

**Massenspektrometrische Analyse
von enzymatisch-chemischen Verdaus zur Detektion von
Photoaffinitätsmarkierungen des ABC-Transporters
P-Glykoprotein**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Svenja Wieschrath
aus
Hamm (Westfalen)

Bonn, März 2015

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

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Wiese
2. Gutachter: Prof. Dr. G. Bendas

Tag der Promotion: 03.07.2015

Erscheinungsjahr: 2015

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

Man merkt nie, was schon getan wurde,
man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.

Marie Curie

Danksagung

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Michael Wiese am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn angefertigt. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Überlassung dieses interessanten und anspruchsvollen Projektes, die mir gewährten Freiräume und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Seine konstruktive Kritik hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferates und die unkomplizierte Zusammenarbeit im Rahmen der Betreuung der Studenten des 1. Semesters.

Für ihre Mitwirkung in der Prüfungskommission danke ich Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde und Herrn Prof. Dr. Arne Lützen.

An Frau Dr. Sabine Metzger geht ein sehr großes Dankeschön für die tolle Betreuung und geduldige Einführung in die Theorie und Praxis der Massenspektrometrie. Ihre stete Gesprächsbereitschaft, die vielen angeregten Diskussionen sowie das sorgfältige Korrekturlesen waren maßgeblich für den Erfolg dieser Arbeit.

Allen meinen ehemaligen und aktuellen Kollegen aus dem Arbeitskreis Wiese möchte ich ganz herzlich für die vielen gemeinsam verbrachten Stunden und die freundschaftliche Atmosphäre danken. Dabei gilt mein ganz besonderer Dank Frau Dr. Anna Jacobs und Herrn Dieter Baumert für die Einführung in das Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae* und ihre Mithilfe bei der Herstellung von aufgereinigtem P-Glykoprotein. Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kollegen Dr. Stefan Leyers und Jennifer Gallus für das gute Büroklima und die gemeinsam verbrachten Arbeitstage bedanken.

Bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises Bendas bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die gemeinsam verbrachten Mittagsstunden.

Auch meinen Kollegen aus dem 1. Semester möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit bei der Betreuung der Erstsemesterstudenten danken.

Mein ganz spezieller Dank geht an meine Familie und meinen Freund Christian für ihren Rückhalt, ihre andauernde Motivation und moralische Unterstützung insbesondere in Zeiten, in denen es mit der Anfertigung dieser Arbeit stockte.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis.....	iv
1 Einleitung.....	1
1.1 ABC-Transportproteine und ihre medizinische Relevanz.....	1
1.2 ABC-Transporter vermittelte Multidrug Resistenz.....	5
1.3 P-Glykoprotein (ABCB1).....	7
1.3.1 Allgemeine Funktionsweise von P-Glykoprotein.....	9
1.3.2 Transportzyklus von P-Glykoprotein.....	11
1.3.3 Bindungsstellen von P-Glykoprotein.....	18
1.3.4 Substrate und Modulatoren von P-Glykoprotein.....	22
1.3.4.1 Substrate.....	22
1.3.4.2 Modulatoren.....	23
2 Zielsetzung.....	29
3 Material und Methoden.....	31
3.1 Allgemeine Methoden.....	31
3.1.1 Herstellung von Pufferlösungen.....	31
3.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	32
3.1.3 Färbung von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen.....	35
3.2 Enzymatisch-chemische Verdaus von P-Glykoprotein.....	38
3.2.1 In-Gel-Verdau.....	39
3.2.1.1 In-Gel-Verdau Protokoll Dr. Metzger.....	40
3.2.1.2 In-Gel-Verdau Protokoll Dr. Hess.....	43
3.2.1.3 Kombiniertes In-Gel-Verdau.....	46
3.2.2 In-Lösung-Verdau.....	47
3.2.2.1 Trypsin-In-Lösung-Verdau.....	49
3.2.2.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau.....	50
3.2.2.3 Bromcyan-In-Lösung-Verdau.....	51
3.2.2.4 Pepsin-In-Lösung-Verdau.....	53
3.2.2.5 Elastase-In-Lösung-Verdau.....	56
3.2.2.6 Proteinase K-In-Lösung-Verdau.....	57
3.2.2.7 Thermolysin-In-Lösung-Verdau.....	58
3.2.2.8 Kombinations-Verdaus unter Einsatz von MWCO-Filtern.....	60
3.2.2.9 In-Lösung-Verdau in Kombination mit Hitzedenaturierung.....	62
3.2.2.10 In-Lösung-Verdau mit massenkompatiblen Detergenzien.....	63
3.3 Photoaffinitätsmarkierungen von P-Glykoprotein.....	70
3.3.1 Photoaffinity Labeling mit 8-Azido-ATP.....	73
3.3.2 Photoaffinity Labeling mit 2,4-Dihydroxybenzophenon.....	78
3.3.3 Photoaffinity Labeling mit H15 und H19.....	80
3.4 Massenspektrometrie.....	83
3.4.1 Theoretische Grundlagen der Massenspektrometrie.....	83
3.4.2 Praktische Durchführung der massenspektrometrischen Analyse.....	96
3.5 Chemikalien und Reagenzien.....	103
3.6 Verbrauchsmaterialien.....	105

3.7 Geräte und Zubehör.....	106
4 Ergebnisse und Diskussion.....	108
4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von P-gp.....	108
4.2 Enzymatisch-Chemische Verdau von P-gp.....	110
4.2.1 In-Gel-Verdau von P-gp.....	112
4.2.1.1 Trypsin-In-Gel-Verdau von P-gp.....	114
4.2.1.2 Chymotrypsin-In-Gel-Verdau.....	120
4.2.1.3 Kombiniertes In-Gel-Verdau von P-gp.....	127
4.2.2 In-Lösung-Verdau von P-gp.....	128
4.2.2.1 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp.....	129
4.2.2.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp.....	136
4.2.2.3 Bromcyan-In-Lösung-Verdau von P-gp.....	144
4.2.2.4 Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp.....	149
4.2.2.5 Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp.....	160
4.2.2.6 In-Lösung-Verdau von P-gp mit Proteinase K.....	166
4.2.2.7 Thermolysin-In-Lösung-Verdau von P-gp.....	174
4.2.2.8 Kombinations-Verdau von P-gp unter Einsatz eines MWCO-Filters.....	179
4.2.2.8.1 Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters.....	180
4.2.2.8.2 Trypsin/Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters.....	184
4.2.2.8.3 Bromcyan/Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters.....	187
4.2.2.8.4 Bromcyan/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters.....	189
4.2.2.8.5 Bromcyan/Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters.....	192
4.2.2.9 In-Lösung-Verdau in Kombination mit Hitzedenaturierung.....	194
4.2.2.9.1 Trypsin-In-Lösung-Verdau in Verbindung mit Hitzedenaturierung von P-gp	195
4.2.2.9.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Verbindung mit Hitzedenaturierung von P-gp.....	197
4.2.2.10 In-Lösung-Verdau mit massenkompatiblen Detergenzien.....	201
4.2.2.10.1 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit AALS II.....	203
4.2.2.10.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit AALS II.....	208
4.2.2.10.3 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ZALS I.....	214
4.2.2.10.4 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ZALS I.....	218
4.2.2.10.5 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit NALS II.....	223
4.2.2.10.6 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®	230
4.2.2.10.7 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®.....	234
4.2.2.10.8 Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®	242
4.3 Photoaffinitätsmarkierungen von P-gp.....	248
4.3.1 Photoaffinity Labeling von P-gp mit 8-Azido-ATP.....	250
4.3.2 Photoaffinity Labeling von P-gp mit 2,4-Dihydroxybenzophenon.....	263
4.3.3 Photoaffinity Labeling von P-gp mit H15.....	274

Inhaltsverzeichnis

4.3.4 Photoaffinity Labeling von P-gp mit H19.....	285
5 Zusammenfassung.....	296
Literaturverzeichnis.....	309
Publikationen.....	319
Verfassererklärung.....	320
Lebenslauf.....	321

Abkürzungsverzeichnis

AALS	Anionic Acid Labile Surfactant (Anionisches säurelabiles Detergens)
ABC	ATP-binding cassette
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein, ABCG2
CHO-Zellen	Chinesische Hamster-Ovarzellen
CMC	Critical Micelle Concentration (Kritische Mizellbildungskonzentration)
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
ESI	Electrospray Ionization
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
MDR	Multidrug Resistenz
MRP1	Multidrug resistance-associated protein 1, ABCC1
MS	Massenspektrometrie
MSD	Membrane Spanning Domain (Transmembranäre Domäne)
NALS	Non-Ionic Acid Labile Surfactant (Nichtionisches säurelabiles Detergens)
NBD	Nukleotid-Bindungsdomäne
P-gp	P-Glykoprotein, ABCB1
P _i	Anorganisches Phosphat
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TFA	Trifluoressigsäure
TM	Transmembranäre Helix
TMD	Transmembranäre Domäne
TOF	Time-of-flight
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ZALS	Zwitterionic Acid Labile Surfactant (Zwitterionisches säurelabiles Detergens)

1 Einleitung

1.1 ABC-Transportproteine und ihre medizinische Relevanz

ATP-binding cassette (ABC) Transporter repräsentieren eine der größten Familien strukturell verwandter Membranproteine, welche angetrieben durch die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat (P_i) ein breites Spektrum unterschiedlicher Substanzen (z. B. Ionen, Peptide, Phospholipide und Polysaccharide) durch die Zellmembran transportieren [1]. ABC-Transporter werden durch die Gene der ABC-Superfamilie kodiert und kommen ubiquitär sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten vor [2, 3]. Aus der breiten Substratspezifität und dem ubiquitären Vorkommen wird die bedeutende Rolle, die diese Transportproteine bei vielen lebenswichtigen Prozessen wie der Nährstoffaufnahme, der Ausscheidung giftiger Metabolite, der Energiegewinnung und der Signaltransduktion in der Zelle innehaben, ersichtlich [4]. Namensgeber für die Proteinfamilie ist die ATP-bindende Domäne bzw. Nukleotid-Bindungsdomäne (NBD), welche für die Bindung und Hydrolyse von ATP verantwortlich und bei allen Mitgliedern hoch konserviert ist. Sie besteht aus verschiedenen charakteristischen Aminosäuresequenzen, darunter die allgemein für Nukleotidbindungsstellen typischen Motive „Walker A“ und „Walker B“ als auch das dazwischen liegende, für ABC-Transporter spezifische ABC-Signatur Motiv, welches die Zugehörigkeit zur ABC-Superfamilie anzeigt [2, 3, 4]. Anhand der Überlagerung ihrer NBD-Sequenzen und nachfolgender phylogenetischer Analyse, lassen sich die 48 humanen Vertreter dieser Superfamilie in die sieben Subfamilien ABC-A bis ABC-G einteilen [5, 6].

Fast alle ABC-Transporter zeigen einen typischen Aufbau aus zwei homologen Hälften, von denen wiederum jede eine transmembranäre Domäne (TMD) und die bereits genannte zytoplasmatische Nukleotid-Bindungsdomäne aufweist [5, 6]. In Abhängigkeit von der Transportrichtung durch die Membran wird zwischen ABC-Exportern, die Substanzen aus der Zelle ausschleusen und ABC-Importern, die eine Aufnahme von Substanzen in die Zelle vermitteln, unterschieden. ABC-Importer werden ausschließlich in Prokaryonten exprimiert und erfordern für den Transport des Substrates eine zusätzliche periplasmatische Bindungsdomäne [4]. Im Gegensatz dazu transportieren

ABC-Exporter das Substrat entweder aus dem Zytoplasma oder der zytosolischen Membranschicht heraus und benötigen diese zusätzliche periplasmatische Bindungsstelle deshalb nicht [7]. Insbesondere in Prokaryonten kommen einige Proteine vor, die aus isolierten NBDs bestehen und regulatorische Funktion besitzen. Die weiteren prokaryotischen Transporter (meist Importer) zeigen den für die gesamte Familie charakteristischen Aufbau aus TMDs und NBDs, allerdings werden diese in der Regel als separate Polypeptidketten exprimiert und müssen sich erst zu einer funktionstüchtigen Einheit zusammenlagern [8, 9]. In bakteriellen ABC-Exportern sind die TMD und die NBD miteinander verknüpft und bilden einen „Halbtransporter“ aus, der als Homo- bzw. Heterodimer vorliegen muss, um Transportfunktion zu erlangen. Ein Beispiel für einen bakteriellen ABC-Exporter stellt der Phospholipidtransporter MsbA aus *Vibrio cholerae* dar, für den als einer der ersten ABC-Transporter eine hoch aufgelöste Kristallstruktur konstruiert werden konnte [10, 11]. Im Gegensatz zu den prokaryotischen Vertretern handelt es sich bei den eukaryotischen ABC-Transportern in der Mehrzahl der Fälle um Exporter, bei denen die vier funktionellen Untereinheiten (TMDs und NBDs) innerhalb einer einzigen Polypeptidkette vereinigt sind [6].

