoll wurden die

Abhängigkeit des Wegbindungsphänomens vom verwendeten Gefäßmaterial und vom verwendeten Puffer untersucht. Ersteres wurde an 1,5 ml PP-Reaktionsgefäßen und 7,5 ml Pyrex-Glasröhrchen mit einer Verdünnung des Radioliganden in Wasser untersucht. Versuche zum Einfluss der Pufferzusammensetzung wurden in 1,5 ml PP-Reaktionsgefäßen durchgeführt.

2.8 Photoaffinitätsmarkierung

Die Photoaffinitätsmarkierung ist eine Technik, mit der die Lage einer Bindungsstelle in einem Rezeptor bestimmt werden kann. Voraussetzung ist dabei ein Ligand mit einem photoaktivierbaren Strukturelement. Nach der Ausbildung des Bindungsgleichgewichts zwischen Ligand und Rezeptor kann diese funktionelle Gruppe durch Bestrahlung mit UV-Licht in eine reaktive Spezies überführt werden. Durch die folgende Reaktion wird der Ligand im Bereich der Bindungsstelle kovalent an das Rezeptormolekül gebunden. Im Anschluß wird das Protein z. B. mit Trypsin proteolytisch gespalten. Die Spaltung der Peptidbindungen erfolgt dabei sequenzspezifisch, so dass sich für jedes Protein ein typisches Spaltungsmuster ergibt. Das entstandene Peptidgemisch wird anschließend mit einer chromatografischen Methode fraktioniert. Nun kann die Masse der einzelnen Peptide massenspektrometrisch bestimmt und mit der Masse der zu erwartenden Peptide verglichen werden. Peptide, die erfolgreich markiert wurden, zeichnen sich durch eine Verschiebung der Masse um das Molekulargewicht des eingesetzten Liganden aus. Auf diese Weise können markierte Bereiche in der Primärstruktur des Proteins lokalisiert werden.

Der In-Gel Verdau und die LC-MS-Analytik wurden von Frau Jessica Hierer in der Arbeitsgruppe „Functional Peptides“ an der Stiftung caesar in Bonn durchgeführt.

2.8.1 Durchführung

Photoaffinitätsmarkierung

In ein Quarzröhrchen mit 100 µl Fassungsvermögen wurden mit einer 100 µl-Hamiltonspritze 20 µl Proteoliposomensuspension ($c \approx 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) vorgelegt. Die Suspension wurde mit 10 µl einer Photoligandlösung in Markierungspuffer (10 mmol/l Tris-HCl, 250 mmol/l Saccharose, pH 7,4) versetzt und ein Mikrorührfisch in das Quarzröhrchen eingebracht. Die Endkonzentration der Photoliganden betrug jeweils 10 µmol/l. Nun wurde die Mischung 2 h unter Rühren in der Dunkelheit bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch unter Lichtausschluss 15 min auf Eis gekühlt und die weiterhin eisgekühlte Probe dann unter ständigem Rühren in einem UV-Kabinett mit UV-Licht bestrahlt. Die Wellenlänge des verwendeten Lichts richtete sich nach dem Photoliganden. Für Progesteron wurde Licht der Wellenlänge $\lambda = 254 \text{ nm}$ verwendet, bei den Substanzen WK-X-87 und H19 konnte bereits bei einer Wellenlänge

von $\lambda = 365$ nm die Aktivierung bewerkstelligt werden. Die Ansätze wurden mit definierten Energiemengen oder für eine bestimmte Zeit bestrahlt. Als Vergleich dienten Proben, die in Abwesenheit des jeweiligen Photoliganden mit UV-Licht bestrahlt wurden. Aus beiden Ansätzen wurden in regelmäßigen Abständen mit einer 10 μ l-Hamiltonspritze Proben mit einem Volumen von 2 μ l entnommen und bis zum Ende des Experiments in 1,5 ml PP-Reaktionsgefäßen auf Eis gelagert. Nach Beenden der Bestrahlung wurde die Proteoliposomen-Suspension vollständig aus den Quarzröhrchen in 1,5 ml PP-Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde die ATPase-Aktivität der Proben in Anwesenheit von 130 μ mol/l Verapamil bestimmt. Einzelheiten sind Kapitel 2.5.4 zu entnehmen. In Abweichung zum Standardprotokoll wurde die Reaktion jedoch durch Zugabe des auf 37 °C vortemperierten Reaktionspuffers gestartet.

In-Gel-Verdau

Nach der Photoaffinitätsmarkierung wurden die Proteinproben in einem In-Gel-Verdau proteolytisch gespalten. Dazu wurde zunächst eine SDS-PAGE durchgeführt, wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben. Die Proteinbanden wurden mit Coomassieblau angefärbt und die Gelmatrix anschließend über Nacht in Wasser entfärbt. Nun wurden die einzelnen Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Dann wurden die Banden in kleine Würfel mit einer Kantenlänge von etwa 1 mm zerschnitten und in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt, das zuvor dreimal mit je 200 μ l einer Lösung aus 0,01 % (m/V) Cymal und 25 mmol/l Ammoniumhydrogencarbonat in 50 % (V/V) Acetonitril ausgespült worden war. Zusätzlich wurde ein Stück Gel, das keine Probe enthielt, in Bandengröße ausgeschnitten und auf gleiche Weise behandelt. Diese Probe diente bei der später durchgeführten Analyse der Peptide als sogenannte „Dummy“-Probe.

Nun wurde zunächst der proteingebundene Coomassieblau-Farbstoff ausgewaschen. Dazu wurden 100 μ l einer Lösung aus 25 mmol/l Ammoniumhydrogencarbonat in 50 % (V/V) Acetonitril auf die Gelfragmente pipettiert und der gesamte Ansatz für 10 min bei RT und einer Geschwindigkeit von 1 000 Upm in einem Schüttelthermostat geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde durch einen kurzen Zentrifugationschritt (Tischzentrifuge, „shortspin“, 5 s) am Gefäßboden gesammelt, mit einer Pipette aufgenommen und verworfen. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt und der Farbstoff dadurch vollständig abgetrennt.

Nun wurden die Gelfragmente mit 400 μl einer Lösung aus 50 mmol/l Ammoniumhydrogencarbonat in Wasser überschichtet und für 5 min bei 25 °C und 1 000 Upm im Schüttelthermostat geschüttelt. Der Überstand wurde verworfen. Nach erneuter Zugabe von 200 μl Acetonitril wurde die Inkubation im Schüttelthermostat wiederholt. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Gelstücke für etwa 10 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die getrockneten Fragmente wurden mit 20 μl Trypsin-Lösung (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Trypsin in wässriger 50 mmol/l Ammoniumhydrogencarbonatlösung) versetzt und das Gefäß auf Eis platziert. In den folgenden 10 min quollen die Gelstücke. Anschließend wurden weitere 400 μl der wässrigen 50 mmol/l Ammoniumhydrogencarbonatlösung zugesetzt. Der gesamte Überstand wurde aufgenommen und verworfen. Nachdem der Ansatz mit 40 μl einer Lösung aus 0,01 % (m/V) Cymal in wässriger Ammoniumhydrogencarbonatlösung versetzt wurde, erfolgte die proteolytische Spaltung des Proteins über Nacht im Schüttelthermostat bei 500 Upm und 37 °C.

Am folgenden Morgen wurden die Peptide aus der Gelmatrix eluiert. Dazu wurde der Ansatz zunächst mit 10 μl Wasser versetzt, kurz zentrifugiert und anschließend 3 min im Ultraschallbad inkubiert. Nun wurde für 15 min im Schüttelthermostat bei 37 °C und 500 Upm inkubiert und die Flüssigkeit durch kurze Zentrifugation am Gefäßboden gesammelt. Dem Ansatz wurden 100 μl Acetonitril zugefügt und die Inkubation im Ultraschallbad und im Schüttelthermostat wiederholt. Anschließend wurden dem Ansatz nochmals 40 μl Acetonitril hinzugefügt, der Überstand vollständig aufgenommen und in einem separaten 0,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die Gelmatrix wurde mit 40 μl einer Mischung aus 0,1 % (V/V) Trifluoressigsäure(TFA) und Wasser versetzt und, wie beschrieben, zunächst im Ultraschallbad und dann im Schüttelthermostat inkubiert. Danach wurden 40 μl einer Mischung aus 0,1 % (V/V) TFA und Acetonitril zugesetzt, kurz zentrifugiert und der Überstand ebenfalls in das zweite Gefäß überführt. Die Gelstücke wurden erneut mit 40 μl TFA/Acetonitril-Mischung gewaschen. Der Überstand wurde durch Zentrifugation am Gefäßboden gesammelt und anschließend in das zweite Gefäß überführt. Die vereinigten Überstände wurden in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in einer Mischung aus 5 % (V/V) Acetonitril, 0,1 % (V/V) TFA und Wasser aufgenommen.

Auf einen 2,5 μl Filtertip wurden 30 μl einer Suspension von 3,75 % (m/V) C4-Säulenmatrix in Methanol aufgebracht. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit

30 μl einer Mischung aus 0,1 % (V/V) TFA und Wasser gewaschen. Nun wurde die Probenlösung aufgegeben. Dann erfolgte die Entsalzung der Probe durch fünfmaliges Waschen mit der TFA/Wasser-Mischung. Die Peptide wurden nun zweimal mit je 7,5 μl eines Gemischs aus 80 % (V/V) Acetonitril, 0,1 % (V/V) TFA und Wasser eluiert. Das Eluat wurde erneut in der Vakuumentrifuge bis zur Trockene eingengt und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

LC-MS-Analytik der Peptide

Die durch den In-Gel-Verdau gewonnenen Peptide wurden mit der Nano-HPLC fraktioniert. Dazu wurde die Probe zunächst in 5 μl einer Mischung aus 0,1 % (V/V) TFA und Wasser gelöst; eine Dummy-Probe wurde in 10 μl der Mischung gelöst. Jeweils 1 μl dieser Proben wurden mit dem Autosampler auf die Säule aufgebracht. Die Parameter für die chromatografische Trennung wurden wie folgt gewählt: Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,2 $\mu\text{l}/\text{min}$. Der lineare Fließmittelgradient startete mit 100 % Fließmittel A (4,95 % (V/V) Acetonitril, 95 % (V/V) Wasser, 0,05 % (V/V) TFA). In den folgenden 30 min erhöhte sich der Anteil an Fließmittel B (79,95 % (V/V) Acetonitril, und 20 % (V/V) Wasser, 0,04 % (V/V) TFA) auf 50 %. In der folgenden Minute wurde der Anteil von Fließmittel B auf 90 % erhöht. In den nächsten 5 min blieb die Fließmittelzusammensetzung konstant. Anschließend wurde der Anteil von Fließmittel A innerhalb einer Minute auf 100 % erhöht und die Säule in den folgenden 23 min mit dem Fließmittel gespült. Ab der fünfzehnten Minute wurden alle 30 s Proben des Eluats mit dem Probenroboter auf ein 384 Feld „anchor chip target“ aufgebracht. Auf diese Weise wurden insgesamt 72 Proben für die massenspektrometrische Analyse erhalten. Als Matrix diente α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure. Die Proben wurden mit einem MALDI-TOF-Massenspektrometer nach positiver Ionisierung mit dem Laser bei einer Wellenlänge von $\lambda = 337\text{ nm}$ im Reflektor-Modus vermessen.

Datenanalyse

Aus der massenspektrometrischen Analyse der Proben wurden sogenannte Peaklisten erhalten, die alle detektierten Massen, die Intensität des Signals und die Lage der Probe auf dem „anchor chip target“ enthielten. Diese Listen wurden in das Programm Excel XP exportiert und nach aufsteigenden Massewerten sortiert.

Diese Werte wurden dann mit der Massenliste, die aus einer „Dummy“-Probe erhalten wurde verglichen und alle Werte aus der Liste eliminiert, die innerhalb der gewählten Massentoleranz von 100 ppm gleich waren. Auf diese Weise konnten Werte ausgeschlossen werden, die nicht auf das Protein zurückzuführen waren und so der Datensatz verkleinert werden.

Mit dem Programm **PeptideMass**[85] wurde nun P-gp „in silico“ mit dem Enzym Trypsin gespalten und eine Liste der zu erwartenden Peptidmassen erstellt. Dabei wurden folgende Parameter vorgegeben: Die Anzahl der nicht ausgeführten Spaltungen pro Peptid betrug 1. Die Thiolgruppe der Aminosäure Methionin konnte auch oxidiert als Sulfoxid vorliegen und für die Aminosäure Cystein wurden Acrylamid-Addukte berücksichtigt. Die monoisotopischen Massen der Peptide wurden im einfach positiv geladenen Zustand $[MH^+]$ berechnet und nur Peptide mit einer Masse von mehr als 500 Da berücksichtigt. Als Grundlage für die Berechnung diente die unter der Nummer P08183 in der **UniProt**-Datenbank [86] archivierte Aminosäuresequenz von humanem P-Glykoprotein. Auf diese Weise wurde eine Liste mit insgesamt 220 verschiedenen Peptiden erhalten. Durch die Berücksichtigung der Modifikationen waren theoretisch insgesamt 305 verschiedene Massen möglich. Den Werten aus dieser Liste wurden nun die experimentell bestimmten Werte aus dem reduzierten Datensatz innerhalb einer Massentoleranz von 100 ppm zugeordnet. Dieses Vorgehen führte zu einer erheblichen Datenreduktion.

Die Zuordnung der Peptidmassen zu bestimmten Sequenzabschnitten erfolgte durch das Programm **Mascot** [87]. Es nutzt die Tatsache, dass die Spaltung eines Proteins mit einer für bestimmte Sequenzabschnitte spezifischen Protease zu einem charakteristischen Peptidmuster führt. Bei der massenspektrometrischen Analyse dieser Peptide wird in der Folge eine für das Protein spezifische Peakliste erhalten. Dieser sogenannte „Mass-Fingerprint“ kann unter Angabe der verwendeten Protease durch Vergleich mit Massenlisten in einer Datenbank zur Identifizierung des Proteins genutzt werden. Dabei werden auch den Einzelwerten die entsprechenden Sequenzabschnitte im Protein zugeordnet. Diese Funktionalität wurde für diese Arbeit genutzt. Die zuvor durchgeführte Datenreduktion war notwendig, da die genutzte Version von **Mascot** nur die Analyse von Listen mit maximal 300 Werten zulässt. Dabei wurden folgende Einstellungen vorgenommen: Trypsin wurde als Protease angegeben und erneut maximal eine nicht beachtete Schnittstelle pro Peptid zugelassen. Desweiteren wurden die Peptidmassen als monoisotopisch deklariert und die Ladung der Peptide

auf +1 festgesetzt. Für die restlichen Parameter wurden die Standardeinstellungen beibehalten. Auch für den Datenbankabgleich wurden die Standardeinstellungen verwendet.

Für die Analyse der Photoaffinitätsmarkierungsexperimente wurde das beschriebene Protokoll leicht abgeändert. Auch hier wurde zunächst eine Datenreduktion durch Vergleich mit der „Dummy“-Probe durchgeführt. Neben der Analyse mit **Mascot** wurden die Werte jedoch zusätzlich mit den Werten aus dem Kontrollversuch verglichen. Massen, die innerhalb der Massentoleranz von 100 ppm gleich waren, wurden eliminiert. Von den verbleibenden Werten wurde die exakte Masse des verwendeten Photoliganden subtrahiert und die Differenz mit der durch den theoretischen Verdau erhaltenen Massenliste verglichen. Auch hier wurden die Massen innerhalb einer Toleranzgrenze von 100 ppm als gleich angesehen. Den auf diese Weise erhaltenen Werten wurden, wie bereits beschrieben, mit dem Programm **Mascot** die entsprechenden Sequenzbereiche zugeordnet.

2.9 Strukturformeln untersuchter Substanzen

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reihe von strukturell unterschiedlichen Testsubstanzen mit den beschriebenen Testsystemen untersucht. Neben klassischen P-gp Substraten, dargestellt in Abbildung 2.3, wurden auch MDR-Modulatoren aus der Arzneistoffklasse der Calciumantagonisten verwendet (Abbildung 2.4). Die Gruppe der Substrate umfasst neben dem Zytostatikum Vinblastin mit Hoechst 33342, Hoechst 33258 und Rhodamin 123 drei Substanzen, die aufgrund ihrer Fluoreszenz direkt zur Untersuchung des P-gp vermittelten Transports genutzt werden [58, 88].

Auch die in Abbildung 2.4 dargestellten Calciumantagonisten Diltiazem, Nicardipin und Verapamil interagieren mit P-gp. Dies lässt sich z. B. durch die Inhibition des P-gp-vermittelten Calcein-AM Transports belegen [58]. In der vorliegenden Arbeit wurden sie daher als typische MDR-Modulatoren eingesetzt. Weiterhin beinhaltet die Zusammenstellung vier Substanzen, die aufgrund photoaktivierbarer funktioneller Gruppen für die Durchführung von Photoaffinitätsmarkierungen geeignet sind (Abbildung 2.5). Neben den Phenothiazinen H15 und H19, die dankenswerterweise von Herrn Dr. Matthias Schmidt (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie) zur Verfügung gestellt wurden, handelt es sich dabei um das Hormon

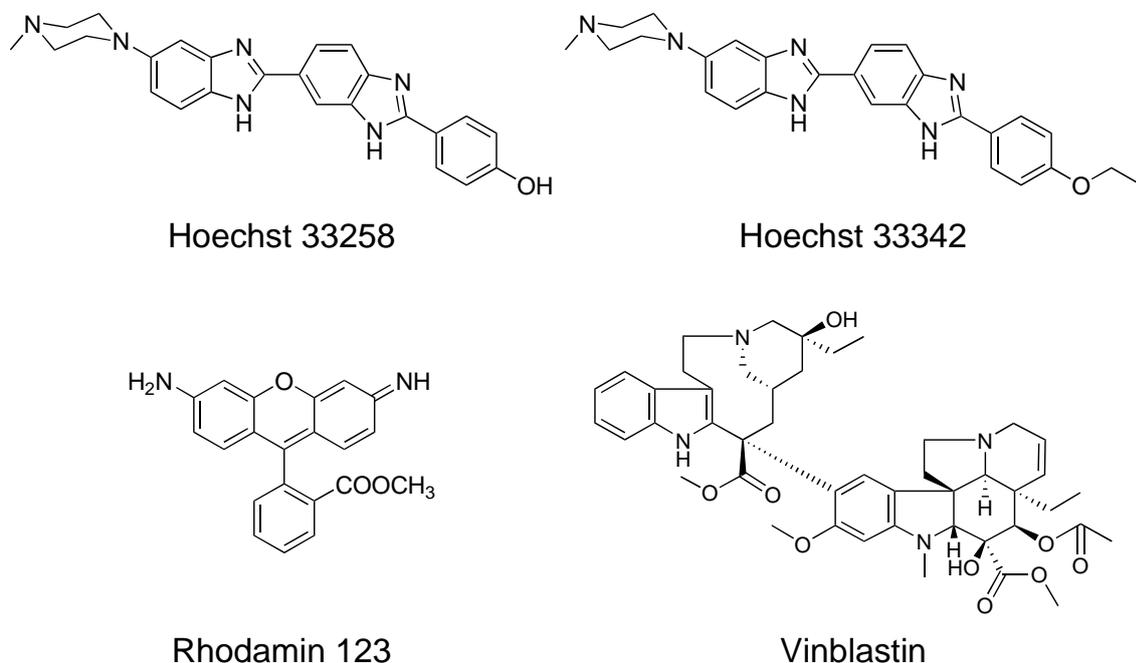


Abb. 2.3: Strukturformeln der in dieser Arbeit untersuchten P-gp Substrate.

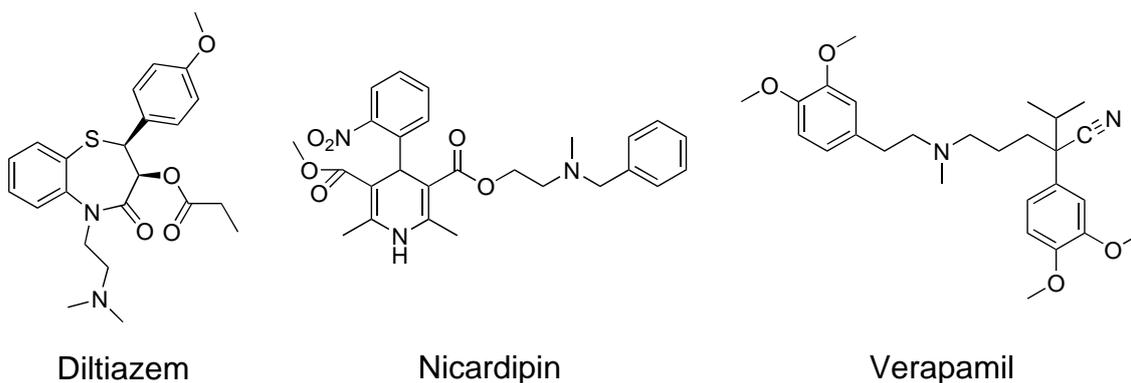


Abb. 2.4: Strukturformeln von P-gp Modulatoren aus der Arzneistoffklasse der Calciumantagonisten.

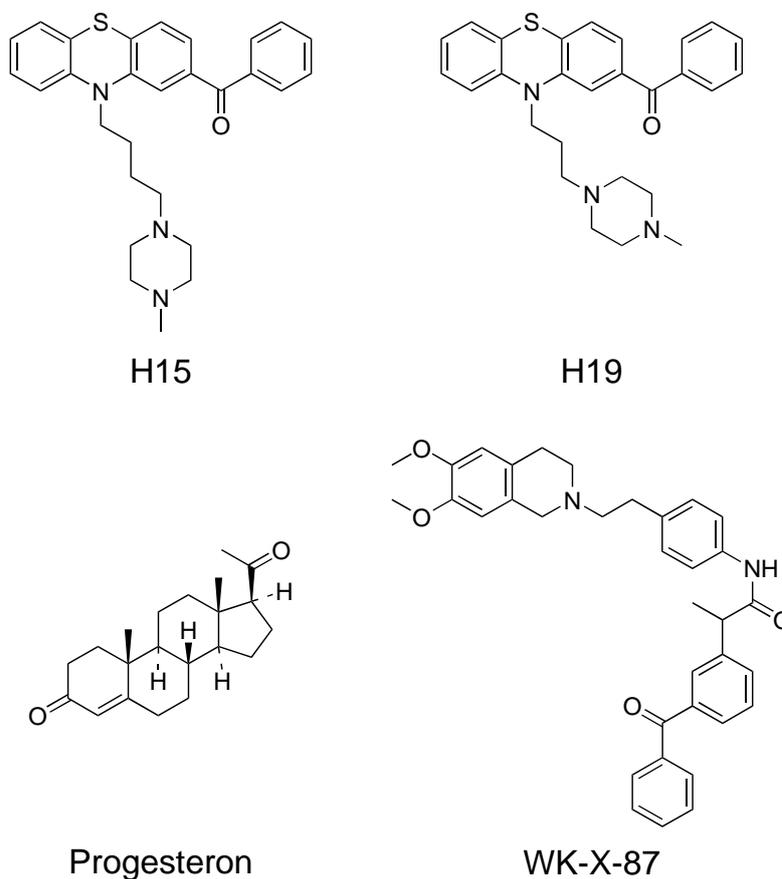


Abb. 2.5: Strukturformeln von P-gp Modulatoren mit photoaktivierbaren funktionellen Gruppen.

Progesteron. Die Substanz WK-X-87 wurde von Werner Klinkhammer im Rahmen seiner Dissertation [89] synthetisiert. Als Leitstruktur für die Synthese diente die Substanz Tariquidar (syn. XR9576), ein Modulator der dritten Generation [90]. Tariquidar gehört zu den potentesten verfügbaren P-gp Inhibitoren [91]. Neben den hier vorgestellten Verbindungen wurden zwei weitere XR-Verbindungen (XR9476 und XR9577) und eine Reihe von 16 WK-X-Verbindungen untersucht. Die strukturellen Eigenschaften dieser Substanzen sind in Kapitel 3.4.1 aufgeführt.

2.10 Allgemeine Methoden der Datenanalyse

2.10.1 Statistische Kennzahlen

Aus Messreihen mit n Messwerten x_i wurden vier statistische Kennzahlen berechnet. Die entsprechenden Formeln wurden aus [92] entnommen. Anhand von Gleichung (1) wurde der arithmetische Mittelwert der Messwerte berechnet.

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

Weiterhin wurde die Varianz mit Hilfe von Gleichung (2) bestimmt. Diese Kennzahl ist ein Maß für die Streuung der statistisch untersuchten Messwerte und diente als Grundlage für den F-Test, der im folgenden Kapitel genauer beschrieben wird.

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

Wie Gleichung (3) zu entnehmen ist, entspricht die Standardabweichung s_x der Quadratwurzel aus der Varianz s^2 . Auch diese statistische Kennzahl ist ein Maß für die Streuung der untersuchten Messwerte.

$$s_x = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (3)$$

Der Standardfehler des Mittelwerts s_M wurde nach Gleichung (4) berechnet. Dieser Wert gibt die Streuung des Mittelwerts der Stichprobe \bar{x} um den Mittelwert der Grundgesamtheit μ an.

$$s_M = \frac{s_x}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

2.10.2 Statistische Tests

Alle statistischen Tests wurden unter der Annahme durchgeführt, dass die Grundgesamtheit der Messwerte einer Normalverteilung entspricht. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf $P \leq 0,05$ festgesetzt.

Test auf Gleichheit von Varianzen (F-Test)

Mit dem F-Test wurden die Varianzen zweier Stichproben mit einem Probenumfang von n_1 und n_2 Messwerten auf signifikante Unterschiede überprüft [92]. Dazu wird nach Gleichung (5) der F-Wert berechnet und mit einem tabellierten F-Wert verglichen.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (\text{mit } s_1 > s_2) \quad (5)$$

Der tabellierte F-Wert ist abhängig von den Freiheitsgraden der Messreihen ($f_1 = n_1 - 1$ und $f_2 = n_2 - 1$) sowie der Irrtumswahrscheinlichkeit α . War der tabellierte Wert kleiner als der berechnete, so bedeutete dies einen signifikanten Unterschied der Varianzen und damit eine Zuordnung der Messreihen zu zwei unterschiedlichen Grundgesamtheiten. Unterschieden sich die Varianzen nicht signifikant voneinander (Varianzhomogenität), konnten die Mittelwerte der Messreihen mit Hilfe des t-Tests auf Gleichheit geprüft werden.

Bei einigen Versuchen wurde eine Sonderform des F-Tests [83] eingesetzt. Mit Hilfe dieses statistischen Tests wurde entschieden, ob die nichtlineare Regression mit der Drei Parameter Logistischen Gleichung, d. h. mit einem fixierten Hillkoeffizienten, oder mit der Vier Parameter Logistischen Gleichung durchgeführt wurde. Der F-Wert wurde anhand von Gleichung (6) ermittelt.

$$F = \frac{\frac{SS_1 - SS_2}{f_1 - f_2}}{\frac{SS_1}{f_2}} \quad (6)$$

Die Variablen SS_1 und f_1 entsprechen der Summe der Fehlerquadrate und der Anzahl der Freiheitsgrade bei Auswertung mit der Drei Parameter Logistischen Gleichung. Analoges gilt im Falle der Vier Parameter Logistischen Gleichung für SS_2 und f_2 . Wurde anhand des F-Wertes kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Modellen festgestellt, wurde der Hillkoeffizient n_H bei der Auswertung des Experiments auf 1 fixiert. Dieser Test wurde durchgeführt, da sich bei der nichtlinearen Regression häufig alleine durch Einbringen zusätzlicher Variablen das Bestimmtheitsmaß R^2 eines Modells verbessert. Dient dieser Wert als Entscheidungsgrundlage bei der Auswahl des Modells, können also irrelevante Parameter in die Auswertung mit einbezogen werden.

Test auf Gleichheit von Mittelwerten

Wurde mit Hilfe des F-Tests die Varianzhomogenität festgestellt, konnten die Mittelwerte zweier Messreihen mit einem Probenumfang von n_1 und n_2 Messwerten anhand eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests auf einen statistisch signifikanten Unterschied geprüft werden [92]. Zunächst erfolgte die Berechnung der mittleren, gewichteten Standardabweichung beider Datenreihen s_D aus den Varianzen (s_1^2, s_2^2) (siehe Gleichung (2)) nach Gleichung (7).

$$s_D = \sqrt{\frac{s_1^2 \cdot (n_1 - 1) + s_2^2 \cdot (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (7)$$

Nun ließ sich die Prüfgröße PG nach Gleichung (8) [92] berechnen:

$$PG = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_D} \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} \quad (8)$$

Diese Prüfgröße wurde mit einem tabellierten Wert t verglichen, der von der Anzahl der Freiheitsgrade f (mit $f = n_1 + n_2 - 2$) und der Irrtumswahrscheinlichkeit P (s. o.) abhängig ist. War der tabellierte Wert t kleiner als die Prüfgröße PG , bedeutete dies einen signifikanten Unterschied der beiden Mittelwerte und somit eine Zuordnung der Messreihen zu unterschiedlichen Grundgesamtheiten.

Für den Fall, dass keine Varianzhomogenität festgestellt werden konnte, wurde ein modifizierter t-Test angewendet [93]. Die Prüfgröße wurde nach Gleichung (9) bestimmt:

$$PG = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad (9)$$

Anschließend erfolgte die Berechnung der Freiheitsgrade nach Gleichung (10):

$$f = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2 \cdot \frac{1}{n_1 - 1} + \left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2 \cdot \frac{1}{n_2 - 1}} \quad (10)$$

Der für f berechnete Wert wurde auf eine ganze Zahl abgerundet und die Prüfgröße mit dem für die entsprechende Zahl der Freiheitsgrade tabellierten Wert verglichen. War der tabellierte Wert kleiner als die Prüfgröße PG , bedeutete dies

einen signifikanten Unterschied der beiden Mittelwerte trotz der zuvor festgestellten Varianzhomogenität.

Ausreißertest nach Dixon

Messreihen mit mehr als drei Messwerten wurden mit dem Ausreißertest nach Dixon [92] auf statistische Ausreißer geprüft. Dieser Test ist auch für kleine Stichproben ($n < 8$) geeignet. Für den kleinsten und den größten Messwert wurde jeweils ein Prüfwert PW berechnet. Für den kleinsten Messwert x_1 gilt nach Gleichung (11):

$$PW_{\min} = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1} \quad (11)$$

Dabei entspricht x_2 dem zweitkleinsten und x_n dem größten Messwert. Analog dazu gilt für PW_{\max} entsprechend Gleichung (12):

$$PW_{\max} = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_1} \quad (12)$$

Die Variable x_{n-1} entspricht dabei dem zweitgrößten Messwert. Die berechneten Prüfgrößen wurden mit einem tabellierten Wert (abhängig vom Stichprobenumfang n und der Irrtumswahrscheinlichkeit P) verglichen. Lagen sie unter dem tabellierten Wert, war keiner der Werte ein Ausreißer. Dieser Test wurde pro Messreihe einmal durchgeführt und so maximal ein Messwert als Ausreißer eliminiert.

2.10.3 Korrelation

Korrelationen wurden nach Pearson [94] durchgeführt. Die Berechnung des P-Wertes erfolgte dabei zweiseitig. Das Ergebnis wurde grafisch durch eine mit Hilfe der linearen Regression ermittelte Gerade und das entsprechende 95 % Konfidenzintervall dargestellt.

2.11 Eingesetzte Computerprogramme

Die Auswertung der Experimente und die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte computergestützt mit folgenden Programmen:

- GraphPad Prism 5.0, GraphPad Software Inc. (San Diego, USA)
- Microsoft Excel XP, Microsoft Corporation (Redmond, USA)

Strukturformeln wurden mit Hilfe von ChemDraw Ultra 6.0 aus dem ChemOffice Ultra 2001 Softwarepaket der Firma CambridgeSoft Corporation (Cambridge, USA) gezeichnet.

2.12 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 2.6: Quellennachweis der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Substanz/Reagenz	Bezugsquelle und Bestellnr.
30 % (m/V) Acrylamid-Lösung	Applichem, A3626
Acetonitril	Biosolve, 1200701
Adenin Hemisulfat	Sigma, A-9126
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma, A-2383
Agar-Agar	Merck, 1.01614
Ammoniumhydrogencarbonat	Merck, 1.01131
Antifoam A	Sigma, A-5633
Antikörper C219	Signet Laboratories, 870-01
Antikörper 17F9	BD Biosciences, 557002
Antikörper, sekundär	Calbiochem, Anti-mouse IgG 401215
Amidoschwarz	Applichem, A1399
4-Aminobenzoesäure	Sigma, A-9878
6-Aminohexansäure	Sigma, A-2504
Ammoniummolybdat-Tetrahydrat	Sigma, A-1343
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, A-3678
Ammoniumsulfat	Fluka, 09978
Antifoam A	Sigma, A-5633
L-Arginin Hydrochlorid	Sigma, A-5131
Biotin	Sigma, B-4501
Borsäure	Sigma, B-6768
Brilliant Blau R250	Carl Roth GmbH + Co KG, 3862.1
bovines Serumalbumin (BSA)	Applichem, A0850
BSA-Stammlösung	Sigma, P-5369
Calcein-AM	Calbiochem, 206700
Calciumchlorid	Sigma, C-4901
Cholesterol	Sigma, C-8667
α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure	Bruker, 201344
D(+)-Glucose wasserfrei für die Zellkultur	Applichem, A0883

Tab. 2.6: (Fortsetzung – Chemikalien und Reagenzien)

Substanz/Reagenz	Bezugsquelle und Bestellnr.
Desoxycholinsäure, Natriumsalz	Sigma, D-6750
Diisopropylfluorophosphat (DFP)	Acros, 115230010
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Acros, AC19773
D-Pantothensäure Hemicalciumsalz	Sigma, P-2250
Dithiothreitol (DTT)	Appllichem, A2948
ECL-Reagenz	Amersham Biosciences, RPN2132
Eisen(III)chlorid	Sigma, F-7134
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Aldrich, E2,628-2
Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-Tetraessigsäure (EGTA)	Sigma, E-3889
Fötales Kälberserum (FKS)	Sigma, F-7524
Folsäure	Sigma F-7876
Geneticin (G418)	Sigma, G-9516
L-Glutamin Lösung	Sigma, G-7513
86 % (V/V) Glycerol	Grüssing, 11014
Glycerol (wasserfrei)	Appllichem, A1123
Glycin	Appllichem, A3707
HEPES	Appllichem, A1069
L-Histidin Hydrochlorid Monohydrat	Sigma, H-8125
Imidazol	Sigma, I-0125
myo-Inositol	Sigma, I-5125
Iodoacetamid	Sigma, I-6125
L-Isoleucin	Sigma, I-2752
Isopropanol	Riedel-deHaën, 34863
Kaliumchlorid	Merck, 1.04936
Kaliumchlorid-Lösung, gesättigt	Aldrich, 319309
Kaliumdihydrogenphosphat	Appllichem, A3095
Kaliumiodid	Sigma, P-8256
Kupfersulfat-Pentahydrat	Acros, AC19773
L-Leucin	Aldrich, L60-2
Leupeptin Hemisulfat	Sigma, L-2884
L-Lysin-Hydrochlorid	Sigma, L-5626
Lysophosphatidylcholin (LPC)	Avanti, 830071P
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, 105833
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Appllichem, A4101
Malachitgrün-Hydrochlorid	Sigma, M-9636
Mangansulfat	Fluka, 63555
Melsept SF	Braun, 18907
β -Mercaptoethanol	Sigma, M-6250
L-Methionin	Appllichem, A3897
Nährmedium Ham's F12	Sigma, N-4888
Nährmedium RPMI-1640	Sigma, R8758
Natriumazid	Fluka, 71290
Natriumbutyrat	Acros, 263190250
Natriumcarbonat	Aldrich, 451614
Natriumchlorid	Merck, 106404
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Appllichem, A2572
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Appllichem, A4732
Natriumhydroxid	Acros, 13407
Natriummolybdat Dihydrat	Sigma, M-1651

Tab. 2.6: (Fortsetzung – Chemikalien und Reagenzien)

Substanz/Reagenz	Bezugsquelle und Bestellnr.
Natriumsulfat Decahydrat	Fluka, 71969
Di-Natriumtartrat Dihydrat	Fluka, 71995
Natriumtaurodeoxycholat Hydrat (TDOC)	Sigma, T-0875
Nicotinsäure	Sigma, N-4126
Octylglucosid (n-Octyl- β -D-Glucopyranosid)	Appllichem, A1010
Penicillin/Streptomycin(P/S)-Lösung	Sigma, P-0781
Pepstatin A	Sigma, P-5318
L-Phenylalanin	Sigma, P-2126
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, P-7626
Phosphatidylcholin (PC)	Avanti, 840051C
Phosphatidylsäure (PS)	Avanti, 840101C
Polyvinylalkohol (PVA)	Aldrich, 348406
Proteingrößenstandard	Appllichem, A3993
Pyridoxin-Hydrochlorid	Sigma, P-9755
(-)-Riboflavin	Sigma, R-4500
D(+)-Saccharose	Appllichem, A2211
Standardpuffer pH 4,01	Hanna Instruments, HI-70004P-Lab
Standardpuffer pH 7,01	Hanna Instruments, HI-70007P-Lab
Standardpuffer pH 10,01	Hanna Instruments, HI-70010P-Lab
TEMED	Appllichem, A1148
Thiamin Hydrochlorid	Sigma, T-4625
L-Threonin	Sigma, T-8625
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma, T-8657
Trifluoressigsäure	Merck, 1.08262
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Appllichem, A2264
Trypsin	Roche Diagnostics, 11418025001
Trypsin/EDTA-Lösung	Sigma, T-3924
L-Tryptophan	Appllichem, A3410
L-Tyrosin	Sigma, T-3754
L-Valine	Sigma, V-0500
Verapamil	Sigma, V-4629
[³ H]Vinblastin	Amersham Biosciences, TRK507
Uracil	Appllichem, A0667
Wasser p. a.	Wasseraufbereitungsanlage
Zinksulfat-Heptahydrat	Sigma, Z-4750

2.13 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.7: Quellennachweis der Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle und Bestellnr.
Aufschraubmembranfilter	Millipore, SCGP T01 RE
Dialyseschlauch	Spectrum laboratories, 132700
FACS-Teströhrchen	BD Biosciences, 352054
Filtermatte	Printed Filtermat A Nr. 1450-421, Wallac, Turku, Finnland

Tab. 2.7: (Fortsetzung – Verbrauchsmaterialien)

Material	Bezugsquelle und Bestellnr.
Filterpapier	VWR, 552-5265
2,5 µl Filtertip	Eppendorf, 0030.067.100
Handdispenser Aufsatz 2,5 ml	Carl Roth GmbH + Co KG, H682.1
Handdispenser Aufsatz 12,5 ml	Brand GmbH + Co KG, 7023-78
Impfösen	VWR International, I612-9355
Indikatorpapier (pH 5.5–9.0)	Merck, 1.09569.0003
Kulturflasche 75 cm ²	Greiner Bio-one, 658175
Kulturflasche 175 cm ²	Greiner Bio-one, 650175
Kulturplatte 6 × 9,6 cm ²	Greiner Bio-one, 657160
Kulturplatte 24 × 1,9 cm ²	Greiner Bio-one, 662160
Kulturplatte 96 × 0,3 cm ²	Greiner Bio-one, 655180
Kulturschale 145 cm ²	Greiner Bio-one, 639160
Kryo-Röhrchen	Sarstedt AG & Co, 72.693.100
Membranfilter für den Fermenter	Sartorius, 17805
Ni-NTA Superflow	Qiagen, 30410
Parafilm M	American National Can, Chicago, USA
Plastikeinmalpipette	VWR International, I612-1681
Plastikeinmalpipetten 20 ml	Corning incorporated, COSTAR Stripetten 4488
Plastikkulturschalen (Hefekultur)	Greiner Bio-one, 632171
PS-Mikrotiterplatte	Greiner Bio-one, 655101
PP-Mikrotiterplatten	Deep Well Plates, Nr. AB-0564, Abgene House, Epsom, UK
15 ml PP-Röhrchen	Greiner Bio-one, 188271
50 ml PP-Röhrchen	Greiner Bio-one, 227261
PVDF-Membran	Carl Roth GmbH + Co KG, T830.1
Pyrex-Glasröhrchen	Brand GmbH + Co KG, 114110
0,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, 0030 124.502
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co, 72.690
C4-Säulenmatrix	GROM-SIL, Butyl-1 ST C4-alkylates, endcapped silica
Schutzhülle	Sample Bag, 1450-432, Wallac, Turku, Finnland
Szintillationscocktail Ready Protein	Beckman Coulter GmbH, Unterschleissheim, Deutschland
Szintillationsgefäße aus PE, 21 ml	Ratiolab, Dreieich, Deutschland
Wachsplatte	Meltilex A, 1450-441, Wallac, Turku, Finnland
Zellschaber	Greiner Bio-one, 541070

2.14 Geräte und Zubehör

Tab. 2.8: Typenbezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte sowie deren Zubehör

Bezeichnung	verwendetes Material
Beadbeater	Nr. 1G918, Hamilton Beach Commercial
zirkonisierte Glasskugeln	Nr. 11079105Z, Biospec Products Inc.
Chromatographiesäulen	Econocolumn, Bio-Rad
Durchflusszytometer	FACScalibur, BD Biosciences

Tab. 2.8: (Fortsetzung – Geräte und Zubehör)

Bezeichnung	verwendetes Material
Elektrophorese	
Blottingapparatur	Mini-Protean II, Bio-Rad
Elektrophoreseapparatur	Mini-Protean II, Bio-Rad
Geldokumentationseinheit	Versa Doc Imagine System 5000, Bio-Rad
Scanner	Astra 2200, UMAX
Stromgeber	EC250-90, Life Sciences Int. GmbH
10 µl-Hamiltonspritze	701N, Hamilton Bonaduz AG
100 µl-Hamiltonspritze	MS*100, ITO Corporation
Handdispenser	Handystep, Brand GmbH + Co KG
Hefekultur	
Belüftungsvorrichtung	Nr. 1969-66000 u. 1965-45006, Dunn Labortechnik,
Brutschrank	Kelvitron T, Heraeus Instruments
Fermenter mit Flügelrührer	Nr. 1965-08000, Dunn Labortechnik
Heizmanschette	Nr. 1964-54080, Dunn Labortechnik
Magnetrührer	Nr. 7785-D1208, Dunn Labortechnik
Pumpe	Mistral 4000, Aqua Medic GmbH
Schüttelinkubator	Orbital Shaker Model 4520, Forma Scientific Inc.
Temperaturregulierung	Eigenbau
Temperaturfühler	Eigenbau
Horizontalschüttler	Red Rotor, Hoefer Pharmacia Biotech
LC-MS-Analytik	
Autosampler	Famos, LC-Packings /Dionex
Nano-HPLC	Nano-HPLC Ultimate, LC-Packings/Dionex
Probenroboter	µ-Carrier, BAI
Massenspektrometer	MALDI-TOF-MS Reflex III, Bruker
Magnetrührer	RCT Basic, IKA Labortechnik
Microplaterreader	POLARstar Galaxy, BMG Labtech
pH-Messung	
pH-Meter	Φ720 pH-Meter, Beckman Coulter
Kalomel pH-Elektrode	Nr. E6009-1EA, Sigma
Photometer	Ultrospec 4000, Amersham Biosciences
Polytron-Homogenisator	PT 10-35, Kinematica AG
Potter Elvehjem Glashomogenisator	
Antrieb	Janke und Kunkel, IKA Labortechnik
Glashomogenisator klein (2 ml)	Nr. 432-1202, VWR International
Glashomogenisator mittel (5 ml)	Nr. 432-1205, VWR International
Glashomogenisator gross (50 ml)	Nr. 432-5021, VWR International
Radioligandbindung	
Flüssigkeits-Szintillationszähler	Beckman Coulter, Unterschleissheim, Deutschland
Harvester	Tomtec, Mach III M, Tomtec, Hamden, USA
Heizplatte	Dri-Block DB-2A, Techne, Duxford Cambridge, UK
Microbeta-Trilux 1450 Counter	Wallac, Turku, Finnland
Zählkassette	Plate Cassette Nr. 1450-105, Wallac, Turku, Finnland
Schüttelwasserbad	Quodrothermal, GFL, Deutschland
Schüttelthermostat	Thermomixer comfort, Eppendorf
Thermostat	Thermostat plus, Eppendorf
Ultraschallbad	Sonorex Super RK106, Bandelin
Ultraschallstab	Sonoplus HD2070, Bandelin
UV-Kabinett	CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP inc.

Tab. 2.8: (Fortsetzung – Geräte und Zubehör)

Bezeichnung	verwendetes Material
Vakuumblock	Dot-Blot Nr. T790.1, Carl Roth GmbH + Co KG
Vakuumpumpe	PC5, Vacuubrand GmbH + Co KG
Vortexschüttler	Vortex Genie 2, Scientific Industries
Zellkultur	
Inkubator	CO ₂ Water Jacketed Incubator, Forma Scientific Inc.
Mikroskop	Axiovert 25, Carl Zeiss AG
Wasserbad	TW12, Julabo Labortechnik GmbH
Zellzähler	Casy 1 Modell TT, innovatis AG
Zentrifugen und Zubehör	
Tischzentrifuge	5451R Centrifuge, Eppendorf AG
Laborzentrifuge	Avanti J-25, Beckman Coulter
Ausschwingrotor	JS-7.5, Beckman Coulter
Festwinkelrotor JA-25.50	JA-25.50, Beckman Coulter
Zentrifugengläser für JA-25.50	3118-0050, Nalge Nunc Int.
Festwinkelrotor JLA-10.500	JLA-10.500, Beckman Coulter
Zentrifugengläser für JLA-10.500	Nr. 361690, Beckman Coulter
Ultrazentrifuge	Optima LE-80K, Beckman Coulter
Festwinkelrotor	Type 45Ti, Beckman Coulter
Ultrazentrifugengläser	Nr. 355655, Beckman Coulter
Vakuumblock	Speedvac SC110, Savant
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore Elix, Millipore

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Etablierung der Zelllinie CHO-K1 M403

3.1.1 Selektion der Zelllinie

Die Transfektion wurde wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben durchgeführt. Die Aufnahme des Plasmids konnte während der anschließenden Selektion der transfizierten Zellen mit Geneticin (G418) bestätigt werden. Wie erwartet konnten nur erfolgreich transfizierte Zellen in Gegenwart von G418 kultiviert werden. Die Kultivierung von Wildtypzellen gelang unter den gleichen Bedingungen jedoch nicht. Durch die Klonierung wurden aus dem pcDNA3.1(+)-mdr1 Ansatz insgesamt elf Einzelkulturen gewonnen. Davon wurden sieben Kulturen aus den Klonierungsansätzen mit einer Zelle je Kulturkammer, drei Kulturen aus den Ansätzen mit einer Zelle pro drei Kulturkammern und eine Kultur aus den Ansätzen mit einer Zelle pro zehn Kulturkammern isoliert. Statistisch gesehen nimmt die Wahrscheinlichkeit eine klonale, d. h. eine aus einer einzigen Zelle hervorgegangene, Zelllinie zu erhalten, mit abnehmender Zellkonzentration zu. Bei einer Konzentration von einer Zelle je Kulturkammer liegt diese Wahrscheinlichkeit mit etwa 60 % [56] relativ niedrig. Da die Auswahl der Einzelkolonien jedoch nicht zufällig erfolgte, sondern nur Ansätze weiter kultiviert wurden, bei denen auch mikroskopisch nur eine einzelne Kolonie beobachtet worden war, ist der Anteil der klonalen Zelllinien vermutlich höher und es wurde auf eine erneute Klonierung zunächst verzichtet. Die so gewonnenen Zelllinien wurden mit CHO-K1 M401 bis CHO-K1 M411 benannt. Der mit dem Ausgangsplasmid pcDNA3.1(+) transfizierte Kontrollansatz lieferte nach der Grenzwertverdünnung 19 Einzelkulturen (Anteil nach Verdünnung: 11/8/0), die im Folgenden alle mit CHO-K1 pcDNA benannt sind.

Nach der Selektion wurden in einem ersten Vorversuch alle Klone der M-Reihe, drei Klone der pcDNA-Reihe und die Wildtyp CHO-K1 Zellen (als Negativkontrolle) mit dem FITC-markierten Antikörper 17F9 auf P-gp Expression untersucht (siehe Kapitel 2.2.6). Da bis zu diesem Zeitpunkt keinerlei praktische Erfahrung mit diesem Testsystem bestand, wurde zunächst in Anlehnung an das Originalprotokoll [57] eine Inkubationszeit von 20 min zur Ausbildung des Antigen/Antikörper-Komplexes gewählt. Unter diesen Bedingungen zeigte die Zelllinie CHO-K1 M403 die höchste antikörpervermittelte Fluoreszenz, der Messwert für CHO-K1 M411 bewegte sich in einer ähnlichen Größenordnung. Die verbleibenden Zellen der M-Reihe zeigten nur eine sehr niedrige Expression und wurden daher nicht weiter untersucht. Wie erwartet, lag die antikörpervermittelte Fluoreszenz bei den CHO-K1 pcDNA Zellen auf dem Niveau der Wildtyp-Zellen. Es konnte also nur in Zellen, die mit dem *mdr1*-Gen transfiziert wurden, eine erhöhte P-gp Expression festgestellt werden.

Für eine sensitive Unterscheidung der Expressionslevel ist ein großes Messfenster wünschenswert. Daher wurde im Anschluss an den oben beschriebenen Vorversuch zunächst die Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals von der Inkubationszeit der CHO-K1 M403 Zellen mit dem Antikörper untersucht. Wie in Abbildung 3.1 deutlich zu erkennen ist, erreichte die antikörpervermittelte Fluoreszenz erst nach 40 min das Maximum. Weiterhin blieb das Fluoreszenzniveau der Wildtyp-Zellen über

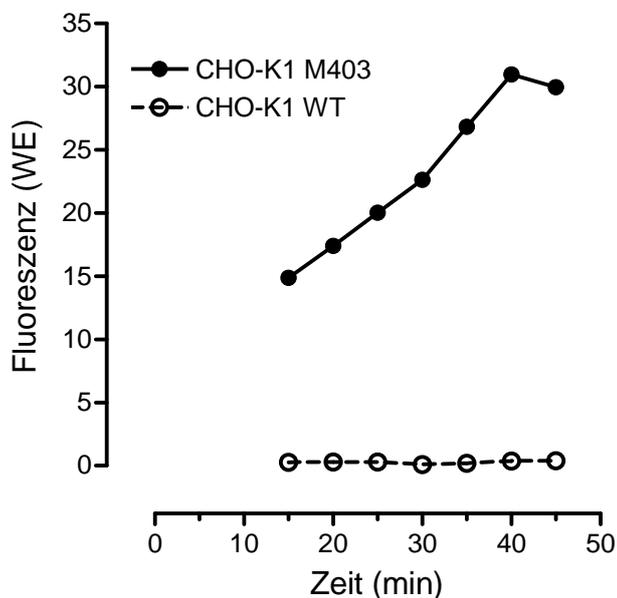


Abb. 3.1: Optimierung der Inkubationszeit

den gesamten Zeitrahmen nahezu konstant. Durch die Verlängerung der Inkubationszeit von 20 auf 40 min konnte somit das Messfenster fast verdoppelt werden. Alle Folgeversuche wurden daher mit der optimierten Inkubationszeit durchgeführt. Unabhängig von dieser Arbeit wurde für A2780adr Zellen ebenfalls eine optimale Inkubationszeit von 40 min ermittelt [58]. Nach dieser Optimierung sollte das Ergebnis des Vorversuchs abgesichert und die hohe P-gp Expression in den Zelllinien CHO-K1 M403 und CHO-K1 M411 bestätigt werden. Wie in Abbildung 3.2 zu sehen ist, wurden auch in den Folgeexperimenten im Vergleich zu den Wildtyp Zellen für CHO-K1 M403 und CHO-K1 M411 etwa 30-fach höhere Fluoreszenzwerte gemessen. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Insgesamt wurde während dieser Experimente für keine der beiden Zelllinien mehr als eine antikörpermarkierte Zellpopulation beobachtet. Dies wurde als Bestätigung für einen klonalen Ursprung der beiden Zelllinien mit dem höchsten Expressionsniveau gewertet. Anhand der durchgeführten Experimente konnte die heterologe Expression von humanem P-gp in der Plasmamembran der Zelllinien CHO-K1 M403 und M411 belegt werden. Im Gegensatz dazu waren die Messwerte für CHO-K1 pcDNA und CHO-K1 WT Zellen nicht signifikant verschieden. Diese Zellen zeigten wie erwartet keine Expression von humanem P-gp.

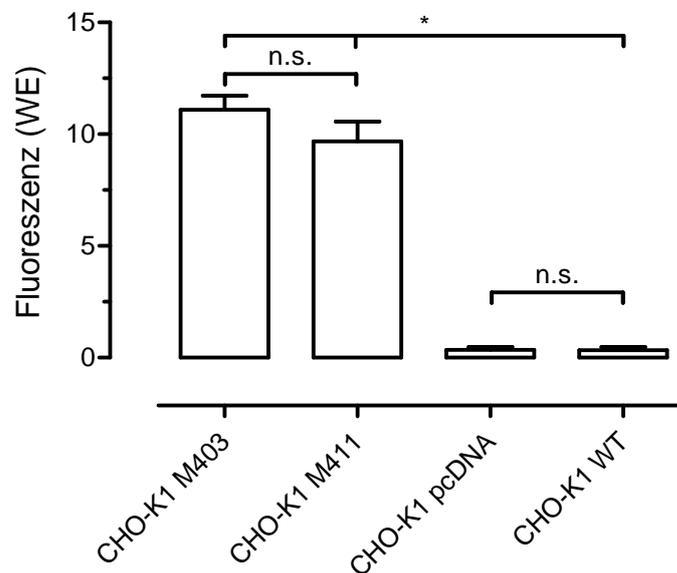


Abb. 3.2: Charakterisierung der CHO-K1 Klone M403 und M411. Die Abbildung zeigt Mittelwert und Standardabweichung der antikörpervermittelten Fluoreszenz aus drei unabhängigen Experimenten. Nicht signifikante Fluoreszenzunterschiede wurden mit n. s. und signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) mit * gekennzeichnet.

Insgesamt zeigte die Zelllinie CHO-K1 M403 im Mittel zwar die höchsten Fluoreszenzwerte und damit die stärkste Expression, jedoch war der Unterschied zu den CHO-K1 M411 Zellen statistisch nicht signifikant. Die Auswahl der Zelllinie für die weitere Charakterisierung wurde daher anhand eines weiteren Parameters getroffen. Hierbei handelte es sich um die durchschnittliche Zellgröße, die standardmäßig bei der Zellzahlbestimmung ermittelt wurde. CHO-K1 M411 Zellen, mit einem Durchmesser von $17,06 \mu\text{m} \pm 0,54 \mu\text{m}$ ($\bar{x} \pm s_M$) und CHO-K1 M403 Zellen, mit einem Durchmesser von $12,04 \mu\text{m} \pm 0,37 \mu\text{m}$, waren signifikant größer ($P < 0,05$) als die Wildtyp-Zellen ($10,89 \mu\text{m} \pm 0,20 \mu\text{m}$). Da die durch die Transfektion hervorgerufene morphologische Veränderung der CHO-K1 M403 Zellen jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war, wurde diese Zelllinie für die vergleichenden Untersuchungen mit A2780adr Zellen ausgewählt.

Abbildung 3.3 zeigt die P-gp Expressionsniveaus der etablierten Zelllinie A2780adr und von CHO-K1 M403 Zellen im direkten Vergleich. Wurden die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert (-), lag das P-gp Expressionsniveau der transfizierten Zellen zwei- bis dreifach niedriger, als bei A2780adr Zellen. Jedoch war dieser Unterschied aufgrund der hohen Varianz der Messwerte der A2780adr Zellen nicht signifikant. Die Versuchsergebnisse belegen jedoch eine im Vergleich zu den transfizierten Zellen höhere P-gp Expression in den durch Selektion mit Doxorubicin

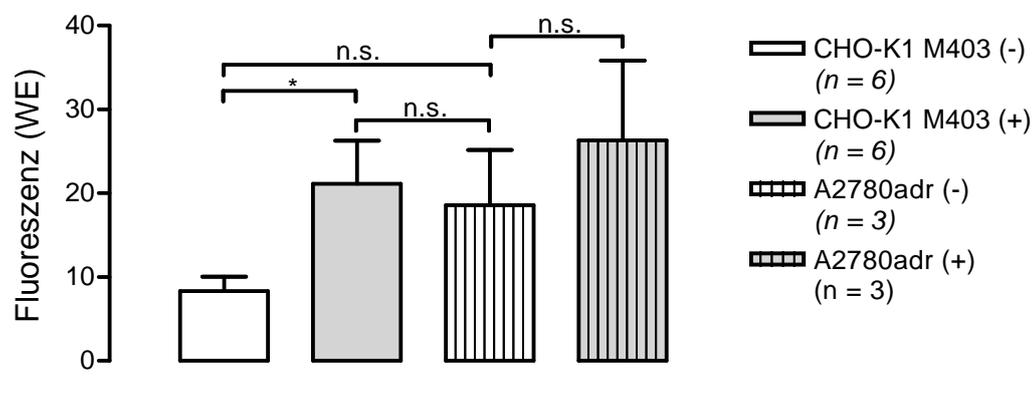


Abb. 3.3: P-gp Expression in CHO-K1 Zellen im direkten Vergleich zur Standardzelllinie A2780adr Die mit (-) gekennzeichneten Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert. Das Nährmedium der mit (+) gekennzeichneten Zellen wurde 12 bis 16 h vor der Versuchsdurchführung mit 5 mmol/l Natriumbutyrat versetzt. Das Diagramm zeigt Mittelwert und Standardabweichung der Messwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Nicht signifikante Fluoreszenzunterschiede wurden mit n. s. und signifikante Unterschiede ($P < 0,05$) mit * gekennzeichnet.

gewonnenen A2780adr Zellen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnisse von Versuchen, die von Devine et al. [47] an der Zelllinie DC-3F durchgeführt wurden.

Oft kann die Expression eines rekombinanten Proteins durch Supplementierung des Nährmediums mit expressionssteigernden Substanzen verbessert werden. So wurde in der vorliegenden Arbeit das chemische Chaperon Glycerol zur Steigerung der P-gp Expression im verwendeten Hefe-Expressionssystem verwendet. [49]. Bei Säugetierzellen hat sich in einigen Fällen Natriumbutyrat für diesen Zweck bewährt. Es wurde bereits erfolgreich zur Steigerung der Expressionrate rekombinanter Proteine in CHO-Zellen eingesetzt [95]. Weiterhin konnte in einigen Kolonkarzinom-Zelllinien eine Induktion der P-Glykoprotein Expression festgestellt werden [96]. Auf welche Weise Natriumbutyrat die Steigerung der Proteinexpression bewirkt, ist dabei nicht geklärt [97]. In einem Parallelversuch wurde daher die Auswirkung von Natriumbutyrat auf die P-gp Expression in A2780adr und CHO-K1 M403 Zellen untersucht. Dazu wurde das Nährmedium der Zellen etwa 16 h vor Bestimmung des Expressionsniveaus mit 5 mmol/l Natriumbutyrat versetzt. Das Versuchsprotokoll blieb ansonsten unverändert. Abbildung 3.3 zeigt, dass die P-gp Expression in den transfizierten Zellen durch diese Behandlung (+) signifikant gesteigert werden konnte und das Expressionsniveau der unbehandelten (-) A2780adr Zellen erreicht wurde. Auch in den A2780adr Zellen ließ sich eine erhöhte P-gp Expression feststellen. Der Unterschied fiel im Vergleich zu den transfizierten Zellen jedoch wesentlich geringer aus und war statistisch nicht signifikant.

3.1.2 Funktionelle Charakterisierung der Zelllinie

Nachdem das heterolog exprimierte P-Glykoprotein erfolgreich in der Zellmembran der transfizierten CHO-K1 M403 Zellen nachgewiesen werden konnte, sollten die folgenden Versuche die Funktion des rekombinanten Proteins klären und ein Vergleich mit den bisher genutzten A2780adr Zellen gezogen werden. Dies sollte anhand von Calcein-AM Transportassays (vgl. Kapitel 2.2.7) geschehen. Zur Inhibition des Calcein-AM Transports wurde Verapamil eingesetzt, ein bekannter und sehr gut charakterisierter Modulator der P-gp Funktion [98]. Neben der Zelllinie CHO-K1 M403 wurden auch CHO-K1 Zellen der pcDNA Linie für Kontrollversuche eingesetzt. Das Ergebnis einer solchen funktionellen Untersuchung ist in Abbildung 3.4 dargestellt. In beiden Zelllinien konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung

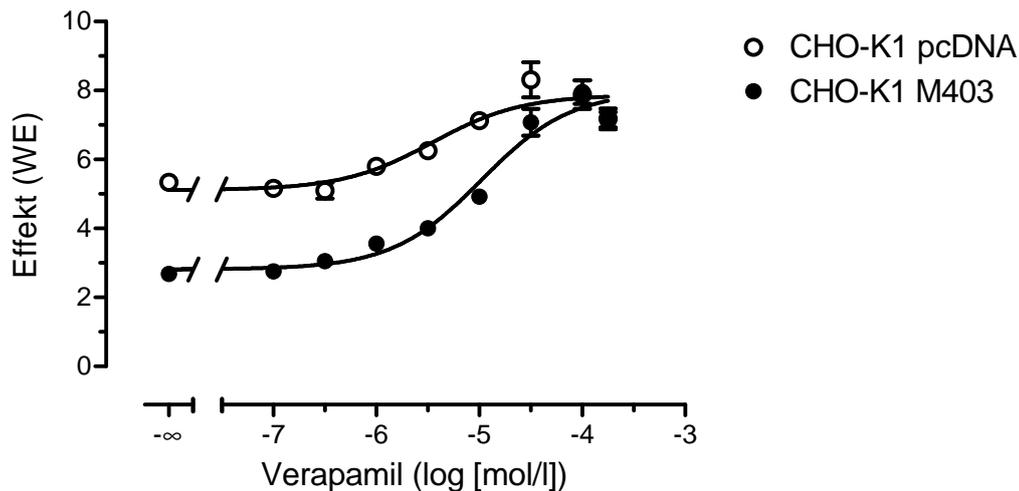


Abb. 3.4: P-gp vermittelter Calcein-AM Transport in CHO-K1 M403 im direkten Vergleich mit der CHO-K1 pcDNA Kontrollzelllinie. (Repräsentatives Experiment)

der Calcein-Akkumulation beobachtet werden. In Abwesenheit von Verapamil wurde in der Kontrollzelllinie ein höherer Calcein-vermittelter Fluoreszenzanstieg gemessen, als in den P-gp exprimierenden Zellen. Dieser Befund lieferte erste Hinweise darauf, dass das Protein nicht nur exprimiert wird, sondern auch funktionell intakt ist.

Zunächst überraschend ist die Zunahme der Calcein-Akkumulation in der Kontrollzelllinie mit steigender Verapamil Konzentration. Es handelt sich hierbei um ein Phänomen, das bereits bei einem anderen Transportassay für CHO-K1 Zellen beobachtet wurde [99]. Die P-gp Funktion wurde in diesem Fall mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 123 untersucht. Andererseits wurde auch bei Untersuchungen von P-gp exprimierenden P388 Zellen mit dem Calcein-AM Assay bei Kontrollexperimenten mit P388 Wildtyp Zellen ein ähnliches Verhalten beobachtet [100]. Spenderorganismus für die verwendete Zelllinie P388 war eine Maus. Als möglicher Grund für diese Beobachtungen wurde die, wenn auch schwach ausgeprägte, intrinsische P-gp Expression in diesen Zellen angegeben. Aufgrund dieser Literaturdaten wurde die in dieser Arbeit beobachtet konzentrationsabhängige Steigerung der Calcein-Akkumulation auf die von Hamstern exprimierte P-gp Isoformen zurückgeführt. Sie werden mit Pgp1 und Pgp2 bezeichnet und weisen strukturell und funktionell starke Ähnlichkeiten mit humanem P-gp auf [101, 102]. Aufgrund der Spezifität des Antikörpers 17F9 für humanes P-gp [103] konnte keine dieser Isoformen in den vorangegangenen Versuchen detektiert werden. Der für Western-Blots eingesetzte

Antikörper C219 reagierte hingegen sowohl mit humanem P-gp als auch mit den Isoformen aus dem Hamster [53]. Tatsächlich konnte mit Hilfe des Western-Blots zu einem späteren Zeitpunkt die Expression einer P-gp Isoform in CHO-K1 pcDNA Membranen nachgewiesen werden (vergleiche Kapitel 3.1.3, Abbildung 3.8).

Da die verwendeten CHO-K1 Zellen ursprünglich aus Ovarien des chinesischen Hamsters isoliert worden waren, verwundert dieses Ergebnis nicht. Wird doch P-gp in diesem Gewebe natürlicherweise exprimiert [104]. Die Expression war im Vergleich zu den aus einem menschlichen Ovarialkarzinom erhaltenen A2780 Zellen jedoch deutlich stärker ausgeprägt, so dass ein Nachweis auch auf funktioneller Ebene mit dem Calcein-AM Transportassay möglich war. Im Gegensatz dazu konnte in den sensitiven A2780 Zellen bei FACS-Versuchen mit dem Antikörper 17F9 und bei Western-Blots mit dem Antikörper C219 keine P-gp Expression nachgewiesen werden.

Die funktionellen Experimente mit der Zelllinie CHO-K1 M403 wurden zunächst nach dem für A2780adr Zellen etablierten Protokoll [58] durchgeführt. Die aus diesen Versuchen erhaltenen Dosiseffektkurven fielen zum Teil sehr flach ($n_H < 0,6$) aus. Da in A2780adr Zellen mit steigenden Calcein-AM Konzentrationen ein leichter, jedoch nicht signifikanter, Anstieg des Hillkoeffizienten beobachtet wurde [105], wurde die Auswirkung der eingesetzten Calcein-AM Konzentration auf das Versuchsergebnis genauer untersucht. Weiterhin wurden von Versuch zu Versuch zum Teil erhebliche Schwankungen bei den ermittelten Fluoreszenzanstiegen beobachtet. Als möglicher Grund für dieses Phänomen wurde der Inkubationsschritt ausgemacht, der aus organisatorischen Gründen zwischen dem Ausplattieren der Zellen in die PS-Mikrotiterplatte und der Zugabe des Modulators eingefügt worden war. Diese Vorgehensweise hatte bei A2780adr keinerlei Auswirkungen, bei den transfizierten Zellen führte diese Vorinkubation jedoch zu einer beschleunigten Aufnahme von Calcein-AM. Dieses zellspezifische Phänomen hatte zwar keinen Einfluss auf das Versuchsergebnis in Form des jeweiligen pEC_{50} -Wertes, machte jedoch den Vergleich mehrerer unabhängiger Versuche schwierig. Mit dem Ziel, eine bessere Reproduzierbarkeit der Calcein-Akkumulationsgeschwindigkeit zu erreichen, wurde auch die Dauer der Vorinkubation genauer untersucht.

Abbildung 3.5 A zeigt den Einfluss der Calcein-AM Konzentration auf das Versuchsergebnis. Weder die pEC_{50} -Werte noch die Hillkoeffizienten der vier Dosiseffektkurven zeigten untereinander signifikante Unterschiede. Die Erhöhung der Calcein-AM

Konzentration hatte somit keine Auswirkung auf die Kurvensteilheit. Allerdings vergrößerte sich das relative Messfenster bis zu einer Calcein-AM Konzentration von $0,37 \mu\text{mol/l}$ und fiel dann wieder etwas ab. Diese Beobachtung konnte in den Folgeexperimenten bestätigt werden. Für die folgenden Versuche wurde daher Calcein-AM in einer Konzentration von $0,37 \mu\text{mol/l}$ eingesetzt. Abbildung 3.5 B zeigt sehr deutlich, dass die Vorinkubation der CHO-K1 M403 Zellen zu einer beschleunigten Calcein-Akkumulation während der Messung führte. Der Grund für dieses Phänomen ist nicht bekannt. Ausgehend von diesem Ergebnis wurden die Zellen in den folgenden

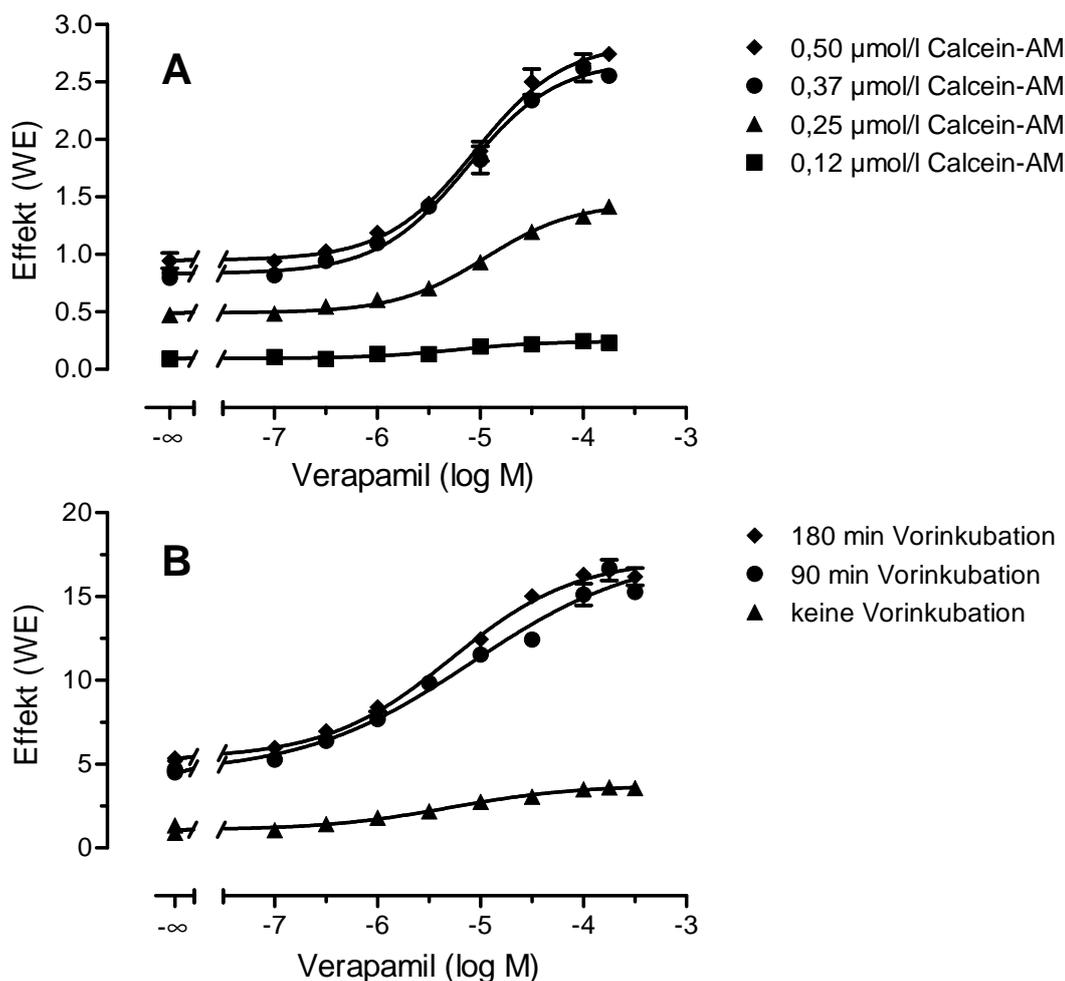


Abb. 3.5: Optimierung der Calcein-AM Transportassay Parameter für CHO-K1 M403 Zellen. Abbildung A zeigt die Auswirkung steigender Calcein-AM Konzentrationen auf das Ergebnis der Calcein-AM Transportassays. Bei diesem Versuch wurde auf eine Vorinkubation verzichtet. Die Auswirkung eines zusätzlich zum Standardprotokoll eingefügten Vorinkubationsschritts ist in Abbildung B dargestellt (Calcein-AM Konzentration: $0,37 \mu\text{mol/l}$). (Repräsentative Experimente)

Versuchen vor der Zugabe der Testsubstanz für 90 min unter Standardkulturbedingungen vorinkubiert. Diese Optimierung half, die beobachteten Schwankungen bei der Geschwindigkeit der Calcein-Akkumulation zu reduzieren. Dennoch waren unabhängig durchgeführte Versuche nicht direkt vergleichbar. Die Daten wurden daher normalisiert, indem die in Abwesenheit des Modulators gemessene Fluoreszenzrate gleich 0% und die maximale Fluoreszenzrate gleich 100% gesetzt wurde.

Nachdem die Versuchsbedingungen des Calcein-AM Transportassays an die CHO-K1 M403 Zellen angepasst worden waren, wurde die Auswirkung einer Auswahl von insgesamt neun bekannten P-gp Modulatoren auf den P-gp vermittelten Calcein-AM Transport untersucht. Die Modulatoren wurden dabei so ausgewählt, dass sie in ihrer Struktur und in ihrer Affinität möglichst unterschiedlich waren. In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse dieser Versuche aufgeführt. Die ermittelten pEC_{50} -Werte zeigten eine gute Korrelation ($R^2 = 0,78$; siehe Abbildung 3.6 A) mit den von Henrik Müller im Rahmen seiner Dissertation [58] an A2780adr Zellen ermittelten Werten. Allein die Substanz H19 wies in A2780adr Zellen eine deutlich größere Affinität zu P-gp auf. Wurde diese Substanz von der Korrelation ausgeschlossen, stieg das Bestimmtheitsmaß auf $R^2 = 0,94$. Im Gegensatz zu den pEC_{50} -Werten korrelierten die Hillkoeffizienten nicht.

Mit den vier Substanzen Diltiazem, H15, Verapamil und WK-X87 wurden zusätzlich funktionelle Untersuchungen an mit Butyrat behandelten Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind ebenfalls in Tabelle 3.1 aufgeführt. Die Calcein-

Tab. 3.1: Funktionelle Charakterisierung von CHO-K1 M403 mit Hilfe von ausgewählten P-gp Modulatoren. Tabelliert sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der pEC_{50} -Werte und der Hillkoeffizienten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Substanz	ohne Butyrat		mit Butyrat	
	pEC_{50}	n_H	pEC_{50}	n_H
Diltiazem	$4,77 \pm 0,11$	$0,82 \pm 0,13$	$4,31 \pm 0,16$	$0,88 \pm 0,18$
H15	$5,79 \pm 0,17$	$1,83 \pm 0,25$	$5,43 \pm 0,14$	$1,78 \pm 0,57$
H19	$5,59 \pm 0,11$	$2,97 \pm 1,23$		
Nicardipin	$5,74 \pm 0,23$	$1,45 \pm 0,86$		
Progesteron	$4,76 \pm 0,38$	$3,56 \pm 2,38$		
Verapamil	$5,55 \pm 0,33$	$0,88 \pm 0,16$	$4,57 \pm 0,14$	$0,84 \pm 0,21$
Vinblastin	$5,50 \pm 0,08$	$1,97 \pm 0,22$		
XR9577	$6,96 \pm 0,18$	$2,35 \pm 0,83$		
WK-X87	$6,59 \pm 0,24$	$1,63 \pm 0,70$	$6,09 \pm 0,10$	$3,59 \pm 0,18$

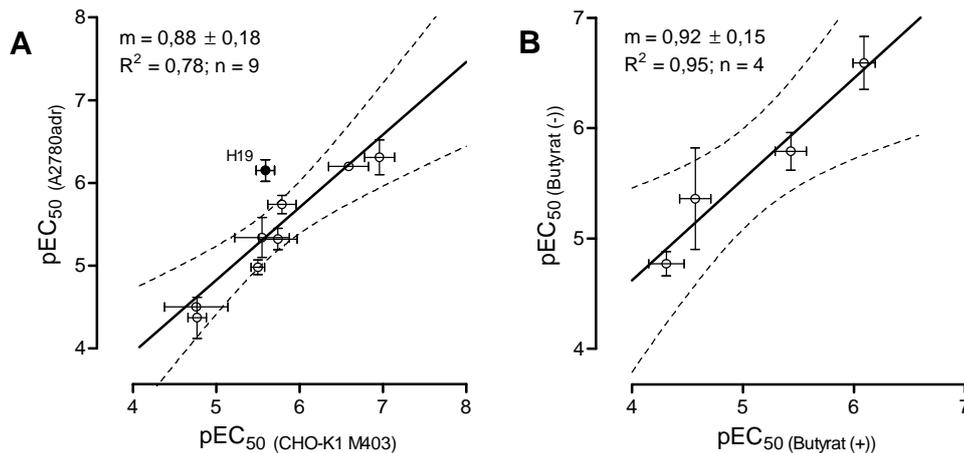


Abb. 3.6: Korrelation zwischen den mit dem Calcein-AM Assay an CHO-K1 M403 erhobenen funktionellen Daten. Abbildung A zeigt die Korrelation der für CHO-K1 M403 Zellen bestimmten pEC_{50} -Werte mit den an A2780adr Zellen erhobenen Daten [58]. Abbildung B zeigt das Ergebnis der Korrelation von pEC_{50} -Werten, die mit CHO-K1 M403 Zellen nach der Behandlung mit Butyrat (+) bestimmt wurden, mit den unter Standardbedingungen (-) an CHO-K1 Zellen gewonnenen Daten.

Akkumulationsrate lag in Abwesenheit der Testsubstanzen bei diesen Zellen niedriger als bei den unbehandelten Zellen. Ein Befund, der im Einklang mit der erhöhten P-gp Expression steht (siehe Kapitel 3.1.1). Insgesamt vergrößerte sich das relative Messfenster durch die Behandlung mit Butyrat um etwa 40 bis 50%. Die pEC_{50} -Werte lagen bei diesen Experimenten um 0,5 bis 1 log-Einheiten niedriger und zeigten eine sehr gute Korrelation ($R^2 = 0,94$; siehe Abbildung 3.6 B) mit den an unbehandelten Zellen erhobenen Daten. Auch hier korrelierten die Hillkoeffizienten nicht.

Anhand von Tabelle 3.1 lässt sich noch ein weiterer Sachverhalt verdeutlichen. Wie bereits erwähnt, zeigt der Vergleich der pEC_{50} -Werte, die in An- und Abwesenheit von Butyrat bestimmt wurden, dass bei Induktion der P-gp Expression mit Butyrat eine Verschiebung zu niedrigeren Werten erfolgt. Dies entspricht einer Verschiebung der Dosiseffektkurven nach rechts, hin zu höheren Konzentrationen. Die Fähigkeit der eingesetzten Substanz, den P-gp vermittelten Calcein-AM Transport zu inhibieren, nimmt also scheinbar ab. Aufgrund dieser Abhängigkeit der pEC_{50} -Werte vom P-gp Expressionslevel handelt es sich also um apparente Hemmkonstanten, die nur für diesen einen P-gp Expressionsstatus gelten.

3.1.3 Membranpräparation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das von Lever et al. [59] entwickelte Protokoll zur Gewinnung der Membranfraktion aus CHO-Zellen für die vorhandenen Laborgeräte modifiziert und etabliert. Beispielsweise wurden die Zellen im Originalprotokoll in einer sogenannten „French press“ homogenisiert. Da dieses Gerät nicht zur Verfügung stand, wurden die Zellen von jeweils zehn Kulturschalen in einem Polytron-Homogenisator aufgebrochen. Diese Vorgehensweise wurde einem Protokoll zur Erstellung eines Zellextraktes entnommen [106].

Anschließend wurde das Zellhomogenat durch differenzielle Zentrifugation fraktioniert. Tabelle 3.2 gibt einen Überblick über die prozentuale Verteilung des Gesamtproteins auf die resultierenden Fraktionen. Zunächst fallen die großen Unterschiede in der Proteinausbeute bezogen auf die Anzahl der verwendeten Kulturschalen auf. Die Behandlung der Zellen mit Butyrat führte zu einer deutlichen Abnahme der Gesamtproteinausbeute. Ebenso wurde aus einer Kulturschale mit A2780adr Zellen mehr als doppelt soviel Protein isoliert, wie aus einer vergleichbaren CHO-K1 M403 Kultur. Diese Beobachtung ist auf die unterschiedlichen Zellzahlen zurückzuführen, die je nach Versuchsbedingung aus einer Kulturschale gewonnen werden konnten. So verursacht Butyrat nicht nur eine Induktion der Proteinexpression, sondern auch zur Inhibition der Zellteilung durch einen Zellzyklusarrest in der G₁-Phase [107]. Während der 16stündigen Inkubation können sich die unbehandelten Zellen ungehindert teilen, was bei einer Verdopplungszeit von etwa $t_{1/2} = 24$ h zu erheblichen Unterschieden in der Gesamtzellzahl führt. Die hohe Proteinausbeute bei A2780adr Zellen lässt sich ebenfalls über die Gesamtzellzahl erklären. So wurden für CHO-

Tab. 3.2: Fraktionierung des Gesamtproteins während der Membranpräparation nach Lever [59]. Untersucht wurde der Einfluss der Zelldichte bei der Homogenisierung sowie die Induktion der P-gp Expression mit Butyrat (+) auf die Membranfraktion-Ausbeute (P3) bei CHO-K1 M403 Zellen. Bei den mit „B“ gekennzeichneten Kulturen wurde die Homogenisierung mit der doppelten Zelldichte durchgeführt. Zum Vergleich wurde die Membranpräparation ebenfalls mit A2780adr Zellen durchgeführt. Tabelliert sind jeweils die gemittelten Werte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Zellkultur	Protein/Schale	P1	P2	S1	P3	Wiederfindung
CHO-K1 M403 A(-)	1,13 mg	36 %	13 %	42 %	8 %	99 %
CHO-K1 M403 B(-)	0,95 mg	43 %	19 %	24 %	17 %	103 %
CHO-K1 M403 A(+)	0,61 mg	30 %	16 %	48 %	6 %	100 %
A2780adr	2,31 mg	34 %	8 %	27 %	21 %	90 %

K1 M403 Zellen etwa 130 000 Zellen/cm², für A2780adr jedoch 400 000 Zellen/cm² erhalten. Wird dieser Unterschied bei der Betrachtung der Gesamtproteinausbeute berücksichtigt, liegt auch hier eine ähnliche Größenordnung vor.

Bei der Fraktionierung des Homogenats wurde etwa die Hälfte (50–60 %) des Gesamtproteins während der ersten zwei Zentrifugationsschritte abgetrennt. Dies geschah unabhängig von den Versuchparametern oder der verwendeten Zelllinie. Dabei entfiel der Großteil auf das Pellet P1, das aus der direkt nach der Homogenisierung durchgeführten Zentrifugation resultierte und insgesamt etwa 40 % des Gesamtproteins enthielt. Bei der Untersuchung dieser Fraktion mittels Western-Blot (Abbildung 3.7) wurde ein P-gp Gehalt auf Niveau des Zellhomogenats in dieser Fraktion beobachtet. Durch die im Anschluss durchgeführte Zentrifugation über dem Saccharosekissen wurde das Pellet P2 erhalten. Wie in Abbildung 3.7 zu sehen ist, konnte in dieser Fraktion bereits eine gewisse Anreicherung des Zielproteins beobachtet werden. Der Überstand (S1) und die Membranfraktion in Form von Pellet P3 wurden durch die nachfolgende Ultrazentrifugation gewonnen. Wie angestrebt wurde dabei in der Membranfraktion der höchste P-gp Anteil gefunden. Wieviel P-gp bei dem zuvor durchgeführten Aufreinigungsschritt im Saccharosekissen zurückgehalten wurde, war abhängig von der verwendeten Zelllinie. Der Western-Blot zeigt deutlich, dass bei Zellen der A2780adr Linie deutlich größere Verluste in Kauf genommen werden mussten. Wie Tabelle 3.2 zu entnehmen ist, hatte jedoch nicht nur die verwendete Zelllinie Auswirkungen auf die Ausbeute der Membranpräparation. So wurde bei mit Butyrat behandelten Zellen nur 6 % des Gesamtproteins in Form der Membranfrakti-

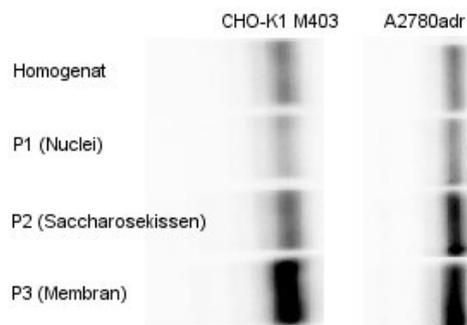


Abb. 3.7: Western-Blot der während der Membranpräparation nach Lever erhaltenen Fraktionen. Abgebildet ist ein Western-Blot für CHO-K1 M403 Zellen und ein Western-Blot für A2780adr Zellen. Pro Bahn wurden je 4 µg Protein aufgetragen. Es handelt sich um unabhängige Experimente, so dass die Blots untereinander nicht vergleichbar sind.

on erhalten. Auch die Ausbeute der unter Standardbedingungen kultivierten und bei niedriger Zelldichte homogenisierten CHO-K1 M403 Zellen lag nur geringfügig höher. In der Literatur [108] wurde eine hohe Zelldichte während der Homogenisierung als vorteilhaft beschrieben. Tatsächlich führte die probeweise Verdopplung der Zelldichte vor der Homogenisierung, durch Vereinigung von CHO-K1 M403 Zellen aus 20 Kulturschalen in 20 ml Homogenisierungspuffer nach Lever, zu einer deutlichen Verbesserung der Ausbeute. Ähnliche Ausbeuten lieferten A2780adr Kulturen bei der Verwendung des in Kapitel 2.2.8 beschriebenen Standardprotokolls.

Im Western-Blot zeigte sich bei der Membranpräparation für die CHO-K1 M403 Zelllinie eine deutliche P-gp Anreicherung. Auch bei A2780adr Zellen wurde eine gewisse Anreicherung beobachtet, jedoch ging bei diesen Zellen die Zentrifugation über dem Saccharosekissen mit einem höheren Verlust einher. Der Western-Blot in Abbildung 3.8 ermöglicht den direkten Vergleich des P-gp Gehalts verschiedener Membranpräparationen. Es ist deutlich zu erkennen, dass der P-gp Anteil in CHO-K1 M403 Membranen insgesamt höher lag als in A2780adr Membranen. Nach den in Kapitel 3.1.1 vorgestellten Ergebnissen liegt die P-gp Expression jedoch in der Membran lebender A2780adr Zellen etwa um den Faktor drei höher als bei CHO-K1 M403. Die vergleichsweise niedrige P-gp Ausbeute belegt damit die wesentlich stärkeren Verluste während der Präparation und die insgesamt bessere Eignung von CHO-K1 M403 Zellen für die Präparation einer P-gp-haltigen Membranfraktion. Die Behandlung der CHO-K1 M403 Zellen mit Butyrat führte durch die erhöhte P-gp Expression (vergleiche Kapitel 3.1.1) zu einer weiteren Steigerung des P-gp

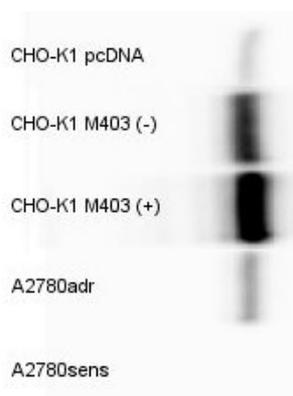


Abb. 3.8: Vergleich des P-gp Gehalts verschiedener Membranfraktionen. Für den abgebildeten Western-Blot wurden jeweils 4 µg Protein aufgetragen. Vor der Membranpräparation mit Butyrat behandelte Zellen wurden mit (+) gekennzeichnet.