Vergleicht man die transmembranären Domänen der diversen ABC-Transporter miteinander, werden große Unterschiede bezüglich des Aufbaus deutlich. Ausgehend von der Aminosäuresequenz variieren sie in Länge, Anzahl und Organisation der transmembranären Helices (TM). ABC-Exporter zeigen einen charakteristischen Aufbau aus 12 TMs, während ABC-Importer zwischen 10 und 20 TMs enthalten können. Als Besonderheit beobachtet man bei einigen ABC-Exportern, beispielsweise ABCC1, eine zusätzliche transmembranäre Domäne bestehend aus 5 - 6 TMs, der eine regulatorische Funktion nachgesagt wird. Verantwortlich für den unterschiedlichen Aufbau der TMDs ist die Spezifität für die jeweiligen zu transportierenden Substrate.

Im Gegensatz zu den TMDs sind die für die Bindung und Hydrolyse von ATP verantwortlichen NBDs hoch konserviert. Sie bestehen aus für ABC-Transporter charakteristischen Aminosäuresequenzen, die entweder direkt an der ATP-Bindung bzw. -Hydrolyse beteiligt sind oder weitere für die Funktion essenzielle Interaktionsstellen beinhalten. Hierzu zählen die beiden Motive „Walker A“ und „Walker B“, das LSGGQ- oder ABC-Signatur-Motiv, sowie Q-Loop, D-Loop, P-Loop und H-Loop. Dabei werden dem

Walker A- und LSGGQ-Motiv eine Beteiligung an der Nukleotid-Bindung, dem Walker B-Motiv und H-Loop eine Mitwirkung an der ATP-Hydrolyse, dem Q-Loop die Bindung des γ -Phosphates und dem D-Loop eine Funktion als Kontaktstelle zwischen den beiden NBDs zugesprochen [13, 14, 15].

Bis heute konnten im menschlichen Genom mindestens 48 Gene, die für ABC-Transporter kodieren, identifiziert werden [1]. Der durch das 49. entdeckte Gen *ABCC13* kodierte ABC-Transporter wurde laut der Swissprot-Datenbank lediglich auf Transkriptionsebene nachgewiesen. Anhand ihrer Sequenz werden die 48 humanen ABC-Transporter in die sieben Unterfamilien ABC-A bis ABC-G eingeteilt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Subfamilien ABC-E und ABC-F keine TMDs enthalten und somit keine membranständigen Transporter im eigentlichen Sinne darstellen [12]. Aufgrund der Tatsache, dass sie über die für ABC-Transporter charakteristischen NBDs verfügen, werden sie aber zur ABC-Transporter Superfamilie hinzu gezählt.

Einige ABC-Transporter erkennen ein äußerst breites Spektrum von Verbindungen als Substrate und werden insbesondere in Geweben exprimiert, denen eine physiologische Barrierefunktion zukommt. Die am besten untersuchten humanen Transportproteine P-Glykoprotein (P-gp, MDR1 oder ABCB1), Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1 oder ABCC1) und Breast Cancer Resistance Protein (BCRP oder ABCG2) dienen in Darm, Leber und Niere dem Schutz vor potenziell toxischen Fremdstoffen, da sie sowohl deren Absorption im Darm verringern als auch ihre Ausscheidung über Leber und Niere beschleunigen [16, 17, 18]. Zusätzlich dazu übernehmen P-gp und BCRP in besonders sensiblen Geweben wie der Blut-Hirn-Schranke und der Plazenta eine wichtige Barrierefunktion [2]. Dagegen sind die physiologischen Funktionen und Substrate vieler weiterer Transportproteine bisher noch unbekannt.

Wie bereits erwähnt, zeigt eine Reihe von menschlichen ABC-Transportern eine sehr breite, teilweise überlappende Spezifität für strukturell nicht verwandte Substanzen. Häufig sind die einzigen erkennbaren Gemeinsamkeiten eine gewisse Lipophilie gepaart mit einem polaren Teil und somit insgesamt ein amphiphiler Charakter, eine planare räumliche Struktur und ein Molekulargewicht von weniger als 800 Dalton. Die beschriebenen Kriterien werden von vielen der sich auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe erfüllt. Zu den Substraten von ABC-Transportproteinen zählen beispielsweise

Verbindungen aus der Gruppe der Antibiotika, der Antimalariamittel und der Virustatika sowie eine große Anzahl von Zytostatika [16, 19-21].

Durch die Interaktion der ABC-Transporter mit den genannten Arzneistoffen werden wichtige Parameter der Pharmakokinetik wie Absorption, Distribution, Metabolisierung und Elimination und damit ihre Bioverfügbarkeit beeinflusst [12]. Beispielsweise kann es bei gleichzeitiger Einnahme mehrerer Arzneistoffe zu klinisch relevanten Wechselwirkungen kommen, vorausgesetzt, die Wirkstoffe interagieren mit dem selben ABC-Transporter und das Transportprotein besitzt eine begrenzte Transportkapazität. Dabei kann sich die gegenseitige Beeinflussung in einer Erhöhung oder einer Abnahme der Plasmakonzentration niederschlagen, was im schlimmsten Fall bei enger therapeutischer Breite eine Intoxikation bzw. einen Wirkungsverlust bedeutet. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass die Expression einiger ABC-Transporter durch Enzyminduktoren (z. B. Rifabutin) erhöht wird und es dadurch zu einer Veränderung der Pharmakokinetik von Arzneistoffen kommt, die mit diesen Transportproteinen wechselwirken. Außerdem kann es passieren, dass eigentlich ZNS-gängige Wirkstoffe ihren Wirkort nicht mehr erreichen, weil sie Substrate von in der Blut-Hirn-Schranke exprimierten ABC-Transportern darstellen.

Da Bioverfügbarkeit und Gewebeverteilung nicht nur für die Arzneimittelsicherheit, sondern auch für die Entwicklung neuer Wirkstoffe und Arzneiformen relevant sind, werden heutzutage neue Arzneistoffkandidaten in der Präklinik routinemäßig auf ihre Wechselwirkung mit den häufigsten ABC-Transportern (insbesondere P-Glykoprotein) untersucht [18].

Überdeutlich zeigt sich die Wichtigkeit von ABC-Transportern für den menschlichen Organismus beim Auftreten von Mutationen in den kodierenden Genen, welche einen teilweisen bzw. vollständigen Funktionsverlust der entsprechenden Transportproteine zur Folge haben. Dabei sind von den 49 humanen Genen ganze 17 von Mutationen betroffen [1]. Beispielsweise sind Mutationen in den Genen ABCC7 bzw. ABCA1 die Ursachen für die Erbkrankheiten „zystische Fibrose“ [6, 22] und „Morbus Tangier“ [23].

1.2 ABC-Transporter vermittelte Multidrug Resistenz

Die chemotherapeutische Behandlung mit zytostatisch wirksamen Arzneistoffen stellt eine wichtige Säule in der Therapie maligner Erkrankungen dar. In einer Reihe von Fällen wird der Therapieerfolg jedoch durch die Entwicklung einer Resistenz der Tumorzellen gegenüber den eingesetzten Zytostatika begrenzt. Die Resistenzentwicklung kann dabei entweder durch unspezifische Mechanismen, die zu einem Wirkungsverlust verschiedener Wirkstoffklassen führen, erfolgen oder durch für einen bestimmten Arzneistoff bzw. eine definierte Substanzgruppe spezifische Mechanismen. Beispielsweise kommt es durch die vermehrte Expression der Dihydrofolatreduktase zu einer Resistenz gegenüber Methotrexat, welches seine zytostatische Wirkung über den Angriff an diesem Enzym entfaltet [24]. Zu den unspezifischen Resistenzmechanismen zählen eine verstärkte DNA-Reparatur, eine Verringerung apoptotischer Signaltransduktionswege und die Anwesenheit von sich nicht teilenden Zellen innerhalb eines soliden Tumors [24].

Auch eine Reihe von multispezifischen ABC-Transportern wird für die Entwicklung einer unspezifischen Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Struktur und vom Wirkungsmechanismus variierender Zytostatika verantwortlich gemacht [25]. Diese Kreuzresistenz wird als „Phänomen der klassischen Multidrug Resistenz (MDR)“ bezeichnet. Verursacht wird die beobachtete Resistenz unter anderem durch die Überexpression bestimmter ABC-Transporter in der Zellmembran von Tumorzellen und den damit verbundenen gesteigerten Efflux der betroffenen Zytostatika aus den Tumorzellen heraus. Dies hat eine Verringerung der intrazellulären Zytostatikakonzentration unterhalb die Wirksamkeitsgrenze und damit letztendlich ein Therapieversagen zur Folge [26].

Der Zusammenhang zwischen auftretender MDR und ABC-Transportern konnte erstmalig im Jahre 1976 am Beispiel des ABCB1 gezeigt werden: Mit Colchicin selektionierte, resistente Chinese Hamster Ovarial (CHO)-Zellen wiesen eine Kreuzresistenz gegenüber mehreren verschiedenen Zytostatika auf [28]. Einige Jahre später (1987) gelang es Ueda et al. durch Transfektion sensitiver Zellen mit dem humanen ABCB1-Gen nachzuweisen, dass für den beobachteten MDR-Phänotyp die alleinige Expression dieses ABC-Transporters in der Zellmembran verantwortlich ist [29]. Für eine Reihe weiterer ABC-

Transporter, darunter ABCC1 und ABCG2, konnten ähnliche Zusammenhänge festgestellt werden [30].

Die vier wichtigsten, in diesem Zusammenhang identifizierten ABC-Transporter ABCB1, ABCC1, ABCC2 und ABCG2 sind in Tabelle 1.1 beschrieben. Auffällig ist, dass es sich bei den an der MDR beteiligten ABC-Transportern überwiegend um solche Transporter handelt, die unter physiologischen Bedingungen eine Schutzfunktion gegenüber Xenobiotika übernehmen. Unabhängig von der Zugehörigkeit zu verschiedenen Subfamilien weisen die beschriebenen ABC-Transporter ein überlappendes Substratspektrum auf. Die in der Tabelle beispielhaft aufgelisteten Substrate verdeutlichen die außerordentliche strukturelle und funktionelle Diversität der transportierten Verbindungen. Häufig besteht die einzige Gemeinsamkeit in einer gewissen Lipophilie, kombiniert mit einem polaren Teil, so dass insgesamt amphiphile Eigenschaften vorherrschen [27].

Tab. 1.1: Zusammenstellung der vier wichtigsten ABC-Transporter, für die der klassische MDR-Phänotyp beobachtet wurde [27].

Name	systematische Bezeichnung	ausgewählte 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

Trotz der vielen Hinweise für einen kausalen Zusammenhang zwischen beobachteter Resistenz und der Überexpression von ABC-Transportern, konnte die tatsächliche klinische Relevanz der Transporter assoziierten MDR bis heute noch nicht abschließend geklärt werden. Allerdings wird eine Beteiligung von ABCB1 in der Resistenzentwicklung der akuten myeloischen Leukämie (AML) als sicher angenommen [31, 32]. Außerdem wird insbesondere für maligne entartete Gewebe, die bereits durch eine hohe physiologische

Expression von ABCB1 charakterisiert sind, eine so genannte intrinsische MDR beobachtet. Die Resistenz kann sich jedoch auch erst während der Chemotherapie durch die Selektion resistenter Tumorzellen entwickeln [24].

Auch für ABCG2 gilt eine Mitwirkung bei der Resistenzentwicklung der AML gegenüber unterschiedlichen Zytostatika als sicher. Dagegen ist die klinische Datenlage bezüglich einer Beteiligung von BCRP an der MDR weiterer Tumorentitäten nicht eindeutig [33]. Dasselbe trifft auch für ABCC1 zu [30].