Anteils. Diese Steigerung wurde jedoch durch den geringeren Gesamtproteingehalt dieser Zellkulturen praktisch nivelliert. So wurden unter diesen Bedingungen aus 40 Zellkulturschalen in keinem Fall ausreichende Mengen Membranfraktion für die Durchführung von Radioligandbindungsstudien erhalten.

In der Kontrollzelllinie CHO-K1 pcDNA wurde ein Protein mit einem Molekulargewicht, das dem von humanem P-gp ähnlich ist, durch den Antikörper C219 markiert. Da dieser nicht spezifisch für humanes P-gp ist [53], sondern auch an die in Hamstern exprimierten P-gp Isoformen Pgp1 und Pgp1b bindet, handelt es sich vermutlich um eines der letztgenannten Proteine. Diese Beobachtung deckt sich mit der bei funktionellen Untersuchungen beobachteten Beschleunigung der Calcein-Akkumulation in Gegenwart steigender Verapamilkonzentration in CHO-K1 pcDNA Zellen (siehe Kapitel 3.1.2). Im Gegensatz dazu kam es bei der A2780sens Membranpräparation zu keiner Antigen/Antikörper-Reaktion.

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass sich das eingesetzte Protokoll zur Gewinnung P-gp-haltiger Membranfraktionen eignet. In Membranpräparationen aus CHO-K1 M403 Zellen ist der P-gp Anteil höher als in Präparationen aus A2780adr Zellen. Daher sind diese Präparationen für Radioligand-Bindungsversuche besser geeignet. Im Laufe der Etablierung dieser Methode wurde ein direkter Zusammenhang zwischen der während der Homogenisierung eingesetzten Zelldichte und der Gesamtausbeute festgestellt. Aus diesem Grund sollte im Gegensatz zu dem in Kapitel 2.2.8 beschriebenen Protokoll für CHO-K1 M403 Zellen stets die doppelte Zelldichte bei der Homogenisierung eingesetzt werden.

3.1.4 Schlussfolgerungen

Die angestrebte heterologe Expression von humanem P-gp in der Zelllinie CHO-K1 wurde erfolgreich durchgeführt. Nach der Transfektion der Wildtyp-Zelllinie wurde die Expression zunächst qualitativ mit dem Antikörper 17F9 in der Plasmamembran einer Reihe klonaler Zelllinien nachgewiesen. Schließlich wurde die Zelllinie CHO-K1 M403 als Zelllinie mit der höchsten Expressionsrate identifiziert und für funktionelle Untersuchungen mittels des Calcein-AM Transportassays herangezogen.

Mit Hilfe des Transportassays konnte in den CHO-K1 M403 Zellen die P-gp Expression auch funktionell nachgewiesen werden. Die für die Testsubstanzen erhobenen Daten korrelieren gut, unter Auslassung der Substanz H19 sogar sehr gut, mit den an

der Zelllinie A2780adr erhobenen Daten. Der Grund für die im Vergleich niedrigere Affinität von H19 konnte nicht ermittelt werden. Jedoch zeigte die strukturell eng mit H19 verwandte Substanz H15 an A2780adr ebenfalls eine um fast 0,5 log-Einheiten herabgesetzte Affinität [58]. Weiterhin wurden für diese beiden Substanzen an aufgereinigtem humanem P-gp mit dem ATPase-Assay sehr ähnliche $pK_{M(D)}$ -Werte ermittelt (vergleiche Kapitel 3.3.3). Da die ATPase-Daten insgesamt auch eine gute Korrelation mit den an A2780adr Zellen bestimmten pEC_{50} -Werten zeigten, wurde die hohe Affinität von H19 als Ausreißer gewertet. Demzufolge gibt es derzeit keine Anhaltspunkte dafür, dass während der Selektion der Standardzelllinie A2780adr mit Doxorubicin Punktmutationen auftraten, die zu einer deutlichen Änderung der Substratspezifität von P-gp geführt hätten. Die Validität des bestehenden Standardtestsystems, bestehend aus Calcein-AM Transportassay und A2780adr Zellen, konnte damit weiter untermauert werden.

CHO-K1 M403 Zellen zeigten sich im Verlauf der experimentellen Arbeiten als äußerst anfällig gegenüber kleineren Änderungen im Versuchsablauf. Durch das Einfügen des Inkubationsschritts und die leichte Erhöhung der eingesetzten Calcein-AM Konzentration konnten zwar die Schwankungen, die von Versuch zu Versuch auftraten, etwas verringert werden, dennoch stellte sich die Zelllinie A2780adr im Laboralltag als robuster heraus. Von einer weiteren Verwendung der rekombinanten Zelllinie zur Charakterisierung neuer Testsubstanzen sollte daher abgesehen werden. Die im Zuge dieser Arbeit etablierten Methoden zur heterologen Expression von Proteinen in Säugetierzellen könnten aber beispielsweise für Mutationsstudien an P-gp verwendet werden. Die erneute Verwendung von CHO-K1 Zellen muss dann jedoch überdacht werden, da die beobachtete intrinsische P-gp Expression solche Experimente stören könnte. Für eine Verwendung der CHO-K1 Zellen spricht dagegen die gute Induzierbarkeit der Expression des rekombinanten Proteins mit Butyrat.

Auch die Etablierung eines Protokolls zur Präparation P-gp-haltiger Membranfraktionen aus den CHO-K1 und A2780 Zelllinien verlief erfolgreich. Als wichtiger Parameter für die Ausbeute stellte sich dabei die bei der Herstellung des Zellhomogenats eingesetzte Zelldichte heraus. Insgesamt wurden mit CHO-K1 M403 Zellen Membranpräparationen mit einem höheren P-gp Anteil erhalten als bei A2780adr Zellen, so dass Präparationen aus CHO-K1 M403 Zellen insgesamt für die Durchführung von Radioligandbindungsstudien besser geeignet scheinen.

3.2 Etablierung des *Saccharomyces cerevisiae* Expressionssystems

3.2.1 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Inkulturnahme des Hefestamms BJ5457 RAF#13 auf festem Nährmedium erfolgte wie in Kapitel 2.3 beschrieben und verlief stets erfolgreich. Von den resultierenden Kulturplatten wurden einzelne Kolonien ausgewählt und als Grundlage der Flüssigkulturen zur Herstellung der Biomasse verwendet. Da nicht jede Kolonie zu einer vitalen Vorkultur führte, wurden immer drei 50 ml Vorkulturen angelegt. Eine Überwachung dieser Kulturen durch regelmäßige Bestimmung der OD_{600} erfolgte nicht. Auf diese Weise sollte die Kontaminationsgefahr mit anderen Mikroorganismen minimiert werden. Die optische Dichte wurde nach 40–42 h erstmals bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt war die Kontaminationsgefahr durch die erhöhte Zelldichte bereits wesentlich geringer. Nach dem Erreichen der gewünschten Zelldichte ($0,8 < OD_{600} < 1,2$) wurde das Kulturvolumen von einer 50 ml Vorkultur auf 0,5 l vergrößert. Von diesem Zeitpunkt an wurden die Kulturdauer und die Wachstumsgeschwindigkeit in Form der Verdopplungszeit protokolliert. Nachdem auch diese Kultur die gewünschte optische Dichte ($0,8 < OD_{600} < 1,2$) erreichte, wurde sie zum Animpfen der Fed-Batch Kultur im Fermenter genutzt. Die für die Kultivierung des Stamms BJ5457 RAF#13 typischen Werte sind in Tabelle 3.3 aufgeführt. Während der einzelnen Kultivierungsphasen wurden nur minimale Unterschiede der Verdopplungszeiten beobachtet. Weiterhin entsprachen die beobachteten Teilungsraten den Literaturwerten [49]. Ein

Tab. 3.3: Typische Kulturdauer und Verdopplungszeit des P-gp exprimierenden Hefestamms BJ5457 RAF#13. Bei den angegebenen Parametern handelt es sich um Mittelwert und Standardabweichung aus sieben Ansätzen (n. b. = nicht bestimmt).

Ansatz	Kulturdauer [h]	Verdopplungszeit [h]
50 ml Vorkultur	≤ 48	n. b.
0,5 l Vorkultur	$14,0 \pm 5,3$	$5,5 \pm 0,7$
Fermenter		
Beginn	$20,6 \pm 2,2$	$5,7 \pm 0,9$
nach 1. Zugabe	$7,9 \pm 2,2$	$5,8 \pm 0,7$
nach 2. Zugabe	$6,9 \pm 0,9$	$5,7 \pm 0,5$
Gesamt:	$35,4 \pm 5,3$	$5,7 \pm 0,6$

vollständiger Wachstumszyklus dauerte vom Animpfen der ersten Flüssigkultur bis zur Ernte der Hefen etwa 100 h und lieferte durchschnittlich 61 g Biomasse.

3.2.2 Membranpräparation

Wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben, wurde die durch Kultivierung der Hefen gewonnene Biomasse zur Präparation der Membranfraktion verwendet. Vor der eigentlichen Membranpräparation wurde die eingesetzte Biomasse erneut bestimmt. Im Vergleich zu den sofort nach der Ernte der Hefen bestimmten Werten fiel die Ausbeute nun um etwa 50 % niedriger aus und lag bei $31,7 \text{ g} \pm 1,2 \text{ g}$. Dieser Unterschied entsteht vermutlich durch einen Flüssigkeitsverlust, der auf die Permeabilisierung der Hefemembranen zurückzuführen ist. Ausgelöst wird die Permeabilisierung durch Eiskristalle, die während des Schockgefrierens der Hefen in flüssigem Stickstoff entstehen und die Plasmamembran beschädigen [109]. Werden die Hefen nach dem Auftauen erneut durch Zentrifugation pelletiert, kann die intrazelluläre Flüssigkeit durch die nun durchlässigen Membranen teilweise entweichen, was in der Folge zu einer geringeren Biomasse führt.

Nach der Präparation wurde jede Membranfraktion charakterisiert. Neben dem Proteingehalt wurde auch die apparente P-gp Expressionsrate mit Hilfe des ATPase-Enzymassays (siehe Kapitel 2.5.3) bestimmt. Die Membranpräparationen, die aus den sieben Wachstumsansätzen gewonnen wurden, ließen sich danach in zwei Gruppen aufteilen, die sich in ihrer Expressionsrate signifikant ($P < 0,05$) unterschieden. In Tabelle 3.4 sind einige Parameter der beiden Membranpopulationen und des verwendeten Ausgangsmaterials aufgelistet. In vier der Präparationen wurde nur ein niedriges Expressionsniveau festgestellt. Dieses lag mit durchschnittlich 2,3 % (m/m) noch unter dem Expressionsniveau von Hefen, die in Abwesenheit des chemischen Chaperons Glycerol kultiviert wurden [49]. Die drei weiteren Präparationen zeigten mit durchschnittlich 4 % (m/m) einen höheren P-gp Anteil am Gesamtmembranprotein. Dieser Wert war mit dem Literaturwert ($5,1 \pm 2,2 \text{ % (m/m)}$) vergleichbar [49].

Je nach Expressionsniveau unterschieden sich auch die geerntete Biomasse der für die Präparationen eingesetzten Hefen und die Gesamtproteinausbeute der Präparationen signifikant voneinander. Nicht signifikant unterschiedlich waren hingegen die letzte bestimmte Zelldichte der Kulturen bei der Ernte (OD_{600} Ernte) oder die Biomasse nach dem erneuten Pelletieren der aufgetauten Hefen. Die Massenunterschiede bei der

Tab. 3.4: Zusammenhang der P-gp Expressionsrate in Hefemembranen mit den bestimmten Parametern. Bei den angegebenen Werten handelt es sich um Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. (* = Werte signifikant verschieden, $P < 0,05$)

Parameter	Expressionsrate	
	hoch (n=3)	niedrig (n=4)
OD ₆₀₀ Ernte	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,3
Biomasse [g]		
geerntet *	56,3 ± 0,6	64,0 ± 3,5
permeabilisiert	31,1 ± 0,5	32,1 ± 0,8
Gesamtproteinausbeute [mg] *	609,6 ± 11,9	743,1 ± 69,8
Expressionsrate [% (m/m)] *	4,0 ± 0,1	2,3 ± 0,1

Ernte können also nicht auf unterschiedlichen Zelldichten der Kulturen beruhen und wurden daher auf unterschiedliche Zellvolumina zurückgeführt. Demnach wäre die höhere Masse der Zellen mit niedrigeren Expressionsraten vor allem auf den Anstieg des Volumens der intrazellulären Flüssigkeit zurückzuführen. Bekräftigt wird dies durch die ähnlichen Biomassen, die nach der Permeabilisierung der Membran durch das Schockgefrieren der Hefen in flüssigem Stickstoff beobachtet wurden. Der damit verbundene Verlust intrazellulärer Flüssigkeit führte bei der erneuten Bestimmung der Biomasse zu nicht signifikant unterschiedlichen Werten. Zukünftig wäre es daher wünschenswert, auch die Größe der Hefen als Standardparameter zu protokollieren. Auf diese Weise könnten möglicherweise schon während der Kultivierung Rückschlüsse auf den P-gp Expressionsstatus der Kultur gezogen werden. Diese Bestimmung wäre bei Verwendung einer geeigneten Messkapillare mit dem Casy TT Zellzähler einfach durchführbar.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass alle Kulturen aus einer klonalen Glycerol-Stammkultur gewonnen wurden, überrascht die Isolierung von Populationen mit derart gravierenden Unterschieden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist eine toxische Wirkung des rekombinanten Proteins auf die Hefen. Diese Toxizität geht oft mit einer Erhöhung der Verdopplungszeit einher [110]. Untransformierte BJ5457 Hefen verdoppeln sich etwa alle 2,6 h. Wird dieser Stamm mit dem Leerplasmid YEplac181 transformiert, verlangsamt sich die Verdopplungszeit auf 3,8 h [49]. Bei dem P-gp exprimierenden Stamm BJ5457 RAF#13 verdoppelt sich die Zellzahl hingegen nur etwa alle 5,5 h. Aufgrund dieser Daten ist eine toxische Wirkung des

rekombinanten P-gps wahrscheinlich. Als Mechanismus für diese Toxizität wird für Membranproteine allgemein die Einlagerung in intrazelluläre Membranen und die damit verbundene Zerstörung der Membranstruktur diskutiert [110]. In diesem Zusammenhang wurde auch eine verringerte Lebensfähigkeit von Membranprotein exprimierenden Hefen in Glycerol-Stammkulturen beobachtet. Es ist also vorstellbar, dass Hefen mit niedrigeren P-gp Expressionsleveln Vorteile bezüglich ihres Wachstums und ihrer Überlebensfähigkeit haben. Dieser Vorteil wird durch die vorliegenden Daten tendenziell bestätigt. So wurde bei vier der insgesamt sieben durchgeführten BJ5457 RAF#13 Kultivierungen eine verminderte Expression beobachtet.

3.2.3 Schlussfolgerungen

Die Kultivierung des *S. cerevisiae*-Stamms BJ5457 RAF#13 gelang unter den beschriebenen Bedingungen. Aus der erhaltenen Biomasse wurde eine P-gp-haltige Membranfraktion präpariert. Die Charakterisierung der resultierenden Membranfraktionen ergab signifikante Unterschiede in Bezug auf die apparente P-gp Expressionsrate und die Gesamtproteinausbeute. Diese Beobachtung führte zur Differenzierung von zwei Gruppen von Membranpräparationen. Eine Gruppe zeigte hohe Gesamtproteinausbeuten bei gleichzeitig niedriger P-gp Expression, bei der zweiten Gruppe wurden gegenteilige Beobachtungen gemacht. Die genauere Untersuchung der bestimmten Parameter lieferte schließlich Hinweise auf einen indirekt proportionalen Zusammenhang zwischen Zellgröße und Expressionsrate. Daher wurde die Einführung der Zellgröße als zusätzlicher Kulturparameter vorgeschlagen.

3.3 Aufreinigung von rekombinantem P-Glykoprotein aus Hefemembranen

3.3.1 Aufreinigung und Rekonstitution

Nach der Präparation der Hefemembranen erfolgte die Aufreinigung des rekombinanten P-gps mit Hilfe der Nickelaffinitätschromatografie. Das aufgereinigte Membranprotein wurde schließlich durch Dialyse in Liposomen rekonstituiert. Die entsprechenden Techniken sind in Kapitel 2.4 beschrieben.

In Tabelle 3.5 sind die Parameter zur Charakterisierung von vier erfolgreich durchgeführten Aufreinigungen zusammengestellt. Eingesetzt wurden jeweils zwei Membranpräparationen mit einem niedrigen P-gp Anteil für die Aufreinigungen A und B sowie zwei Membranpräparationen mit hohem P-gp Anteil für die Aufreinigungen C und D. Anhand der Tabelle wird deutlich, dass eine geringe P-gp Menge durch niedrige Expressionsraten nicht durch die erhöhte Gesamtproteinausbeute (vergleiche Kapitel 3.2.2) ausgeglichen werden kann. So zeigte Membranpräparation D die höchsten Expressionsrate und enthielt knapp 38 % mehr P-gp als die Präparation B, die über den niedrigsten relativen P-gp Anteil verfügte. Im Gegensatz dazu lag die Gesamtproteinausbeute der Präparation D im direkten Vergleich fast 23 % niedriger.

Tab. 3.5: Parameter zur Charakterisierung der verschiedenen P-gp Präparationen aus Hefemembranen. Der relative P-gp Anteil bezieht sich auf die eingesetzte Gesamtproteinmenge, während sich die relative P-gp Ausbeute auf die gesamte eingesetzte P-gp Menge bezieht.

Parameter	Präparation			
	A	B	C	D
Membranpräparation				
Gesamtprotein (mg)	707	804	602	623
P-gp Anteil, absolut (mg)	20,5	18,5	23,5	25,5
P-gp Anteil, relativ (% (m/m))	2,9	2,3	3,9	4,1
Detergenz	TDOC	TDOC	LPC	LPC
Lipidkonzentration (% (m/V))	0,1	0,4	0,4	0,4
Ausbeute P-gp				
absolut (mg)	1,0	0,8	2,4	2,6
relativ (% (m/m))	4,9	3,9	10,2	10,1
Konzentration (mg/ml)	0,45	0,30	0,83	0,97

Wird bei zwei Aufreinigungen das gleiche Detergenz verwendet, bleibt das Massenverhältnis des eingesetzten P-gps im Verlauf der Aufreinigung in etwa erhalten. So lag dieses Verhältnis zu Beginn der Aufreinigungen A und B bei 1,11 : 1 und nach Abschluss der Rekonstitution bei 1,25 : 1. Der Einsatz unterschiedlicher Lipidkonzentrationen hatte dabei keinen Einfluss auf die P-gp Ausbeute. Analog dazu wurden für die Aufreinigungen C und D Massenverhältnisse von 1 : 1,09 zu Beginn und 1 : 1,08 nach der Rekonstitution beobachtet. Werden jedoch zwei Aufreinigungen verglichen, die unter ansonsten gleichen Bedingungen mit unterschiedlichen Detergenzien durchgeführt wurden, so fällt die Ausbeute bei Solubilisierung mit LPC überproportional höher aus. So lag das Massenverhältnis vor der Solubilisierung in den Aufreinigungen B und D bei 1 : 1,38, nach der Rekonstitution hingegen bei 1 : 3,25. Es stellt sich also die Frage, worauf diese Beobachtungen zurückzuführen sind. Prinzipiell bieten sich zwei Möglichkeiten an: Zum Einen ist ein nichtlinearer Zusammenhang zwischen eingesetzter P-gp Menge und der Ausbeute bei der Aufreinigung denkbar, zum Anderen kann die Auswahl des Detergenz' die Ausbeute beeinflussen.

Die Aufreinigung mit Hilfe der Nickelaffinitätschromatografie beruht auf der spezifischen Wechselwirkung zwischen den immobilisierten Nickelkationen und dem Polyhistidin-Schwanz des Proteins. Die theoretischen Grundlagen entsprechen denen der Radioligandbindungsexperimente (vergleiche Kapitel 2.7). Dies bedeutet, dass unterhalb der Gleichgewichtsbindungskonstanten K_D der Anteil an gebundenem Protein mit steigender Proteinkonzentration linear zunimmt. Bei der Nickelaffinitätschromatografie liegen die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Proteine in einem Konzentrationsbereich von $K_D = 1 \mu\text{mol/l}$ bis $K_D = 10 \mu\text{mol/l}$ [54, 111]. Für die Aufreinigung wurde stets eine Membranproteinkonzentration von 2 mg/ml eingestellt. Der P-gp Anteil am Gesamtprotein betrug maximal 4,1 % (m/m). Unter der Annahme einer vollständigen Solubilisierung und bei einem geschätzten Molekulargewicht von 140 000 g/mol für P-gp wäre auf diese Weise eine maximale P-gp-Konzentration von etwa 0,6 $\mu\text{mol/l}$ möglich. Da diese Konzentration unterhalb der genannten K_D -Werte liegt, sollte die Ausbeute proportional mit den eingesetzten P-gp Mengen ansteigen. Die unterschiedlichen P-gp Ausbeuten sind also nach diesen Überlegungen nicht auf einen nichtlinearen Zusammenhang zwischen eingesetzter P-gp Menge und der Ausbeute bei der Aufreinigung zurückzuführen.

Für die Solubilisierung der Membranproteine wurden zwei verschiedene Detergenzien verwendet. Neben dem in der Originalarbeit [49] verwendeten LPC wurde aus

Kostengründen auch das preiswertere TDOC eingesetzt. Die beiden Detergenzien unterscheiden sich erheblich in ihren Eigenschaften. So handelt es sich bei TDOC um ein anionisches Detergenz mit einer kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) von 2–6 mmol/l [112], während LPC zwitterionische Eigenschaften besitzt und über eine CMC von 4 $\mu\text{mol/l}$ verfügt [113]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass TDOC Membranen aus Ergosterol-defizienten Hefestämmen ähnlich effizient solubilisieren kann wie LPC [114]. Allerdings sind Ergosterol-haltige Membranen, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, aufgrund ihrer höheren Rigidität schwerer zu solubilisieren [114]. Der Grund für die geringen P-gp Ausbeuten bei der Verwendung von TDOC könnte daher die unvollständige Solubilisation der eingesetzten Membranpräparationen durch das Detergenz sein. Demnach ist also der Einsatz unterschiedlicher Detergenzien zur Solubilisation der Membranen als Ursache für die beobachteten Differenzen bei der Ausbeute wahrscheinlich.

Durch den Einsatz unterschiedlicher Lipidkonzentrationen bei der Rekonstitution kann der Anteil der extraliposomalen Nukleotidbindungsstellen beeinflusst werden. Bei niedrigen Lipidkonzentrationen bilden sich während der Dialyse kleinere Liposomen [115]. Diese können die voluminösen Nukleotidbindungsdomänen des ABC-Transporters nicht aufnehmen, was in der Folge bevorzugt zu einer extraliposomalen Orientierung führt [26]. Das Verhältnis von nach innen zu nach außen gerichteten Nukleotidbindungsdomänen kann mit dem ATPase-Assay (siehe Kapitel 2.5.5) und dem Detergenz CHAPS bestimmt werden. In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse eines solchen Assays für die Aufreinigungen A und B dargestellt. Es ist deutlich zu

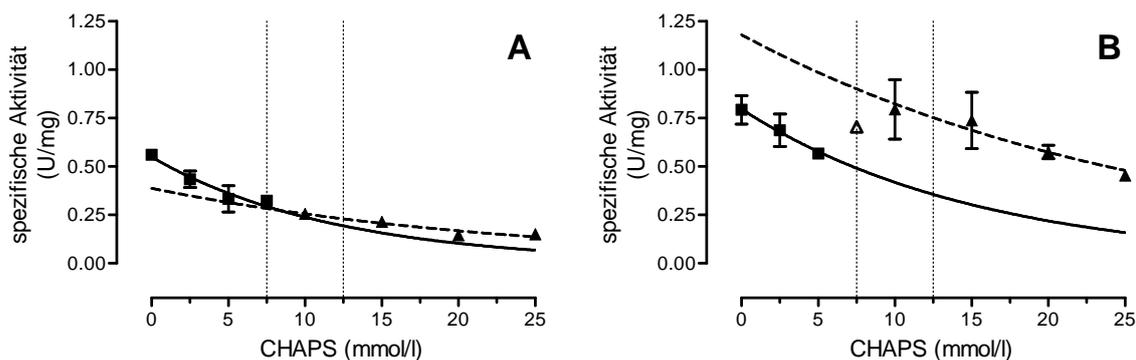


Abb. 3.9: Bestimmung der Ausrichtung von P-gp in Liposomenmembranen mit Hilfe des CHAPS-ATPase-Assays. Aufgetragen ist die gemittelte spezifische ATPase-Aktivität aus Doppelbestimmungen gegen die CHAPS-Konzentration. Abbildung A zeigt das Ergebnis für Aufreinigung A, in Abbildung B analog das Ergebnis für Aufreinigung B dargestellt.

erkennen, dass bei Aufreinigung A auch nach Permeabilisierung der Proteoliposomen kein Anstieg der ATPase-Aktivität im Bereich von 7,5 bis 12,5 mmol/l CHAPS zu beobachten ist. Die Auswertung des Experiments ergab eine hundertprozentige Ausrichtung nach außen. Erfolgt die Rekonstitution in Gegenwart von 0,1 % (m/V) Phospholipid, werden demnach Proteoliposomen erhalten, bei denen das Protein fast vollständig mit nach außen gerichteten Nukleotidbindungsdomänen vorliegt. Dieser Zustand wird auch als „inside-out“-Orientierung bezeichnet.

Im Gegensatz dazu wurde für Aufreinigung B bei Konzentrationen oberhalb von 7,5 mmol/l CHAPS ein deutlicher Anstieg der ATPase-Aktivität beobachtet. Dieser ist auf intraliposomal gelegene ATP-Bindungsdomänen zurückzuführen, die durch die Permeabilisierung der Proteoliposomen zugänglich werden. Der Anteil der extraliposomalen Nukleotidbindungsdomänen betrug bei dieser Aufreinigung 50 %. Ergebnisse in dieser Größenordnung waren typisch für Proteoliposomen, die durch Rekonstitution in Gegenwart einer Lipidkonzentration von 0,4 % (m/V) erhalten werden [114].

3.3.2 Charakterisierung der Proteoliposomen

Die Charakterisierung von aufgereinigtem P-gp erfolgte mit dem ATPase-Assay. Die Kenngrößen wurden bestimmt, wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben, und sind in Tabelle 3.6 aufgeführt. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ist der $K_{M(ATP)}$ -Wert ein Maß für die Affinität von ATP zu P-gp in Anwesenheit von 130 μ mol/l Verapamil. Bei allen vier Aufreinigungen waren dieser und die restlichen Werte mit den Literaturwerten vergleichbar [49, 116]. Der Quotient aus stimulierter und basaler Aktivität ist ein Maß für Güte der Präparation. Je höher dieser Wert liegt, desto genauer lassen sich Unterschiede in der ATPase-Aktivität bei der Charakterisierung

Tab. 3.6: Charakterisierung des aufgereinigten P-gps.

Aktivität	Präparation			
	A	B	C	D
basal (U/mg)	0,16 ± 0,05	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,18 ± 0,05
stimuliert (U/mg)	0,67 ± 0,07	1,04 ± 0,03	1,50 ± 0,05	1,68 ± 0,03
Verhältnis stimuliert : basal	4,2	7,4	10,0	9,3
$K_{M(ATP)}$ (mmol/l)	0,4	1,1	0,8	1,0

neuer Substanzen detektieren. Es zeigt sich, dass bei Verwendung von TDOC als Detergenz (Aufreinigung A und B) das Messfenster geringer ausfällt. Ein Grund für die schlechtere Aktivität ist die teilweise Denaturierung des P-gps während der Solubilisation mit TDOC. Dies führt zu einer Aufreinigung, bei der nur etwa 70 % des Proteins in der aktiven Konformation vorliegen [114].

Für das kleine Messfenster der Aufreinigung A ist jedoch ein weiterer Faktor verantwortlich. So führt eine Lipidkonzentration von 0,1 % (m/V) bei der Rekonstitution nicht nur zur bevorzugten Einlagerung des Proteins in die Liposomenmembran in „inside-out“-Orientierung, sondern auch zu einer Herabsetzung der Rekonstitutionseffizienz [26]. Der Vergleich der spezifischen ATPase-Aktivität sowie der P-gp Ausbeute (siehe Tabelle 3.5) von dieser Präparation und der von Präparation B macht dies deutlich. Obwohl mit Präparation A insgesamt sogar eine etwas höhere P-gp Ausbeute erreicht wurde, ist sie Präparation B hinsichtlich der spezifischen ATPase-Aktivität in Gegenwart von 130 $\mu\text{mol/l}$ Verapamil deutlich unterlegen. Die Rekonstitution in Gegenwart von 0,1 % (m/V) Lipiden geht mit einem Aktivitätsverlust einher, ist also ineffizienter als bei höheren Lipidkonzentrationen.

Die Auswirkung einer Testsubstanz auf die ATPase-Aktivität von P-gp kann mit enzymatisch hochaktivem Protein besonders genau untersucht werden. Der ATPase-Aktivität einer Aufreinigung muss daher, wie auch der Ausbeute, eine große Bedeutung zugemessen werden. Aufgrund der insgesamt überlegenen Aktivität der Aufreinigungen C und D wurden diese zur Erstellung von ATPase-Aktivierungsprofilen für eine Reihe von Testsubstanzen genutzt.

3.3.3 Funktionelle Untersuchungen an aufgereinigtem P-Glykoprotein

Die konzentrationsabhängige Änderung der ATPase-Aktivität von P-gp ist ein Zeichen für die Wechselwirkung der untersuchten Substanz mit dem Protein. Die Erstellung und Analyse eines substanzspezifischen ATPase-Aktivierungsprofils ist in Kapitel 2.5.6 beschrieben.

Auf diese Weise generierte Konzentrations-Effekt-Kurven haben typischerweise ein glockenförmiges Aussehen und werden in drei Phasen unterteilt. In Abbildung 3.10 sind die ATPase-Aktivierungsprofile für vier unterschiedliche Substanzen dargestellt.

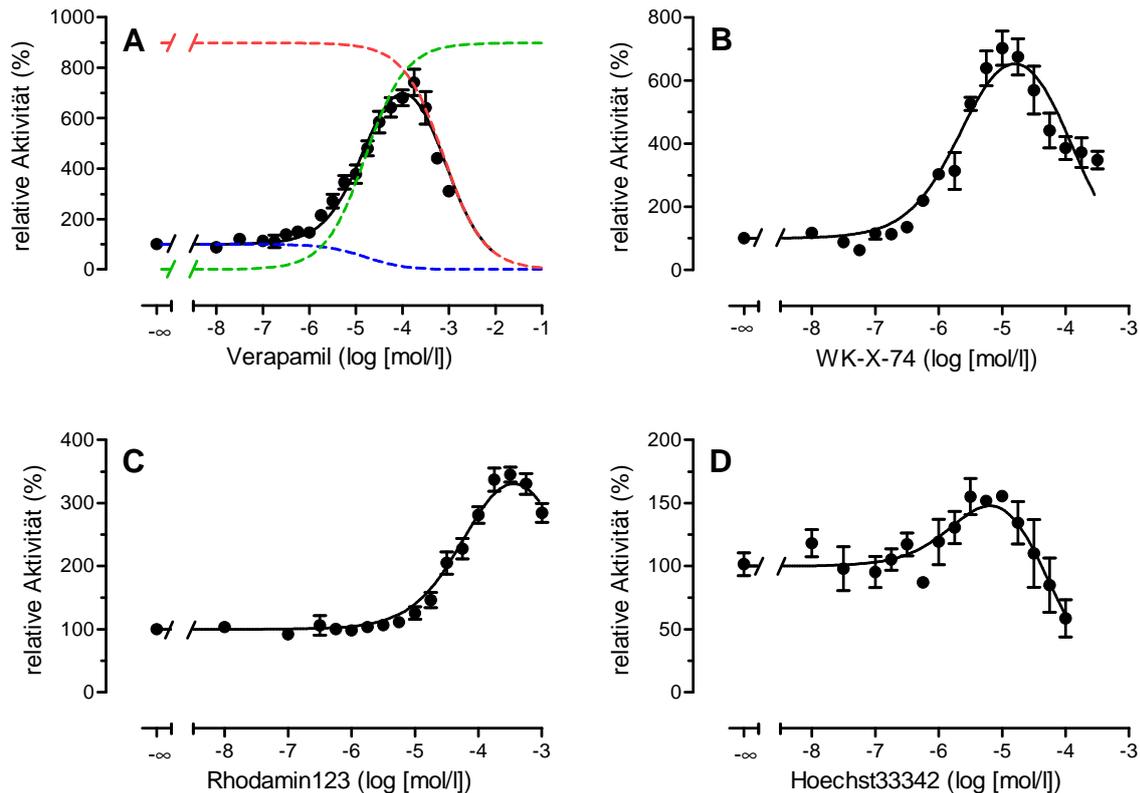


Abb. 3.10: Typische ATPase-Aktivierungsprofile am Beispiel vier strukturell unterschiedlicher Substanzen. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardfehler der Messwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Abbildung A zeigt neben dem Graphen für die Gesamtaktivität (schwarz) zusätzlich die Graphen der zugrundeliegenden Teilfunktionen. In Blau ist der Anteil der basalen ATPase-Aktivität abgebildet. Die Aktivierung der ATP-Hydrolyse durch Verapamil ist in grün, die bei hohen Konzentrationen beobachtete Inhibition der ATPase-Aktivität in rot dargestellt.

Abbildung 3.10 A zeigt zusätzlich die Anteile der einzelnen Phasen an der Gesamtaktivität. In der ersten Phase wird nur die basale ATPase-Aktivität B gemessen. Dieser Abschnitt entspricht dem Protein im Ruhezustand. Al-Shawi et al. [26] konnten zeigen, dass sich der Mechanismus der ATP-Hydrolyse in dieser Phase thermodynamisch vom Mechanismus im aktivierten Zustand unterscheidet. Wird die Substanzkonzentration weiter erhöht, erfolgt der Übergang in Phase zwei. Die Bindung der Substanz an den Transporter führt zum Anstieg der ATPase-Aktivität bis schließlich die maximale ATPase-Aktivität D erreicht wird. Die Substanzkonzentration, die eine halbmaximale Aktivierung des Transporters bewirkt, wird als apparente Michaeliskonstante $pK_{m(D)}$ bezeichnet und ist ein Maß für die Affinität einer Substanz zu dem Protein. Parallel mit dem Anstieg der substanzvermittelten ATPase-Aktivität nimmt die basale Aktivität kontinuierlich ab und kommt schließlich

völlig zum Erliegen. Im dritten Abschnitt der Kurve wird schließlich eine Inhibierung der ATPase-Aktivität beobachtet, welche durch die Inhibitionskonstanten pK_i und erneut die maximale ATPase-Aktivität D beschrieben wird. Mechanistisch wird hier die Bindung der Substanz an niedrigaffine Bindungsstellen diskutiert, die durch eine Konformationsänderung des Proteins während des Transportvorgangs zugänglich werden [117, 118]. Durch die nun schwächeren Wechselwirkungen kann das transportierte Molekül von dort in das extrazelluläre Medium dissoziieren. Erst danach kann das P-gp-Molekül durch eine erneute Konformationsänderung in seine aktive Konformation zurückkehren und den katalytischen Zyklus erneut durchlaufen [26]. Bei höheren Konzentrationen erfolgt vermehrt auch eine Bindung der Testsubstanz an diese Bindungsstelle. Dies verhindert die Rückkehr des Proteins in die aktive Konformation und führt somit letztendlich zur Inhibierung der ATPase-Aktivität.

Nach der verwendeten Gleichung (siehe Kapitel 2.5.6, Gleichung (6)) müsste die ATPase-Aktivität bei sehr hohen Substanzkonzentrationen letztlich völlig inhibiert werden. In der Praxis ist die Untersuchung der Inhibitionsphase aufgrund der nötigen hohen Substanzkonzentrationen und der damit verbundenen Löslichkeitsprobleme generell schwierig. Die unvollständige Inhibierung der ATPase-Aktivität bei hohen Konzentrationen der Substanz WK-X-74 (siehe Abbildung 3.10 B) deutet beispielsweise auf die Präzipitation der Substanz hin, obwohl diese makroskopisch nicht feststellbar war. Weiterhin wird am Beispiel des Aktivierungsprofils von Rhodamin 123 in Abbildung 3.10 C deutlich, dass der zur Charakterisierung der ATPase-Inhibition verwendete pK_i -Wert oft nur durch Interpolation gewonnen werden kann und somit fehlerbehaftet ist.

Für das bekannte P-gp Substrat Hoechst 33342 sind in der Literatur widersprüchliche Eigenschaften beschrieben. So wird es zwar durch P-gp aktiv aus Zellen heraus transportiert und kann aufgrund seiner Eigenfluoreszenz für funktionelle Tests genutzt werden [119], jedoch wurde nach Kenntnisstand des Autors bisher nur eine Inhibierung der ATPase-Aktivität beschrieben [26, 120]. Der Transport eines Substrats sollte aber nach Polli et al. [44] mit einer Aktivierung der ATPase-Aktivität einhergehen. Diese Stimulation der ATP-Hydrolyse konnte an aufgereinigtem P-gp nun nachgewiesen werden. In Abbildung 3.10 D ist das resultierende Aktivierungsprofil für Hoechst 33342 aufgeführt. Diese Bestimmung war nur durch die hohe Aktivität der verwendeten Präparation möglich. Die abgebildeten Standardfehler der Messwerte machen deutlich, dass die Erstellung des Aktivierungsprofils für Hoechst 33342 an

der Grenze der Durchführbarkeit lag. Es ist somit nicht verwunderlich, wenn die Aktivierung bei Testsystemen mit einem kleineren Messfenster nicht mehr gemessen werden kann und scheinbar nur eine Inhibierung beobachtet wird. Somit zeigt das hier etablierte System klare Vorteile gegenüber Systemen, die beispielsweise auf Zellmembranpräparationen beruhen.

Im Laufe dieser Arbeit wurden für eine Reihe bekannter und neuer P-gp Substrate und Modulatoren weitere ATPase-Aktivierungsprofile erstellt. In Tabelle 3.7 sind die Ergebnisse aller durchgeführten Versuche zusammengefasst. Durch die bereits diskutierte schlechte Abdeckung der Inhibitionsphase kam es bei der Auswertung der Daten mit der nichtlinearen Regression häufig zu unrealistisch hohen D -Werten. Diesen Artefakten wurde daher durch die Einschränkung des D -Werts auf Werte zwischen 0 und dem 1,25fachen der maximal ermittelten Aktivität vorgebeugt. War dieser vorgegebene Maximalwert Ergebnis der Regressionsanalyse, wurde in der Tabelle kein Standardfehler angegeben. Diese Werte entsprechen nicht der tatsächlichen maximalen Stimulation und können daher nur als Richtwerte zum Vergleich unterschiedlicher Substanzen dienen.

Die Inhibitionskonstante pK_i deckt mit Werten zwischen 2,39 und 4,35 im Vergleich zur apparenten Michaeliskonstanten $pK_{m(D)}$ nur einen kleinen Konzentrationsbereich ab. Eine Beziehung zwischen diesen beiden Werten wurde nicht beobachtet. Auch für die maximale ATPase-Aktivität D wurde kein direkter Zusammenhang mit den beiden anderen Konstanten registriert. Zwar sind alle drei Konstanten für die vollständige Beschreibung eines Aktivierungsprofils nötig, jedoch sind aufgrund der beschriebenen Ungenauigkeiten die Inhibitionskonstante und die maximale ATPase-Aktivität nur bedingt zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen geeignet. Vergleiche und weiterführende Untersuchungen wurden daher anhand der apparenten Michaeliskonstanten der Substanzen vollzogen.

Grundsätzlich lassen sich die in Tabelle 3.7 aufgelisteten Substrate und Modulatoren in zwei Gruppen aufteilen. Während die eine Gruppe mit den WK-X- und XR-Verbindungen strukturell eng verwandte Substanzen beinhaltet, umfasst die andere Gruppe Substanzen, die sich vor allem durch strukturelle Diversität auszeichnen. Ausnahmen bilden die Substanzpaare H15 und H19 sowie Hoechst 33342 und Hoechst 33258. Die $pK_{m(D)}$ -Werte der meisten Substanzen in der letztgenannten Gruppe bewegen sich im Bereich zwischen vier und fünf, was einer nur mäßigen Affinität im mittleren bis hohen mikromolaren Konzentrationsbereich entspricht. Nur Vinblastin zeigt mit

Tab. 3.7: Charakterisierung bekannter P-gp Substrate und Modulatoren durch ihre ATPase-Aktivierungsprofile. Die Daten von mindestens zwei unabhängigen Experimenten wurden zusammengefasst und mit der nichtlinearen Regression analysiert. Tabelliert sind die Ergebnisse der Analyse und ihre Standardfehler. Ist für einen D -Wert kein Standardfehler angegeben, wurde der angegebene Wert in der Analyse als Konstante festgesetzt und entspricht 125% der maximalen ATPase-Aktivität.

Substanz	$\text{pK}_{m(D)}$	pK_i	D	n
Diltiazem	$4,24 \pm 0,06$	$2,67 \pm 0,10$	760	2
H15	$4,88 \pm 0,09$	$3,65 \pm 0,08$	381	4
H19	$4,83 \pm 0,15$	$3,44 \pm 0,15$	330	2
Hoechst 33258	$4,94 \pm 0,07$	$3,65 \pm 0,04$	200	4
Hoechst 33342	$5,49 \pm 0,14$	$4,35 \pm 0,08$	205	3
Nicardipin	$5,51 \pm 0,05$	$3,70 \pm 0,07$	523	4
Progesteron	$4,26 \pm 0,09$	$2,39 \pm 0,51$	705	6
Rhodamin 123	$4,14 \pm 0,03$	$2,58 \pm 0,05$	431	7
Verapamil	$4,79 \pm 0,04$	$3,11 \pm 0,06$	897 ± 35	3
Vinblastin	$6,34 \pm 0,08$	$4,22 \pm 0,06$	355 ± 14	3
WK-X-14	$4,73 \pm 0,08$	$3,11 \pm 0,22$	829	2
WK-X-15	$4,61 \pm 0,10$	$3,08 \pm 0,19$	993	3
WK-X-16	$4,96 \pm 0,05$	$3,17 \pm 0,09$	586	2
WK-X-17	$4,95 \pm 0,09$	$3,51 \pm 0,11$	785	3
WK-X-34	$7,32 \pm 0,07$	$3,41 \pm 0,13$	217 ± 3	2
WK-X-35	$6,35 \pm 0,05$	$3,14 \pm 0,07$	473 ± 9	2
WK-X-38	$6,25 \pm 0,04$	$3,38 \pm 0,05$	399 ± 7	2
WK-X-46	$5,32 \pm 0,07$	$3,57 \pm 0,12$	699	2
WK-X-48	$4,41 \pm 0,08$	$2,45 \pm 0,48$	916	3
WK-X-51	$5,69 \pm 0,06$	$4,10 \pm 0,06$	726	2
WK-X-52	$5,77 \pm 0,09$	$4,26 \pm 0,09$	611 ± 46	2
WK-X-74	$5,59 \pm 0,08$	$3,95 \pm 0,07$	850 ± 53	2
WK-X-76	$4,49 \pm 0,06$	$3,01 \pm 0,14$	833	3
WK-X-78	$6,25 \pm 0,06$	$3,80 \pm 0,05$	631 ± 19	2
WK-X-81	$6,13 \pm 0,05$	$3,11 \pm 0,21$	591 ± 17	2
WK-X-83	$6,76 \pm 0,09$	$4,11 \pm 0,08$	496 ± 19	2
XR9476	$6,66 \pm 0,08$	$2,72 \pm 0,20$	187 ± 3	3
XR9577	$6,73 \pm 0,04$	$2,60 \pm 0,31$	245 ± 3	2

einem $\text{pK}_{m(D)}$ -Wert von 6,34 eine halbmaximale Stimulation der ATPase-Aktivität bei submikromolaren Konzentrationen. Bei den Substanzpaaren H15 und H19 sowie Hoechst 33342 und Hoechst 33258 ist der Einfluss der strukturellen Veränderungen auf die biologische Aktivität unterschiedlich ausgeprägt. Während die Erweiterung des Linkers um eine zusätzliche Methylengruppe in H15 keine Auswirkung auf den $\text{pK}_{m(D)}$ -Wert hat, bewirkt die Überführung der phenolischen OH-Gruppe von

Hoechst 33258 in die neutrale Ethylenoxy-Gruppe von Hoechst 33342 eine Anhebung des $pK_{m(D)}$ -Wertes um mehr als eine halbe log-Einheit.

Die Substanzen XR9476 und XR9577 gehören zu den potenten P-gp Modulatoren der dritten Generation [90]. Sie sind strukturell verwandt mit der Substanz Tariquidar (XR9576), die als Leitstruktur für die Synthese der WK-X-Verbindungen diente [89]. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die $pK_{m(D)}$ -Werte in dieser Gruppe insgesamt höher ausfallen. Mehrere Substanzen zeigten Affinitäten im submikromolaren Bereich, wobei WK-X-34 mit einem $pK_{m(D)}$ -Wert von 7,32 die affinste Substanz war. Aufgrund der strukturellen Gemeinsamkeiten konnten die für diese Substanzen gewonnenen Affinitätsdaten für eine detaillierte 3D-QSAR Analyse herangezogen werden. Die Ergebnisse dieser Analyse werden in Kapitel 3.4.1 vorgestellt und diskutiert.

Zur weiteren Absicherung der Validität der Ergebnisse wurden die $pK_{m(D)}$ -Werte der Substanzen Nicardipin, Rhodamin 123, Verapamil und Vinblastin mit den von Kimura et al. [121] ermittelten K_M -Werten verglichen. Wie in Abbildung 3.11 A dargestellt, wurde eine gute Korrelation zwischen den Daten beobachtet. Die Eignung des etablierten ATPase-Assays für funktionelle Untersuchungen an P-gp wurde

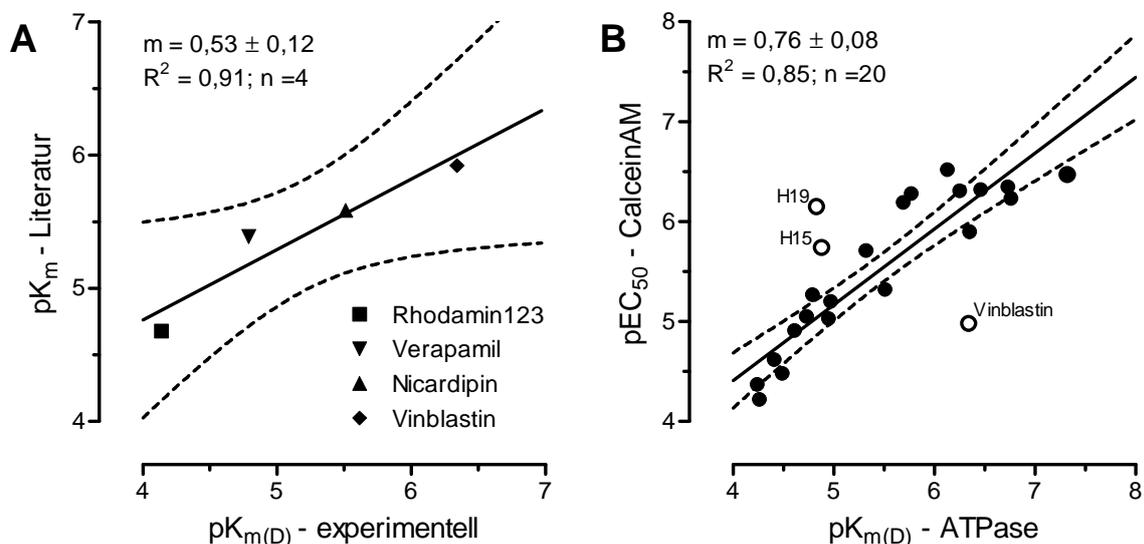


Abb. 3.11: Korrelation der experimentell bestimmten $pK_{m(D)}$ -Werte mit Literaturdaten. Abbildung A zeigt die Korrelation der $pK_{m(D)}$ -Werte von vier charakterisierten Substanzen mit Literaturdaten [121]. Die Substanzen sind in der Legende nach aufsteigender Affinität geordnet. Abbildung B zeigt die Korrelation mit Daten, die mit Hilfe des Calcein-AM Transportassays erhoben wurden [58]. Die Substanzen H15, H19 und Vinblastin (offene Kreissymbole) wurden bei der Analyse nicht berücksichtigt.

so weiter untermauert. Zusätzlich korrelierten die $pK_{m(D)}$ -Werte gut mit pEC_{50} -Werten aus dem Calcein-AM Transportassay [58]. Jedoch unterschieden sich die Ergebnisse für einige Substanzen je nach Testsystem deutlich voneinander. So zeigte Vinblastin im Calcein-AM Transportassay eine im Vergleich zum ATPase-Assay deutlich herabgesetzte Affinität. Für die Phenothiazine H15 und H19 wurde hingegen im ATPase-Assay eine deutlich niedrigere Affinität beobachtet. In Anwesenheit aller Substanzen ergab sich eine signifikante Korrelation mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,62$. Wurden die drei genannten Substanzen von der Analyse ausgeschlossen stieg das Bestimmtheitsmaß auf $R^2 = 0,85$. In Abbildung 3.11 B ist dieses Ergebnis grafisch dargestellt.

Ein systematischer Vergleich mehrerer Testsysteme zur Untersuchung der P-gp Funktion führte zu folgenden Ergebnissen: Funktionelle Daten aus Transportassays, die auf der Inhibition des Transports einer Markersubstanz durch die Testsubstanz beruhten, wiesen eine hohe Interkorrelation auf [119]. Wurden hingegen die Ergebnisse solcher Transportassays mit denen des ATPase-Assays verglichen wurde keine Korrelation beobachtet [119]. Die beobachtete Korrelation steht also im Widerspruch zu bisherigen Ergebnissen.

Der Grund für diese Diskrepanz liegt vermutlich in den Testsystemen selbst. Für den Calcein-AM Transportassay werden ganze Zellen verwendet. P-Glykoprotein ist in der Plasmamembran dieser Zellen lokalisiert, wobei die Nukleotidbindungsdomänen im Cytoplasma der Zelle liegen. Nach derzeitigem Kenntnisstand befinden sich die Bindungsstellen für die Substrate und Modulatoren in der dem Cytoplasma zugewandten Seite der Plasmamembran oder im Übergangsbereich zwischen Cytoplasma und Plasmamembran. Bevor eine Substanz mit P-Glykoprotein interagieren kann, muss sie daher den hydrophoben Kernbereich der Membran durch passive Diffusion überwinden [122]. Die Geschwindigkeit, mit der dieser Vorgang abläuft, ist dabei u. a. abhängig von der Lipophilie einer Substanz und ihrer Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit den Lipiden der Plasmamembran [123]. Auch die Acidität bzw. Basizität einer Substanz und die damit einhergehende partielle Ionisierung in wässriger Lösung spielen eine wichtige Rolle für die Geschwindigkeit der passiven Diffusion [122]. Hat die Substanz die Plasmamembran überwunden, kann sie entweder durch passive Diffusion oder durch den P-gp vermittelten aktiven Transport erneut aus der Zelle geschleust werden [58, 122]. Nach einiger Zeit wird ein Gleichgewichtszustand erreicht, in dem die Influx- gleich der Effluxgeschwindigkeit ist. Unter diesen

„steady-state“-Bedingungen bleiben die extrazelluläre Substratkonzentration c_{out} und die Substratkonzentration im Cytosol c_{in} scheinbar konstant. Der Zusammenhang zwischen diesen Konzentrationen und der Geschwindigkeitskonstanten des P-gp-vermittelten Transports $k_{\text{P-gp}}$ sowie der Geschwindigkeitskonstanten der passiven Diffusion k_{Diff} werden anhand folgender Gleichung ersichtlich [58]:

$$\frac{c_{\text{out}}}{c_{\text{in}}} = 1 + \frac{k_{\text{P-gp}}}{k_{\text{Diff}}}$$

Demnach steigt die Konzentration c_{in} proportional mit k_{Diff} . Im Gegensatz dazu besteht zu der Geschwindigkeitskonstanten des P-gp vermittelten Transports eine indirekt proportionale Beziehung. Mit anderen Worten: Bei Substanzen die sehr schnell durch die Membran diffundieren ($k_{\text{Diff}} > k_{\text{P-gp}}$) kann das Konzentrationsgefälle zwischen extrazellulärer und intrazellulärer Umgebung nicht aufrecht erhalten werden und die Konzentrationen gleichen sich an. Nach Eytan et al. [43] zeigen beispielsweise Verapamil und Chinidin, als typische MDR-Modulatoren, eine sehr hohe Diffusionsgeschwindigkeit. Andererseits verschiebt sich das Gleichgewicht bei Substanzen, die nur langsam die Membran überwinden ($k_{\text{Diff}} < k_{\text{P-gp}}$), zugunsten der extrazellulären Konzentration. Diese Eigenschaften sind nach Eytan et al. [43] typische Eigenschaften von P-gp Substraten.

In diesem Zusammenhang ergaben Zytotoxizitätsuntersuchungen an P-gp exprimierenden Zellen mit einer Reihe von Anthrazyklin-Derivaten, dass die Zellen gegen Derivate, die schnell in die Zellen diffundierten, nur eine geringe Resistenz aufwiesen [122]. Dabei zeigten alle Derivate an der P-gp freien Kontrollzelllinie eine ähnliche Zytoxizität und auch die Geschwindigkeitskonstanten des P-gp-vermittelten Transports waren ähnlich. Die Autoren zogen den Schluss, dass die Transportkapazität von P-gp nicht zu einer hinlänglichen Reduktion des Einstroms der schnell diffundierenden Derivate ausreichte.

Grundlage des Calcein-AM Transportassays ist die Konkurrenz einer Testsubstanz mit dem Substrat Calcein-AM um die P-gp Funktion. Wird eine Testsubstanz ebenfalls durch P-gp aktiv aus der Zelle transportiert, gelten für diese die zuvor dargestellten Zusammenhänge. D. h. die Inhibierung des P-gp vermittelten Calcein-AM Transports ist nicht nur abhängig von der Affinität einer Substanz zu P-gp, sondern auch von der Geschwindigkeit, mit der diese Substanz die Zellmembran durch passive Diffusion überwinden kann. Im Gegensatz dazu erfolgt die Bestimmung eines ATPase-Aktivierungsprofils an P-gp Molekülen, die in Proteoliposomen

in „inside-out“-Orientierung vorliegen (siehe Kapitel 3.3.1). Die Bindungsbereiche, die im Calcein-AM Transportassay intrazellulär liegen und erst nach der passiven Diffusion durch die Plasmamembran von der Testsubstanz erreicht werden können, sind nun zugänglich, ohne das zuvor der hydrophobe Kernbereich der Phospholipiddoppelschicht überwunden werden muss. Funktionelle Daten aus dem ATPase-Assay werden folglich nicht durch die Geschwindigkeitskonstante der passiven Diffusion k_{Diff} beeinflusst. Mit dem Calcein-AM Transportassay wurde beispielsweise für Vinblastin ein pEC_{50} -Wert von 4,98 bestimmt. Der $\text{pK}_{m(D)}$ -Wert betrug hingegen 6,34. Im ATPase-Assay wird also schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen ein Effekt beobachtet. Vinblastin ist ein bekanntes P-gp Substrat und diffundiert nach Eytan et al. [124] eher langsam durch die Membran. Die Konzentration, die für eine halbmaximale Stimulation der ATPase-Aktivität durch Calcein-AM ($\text{pK}_{m(D)} = 6,30$, [125]) nötig ist, ist mit der von Vinblastin vergleichbar. Die Diffusion durch die Membran erfolgt hingegen mit hoher Geschwindigkeit [126]. Für eine erfolgreiche Konkurrenz mit Calcein-AM muss daher eine höhere Vinblastin-Konzentration eingesetzt werden.

Die Korrelation der ATPase-Assay Daten mit den Calcein-AM Transportassay Daten, die in dieser Arbeit beobachtet wurde und im Widerspruch zur Literatur steht, kann so ebenfalls erklärt werden. Wie bereits erwähnt, wird die Geschwindigkeit, mit der eine Substanz durch die Phospholipiddoppelschicht diffundiert, von verschiedenen Parametern, wie z. B. Basizität und der Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken, beeinflusst. Besonders große Unterschiede in den Diffusionseigenschaften sind daher bei strukturell sehr unterschiedlichen Substanzen zu erwarten. Weisen Substanzen jedoch nur geringe strukturelle Unterschiede auf, so sind wahrscheinlich nur geringe Änderungen der Diffusionsgeschwindigkeit die Folge. Daher wird mit einem Datensatz mit strukturell sehr unterschiedlichen Substanzen, wie dem von Litman et al. [127], keine Korrelation der Daten aus den beiden Testsystemen beobachtet. Zeigen die Substanzen des Datensatzes jedoch starke strukturelle Übereinstimmung, wie in dieser Arbeit, kann durchaus eine Korrelation beobachtet werden. Gestützt wird diese These durch das folgende Ergebnis: Wird der vorliegende Datensatz in eine Gruppe mit strukturell unterschiedlichen Substanzen und eine Gruppe mit strukturell verwandten Substanzen aufgeteilt, ergibt sich keine Korrelation für die Daten der ersten Gruppe ($R^2 = 0,08$; $n = 7$), jedoch eine gute Korrelation für die Daten der zweiten Gruppe ($R^2 = 0,82$; $n = 16$).

Funktionelle Daten, die mit den beiden unterschiedlichen Testsystemen gewonnen werden, können deutliche Unterschiede aufweisen. Während mit dem Calcein-AM Transportassay die Eignung einer Testsubstanz zur Inhibierung des P-gp-vermittelten Calcein-AM Transports untersucht werden kann, liefert der ATPase-Assay eher ein Maß für die Affinität der Substanz zu dem Transportprotein (siehe auch Kapitel 3.5.3). Nach Polli et al. [44] kann die Kombination der beiden Testsysteme zur funktionellen Kategorisierung einer Testsubstanz angewendet werden. Die Testsysteme ergänzen sich somit sinnvoll. Ein reiner Inhibitor der P-gp Funktion blockiert den P-gp-vermittelten Calcein-AM Transport, führt jedoch zu keiner Steigerung der ATPase-Aktivität. P-gp Substrate führen dagegen zu einer Hemmung der Transportfunktion und zu einer Steigerung der ATPase-Aktivität. Die Frage, ob ein Substrat durch P-gp transportiert wird, bleibt jedoch weiterhin offen. Sie lässt sich durch ein weiteres Testsystem beantworten, das die direkte Untersuchung des Transports einer Substanz durch eine Zellschicht zulässt [44].

3.3.4 Schlussfolgerungen

Das heterolog in *S. cerevisiae* exprimierte humane P-Glykoprotein konnte nach der Methode von Figler et al. [49] erfolgreich aufgereinigt werden. Ausschlaggebend für Ausbeute und enzymatische Aktivität des aufgereinigten Proteins war das zur Solubilisierung eingesetzte Detergenz. Die Verwendung von Natriumtaurodeoxycholat (TDOC) führte zu deutlichen Einbußen bei der Ausbeute. Zusätzlich war die enzymatische Aktivität des aufgereinigten P-Glykoproteins im Vergleich zu einer Präparation, die nach Solubilisierung mit Lysophosphatidylcholin (LPC) gewonnen wurde, niedriger. Von einer Substitution von LPC gegen das kostengünstigere TDOC sollte daher abgesehen werden. Neben den Detergenzien hatte auch die bei der Rekonstitution eingesetzte Lipidkonzentration einen Einfluss auf die Aktivität der erhaltenen Präparation. Wurden bei der Rekonstitution nur geringe Konzentrationen (0,1 % (m/V)) eingesetzt, lagerte sich das Protein bevorzugt in „inside-out“-Orientierung in die Liposomen ein. Dies führte jedoch gleichzeitig zu einer Verminderung der Rekonstitutionseffizienz und damit zur Abnahme der enzymatischen Aktivität.

Das aufgereinigte P-gp wurde zur Charakterisierung von 28 bekannten und neuen Substraten und Modulatoren anhand ihrer ATPase-Aktivierungsprofile verwendet. Die gute Korrelation mit publizierten ATPase-Assay Daten belegte die Validität des

Testsystems. Weiterhin wurde eine Korrelation mit funktionellen Daten beobachtet, die mit dem Calcein-AM Transportassay erhoben wurden. Dies stand zunächst im Widerspruch zu Befunden in der Literatur, konnte jedoch schließlich auf grundlegende Unterschiede in den beiden Testsystemen und die unterschiedlichen Datensätze, die für die Korrelation verwendet wurden, zurückgeführt werden. Demzufolge ist die Inhibition des P-gp-vermittelten Calcein-AM Transports nicht nur von der Affinität der getesteten Substanz zu P-gp abhängig, sondern auch von der Geschwindigkeit, mit der diese die Zellmembran durch passive Diffusion überwinden kann. Die Bestimmung des ATPase-Aktivierungsprofils erfolgt an P-gp, das in „inside-out“-Orientierung in der Liposomenmembran vorliegt. Die Bindungsstellen können daher von der Testsubstanz ohne die vorausgehende Diffusion durch den hydrophoben Kerne der Phospholipiddoppelschicht erreicht werden. Die bestimmten $pK_{m(D)}$ -Werte sind demnach vor allem abhängig von der Affinität einer Testsubstanz. Der ATPase-Assay stellt somit eine sinnvolle Ergänzung zu den bestehenden Testsystemen dar.

3.4 Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen der P-gp Modulatoren vom XR- und WK-X-Typ

In Kapitel 3.3.3 wurde die Charakterisierung von P-gp Modulatoren vom XR- und WK-X-Typ anhand ihrer ATPase-Aktivierungsprofile beschrieben. Die Verbindungen XR9476 und XR9577 gehören zu den Modulatoren der dritten Generation und unterscheiden sich strukturell nur geringfügig von dem hochpotenten Tariquidar (XR9576) [82, 128]. Für die Synthese der WK-X-Verbindungen diente Tariquidar als Leitstruktur, so dass auch hier strukturelle Gemeinsamkeiten bestehen [89]. Die untersuchten Substanzen umschließen hinsichtlich der Konzentrationen, die zur halbmaximalen Stimulation der ATPase-Aktivität nötig sind, einen Bereich von fast drei Zehnerpotenzen. Aufgrund dieser Eigenschaften erscheint der vorliegende Datensatz geeignet zur Durchführung einer 3D-QSAR Analyse [66].

3.4.1 Dreidimensionale Struktur-Wirkungsbeziehungen

Eine Übersicht über die strukturellen Merkmale und die zugehörigen biologischen Aktivitäten der untersuchten Substanzen ist in Tabelle 3.8 gegeben. Der Datensatz setzt sich aus Modulatoren zusammen, die anhand ihres Grundgerüsts in zwei Untergruppen aufgeteilt werden können. Substanzen, die auf dem in Tabelle 3.8 abgebildeten Grundgerüst A beruhen, werden im Folgenden auch als kleine Modulatoren bezeichnet. Das Grundgerüst B ist hingegen charakteristisch für die sogenannten großen Modulatoren.

Wie in Kapitel 2.6 beschrieben, wurden zunächst die dreidimensionalen Strukturen der untersuchten Substanzen erstellt und die für die Berechnung der CoMFA- und CoMSIA-Modelle notwendigen Partialladungen berechnet. Das Ergebnis der anschließenden Überlagerung der Substanzen mit dem Programm FlexS ist in Abbildung 3.12 dargestellt. Auf der linken Seite der Abbildung ist das gemeinsame Grundgerüst zu erkennen, das für alle Verbindungen gleich angeordnet wurde. Besonders fallen die Strukturen der Verbindungen WK-X-35 und WK-X-44 ins Auge, die zu der Gruppe der großen Modulatoren gehören. Die Substitution des zweiten Phenylrings in para-Position führt im Vergleich zu den restlichen Modulatoren dieses Typs zu langgestreckten Derivaten. Der in der Abbildung rechts aus den

Tab. 3.8: Strukturelle Merkmale und Aktivitätsdaten der mit dem ATPase-Assay charakterisierten Modulatoren vom XR- und WK-X-Typ. Die Aktivitätsdaten der mit * gekennzeichneten Verbindungen wurden aus [114] entnommen. Die Abkürzung dB steht für eine direkte Bindung zwischen dem Kohlenstoffatom der Amid-Funktion und dem Aromaten.

Substanz	pK _{m(D)}	R ₁	X	Pos.	R ₂
Grundgerüst A					
WK-X-14	4,73	-OCH ₃	dB	–	2-Nitrophenyl
WK-X-15	4,61	-H	dB	–	2-Nitrophenyl
WK-X-16	4,96	-OCH ₃	dB	–	2-Aminophenyl
WK-X-17	4,95	-H	dB	–	2-Aminophenyl
WK-X-46	5,32	-H	-NH-	–	2-Nitrophenyl
WK-X-48	4,41	-H	-NH-	–	2-Aminophenyl
WK-X-51	5,69	-OCH ₃	dB	–	3-Chinolinylyl
WK-X-52	5,77	-H	dB	–	3-Chinolinylyl
WK-X-74	5,59	-OCH ₃	-NH-	–	2-Nitrophenyl
WK-X-76	4,49	-OCH ₃	-NH-	–	2-Aminophenyl
WK-X-81	6,13	-OCH ₃	-CH ₂ O-	–	2-Nitrophenyl
WK-X-82*	4,84	-OCH ₃	-CH ₂ O-	–	2-Aminophenyl
Grundgerüst B					
WK-X-34	7,32	-OCH ₃	dB	ortho	3,4-Dimethoxyphenyl
WK-X-35	6,35	-OCH ₃	dB	para	3-Chinolinylyl
WK-X-38	6,25	-H	dB	ortho	3,4-Dimethoxyphenyl
WK-X-44*	5,82	-H	dB	para	3-Chinolinylyl
WK-X-78	6,25	-OCH ₃	-NH-	ortho	3,4-Dimethoxyphenyl
WK-X-83	6,76	-OCH ₃	-CH ₂ O-	ortho	3-Chinolinylyl
WK-X-84*	6,15	-OCH ₃	-CH ₂ O-	ortho	3,4-Dimethoxyphenyl
XR9476	6,66	-OCH ₃	dB	ortho	3-Chinolinylyl
XR9577	6,73	-H	dB	ortho	3-Chinolinylyl

Strukturen herausragende Chinolinylyl-Rest ist daher auf diese beiden Verbindungen zurückzuführen.

Auf Grundlage der vorgestellten Überlagerung wurden die CoMF- und CoMSI-Analysen durchgeführt. Die dabei berücksichtigten Moleküleigenschaften und die

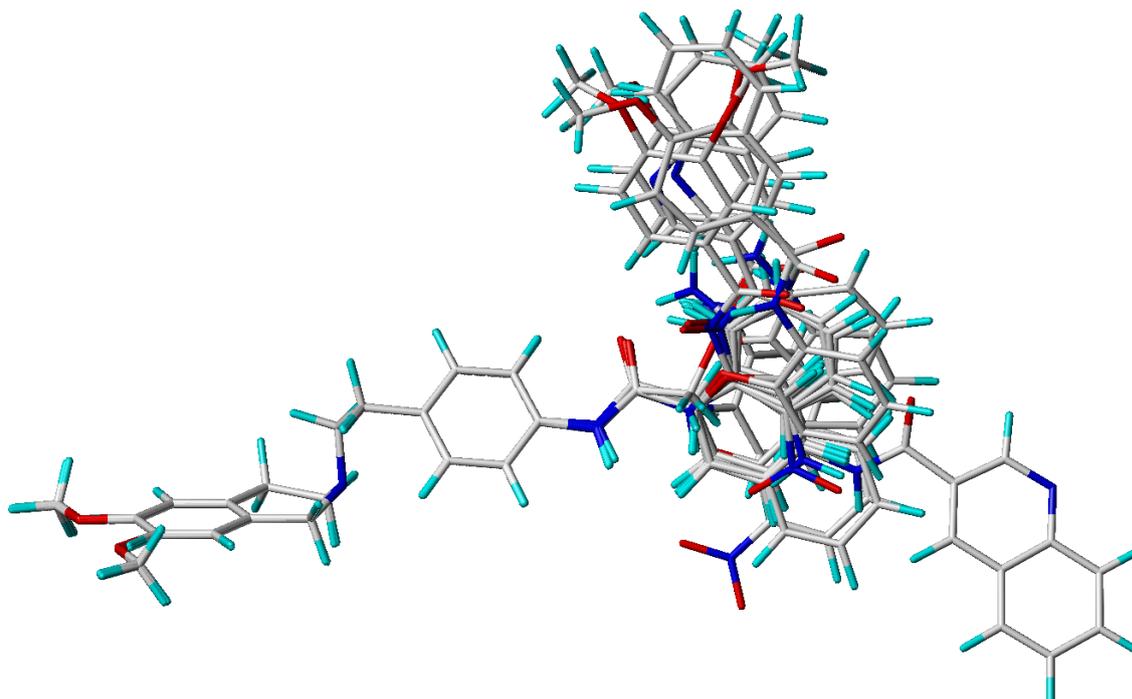


Abb. 3.12: Überlagerung der P-gp Modulatoren vom XR- und WK-X-Typ.

Ergebnisse der Kreuzvalidierung der resultierenden Modelle sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst. Demnach lieferte der überwiegende Teil der verwendeten Felder und Feldkombinationen gute Modelle zur Beschreibung der experimentell bestimmten biologischen Aktivitäten.

Bei beiden Methoden führte die Kombination aus sterischen und elektrostatischen Molekülfeldern zu den besten Modellen. Mit einem q^2 -Wert von 0,782 ist das CoMSIA-Modell etwas besser als das entsprechende CoMFA-Modell ($q^2 = 0,769$). Wie die in Tabelle 3.9 aufgeführten q^2 -Werte belegen, führte die Berücksichtigung zusätzlicher Eigenschaften in keinem Fall zu einer weiteren Verbesserung der Modelle. Desweiteren wurden auch bei Modellen auf Grundlage einer einzelnen Eigenschaft eindeutig die sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen favorisiert. Die biologische Aktivität der untersuchten Substanzen kann demnach anhand dieser beiden Eigenschaften erklärt werden.

Demgegenüber war das CoMSIA-Modell auf Basis von Wasserstoffbrückendonoreigenschaften am wenigsten zur Beschreibung der Struktur-Wirkungsbeziehungen geeignet. Mit einem q^2 -Wert von 0,384 stellte es das einzige als schlecht einzustufende Modell dar. Das zweitschlechteste Ergebnis wurde ebenfalls mit der CoMSIA-Methode

Tab. 3.9: Kreuzvalidierung der CoMFA- und CoMSIA-Modelle mit der LOO-Methode. Angegeben sind der Korrelationskoeffizient r^2 und die Standardabweichung der Vorhersagefehler $SDEP$ für die nicht validierten Modelle sowie für die mit der Leave-One-Out(LOO)-Methode validierten Modelle der quadrierte Korrelationskoeffizient der Vorhersage q^2 und die kreuzvalidierte Standardabweichung $sPRESS$.

Felder	keine Validierung		LOO-Kreuzvalidierung		
	r^2	$SDEP$	q^2	$sPRESS$	c
CoMFA-Modelle					
sterisch (s)	0,870	0,322	0,715	0,478	2
elektrostatisch (e)	0,960	0,190	0,744	0,481	4
Hbond (H)	0,961	0,183	0,715	0,492	3
both (s+e)	0,943	0,219	0,769	0,443	3
both + H	0,963	0,177	0,760	0,452	3
CoMSIA-Modelle					
sterisch (s)	0,850	0,347	0,733	0,463	2
elektrostatisch (e)	0,958	0,194	0,741	0,484	4
hydrophob (h)	0,856	0,340	0,595	0,569	2
Donor (d)	0,696	0,494	0,384	0,703	2
Akzeptor (a)	0,773	0,415	0,652	0,514	1
s+e	0,951	0,203	0,782	0,430	3
s+a	0,866	0,328	0,705	0,487	2
s+h	0,876	0,315	0,648	0,532	3
h+e	0,956	0,200	0,747	0,477	4
h+a	0,915	0,269	0,735	0,475	3
d+a	0,865	0,329	0,656	0,525	2
s+e+h	0,938	0,229	0,754	0,457	3
s+a+h	0,916	0,267	0,746	0,465	3
s+e+h+a	0,939	0,227	0,768	0,443	3

erhalten. Auf Grundlage hydrophober Wechselwirkungen wurde nur ein Modell mit fragwürdiger Aussagekraft erhalten. Die Aktivitätsunterschiede bei den untersuchten Substanzen lassen sich also nicht zufriedenstellend allein durch Unterschiede in der Hydrophobie erklären, obwohl diese Eigenschaft eine der wenigen Gemeinsamkeiten aller Substrate und Modulatoren von P-Glykoprotein darstellt [15]. Ein vergleichbares Ergebnis wurde bei der Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von 26 strukturell ähnlichen Modulatoren vom XR-, WK-X- und WK-Y-Typ erhalten [129].

Wie bereits erwähnt, ließ sich die biologische Aktivität der Testsubstanzen am besten anhand ihrer sterischen und elektrostatischen Eigenschaften beschreiben. Die Validität der entsprechenden CoMFA- und CoMSIA-Modelle wurde daher mit Hilfe

der Leave-Many-Out-Methode (LMO) genauer untersucht. In Tabelle 3.10 ist das Ergebnis dieser Validierung aufgeführt.

Erwartungsgemäß nahm der q^2 -Wert mit der Gruppengröße ab. Wurde der gesamte Datensatz in nur zwei Gruppen aufgeteilt, fiel er schließlich unter 0,6. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Anzahl der untersuchten Substanzen mit 21 ohnehin an der unteren Grenze für die Durchführung einer QSAR-Untersuchung liegt [68], verfügen die Modelle über eine gute Stabilität. Die Analyse elektrostatischer Molekülfelder mit der CoMFA-Methode führte zu einem Modell, das insgesamt etwas instabiler war. Hier fiel der q^2 -Wert bereits bei Auslassung eines Drittels der Aktivitätswerte unter den Schwellenwert von 0,6. Die CoMSIA-Modelle waren den CoMFA-Modellen auch bei der Validierung mit der LMO-Methode leicht überlegen. Weiterhin wurden Modelle, die auf der Kombination von sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen beruhen, durch diese Validierung als die besten Modelle bestätigt.

In Abbildung 3.13 A sind die experimentell bestimmten $pK_{m(D)}$ -Werte gegen die mit einem CoMSIA-Modell vorhergesagten Werte aufgetragen. Grundlage des verwendeten Modells war die Feldkombination aus sterischen und elektrostatischen Wechselwirkungen. Die Differenz zwischen experimentellen Werten und vorhergesagten Werten für jede Substanz ist in Abbildung 3.13 B dargestellt. Die größten Abweichungen zwischen experimentellen und vorhergesagten Aktivitätswerten wur-

Tab. 3.10: Validierung der besten CoMFA- und CoMSIA-Modelle mit der LMO-Methode.

Gruppen	Felder	CoMFA		CoMSIA		
		\bar{x}_{q^2}	s_{q^2}	Felder	\bar{x}_{q^2}	s_{q^2}
2		0,544	0,214		0,580	0,156
3	both (n = 3)	0,666	0,114	sterisch und elektrostatisch (n = 3)	0,676	0,095
4		0,711	0,059		0,711	0,062
5		0,723	0,053		0,744	0,050
2		0,563	0,175		0,630	0,109
3	sterisch (n = 2)	0,650	0,095	sterisch (n = 2)	0,670	0,080
4		0,672	0,055		0,704	0,042
5		0,690	0,043		0,713	0,038
2		0,372	0,205		0,489	0,160
3	elektrostatisch (n = 4)	0,571	0,121	elektrostatisch (n = 4)	0,690	0,097
4		0,627	0,091		0,663	0,091
5		0,651	0,084		0,662	0,079

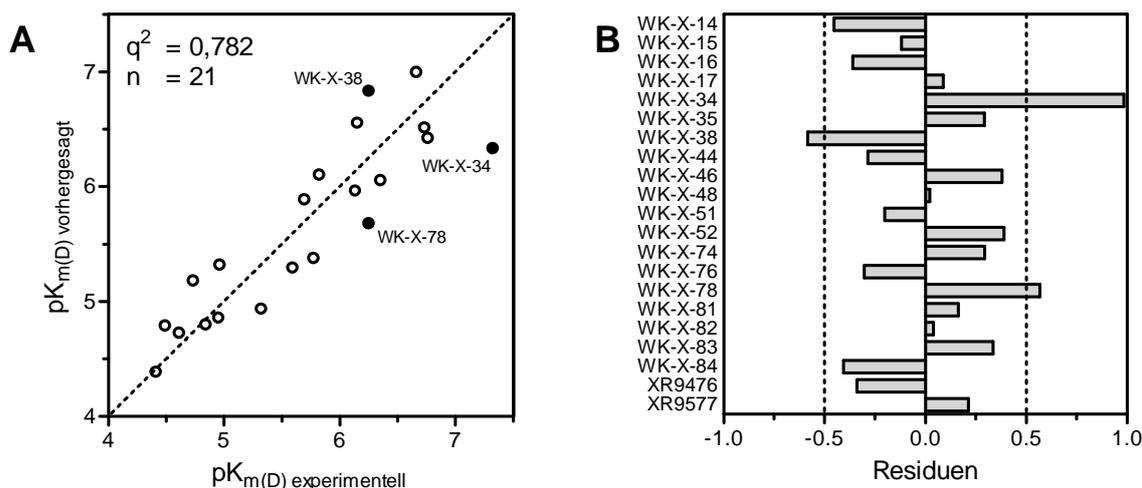


Abb. 3.13: Vorhersagekraft des auf der sterischen und elektrostatischen Feldkombination basierenden CoMSIA-Modells. In Abbildung A wurden die gemessenen $pK_{M(D)}$ -Werte gegen die mit Hilfe des Modells vorhergesagten $pK_{M(D)}$ -Werte aufgetragen. Die Aktivität der hervorgehobenen Substanzen wich im Modell mehr als 0,5 logarithmische Einheiten von den experimentell bestimmten Werten ab. Abbildung B zeigt die als Residuum bezeichnete Differenz zwischen experimentellen und vorhergesagten Werten.

den für die Substanzen WK-X-34, WK-X-38 und WK-X-78 beobachtet. Die Residuen lagen hier jeweils jenseits von 0,5 log-Einheiten. Im Fall von WK-X-34, das im Experiment die höchste Aktivität zeigte, wurde von dem Modell sogar eine fast zehnfach schwächere Aktivität vorhergesagt. Die Substanz WK-X-38, die sich von WK-X-34 nur durch das Fehlen der Methoxy-Gruppen am Tetrahydroisochinolinring unterscheidet (vergleiche Tabelle 3.8), wurde hingegen als deutlich affiner eingeschätzt. Die schlechte Vorhersagekraft des Modells für diese Substanzen wurde daher auf die ungewöhnlich hohe Aktivität von WK-X-34 im ATPase-Assay zurückgeführt. So führen die zusätzlichen Methoxygruppen am Tetrahydroisochinolinring im Vergleich zu WK-X-38 zu einer Verschiebung des $pK_{m(D)}$ -Wertes um eine Einheit. Bei allen anderen Substanzpaaren, die sich nur durch die Methoxylierung des Tetrahydroisochinolinrings unterscheiden, fällt dieser Aktivitätsunterschied wesentlich geringer aus. Wurde für WK-X-35 und WK-X-44 noch ein Unterschied von etwa 0,5 log-Einheiten beobachtet, lagen die Differenzen bei den restlichen Paaren innerhalb der Messungenauigkeiten. Als Beispiel seien hier WK-X-14 und WK-X-15 genannt, deren $pK_{m(D)}$ -Werte sich nur um 0,08 Einheiten unterschieden. Bei der Vorhersage der Aktivität von WK-X-34 zeigt also keine Substanz des dem Modell zugrunde liegenden Datensatzes einen vergleichbar hohen $pK_{m(D)}$ -Wert. Zusätzlich gibt es in den experimentellen Daten keinen Anhaltspunkt für eine derart extreme Aktivitätssteigerung

durch die Methoxylierung der Substanz WK-X-38. Die deutliche Unterschätzung der Potenz von WK-X-34 ist daher nicht verwunderlich. Soll dagegen die Aktivität von WK-X-38 vorhergesagt werden, führt die außergewöhnlich hohe Aktivität von WK-X-34 aus den gleichen Gründen zu einer Überschätzung der Potenz von WK-X-38. Erneut kann das Modell einen derart großen Aktivitätsunterschied aufgrund der zur Verfügung stehenden Daten nicht erklären. Diese wechselseitige Beeinflussung ist so stark ausgeprägt, dass es bei der Vorhersage der Aktivität zu einer Umkehr der Aktivitätsreihenfolge der beiden Substanzen kommt.

Die dritte Substanz, WK-X-78, ist strukturell ebenfalls mit WK-X-34 verwandt. Beide Substanzen unterscheiden sich nur durch den Linker, welcher im Grundgerüst B (vergleiche Tabelle 3.8) die beiden Phenylreste miteinander verbindet. Anstelle der Amid-Funktion verfügt WK-X-78 hier über eine Harnstoff-Gruppe. Im Gegensatz zu WK-X-38 hat die hohe Aktivität von WK-X-34 hier jedoch scheinbar keinen Einfluss auf die Vorhersage, wird doch die Aktivität von WK-X-78 deutlich unterschätzt.

Der vollständige Datensatz enthält mit den Substanzen WK-X-35 und WK-X-44 nur zwei große Modulatoren mit Substitution in para-Position. Bei der Validierung mit der LOO-Methode muss bei Ausschluss einer dieser beiden Substanzen die Aktivität aufgrund eines einzelnen Wertes vorhergesagt werden. Dies kann die Qualität des Modells negativ beeinflussen. Ebenso wären bei der LMO-Methode, je nachdem ob die Aktivität von einer oder sogar beiden Substanzen vorhergesagt werden muss, negative Auswirkungen auf die Stabilität zu befürchten. Für die besten CoMFA- und CoMSIA-Modelle wurden daher die Berechnung und Kreuzvalidierung in Abwesenheit von WK-X-35 und WK-X-44 wiederholt. Die Kenndaten der resultierenden Modelle und die Ergebnisse der Kreuzvalidierung mit der LOO-Methode sind in Tabelle 3.11 aufgeführt. Der Vergleich mit den Werten aus Tabelle 3.9 lässt nur geringe Unterschiede erkennen. Insgesamt wurden die CoMFA-Modelle etwas schlechter, wobei jedoch für das auf sterischen und elektrostatischen Eigenschaften beruhende Modell die Zahl der Komponenten auf 2 reduziert werden konnte. Im Gegensatz dazu wurden die CoMSIA-Modelle etwas besser, der quadrierte Korrelationskoeffizient für das beste Modelle lag nun über 0,8. Die Ergebnisse der weiteren Validierung dieser Modelle mit der LMO-Methode sind in Tabelle 3.12 zusammengefasst. Auch hier wurden im Vergleich zu den Modellen aus dem vollständigen Datensatz (siehe Tabelle 3.10) qualitativ gleichwertige Ergebnisse erhalten. Anhand dieser Ergebnisse wurde geschlussfolgert, dass die para-Substitution der großen Modulatoren nicht

Tab. 3.11: Kreuzvalidierung der in Abwesenheit von WK-X-35 und WK-X-44 erhaltenen CoMFA- und CoMSIA-Modelle mit der LOO-Methode. Angegeben sind der Korrelationskoeffizient r^2 und die Standardabweichung der Vorhersagefehler $SDEP$ für die nicht validierten Modelle sowie für die mit der LOO-Methode validierten Modelle der quadrierte Korrelationskoeffizient der Vorhersage q^2 und die kreuzvalidierte Standardabweichung s_{PRESS} .

Felder	keine Validierung		LOO-Kreuzvalidierung		
	r^2	$SDEP$	q^2	s_{PRESS}	c
CoMFA-Modelle					
sterisch (s)	0,895	0,303	0,708	0,505	2
elektrostatisch (e)	0,960	0,200	0,714	0,534	4
both (s+e)	0,932	0,243	0,739	0,477	2
CoMSIA-Modelle					
sterisch (s)	0,862	0,347	0,741	0,476	2
elektrostatisch (e)	0,955	0,205	0,743	0,489	3
s+e	0,957	0,201	0,803	0,428	3

Tab. 3.12: Validierung der besten in Abwesenheit von WK-X-35 und WK-X-44 erhaltenen CoMFA- und CoMSIA-Modelle mit der LMO-Methode.

Gruppen	Felder	CoMFA		Felder	CoMSIA	
		\bar{x}_{q^2}	s_{q^2}		\bar{x}_{q^2}	s_{q^2}
2	both (n = 2)	0,543	0,140	sterisch und elektrostatisch (n = 3)	0,628	0,150
3		0,642	0,115		0,713	0,071
4		0,681	0,070		0,753	0,048
5		0,700	0,047		0,762	0,040
2	sterisch (n = 2)	0,577	0,148	sterisch (n = 2)	0,624	0,137
3		0,649	0,079		0,693	0,067
4		0,673	0,070		0,718	0,044
5		0,672	0,033		0,719	0,038
2	elektrostatisch (n = 4)	0,399	0,224	elektrostatisch (n = 3)	0,493	0,196
3		0,556	0,120		0,608	0,122
4		0,624	0,066		0,664	0,088
5		0,641	0,073		0,690	0,059

zu einer signifikanten Steigerung der biologischen Aktivität führt und die Aktivität solcher Derivate in den vorliegenden Modellen hinreichend durch die Struktur-Wirkungsbeziehungen der kleinen Modulatoren beschrieben ist. Der Verbleib der beiden Verbindungen im Datensatz hat daher keine negativen Auswirkungen auf die Güte der Modelle. Zur Erstellung der im Folgenden beschriebenen Konturdiagramme wurden aufgrund dessen die auf dem vollständigen Datensatz beruhenden Modelle verwendet.

Abbildung 3.14 zeigt das auf dem „s+e“-CoMSIA-Modell basierende Konturdiagramm mit drei Substanzen unterschiedlicher Aktivität. Die Gruppe der hochaktiven Substanzen wird durch XR9476 vertreten (siehe Abbildung 3.14 A). Es ist deutlich zu erkennen, dass sich ein räumlich anspruchsvoller Substituent, wie der 3-Chinolinylnyl-Rest dieser Substanz, positiv auf die Aktivität auswirkt. Die Überlappung der Amidfunktion mit dem für sterische Wechselwirkungen als ungünstig charakterisierten Bereich (magenta) ist nur gering. Daraus resultierende negative Einflüsse werden vermutlich durch die Wechselwirkung des partialpositiv geladenen Wasserstoffs der Amidfunktion mit dem elektrostatischen Interaktionsbereich (blau) aufgehoben. Abbildung 3.14 B zeigt mit WK-X-51 eine Substanz mittlerer Aktivität. Es handelt sich hierbei um einen der „kleinen“ Modulatoren auf Basis von Grundgerüst A (vergleiche Tabelle 3.8). Hier wirkt sich die Substitution des zweiten Phenylrests durch einen Chinolinylnylrest positiv aus. Dieser erstreckt sich deutlich in den Interaktionsbereich, der eine positive Auswirkung sterisch anspruchsvoller Substituenten (grün) signalisiert. Auch negative Partialladungen sind in diesem Bereich günstig (dargestellt in rot), was durch das π -Elektronensystem eines Aromaten oder durch Methoxygruppen bewerkstelligt werden kann. In der dritten Abbildung (C) ist schließlich mit WK-X-82 die Struktur einer nur schwach aktiven Substanz dargestellt. Der zweite Phenylrest liegt komplett in einem Bereich, der ungünstige Auswirkungen auf die Aktivität beschreibt. Dies gilt für sterische und für elektrostatische Wechselwirkungen. Die geringe Aktivität von WK-X-82 ist vor allem auf den Linker zwischen dem ersten und dem zweiten Phenylrest zurückzuführen. Durch die zusätzliche Methylenoxy-Funktion verändert sich die räumliche Lage des Phenylrests hin zu einer sterisch ungünstigen Position (magenta). Desweiteren wirkt sich die partialnegative Ladung des Ether-Sauerstoffs aktivitätsmindernd aus (blau).