Obwohl für zwei ABC-Transporter eine klinische Relevanz aufgezeigt werden konnte, ist nicht davon auszugehen, dass eine klinisch signifikante multiple Zytostatikaresistenz allein auf der Expression dieser Transporter im Tumorgewebe beruht. Zwar wurde anhand von unterschiedlichen selektionierten Zelllinien gezeigt, dass polyspezifische Transportproteine, insbesondere ABCB1, eine Ursache des klassischen MDR-Phänotyps darstellen. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass zusätzlich eine große Anzahl weiterer Faktoren und Mechanismen für die Ausbildung dieser Form der Zytostatikaresistenz verantwortlich ist [34].

1.3 P-Glykoprotein (ABCB1)

Die Entdeckung des zur ABCB-Subfamilie gehörigen ABC-Transporters P-Glykoprotein (P-gp) geht auf das Jahr 1976 zurück: Juliano und Ling identifizierten die Nager-Isoform des Transportproteins als Ursache für die beobachtete Resistenz von chinesischen Hamster-Ovar-Karzinomzellen gegenüber dem Zytostatikum Colchicin [28]. Die verminderte Permeabilität der resistenten Zelllinie für verschiedene zytotoxische Substanzen und die Tatsache, dass das Protein glykosyliert vorlag, führten zu der Bezeichnung „P-Glykoprotein“ (P = Permeability). In allen bisher untersuchten Wirbeltier-Genomen konnte P-gp nachgewiesen werden, was auf eine wichtige und ähnliche Funktion in allen Säugetierspezies hinweist [1]. Durch eine Genduplizierung besitzen Nagetiere wie Hamster, Mäuse und Ratten zwei P-Glykoproteine, deren Benennung uneinheitlich mit „pgp1“ bzw. „pgp2“ (Hamster) und „mdr1a“ bzw. „mdr1b“ (Mäuse, Ratten) erfolgt. Dagegen konnte in allen anderen bisher untersuchten Säugetier-Genomen nur ein für P-

gp kodierendes Gen identifiziert werden [1]. Der Nachweis von ABCB1 im menschlichen Genom erfolgte erst zehn Jahre später im Jahr 1986 [35].

Heute stellt das Protein den wohl bestuntersuchten und aus medizinischer Sicht wichtigsten ABC-Transporter dar. Im Organismus wird es natürlicherweise in Geweben exprimiert, denen eine Schutzfunktion vor toxischen Xenobiotika zukommt. Hierzu zählen die Bürstensaum-Zellen des Darms, die Canaliculi der Leber, der proximale Tubulus der Niere und die Epithelien der Plazenta und der Blut-Hirn-Schranke [36].

Trotz der jahrelangen intensiven Erforschung von P-gp, konnte die genaue Funktionsweise des Proteins bis heute nicht abschließend geklärt werden. Lag der Fokus der Forschung zunächst hauptsächlich auf dem Gebiet der P-gp-vermittelten MDR, gewinnen mittlerweile die physiologischen Funktionen von P-gp und die damit verbundenen Auswirkungen auf die Pharmakokinetik von Arzneistoffen zunehmend an Bedeutung [37].

P-gp besteht aus insgesamt 1280 Aminosäuren und besitzt in glykosyliertem Zustand ein Molekulargewicht von ca. 170 kDa [38]. Ohne die Zuckerreste beträgt die molare Masse ungefähr 140 kDa [39]. Das Protein weist den charakteristischen vierteiligen Aufbau eines eukaryotischen ABC-Exporters auf. Die vier Untereinheiten TMD-NBD-TMD-NBD sind auf einer gemeinsamen Polypeptidkette lokalisiert und folgen alternierend aufeinander. Dabei bilden jeweils eine transmembranäre Domäne, bestehend aus wiederum sechs α -Helices und eine zytoplasmatische Nukleotidbindungsdomäne einen Halbtransporter [19, 25, 40]. Die beiden homologen Transporterhälften sind durch einen ca. 75 Aminosäuren umfassenden intrazellulären Linker miteinander verbunden [40]. Im ersten extrazellulären Loop (ECL 1) zwischen TM 1 und TM 2 ist das Protein über drei Asparagine N-glykosyliert. Die Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung der Topologie von P-gp. Mutationsstudien haben ergeben, dass diese N-Glykosylierung jedoch keine Auswirkung auf die Transportfunktion und das Substratspektrum von P-gp hat, sondern vielmehr eine Rolle für die korrekte Faltung des Proteins im Endoplasmatischen Reticulum spielt [19, 41]. Des Weiteren beeinflusst das Ausmaß der Glykosylierung die Stabilität des Transporters, was anhand des erleichterten Abbaus der nicht bzw. unvollständig glykosylierten Form des Proteins durch die Protease Trypsin gezeigt werden konnte [42].

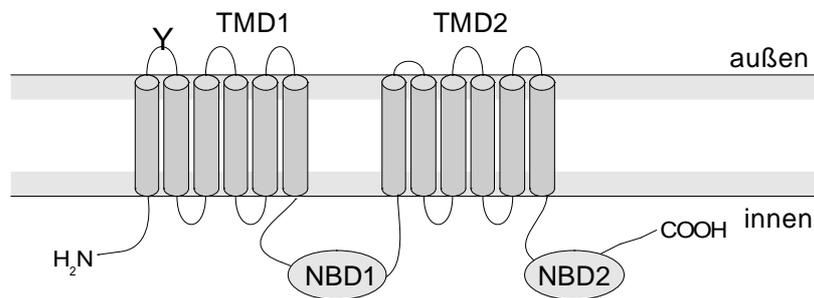


Abbildung 1.1: Topologiemodell von P-Glykoprotein

1.3.1 Allgemeine Funktionsweise von P-Glykoprotein

Zur allgemeinen Funktionsweise von P-Glykoprotein existieren verschiedene Modelle, von denen die drei wichtigsten an dieser Stelle kurz vorgestellt werden sollen. Diese Modelle beschreiben den allgemeinen Transportvorgang der Substrate durch die Zellmembran inklusive dem Ort der Substraterkennung und dem Weg zum Zielkompartiment. Einzelheiten wie die Verknüpfung von ATP-Hydrolyse und Substrattransport sowie Konformationsänderungen des Proteins werden jedoch nicht berücksichtigt.

Wie in diversen experimentellen Untersuchungen gezeigt werden konnte, findet die Bindung der zumeist lipophilen Substrate innerhalb der TMDs des Transportproteins statt. Loo et al. identifizierten in Mutationsstudien eine Reihe von transmembranären Helices, die an der Bindung der Substrate beteiligt sind [43 - 45]. Diese Erkenntnisse werden durch Photolabelingexperimente unterstützt [46, 47]. Es wird angenommen, dass sich die Substrate aufgrund ihrer Lipophilie in der Zellmembran anreichern und nach ihrer Bindung an das Protein von dort aus transportiert werden [48 - 50]. Wie genau der Transportvorgang nach Bindung der Substrate in der Zellmembran erfolgt, ist bisher jedoch noch unbekannt.

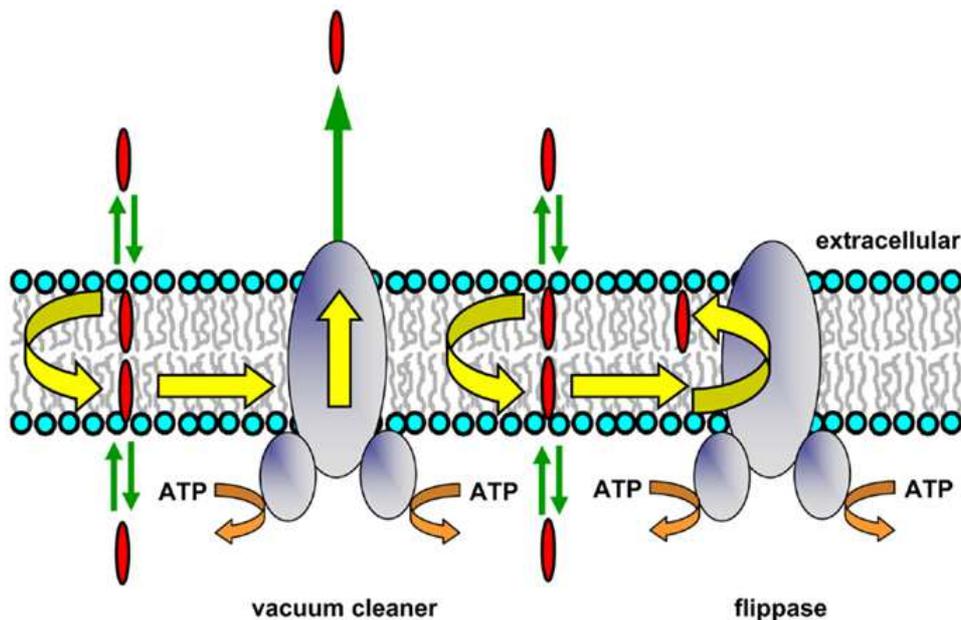


Abb. 1.2: HVC- und Flippase-Modell nach Raviv [52] und Higgins [53]

Das erste Modell zur Erklärung des Transportvorgangs wurde von Gerlach et al. aufgrund der Homologie von P-gp zum bakteriellen Hämolyisin-Transporter HlyB vorgeschlagen und als „Poren-Modell“ bezeichnet. Demnach bilden die beiden transmembranären Domänen einen Kanal durch die Zellmembran, durch den der Export der Substrate ausgehend vom Zytoplasma aus der Zelle erfolgen kann [51]. Später postulierten Raviv et al. nach Hinweisen auf eine stattfindende Substratbindung innerhalb der Plasmamembran das Modell des „hydrophoben Staubsaugers“ (Hydrophobic Vacuum Cleaner, HVC-Modell). Demzufolge wird das Substrat in der dem Zytosol zugewandten inneren Membranschicht gebunden und von dort aus direkt in den Extrazellulärraum transportiert [52]. Im von Higgins und Gottesman aufgestellten „Flippase-Modell“ wird das Substrat in Analogie zum HVC-Modell in der inneren Phospholipidschicht der Zellmembran erkannt, im Anschluss daran aber nicht direkt in den extrazellulären Raum freigesetzt, sondern zunächst in die äußere Phospholipidschicht der Plasmamembran transportiert, von wo aus es dann in das extrazelluläre Medium diffundiert [53]. Dieses Modell geht auf die Enzymklasse der Flippasen zurück, welche durch den Transport von Phospholipiden

zwischen Lipiddoppelschichten eine Änderung der Lipidzusammensetzung von Phospholipidmembranen bewirken können [54].

Vor dem Hintergrund der allen P-gp-Substraten gemeinsamen Lipophilie und der damit verbundenen Akkumulation in der Plasmamembran, sowie der Hinweise für eine Substratbindung in der inneren Phospholipidschicht der Membran, erscheinen das HVC-Modell und das Flippase-Modell realistischer und sollten dem Poren-Modell daher vorgezogen werden [55].

Unabhängig vom verwendeten Modell, muss ein Substrat vor seinem Transport immer erst mit der Zellmembran interagieren. Daher sollten Verteilungs- und Diffusionsvorgänge, die ebenfalls Einfluss auf den P-gp-vermittelten Transport haben, bei der Untersuchung der P-gp-Funktion berücksichtigt werden [56].

1.3.2 Transportzyklus von P-Glykoprotein

Die für den aktiven Transport von Substraten benötigte Energie wird - wie bei allen ABC-Transportern - an den Nukleotidbindungsdomänen aus der Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat gewonnen. Dies erfordert eine Beteiligung beider NBDs, welche nach der Bindung von vermutlich zwei Molekülen ATP dimerisieren. Dabei setzt sich die eigentliche ATP-Bindungsstelle aus den Walker A und B Motiven der einen und der C-Signatur der anderen NBD zusammen [4, 55]. Die ATP-Hydrolyse führt letztendlich zu Konformationsänderungen in den transmembranären Domänen, welche dann den Transport des Substrates einleiten. Der Mechanismus der Kopplung von ATPase- und Transportaktivität konnte bisher noch nicht bis ins letzte Detail aufgeklärt werden. Allerdings wurde diesbezüglich eine Reihe von Modellen erstellt, die den möglichen Transportzyklus von P-gp beschreiben. Diese Modelle können auch auf andere ABC-Transporter wie MRP1 und BCRP angewendet werden oder bilden die Grundlage jener Modelle, die eigens für diese Proteine entwickelt wurden [57, 58]. Die wichtigsten Transportmodelle sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

Senior et al. schlugen im Jahr 1995 einen Transportzyklus vor, bei dem die ATP-Hydrolyse

abwechselnd an beiden NBDs stattfindet [59]. Basierend hierauf wurden das von Higgins und Linton 2004 veröffentlichte „ATP-Switch Modell“ sowie das von Sauna und Ambudkar postulierte „Occlusion-induced-Switch Modell“ entwickelt.