Die unterschiedlichen Aktivitäten der drei vorgestellten Beispielsubstanzen lassen sich anhand des Konturdiagramms also gut erklären. Die Struktur-Wirkungsbeziehungen

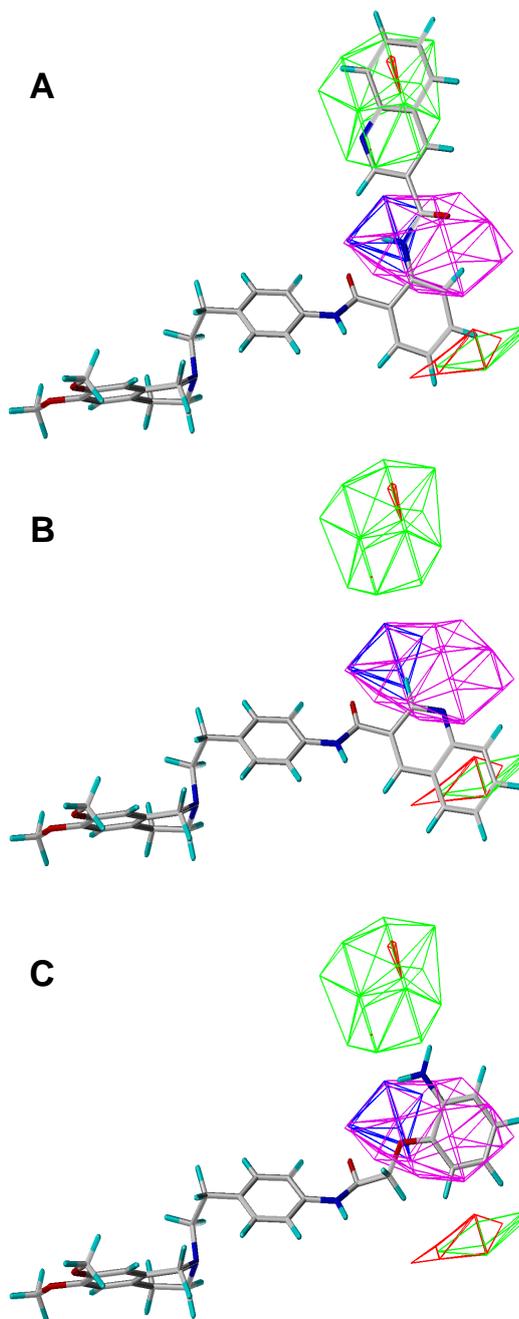


Abb. 3.14: Konturdiagramm (STDEV*COEFF) der sterischen und elektrostatischen Eigenschaften des „s+e“-CoMSIA-Modells mit der hochaktiven Substanz XR9476 (A), der mittelaktiven Substanz WK-X-51 (B) und der schwach aktiven Substanz WK-X-82 (C). Günstige Interaktionsbereiche: grün 70 % (sterisch), blau 90 % (elektrostatisch); ungünstige Interaktionsbereiche: magenta 7 % (sterisch), rot 20 % (elektrostatisch). Für elektrostatische Wechselwirkungen günstige Bereiche lassen sich im Sinne einer favorisierten positiven Ladung interpretieren; negative Ladungen sind in diesen Bereichen ungünstig. Gegenteiliges gilt für die für elektrostatischen Wechselwirkungen ungünstigen Bereiche.

von Tariquidar (XR9576), einem der potentesten bekannten Modulatoren, sind ebenfalls im Modell erkennbar, obwohl diese Substanz nicht zum Testsatz gehörte. Abgesehen von der zusätzlichen Substitution des zweiten Phenylrings mit zwei Methoxygruppen in Position 3 und 4, ist Tariquidar mit der Substanz XR9476 identisch. Durch das bestehende Modell wird der positive Effekt dieser Substitution auf die biologische Aktivität bereits beschrieben. Im Gegensatz zu vorausgegangenen Arbeiten [58, 89, 129], bei denen vor allem kleine Modulatoren vom WK-X- und WK-Y-Typ untersucht wurden, setzt sich der untersuchte Datensatz etwa zu gleichen Teilen aus großen und kleinen Modulatoren vom XR- und WK-X-Typ zusammen. Das resultierende Modell unterstreicht erneut die Rolle der sterischen und der elektrostatischen Eigenschaften der Modulatoren. Dabei ist die räumliche Anordnung der Interaktionsbereiche mit den publizierten Modellen vergleichbar.

3.4.2 Schlussfolgerungen

Die 3D-QSAR-Methoden CoMFA und CoMSIA wurden erfolgreich zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von 21 neuen P-gp Modulatoren eingesetzt. Die biologische Aktivität der getesteten Substanzen ließ sich vor allem durch sterische und elektrostatische Wechselwirkungen erklären. So wurde das beste QSAR-Modell mit einer Kombination dieser Eigenschaften durch eine CoMSI-Analyse erhalten. Nach diesem Modell sind die großen Modulatoren (siehe Tabelle 3.8) klar zu favorisieren. Jedoch wirken sich Veränderungen in der Linkerregion unabhängig von der Größe des Modulators eher negativ auf die Aktivität aus. Die gefundenen Struktur-Wirkungsbeziehungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen bereits publizierter QSAR-Untersuchungen strukturell verwandter Substanzen [58, 89].

3.5 Radioligandbindungsstudien

Bindungsexperimente sind ein wertvolles Werkzeug zur Charakterisierung von Ligand/Rezeptor-Interaktionen. Im Fall von P-gp können solche Untersuchungen helfen, die Bindungskonstanten neu synthetisierter Substanzen zu bestimmen sowie offene Fragen bezüglich Zahl und Interaktion der Substrat- und Modulatorbindungsstellen zu klären.

Ziel der im Folgenden beschriebenen Experimente war daher die Etablierung eines Protokolls zur Untersuchung der Bindung von Testsubstanzen an P-gp. Dies sollte die Durchführung von Bindungsexperimenten im Mikrotiterplattenformat ermöglichen. Ausgangspunkt dieser Arbeiten war dabei eine Methode, die von Ferry et al. [80, 81, 130] beschrieben worden war und die, verschiedentlich variiert, nachfolgend Anwendung in einer Reihe von Untersuchungen von P-gp/Ligand-Interaktionen fand [32, 82, 116, 131–134]. Als Radioliganden wurden hierbei [³H]Vinblastin [32, 82, 116, 131–134], [³H]XR9576 [32, 82, 133] und [³H]Paclitaxel [82] verwendet. Mit einer Dissoziationskonstanten von $K_D = 2,9 \text{ nmol/l}$ erwies sich [³H]XR9576 dabei als der Ligand mit der höchsten Affinität [32]. Da dieser Radioligand kommerziell nicht zugänglich war, wurde für die vorliegende Arbeit [³H]Vinblastin verwendet, das die zweitbeste Affinität zeigte [32, 82, 133].

Unabhängig von den bisher genannten Arbeiten wurden einige weitere Methoden zur Durchführung von Bindungsexperimenten an P-gp publiziert. Diese unterschieden sich z. T. deutlich in ihren Versuchsbedingungen. So wurden neben [³H]Vinblastin [135–137] auch [³H]Vincristin [138, 139], [³H]Daunorubicin [139] und [³H]Verapamil [137] als Radioligand eingesetzt. Neben P-gp-haltigen Membranvesikeln aus eukaryotischen Zellen kamen in einer Arbeit auch intakte permeabilisierte Caco-2 Zellen zum Einsatz [137]. Allerdings wurden diese Versuche in Gegenwart von ATP durchgeführt, wodurch eine Unterscheidung zwischen einer „echten“ Bindung des Liganden an P-gp und einer Anreicherung des Liganden in Vesikeln durch einen P-gp-vermittelten Transport erschwert wurde. Weiterhin wurden in diesen Arbeiten niedrige Affinitäten für [³H]Vinblastin mit K_D -Werten herab bis zu $1,8 \mu\text{mol/l}$ [137] ermittelt. Selbst unter Berücksichtigung einer sehr langsamen Assoziation des Ligand/Rezeptor-Komplexes erschienen diese Verfahren für Bindungsmessungen mittels einer Abtrennung durch Filtration, wie in der vorliegenden Arbeit angestrebt, nicht anwendbar.

3.5.1 Validierung der Versuchsparemeter

Zunächst wurden die Eigenschaften des Radioliganden [^3H]Vinblastin genauer untersucht. Es ist bekannt, dass das Vinca-Alkaloid zu einer ausgeprägten Adsorption an Oberflächen neigt [140]. Daher wurde zunächst dieses Wegbindungsphänomen in Abhängigkeit von dem verwendeten Gefäßmaterial untersucht, um es anschließend durch Optimierung der Pufferzusammensetzung zu minimieren.

Radioligandadsorption an das Arbeitsmaterial

Die für die Bindungsversuche eingesetzten Mikrotiterplatten bestanden aus Polypropylen. Die Oberfläche von Arbeitsmaterialien aus diesem Werkstoff besitzt hydrophobe Eigenschaften und unterscheidet sich dadurch deutlich von der hydrophilen Oberfläche von Glasgefäßen [141]. Aus diesem Grund wurde die Adsorption des Radioliganden an 1,5 ml PP-Reaktionsgefäße untersucht und das Ergebnis mit dem Verhalten gegenüber Pyrex-Glasröhrchen verglichen. Eine detaillierte Versuchsbeschreibung findet sich in Kapitel 2.7.3.

Wie Abbildung 3.15 deutlich macht, ist die Bindung von [^3H]Vinblastin an beide Materialien ausgeprägt. Trotz der Verwendung identischer Lösungen für beide Materialien,

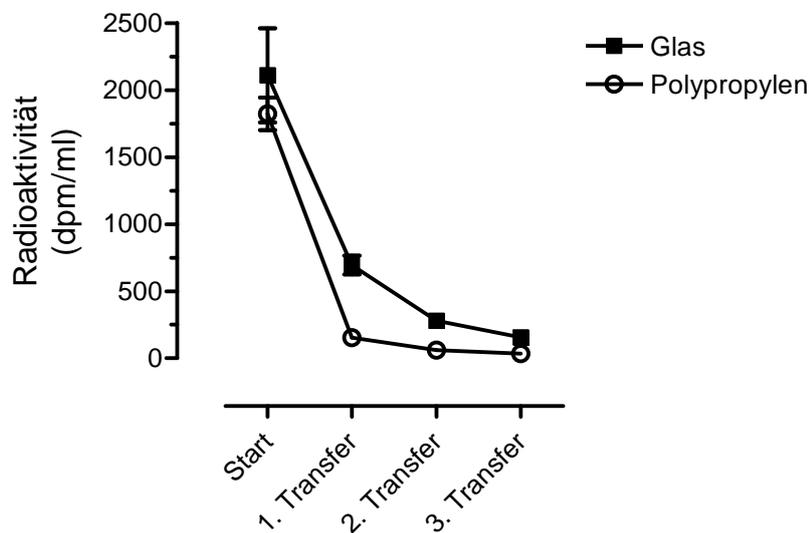


Abb. 3.15: Adsorption von [^3H]Vinblastin an PP- und Glas-Oberflächen. Ordinate: gemessene Radioaktivität in (dpm/ml); Abzisse: Zahl der Transfers. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler der Messwerte zweier unabhängiger Experimente, die als Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. (Weitere Details im Text.)

lag die Wiederfindungsrate der Radioaktivität bei Verwendung von Glasgefäßen im Durchschnitt etwa 15 % höher. Nach dem ersten Transfer wurde unabhängig vom verwendeten Material eine deutliche Abnahme der Aktivität als Ausdruck der Wegbindung des Radioliganden beobachtet. Die in Lösung gemessene Radioaktivität war bei den Proben aus Glasgefäßen etwa vierfach höher als bei den Proben aus Polypropylengefäßen. Dieses Verhältnis blieb auch bei den folgenden Transfers erhalten. Nach dem letzten Transfer betrug die Wiederfindungsrate der Radioaktivität bei Verwendung von PP durchschnittlich 1,9 % der eingesetzten Radioaktivität, bei Glasgefäßen lag sie hingegen noch bei 7,3 %. Da die verwendeten Pyrex-Glasröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 7,5 ml über eine erheblich größere Oberfläche als die PP-Reaktionsgefäße verfügen, ist der tatsächliche Unterschied sicherlich noch größer als der hier gemessene. PP-Gefäße sind also im Hinblick auf die Adsorption des Radioliganden an die Gefäßoberfläche nur bedingt geeignet. Die Verwendung von Glasgefäßen während der Inkubation wäre durch anschließende Verwendung eines Harvesters der Firma Brandel zwar möglich gewesen, dies hätte aber zwingend eine deutliche Vergrößerung der Reaktionsansätze vorausgesetzt [142] und damit zu einem wesentlich höheren Membranverbrauch geführt. Während der gesamten Dauer dieser Arbeit war die Generierung ausreichender Mengen Membranfraktion mit bindungsfähigem P-gp limitierend. Die Versuchsdurchführung im Mikrotiterplattenmaßstab und damit die Verwendung von PP-Gefäßen war somit aus experimentellen Gründen nicht zu umgehen.

Die folgenden Experimente zielten deshalb auf die Minimierung der Oberflächenadsorption des Radioliganden ab. Dazu wurden Puffersysteme auf Basis von Tris und HEPES getestet. In Abbildung 3.16 sind die wichtigsten Ergebnisse dieser Versuche dargestellt. Bei dem Vergleich der Adsorption des Radioliganden in Wasser mit der Adsorption in dem von Martin et al. [82] verwendeten Bindungspuffer (50 mmol/l Tris, pH 7,4) fallen nur geringe Unterschiede auf. Erst durch Zusatz von 20 mmol/l Natriumchlorid und 0,01 % (m/V) BSA trat eine deutliche Verringerung der Wegbindung ein. Ob ein zwitterionisches (HEPES) oder kationisches Puffersystem (Tris) eingesetzt wurde, spielte dabei eine untergeordnete Rolle. Ebenso hatte die Konzentration der Puffersubstanz nur geringe Auswirkungen auf das Ausmaß der Adsorption. Die Ergebnisse fielen aber für die Puffer mit der jeweils höheren Tris- bzw. HEPES-Konzentration tendenziell besser aus.

Die geringste Oberflächenadsorption wurde in einer Lösung aus 20 mmol/l Natriumchlorid und 0,01 % (m/V) BSA beobachtet. Diese Lösung verfügt jedoch über keine

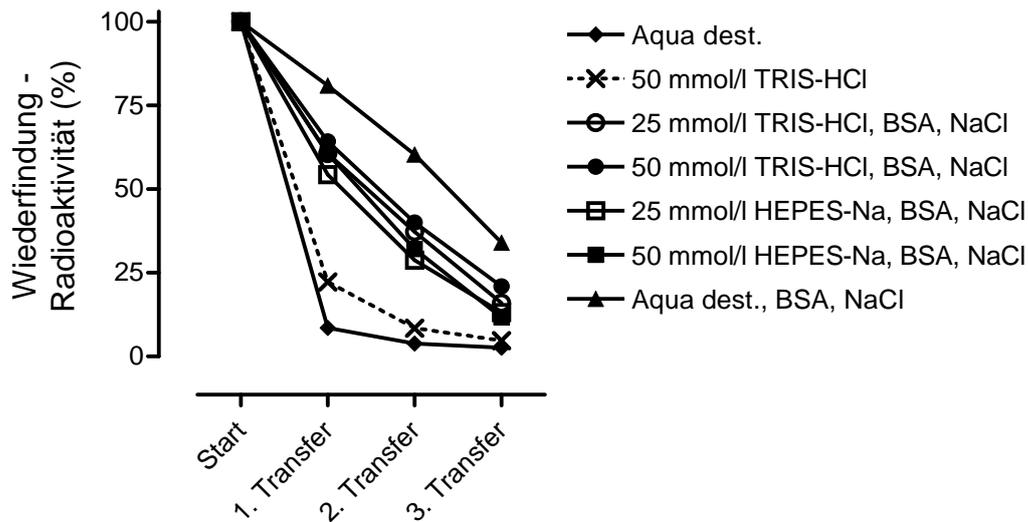


Abb. 3.16: Abhängigkeit der Adsorption von $[^3\text{H}]$ Vinblastin an PP-Oberflächen von der Pufferzusammensetzung. Alle Puffer wurden auf pH 7,4 eingestellt, BSA in einer Konzentration von 0,01 % (m/V) und Natriumchlorid in einer Konzentration von 20 mmol/l eingesetzt. Die gestrichelte Linie zeigt die Ergebnisse für den von Martin et al. [82] verwendeten Bindungspuffer (50 mmol/l Tris, pH 7,4). Dargestellt sind die gemittelten Messwerte eines repräsentativen Experimentes.

Pufferkapazität und konnte daher nicht direkt in den Bindungsexperimenten eingesetzt werden. Sie wurde jedoch stets zur Verdünnung der Radioligandstammlösung verwendet.

Filterbindung

Es ist möglich, dass ein Radioligand eine verdrängbare Filterbindung zeigt [143]. Bei Bindungsstudien an α_1 -Adrenorezeptoren mit $[^3\text{H}]$ Prazosin wurde beispielsweise neben der Bindung des Radioliganden an Glas auch eine Bindung an den eingesetzten Glasfaserfilter beobachtet [144]. Prazosin interagiert bekanntermaßen mit P-gp [31], was zumindest eine partielle Übereinstimmung mit den Eigenschaften von Vinblastin darstellt. Wegen der zuvor nachgewiesenen Adsorption von $[^3\text{H}]$ Vinblastin an Glasoberflächen wurde geprüft, ob eine spezifische Bindung von $[^3\text{H}]$ Vinblastin an das verwendete Glasfaser-Filtermaterial (Filtermat A, Wallac) messbar ist. Abbildung 3.17 zeigt die Gesamt- und die unspezifische Filterbindung in Gegenwart steigender Radioligandkonzentrationen in Form eines repräsentativen Experimentes.

Insgesamt stieg die filtergebundene Radioaktivität über den untersuchten Konzentrationsbereich leicht an. Einzig bei einer Konzentration von 12 nmol/l $[^3\text{H}]$ Vinblastin fielen die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung wesentlich höher aus. Im

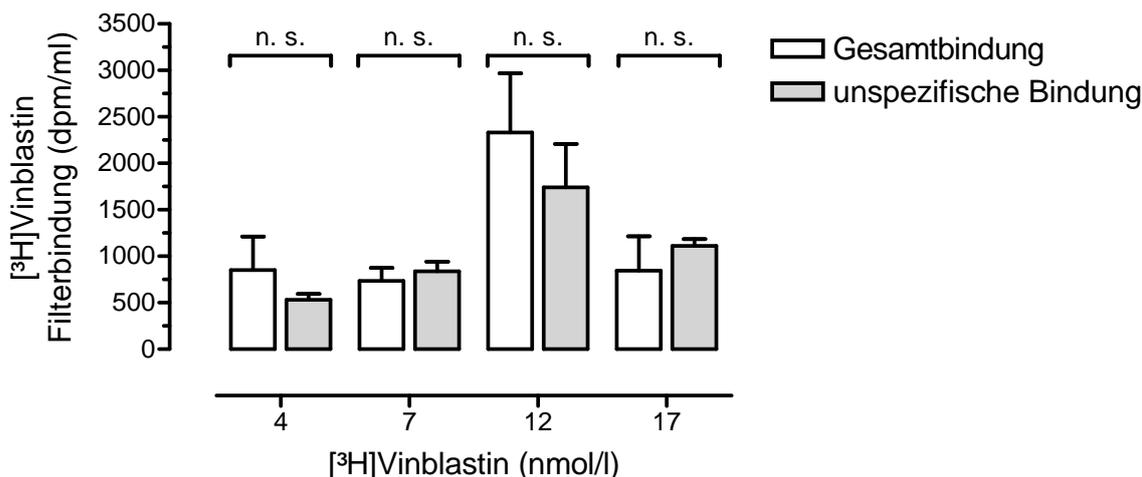


Abb. 3.17: Filterbindung in Abhängigkeit von der [³H]Vinblastin-Konzentration. Die Abbildung zeigt die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung (in Gegenwart von 10 μ mol/l Verapamil) an das Filtermaterial bei pH 7,4. Der Bindungspuffer setzte sich aus 25 mmol/l HEPES, 20 mmol/l NaCl und 0,01 % (m/V) BSA zusammen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler der Messwerte eines repräsentativen Experimentes (n. s. nicht signifikant verschieden, $P < 0,05$).

untersuchten Konzentrationsbereich von 4–12 nmol/l [³H]Vinblastin wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Gesamt- und unspezifischer Filterbindung beobachtet. Mit anderen Worten, eine spezifische Filterbindung von [³H]Vinblastin konnte nicht festgestellt werden. Die Befunde sprechen darüber hinaus gegen eine mittels Filtration messbare spezifische [³H]Vinblastin Bindung an das eingesetzte BSA.

Einfluss der Pufferzusammensetzung auf die spezifische Bindung

Nachdem die Pufferzusammensetzung im Hinblick auf eine Minimierung der Oberflächenadsorption von [³H]Vinblastin optimiert worden war, wurde der Einfluss des Pufferbestandteils BSA auf die spezifische Bindung an P-gp-haltige Membranen genauer untersucht. Es ist bekannt, dass Vinblastin an Plasmaeiweiße binden kann [140]. Daher stellt sich die Frage, ob der Einsatz von BSA als Antiadsorbens die Konzentration des freien Radioliganden herabsetzt [143] und so zu einer Verringerung der gemessenen spezifischen P-gp Bindung führt. Abbildung 3.18 zeigt die Auswirkung von BSA auf die spezifische Bindung von [³H]Vinblastin an eine Membranpräparation aus CHO-K1 M403 Zellen. Im Gegensatz zu den angestellten Überlegungen führte der BSA-Zusatz nicht zu einer Abnahme der spezifischen

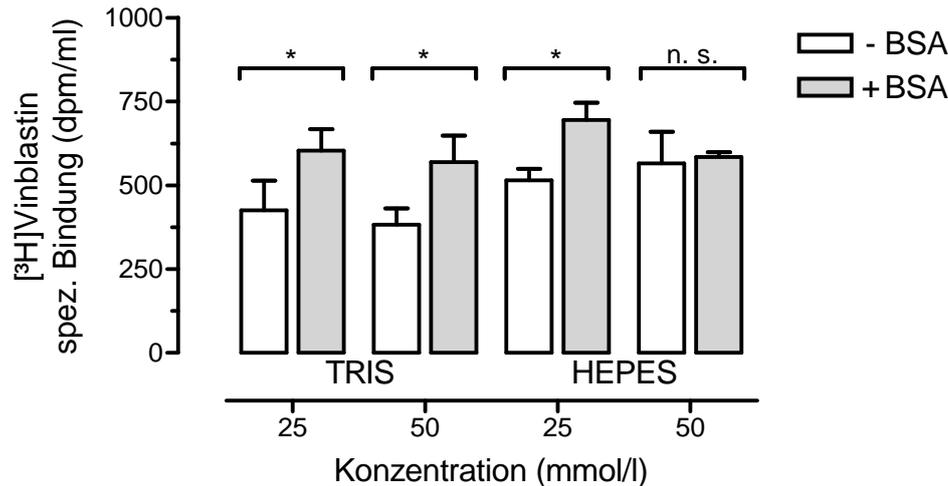


Abb. 3.18: Spezifische [^3H]Vinblastin-Bindung an Membranpräparationen aus CHO-K1 M403 Zellen in Abhängigkeit von der Pufferzusammensetzung. Die Abbildung zeigt die spezifische Bindung von [^3H]Vinblastin (9 nmol/l) bei pH 7,4 und den angegebenen Tris- und HEPES-Konzentrationen in An- und Abwesenheit von 0,01 % (m/V) BSA in 20 mmol/l NaCl. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler der Ergebnisse dreier unabhängiger Experimente, welche als Fünffachbestimmungen durchgeführt wurden. Die Mittelwerte wurden mittels t-Test verglichen und signifikante Unterschiede gekennzeichnet (*, $P < 0,05$).

Bindung. In drei Fällen wurde stattdessen eine signifikant ($P < 0,05$) höhere spezifische Bindung beobachtet. Dies deutet auf eine erhöhte Konzentration des freien Radioliganden durch die gewünschte antiadsorptive Wirkung des BSAs hin. Nur bei Verwendung von 50 mmol/l HEPES führte der Zusatz von BSA zu nicht signifikant unterschiedlichen Ergebnissen. Da in Bindungspuffer aus 25 mmol/l HEPES (pH 7,4), 20 mmol/l Natriumchlorid und 0,01 % (m/V) BSA insgesamt die höchste spezifische [^3H]Vinblastin-Bindung beobachtet worden war, wurde dieser Puffer in den folgenden Bindungsexperimenten als Standardbindungspuffer eingesetzt.

3.5.2 Homologe und heterologe Konkurrenzexperimente

Mit dem optimierten Bindungspuffer konnten anschließend an einer Membranpräparation aus CHO-K1 M403 Zellen Konkurrenzexperimente durchgeführt werden. Vor Beginn der Untersuchungen der Testsubstanzen wurde jedoch zunächst die Membranfraktion der Kontrollzelllinie CHO-K1 pcDNA auf eine verdrängbare [^3H]Vinblastin Bindung überprüft. Die spezifische [^3H]Vinblastin Bindung an die Kontrollmembranen betrug 25 % der spezifischen Bindung an die Membranfraktion der CHO-K1 M403

Zellen nach Transfektion mit humanem P-gp. Diese Residualbindung wurde auf die intrinsische P-gp Expression in CHO-K1 Zellen (siehe Kapitel 3.1.3) zurückgeführt und ihr Nachweis als Hinweis auf eine ausreichende Empfindlichkeit des gewählten Versuchsaufbaus gewertet.

In Abbildung 3.19 sind repräsentative Ergebnisse für homologe Kompetitionen zwischen [^3H]Vinblastin und nicht markiertem Vinblastin sowie heterologe Kompetitionen zwischen [^3H]Vinblastin und fünf Testsubstanzen dargestellt. Es ist die Gesamtbindung aufgetragen. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 10 $\mu\text{mol/l}$ Verapamil bestimmt; ihr Anteil an der [^3H]Vinblastin-Gesamtbindung entsprach etwa 30 % und war mit den in der Literatur [80, 132] angegebenen Werten von 20 - 30 % vergleichbar.

Die [^3H]Vinblastin Bindung wurde von allen Testsubstanzen konzentrationsabhängig vermindert. Die Auswertung der Versuchsdaten erfolgte mit der vier Parameter logistischen Gleichung (Gleichung (9), siehe Kapitel 2.7.2). Dabei wurde mittels F-Test geprüft, ob eine variable Steigung n eine signifikant bessere Anpassung lieferte als eine auf $n = -1$ fixierte Steigung ($P < 0,05$). Mit Ausnahme von Substanz H15, bei der dies der Fall war und die Hemmkurve steiler verlief, wurden alle übrigen Anpassungen mit $n = -1$ vorgenommen.

Für jede Testsubstanz wurden insgesamt drei unabhängige Wettbewerbsexperimente mit [^3H]Vinblastin durchgeführt. Durch Analyse der spezifischen Bindung der homologen Kompetitionen nach DeBlasi et al. [79] (siehe Kapitel 2.7.1) wurde die maximale Zahl der Bindungsstellen B_{max} ermittelt. Sie betrug $B_{\text{max}} = 30 \pm 5 \text{ pmol/mg}$ ($\bar{x} \pm s_M$), was einem P-gp Anteil von etwa 0,5 % (m/m) am Gesamtproteingehalt der Membranpräparation entspricht. Damit lag der P-gp Anteil in der Membran deutlich unter demjenigen der in der Literatur verwendeten Membranen. Dieser wurde mit 1,5 % (m/m) [32] bis 2,9 % (m/m) [131] angegeben. Die niedrige Expressionsrate war ein Grund für das relativ kleine Messfenster und die damit verbundenen Messwertschwankungen. Mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Membranprotein wurde schon die höchste in den Vergleichsarbeiten angegebene Membranmenge eingesetzt [132], dennoch blieb das Signal mäßig detektierbar. Durch eine weitere Erhöhung der eingesetzten Membranmenge hätte das Messfenster voraussichtlich vergrößert werden können. Jedoch waren die Protein- und P-gp-Ausbeuten bei den folgenden Membranpräparationen dieser Arbeit geringer als bei der ersten Membranpräparation, so dass dieser Ausweg nicht gangbar war.

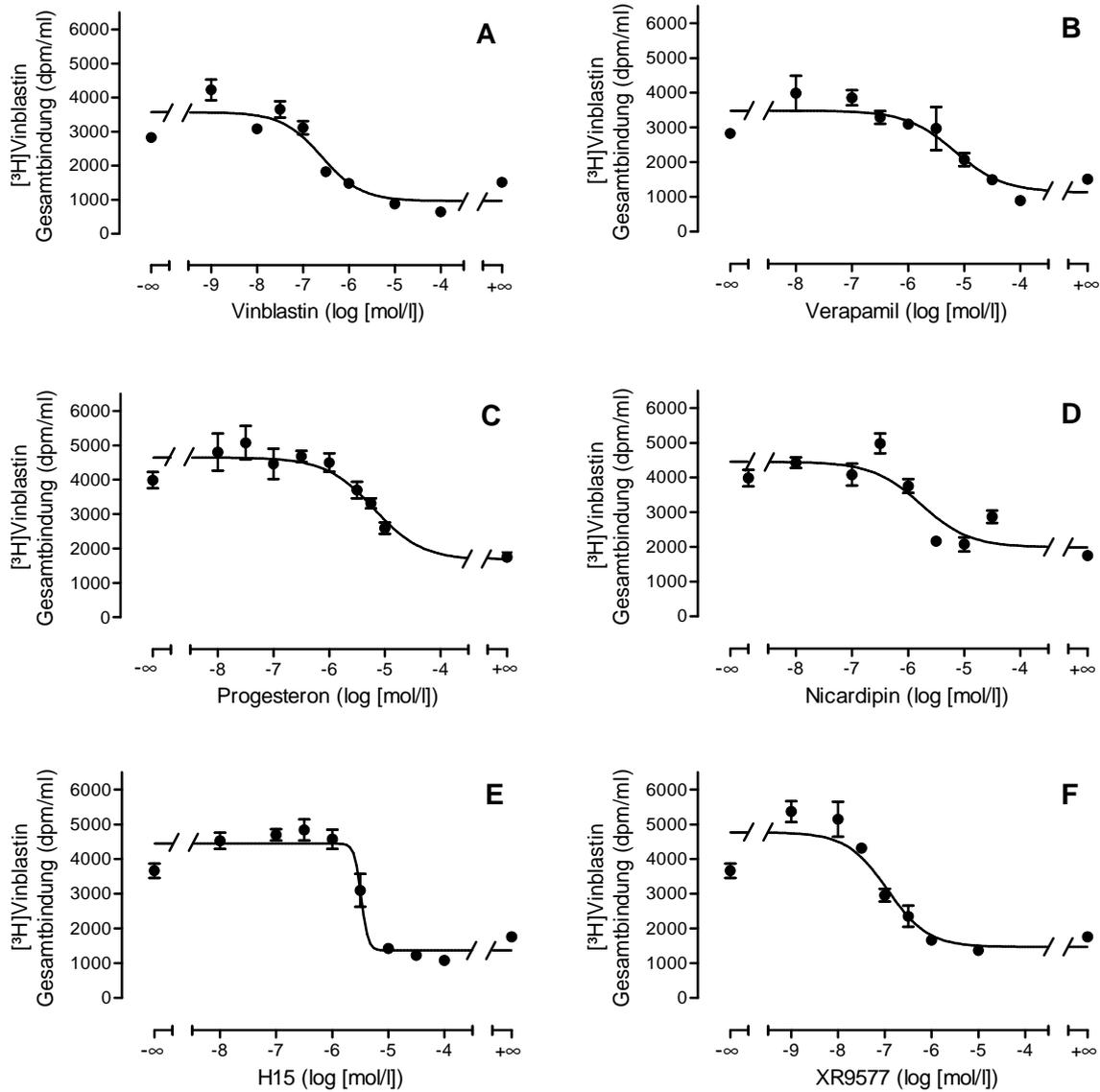


Abb. 3.19: $[^3\text{H}]\text{Vinblastin}$ (8 nmol/l) Gesamtbindung in An- und Abwesenheit steigender Konzentrationen von nicht markiertem Vinblastin (A), Verapamil (B), Progesteron (C), Nicardipin (D), H15 (E), und XR9577 (F) an P-gp enthaltende Membranpräparationen aus CHO-K1 M403 Zellen (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ansatz). Dargestellt sind in dpm/ml jeweils Mittelwerte und Standardfehler repräsentativer Experimente, die als Fünffachbestimmungen durchgeführt wurden.

Wie beschrieben, erfolgte die Präparation der Membranfraktion in Übereinstimmung mit Lever et al. [59] (vgl. Kapitel 2.2.8 und Kapitel 3.1.3). Mit dieser Methode konnte aus dem Zellhomogenat durch differenzielle Zentrifugation eine Fraktion mit erhöhtem P-gp Gehalt gewonnen werden. Diese enthielt jedoch insgesamt sehr wenig Protein. So wurden je nach eingesetzter Zelllinie und Zellzahl nur noch etwa

die Hälfte (3,6 mg bis 6,5 mg) der in der ersten Membranpräparation aus CHO-K1 M403 erhaltenen Proteinmenge (10,6 mg) erreicht. Zudem wurden bezüglich der P-gp Anreicherung für CHO-K1 M403 Zellen bessere Ergebnisse erzielt als für A2780adr Zellen (siehe Kapitel 3.1.3). So ergaben Western-Blots der verschiedenen Membranfraktionen einen höheren P-gp Gehalt in Membranen aus CHO-K1 M403 Zellen als in Membranen aus A2780adr Zellen. Aufgrund dieser Beobachtungen kann geschlossen werden, dass das Protokoll der Membranpräparation an die jeweils verwendete Zelllinie angepasst werden muss. Da mit keiner der beiden Zelllinien eine zufriedenstellende Proteinausbeute erzielt wurde, konnte die im Bindungsversuch eingesetzte Membranmenge nicht erhöht werden.

Eine nahe liegende Lösung dieses Problems wäre der Einsatz P-gp-haltiger Membranpräparationen aus *Saccharomyces cerevisiae* gewesen. Diese wurden mit hohen Ausbeuten präpariert und enthielten bis zu 4% (m/m) P-gp bezogen auf den Gesamtproteingehalt (vgl. Kapitel 3.2.2). Bei Vorversuchen konnte jedoch unter den gewählten Versuchsbedingungen keine spezifische [³H]Vinblastin Bindung nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung könnte in den unterschiedlichen Eigenschaften der Membranen aus Hefen und Säugetierzellen zu suchen sein. Hefemembranen enthalten statt des Steroids Cholesterol das Steroid Ergosterol. Diese Steroide senken u. a. die Durchlässigkeit der Lipiddoppelschicht und erhöhen die Rigidität der Membran [114]. Der Effekt von Ergosterol ist dabei stärker ausgeprägt als der von Cholesterol. Aufgrund der erhöhten Rigidität der Hefemembranen wird P-gp vermutlich in eine Konformation gezwungen, die die Bindung des Radioliganden verhindert. Dies böte eine Erklärung dafür, weshalb an diesen Membranen keine spezifische [³H]Vinblastin Bindung beobachtet wurde.

Die unter Verwendung von CHO-K1 M403 Zellen erhaltene spezifische Bindung aus unabhängigen Kompetitionsexperimenten mit den Testsubstanzen wurde normalisiert, gemittelt und erneut mit Hilfe der nichtlinearen Regression analysiert. In Abbildung 3.20 A–E sind die Ergebnisse der Regressionsanalysen grafisch dargestellt. Sie wurden zur Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D von Vinblastin sowie der substanzspezifischen Inhibitionskonstanten K_i der Testsubstanzen mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Korrektur [78] (siehe Kapitel 2.7.1) genutzt.

Der negative dekadische Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten für [³H]Vinblastin wurde mit $pK_D = 6,50 \pm 0,20$ ($\bar{x} \pm s_M$, $K_D = 315$ nmol/l) bestimmt. Bennet und Yamamura [143] postulierten aufgrund theoretischer Überlegungen, dass Radioligand-Rezeptor-Komplexe von Radioliganden mit einem K_D -Wert oberhalb

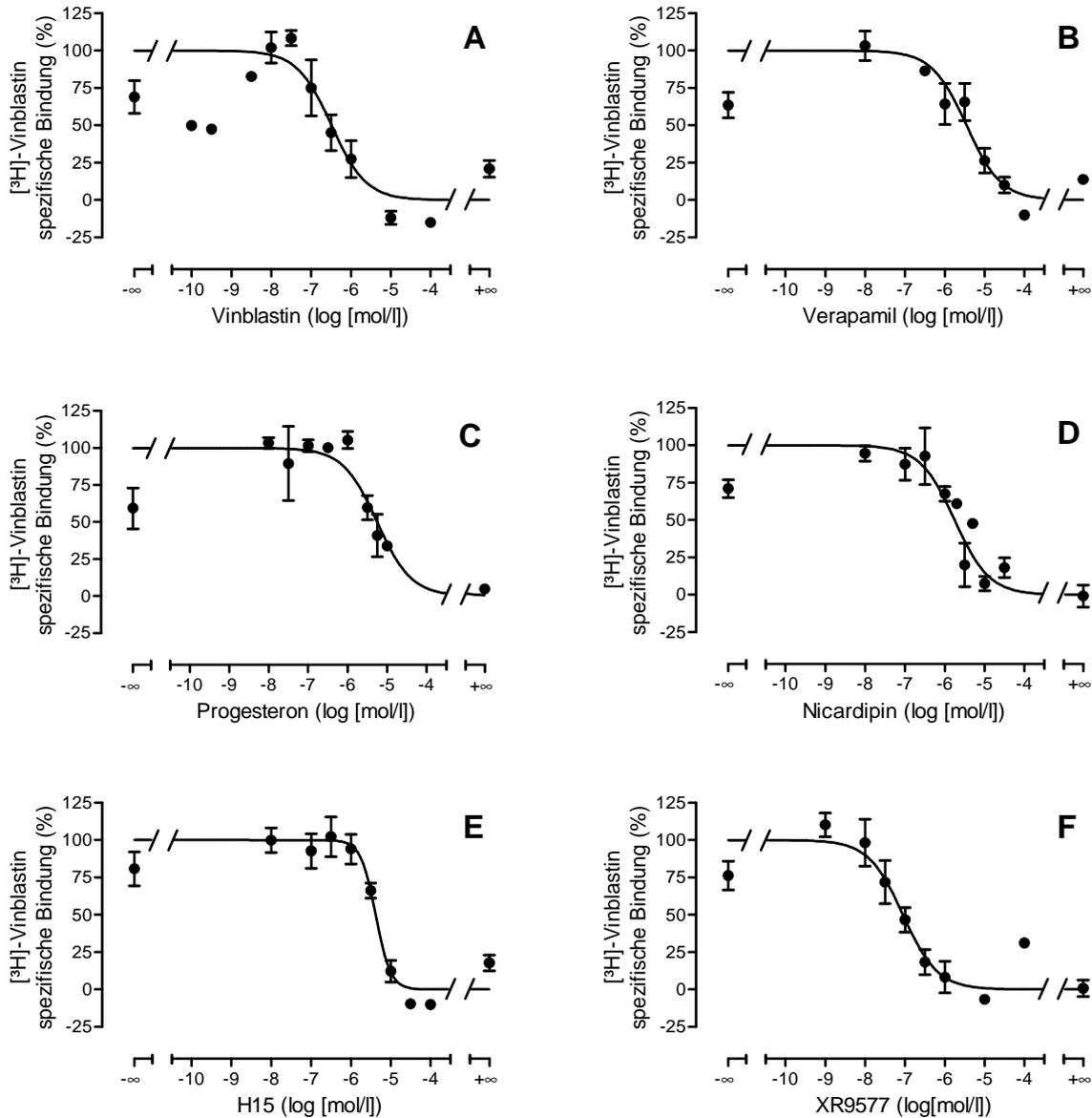


Abb. 3.20: Spezifische $[^3\text{H}]$ Vinblastin Bindung in Ab- und Anwesenheit steigender Konzentrationen von nicht markiertem Vinblastin (A), Verapamil (B), Progesteron (C), Nicardipin (D), H15 (E), und XR9577 (F) an P-gp enthaltende Membranpräparationen aus CHO-K1 M403 Zellen. Die spezifische Gesamtbindung vor der Normalisierung variierte zwischen 935 ± 177 dpm/ml und 2233 ± 532 dpm/ml. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardfehler dreier unabhängiger Experimente, die als Fünffachbestimmungen durchgeführt wurden.

von 10 nmol/l üblicherweise nicht mittels Filtration abgetrennt werden können. Bei Radioliganden mit einer Affinität unterhalb dieser Grenze, würden mehr als 10 % der Komplexe während der Filtration dissoziieren und so das Versuchsergebnis verfälscht. Wird die Beispielrechnung auf den für [³H]Vinblastin bestimmten K_D -Wert von 315 nmol/l übertragen, bedeutet dies, dass die Filtration in maximal 0,33 s durchgeführt werden müsste, damit eine mehr als 10 %ige Dissoziation des Komplexes verhindert wird. In der Praxis ist eine derart kurze Trennzeit, also die Zeit für Filtration und die Waschschritte, nicht erreichbar. Grundlage für die Berechnung durch Bennet und Yamamura [143] war jedoch eine für Antagonisten an Neurotransmitterrezeptoren typische Assoziationsgeschwindigkeitskonstante von $k_{+1} = 10^6 \text{ [mol/l]}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die erneute Berechnung auf Grundlage der von Martin et al. [82] für [³H]Vinblastin an P-gp bestimmten Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten ($k_{+1} = 8000 \text{ [mol/l]}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ergibt dagegen eine maximale Trennzeit von 41 s, in der die Abtrennung der Radioligand-Rezeptor-Komplexe durchgeführt werden kann. Somit wird verständlich, weshalb in der vorliegenden Arbeit das Filtrationsverfahren auch bei einem relativ niedrigaffinen Radioliganden wie [³H]Vinblastin anwendbar und eine spezifische [³H]Vinblastin Bindung messbar war.

Der experimentell ermittelte K_D -Wert war vierfach höher als der höchste von Martin et al. (10 nmol/l [32] bis 80 nmol/l [134]) bei Verwendung P-gp-haltiger Membranpräparationen beschriebene K_D -Wert für [³H]Vinblastin. Trotz der durchgeführten Vorversuche ist der Einsatz von BSA als Antiadsorbent ein möglicher Grund für die Abweichung des experimentell bestimmten K_D -Wertes von den Literaturdaten [143]. Zwar wurde auf den Filtern keine Hinweise auf eine [³H]Vinblastin Bindung an BSA gefunden, dennoch kann eine Bindung des Radioliganden an das lösliche BSA nicht ausgeschlossen werden. Wie bereits erwähnt, würde die Konzentration an frei in Lösung vorliegendem Vinblastin im Reaktionsansatz dadurch herabgesetzt. Dies beträfe sowohl markiertes als auch nicht markiertes Vinblastin und könnte gegenüber einer Situation ohne Wegbindung, durch die verminderte Konzentration an freiem unmarkiertem Vinblastin, eine nach rechts verschobene Vinblastin Inhibitionskurve nach sich ziehen. Mit anderen Worten: Die Bindungsaffinität von Vinblastin würde unterschätzt. Aufgrund der ausgeprägten Adsorption des Radioliganden an die verwendeten PP-Mikrotiterplatten (s. o.) konnte jedoch nicht auf den BSA-Zusatz verzichtet werden.

Die pK_i -Werte und die Steigungen der Inhibitionskurven n der fünf Testsubstanzen sind in Tabelle 3.13 zusammengefasst. Da die Steigung der Inhibitionskurve für die

Tab. 3.13: Parameter der Bindung der Testsubstanzen an P-gp-haltige Membranpräparationen aus CHO-K1 M403 Zellen ermittelt in kompletten Inhibitionsversuchen mit [³H]Vinblastin. Tabelliert sind $\bar{x} \pm s_M$ des negativen dekadischen Logarithmus der Inhibitionskonstantem K_i (pK_i) bzw. im Fall von H15 die apparente Inhibitionskonstante K_{app} (pK_{app}) sowie die Steigung (n) am Wendepunkt der Kurve. Die Werte wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse aus den Daten dreier unabhängiger Inhibitionsexperimente ermittelt.

Substanz	pK_i/pK_{app}	n
H15	$5,39 \pm 0,04$	$-2,33 \pm 0,45$
Nicardipin	$5,77 \pm 0,07$	-1 (konst.)
Progesteron	$5,26 \pm 0,10$	-1 (konst.)
Verapamil	$5,47 \pm 0,12$	-1 (konst.)
XR9577	$7,06 \pm 0,08$	-1 (konst.)

Substanz H15 signifikant verschieden von $n = -1$ ist, wird mit der Cheng-Prusoff-Korrektur für diese Substanz nur eine apparente Inhibitionskonstante K_{app} erhalten. Ein Vergleich der pK_i - und pK_{app} -Werte mittels einer One-way ANOVA Analyse ergab, dass der pK_i -Wert von XR9577 signifikant größer war als der der anderen Substanzen. Die Substanz XR9577 zeigte, wie aus der Literatur erwartet [32], die höchste Affinität. Keinen signifikanten Unterschied ergab hingegen der Vergleich der Inhibitionskonstanten der verbleibenden vier Substanzen untereinander ($P > 0,05$).

Die Auswertung der heterologen Kompetitionsexperimente mit dem Phenothiazin H15 ergab ein Steilheitsmaß der Kurve von $n = -2,33$. Wie bereits in Kapitel 2.7.2 erwähnt, kann dies als Hinweis auf eine homotrope positive Kooperativität gewertet werden, also eine Bindungsförderung der Inhibitor-Moleküle untereinander, die die Hemmung der Bindung des Radioliganden verstärkt. Eine derartige Interpretation der Kurvensteilheit legt das Vorliegen von zwei Bindungsstellen für H15 nahe. Eine komplexe Topologie der Ligandbindung mit mehr als nur einer Inhibitorbindungsstelle am P-gp wurde bereits von Martin et al. [32] beschrieben.

Die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse sollte nun an weiteren Membranpräparationen aus CHO-K1 M403 und A2780adr Zellen überprüft werden. Aufgrund der sehr niedrigen Gesamtproteinausbeuten bei diesen Membranpräparationen wurden die Experimente als Einpunkt-Bestimmungen durchgeführt. Die Testsubstanzen wurden dabei in Konzentrationen eingesetzt, die den in der ersten Versuchsserie ermittelten IC_{50} -Konzentrationen für die Hemmung der spezifischen [³H]Vinblastin Bindung entsprachen. Die spezifische [³H]Vinblastin Bindung in Gegenwart der IC_{50} -

Konzentrationen der Testsubstanzen aus der initialen Versuchsreihe mit der ersten Membranpräparation wurde in ein xy -Koordinatensystem, wie in Abbildung 3.20 gezeigt, eingetragen. Anschließend wurde eine Kurvenanpassung mit der vier Parameter logistischen Gleichung durchgeführt, indem das obere und das untere Plateau der Kurve auf 100 % bzw. 0 % konstant gesetzt wurden. Darüber hinaus wurde die Kurvensteilheit auf den jeweiligen Wert festgesetzt, der im Rahmen der ersten Versuchsserie ermittelt worden war (vergleiche Tabelle 3.13). Durch diese Vorgehensweise konnte trotz nur eines Messpunktes pro Testsubstanz eine Abschätzung eines IC_{50} -Wertes erreicht werden. Diese wurden zur Erstellung von Affinitätsprofilen mit Hilfe weiterer Membranpräparationen genutzt. Der Vergleich des durch die vollständigen Kompetitionen erhaltenen Affinitätsprofils in Abbildung 3.21 A mit den durch die Einpunkt-Bestimmung generierten Profilen in den Abbildungen 3.21 C–D ergibt eine gute Übereinstimmung und spricht für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Im Gegensatz zu den Vergleichswerten, war die Substanz H15 auf dem IC_{50} Niveau in zwei Fällen wirksamer als Verapamil. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die H15-Kurve sehr steil verläuft und sich die Inhibitionskonstanten dieser beiden Substanzen ohnehin nicht signifikant unterschieden, wurde dieser Beobachtung keine weitere Bedeutung zugemessen.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode konnte die konzentrationsabhängige Verdrängung von gebundenem [3H]Vinblastin durch fünf strukturell unterschiedliche Testsubstanzen an P-gp-haltigen Membranen aus CHO-K1 M403 Zellen und A2780adr Zellen gezeigt werden. Der Wirkungsmechanismus des Zytostatikums Vinblastin beruht auf der Bindung an Tubulin. Dadurch wird die Tubulinpolymerisation gehemmt und die Zellteilung unterbunden [145]. Es stellt sich also die Frage, ob die beobachtete [3H]Vinblastin Bindung spezifisch für P-gp ist oder auf eventuell ebenfalls in der Membranpräparation enthaltene Tubulinproteine zurückgeführt werden kann. Die [3H]Vinblastin Bindung an embryonales Tubulin aus dem Hirn von Hühnern und an Tubulin aus Seeigel Spermaschwanzzellen [146] zeigte mit $K_D = 30 \mu\text{mol/l}$ einen 100fach höheren K_D -Wert als der in der vorliegenden Arbeit ermittelte ($K_D = 0,3 \mu\text{mol/l}$, vergleiche Tabelle 3.14). Darüber hinaus konnte an nicht P-gp exprimierenden Zellen nachgewiesen werden, dass sich Vinblastin nicht durch Verapamil oder Nifedipin kompetitiv aus seiner Bindung an das Tubulin verdrängen lässt [147, 148]. Diese Literaturbefunde wurden deshalb als weitere Hinweise dafür gewertet, dass der in dieser Arbeit gemessenen [3H]Vinblastin Bindung eine spezifische Wechselwirkung mit P-Glykoprotein zugrunde liegt.

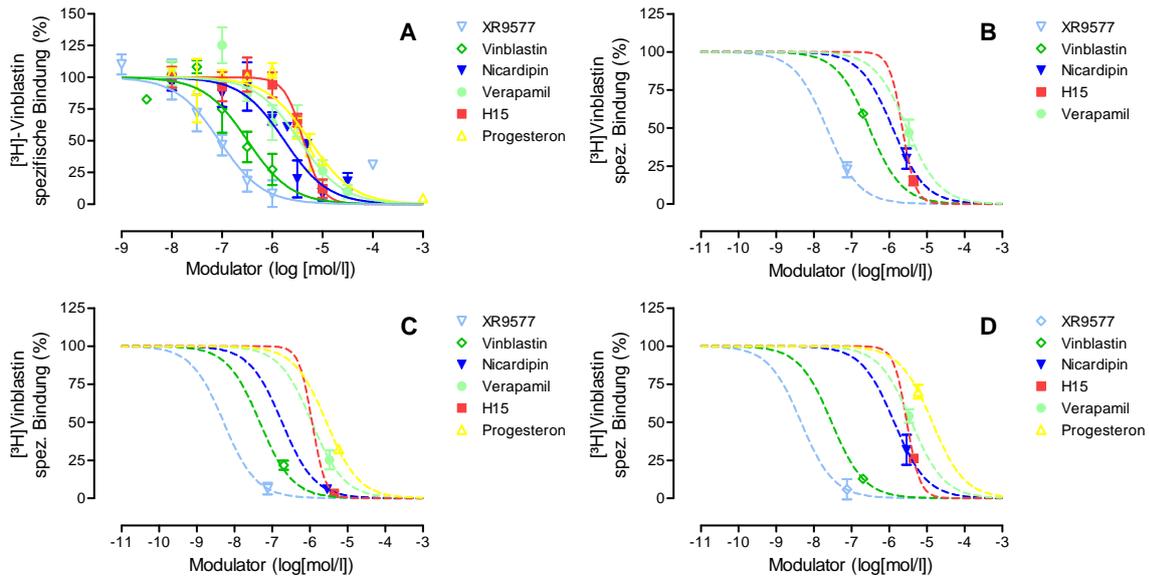


Abb. 3.21: Einfluss von nicht markiertem H15, Nicardipin, Progesteron, Verapamil, Vinblastin und XR9577 auf die $[^3\text{H}]$ Vinblastin Bindung an P-gp enthaltende Membranpräparationen aus CHO-K1 M403 und A2780adr Zellen. Abbildung A zeigt das anhand der mit den Testsubstanzen durchgeführten Gleichgewichtsbindungsexperimente erstellte Affinitätsprofil. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardfehler dreier unabhängiger Experimente, die als Fünffachbestimmungen durchgeführt wurden. Die Affinitätsprofile in den Abbildungen B, C und D wurden mit der Einpunkt-Methode an weiteren Membranpräparationen aus CHO-K1 M403 Zellen (B, C) und A2780adr Zellen (D) bestimmt. Dargestellt sind hier Mittelwert und Standardfehler der spezifischen $[^3\text{H}]$ Vinblastin Bindung aus Fünffachbestimmungen in Gegenwart einer Konzentration der jeweiligen Testsubstanz, die in der ersten Versuchsserie ihrer IC_{50} Konzentration entsprach. Die gestrichelten Kurven wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse mittels der vier Parameter logistischen Gleichung erhalten. Die Wendepunkte wurden bestimmt durch Übernahme der Kurvensteilheit aus den vollständigen Bindungskurven (vergleiche Abbildung A und Tabelle 3.13) und durch Konstantsetzen des oberen und unteren Plateaus auf 100 % bzw. 0 % spezifische Bindung. Die Legende führt die Testsubstanzen jeweils in der Reihenfolge abnehmender Affinität auf.

Die Substanz XR9577 zeigte bei den durchgeführten Konkurrenzexperimenten die höchste Affinität. Sie wurde stellvertretend für XR9576 eingesetzt, dem Modulator mit der bisher höchsten Affinität zu P-gp [32]. Beide Modulatoren sind strukturell eng miteinander verwandt. In funktionellen Studien zur Akkumulation von $[^3\text{H}]$ Daunorubicin musste zwar im Vergleich zu den Bindungsexperimenten eine etwa vierfach höhere XR9577 Konzentration zur halbmaximalen Inhibierung des P-gp vermittelten Transports eingesetzt werden, dennoch ist auch diese Substanz ein potenter MDR Modulator der dritten Generation [149]. Auch die Affinität der Testsubstanzen Vinblastin, Nicardipin und Verapamil zu P-gp wurde bereits in

der Literatur untersucht [80, 81, 130]. Dabei zeigte Vinblastin stets die höchste Affinität, gefolgt von Nicardipin und schließlich Verapamil. Unter Vernachlässigung der Tatsache, dass in dieser Arbeit kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Inhibitionskonstanten von Nicardipin und Verapamil beobachtet wurde, zeigt sich hier eine weitere qualitative Übereinstimmung mit Literaturdaten. Im direkten Vergleich fällt jedoch eine deutliche Verschiebung der K_D -Werte für Vinblastin und der K_i -Werte der beiden anderen Substanzen zu niedrigeren Affinitäten auf. Dies ist in Tabelle 3.14 durch eine Gegenüberstellung mit Literaturwerten verdeutlicht. In den Vergleichsarbeiten lagen die Dissoziationskonstanten von Vinblastin zwischen $K_D = 8$ nmol/l und $K_D = 23$ nmol/l. Dem gegenüber steht mit der in dieser Arbeit bestimmten Dissoziationskonstanten von $K_D = 315$ nmol/l eine 14- bis 39fach niedrigere Affinität. Für Nicardipin und Verapamil ergeben sich etwa sechsfach bis zwölffach niedrigere Affinitäten. Die größten Unterschiede werden für Vinblastin beobachtet; dies gilt auch für den Vergleich der Literaturdaten untereinander. Für die verbleibenden Substanzen H15 und Progesteron lagen keine Literaturdaten vor, so dass hier kein Vergleich gezogen werden konnte.

Da bei den drei Testsubstanzen eine systematische Verschiebung zu niedrigeren Affinitäten vorliegt, deutet diese Abweichung auf eine gemeinsame Ursache hin. Ein möglicher Einfluss des BSA Zusatzes wurde bereits im Zusammenhang mit der [^3H]Vinblastin Kontrollbindung beschrieben (s. o.). Viele bekannte Modulatoren und P-gp Substrate neigen aufgrund ihrer hohen Lipophilie ebenfalls zur Bindung an Serumalbumin. So wurde z. B. für Verapamil und für Nifedipin, das strukturell eng mit Nicardipin verwandt ist, unter physiologischen Bedingungen eine Plasmaeiweißbindung von über 90% ermittelt [145]. Somit wäre bei Konkurrenzexperimenten eine Absenkung der Konzentration des freien Radioliganden und des freien Kompetitors zu erwarten, die eine quantitative Aussage über die Fähigkeit des Kompetitors zur

Tab. 3.14: Vergleich der für Vinblastin bestimmten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D und der für Nicardipin und Verapamil bestimmten Gleichgewichtsinhibitionskonstanten K_i mit Literaturwerten.

Substanz	K_D (Vinblastin) bzw. K_i			
	diese Arbeit	Ferry 1992 [80]	Malkhandi 1994 [130]	Ferry 1995 [81]
Vinblastin	315 nmol/l	9 nmol/l	8 nmol/l	23 nmol/l
Nicardipin	1 760 nmol/l	153 nmol/l	179 nmol/l	173 nmol/l
Verapamil	3 490 nmol/l	600 nmol/l	383 nmol/l	452 nmol/l

Verdrängung des Liganden aus seiner Bindung behindert. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit bietet die Tatsache, dass es sich bei P-Glykoprotein um ein komplex aufgebautes und funktionierendes Transportprotein handelt, welches während eines Transportzykluses mehrere Konformationsänderungen durchläuft [27]. So wurden in Anwesenheit von ATP und Magnesiumionen bei Untersuchungen der P-gp ATPase-Aktivität Übergangszustände mit hoher und niedriger Substrataffinität nachgewiesen [26, 65, 133]. In der vorliegenden Arbeit wurde in Abwesenheit von ATP und Magnesiumionen gearbeitet, um möglichst nur eine reproduzierbare bindungsfähige P-gp Konformation zu erhalten. Dennoch könnten je nach Präparationsbedingungen der Membranen und Inkubationsbedingungen der Experimente unterschiedliche Konformationen und damit Bindungsvoraussetzungen vorgelegen haben, die ebenfalls Ursache für die in dieser Arbeit im Vergleich mit Literaturwerten beobachteten niedrigeren Affinitäten gewesen sein könnten.

3.5.3 Korrelation mit funktionellen Daten

Ein Hauptziel bei der Etablierung und Validierung eines Protokolls zur Durchführung von Radioligandbindungsstudien ist der Nachweis der spezifischen Bindung an das Zielprotein [150]. Die bisher vorgestellten und diskutierten Ergebnisse belegen eine sättigbare Bindung von [³H]Vinblastin an das Membranhomogenat. Damit ist zwar ein Basiskriterium zur Rezeptoridentifizierung erfüllt, jedoch reicht dieser Befund nicht aus, die beobachtete Bindung zweifelsfrei einer spezifischen Bindung an P-Glykoprotein zuzuordnen. Durch die Korrelation der Bindungsdaten mit funktionellen Daten, erhoben mit dem Calcein-AM Transportassay (weitere Details in Kapitel 3.1.2) und dem ATPase-Assay (weitere Details in Kapitel 3.3.3), sollte daher die Spezifität der Bindung an P-gp überprüft werden.

Es zeigte sich, dass die Bindungsdaten nicht mit den im Calcein-AM Transportassay ermittelten funktionellen Daten korrelierten (Abbildung 3.22 A). So musste zur Inhibition des Calcein-AM Transports eine zehnfach höhere Konzentration Vinblastin eingesetzt werden, als zur Besetzung der Hälfte der Bindungsstellen erwartet worden war. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Schlussfolgerungen die aus dem Vergleich von ATPase-Assay Daten und Calcein-AM Transportassaydaten gezogen wurden. Demzufolge werden die mit dem Calcein-AM Transportassay erhaltenen pEC_{50} -Werte auch von der Diffusionsgeschwindigkeit der untersuchten Substanzen

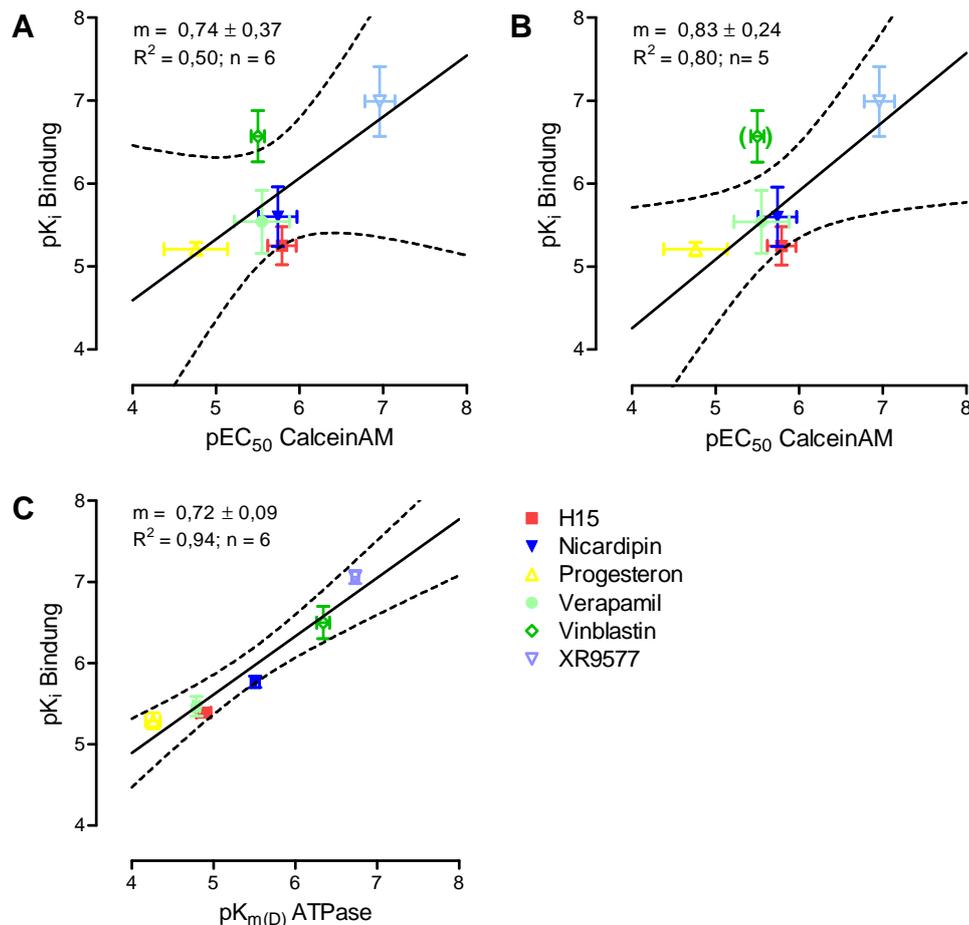


Abb. 3.22: Korrelation der Bindungsdaten mit funktionellen Daten aus dem Calcein-AM Transportassay (vergleiche Kapitel 3.1.2) und dem ATPase-Enzymassay (vergleiche Kapitel 3.3.3). Die Abbildungen A und B zeigen das Ergebnis der Korrelationsanalyse der Inhibitionskonstanten der Bindung pK_i und den pEC_{50} -Werten aus dem Calcein-AM Transportassay mit und ohne Berücksichtigung von Vinblastin. Die Punkte und Fehlerbalken entsprechen Mittelwert und Standardabweichung. In Abbildung C ist die Korrelation der Inhibitionskonstanten mit den entsprechenden $pK_{m(D)}$ -Werten aus dem ATPase-Enzymassay grafisch dargestellt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes.

beeinflusst. Aufgrund der langsamen Diffusion von Vinblastin sind daher relative hohe Konzentrationen zur Inhibierung des P-gp-vermittelten Calcein-AM Transports notwendig (siehe Kapitel 3.3.3). Unter Auslassung der Werte für Vinblastin ergab sich hingegen eine signifikante Korrelation zwischen den Bindungsdaten und den funktionellen Daten. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 3.22 B grafisch dargestellt.

Im Gegensatz zum Calcein-AM Transportassay korrelierten die Bindungsdaten sehr gut mit den im ATPase-Assay erhobenen Daten. In Abbildung 3.22 C ist deutlich zu erkennen, dass das für Vinblastin ermittelte Wertepaar nun auch innerhalb des

95 % Konfidenzintervalls liegt. Im Vergleich zur Korrelation mit den Calcein-AM Transportassaydaten ist die Korrelation zudem deutlich besser ($R^2 = 0,94$) und das Konfidenzintervall entsprechend sichtbar schmaler.

Zurückzuführen ist dies vermutlich auf den unterschiedlichen Aufbau der Testsysteme. Während für den Calcein-AM Transportassay ganze Zellen eingesetzt werden, wird die P-gp ATPase Aktivität an P-gp-haltigen Membranen [127] oder wie in dieser Arbeit an aufgereinigtem P-gp bestimmt. Ein systematischer Vergleich verschiedener Testsysteme ergab eine Korrelation der untersuchten Transportassays untereinander, jedoch wurde keine Korrelation mit Daten aus dem ATPase Assay gefunden [119]. Aus dieser Beobachtung wurde geschlussfolgert, dass Transportassays generell die Kompetition der Testsubstanz mit dem eingesetzten Substrat charakterisieren, während über die ATPase-Aktivität die Affinität der Testsubstanz für P-gp bestimmt wird [119]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bekräftigen diese These (siehe Kapitel 3.3.3). Deshalb kann die gute Korrelation der [^3H]Vinblastin Bindungsdaten mit den Daten des ATPase-Assays als deutlicher Hinweis darauf gewertet werden, dass es sich bei der in dieser Arbeit gemessenen [^3H]Vinblastin Bindung tatsächlich um eine molekulare Interaktion von Vinblastin mit P-gp handelt.

3.5.4 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend konnte eine Methode zur routinemäßigen Durchführung von Radioligand-Bindungsexperimenten an P-gp im Mikrotiterplattenformat etabliert werden. Hiermit wurden Übereinstimmungen mit Werten aus der Literatur und mit selbst erhobenen funktionellen Daten gefunden. Jedoch wurden im direkten Vergleich mit publizierten Bindungsdaten niedrigere Bindungskonstanten beobachtet. Die zukünftige Suche nach der Ursache hierfür sollte auch Alternativen zur Verhinderung der Wegbindung der Liganden und eine Optimierung der Pufferzusammensetzung im Hinblick auf eine für die Bindung optimale Konformation des P-Glykoproteins einschließen. Desweiteren sollten Wege zur Steigerung der Ausbeuten P-gp-haltiger Membranen beschritten werden, um das Messfenster zu vergrößern und die Streuung der Datenpunkte zu verringern. Dadurch würde die Anwendung des Bindungsprotokolls in Serienuntersuchungen erleichtert und die Durchführung kinetischer Bindungsexperimente möglich. Dennoch sprechen bereits die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente für die Durchführbarkeit von Bindungsuntersuchungen an P-gp im Mikrotiterplatten-Format.

Eine Verbesserung verspräche auch die Optimierung des bestehenden Präparations-Protokolls für A2780adr-Zellen. Diese Zellen zeigen eine deutlich höhere P-gp Oberflächenexpression als CHO-K1 M403 Zellen (vergleiche Kapitel 3.1.1) und sollten daher mit einem optimierten Protokoll Membranfraktionen mit höherem P-gp Anteil liefern können. Desweiteren wäre ein Radioligand mit höherer Affinität zu P-gp bei gleichzeitig schwach ausgeprägter Adsorption an Polypropylen oder Serumalbumin wünschenswert. Sofern das Phänomen der Wegbindung für XR9576 schwächer ausgeprägt ist, erscheint [³H]XR9675 hier als geeigneter Kandidat. Mit einer Dissoziationskonstanten von $K_D = 2,9 \text{ nmol/l}$ handelt es sich bis heute um den Radioliganden mit der höchsten Affinität für P-gp [32]. Leider ist er derzeit nicht kommerziell verfügbar, sondern müsste synthetisiert und anschließend radioaktiv markiert werden, um danach im Bindungsversuch hinsichtlich der Anwendbarkeit des in dieser Arbeit entwickelten Bindungsprotokolls untersucht werden zu können.

3.6 Photoaffinitätsmarkierung

Wie bereits in Kapitel 2.8 beschrieben, bietet die Photoaffinitätsmarkierung die Möglichkeit, Bindungsstellen innerhalb der Primärstruktur eines Proteins zu lokalisieren. Voraussetzung dafür ist, dass der verwendete Ligand über eine photoaktivierbare funktionelle Gruppe verfügt, das sogenannte Photophor. Nach der Ausbildung des Bindungsgleichgewichts kann diese Gruppe durch Bestrahlung der Probe mit ultraviolettem Licht (UV-Licht) in einen chemisch äußerst reaktiven Zustand überführt werden. Die sich anschließende Reaktion führt zur kovalenten Verknüpfung des Liganden mit dem Zielprotein [54]. Läuft diese Reaktion schneller ab als die Dissoziation des Protein-Ligand-Komplexes, erfolgt die Ausbildung der Bindung bevorzugt innerhalb der Bindungsstelle.

Üblicherweise werden als Photophore Arylazide, Phenyldiazirine oder Benzophenone eingesetzt [54]. Arylazide und Phenyldiazirine müssen dabei nachträglich an bekannte Liganden gekoppelt werden, während Benzophenon-Gruppen bisweilen Teilstrukturen bekannter Substanzen sind. Als Beispiel sei hier das Analgetikum Ketoprofen genannt [151]. Solche Substanzen verfügen über eine intrinsische Photoaktivierbarkeit und können somit unmittelbar für Photoaffinitätsmarkierungen verwendet werden. Weitere Vorteile der Benzophenone sind eine erhöhte chemische Stabilität und eine herabgesetzte Lichtempfindlichkeit im Vergleich zu den Arylaziden und Phenyldiazirine. Da zu ihrer Aktivierung lediglich UVA-Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 350\text{--}370\text{ nm}$ notwendig ist, wird häufig auch eine wesentlich geringere Schädigung des Proteins durch die Bestrahlung beobachtet [152]. Aufgrund dieser Eigenschaften sollten erste Photoaffinitätsmarkierungen mit dem Benzophenon-Photophor durchgeführt werden. Daher wurden bekannte P-gp Modulatoren auf diese Teilstruktur geprüft und schließlich die Substanzen H19, Progesteron und WK-X-87 ausgewählt.

3.6.1 Photochemische Eigenschaften der ausgewählten Modulatoren

Während H19 und WK-X-87 über das beschriebene Benzophenon-Photophor verfügen, handelt es sich bei Progesteron um ein α,β -ungesättigtes Keton. Diese Teilstruktur zeigt bei Aktivierung mit UV-Licht eine dem Benzophenon ähnliche Reaktion

[54, 153]. Progesteron wurde bereits erfolgreich zur Photoaffinitätsmarkierung an P-gp eingesetzt [154]. Die Strukturformeln des Phenothiazins H19, des Steroids Progesteron und des Dihydroisochinolinethylenphenyl-Derivats WK-X-87 sind in Abbildung 3.23 aufgeführt.

Die Photoaffinitätsmarkierung läuft bei diesen Photophoren nach dem in Abbildung 3.24 dargestellten Mechanismus ab. Die Absorption eines Photons führt zur Anregung eines Elektrons in den freien Elektronenpaaren des Sauerstoffs und in der Folge zu einem sogenannten $n\pi^*$ -Übergang. Dabei wird ein Elektron von einem n -Orbital in ein antibindendes π^* -Orbital übertragen. In diesem angeregten Zustand liegen nun zwei ungepaarte Elektronen vor und das Photophor besitzt einen diradikalischen Charakter. Das unvollständig besetzte n -Orbital der Carbonylgruppe hat elektrophile Eigenschaften und reagiert mit C-H-Bindungen. Durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms wird die Elektronenlücke gefüllt. Es entsteht ein Ketyl, das schließlich mit dem bei der Abstraktion entstandenen Alkyradikal unter Ausbildung einer C-C-Bindung zum benzpinacolartigen Endprodukt reagiert [152]. Findet das Photophor im angeregten Zustand keinen geeigneten Reaktionspartner, fällt es in den Grundzustand zurück. Es können daher mehrere Anregungszyklen durchlaufen

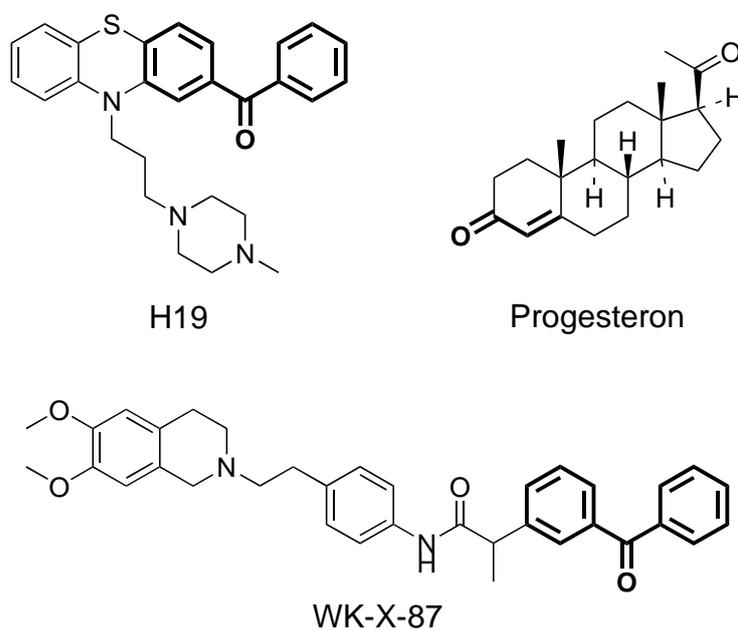


Abb. 3.23: Auswahl bekannter P-gp Modulatoren mit intrinsischer Photoaktivierbarkeit. Die drei gezeigten Substanzen wurden auf ihre Eignung zur Durchführung von Photoaffinitätsmarkierungen an P-gp überprüft. Die hervorgehobenen Teilstrukturen entsprechen den Photophoren.

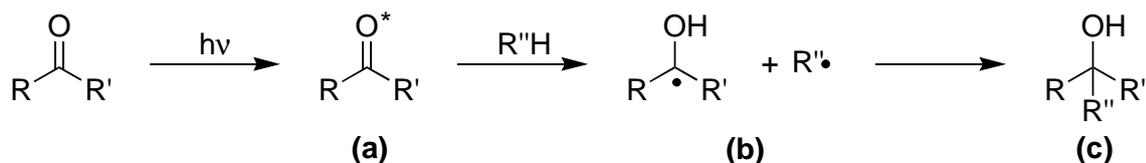


Abb. 3.24: Reaktionsmechanismus der eingesetzten Photophore. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht geht das Keton in einen angeregten Triplettzustand (a) mit diradikalischem Charakter über. Durch Abstraktion aus einer C-H-Bindung entsteht ein Wasserstoffradikal, das im Folgenden mit dem aktivierten Keton zum Ketyl (b) weiterreagiert. Die abschließende Ausbildung der C-C-Bindung (c) erfolgt durch Reaktion des Ketyls mit dem ebenfalls bei der Abstraktion entstandenen Alkylradikal (b) [152, 153].

werden und dadurch möglicherweise eine effizientere Markierung des Proteins erreicht werden. Dies ist ein weiterer Vorteil gegenüber anderen Photophoren (s. o.), bei denen die Aktivierung häufig irreversibel verläuft [54].

Zwar unterscheiden sich die drei ausgewählten Modulatoren nicht im Hinblick auf den Reaktionsmechanismus ihrer Photophore, jedoch treten deutliche Unterschiede bei der für die Anregung nötigen Energie auf. So ist die Überführung der Benzophenon-Partialstruktur bereits mit UVA-Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda = 365$ nm möglich, während bei Progesteron für die Aktivierung des α,β -ungesättigten Ketons das energiereichere UVC-Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda = 254$ nm notwendig ist [154]. Dies kann anhand der UV/VIS Spektren in Abbildung 3.25 verdeutlicht werden. Hier zeigen die Substanzen H19 und WK-X-87 bei $\lambda = 365$ nm eine deutliche Absorption. Diese Beobachtung steht im guten Einklang mit der in der Literatur genannten Wellenlänge von $\lambda = 350$ nm für den $n\pi^*$ -Übergang von Benzophenon [152]. Für Ketone wird für diesen Übergang eine Wellenlänge von $\lambda = 275$ – 300 nm genannt [155]. In diesem Bereich absorbiert nun auch Progesteron das eingestrahelte Licht.

3.6.2 Photoinaktivierungsexperimente

An P-gp wurden bisher eine Reihe von Photoaffinitätsmarkierungen mit strukturell unterschiedlichsten Substanzen durchgeführt [156]. Bei einer Vielzahl dieser Studien wurden P-gp-haltige Membranpräparationen für die Experimente eingesetzt. Die Trennung des in der Membranpräparation enthaltenen Proteingemischs erfolgte nach der Markierung durch eine SDS-PAGE. Da die eingesetzten photoaktivierbaren Substanzen zusätzlich radioaktive Isotope wie ^3H oder ^{125}I enthielten, konnten erfolgreich markierte Proteine sensitiv mit Hilfe der Autoradiografie detektiert werden

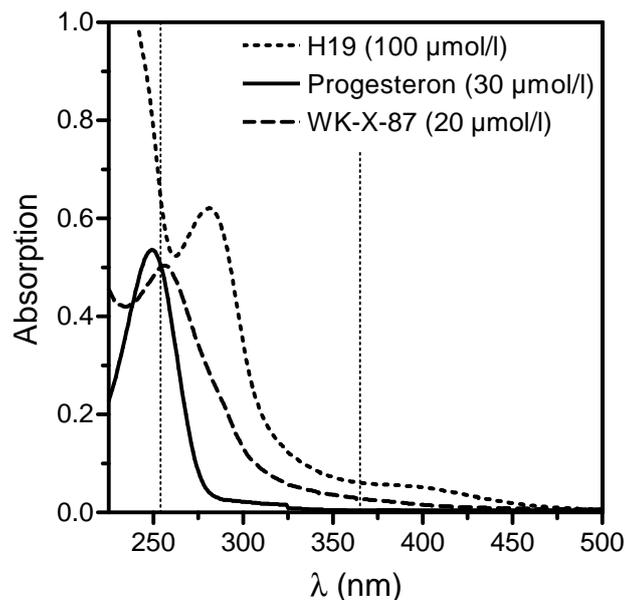


Abb. 3.25: UV/VIS Spektren der ausgewählten Modulatoren. Die gepunkteten Linien geben die Intensitätsmaxima der für die Photoaffinitätsmarkierungen zur Verfügung stehenden Lichtquellen an.

[54]. Die Notwendigkeit der radioaktiven Markierung stellt jedoch gleichzeitig die größte Einschränkung dieses Verfahrens dar, weil nur wenige radioaktiv markierte Photoliganden kommerziell erhältlich sind. In dieser Arbeit wurde daher ein anderer Ansatz gewählt.

Durch das *S. cerevisiae* Expressionssystem standen ausreichende Mengen von reinem P-gp für Photoaffinitätsmarkierungsexperimente zur Verfügung (siehe Kapitel 3.3.1). Da die Experimente auf diese Weise in Abwesenheit störender Fremdproteine durchgeführt werden können, sollte die erfolgreiche Markierung von P-gp durch Photoinaktivierungsexperimente nachgewiesen werden. Diese Experimente beruhen auf der Überlegung, dass nach einer erfolgreichen Markierung ein Enzym nicht mehr aktiv ist, da die Bindungsstelle permanent blockiert wird [153]. Im Fall von P-gp sollte dies durch die Reduzierung der ATPase Aktivität bei vollständiger Stimulation mit 130 µmol/l Verapamil nachgewiesen werden (siehe auch Kapitel 2.5.4). Eine radioaktive Markierung des Photoliganden wäre in diesem Fall nicht mehr nötig.

Zunächst wurde jedoch überprüft, ob die Bestrahlung des Proteins mit UV-Licht in Abwesenheit eines Photoliganden zu einer Inaktivierung des Transporters führt. In Abbildung 3.26 ist das Ergebnis dieser Untersuchungen dargestellt. Die Inaktivierung des Proteins durch die energiereichere UVC Strahlung ($\lambda = 254$ nm) ist deutlich zu erkennen. Mit Beginn der Bestrahlung nahm die ATPase Aktivität von P-gp in

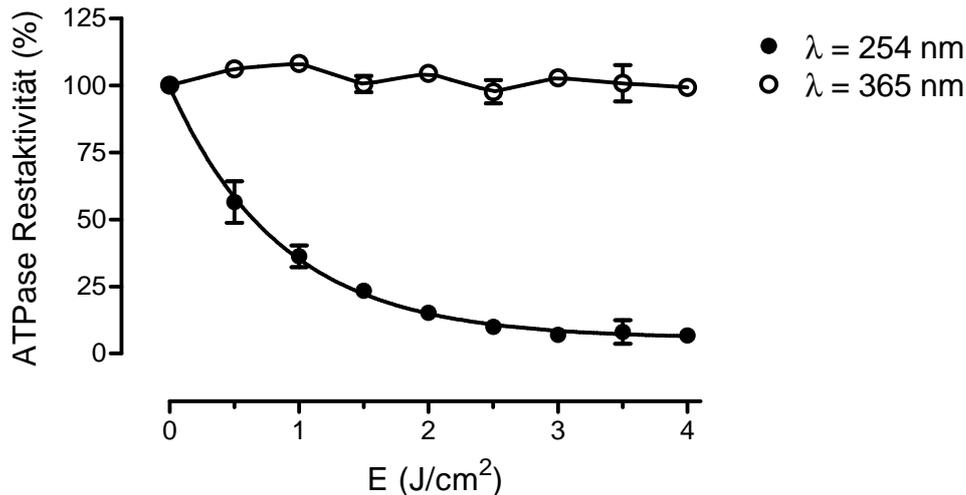


Abb. 3.26: Abnahme der maximalen P-gp ATPase Aktivität durch Bestrahlung mit UV-Licht. Die ATPase Aktivität wurde in Gegenwart von 130 $\mu\text{mol/l}$ Verapamil bestimmt. Dargestellt sind die normalisierten und gemittelten Messwerte aus jeweils zwei unabhängigen Experimenten, die mit aufgereinigtem P-gp (0,65 mg/ml) durchgeführt wurden.

Gegenwart von 130 $\mu\text{mol/l}$ Verapamil exponentiell ab, bis sie schließlich bei einer Energiemenge von etwa 3 J/cm^2 völlig zum Erliegen kam. Ursachen für die Abnahme der Proteinaktivität bei Bestrahlung sind häufig durch das UV-Licht verursachte Peptidkettenbrüche oder zusätzliche Verknüpfungen der Seitenketten untereinander und die damit verbundenen Veränderungen in der Proteinstruktur [153, 157]. Aufgrund der ausgeprägten Schädigung des P-gps waren die geplanten Photoinaktivierungsexperimente mit Progesteron, das mit UVC Licht aktiviert wird, nicht durchführbar. Progesteron wurde daher von den folgenden Versuchen ausgeschlossen. Im Gegensatz dazu blieb bei Verwendung einer Lichtquelle für UVA Licht ($\lambda = 365$ nm) die ATPase Aktivität von P-gp in Gegenwart von 130 $\mu\text{mol/l}$ Verapamil nahezu konstant.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Bestrahlung von P-gp mit UVA Licht bis zu einer Energie von 4 J/cm^2 keinen negativen Einfluss auf die Funktion des Proteins hat, sollten im Anschluss Photoinaktivierungsexperimente mit den verbleibenden Substanzen H19 und WK-X-87 durchgeführt werden. Zunächst galt es jedoch einige Rahmenparameter festzulegen. Die eingesetzten Konzentrationen des Zielproteins und der photoaktivierbaren Substanz sind von entscheidender Bedeutung für den Ausgang des Experiments. Günstig sind möglichst hohe Proteinkonzentrationen bei andererseits möglichst niedrigen Substanzkonzentrationen [153]. Auf diese Weise kann eine hohe Besetzung der Bindungsstellen bei einem vergleichsweise geringen

Anteil von ungebundenem Modulator erreicht werden und so die Wahrscheinlichkeit für eine erfolgreiche Markierung der Bindungsdomäne erhöht werden. Gleichzeitig bewirkt der geringe Anteil an freiem photoaktivierbarem Modulator eine Minimierung der unspezifischen Markierungen des Proteins. Werden Protein und Photoligand in äquimolaren Mengen eingesetzt, ist das Verhältnis von spezifisch gebundenem und ungebundenem Modulator besonders günstig [153]. Ausgehend von diesen Überlegungen wurde eine Proteinkonzentration von 0,65 mg/ml für die Experimente ausgewählt. Dies entspricht etwa zwei Dritteln der maximal erreichten P-gp Konzentration in einer Aufreinigung (siehe Kapitel 3.3.1). Bei einem angenommenen Molekulargewicht von 140 kDa liegt die gewählte Konzentration bei etwa 5 $\mu\text{mol/l}$ P-gp. Nun mussten noch geeignete Konzentrationen für die verwendeten Modulatoren bestimmt werden. Für hochaffine Substanzen kann sich diese Konzentration nach der ausgewählten Proteinkonzentration richten. Dann können äquimolare Bedingungen gewählt werden. Ausgehend von den anhand der ATPase Aktivierungsprofile bestimmten $K_{m(D)}$ -Werten von H19 und WK-X-87 handelt es sich jedoch um niedrig- bis mittelaffine Modulatoren. So erfolgte eine halbmaximale Stimulation der ATPase Aktivität durch H19 bei einer Konzentration von $K_{m(D)} = 13,5 \mu\text{mol/l}$ ($\text{p}K_{m(D)} = 4,83$, siehe Kapitel 3.3.3) und durch WK-X-87 bei $K_{m(D)} = 2,6 \mu\text{mol/l}$ ($\text{p}K_{m(D)} = 5,6$ [114]). Aus diesem Grund wurde im Experiment für beide Substanzen eine Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt. Unter der Annahme, dass die zugrunde gelegten funktionellen Daten mit den Bindungsaffinitäten der Substanzen korrelieren, stellt diese Konzentration einen Kompromiss zwischen der gewünschten maximalen Bindungsstellenbesetzung und den zur Minimierung der unspezifischen Bindung geforderten äquimolaren Konzentrationen von Modulator und Zielprotein dar.