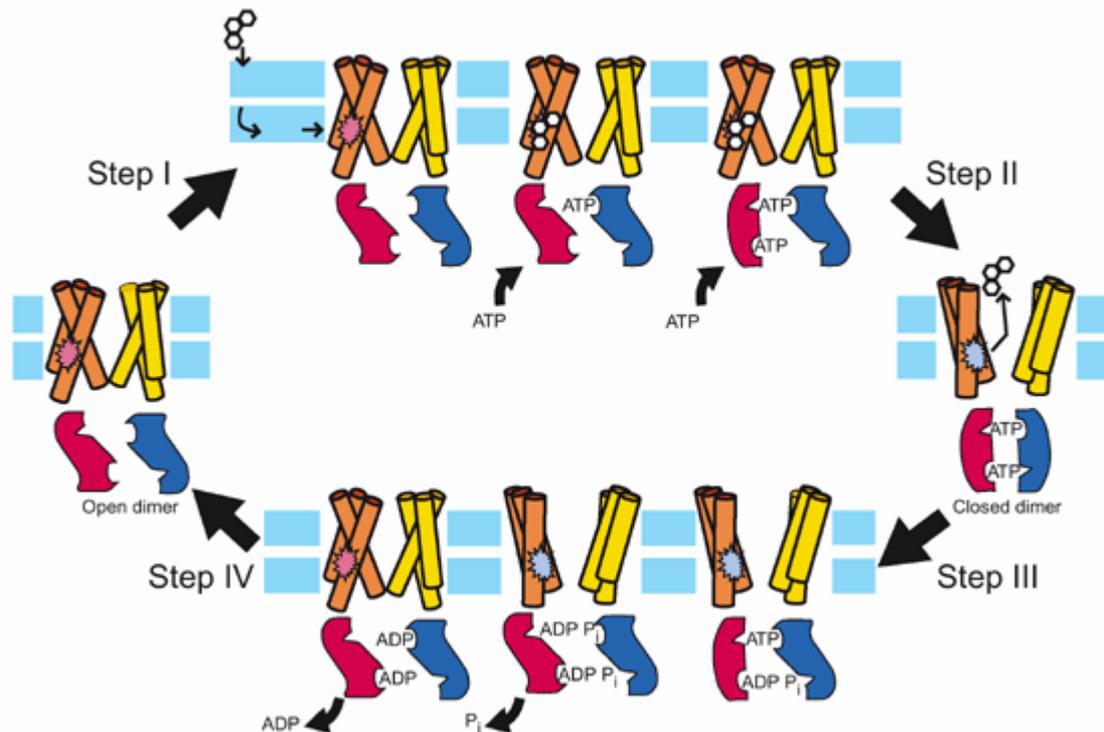


Abb. 1.3: ATP-Switch Modell nach Higgins und Linton [60]

Das „ATP-Switch Modell“ ist ein allgemeines Modell zur Beschreibung des katalytischen Zyklus von ABC-Transportern. Im Grundzustand liegt das Protein in einer offenen Konformation vor und weder NBD noch Substratbindungsstelle sind besetzt. In einem ersten Schritt kommt es durch Bindung des Substratmoleküls an die High-Affinity Site innerhalb der TMDs zu einer Konformationsänderung in den NBDs, wodurch die Affinität für ATP steigt und die zur Dimerisierung der NBDs erforderliche Aktivierungsenergie abnimmt. Im zweiten Schritt induziert die kooperative Bindung von zwei ATP-Molekülen durch Dimerisierung der NBDs eine erneute Konformationsänderung, was wiederum eine Reorientierung der Substratbindungsstelle mit einhergehender Herabsetzung der

1.3.2 Transportzyklus von P-Glykoprotein

Affinität des Transportproteins zu seinem Substrat nach sich zieht. Dies hat zur Folge, dass der Protein-Substrat-Komplex zerfällt und das Substrat von der Low-Affinity Site in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Im Anschluss daran ermöglichen die mit der schrittweisen Hydrolyse beider ATP-Moleküle verbundene Dissoziation des NBD-Dimers (Schritt 3) sowie die durch die sequenzielle Freisetzung von ADP und Phosphat resultierende abschließende Konformationsänderung (Schritt 4) die Rückkehr in den bindungskompetenten Zustand mit hoher Substrataffinität [60].

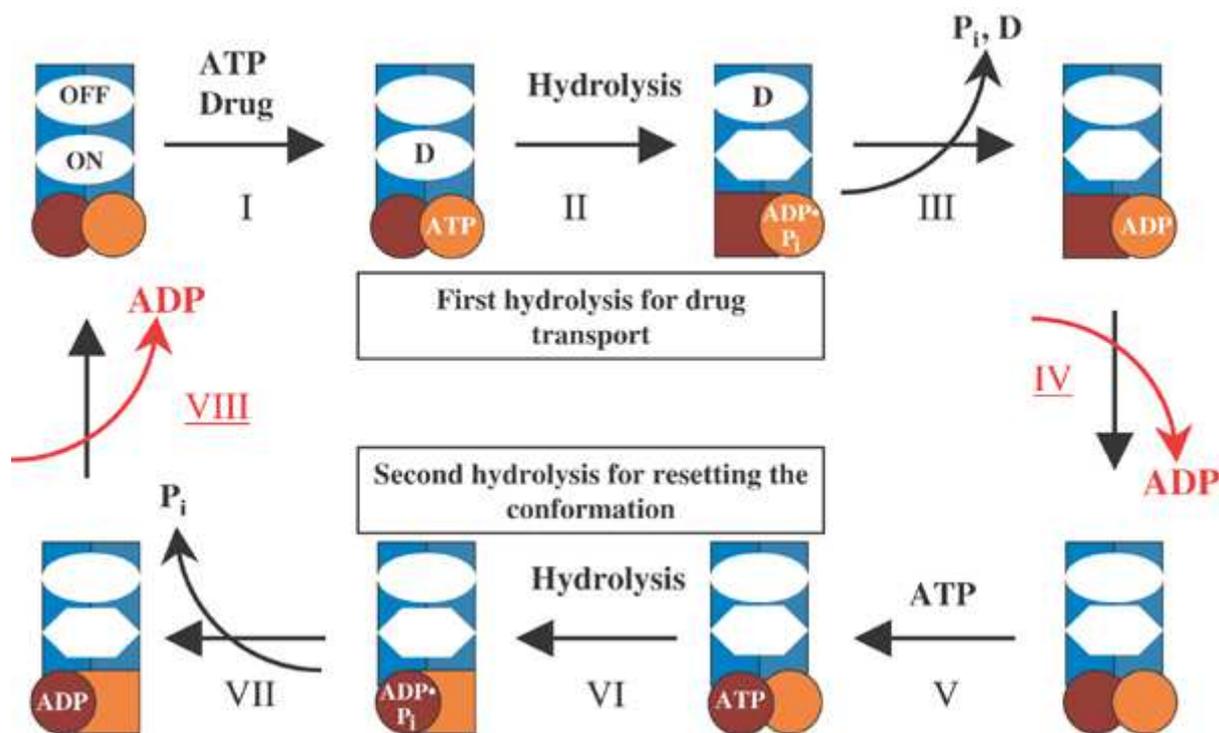


Abb. 1.4: Occlusion-induced-Switch Modell nach Sauna und Ambudkar [61, 62]

Das „Occlusion-induced-Switch Modell“ ähnelt dem „ATP-Switch Modell“ in gewissen Punkten: Auch hier liegt das Transportprotein zu Beginn des katalytischen Zyklus in einem Grundzustand mit hoher Substrataffinität vor. Durch Bindung des Substrats sowie zweier ATP-Moleküle mit sich anschließender Dimerisierung der NBDs, wird in der Folge der Transportvorgang eingeleitet (Schritt 1, 2). Im Unterschied zum „ATP-Switch Modell“ geht man hier davon aus, dass im NBD-Dimer zunächst nur eine lockere Bindung des

1.3.2 Transportzyklus von P-Glykoprotein

Nukleotids stattfindet und erst der feste Einschluss („Occlusion“) eines ATP-Moleküls zur Konformationsänderung und Ausbildung des Low-Affinity States führt (Schritt 3). Die sich anschließende Hydrolyse des fest gebundenen ATP-Moleküls führt darauf zur Freisetzung des Substrats in den Extrazellulärraum (Schritt 4). Die abschließende Rückkehr des Proteins in den basalen Zustand wird durch den Einschluss und die Spaltung des zweiten ATP-Moleküls erreicht (Schritt 5, 6) [61, 62].

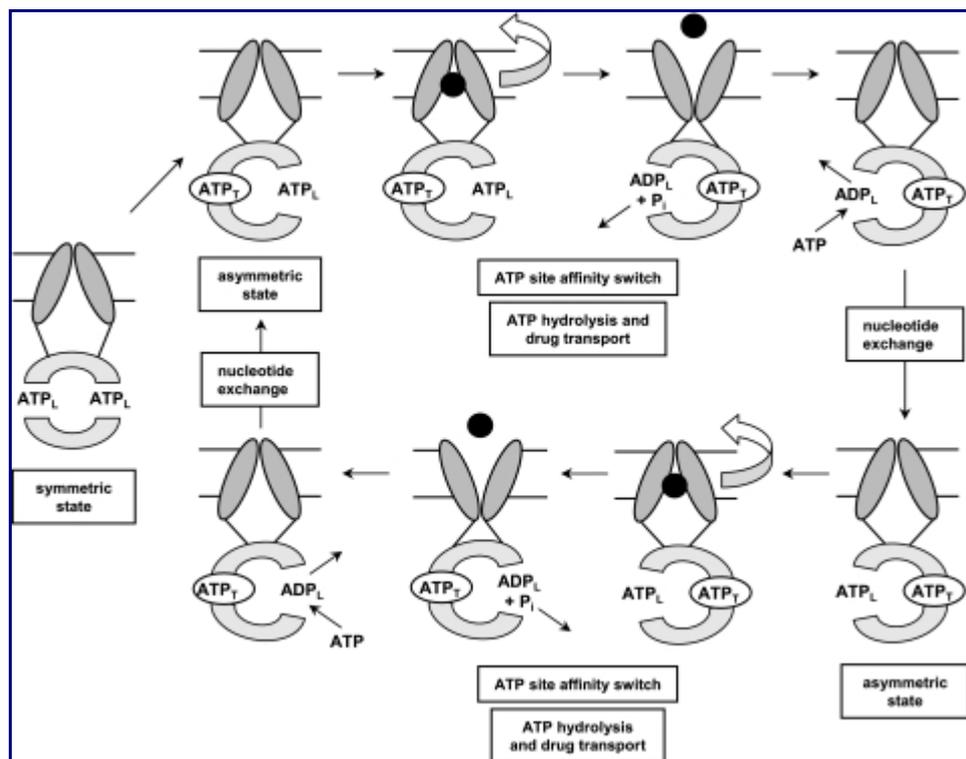


Abb. 1.5: Transportzyklus von P-gp nach F. Sharom [63]

Basierend auf dem „Occlusion-induced-Switch Modell“ postulierte die Arbeitsgruppe um F. Sharom 2010 ein Modell für den Transportzyklus von P-gp, bei dem die beiden NBDs im inaktiven Zustand in Form eines „symmetrischen“ Dimers mit zwei locker gebundenen ATP-Molekülen vorliegen. Geht das Protein in den katalytisch aktiven Zustand über, erfolgt die feste Bindung eines ATP-Moleküls sowie des Substrats. Durch Hydrolyse des fest gebundenen ATPs zu ADP und Phosphat wird das Substrat in den extrazellulären

Raum freigesetzt und es kommt nachfolgend zum festen Einschluss des zweiten ATP-Moleküls. Das bei der Spaltung des ersten ATP-Moleküls gebildete, nun locker gebundene ADP wird daraufhin freigesetzt und durch ein neues ATP-Molekül ersetzt, so dass der Zyklus in analoger Art und Weise ein weiteres Mal durchlaufen werden kann. Das katalytisch aktive Transportprotein liegt somit stets in einem „asymmetrischen“ Zustand vor, der durch ein fest und ein locker gebundenes Molekül ATP bzw. ADP charakterisiert ist [63]. Im Unterschied zu den bereits vorgestellten Modellen, wird in dem von Al-Shawi et al. [64] 2003 publizierten Modell für den Transportmechanismus von P-gp erstmals auch die basale ATPase-Aktivität in Abwesenheit eines Substrats, welche durch Inhibitoren und Aktivatoren stimuliert werden kann, mit einbezogen. Ausgangspunkt des katalytischen Zyklus für den Transportweg mit und ohne Substrat ist das bindungskompetente P-gp, welches an einer NBD ein ATP-Molekül gebunden hat und sich im Gleichgewicht zwischen einem Zustand hoher und niedriger Bindungsaffinität der Substrat-Bindungsstelle befindet. Abhängig davon, ob zuerst ein weiteres ATP-Molekül an die zweite NBD bindet oder das Substrat mit der hochaffinen Bindungsstelle wechselwirkt, läuft der zugehörige Zyklus der basalen bzw. substratinduzierten ATPase-Aktivität ab. Die Reihenfolge der Bindung hängt dabei vom Zufall ab, das Gleichgewicht wird jedoch durch Erhöhung der Substratkonzentration auf die Seite der substratinduzierten ATPase-Aktivität verschoben und bei Sättigung mit dem Substrat kommt es zum vollständigen Erliegen der basalen ATPase-Aktivität.