Nach der Festlegung der Parameter für die Photoaktivierungsexperimente wurden erste Versuche durchgeführt. Die Proben wurden dazu mit einer Energie von maximal 4 J/cm² bestrahlt. Bei keinem dieser Experimente wurde eine signifikante Verringerung der ATPase Aktivität im Vergleich zum Kontrollexperiment ohne Modulator beobachtet. Aus diesem Grund wurde die eingestrahlte Energie erhöht. Da die ununterbrochene Bestrahlung der Probe technisch auf maximal 1 J/cm² limitiert war, wurde in den Folgeexperimenten aus praktischen Gründen ein alternativer Betriebsmodus gewählt, der die Eingabe einer Bestrahlungsdauer zulässt. Näherungsweise entspricht eine Energie von 1 J/cm² einer Bestrahlungsdauer von 1 min, wobei die Energie jedoch von der Art und dem Alter der verwendeten Strahlungsquelle abhängig ist. Die Ergebnisse dieser Folgeexperimente mit einer verlängerten Bestrahlungsdauer sind in Abbildung 3.27 dargestellt. Eine Beeinflussung der Messwerte

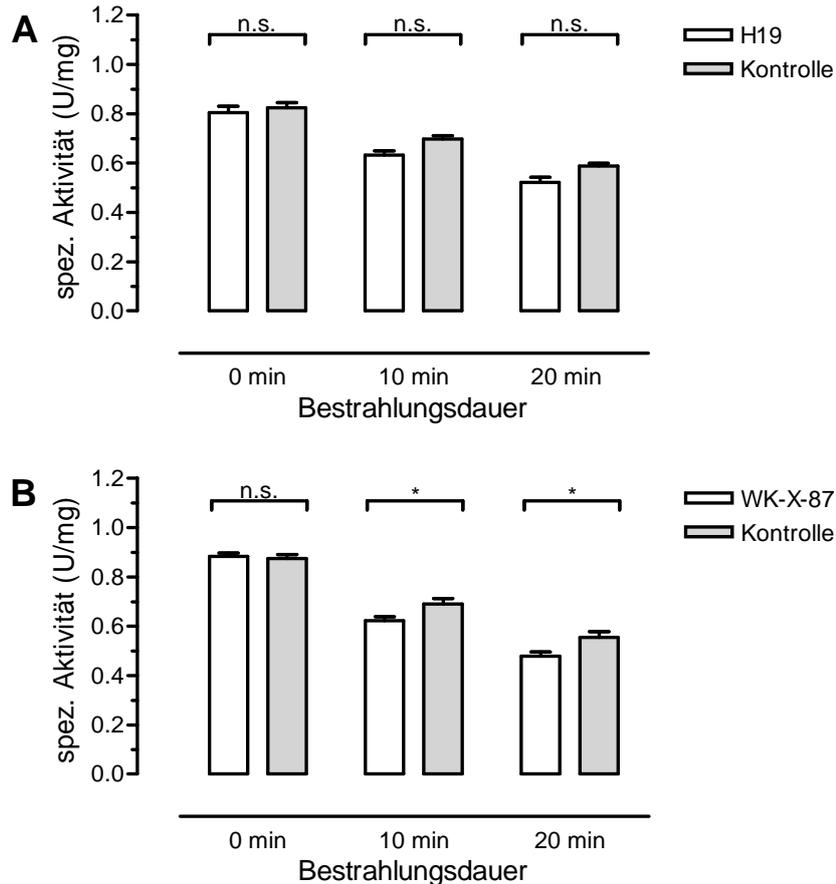


Abb. 3.27: Photoinaktivierungsexperimente mit den Modulatoren H19 (A) und WK-X-87 (B). Die spezifische ATPase Aktivität wurde in Gegenwart von 130 $\mu\text{mol/l}$ Verapamil ermittelt. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardfehler dreier unabhängiger Experimente, die als Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. Die Testsubstanzen H19 und WK-X-87 wurden in einer Konzentration von jeweils 10 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt und mit aufgereinigtem P-gp (0,65 mg/ml) über den angegebenen Zeitraum mit UVA Licht ($\lambda = 365 \text{ nm}$) bestrahlt.

durch H19 und WK-X-87 konnte aufgrund der 100fachen Verdünnung der Probe in dem ATPase Reaktionspuffer ausgeschlossen werden, da keine der Substanzen bei einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{mol/l}$ die ATPase Aktivität beeinflusst. Diese Überlegung wurde durch die Beobachtung bestätigt, dass vor der Bestrahlung bei beiden Substanzen kein signifikanter Unterschied der ATPase Aktivität im Vergleich zum Kontrollansatz auftrat.

Bei Betrachtung von Abbildung 3.27 fällt zunächst eine substanzunabhängige Inaktivierung des Transporters durch die verlängerte Bestrahlung auf. Mit zunehmender Bestrahlungsdauer schädigt auch das energieärmere UVA Licht das Transportprotein,

wenn auch das Ausmaß der Schädigung wesentlich schwächer ausgeprägt ist als bei UVC Licht. Die Durchführung eines Kontrollexperimentes in Abwesenheit des Photoliganden ist also unerlässlich. Nur auf diese Weise kann zwischen einer Inaktivierung des Transporters durch die jeweilige Testsubstanz und einer Inaktivierung durch UV-induzierte Proteinschäden unterschieden werden. Im direkten Vergleich zeigten die ATPase Aktivitäten des Kontrollansatzes ohne H19 und des Photomarkierungsansatzes für Substanz H19 weder nach einer Bestrahlungsdauer von 10 min noch nach 20 min einen signifikanten Unterschied. Jedoch wurde im Kontrollansatz tendenziell eine höhere Aktivität als in der Probe mit H19 gemessen. Der Vergleich der Mittelwerte ergab eine Aktivitätsdifferenz von 0,065 U/mg nach zehnminütiger und 0,066 U/mg nach zwanzigminütiger Bestrahlung. Die Anwesenheit von H19 scheint also einen inaktivierenden Effekt auf die ATPase Aktivität zu besitzen. Dieser Effekt ist jedoch sehr schwach ausgeprägt und erreicht bereits nach 10 min das Maximum. Deutlicher war der Effekt von WK-X-87 bei den Photoinaktivierungsexperimenten. Im Vergleich zu den Kontrollexperimenten wurde eine signifikant ($P < 0,05$) niedrigere ATPase Aktivität beobachtet. Die bessere Inaktivierung durch WK-X-87 wurde auf die höhere Potenz der Substanz (s. o.) und die damit verbundene erhöhte Absättigung der Bindungsstellen im Vergleich zu H19 zurückgeführt. Die absolute Differenz der ATPase Aktivität lag nach zehn Minuten bei 0,067 U/mg und stieg nach weiteren zehn Minuten Bestrahlung mit UVA-Licht auf 0,076 U/mg an. Dies deutet darauf hin, dass bei der Substanz WK-X-87 die maximale Inaktivierung nach zehn Minuten noch nicht erreicht war.

Insgesamt konnte in Gegenwart der Photoliganden eine Photoinaktivierung beobachtet werden. Der ATPase-Assay ist also in der eingesetzten Form zur Beurteilung des Fortschritts eines Photomarkierungsexperiments geeignet und die Experimente sind ohne die radioaktive Markierung des Liganden prinzipiell durchführbar. Die Versuchsparameter sind jedoch noch nicht im Hinblick auf eine möglichst starke Photoinaktivierung bei gleichzeitig geringer Schädigung des Transporters durch das UVA Licht optimiert. So könnte beispielsweise die Bestrahlung unter Schutzgas zu einer Verminderung der Photooxidation führen [153]. Auch die Verminderung der eingesetzten Proteinkonzentration und die damit verbesserte Lichtdurchlässigkeit der Probe könnte zu einer effektiveren Markierung des Proteins führen [153]. Für die Identifizierung der Bindungsstellen muss desweiteren zwischen unspezifischer und spezifischer Bindung unterschieden werden können. Die unspezifische Bindung wird normalerweise in Gegenwart eines etwa 100fach molaren Überschusses eines nicht

markierten Liganden bestimmt [50, 158]. Dies ist mit dem derzeitigen Versuchsaufbau noch nicht möglich. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung müsste der zweite Ligand in einer Konzentration von 1 mmol/l eingesetzt werden. Dies würde jedoch bedeuten, dass dieser Ligand im ATPase-Assay immer noch in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ vorliegt. In diesem Konzentrationsbereich wurde für viele der in dieser Arbeit untersuchten Substanzen bereits eine ausgeprägte Stimulation der ATPase Aktivität beobachtet (siehe Kapitel 3.3.3). Der Kompetitor sollte daher zunächst durch einen Pufferaustausch abgetrennt werden. Dies könnte z. B. durch Gelfiltration bewerkstelligt werden [159].

3.6.3 LC-MS Analytik und Datenanalyse

Im vorangegangenen Kapitel konnte eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Inaktivierung von P-gp durch den Photoliganden WK-X-87 nachgewiesen werden. Auch für die Substanz H19 wurde eine Inaktivierung beobachtet, diese war jedoch statistisch nicht signifikant. Der folgende Abschnitt beschäftigt sich daher mit der Frage, ob sich die nun kovalent an das Protein gebundenen Photoliganden nach dem In-Gel-Verdau des Proteins mit einer Kombination aus flüssigchromatografischen (*engl.*: liquid chromatography, LC) und massenspektrometrischen (MS) Methoden nachweisen lassen.

Zunächst wurde mit den Proben eine SDS-PAGE unter Standardbedingungen durchgeführt (siehe Kapitel 2.1.4) und die Proteine mit Coomassieblau angefärbt. Ein typisches Ergebnis einer solchen Gelelektrophorese ist in Abbildung 3.28 dargestellt. Die P-gp Bande bei einem Molekulargewicht von 144 kDa ist deutlich zu erkennen.

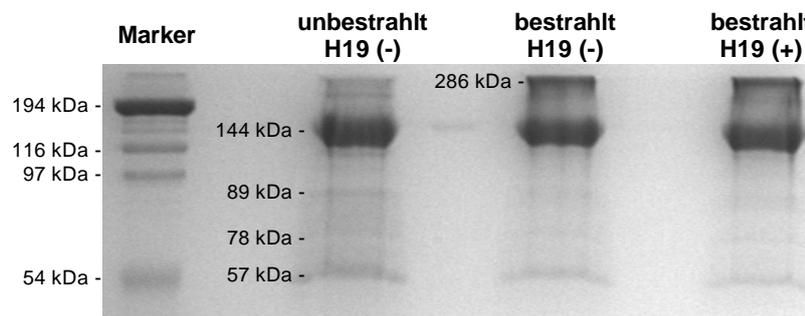


Abb. 3.28: SDS-PAGE von aufgereinigtem P-gp vor und nach Bestrahlung mit UVA Licht und in An- (+) und Abwesenheit (-) des photoaktivierbaren Phenothiazins H19.

Desweiteren fallen bei allen Proben einige Proteine oder Proteinfragmente mit kleinerem Molekulargewicht auf. Es handelt sich dabei um Verunreinigungen, die während der P-gp Aufreinigung mit der Nickelaffinitätschromatografie nicht abgetrennt werden konnten. Durch die starke Beladung des Gels mit 5 µg Protein pro Bande wurden diese detektiert, obwohl sie nur einen kleinen Teil der Gesamtproteinmasse ausmachen. Nachdem das aufgereinigte Protein mit UV Licht bestrahlt wurde, treten eine zusätzliche Bande bei 286 kDa und eine diffuse Bande bei Molekulargewichten zwischen 144 kDa und 286 kDa auf. Diese Veränderungen sind vermutlich auf die UV Licht induzierte Photooxidation von P-gp zurückzuführen. Neben den kovalenten Verknüpfungen mehrerer Moleküle, sogenannten „Crosslinks“, sind Aggregatbildung und Fragmentierung typische Anzeichen für diese Form der Oxidation [157]. Diese Veränderung der Proteinstruktur schlug sich bereits bei den Photoaktivierungsexperimenten in einer im Vergleich zum unbestrahlten P-gp herabgesetzten ATPase Aktivität der Kontrollansätze nieder (s. o.).

Nach der Auftrennung der verschiedenen Versuchsansätze durch die Gelelektrophorese wurde die P-gp Bande mit einem Molekulargewicht von 144 kDa ausgeschnitten und der In-Gel-Verdau des Proteins mit der Serinprotease Trypsin durchgeführt. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung von Peptidbindungen C-terminal von den Aminosäuren Arginin und Lysin sowie deren Amid- und Estermodifikationen [54]. Die entstandenen Peptide wurden aus der Gelmatrix eluiert und das gewonnene Peptidgemisch mit Hilfe der Flüssigkeitschromatografie an einer Umkehrphasensäule nach ihrer Lipophilie aufgetrennt und fraktioniert. Abschließend wurden die Massen der Peptide mit einem Massenspektrometer bestimmt. Das durch die proteolytische Spaltung erhaltene Peptidmuster ist für ein Protein so charakteristisch wie ein Fingerabdruck und kann daher zur Identifizierung des Proteins herangezogen werden. Es wird in Anlehnung an den genannten Vergleich auch als „Mass Fingerprint“ bezeichnet. Durch den Abgleich der bei der massenspektrometrischen Analyse detektierten Massen mit den „Mass Fingerprints“ von Proteinen aus einer Sequenzdatenbank kann das analysierte Protein identifiziert werden. Das Programm **Mascot** [87] bietet eine solche Funktionalität und wurde in dieser Arbeit zur Identifizierung der Peptide verwendet.

Nach einem theoretischen Verdau mit dem Programm **PeptideMass** [85] wurden nach der vollständigen proteolytischen Spaltung von P-gp insgesamt 145 Fragmente erhalten. In der Praxis sind jedoch nicht alle möglichen Schnittstellen für die Pro-

tease zugänglich. Zusätzlich können an bestimmten Aminosäuren Modifikationen auftreten, die wiederum zu einer veränderten Masse der jeweiligen Peptide führen. Die Berücksichtigung einiger dieser Fälle führt zu insgesamt 305 unterschiedlichen Werten. Die genaue Parametrisierung des theoretischen Verdau ist in Kapitel 2.8 beschrieben.

Mit massenspektrometrischen Methoden ist die Detektion von Peptiden im Femtomol-Bereich möglich [54]. Aufgrund dieser außerordentlich hohen Sensitivität werden auch Spuren von Verunreinigungen detektiert, die während der Aufarbeitung der Probe eingebracht werden. Daher wurden zusätzlich sogenannte „Dummy“-Proben massenspektrometrisch untersucht. Diese Proben wurden durch In-Gel-Verdau und Elution aus einem Polyacrylamidgelstück gewonnen, das durch Coomassieblau nicht angefärbt wurde, also keine Proteine enthielt. Das Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse dieser Probe konnte also auf Verunreinigungen zurückgeführt werden. Auf diese Weise erhaltene Messwerte wurden mit den Messwerten der P-gp Proben verglichen und innerhalb der Massentoleranz gleiche Werte aus der Analyse eliminiert. Dieses Vorgehen führte zu einer Reduktion der Datenmenge um etwa 30 % bis 40 %.

Die verbleibenden Messwerte wurden nun mit den aufgrund des theoretischen Verdau zu erwartenden Massen verglichen. Erneut wurde dabei eine Massentoleranz von 100 ppm zugelassen und innerhalb dieser Grenzen gleiche Werte in einer neuen Liste zusammengefasst. Diese Art von Analyse wurde mit zwei unabhängigen Proben durchgeführt. Für die erste Probe konnten auf diese Weise 564 von 1 887 Messwerten den theoretischen Massen zugeordnet werden. Mit dem Programm *Mascot* [87] wurden diesen Werten die entsprechenden Peptidsequenzen zugeordnet. Die so identifizierten Peptide deckten insgesamt 59 % der Aminosäuresequenz des Transportproteins ab. Dieses Ergebnis wurde durch die zweite Probe bestätigt. Hier konnten aus einer Liste von 2 133 Werten insgesamt 663 Werte den Massen aus dem theoretischen Verdau zugeordnet werden. Dies führte schließlich zu einer Sequenzabdeckung von 61 %. Wurden bei der Auswertung nur Massen berücksichtigt, die in beiden Proben beobachtet wurden, wurde eine Sequenzabdeckung von insgesamt 57 % erreicht. Dies bedeutet, dass der In-Gel-Verdau und die LC-MS-Analytik gut reproduzierbare Ergebnisse lieferten und nur ein kleiner Teil der Sequenzabdeckung von interexperimentellen Schwankungen betroffen ist. Für die Identifizierung der Peptide ist jedoch nur ein kleiner Teil der Messwerte verantwortlich. Durch die

Berücksichtigung zusätzlicher Modifikationen oder nicht beachteter Schnittstellen könnte die Zahl der zugeordneten Messwerte noch weiter gesteigert werden.

In Abbildung 3.29 ist die Aminosäuresequenz von P-gp dargestellt. Sequenzbereiche, die in beiden Proben identifiziert wurden sind rot markiert. Zusätzlich wurden einige Sequenzabschnitte durch Invertierung hervorgehoben. Diese Bereiche wurden anhand eines P-gp Homologiemodells von Globisch et al. [160], das auf dem bakteriellen ABC-Transporter SAV1866 basiert, den transmembranären Helices (TM) zugeordnet. Es wird deutlich, dass gerade diese Bereiche nicht durch die angewendete Analyse methode abgedeckt werden. Von den insgesamt 334 markierten Aminosäuren werden 288 nicht abgedeckt. Dies entspricht etwa 23% der Gesamtproteinsequenz und damit einem Großteil der durch die Methode nicht erfassten Sequenzabschnitte. Die schlechte Abdeckung der hydrophoben transmembranären Bereiche ist ein für Membranproteine typisches Phänomen. Die proteolytische Spaltung dieser Bereiche führt zu sehr hydrophoben Peptiden, die in wässrigen Lösungen zur Präzipitation

1	MDLEGDRNGG	AK KKNFFKLN	NKSEKDKK EK	KPTVSVFSMF	RYSNWL DKLY	TM 1
51	MV VGTLAAII	HG AGLPLMML	VF GEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNR SDIND	TM 1
101	TGFF MNLEED	MTR YAYYSG	IG AGVLVAAY	IQ VSFWCLAA	GR QIHKIRKQ	TM 2
151	FF HAIMRQEI	GW FDVHDVGE	LN TRLTDDVS	KI NEGIGDKI	GM FFQSMATF	TM 3 + 4
201	FT TGFIVGFR	GW KLTLVILA	IS PVLGLSAA	VW AKILSSFT	DK ELLAYAKA	TM 3 + 4
251	GAV AEEVLAA	IR TVIAFGGQ	KK ELERYNKN	LEE AKRIGIK	KAITANISIG	TM 5
301	AA FLLIYASY	AL AFWYGTTL	VL SGEYSIGQ	VL TVFFSVLI	GA FSVGQASP	TM 5 + 6
351	SIEA FANARG	AA YEIFKIID	NK PSIDSYSK	SG HKPDNIKG	NL EFRNVHFS	TM 6
401	YPS RKEVKIL	KGL NLKVQSG	QT VALVGNNG	CG KSTTVQLM	QR LYDPTEGM	
451	VSV DGQDIRT	IN VRFLREII	GV VSQEPVLF	AT TIAENIRY	GR ENVMTDEI	
501	EKA VKEANAY	DF IMKLPHKF	DT LVGERGAQ	LS GGQKQRIA	IARALVRNPK	
551	ILL LDEATSA	LD TESEAVVQ	VAL DKARKGR	TT IVIAHRLS	TV RNADVIAG	
601	FDD GVIVEKG	NH DELMKEKG	IY FKLVTMQT	AG NEVELENA	AD ESKSEIDA	
651	LEM SSNDSRS	SL IRKRSTRR	SV RGSQAQDR	KL STKEALDE	SI PPVSFWRI	
701	MK LNLTWPY	FV VGVFCAII	NG GLQPAFAI	IF SKIGVFT	RID DPETKRQ	TM 7 + 8
751	NS NLFSLLFL	AL GIISFITE	FL QGFTFGKA	GE ILTKRLRY	MV FRSMLRQD	TM 8
801	VSW FDDPKNT	TG ALTTRLAN	DA AQVKGATG	SR LAVITQNI	AN LGTGIIS	TM 9 + 10
851	FI YGWQLTLL	LL AIVPIIAI	AG VVEMKML	SG QALKDKKEL	EG AGKIATEA	TM 9 + 10
901	IEN FRTVVSL	TQ EQKFEHMY	AQ SLQVPYRN	SL RKAHIFGI	TF SFTQAMMY	TM 11
951	FS YAGCFRFG	AY LVAHKLMS	FE DVLLVFS	VV FGAMAVGQ	VSS FAPDYAK	TM 11 + 12
1001	AK ISAHHIIM	II EKTPLIDS	YS TEGLMPNT	LE GNVTFGEV	VF NYPTRPDI	
1051	PV LQGLSLEV	KKG QTLALVG	SS GCGKSTVV	QL LERFYDPL	AG KVLLDGKE	
1101	IK RNLVQWLR	AHL GIVSQEP	IL FDCSIAEN	IAY GDNSRVV	SQ EIVRAAK	
1151	EAN IHFIES	LP NKYSTKVG	DK GTQLSGGQ	KQ RIAIARAL	VR QPHILLLD	
1201	EAT SALDTE	EKV VQEALDK	AR EGRTCIVI	AH RLSTIQNA	DL IVVFQNGR	
1251	VKE HGTHQQL	LA QKGIYFSM	VSV QAGTKRQ			

Abb. 3.29: Grafische Darstellung der durch die LC-MS Methode abgedeckten Sequenzbereiche. Abgebildet ist die Aminosäuresequenz des Transporters P-gp. Die zwölf transmembranären Helices wurden durch Invertierung hervorgehoben. Sequenzbereiche, die durch die LC-MS Methode zuverlässig identifiziert wurden sind in rot dargestellt.

neigen [161]. Für die zweifelsfreie Identifikation eines Proteins mit der „Mass fingerprint“ Methode spielt dieses Phänomen nur eine untergeordnete Rolle, da hierfür bereits eine Sequenzabdeckung von 15 % ausreichend ist [162]. Dieser Wert kann oft mit Standardprotokollen erreicht werden. So lag die Sequenzabdeckung für P-gp bereits zu Beginn der Arbeiten mit 14 % nur knapp unterhalb des genannten Grenzwerts [163]. Für die Identifizierung modifizierter Bereiche, wie im Fall der Photoaffinitätsmarkierung ist jedoch eine nahezu vollständige Sequenzabdeckung erforderlich. Die Probenvorbereitung musste also im Hinblick auf eine möglichst hohe Sequenzabdeckung optimiert werden. Eine mögliche Strategie ist dabei der Einsatz von Detergenzien zur Solubilisation hydrophober Peptide [164]. So führte der Einsatz von CYMAL zu einer deutlichen Verbesserung der Sequenzabdeckung des Transportproteins [163]. Insgesamt wurde mit der beschriebenen Methode also eine etwa vierfach bessere Sequenzabdeckung erreicht als mit dem Standardprotokoll. Dennoch blieben die besonders hydrophoben transmembranären Bereiche weiterhin zum Großteil von der massenspektrometrischen Analyse ausgeschlossen. Da gerade in diesen Bereichen die Substratbindungsstellen von P-gp vermutet werden [165], können diese anhand der etablierten Methode noch nicht genau lokalisiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass Sequenzabschnitte, die direkt an die transmembranären Helices angrenzen sehr wohl mit der verwendeten Methode detektiert werden können, ist die Überprüfung der Durchführbarkeit der Photoaffinitätsmarkierung mit den neuen Photoliganden H19 und WK-X-87 jedoch durchaus möglich.

Wie bereits beschrieben, wurden aus den Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten immer zwei Proben erhalten. Zum Einen der Markierungsansatz selbst und zum Anderen ein Vergleichsansatz, der in Abwesenheit des Photoliganden mit UV-Licht bestrahlt wurde. Die Aufbereitung und die massenspektrometrische Analyse dieser Proben erfolgte analog zu dem für unbehandeltes P-gp beschriebenen Verfahren. Nach dem Vergleich mit den Messwerten aus der „Dummy“-Probe wurden erneut die innerhalb einer Massentoleranz von 100 ppm gleichen Messwerte eliminiert. Wie zuvor führte dieses Vorgehen zu einer Datenreduktion von etwa 30 % bis 40 %. Anschließend wurde die Sequenzabdeckung für jede einzelne Probe ermittelt. Sie lag im Durchschnitt bei 56 % und war damit vergleichbar mit den zuvor beobachteten Werten. Somit konnte eine negative Auswirkung der Bestrahlung auf die Sequenzabdeckung ausgeschlossen werden.

Der zweite Teil der Analyse hatte die Identifizierung möglicherweise markierter Peptide zum Ziel. Dazu wurde die aus der Analyse des Photoaktivierungsexperiments erhaltenen Messwerte mit den Messwerten aus dem Vergleichsversuch abgeglichen und erneut innerhalb der Massentoleranz gleiche Werte eliminiert. Dieses Vorgehen führte erneut zu einer deutlichen Datenreduktion. So konnte die Liste der Massen durchschnittlich um 70 % verkleinert werden. Dies zeigt deutlich, dass die für die massenspektrometrische Analyse aufbereiteten Proben weitgehend identisch sind und steht im guten Einklang mit den geringen Unterschieden die während der Photoaktivierungsexperimente beobachtet wurden (siehe Kapitel 3.6.2).

Mit der beschriebenen Methode wurden für H19 und für WK-X-87 aus jeweils zwei unabhängigen Experimenten die stark verkleinerten Datensätze erhalten. Diese stellten die Grundlage zur Identifizierung der markierten Peptide dar. Ansatzpunkt dieser Analyse war die Überlegung, dass eine Markierung nach dem vorgestellten Reaktionsmechanismus (siehe auch Abbildung 3.24) die Masse des jeweiligen Peptids um die exakte (monoisotopische) Masse des Photoliganden vergrößern müsste. Daher wurden von allen Messwerten nun die exakte Masse des verwendeten Photoliganden subtrahiert und die resultierenden Werte mit der Liste der möglichen Werte aus dem theoretischen Verdau verglichen. Innerhalb der Massentoleranz gleiche Werte wurden in einer neuen Liste zusammengefasst und die entsprechenden Sequenzabschnitte zugeordnet. Als nächstes wurde die Möglichkeit falsch positiver Zuordnungen überprüft. Dazu wurde von jedem Wert aus dem theoretischen Verdau die exakte Masse des jeweiligen Photoliganden subtrahiert. Die erhaltenen Differenzen wurden erneut auf mögliche Zuordnungen zu den theoretischen Peptidmassen überprüft. Auf diese Weise konnten für H19 insgesamt 17 mögliche falsch positive Zuordnungen identifiziert werden, für WK-X-87 waren es immerhin noch 15. Die aus der Versuchsauswertung erhaltenen Peptide wurden daraufhin auf diese möglicherweise falsch positiv zugeordneten Peptide überprüft und diese gegebenenfalls eliminiert. Die verbleibenden Werte sind in Tabelle 3.15 aufgeführt.

Tab. 3.15: Liste der durch die Photoaffinitätsmarkierung modifizierten Peptide. Angegeben ist die monoisotopische Masse des einfach positiv geladenen Peptidions sowie seine Start- und Endposition innerhalb der P-gp Aminosäuresequenz. Peptide, die bereits mit anderen Photoliganden erfolgreich markiert worden sind, wurden mit der entsprechenden Quellenangabe versehen. Wurde eine Markierung in direkter Nachbarschaft beobachtet, ist die Quellenangabe *kursiv* gedruckt. Die Oxidation der Aminosäure Methionin (Met-Ox) und die Bildung von Polyacrylamidaddukten an der Aminosäure Cystein (Cys-PAM) wurden als mögliche Modifikationen berücksichtigt.

m/z [MH ⁺]	Position		Modifikation	Substanz	Literatur
	Start	Ende			
1 262,579	1	12		H19	
1 024,557	15	22		WK-X-87	
1 298,692	31	41		H19	
1 314,687	31	41	Met-OX	H19	
1 314,687	31	41	Met-OX	WK-X-87	
794,499	143	148		WK-X-87	
845,436	182	189		H19	
2 405,182	190	210		H19	
2 437,171	190	210	Met-OX	H19	[50, 166]
2 058,159	243	262		H19	[158, 166–168]
920,520	263	271		H19	[158, 166–168], [50]
1 479,768	368	380		H19	[166, 167]
995,526 8	381	389		WK-X-87	[166, 167]
1 711,887	381	395		WK-X-87	[166, 167]
503,319	405	408		H19	[166, 167]
2 665,339	417	442	Met-OX	H19	[166, 167]
1 079,551	434	442	Met-OX	H19	[166, 167]
936,478	520	527		H19	[169]
827,521	537	543		WK-X-87	
943,430	610	617		H19	
2 126,003	646	664	Met-OX	WK-X-87	[169]
889,448	674	681		H19	
576,371	681	685		H19	[170]
2 018,041	686	702		H19	[170]
984,544	788	794		WK-X-87	
1 000,539	788	794	Met-OX	WK-X-87	[50, 168]
863,466	878	885	Met-OX	H19	
1 163,605	896	905		H19	
1 338,781	1003	1014		H19	
1 354,776	1003	1014	Met-OX	WK-X-87	[167, 170]
1 348,688	1063	1076	Cys-PAM	H19	[170]
1 535,847	1086	1099		WK-X-87	[170]
545,341	1100	1103		WK-X-87	
928,536	1104	1110		H19	
1 852,991	1148	1164		H19	[168]

Tab. 3.15: Fortsetzung – Liste der durch die Photoaffinitätsmarkierung modifizierten Peptide

m/z [MH ⁺]	Position		Modifikation	Substanz	Literatur
	Start	Ende			
897,467	1165	1172		H19	[168]
901,499	1213	1220		WK-X-87	
2 852,556	1226	1250	Cys-PAM	H19	
2 115,192	1234	1252		WK-X-87	
1 487,756	1265	1278		H19	
1 487,756	1265	1278		WK-X-87	
1 503,751	1265	1278	Met-OX	WK-X-87	
1 643,857	1265	1279		H19	
1 659,852	1265	1279	Met-OX	H19	

Insgesamt wurden für H19 28 verschiedene markierte Peptide ermittelt, für WK-X-87 waren es 16. Obwohl H19 in den Photoaktivierungsexperimenten deutlich schlechter abschnitt als WK-X-87, konnten diesem Liganden mehr markierte Peptide zugeordnet werden. Wird jedoch berücksichtigt, dass die Gesamtzahl der markierten Peptide aus einer Liste von mehreren tausend Messwerten extrahiert wurde, erscheint der Unterschied vergleichsweise gering und ist vermutlich auf interexperimentelle Schwankungen zurückzuführen. Bei genauerer Betrachtung von Tabelle 3.15 zeigt sich, dass meist mehrere Peptide zu einem Sequenzbereich zusammengefasst werden können. Auch treten einige Peptide mit oder ohne modifizierte Aminosäure auf. Aufgrund dieser Beobachtung kann davon ausgegangen werden, dass tatsächlich bestimmte Bereiche bevorzugt durch die Photoliganden markiert wurden. Desweiteren wurden Ergebnisse der Photoaffinitätsmarkierungen mit H19 und WK-X-87 mit Literaturwerten verglichen. Übereinstimmungen wurden in Tabelle 3.15 durch die Angabe der entsprechenden Quelle vermerkt. Für einen Großteil der identifizierten Peptide wurden Überschneidungen mit Literaturangaben gefunden. Bezogen auf die Aminosäuresequenz von P-gp lagen alle Übereinstimmungen zwischen der Aminosäure an Position 182 und der Aminosäure an Position 1171. Dieser Bereich umfasst beide Nukleotidbindungsdomänen sowie die transmembranären Helices TM3 bis TM12. Im Sequenzbereich vor der Aminosäure 182 wurde in keiner der Vergleichsarbeiten eine Markierung entdeckt. Folglich konnte hier auch keine Übereinstimmung gefunden werden. Peptide, die oberhalb von Aminosäure 1171 mit H19 oder WK-X-87 markiert wurden, lagen ebenfalls in Bereichen, die in keiner der Vergleichsarbeiten identifiziert wurden.

Innerhalb der Vergleichsarbeiten unterscheiden sich die verwendeten Photoliganden, die Methoden zur Identifizierung markierter Sequenzbereiche und der Spenderorganismus des untersuchten P-gps deutlich voneinander. Tabelle 3.16 gibt daher einen Überblick über diese Parameter. Der Einsatz von P-gp aus verschiedenen Spezies mag zunächst überraschen, jedoch sind die verwendeten Proteine eng miteinander verwandt und zeichnen sich durch eine zu mehr als 90 % identische Aminosäuresequenz aus [101]. Auch auf funktioneller Ebene werden größtenteils übereinstimmende Ergebnisse erhalten. So traten bei der Zusammenstellung der Vergleichsarbeiten keine deutlichen Unterschiede bei den Ergebnissen der Photoaffinitätsmarkierungen auf. Dennoch sind Unterschiede in der Substratspezifität möglich [102]. Daher ist humanes P-gp für funktionelle Untersuchungen im Allgemeinen vorzuziehen.

Die verwendeten Photoliganden weisen eine hohe strukturelle Diversität auf. Es handelt sich um Derivate bekannter P-gp Substrate und Modulatoren. Somit ist auch funktionell eine Unterscheidung möglich. Aufgrund dessen sollten sich spezifische Markierungsmuster ergeben und eine Identifizierung verschiedener Bindungsstellen

Tab. 3.16: Experimentelle Eckdaten und Quellenangaben der zum Vergleich herangezogenen Photoaffinitätsmarkierungen. Die Tabelle enthält die Namen der verwendeten Photoliganden und deren Ausgangsverbindungen. Da neben humanem P-gp auch solches von Hamstern oder Mäusen verwendet worden ist, wurde die Herkunft des Zielproteins ebenfalls tabelliert. Zur Identifizierung der markierten Peptide wurden neben der Immunopräzipitation (IP) und der Massenspektrometrie (MS) auch Verfahren eingesetzt, die auf der Kombination der Hochleistungsflüssigkeitschromatografie mit der Edmansequenzierung (LC-Edman) oder der Massenspektrometrie (LC-MS) beruhten.

Photoligand	basierend auf	P-gp	Analytik	Literatur
Modulator-Derivate				
Azidopin		Mensch	IP	[166]
Iodipin	Nicardipin	Hamster	LC-Edman	[158]
B9209-005	Dexniguldipin	Mensch	LC-MS	[169]
Iodoaryl-Azidoprazosin	Prazosin	Hamster	LC-Edman	[168]
		Maus	IP	[167]
GPV51	Propafenon	Mensch	MS	[50]
Substrat-Derivate				
3'-BzDC-Taxol				[170]
7-BzDC-Taxol	Paclitaxel	Maus	IP	
Iodomycin	Daunomycin	Hamster	LC-Edman	[158]

möglich sein. Dies ist jedoch nicht der Fall. Dies kann auf die genutzten Analysemethoden zur Identifizierung markierter Peptide zurückgeführt werden. Je nach angewendetem Verfahren unterscheidet sich die Genauigkeit erheblich, mit der der Ort der kovalenten Modifikation durch den Photoliganden bestimmt werden kann. Dormán et al. [171] teilen Photoaffinitätsmarkierungen abhängig davon, wie genau der Ort der Markierung bestimmt werden kann, in drei Kategorien ein. Im Makro-Bereich wird nur die kovalente Bindung des Photoliganden an das Protein detektiert. In Kombination mit Verdrängungsexperimenten kann auf diese Weise die spezifische Wechselwirkung des Liganden mit dem Zielprotein nachgewiesen werden. Die Lokalisation der Bindungsstelle ist jedoch ausgeschlossen. Im Semimikro-Bereich kann der Ort der Photoaffinitätsmarkierung bereits innerhalb der Aminosäuresequenz eingegrenzt werden. Diese Informationen lassen in Kombination mit dreidimensionalen Modellen des Proteins schon Rückschlüsse auf die Lage der Bindungsstelle zu. Im sogenannten Mikro-Bereich wird die modifizierte Aminosäure innerhalb der Proteinsequenz bestimmt. Auf diese Weise kann die Lage der Bindungsstelle auf einen sehr kleinen Bereich eingegrenzt werden. Eine so hohe Auflösung ist jedoch nur schwer zu erreichen und Ergebnisse in dieser Kategorie wurden nur selten publiziert [171].

Die vorgestellten Ergebnisse sowie die Ergebnisse der zum Vergleich herangezogenen Arbeiten sind alle im Semimikro-Bereich einzuordnen. Dennoch gibt es auch hier abhängig von der verwendeten Analysemethode deutliche Unterschiede. So erstreckte sich das kleinste mit der Immunopräzipitation detektierte Fragment über ungefähr 29 Aminosäuren [167]. Es wurden jedoch auch Markierungen in Peptiden mit einer Länge von mehr als 240 Aminosäuren identifiziert [166]. Aufgrund der recht groben Auflösung ist es auch nicht verwunderlich, dass mit diesen Arbeiten die größten Übereinstimmungen gefunden wurden. Für insgesamt 18 der 44 durch H19 und WK-X-87 markierten Peptide wurden Übereinstimmungen mit Bereichen gefunden, die durch Immunopräzipitation identifiziert worden waren (siehe Tabelle 3.15). Die Peptidanalyse mit einer Kombination aus Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Edman-Sequenzierung führte bereits zur genaueren Eingrenzung des Markierungsortes. Zwar war der kleinste Bereich mit 42 Aminosäuren etwas größer als bei der Immunopräzipitation, das größte Fragment fiel jedoch mit 82 Aminosäuren deutlich kleiner aus. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Peptide mit der Massenspektrometrie identifiziert wurden. Der Ort der Modifikation konnte auf minimal vier bis maximal 59 Aminosäuren eingegrenzt werden. Diese Methode erreichte somit die bisher beste Auflösung. Aufgrund dieser hohen Auflösung können kleine

räumliche Unterschiede bei der Markierung besser erkannt und unterschiedliche Anordnungen der photoaktivierbaren Gruppen der Liganden in der Bindungstasche eventuell detektiert werden.

Trotz dieser interexperimentell sehr ausgeprägten Unterschiede wurde ein Bereich in einem Großteil der Arbeiten detektiert. Im Sequenzabschnitt von den Aminosäuren 243 bis 271 wurden vier der insgesamt acht in der Literatur verwendeten Photoliganden kovalent gebunden. Eine weitere Markierung erfolgt durch das Propafenon-Analog GPV51 in der direkten Umgebung dieser Sequenz. Auch für den in dieser Arbeit verwendeten Photoliganden H19 wurden in diesem Bereich zwei markierte Peptide identifiziert. In der P-gp Topologie liegt diese Sequenz im intrazellulären Loop zwischen den transmembranären Helices TM4 und TM5. Zusätzlich wurde bei beiden Photoaffinitätsmarkierungen mit WK-X-87 eine mögliche Markierung im Bereich der Aminosäuren 273 bis 279 beobachtet. Dieser Sequenzabschnitt wurde jedoch von der Auswertung ausgeschlossen, da die Möglichkeit einer falsch positiven Zuordnung bestand.

Globisch et al. [160] entwickelten kürzlich ein P-gp Homologiemodell auf Basis der Kristallstruktur des bakteriellen ABC-Transporters SAV1866. Anhand des Modells konnten mit computergestützten Methoden drei mögliche Bindungsstellen identifiziert werden. Diese Bindungsstellen standen in guter Übereinstimmung mit Bereichen, die sich in Mutations-, Crosslinking- und Photoaffinitätsmarkierungsexperimenten als wichtig für die Ligand/Rezeptor-Interaktion herausstellten. Daher wurde überprüft, inwieweit Übereinstimmungen mit diesen theoretischen Bindungsstellen und den in dieser Arbeit identifizierten Peptiden bestehen. Alle Bindungsstellen lagen zwischen den Aminosäuren 69 und 1004, markierte Peptide außerhalb dieses Bereichs konnten also ausgeschlossen werden. Da ein Großteil der ausgeschlossenen Peptide, bereits beim Vergleich mit den Literaturdaten zu Photoaffinitätsmarkierungen keine Übereinstimmung zeigten, lässt dies den Schluss zu, dass in diesen Bereichen vor allem eine unspezifische Markierung beobachtet wird. Das Ergebnis des Abgleichs der restlichen markierten Peptide mit den postulierten Bindungsstellen ist in Tabelle 3.17 zusammengefasst. Peptide, die sich nur durch die Modifikation einzelner Aminosäuren unterschieden oder direkt aneinander anschlossen, wurden dabei zu Bereichen zusammengefasst. Die Bindungsstelle 1 setzt sich hauptsächlich aus in den intrazellulären Loops IC1, IC2, IC3 und IC4 zusammen. Auch die Linker-Regionen zwischen den Nukleotidbindungsstellen (NBD) und den transmembranären Helices

Tab. 3.17: Zuordnung der markierten Bereiche zu den drei postulierten Bindungsstellen. IC: Intrazellulärer Loop, TM: Transmembranäre Helix, NBD: Nukleotidbindungsstelle

Start	Ende	Photoligand	Ort	Bindungsstelle
143	148	WK-X-87	IC1	Bindungsstelle 1
182	210	H19	IC1	Bindungsstelle 1 + 2
243	271	H19	IC2	Bindungsstelle 1
788	794	WK-X-87	IC3	Bindungsstelle 1
878	885	H19	IC4	Bindungsstelle 1
896	905	H19	IC4	Bindungsstelle 1
1003	1014	H19, WK-X-87	Linker TM12-NBD	Bindungsstelle 1

TM6 und TM12 sind an der Bindungsstelle beteiligt [160]. Fünf dieser sechs wichtigen Bereiche wurden von den Photoliganden direkt markiert. Zusätzlich wurde durch beide Substanzen der Bereich zwischen AS 367 und AS 394 markiert (siehe Tabelle 3.15). Dieser liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Aminosäuren zwischen der TM6 und der NBD, die für die Bindung der Liganden als wichtig eingestuft werden. Die Bindungsstelle 1 stimmt sehr gut mit den durch die eingesetzten Photoliganden markierten Bereichen überein. Für die Bindungsstelle 2 wurde hingegen nur eine Übereinstimmung gefunden, für Bindungsstelle 3 keine Übereinstimmung identifiziert werden. Da sich diese Bindungsstellen jedoch hauptsächlich aus den transmembranären Bereichen des Proteins zusammensetzen ist dies nicht weiter verwunderlich, werden diese Aminosäuren doch von der derzeitigen Analysemethode noch nicht abgedeckt.

3.6.4 Schlussfolgerungen

Ziel dieser Arbeit war es, die Durchführbarkeit von Photoaffinitätsmarkierungen mit aufgereinigtem P-gp zu prüfen. Der Einsatz des Transportproteins in Abwesenheit von anderen Membranproteinen machte die Auftrennung und Identifizierung des markierten P-gps unnötig. Es sollte daher auch untersucht werden, ob auf eine radioaktive Markierung der Photoliganden verzichtet werden kann.

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zeigten, dass Photoaffinitätsmarkierungen unter den gewählten Bedingungen realisierbar sind. Der Fortschritt der Markierungen konnte bereits auf funktioneller Ebene durch Photoinaktivierungsexperimente nachgewiesen werden. Also kann auf die radioaktive Markierung der

Photoliganden verzichtet werden. Dies ist allerdings nur möglich, wenn P-gp nicht durch das UV-Licht geschädigt und so in seiner Funktion beeinträchtigt wird. So musste auf die Durchführung von Photoaffinitätsmarkierungen mit Progesteron verzichtet werden, weil das zur Aktivierung eingesetzte UVC-Licht die ATPase-Aktivität des Proteins völlig zum Erliegen brachte. Für die verbleibenden Photoliganden konnten die Experimente erfolgreich durchgeführt werden. Allerdings zeigte sich schon während der Photoinaktivierungsexperimente, dass nur ein kleiner Teil des eingesetzten P-gps tatsächlich markiert wird. Die vorgestellte Methode muss also noch im Hinblick auf die Effektivität der Markierung optimiert werden. Ansatzpunkte bieten hier die eingesetzte Proteinkonzentration bzw. Photoligandkonzentration sowie die Bestrahlungsdauer. Weiterhin wurde die unspezifische Markierung des Proteins mit Photoinaktivierungsexperimenten nicht untersucht, da der Einfluss der dazu nötigen hohen Konkretorkonzentrationen auf die ATPase-Aktivität von P-gp nicht abgeschätzt werden konnte. Durch die Etablierung einer Methode zur Abtrennung des Konkretors ließe sich auch dieses Konkretorexperiment durchführen. Denkbar wäre hier ein Pufferaustausch durch Gelfiltration.

Nach dem In-Gel-Verdau des markierten Proteins wurden die Peptide zunächst mit einer chromatografischen Methode fraktioniert und schließlich massenspektrometrisch analysiert. Im Gegensatz zu Standardmethoden wurde der In-Gel-Verdau in Gegenwart des Detergenzes Cymal durchgeführt und so die Abdeckung der Proteinsequenz auf fast 60 % gesteigert. Dennoch blieb vor allem der transmembranäre Bereich von der Detektion ausgeschlossen. Da besonders dieser Bereich für Bindung und Transport der P-gp Liganden von Bedeutung ist [160], müssen an dieser Stelle noch Verbesserungen eingeführt werden. So konnten beispielsweise Ecker et al. [50] durch den Einsatz der Protease Chymotrypsin eine deutlich bessere Sequenzabdeckung in den transmembranären Helices erreichen.