Beim substratinduzierten Zyklus wird nach erfolgreicher Bindung eines Substrats auch die zweite NBD mit einem Molekül ATP besetzt. Die sich anschließende Hydrolyse des zuerst gebundenen ATPs zu ADP und Phosphat führt zu einer Konformationsänderung, welche wiederum die Umwandlung der hochaffinen Substratbindungsstelle in eine Bindungsstelle niedriger Affinität bewirkt. Diese ist in den Extrazellulärraum ausgerichtet, so dass die Dissoziation des Substrat-Protein-Komplexes und die Freisetzung des Phosphatrestes gleichbedeutend mit dem Ende des Transportvorgangs sind. Das Protein verbleibt in einem Zustand niedriger Substrataffinität, bis die Dissoziation des gebundenen ADPs und die daraus resultierende abschließende Konformationsänderung die Rückkehr in den bindungskompetenten Grundzustand erlauben.

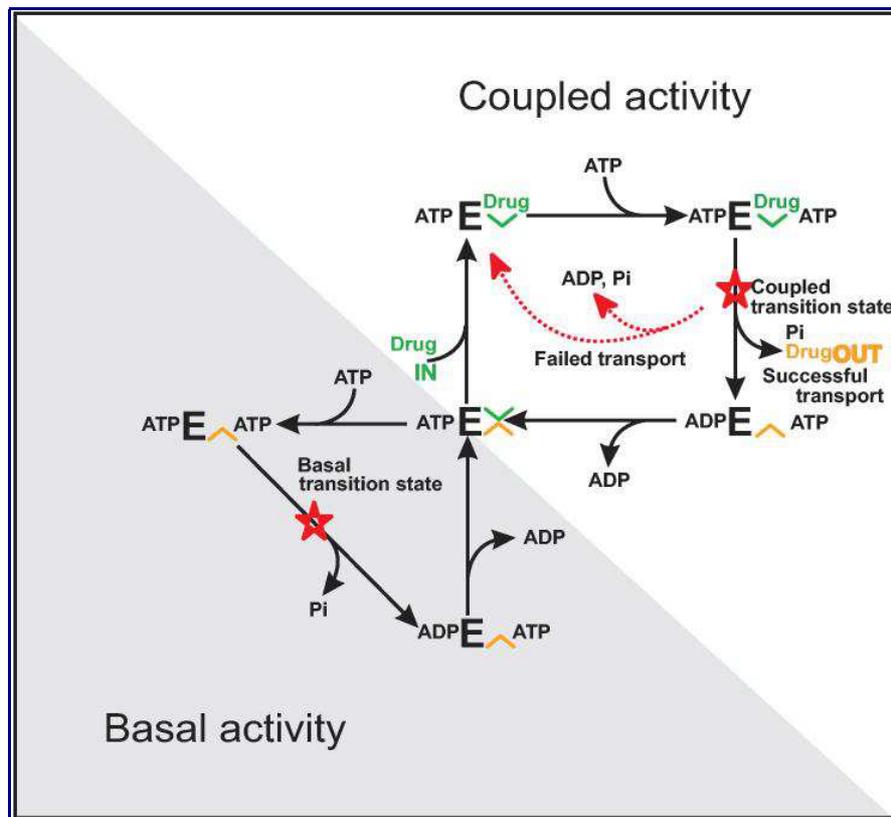


Abb. 1.6: Transportmechanismus von P-gp nach Al-Shawi [64]

Durch Bindung eines zweiten ATP-Moleküls an das bindungskompetente Protein wird der Zyklus der basalen ATPase-Aktivität eingeleitet. Die aus der Bindung des ATPs resultierende Konformationsänderung bewirkt eine Herabsetzung der Affinität von P-gp gegenüber seinen Substraten. In diesem Zustand niedriger Bindungsaffinität kann das Protein seine Transportfunktion nicht ausüben. Für eine Rückkehr in den bindungskompetenten Zustand ist daher die Hydrolyse eines ATP-Moleküls zu ADP und Phosphat und deren schrittweise Freisetzung erforderlich. Der Zyklus der basalen ATPase-Aktivität kann nur in Abwesenheit eines Substrats ablaufen. Ist dagegen ein Substrat vorhanden, können sowohl der substratinduzierte Zyklus als auch der Zyklus der basalen ATPase-Aktivität durchlaufen werden.

Im Unterschied zum „ATP-Switch Modell“ von Higgins und Linton erfolgt im von Al-Shawi vorgeschlagenen Modell der Transportvorgang durch die Hydrolyse von ATP und nicht

1.3.2 Transportzyklus von P-Glykoprotein

durch dessen Bindung und nachfolgende Dimerisierung der NBDs. Eine weitere Abweichung stellt die Anzahl der pro Transportzyklus verbrauchten ATP-Moleküle dar. Im Al-Shawi-Modell wird pro Durchlauf ein Molekül ATP hydrolysiert, im „ATP-Switch Modell“ sind es dagegen zwei ATP-Moleküle. Die Autoren weisen jedoch explizit darauf hin, dass zwar zwei ATP-Moleküle gebunden werden müssen, bei einigen Transportern die Hydrolyse eines einzigen ATP-Moleküls aber ausreichend ist [60].

Das letzte Modell, welches an dieser Stelle kurz vorgestellt werden soll, wurde von Callaghan et al. [65] erstellt und basiert auf thermodynamischen Betrachtungen des Transportzyklus von P-gp.

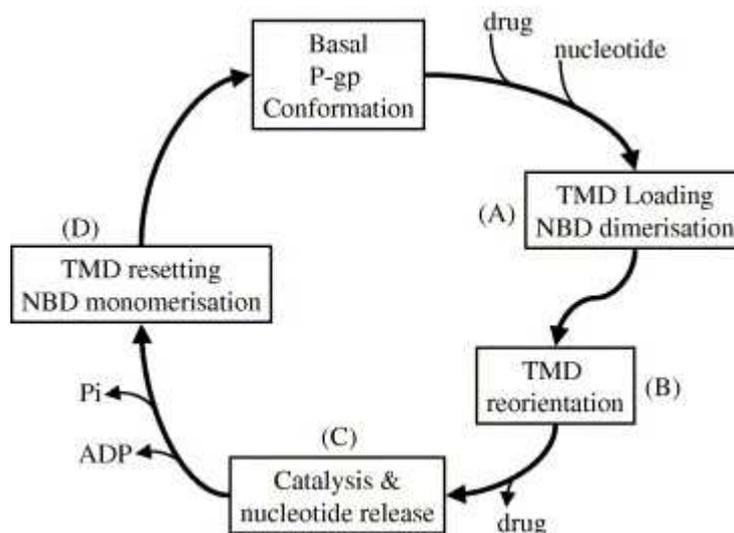


Abb. 1.7: Transportzyklus von P-gp nach Callaghan [65]

Es umfasst vier wesentliche Schritte: (1) Beladung des Proteins inklusive der Bindung des Substrats und des Nucleotids mit nachfolgender Dimerisierung der NBDs, (2) Konformationsänderung in den TMDs samt Reorientierung der Substratbindungsstelle und Erniedrigung der Bindungsaffinität, (3) Hydrolyse und Freisetzung des Nucleotids, (4) Rückkehr in den Grundzustand über TMD-Reset und NBD-Monomerisation. Die Beladung des Proteins mit ATP und die daraus resultierende Dimerisierung der NBDs ist dabei auch ohne Anwesenheit eines Substrats möglich und erklärt somit die basale ATPase-Aktivität.

Die Anzahl der pro Transportzyklus verbrauchten ATP-Moleküle ist jedoch nicht abschließend geklärt, weshalb die Autoren bei einem ATP-Molekül im Modell verbleiben. Nach der Freisetzung des Substrats erfolgt die sequenzielle Dissoziation des Phosphatrestes und von ADP, wobei die Phosphatfreisetzung selbst die für den Konformationswandel notwendige Energie liefern und somit die Rückkehr in den basalen Zustand einleiten soll.

1.3.3 Bindungsstellen von P-Glykoprotein

P-Glykoprotein ist in der Lage, mit einer großen Anzahl von strukturell unterschiedlichsten Substanzen zu interagieren. Vor dem Hintergrund dieser Polyspezifität stellt sich die Frage nach der Art, Anzahl, Lokalisation und Spezifität der potenziellen Bindungsstellen, über die diese Interaktionen vermittelt werden. Die Aufklärung der vier genannten Aspekte konnte bis heute zwar noch nicht abschließend erfolgen, allerdings wurde eine Vielzahl von Untersuchungen publiziert, welche die Existenz mehrerer Bindungsstellen für unterschiedliche Liganden postulieren. Die wichtigsten Erkenntnisse diesbezüglich sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Es wird als allgemein erwiesen angesehen, dass die Bindungsstellen von P-gp in den transmembranären Domänen lokalisiert sind. So konnte in einer Reihe von Mutationsstudien und Photoaffinitätsmarkierungs-Experimenten eine Beteiligung verschiedener Aminosäuren aus nahezu allen transmembranären Helices (TMs 1, 4 - 7, 9 - 12) an der Bindung von Substraten und Modulatoren nachgewiesen werden [43 - 47, 66]. Die aus den erwähnten Studien gewonnenen Daten wurden von Pajeva et al. zusammengefasst und auf ein Homologiemodell von P-gp übertragen [67]. Aus der Auswertung der Daten wurde ersichtlich, dass insbesondere die transmembranären Helices 5, 6, 11 und 12 an der Bindung von Substanzen beteiligt sind. In einem weiteren Homologiemodell des Proteins von Globisch et al. konnten drei potenzielle Bindungsstellen identifiziert werden, von denen zwei innerhalb der transmembranären Domänen und die dritte an der Grenzfläche zwischen Zytosol und Membran lokalisiert sind [68]. Im Jahr 2009 wurde schließlich die Kristallstruktur (Auflösung 3,8 Å) des zum humanen ABCB1 zu 87 % homologen murinen Transportproteins (Abcb1a) veröffentlicht.

Anhand der Kokristallisation des Proteins mit dem inhibitorisch wirksamen Hexapeptid QZ59 konnte die Bindung von Liganden innerhalb der TMDs bestätigt werden und es wurde ersichtlich, dass Substanzen theoretisch direkt aus der Plasmamembran in das Protein gelangen können [69].

Parallel dazu wurde eine Vielzahl von Studien durchgeführt, die sich mit der Untersuchung potenzieller Bindungsstellen und deren Wechselwirkung auf funktioneller Ebene befassen. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Studien sollen nachfolgend ebenfalls kurz vorgestellt werden.

Shapiro und Ling untersuchten 1997 den P-gp-vermittelten Transport der beiden Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin 123 und Hoechst 33342 im Rahmen von Fluoreszenzmessungen an ABCB1-haltigen Plasmamembranvesikeln [48, 70]. Aus der Auswertung der kinetischen Daten schlussfolgerten die Autoren, dass die beiden Substrate unterschiedliche Bindungsstellen besitzen und sich diese gegenseitig im Sinne einer positiven Kooperativität beeinflussen [70]. In Anlehnung an die beiden Liganden wurde die Rhodamin-Bindungsstelle von da an als „R-Site“ und die Hoechst-Bindungsstelle entsprechend als „H-Site“ bezeichnet. Zusätzlich dazu konnte in weiteren Experimenten in Übereinstimmung mit dem HVC-Modell (siehe Kapitel 1.3.1) die Position der „H-Site“ in der dem Zytoplasma zugewandten Phospholipidschicht der Plasmamembran lokalisiert und ein Transport von Hoechst 33342 aus der Membran heraus beobachtet werden [48, 71]. Die beiden Bindungsstellen zeichnen sich durch eine unterschiedliche Substratspezifität aus: Neben Rhodamin 123 interagieren Anthrazykline wie Daunorubicin und Doxorubicin sowie das Chinolinderivat LDS-751 mit der „R-Site“, während zusätzlich zu Hoechst 33342 beispielsweise Quercetin und Colchicin Affinität zur „H-Site“ besitzen [70, 72]. Dagegen konnten die Arzneistoffe Vinblastin, Actinomycin D und Etoposid weder der Hoechst- noch der Rhodamin-Bindungsstelle zugeordnet werden. In einer späteren Arbeit der Autoren wurde das Modell noch um eine dritte Bindungsstelle mit rein regulatorischer Funktion erweitert, an welche Progesteron und Prazosin binden. Bei der Interaktion der beiden Substanzen mit dieser Bindungsstelle konnte im Sinne einer positiven Kooperativität eine Stimulation des P-gp-vermittelten Transports sowohl von Rhodamin 123 als auch von Hoechst 33342 beobachtet werden [73].

In einer Reihe verschiedener experimenteller Ansätze wurde auch die Lokalisation der beschriebenen Bindungsstellen untersucht. Beispielsweise konnte in Mutationsstudien eine Beteiligung der transmembranären Helices 6, 9 und 12 an der Bindung des Thiolreaktiven MTS-Rhodamin nachgewiesen werden [74]. Die Arbeitsgruppe um F. Sharom untersuchte die räumliche Lage der Rhodamin-Bindungsstelle mit Hilfe FRET-basierter Techniken und postulierte ihre Lokalisation intrazellulär in der Nähe der Nukleotidbindungsdomänen [75]. In Analogie hierzu konnte der Hoechst-Bindungsstelle ebenfalls ein Bereich innerhalb der intrazellulären Hälfte der Plasmamembran, allerdings in größerer Entfernung zu den NBDs, zugeordnet werden [76].

Im Unterschied zu den bereits beschriebenen Studien von Shapiro und Ling erstellten Martin et al. auf der Basis von Radioligandbindungs-Experimenten ein Modell mit mindestens vier verschiedenen Bindungsstellen, die sich im Sinne einer negativen Kooperativität gegenseitig beeinflussen. Von diesen vier Bindungsstellen besitzen drei eine Transportfunktion, wogegen der vierten Bindungsstelle lediglich eine regulatorische Funktion zugesprochen wird. Bei einer der transportkompetenten Bindungsstellen handelt es sich dabei um die bereits von Shapiro und Ling postulierte Hoechst 33342-Bindungsstelle. Für diese konnte auch eine Interaktion mit den beiden Modulatoren der dritten Generation (siehe Kapitel 3.1.4) XR9576 und XR9051 gezeigt werden. Aufgrund der Tatsache, dass die beiden genannten Modulatoren aber scheinbar nicht transportiert werden, wird dieser Bindungsstelle neben einer Transportfunktion zusätzlich auch eine regulatorische Funktion zugeschrieben. An die beiden anderen transportkompetenten Bindungsstellen sollen die beiden Zytostatika Vinblastin und Paclitaxel binden. Für die vierte Bindungsstelle mit regulatorischer Funktion konnte eine Wechselwirkung mit den beiden Verbindungen GF120918 und Nicardipin beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte das Bindungsverhalten von Rhodamin 123, welches in dem von Shapiro und Ling vorgeschlagenen Modell eine wichtige Rolle spielt, in dieser Studie nicht eindeutig charakterisiert werden, weshalb eine mögliche Interaktion mit der Paclitaxel-, der GF120918- oder einer zusätzlichen eigenständigen Bindungsstelle diskutiert wird [77].

Neben den bereits vorgestellten Untersuchungen gibt es eine Reihe weiterer Studien, die auf der Basis von funktionellen Untersuchungen, Photolabelingexperimenten und Literaturdaten bis zu sieben verschiedene Bindungsstellen postulieren, welche sowohl

positiv als auch negativ kooperativ interagieren können [78 - 81].

Trotz der großen Anzahl von Studien, die sich mit der Erklärung des Bindungsverhaltens an P-gp beschäftigen, konnte bis dato nicht aufgeklärt werden, ob die verschiedenen Bindungsstellen als unterschiedliche, bevorzugte - teils benachbarte oder sogar überlappende - Erkennungsregionen innerhalb einer großen Bindungstasche realisiert sind, oder aber als einzelne, räumlich getrennte Bindungsstellen vorliegen. Im Falle einer großen Bindungstasche könnten zwei oder mehr Stoffe gleichzeitig gebunden werden. Diese Möglichkeit wurde von der Arbeitsgruppe um F. Sharom bestätigt, indem sie zeigen konnten, dass Rhodamin 123 und LDS-751, die laut Shapiro und Ling beide Affinität zur Rhodamin-Bindungsstelle besitzen, simultan an P-gp binden können [75]. Parallel dazu wird vermutet, dass die Bindungstasche sehr flexibel ist und ihre Form an das jeweils gebundene Molekül anpassen kann. Dieser Vorgang wird auch als „Induced-Fit“- Mechanismus bezeichnet und ist dadurch charakterisiert, dass die eigentliche Bindungsstelle erst durch Bindung des Substrats über eine individuelle Konformationsänderung korrekt ausgebildet wird [82].

Daneben versuchten Higgins et al. 2007 das polyspezifische Bindungsverhalten von P-gp durch das Vorliegen großer Bindungsdomänen zu erklären. Innerhalb dieser Bindungsdomänen existieren für die Liganden unterschiedliche Möglichkeiten der Bindung. Beispielsweise ist eine große Bindungsdomäne in der Lage, einzeln mit den verschiedenen Liganden zu interagieren. Es können aber auch zwei kleinere Verbindungen gleichzeitig gebunden werden, was aus pharmakologischer Sicht zwei separaten Bindungsstellen entsprechen würde. Überlappen sich dagegen die Bindungsareale zweier Substanzen aufgrund ihrer Größe, könnte dies pharmakologisch als kompetitives Verhalten um die gleiche Bindungsstelle interpretiert werden [16]. Unterstützt wird diese Theorie durch verfügbare Kristallstrukturen anderer Multidrug-Transporter, die allerdings bis auf eine Ausnahme nicht zur Familie der ABC-Transporter gehören [16]. Zusätzlich dazu postulierten Loo und Clarke aufgrund von Affinitätsmarkierungen an Cystein-Mutanten von P-gp mit thiolreaktiven Substraten das Vorhandensein zweier großer Bindungsdomänen an der Kontaktstelle der beiden transmembranären Domänen [49]. Bestätigt wird diese Hypothese durch Photolabelingexperimente mit Propafenonderivaten, welche denselben Bereich als

Bindungsdomäne identifizierten [46].

1.3.4 Substrate und Modulatoren von P-Glykoprotein

1.3.4.1 Substrate

Der Begriff „Substrat“ geht in seiner ursprünglichen Bedeutung auf die Entdeckung der Multidrug Resistenz zurück. In diesem Zusammenhang wurden Zytostatika, die durch den P-gp-vermittelten aktiven Transport aus der Tumorzelle heraus ihre Wirkung verloren, als Substrate bezeichnet. Später wurde die Gruppe der Substrate um die Fluoreszenzfarbstoffe Calcein AM, Hoechst 33342 und Rhodamin 123 erweitert [36]. Heutzutage werden prinzipiell alle Verbindungen als Substrate angesehen, die durch ABCB1 aktiv transportiert werden. Davon abzugrenzen sind sogenannte Modulatoren, welche nach ihrer Bindung die Funktion des Transportproteins beeinflussen. Allerdings gibt es eine Reihe von Substanzen, für die beide Eigenschaften zutreffen [2, 25].

Das Substratspektrum von P-gp umfasst eine große Anzahl strukturell äußerst unterschiedlicher Substanzen, unter anderem auch viele Arzneistoffe. Anhand der in Tabelle 1.2 dargestellten Auswahl von Verbindungen wird ersichtlich, dass die Substrate des Transportproteins nur wenige gemeinsame Strukturelemente aufweisen: Das Molekulargewicht liegt zwischen 200 und 1900 Dalton und die Substanzen beinhalten aromatische Teilstrukturen. Außerdem sind die Verbindungen meist durch eine gewisse Lipophilie, gepaart mit einem unter physiologischen Bedingungen protoniert vorliegenden schwach basischen Stickstoff, gekennzeichnet, so dass sich insgesamt ein amphiphiler Charakter ergibt. Im Gegensatz dazu werden anionische Substanzen scheinbar nicht als Substrate erkannt [19, 25].

Aus dem breiten Spektrum der transportierten Substanzen und der Expression von P-gp in Geweben, denen eine Schutzfunktion zukommt, resultiert die große pharmazeutische Relevanz des Transportproteins.

Tab. 1.2: Substrate von P-gp (Auswahl nach [2], [18], [19], [25] und [38]).

Klasse	Substanzklasse	Beispiele
Zytostatika	Anthrazykline	Daunorubicin, Doxorubicin
	Anthracene	Mitoxantron
	Mitosehemmstoffe	Colchicin, Taxane, <i>Vinca</i> -Alkaloide
	Podophyllotoxine	Etoposid, Teniposid
	Topoisomerasehemmstoffe	Irinotecan, Topotecan
	Tyrosinkinaseinhibitoren	Gefitinib, Imatinib
Virustatika	Proteaseinhibitoren	Ritonavir, Saquinavir
Herz-Kreislauf-Therapeutika	Antihypertensiva	Propranolol, Reserpin
	Ca-Antagonisten	Diltiazem, Nifedipin, Verapamil
	Herzglykoside	Digoxin
Sonstige Arzneistoffe	Antibiotika	Actinomycin D, Erythromycin
	Antihistaminika	Fexofenadin, Terfenadin
	Corticoide	Dexamethason, Hydrocortison, Triamcinolon
	Immunsuppressiva	Cyclosporin A, Tacrolimus
	Opioide	Loperamid, Morphin
Fluoreszenzfarbstoffe		Calcein AM, Hoechst 33342, Rhodamin 123

1.3.4.2 Modulatoren

Unter der Bezeichnung „Modulator“ werden Substanzen verstanden, welche in der Lage sind, die Funktion eines ABC-Transporters zu beeinflussen. Dabei wird zwischen einer inhibierenden und einer aktivierenden Wirkung unterschieden und die Verbindungen dementsprechend als Inhibitoren bzw. Aktivatoren bezeichnet.

Inhibitoren

Für P-gp wurde in der Vergangenheit eine Beteiligung an der Entwicklung der klassischen Multidrug Resistenz von Tumoren nachgewiesen (siehe Kapitel 1.2). Aus diesem Grund lag der Fokus der Forschung lange Zeit auf einer Hemmung des Transporters als viel versprechende neuartige Therapieoption in der Behandlung multiresistenter Krebserkrankungen. Die Hemmung des Transportproteins kann dabei auf verschiedenen Wegen erreicht werden:

- (1) Die Expression des Proteins kann durch den Einsatz von siRNA oder Antisense-Oligonukleotiden bereits auf RNA-Ebene erniedrigt werden.
- (2) Durch die Beeinflussung regulatorischer Signaltransduktionswege ist eine Reduktion der zellulären Menge des Transporters möglich, was beispielhaft an einer verminderten BCRP-Expression durch den Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren gezeigt werden konnte [83, 84].
- (3) Eine direkte Hemmung des Transporters auf Proteinebene stellt die dritte Möglichkeit dar. Diese letztgenannte Option wurde in der Vergangenheit am häufigsten angewendet und zu diesem Zweck eine große Anzahl von inhibitorisch wirksamen Substanzen entwickelt. Über diese wird nachfolgend ein kurzer Überblick gegeben (siehe Tabelle 1.3).

Die Entdeckung des ersten P-gp-Inhibitors Verapamil geht auf das Jahr 1981 zurück. Tsuruo und Mitarbeiter fanden heraus, dass die Empfindlichkeit der Vincristin-resistenten Leukämiezelllinie P338 gegenüber Vincristin und Vinblastin durch den Einsatz von Verapamil gesteigert werden konnte [85]. Diese Entdeckung weckte die Hoffnung, das klinische Problem der MDR mit Hilfe von Inhibitoren lösen zu können.