In dem durch die bestehende Methode abgedeckten Sequenzbereich konnte eine Reihe von Peptiden identifiziert werden, die durch die Photoliganden H19 und WK-X-87 markiert wurden. Der Vergleich mit Literaturdaten zeigte dabei gute Übereinstimmungen mit den Ergebnissen anderer Photoaffinitätsmarkierungen. Nach dem Vergleich mit drei hypothetischen Bindungsstellen, die anhand eines auf dem bakteriellen ABC-Transporter SAV1866 basierenden Homologiemodells von P-gp postuliert wurden [160], konnten einige der markierten Peptide der Bindungsstelle 1 zugeordnet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass zumin-

dest eine Bindungsdomäne der beiden verwendeten Photoliganden im Bereich der Schnittstelle zwischen Nukleotidbindungsdomänen und transmembranären Domänen liegt.

Photoaffinitätsmarkierungen können mit dem vorhandenen Material bewerkstelligt werden und die hier vorgestellten Ergebnisse sind vielversprechend. Bei entsprechender Optimierung des Versuchsprotokolls kann diese Art von Experimenten einen wichtigen Beitrag zur Klärung der Lage der Ligandbindungsstellen auf dem Transportprotein P-gp liefern.

4 Zusammenfassung

Die Expression des ABC-Transporters P-Glykoprotein in malignen Tumoren führt zu dem Phänomen der Multidrug-Resistenz. Durch den aktiven Transport des Zytostatikums aus der Zelle wird das Erreichen zytotoxisch wirksamer Konzentrationen im Tumor verhindert und so eine erfolgreiche Therapie erschwert. Aufgrund der breiten Substratspezifität des Transporters ist unabhängig von Struktur und Wirkungsmechanismus ein Großteil der zur Verfügung stehenden Zytostatika von diesem Phänomen betroffen. Durch die Inhibition des Proteins mit sogenannten Modulatoren kann das Problem der ABC-Transport vermittelten MDR umgangen werden. Jedoch konnte bisher nur für wenige Substanzen mit MDR-modulierenden Eigenschaften auch ein klinischer Nutzen nachgewiesen werden. Für die Entwicklung neuer potenter Modulatoren, die die P-gp Funktion selektiv hemmen können, wäre daher die genaue Kenntnis der Zahl und Spezifität der Bindungsstellen hilfreich. Ein Kernpunkt dieser Arbeit war daher die Etablierung von zwei Expressionssystemen, die im Anschluss zu funktionellen Untersuchungen herangezogen wurden.

Zunächst wurde die Säugetier-Zelllinie CHO-K1 mit humaner *mdr1*-cDNA transfiziert. Die Expression von humanem P-gp in der Plasmamembran der Zellen konnte mit dem spezifischen Antikörper 17F9 nachgewiesen werden und die klonale Zelllinie CHO-K1 M403 wurde als Zelllinie mit der höchsten Expressionsrate selektiert. Jedoch fiel die Expression niedriger aus als bei der resistenten Ovarialkarzinom Zelllinie A2780adr. Durch Behandlung der CHO-K1 M403 Zellen mit Natriumbutyrat konnte eine Erhöhung der Expressionsrate bis auf das Niveau der A2780adr Zellen induziert werden. Die Funktion des rekombinanten Proteins wurde mit dem Calcein-AM Transportassay an einem Testsatz aus neun Substanzen belegt.

Die P-gp Expression in den A2780adr Zellen wurde durch die Selektion mit Doxorubicin hervorgerufen. Hierbei können Punktmutationen auftreten, die die Substratspezifität des Transporters ändern [47, 48]. Gegen eine solche ungewollte Punktmutation in A2780adr Zellen spricht die gute Korrelation der im Calcein-AM Transportassay

erhaltenen pIC_{50} -Werte mit den Daten die an CHO-K1 M403 Zellen erhoben wurden. Somit konnte das in dieser Arbeit etablierte CHO-K1 Expressionssystem die Validität des bestehenden Testsystems weiter untermauern.

Durch die zusätzliche Etablierung des auf *Saccharomyces cerevisiae* basierenden Expressionssystems von Figler et al. [49] wurde anschließend die Möglichkeit geschaffen, humanes P-gp in größeren Mengen aufzureinigen. Zunächst wurden die Methoden für eine erfolgreiche Kultivierung des Hefestamms BJ5457 RAF#13 erarbeitet. Die erhaltene Biomasse wurde anschließend zur Präparation einer P-gp-haltigen Membranfraktion verwendet, die als Grundlage für die Aufreinigung des Proteins diente. Aus der Analyse der während der Kultivierung und der Membranpräparation bestimmten Parameter wurde ein Zusammenhang zwischen der Zellgröße und der Expressionsrate abgeleitet. Die zusätzliche Bestimmung der Zellgröße während des Hefewachstums könnte daher in Zukunft bereits bei Vorkulturen eine Selektion im Hinblick auf eine hohe P-gp Expression möglich machen.

Für Ausbeute und enzymatische Aktivität des reinen P-gps erwiesen sich zwei Parameter als ausschlaggebend. Zum Einen führte die Solubilisation der Hefemembranen mit dem kostengünstigeren Detergenz Taurodeoxycholat (TDOC) im Vergleich zum ursprünglich eingesetzten Detergenz Lysophosphatidylcholin nicht nur zu einer Abnahme der Ausbeute, sondern auch zur Herabsetzung der Aktivität des aufgereinigten Transporters. Zum Anderen ließ sich durch die Verringerung der Lipidkonzentration bei der Rekonstitution von 0,4 % (m/m) auf 0,1 % (m/m) zwar eine bevorzugte Einlagerung des Proteins in „inside-out“-Orientierung in die Liposomen bewirken. Dies ging jedoch ebenfalls mit einer Verringerung der enzymatischen Aktivität einher. Die verbesserte Zugänglichkeit der Nukleotidbindungsdomänen durch die vermehrte „inside-out“-Orientierung erbrachte also keinen Vorteil.

An dem aufgereinigten P-gp wurden die ATPase-Aktivierungsprofile von 28 bekannten und neuen Substraten und Modulatoren bestimmt. Die Validität des verwendeten ATPase-Assays wurde durch die gute Korrelation der erhaltenen Daten mit Literaturwerten bestätigt. Zu den untersuchten Substanzen gehörten auch zwei Hoechst-Derivate. Diese Substanzen werden von P-gp erkannt und transportiert [119], zeigten jedoch bisher im ATPase-Assay nur eine Inhibierung der ATPase-Aktivität [26, 120]. In dieser Arbeit konnte erstmals ein vollständiges Aktivierungsprofil für diese beiden Substanzen aufgenommen werden. Die Stimulation der ATPase-Aktivität ist

demnach zwar gering aber durch die hohe Aktivität des aufgereinigten Proteins messbar. Dieses Ergebnis steht nun auch im Einklang mit dem aktiven Transport dieser Substanzen.

Die beobachtete Korrelation der ATPase-Assay Daten mit den Calcein-AM Assay Daten stand zunächst im Widerspruch mit der Literatur [119], konnte jedoch dann auf die unterschiedlichen Datensätze zurückgeführt werden. Insgesamt wurden grundlegende Unterschiede zwischen beiden Testsystemen ausgemacht. Demnach wird mit dem Calcein-AM Transportassay die Fähigkeit einer Substanz charakterisiert, den P-gp vermittelten Transport einer zweiten Substanz zu hemmen. Dies ist nicht nur von der Affinität der Substanz zum Transportprotein abhängig, sondern auch von der Geschwindigkeit, mit der die Substanz die Plasmamembran der Zelle durch Diffusion überwinden kann. Die Bestimmung der ATPase-Aktivität erfolgt dagegen an P-gp, das in „inside-out“-Orientierung in den Proteoliposomen vorliegt. Die Bindungsstellen sind daher zugänglich ohne dass die Substanz den hydrophoben Kern der Phospholipidmembran überwinden muss und die Komponente der passiven Diffusion entfällt. Der ATPase-Assay liefert daher eher ein Maß für die Affinität einer Substanz zu P-gp und bietet eine sinnvolle Ergänzung zu den bestehenden Testsystemen.

Die ATPase-Assaydaten von 21 neuen P-gp Modulatoren vom XR- und WK-X-Typ dienen als Grundlage zur Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen. Die Anwendung der 3D-QSAR-Methoden CoMFA und CoMSIA ermöglichte die Erstellung von Modellen, die die Aktivität der Substanzen gut vorhersagen konnten. Die biologische Aktivität der getesteten Modulatoren ließ sich größtenteils durch sterische und elektrostatische Wechselwirkungen erklären. Die gefundenen Struktur-Wirkungsbeziehungen waren vergleichbar mit den Ergebnissen bereits bestehender QSAR-Untersuchungen strukturell verwandter Substanzen [58, 89].

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden nun die etablierten Expressionssysteme zur Untersuchung der Bindung von Substanzen an P-gp eingesetzt. Dazu wurde eine Methode zur routinemäßigen Durchführung von Radioligand-Bindungsexperimenten an P-gp im Mikrotiterplattenformat erarbeitet. Die vorläufigen Ergebnisse zeigten dabei Übereinstimmungen mit Literaturwerten und mit funktionellen Daten, die in dieser Arbeit mit dem ATPase-Assay erhoben wurden. Insgesamt waren die Bindungskonstanten im Vergleich zu Literaturdaten niedriger. Eine mögliche Ursache hierfür war der Zusatz von BSA zum Bindungspuffer zur Verhinderung der

ausgeprägten Adsorption des Radioliganden [^3H]Vinblastin an das Polypropylen-Arbeitsmaterial. Es sollten daher zukünftig Alternativen für BSA gesucht werden. Zusätzlich sollte das in dieser Arbeit etablierte Protokoll zur Präparation einer P-gp-haltigen Membranfraktion aus CHO-K1 M403 und A2780adr Zellen im Hinblick auf die Proteinausbeuten optimiert werden, um den Einsatz von mehr Protein zu ermöglichen, und so ein größeres Messfenster zu erreichen. Weiterhin wäre ein Radioligand mit höherer Affinität zu P-gp bei gleichzeitig schwach ausgeprägter Adsorption wünschenswert. Hier wäre XR9576, das in tritiiertes Form den bis dato affinsten Radioliganden darstellt, ein möglicher Kandidat. Der Radioligand ist jedoch nicht kommerziell erhältlich und müsste zunächst synthetisiert und anschließend radioaktiv markiert werden.

Die Durchführbarkeit von Photoaffinitätsmarkierungen an aufgereinigtem P-gp wurde ebenfalls überprüft. Erste Versuche mit den neuen Photoliganden H19 und WK-X-87 lieferten vielversprechende Ergebnisse. Die typischerweise für solche Experimente verwendeten Membranpräparationen erfordern eine radioaktive Markierung des verwendeten Photoliganden für die Detektion des markierten Proteins mit der Autoradiografie. Durch die Verwendung von aufgereinigtem Protein konnte auf eine radioaktive Markierung der Liganden verzichtet und die erfolgreiche Photoaffinitätsmarkierung mit Hilfe von Photoinaktivierungsexperimenten nachgewiesen werden. Anschließend wurde das Protein mit der Protease Trypsin gespalten und die Peptide einer massenspektrometrischen Analyse zugeführt. Durch die Untersuchung der Massendifferenzen konnten markierte und unmarkierte Peptide unterschieden werden. Bereits in diesem frühen Stadium konnten gute Übereinstimmungen mit publizierten Ergebnissen von Photoaffinitätsmarkierungen festgestellt werden. Zukünftig muss die Methode in Bezug auf die Effektivität der Markierung jedoch weiter optimiert werden. Auch der In-Gel Verdau und die massenspektrometrische Analyse müssen weiter verbessert werden. So werden derzeit die transmembranären Domänen von P-gp, die maßgeblich an der Bindung der Substrate und Modulatoren beteiligt sind, größtenteils nicht durch die Analytik erfasst. Wie die Arbeit von Ecker et al. [50] zeigt, könnte der zusätzliche Einsatz der Protease Chymotrypsin die Sequenzabdeckung dieses Bereichs verbessern.

Literaturverzeichnis

- [1] M. Dean und T. Annilo, Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2005**, *6*, 123–142.
- [2] B. Sarkadi, L. Homolya, G. Szakács und A. Váradi, Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system, *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 1179–1236.
- [3] K. J. Linton, Structure and function of ABC transporters, *Physiology (Bethesda)* **2007**, *22*, 122–130.
- [4] M. Dean, The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily, National Library of Medicine, Bethesda (MD), **2002**.
- [5] M. Müller, 49 Human ATP-Binding Cassette Transporters (November 2006), <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>.
- [6] H. Glavinas, P. Krajcsi, J. Cserepes und B. Sarkadi, The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity, *Curr. Drug. Deliv.* **2004**, *1*, 27–42.
- [7] T. Ozben, Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 2903–2909.
- [8] C.-H. Choi, ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal, *Cancer Cell. Int.* **2005**, *5*, 30.
- [9] J. Lubelski, W. N. Konings und A. J. M. Driessen, Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2007**, *71*, 463–476.
- [10] H. Bolhuis, D. Molenaar, G. Poelarends, H. W. van Veen, B. Poolman, A. J. Driessen und W. N. Konings, Proton motive force-driven and ATP-dependent drug extrusion systems in multidrug-resistant *Lactococcus lactis*, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 6957–6964.
- [11] P. M. Jones und A. M. George, The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research, *Cell. Mol. Life. Sci.* **2004**, *61*, 682–699.
- [12] R. L. Juliano und V. Ling, A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, *455*, 152–162.
- [13] C. J. Chen, J. E. Chin, K. Ueda, D. P. Clark, I. Pastan, M. M. Gottesman und I. B. Roninson, Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells, *Cell* **1986**, *47*, 381–389.

- [14] E. M. Leslie, R. G. Deeley und S. P. C. Cole, Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *204*, 216–237.
- [15] M. Wiese und I. K. Pajeva, Structure-activity relationships of multidrug resistance reversers, *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 685–713.
- [16] T. W. Loo, M. C. Bartlett und D. M. Clarke, Processing mutations located throughout the human multidrug resistance P-glycoprotein disrupt interactions between the nucleotide binding domains, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 38395–38401.
- [17] A. H. Schinkel, S. Kemp, M. Dollé, G. Rudenko und E. Wagenaar, N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 7474–7481.
- [18] J. J. Gribar, M. Ramachandra, C. A. Hrycyna, S. Dey und S. V. Ambudkar, Functional characterization of glycosylation-deficient human P-glycoprotein using a vaccinia virus expression system, *J. Membr. Biol.* **2000**, *173*, 203–214.
- [19] T. W. Loo und D. M. Clarke, The human multidrug resistance P-glycoprotein is inactive when its maturation is inhibited: potential for a role in cancer chemotherapy, *FASEB J.* **1999**, *13*, 1724–1732.
- [20] J. H. Gerlach, J. A. Endicott, P. F. Juranka, G. Henderson, F. Sarangi, K. L. Deuchars und V. Ling, Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance, *Nature* **1986**, *324*, 485–489.
- [21] Y. Raviv, H. B. Pollard, E. P. Bruggemann, I. Pastan und M. M. Gottesman, Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 3975–3980.
- [22] C. F. Higgins und M. M. Gottesman, Is the multidrug transporter a flippase?, *Trends. Biochem. Sci.* **1992**, *17*, 18–21.
- [23] M. A. Kol, B. de Kruijff und A. I. P. M. de Kroon, Phospholipid flip-flop in biogenic membranes: what is needed to connect opposite sides, *Semin. Cell. Dev. Biol.* **2002**, *13*, 163–170.
- [24] F. J. Sharom, Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1), *Biochem. Cell. Biol.* **2006**, *84*, 979–992.
- [25] J. Ferté, Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 277–294.
- [26] M. K. Al-Shawi, M. K. Polar, H. Omote und R. A. Figler, Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 52629–52640.

- [27] C. F. Higgins und K. J. Linton, The ATP switch model for ABC transporters, *Nature Struct. & Mol. Biol.* **2004**, *11*, 918–926.
- [28] A. B. Shapiro und V. Ling, Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 130–137.
- [29] A. B. Shapiro und V. Ling, Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 122–129.
- [30] A. B. Shapiro, A. B. Corder und V. Ling, P-glycoprotein-mediated Hoechst 33342 transport out of the lipid bilayer, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 115–121.
- [31] A. B. Shapiro, K. Fox, P. Lam und V. Ling, 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.
- [32] C. Martin, G. Berridge, C. F. Higgins, P. Mistry, P. Charlton und R. Callaghan, Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein, *Mol. Pharmacol.* **2000**, *58*, 624–632.
- [33] A. R. Safa, Identification and characterization of the binding sites of P-glycoprotein for multidrug resistance-related drugs and modulators, *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2004**, *4*, 1–17.
- [34] C. F. Higgins, Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters, *Nature* **2007**, *446*, 749–757.
- [35] T. W. Loo und D. M. Clarke, Do drug substrates enter the common drug-binding pocket of P-glycoprotein through "gates"?, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *329*, 419–422.
- [36] K. Pleban, S. Kopp, E. Csaszar, M. Peer, T. Hrebicek, A. Rizzi, G. F. Ecker und P. Chiba, 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.
- [37] S. V. Ambudkar, S. Dey, C. A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan und M. M. Gottesman, Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1999**, *39*, 361–398.
- [38] T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagoshi und Y. Sakurai, 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.
- [39] G. Szakács, J. K. Paterson, J. A. Ludwig, C. Booth-Genthe und M. M. Gottesman, Targeting multidrug resistance in cancer, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2006**, *5*, 219–234.
- [40] A. F. List, K. J. Kopecky, C. L. Willman, D. R. Head, D. L. Persons, M. L. Slovak, R. Dorr, C. Karanes, H. E. Hynes, J. H. Doroshow, M. Shurafa und F. R. Appelbaum, Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study, *Blood* **2001**, *98*, 3212–3220.

- [41] E. Wattel, E. Solary, B. Hecquet, D. Caillot, N. Ifrah, A. Brion, N. Milpied, M. Janvier, A. Guerci, H. Rochant, C. Cordonnier, F. Dreyfus, A. Veil, L. Hoang-Ngoc, A. M. Stoppa, N. Gratecos, A. Sadoun, H. Tilly, P. Brice, B. Lioure, B. Desablens, B. Pignon, J. P. Abgrall, M. Leporrier und P. Fenaux, Quinine improves results of intensive chemotherapy (IC) in myelodysplastic syndromes (MDS) expressing P-glycoprotein (PGP). Updated results of a randomized study. Groupe Français des Myélodysplasies (GFM) and Groupe GOELAMS, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1999**, *457*, 35–46.
- [42] P. A. te Boekhorst, J. van Kapel, M. Schoester und P. Sonneveld, Reversal of typical multidrug resistance by cyclosporin and its non-immunosuppressive analogue SDZ PSC 833 in Chinese hamster ovary cells expressing the *mdr1* phenotype, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1992**, *30*, 238–242.
- [43] G. D. Eytan, R. Regev, G. Oren und Y. G. Assaraf, The role of passive transbilayer drug movement in multidrug resistance and its modulation, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 12897–12902.
- [44] J. W. Polli, S. A. Wring, J. E. Humphreys, L. Huang, J. B. Morgan, L. O. Webster und C. S. Serabjit-Singh, Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2001**, *299*, 620–628.
- [45] Y. Shirasaka, M. Kawasaki, T. Sakane, H. Omatsu, Y. Moriya, T. Nakamura, T. Sakaeda, K. Okumura, P. Langguth und S. Yamashita, Induction of human P-glycoprotein in Caco-2 cells: development of a highly sensitive assay system for P-glycoprotein-mediated drug transport, *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2006**, *21*, 414–423.
- [46] P. D. Roepe, L. Y. Wei, M. M. Hoffman und F. Fritz, Altered drug translocation mediated by the MDR protein: direct, indirect, or both?, *J. Bioenerg. Biomembr.* **1996**, *28*, 541–555.
- [47] S. E. Devine und P. W. Melera, Diversity of multidrug resistance in mammalian cells, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 6133–6139.
- [48] R. A. Shilling, H. Venter, S. Velamakanni, A. Bapna, B. Woebling, S. Shahi und H. W. van Veen, New light on multidrug binding by an ATP-binding-cassette transporter, *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27*, 195–203.
- [49] R. A. Figler, H. Omote, R. K. Nakamoto und M. K. Al-Shawi, 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.
- [50] G. F. Ecker, E. Csaszar, S. Kopp, B. Plagens, W. Holzer, W. Ernst und P. Chiba, Identification of ligand-binding regions of P-glycoprotein by activated-pharmacophore photoaffinity labeling and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry, *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 637–648.
- [51] R. S. Kaplan und P. L. Pedersen, Determination of microgram quantities of protein in the presence of milligram levels of lipid with amido black 10B, *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 97–104.

- [52] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- [53] M. Naito und T. Tsuruo, Monoclonal antibodies to P-glycoprotein: preparation and applications to basic and clinical research, *Methods Enzymol.* **1998**, *292*, 258–265.
- [54] F. Lottspeich, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (Berlin), **1998**.
- [55] J. U. Meyer, Klonierung des Gens MDR1 in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+), Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn **2002**.
- [56] J. Clarke, A. J. Porter, R. Thorpe und J. M. Davis, Basic Cell Culture, in J. M. Davis (Hg.), Practical Approach, Oxford University Press, New York, **2002**, Bd. 254, Kap. Cloning, 275–294.
- [57] D. J. Young, Basic Antibody Staining, <http://cancer.ucsd.edu/flow/Protocols/Mab.asp>.
- [58] H. Müller, Funktionelle Untersuchungen des ABC-Transporters P-Glykoprotein, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn **2007**.
- [59] J. E. Lever, Active amino acid transport in plasma membrane vesicles from Simian virus 40-transformed mouse fibroblasts. Characteristics of electrochemical Na⁺-gradient-stimulated uptake, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 1990–1997.
- [60] L. M. Hjelmeland, Solubilization of native membrane proteins, *Methods Enzymol.* **1990**, *182*, 253–264.
- [61] J. Schmitt, H. Hess und H. G. Stunnenberg, Affinity purification of histidine-tagged proteins, *Mol. Biol. Rep.* **1993**, *18*, 223–230.
- [62] G. D. Eytan, Use of liposomes for reconstitution of biological functions, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, *694*, 185–202.
- [63] M. T. Paternostre, M. Roux und J. L. Rigaud, 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.
- [64] P. P. V. Veldhoven und G. P. Mannaerts, Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range, *Anal. Biochem.* **1987**, *161*, 45–48.
- [65] M. K. Al-Shawi und A. E. Senior, Characterization of the adenosine triphosphatase activity of Chinese hamster P-glycoprotein, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 4197–4206.
- [66] H. D. Höltje, W. Sippl, D. Rognan und G. Folkers, Molecular Modeling, Wiley-VCH, Weinheim, **2003**.

- [67] C. Globisch, I. K. Pajeva und M. Wiese, Structure-activity relationships of a series of tariquidar analogs as multidrug resistance modulators, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 1588–1598.
- [68] H.-J. Böhm, G. Klebe und H. Kubinyi, Wirkstoffdesign, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg(Berlin), **1996**.
- [69] T. A. Halgren, Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94, *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490–519.
- [70] J. J. P. Stewart, MOPAC2007, Computer program **2007**.
- [71] R. D. Cramer, D. E. Patterson und J. D. Bunce, Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). 1. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 5959–5967.
- [72] G. Klebe, U. Abraham und T. Mietzner, Molecular Similarity Indices in a Comparative Analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4130–4146.
- [73] C. Lemmen, T. Lengauer und G. Klebe, FlexS: A method for fast flexible ligand superposition, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4502–4520.
- [74] S. Wold, H. Wold und W. J. Dunn, The collinearity problem in linear regression: The partial least squares approach to generalized inverses, *SIAM J. Sci. Stat. Comput.* **1984**, *5*, 753–743.
- [75] R. D. Cramer, Partial Least Squares (PLS): Its strengths and limitations, in H. Kubinyi (Hg.), Perspectives in Drug Discovery and Design, ESCOM science Publishers, Leiden, **1993**, 269–278.
- [76] Tripos, Tripos Bookshelf v7.2, Tripos Inc.
- [77] A. J. Clark, The Mode of Action of Drugs on Cells, Arnold, London, **1933**.
- [78] Y. Cheng und W. H. Prusoff, Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
- [79] A. DeBlasi, K. O'Reilly und H. J. Motulsky, Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor, *Trends Pharmacol. Sci.* **1989**, *10*, 227–229.
- [80] D. R. Ferry, M. A. Russell und M. H. Cullen, P-glycoprotein possesses a 1,4-dihydropyridine-selective drug acceptor site which is allosterically coupled to a vinca-alkaloid-selective binding site, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *188*, 440–445.
- [81] D. R. Ferry, P. J. Malkhandi, M. A. Russell und D. J. Kerr, Allosteric regulation of [3H]vinblastine binding to P-glycoprotein of MCF-7 ADR cells by dexniguldipine, *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49*, 1851–1861.

- [82] C. Martin, G. Berridge, P. Mistry, C. Higgins, P. Charlton und R. Callaghan, The molecular interaction of the high affinity reversal agent XR9576 with P-glycoprotein, *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *128*, 403–411.
- [83] H. J. Motulsky, Prism 5 Regression Guide, GraphPad Software Inc., San Diego CA **2007**.
- [84] A. Christopoulos und T. Kenakin, G protein-coupled receptor allostereism and complexing, *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 323–374.
- [85] M. R. Wilkins, I. Lindskog, E. Gasteiger, A. Bairoch, J. C. Sanchez, D. F. Hochstrasser und R. D. Appel, Detailed peptide characterization using PEPTIDEMASS—a World-Wide-Web-accessible tool, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 403–408.
- [86] A. Bairoch, R. Apweiler, C. H. Wu, W. C. Barker, B. Boeckmann, S. Ferro, E. Gasteiger, H. Huang, R. Lopez, M. Magrane, M. J. Martin, D. A. Natale, C. O’Donovan, N. Redaschi und L.-S. L. Yeh, The Universal Protein Resource (UniProt), *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, D154–D159.
- [87] D. N. Perkins, D. J. Pappin, D. M. Creasy und J. S. Cottrell, Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data, *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551–3567.
- [88] F. Tang, H. Ouyang, J. Z. Yang und R. T. Borchardt, Bidirectional transport of rhodamine 123 and Hoechst 33342, fluorescence probes of the binding sites on P-glycoprotein, across MDCK-MDR1 cell monolayers, *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 1185–1194.
- [89] W. Klinkhammer, Design, Synthese und 3D-QSAR neuartiger P-gp-Modulatoren, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn **2006**.
- [90] J. Robert und C. Jarry, Multidrug resistance reversal agents, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4805–4817.
- [91] P. Mistry, A. J. Stewart, W. Dangerfield, S. Okiji, C. Liddle, D. Bootle, J. A. Plumb, D. Templeton und P. Charlton, In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 749–758.
- [92] W. Gottwald, Statistik für Anwender, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [93] G. Ruxton, The unequal variance t-test is an underused alternative to Student’s t-test and the Mann-Whitney U test, *Behav. Ecol.* **2006**, *17*, 688–690.
- [94] H. J. Motulsky, Prism 5 Statistics Guide, GraphPad Software Inc., San Diego CA **2007**.
- [95] D. P. Palermo, M. E. DeGraaf, K. R. Marotti, E. Rehberg und L. E. Post, Production of analytical quantities of recombinant proteins in Chinese hamster ovary cells using sodium butyrate to elevate gene expression, *J. Biotechnol.* **1991**, *19*, 35–47.

- [96] L. A. Mickley, S. E. Bates, N. D. Richert, S. Currier, S. Tanaka, F. Foss, N. Rosen und A. T. Fojo, Modulation of the expression of a multidrug resistance gene (mdr-1/P-glycoprotein) by differentiating agents, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 18031–18040.
- [97] J. Kruh, Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture, *Mol. Cell. Biochem.* **1982**, *42*, 65–82.
- [98] M. Wiese und I. Pajeva, *In silicio* models for interactions with transporters, in J. B. Taylor und D. J. Triggle (Hg.), *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, Elsevier, Oxford, **2007**, Bd. 5: ADMET/Property based approaches, Kap. 5.32, 767–795.
- [99] J. Pétriz, J. E. O’Connor, M. Carmona und J. García-López, Is rhodamine 123 an appropriate fluorescent probe to assess P-glycoprotein mediated multidrug resistance in vinblastine-resistant CHO cells?, *Anal. Cell. Pathol.* **1997**, *14*, 129–140.
- [100] F. Tiberghien und F. Loor, Ranking of P-glycoprotein substrates and inhibitors by a calcein-AM fluorometry screening assay, *Anticancer Drugs* **1996**, *7*, 568–578.
- [101] J. M. Croop, Evolutionary relationships among ABC transporters, *Methods Enzymol.* **1998**, *292*, 101–116.
- [102] D. F. Tang-Wai, S. Kajiji, F. DiCapua, D. de Graaf, I. B. Roninson und P. Gros, Human (MDR1) and mouse (mdr1, mdr3) P-glycoproteins can be distinguished by their respective drug resistance profiles and sensitivity to modulators, *Biochemistry* **1995**, *34*, 32–39.
- [103] M. Aihara, Y. Aihara, G. Schmidt-Wolf, I. Schmidt-Wolf, B. I. Sikic, K. G. Blume und N. J. Chao, A combined approach for purging multidrug-resistant leukemic cell lines in bone marrow using a monoclonal antibody and chemotherapy, *Blood* **1991**, *77*, 2079–2084.
- [104] S. V. Ambudkar, C. Kimchi-Sarfaty, Z. E. Sauna und M. M. Gottesman, P-glycoprotein: from genomics to mechanism, *Oncogene* **2003**, *22*, 7468–7485.
- [105] A. Jacobs, Untersuchung von Substraten und Modulatoren von P-Glykoprotein mit Hilfe funktioneller Microplaterereader-basierter Assays, Diplomarbeit, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn **2004**.
- [106] O. Weyand, Allosterische Modulation an muskarinischen M2-Acetylcholin-Rezeptoren: Nutzung des Radioallosters [3H]Dimethyl-W84 zur Überprüfung grundlegender Modellvorstellungen und Eröffnung neuer Einsichten, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn **2001**.
- [107] J. A. D’Anna, R. A. Tobey und L. R. Gurley, Concentration-dependent effects of sodium butyrate in Chinese hamster cells: cell-cycle progression, inner-histone acetylation, histone H1 dephosphorylation, and induction of an H1-like protein, *Biochemistry* **1980**, *19*, 2656–2671.
- [108] J. Graham, Centrifugation: a practical approach, in D. Rickwood und B. D. Hames (Hg.), *Practical Approaches in Biochemistry*, IRL Press, Oxford, Washington DC, **1984**, 161–182.

- [109] D. E. Oliveira, A. L. S. Neto und A. D. Panek, Permeabilization of yeast for in situ determination of alpha-glucosidase, *Anal. Biochem.* **1981**, *113*, 188–192.
- [110] M. A. Romanos, C. A. Scorer und J. J. Clare, Foreign gene expression in yeast: a review, *Yeast* **1992**, *8*, 423–488.
- [111] T. W. Hutchens, T. T. Yip und J. Porath, Protein interaction with immobilized ligands: quantitative analyses of equilibrium partition data and comparison with analytical chromatographic approaches using immobilized metal affinity adsorbents, *Anal. Biochem.* **1988**, *170*, 168–182.
- [112] A. Helenius und K. Simons, Solubilization of membranes by detergents, *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *415*, 29–79.
- [113] W. Kramp, G. Pieroni, R. N. Pinckard und D. J. Hanahan, Observations on the critical micellar concentration of 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine and a series of its homologs and analogs, *Chem. Phys. Lipids.* **1984**, *35*, 49–62.
- [114] J. Sievers, Optimierung der Aufreinigung und Rekonstitution von humanem P-Glykoprotein in *S. cerevisiae* zur Charakterisierung neuer Modulatoren, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn **2007**.
- [115] A. Levitzki, Reconstitution of membrane receptor systems, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *822*, 127–153.
- [116] S. Modok, C. Heyward und R. Callaghan, P-glycoprotein retains function when reconstituted into a sphingolipid- and cholesterol-rich environment, *J. Lipid Res.* **2004**, *45*, 1910–1918.
- [117] Z. E. Sauna und S. V. Ambudkar, Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11653–11661.
- [118] H. Omote und M. K. Al-Shawi, Interaction of transported drugs with the lipid bilayer and P-glycoprotein through a solvation exchange mechanism, *Biophys. J.* **2006**, *90*, 4046–4059.
- [119] H. Müller, W. Klinkhammer, C. Globisch, M. U. Kassack, I. K. Pajeva und M. Wiese, New functional assay of P-glycoprotein activity using Hoechst 33342, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7470–7479.
- [120] T. W. Loo, M. C. Bartlett und D. M. Clarke, Drug binding in human P-glycoprotein causes conformational changes in both nucleotide-binding domains, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1575–1578.
- [121] Y. Kimura, N. Kioka, H. Kato, M. Matsuo und K. Ueda, Modulation of drug-stimulated ATPase activity of human MDR1/P-glycoprotein by cholesterol, *Biochem. J.* **2007**, *401*, 597–605.

- [122] A. Garnier-Suillerot, C. Marbeuf-Gueye, M. Salerno, C. Loetchutinat, I. Fokt, M. Krawczyk, T. Kowalczyk und W. Priebe, Analysis of drug transport kinetics in multidrug-resistant cells: implications for drug action., *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 51–64.
- [123] A. Mälkiä, L. Murtomäki, A. Urtti und K. Kontturi, Drug permeation in biomembranes: in vitro and in silico prediction and influence of physicochemical properties, *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *23*, 13–47.
- [124] G. D. Eytan, Mechanism of multidrug resistance in relation to passive membrane permeation, *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2005**, *59*, 90–97.
- [125] L. Homolya, Z. Holló, U. A. Germann, I. Pastan, M. M. Gottesman und B. Sarkadi, Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 21493–21496.
- [126] M. Essodaigui, H. J. Broxterman und A. Garnier-Suillerot, Kinetic analysis of calcein and calcein-acetoxymethylester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein, *Biochemistry* **1998**, *37*, 2243–2250.
- [127] T. Litman, T. Zeuthen, T. Skovsgaard und W. D. Stein, Structure-activity relationships of P-glycoprotein interacting drugs: kinetic characterization of their effects on ATPase activity, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1361*, 159–168.
- [128] M. Roe, A. Folkes, P. Ashworth, J. Brumwell, L. Chima, S. Hunjan, I. Pretswell, W. Dangerfield, H. Ryder und P. Charlton, Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by novel anthranilamide derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 595–600.
- [129] H. Müller, I. K. Pajeva, C. Globisch und M. Wiese, Functional assay and structure-activity relationships of new third-generation P-glycoprotein inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* **2008** (accepted).
- [130] J. Malkhandi, D. R. Ferry, R. Boer, V. Gekeler, W. Ise und D. J. Kerr, Dexniguldipine-HCl is a potent allosteric inhibitor of [3H]vinblastine binding to P-glycoprotein of CCRF ADR 5000 cells, *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, *288*, 105–114.
- [131] R. Callaghan, G. Berridge, D. R. Ferry und C. F. Higgins, The functional purification of P-glycoprotein is dependent on maintenance of a lipid-protein interface, *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1328*, 109–124.
- [132] C. Martin, G. Berridge, C. F. Higgins und R. Callaghan, The multi-drug resistance reversal agent SR33557 and modulation of vinca alkaloid binding to P-glycoprotein by an allosteric interaction, *Br. J. Pharmacol.* **1997**, *122*, 765–771.
- [133] C. Martin, G. Berridge, P. Mistry, C. Higgins, P. Charlton und R. Callaghan, Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis, *Biochemistry* **2000**, *39*, 11901–11906.
- [134] C. Martin, C. F. Higgins und R. Callaghan, The vinblastine binding site adopts high- and low-affinity conformations during a transport cycle of P-glycoprotein, *Biochemistry* **2001**, *40*, 15733–15742.

- [135] M. M. Cornwell, M. M. Gottesman und I. H. Pastan, Increased vinblastine binding to membrane vesicles from multidrug-resistant KB cells, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 7921–7928.
- [136] M. Horio, M. M. Gottesman und I. Pastan, ATP-dependent transport of vinblastine in vesicles from human multidrug-resistant cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1988**, *85*, 3580–3584.
- [137] S. Döppenschmitt, P. Langguth, C. G. Regårdh, T. B. Andersson, C. Hilgendorf und H. Spahn-Langguth, Characterization of binding properties to human P-glycoprotein: development of a [³H]verapamil radioligand-binding assay, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *288*, 348–357.
- [138] M. Naito, H. Hamada und T. Tsuruo, ATP/Mg²⁺-dependent binding of vincristine to the plasma membrane of multidrug-resistant K562 cells, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 11887–11891.
- [139] M. Sehested, N. Bindslev, E. J. Demant, T. Skovsgaard und P. B. Jensen, Daunorubicin and vincristine binding to plasma membrane vesicles from daunorubicin-resistant and wild type Ehrlich ascites tumor cells, *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 3017–3027.
- [140] K.-J. Lee, R. Mower, T. Hollenbeck, J. Castelo, N. Johnson, P. Gordon, P. J. Sinko, K. Holme und Y.-H. Lee, Modulation of nonspecific binding in ultrafiltration protein binding studies, *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 1015–1021.
- [141] K. H. Bauer, K. Frömming und C. Führer, Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **1999**, 6. Aufl.
- [142] U. Voigtländer, Kooperative Interaktionen an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren: Suche nach essentiellen Aminosäuren der allosterischen Bindungsstelle von M₂-Rezeptoren, Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn **2003**.
- [143] H. I. Yamamura, S. J. Enna und M. J. Kuhar (Hg.), Neurotransmitter receptor binding, Raven Press, New York, **1985**.
- [144] D. M. Veenstra, K. J. van Buuren, M. J. Krielaart und F. P. Nijkamp, Errors introduced in radioligand binding studies due to displaceable, cation dependent, [³H]prazosin binding to glass-fibre filters and glass surfaces, *J. Recept. Res.* **1993**, *13*, 801–814.
- [145] H. Lüllman und K. Mohr, Pharmakologie und Toxikologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1999**.
- [146] L. Wilson, K. M. Creswell und D. Chin, The mechanism of action of vinblastine. Binding of [acetyl-³H]vinblastine to embryonic chick brain tubulin and tubulin from sea urchin sperm tail outer doublet microtubules, *Biochemistry* **1975**, *14*, 5586–5592.
- [147] T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagoshi und Y. Sakurai, Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors, *Cancer Res.* **1982**, *42*, 4730–4733.

- [148] M. A. Russell und D. R. Ferry, Pharmacological profile of [3H]vinblastine binding to the lung cancer cell line H69P which does not express P-gp, *Br. J. Pharm.* **1993**, *108*, 227P.
- [149] H. Ryder, P. A. Ashworth, M. J. Roe, J. E. Brumwell, S. Hunjan, A. J. Folkes, J. T. Sanderson, S. Williams und L. M. Maximen, Anthranilic acid derivatives as multidrug resistance modulators, Patent WO98/17648 **1998**.
- [150] H. I. Yamamura, S. J. Enna und M. J. Kuhar (Hg.), Neurotransmitter receptor binding, Raven Press, New York, **1985**.
- [151] V. T. Chuang, A. Kuniyasu, H. Nakayama, Y. Matsushita, S. Hirono und M. Otagiri, Helix 6 of subdomain III A of human serum albumin is the region primarily photolabeled by ketoprofen, an arylpropionic acid NSAID containing a benzophenone moiety, *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, *1434*, 18–30.
- [152] G. Dormán und G. D. Prestwich, Benzophenone photophores in biochemistry, *Biochemistry* **1994**, *33*, 5661–5673.
- [153] H. Bayley, Photogenerated Reagents in Biochemistry and Molecular Biology, in T. S. Work und R. H. Burdon (Hg.), Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, **1983**.
- [154] X. D. Qian und W. T. Beck, Progesterone photoaffinity labels P-glycoprotein in multidrug-resistant human leukemic lymphoblasts, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 18753–18756.
- [155] A. Dominik und D. Steinhilber, Instrumentelle Analytik für Pharmazeuten, Jungjohann Verlag bei Gustav Fischer, Ulm ; Stuttgart ; Jena ; Lübeck, **1996**.
- [156] M. Peer, E. Csaszar, E. Vorlauffer, S. Kopp und P. Chiba, Photoaffinity labeling of P-glycoprotein, *Mini Rev. Med. Chem.* **2005**, *5*, 165–172.
- [157] E. Shacter, Protein oxidative damage, *Methods Enzymol.* **2000**, *319*, 428–436.
- [158] A. Demmer, S. Andreae, H. Thole und B. Tümmler, Iodomycin and iodipine, a structural analogue of azidopine, bind to a common domain in hamster P-glycoprotein, *Eur. J. Biochem.* **1999**, *264*, 800–805.
- [159] H. S. Penefsky, A centrifuged-column procedure for the measurement of ligand binding by beef heart F1, *Methods Enzymol.* **1979**, *56*, 527–530.
- [160] C. Globisch, I. K. Pajeva und M. Wiese, Identification of putative binding sites of P-glycoprotein based on its homology model, *ChemMedChem* **2008**, *3(2)*, 280–295.
- [161] B. A. van Montfort, M. K. Doeven, B. Canas, L. M. Veenhoff, B. Poolman und G. T. Robillard, Combined in-gel tryptic digestion and CNBr cleavage for the generation of peptide maps of an integral membrane protein with MALDI-TOF mass spectrometry, *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, *1555*, 111–115.
- [162] M. Mann, R. C. Hendrickson und A. Pandey, Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 437–473.

- [163] O. Brokemper, A. Bücken, J. Meyer, G. Treitz, M. Wiese und M. Zabe-Kühn, Optimization of in-gel digestion conditions of ABC-transporter P-glycoprotein **2005**, poster - Proteomics Workshop Brixen.
- [164] H. Katayama, T. Tabata, Y. Ishihama, T. Sato, Y. Oda und T. Nagasu, Efficient in-gel digestion procedure using 5-cyclohexyl-1-pentyl-beta-D-maltoside as an additive for gel-based membrane proteomics, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* **2004**, *18*, 2388–2394.
- [165] S. V. Ambudkar, I.-W. Kim und Z. E. Sauna, The power of the pump: mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1), *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *27*, 392–400.
- [166] E. P. Bruggemann, S. J. Currier, M. M. Gottesman und I. Pastan, Characterization of the azidopine and vinblastine binding site of P-glycoprotein, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 21020–21026.
- [167] L. M. Greenberger, Major photoaffinity drug labeling sites for iodoaryl azidoprazosin in P-glycoprotein are within, or immediately C-terminal to, transmembrane domains 6 and 12, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 11417–11425.
- [168] B. Isenberg, H. Thole, B. Tümmler und A. Demmer, Identification and localization of three photobinding sites of iodoarylazidoprazosin in hamster P-glycoprotein, *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2629–2634.
- [169] C. Borchers, R. Boer, K. Klemm, V. Figala, T. Denzinger, W.-R. Ulrich, S. Haas, W. Ise, V. Gekeler und M. Przybylski, Characterization of the dextriguldipine binding site in the multidrug resistance-related transport protein P-glycoprotein by photoaffinity labeling and mass spectrometry, *Mol. Pharmacol.* **2002**, *61*, 1366–1376.
- [170] Q. Wu, P. Y. Bounaud, S. D. Kuduk, C. P. Yang, I. Ojima, S. B. Horwitz und G. A. Orr, Identification of the domains of photoincorporation of the 3'- and 7-benzophenone analogues of taxol in the carboxyl-terminal half of murine mdr1b P-glycoprotein, *Biochemistry* **1998**, *37*, 11272–11279.
- [171] G. Dormán und G. D. Prestwich, Using photolabile ligands in drug discovery and development, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64–77.