Grundsätzlich werden die P-gp-Inhibitoren hinsichtlich ihrer Entwicklungsphase in drei verschiedene Gruppen eingeteilt [83, 86]:

Die sogenannten Inhibitoren der 1. Generation repräsentieren Arzneistoffe, die eigentlich ein anderes Indikationsgebiet als die Therapie der MDR besitzen und neben ihrer pharmakodynamischen Hauptwirkung zusätzlich den P-gp-vermittelten Transport inhibieren können.

Tab. 1.3: Inhibitoren von P-Glykoprotein (Auswahl nach [18, 25, 84, 93, 94]).

Inhibitoren		
	Substanz	
		<i>1. Indikation</i>
1. Generation	Amiodaron	Antiarrhythmikum
	Chinidin	Antiarrhythmikum
	Chinin	Antimalariamittel
	Cyclosporin A	Immunsuppressivum
	Diltiazem	Calciumkanalblocker
	Nifedipin	Calciumkanalblocker
	Verapamil	Calciumkanalblocker
		<i>Abgeleitet von</i>
2. Generation	Dexniguldipin	Niguldipin
	Dexverapamil	Verapamil
	PSC 833 (Valspodar)	Cyclosporin A
3. Generation	GF120918 (Elacridar)	
	LY335979 (Zosuquidar)	
	MS 209 (Dofequidar)	
	ONT 093 (Ontogen)	
	R101933 (Laniquidar)	
	XR9576 (Tariquidar)	

In diese Gruppe gehören beispielsweise die Calciumkanalblocker Verapamil, Diltiazem und Nicardipin sowie das Immunsuppressivum Cyclosporin A. Die genannten Substanzen zeichnen sich durch eine niedrige P-gp-Affinität aus, so dass sie in den hohen Konzentrationen, die für eine effiziente Hemmung des Transporters erforderlich sind, eine erhebliche Toxizität aufweisen. Dies führte dazu, dass klinische Studien mit dieser Gruppe von Inhibitoren aufgrund von Wirkungslosigkeit oder nicht tolerierbaren Nebenwirkungen abgebrochen werden mussten. Einzig für die beiden Arzneistoffe Cyclosporin A und Chinin konnte ein therapeutischer Nutzen bei der Behandlung der

akuten myeloischen Leukämie (AML) bzw. des myelodysplastischen Syndroms nachgewiesen werden [87, 88].

Die Weiterentwicklung der Inhibitoren der 1. Generation führte zur 2. Generation von P-gp-Hemmstoffen. Bei diesen handelt es sich meist um Derivate der zuvor beschriebenen Arzneistoffe, welche durch eine deutlich verminderte ursprüngliche Hauptwirkung in Verbindung mit einer erhöhten inhibitorischen Aktivität gegenüber P-gp gekennzeichnet sind und damit ein geringeres Nebenwirkungspotenzial besitzen. Vertreter dieser Gruppe sind beispielsweise Dexverapamil (R-Enantiomer von Verapamil) und das von Cyclosporin A abgeleitete PSC 833 (Valspodar). Bedauerlicherweise wurde in den mit PSC 833 durchgeführten klinischen Studien eine starke Beeinflussung der Pharmakokinetik der parallel eingesetzten Zytostatika beobachtet. Diese konnte auf eine Interaktion mit dem Cytochrom P4503A4-Enzym zurückgeführt werden, über welches auch die verwendeten Zytostatika metabolisiert werden. Die zu erwartende Erhöhung der Plasmakonzentration der Zytostatika und die damit verbundene Toxizität führten letztendlich zur Einstellung der klinischen Prüfung von Valspodar [18].

Im Gegensatz zu den beiden zuvor vorgestellten Gruppen handelt es sich bei den Inhibitoren der 3. Generation um hochaffine Wirkstoffe, deren Struktur durch den Einsatz von Methoden der kombinatorischen Chemie unter Berücksichtigung der bis dato bekannten Struktur-Wirkungs-Beziehungen hinsichtlich einer effizienten Hemmung von P-gp optimiert wurde. Aus diesem Grund weichen sie strukturell stark von den beiden übrigen Gruppen von Inhibitoren ab. Des weiteren zeigen diese Verbindungen nur noch einen geringen Einfluss auf die Pharmakokinetik der verwendeten Zytostatika. Beispiele hierfür sind das Anthranilsäurederivat XR9576 (Tariquidar) und das Acridonsäureamid GF120918 (Elacridar), die in der Lage sind, das Protein bereits in nanomolaren Konzentrationen zu hemmen [89, 90]. Leider konnte auch für diese Gruppe von Inhibitoren bisher noch keine Markteinführung erreicht werden. Zwar wurden in einer ersten Phase-I-Studie viel versprechende Ergebnisse für Tariquidar erzielt, alle darauffolgenden Untersuchungen mussten jedoch aufgrund einer nicht tolerablen Toxizität der eingesetzten Zytostatika abgebrochen werden [91]. Ein Grund hierfür war, dass das Patientenkollektiv vor Studienbeginn nicht hinsichtlich einer Überexpression von P-gp in den zu behandelnden Tumoren untersucht worden war [40]. Der duale P-gp- und

BCRP-Inhibitor Elacridar zeigte in einer Phase-I-Studie einen positiven Effekt auf die Wirksamkeit des bei der Therapie verschiedener solider Tumore eingesetzten Topotecans, jedoch wurden bis heute keine weiterführenden Untersuchungen mit diesem Inhibitor durchgeführt [84, 92].

Insgesamt lässt sich festhalten, dass eine erfolgreiche Anwendung von Inhibitoren zwar möglich ist, allerdings eine Patientenselektion voraussetzt. Die Behandlung mit Inhibitoren sollte nur bei der Subgruppe von Patienten erfolgen, die eine ABC-Transporter-vermittelte MDR aufweisen.

Aktivatoren

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Inhibitoren, sind Aktivatoren in der Lage, den P-gp-vermittelten Transport von Substraten zu stimulieren. Welcher Mechanismus dem aktivierenden Effekt zugrunde liegt, ist bislang noch nicht genau bekannt, allerdings wird angenommen, dass die Aktivierung auf einer allosterischen Interaktion verschiedener Bindungsstellen des Transportproteins beruht. Die bekannten P-gp-Aktivatoren sollen nachfolgend kurz vorgestellt werden.

Bereits im Jahr 1994 beobachteten Critchfield et al., dass die Flavonoide Quercetin, Galangin und Kämpferol den P-gp-vermittelten Efflux von Doxorubicin in der Colonkarzinomzelllinie HCT-15 stimulieren konnten, wodurch eine etwa 50 %ige Reduktion des intrazellulär vorliegenden radioaktiv markierten Zytostatikums in der Zelle resultierte [95]. Des Weiteren konnten Wang et al. für das Flavonoid (-)-Epicatechin eine Stimulation des Transports von LDS-751 zeigen [96].

Neben den genannten Flavonoiden gibt es einige wenige weitere Substanzen, die laut Literatur eine Stimulation des Transports verschiedener P-gp-Substrate bewirken. Beispielsweise verstärken gewisse hydrophobe Peptide den Transport von Colchicin in P-gp-haltigen Plasmamembranvesikeln aus resistenten CHO-Zellen [97]. Für den Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib konnte eine Stimulation des P-gp-vermittelten Effluxes von Mitoxantron beobachtet werden, während dagegen der Transport von Vincristin gehemmt wird [98]. Des Weiteren wurde für einige Thioxanthone eine Verstärkung des P-gp-vermittelten Transports von Rhodamin 123 nachgewiesen [99].

Schließlich existiert eine Reihe von sogenannten „QB-Verbindungen“, welche ursprünglich als Inhibitoren des Tumorsuppressor-Proteins p53 konstruiert wurden [100, 101]. Kondratov und Mitarbeiter fanden jedoch über ein Screening heraus, dass einige dieser Verbindungen (z. B. QB11, QB13 und QB102) die intrazelluläre Akkumulation von Doxorubicin und Rhodamin 123 in P-gp exprimierenden Zellen erniedrigten [102]. Die weitere Charakterisierung der beispielhaft ausgewählten Substanz QB102 führte zu dem Ergebnis, dass deren aktivierende Wirkung stark vom transportierten Substrat abhängt. Erklärt werden kann dieses Verhalten zumindest teilweise mit den postulierten Bindungsstellen der verwendeten Substrate [48]:

- (1) Stimulation des Transports von Daunorubicin, Doxorubicin und Rhodamin 123 (Bindung an die Rhodamin-Bindungsstelle), allerdings wurde für einige QB-Verbindungen nur eine Verstärkung des Transports von Rhodamin 123 beobachtet.
- (2) Inhibition des Effluxes von Hoechst 33342 (Bindung an die Hoechst-Bindungsstelle), Vincristin und Vinblastin (Interaktion mit R- und H-Site).
- (3) Keine Beeinflussung des Transports von Actinomycin D und Colchicin.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass die QB-Verbindungen an die Hoechst-Bindungsstelle binden und dort den Transport von Substraten kompetitiv inhibieren. Die beobachtete Stimulation des Effluxes von Daunorubicin, Doxorubicin und Rhodamin 123 ist somit auf die von Shapiro und Ling vorgeschlagene positive Kooperativität zwischen Rhodamin- und Hoechst-Bindungsstelle zurückzuführen [48, 102].

2 Zielsetzung

Der ABC-Transporter P-Glykoprotein erfüllt im menschlichen Organismus eine Vielzahl physiologischer Funktionen und wird besonders in Geweben mit Barrierefunktion ubiquitär exprimiert. Im Zuge dessen beeinflusst das Protein auch die Pharmakokinetik zahlreicher Arzneistoffe und darüber hinaus ist der Transporter am Phänomen der klassischen Multidrug Resistenz von Tumorzellen beteiligt. Trotz langjähriger intensiver Forschung konnten viele Fragen - insbesondere im Hinblick auf die Polyspezifität, den Substrattransport sowie mögliche Bindungsstellen - noch nicht abschließend geklärt werden. Die Gewinnung neuer Erkenntnisse auf diesen Gebieten könnte beispielsweise dazu beitragen, zukünftig Arzneistoffinteraktionen zu vermeiden oder die Weiterentwicklung von Wirkstoffkandidaten zu vereinfachen.

Der Aufbau von Bindungsstellen kann durch sogenannte Photoaffinitätsmarkierungen in Verbindung mit massenspektrometrischen Methoden untersucht werden. Hierbei wird ein Rezeptorprotein in Anwesenheit eines photoaktivierbaren Liganden mit UV-Licht bestrahlt, wodurch es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Ligand und Protein kommt. Da dies in der Regel äußerst schnell abläuft, findet die Bindung des Liganden an den Rezeptor in unmittelbarer Nähe seiner Bindungsstelle statt. Wird das Protein im Anschluss enzymatisch verdaut und die resultierenden Peptide mittels Massenspektrometrie analysiert, können markierte Bereiche durch das Auftreten von Massendifferenzen um genau die Masse der eingesetzten Photoliganden detektiert werden. In Kombination mit computergestützten Modellen lassen sich daraus Rückschlüsse über Art und Lage der Bindungsstellen ziehen. Verwendet man anstelle von Membranpräparationen aufgereinigtes und in Liposomen rekonstituiertes P-gp, so kann auf die nachträgliche Detektion des markierten Proteins mittels Autoradiografie verzichtet werden.

Der Kerninhalt der vorliegenden Arbeit befasst sich daher mit der Identifizierung potenzieller Bindungsstellen für ausgewählte photoaktivierbare P-gp-Modulatoren unter Einsatz einer Kombination aus Photoaffinitätsmarkierung, enzymatischem Verdau und massenspektrometrischer Analyse von P-gp.

Essenziell für die Durchführbarkeit erfolgreicher Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente

ist eine möglichst vollständige Abdeckung der Aminosäuresequenz von P-gp, damit alle erfolgten Markierungen des Proteins mit den verwendeten Photoliganden auch detektiert werden können. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin, Elastase, Proteinase K und Thermolysin neben dem chemischen Agens Bromcyan separat oder in Kombination für den Verdau von P-gp eingesetzt und im Hinblick auf ihre Spaltungsspezifität und -effizienz gegenüber P-gp charakterisiert. Darüber hinaus wurden einige der genannten Spaltungsreagenzien mit Hitzedenaturierung oder massenkompatiblen Detergenzien kombiniert und bezüglich ihres Einflusses auf die Sequenzabdeckung von P-gp untersucht.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beinhaltet dann die eigentlichen Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente an P-gp, welche mit dem ATP-Analogen 8-Azido-ATP, dem Benzophenon 2,4-Dihydroxybenzophenon sowie den beiden Phenothiazin-Derivaten H15 und H19 durchgeführt wurden. Im Zuge dessen sollte überprüft werden, inwiefern sich bestimmte Bindungsregionen identifizieren lassen und ob die erzielten Ergebnisse mit Literaturdaten übereinstimmen.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeine Methoden

3.1.1 Herstellung von Pufferlösungen

Die verwendeten Pufferlösungen wurden immer auf die gleiche Art und Weise hergestellt. Dabei wurden die festen Bestandteile in ca. 80 % des Zielvolumens des verwendeten Lösungsmittels unter Rühren gelöst und flüssige Bestandteile gegebenenfalls zugesetzt. Zur Einstellung des pH-Wertes wurde entweder eine Kalomel- oder eine Gel-Elektrode der Firma Metrohm verwendet. Vor der Bestimmung des pH-Wertes wurde eine Zweipunkt-Kalibrierung des pH-Meters mit Standardpuffern durchgeführt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Standardpuffer die gleiche Temperatur wie die herzustellende Pufferlösung aufwiesen. Nach erfolgter Einstellung des pH-Wertes mit dem jeweiligen Reagenz wurde die Pufferlösung in einen Messkolben überführt und mit Lösungsmittel auf das Zielvolumen aufgefüllt. Nach Umfüllen in das jeweilige Lagergefäß wurde der pH-Wert noch ein letztes Mal überprüft und gegebenenfalls rejustiert. Die Pufferlösungen wurden anschließend bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank gelagert.

Für die im Folgenden beschriebenen wässrigen (Puffer)-Lösungen wurde stets destilliertes Wasser verwendet. Dieses wurde durch eine Kombination aus Umkehrosiose und Elektro-Entionisierung unter Einsatz der Wasseraufbereitungsanlage Elix der Firma Millipore erhalten.

Die nachfolgend aufgeführten Tabellen mit der Zusammensetzung der verwendeten (Puffer)-Lösungen enthalten in der rechten Spalte stets die finale Konzentration der jeweiligen Bestandteile.

3.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteingemischen nach dem Molekulargewicht der einzelnen Proteine in einem elektrischen Feld. Als Trennmedium dient ein diskontinuierliches Gel auf der Basis von Polyacrylamid. Durch den Einsatz des anionischen Detergens SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) und des reduzierenden Agens Dithiothreitol (DTT) werden Eigenladungen der Proteine maskiert und Disulfidbrücken gespalten. Dadurch erhalten die Proteine eine einheitliche negative Ladung und werden denaturiert, was ihre Auftrennung nach der Kettenlänge, proportional zur Molekülmasse, erlaubt.

In der vorliegenden Arbeit kam die diskontinuierliche, eindimensionale SDS-PAGE nach Lämmli et al. [103] zur Anwendung. Hierbei werden die Proteinproben vor dem Auftragen auf das Gel mit DTT reduziert und anschließend unter denaturierenden Bedingungen zuerst in einem großporigen Sammelgel (5 % Acrylamid) fokussiert und nachfolgend in einem Trenngel mit geringerer Porengröße (6 - 10 % Acrylamid) aufgetrennt.

Durchführung

Für die Vorbereitung der SDS-Gelelektrophorese wurden die in den Tabellen 3.1 und 3.2 aufgeführten Puffer und Lösungen hergestellt. Trenn- und Sammelgel-Puffer wurden vor ihrer jeweiligen Verwendung auf Raumtemperatur gebracht und 1000 ml Elektrophorese-Puffer 1X aus Elektrophorese-Puffer 10X (100 ml Elektrophorese-Puffer 10X + 900 ml destilliertes Wasser) hergestellt. Anschließend wurden die Gelkammerbestandteile zur Entfernung von Fett und sonstigen Verunreinigungen mit Spülmittel und Isopropanol 70 % gesäubert und getrocknet. Darauf wurde die Gelkammer zusammengebaut, mit destilliertem Wasser auf Dichtigkeit geprüft und getrocknet. Nachfolgend wurde durch Einsetzen des Gelkammes ca. 1 cm unterhalb der Geltaschen eine Markierung für die Trenngelhöhe angebracht.

Tab. 3.1: Lösungen für die Herstellung von SDS-Gelen.

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

Tab. 3.2: Weitere Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese.

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

Für die Gelelektrophorese wurde pro Bahn zwischen 0,3 und 1 µg aufgereinigtes P-gp [104] aufgetragen. Dafür wurden alle Proben zuvor mit 20 mM Tris-Lösung auf das gleiche Volumen (maximal 20 µl) gebracht und im Verhältnis 1 : 1 mit 2X konzentriertem Probenauftragspuffer (PAP) gemischt. Dabei wurde der Probenauftragspuffer vor seiner Verwendung mit 25 µl DTT-Lösung 20X (Endkonzentration DTT: 16 mM) komplettiert.

Für die Anfertigung des Trenngels mit einer Acrylamid-Endkonzentration von 7,5 % (m/V) wurden 3,750 ml Acrylamid-Lösung 30 % (m/V), 5,625 ml Trenngel-Puffer, 5,345 ml destilliertes Wasser und 150 µl SDS-Lösung 10 % (m/V) in einem 50 ml Falcon gemischt. Für Gele mit höherer oder niedrigerer Acrylamid-Konzentration wurde der Acrylamid-Anteil vergrößert bzw. verringert und das Volumen des destillierten Wassers entsprechend angepasst. Der beschriebene Trenngelansatz ist ausreichend für die Anfertigung von zwei Gelen. Zur Aktivierung der Polymerisationsreaktion wurden 27 µl TEMED und 105 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS)-Lösung 10 % (m/V) zugegeben und erneut kurz gemischt. Anschließend wurde die Mischung zügig mit einer Plastikeinmalpipette bis zur Markierung in die Gelkammer gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. In den nachfolgenden 10 min polymerisierte das Trenngel.

Tab. 3.3: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.

Zusatz	Trenngel 7,5 %	Sammelgel 5 %
Acrylamid-Lösung 30 %	3,75 ml	833 µl
Trenngel-Puffer	5,625 ml	-
Sammelgel-Puffer	-	625 µl
Wasser	5,345 ml	3,445 ml
SDS-Lösung 10 %	150 µl	50 µl
TEMED	27 µl	5 µl
APS-Lösung 10 %	105 µl	20,8 µl

Nach erfolgter Polymerisation wurde der Isopropanol vom Trenngel abgegossen und mit der Herstellung des Sammelgels begonnen. Hierfür wurden 833 µl Acrylamid-Lösung 30 % (m/V), 625 µl Sammelgel-Puffer, 3,445 ml destilliertes Wasser und 50 µl SDS-Lösung 10 %

(m/V) in einem 50 ml Falcon vermischt. Zur Initiierung der Polymerisation wurden dann 5 µl TEMED und 20,8 µl APS-Lösung 10 % (m/V) zupipettiert, kurz gevortext und die Mischung ebenfalls zügig in die Gelkammer gefüllt. Zuletzt wurde der Gelkamm eingesetzt und die ca. 30 minütige Polymerisationszeit gestartet.

Während dieser Zeit wurden die P-gp-Proben durch Zusatz von 2X konzentriertem Probenauftragspuffer im Verhältnis 1 : 1 und Inkubation für 30 min bei 37 °C denaturiert.

Nach erfolgter Polymerisation des Sammelgels wurde der Gelkamm entfernt, die Gelkammer zusammengebaut und mit 1X konzentriertem Elektrophorese-Puffer gefüllt. Daraufhin wurden die Geltaschen mittels Geloader Tips mit Elektrophorese-Puffer zur Entfernung von Acrylamid-Resten gespült. Anschließend wurden die P-gp-Proben und der Proteinstandard (5 µl) aufgetragen und die Elektrophorese durch Anlegen einer Spannung von 200 V gestartet. Nach einer Zeit von 35 - 45 min (abhängig von der Acrylamid-Konzentration) hatte die Bromphenolblau-Front das Ende des Gels erreicht und die Elektrophorese wurde beendet. Die Gelkammer wurde auseinandergelöst, das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt und verworfen. Das Trenngel dagegen wurde im Anschluss mittels Coomassie-Färbung angefärbt.

3.1.3 Färbung von Proteinen in SDS-PAGE-Gelen

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können über verschiedene Techniken im Gel sichtbar gemacht werden. Die wohl am häufigsten angewandte Detektionsmethode ist die Reaktion von Proteinen mit Farbstoffen nach ihrer Fixierung im Gel durch Auswaschen des SDS. Der Standard-Farbstoff ist hierbei das Coomassie Brilliant Blau R-250, welches unspezifisch mit einer Nachweisgrenze von 0,1 - 2 µg an die Mehrzahl aller Proteine bindet. Verwendet man anstelle von Coomassie Brilliant Blau R-250 in der sogenannten „Sensitiven Coomassie-Färbung“ abgewandelt nach Kang et al. [105] den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 in Verbindung mit Aluminiumsulfat, Phosphorsäure und Ethanol, kann die Nachweisgrenze der Proteine auf 1 ng pro Bande gesenkt werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Gele nur wenig Hintergrund entwickeln

und somit durch Erhöhung des Kontrastes zwischen Proteinbanden und Gelhintergrund zeitraubende Entfärbeschritte entfallen können. Des Weiteren ist der Färbeprozess nach einer Zeit von 2 Stunden meist abgeschlossen. Aus den genannten Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit nach anfänglicher Anwendung der standardmäßigen Coomassie-Färbung die Sensitive Coomassie-Färbung durchgeführt.

Coomassie-Färbung

Das Trenngel wurde in einem ersten Schritt zur Entfernung des SDS dreimal für jeweils 5 min mit Wasser gewaschen. Anschließend daran erfolgte die Anfärbung mit Coomassie-Färbelösung für 1 h bei Raumtemperatur (RT) auf dem Horizontalschüttler. Die unspezifische Anfärbung der Gelmatrix wurde durch drei Entfärbeschritte mit Entfärbelösung von jeweils 30 min bei RT bzw. bis zur deutlichen Abzeichnung der Proteinbanden entfernt. Die Zusammensetzung der Lösungen ist in Tabelle 3.4 dargestellt. Nachfolgend wurde das Gel für 1,5 h in Wasser inkubiert und im Anschluss daran mit dem Scanner dokumentiert.

Tab. 3.4: Lösungen für die Coomassie-Färbung.

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

Sensitive Coomassie-Färbung

Zur Auswaschung des SDS wurde das Trenngel dreimal für 10 min mit Wasser bei RT auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Optional konnten die Proteine dann durch 30 minütige Inkubation mit einer Mischung aus 30 % Ethanol (m/V) / 2 % Phosphorsäure (m/V) im Gel fixiert werden. Im Anschluss daran erfolgte während 2 - 3 h die Anfärbung der Proteine in Sensitiver Coomassie-Färbelösung bei RT unter Schütteln. Die Zusammensetzung der Färbelösung ist Tabelle 3.5 zu entnehmen. Die Färbelösung unterscheidet sich durch ihren grünlich-bläulichen, durchscheinenden Farbton und sichtbare Farbpartikel von anderen Coomassie-Färbelösungen und muss vor Gebrauch geschüttelt werden. Nach abgeschlossener Anfärbung wurde die Färbelösung abgenommen und verworfen und das Trenngel zweimal mit Wasser abgespült. Zur Erhöhung des Kontrastes zwischen Proteinbanden und Gelhintergrund konnte das Trenngel wahlweise 10 - 60 min mit Entfärbelösung inkubiert oder mehrmals mit Wasser gewaschen werden. Die Zusammensetzung der Entfärbelösung ist ebenfalls in Tabelle 3.5 beschrieben. Abschließend erfolgte die Dokumentation des so erhaltenen Gels mit Hilfe des Scanners.

Tab. 3.5: Lösungen für die Sensitive Coomassie-Färbung.

Sensitive Coomassie-Färbelösung		
200 mg	Coomassie Brilliant Blau G-250	0,02 % (m/m)
23,5 g	Phosphorsäure 85 %	2,35 % (m/m)
50 g	Aluminiumsulfat x 16 H ₂ O	5 % (m/m)
100 g	Ethanol 100 %	10 % (m/m)
ad 1000 g	Wasser	
Coomassie-Entfärbelösung		
100 g	Ethanol 100 %	10 % (m/m)
23,5 g	Phosphorsäure 85 %	2,35 % (m/m)
ad 1000 g	Wasser	

3.2 Enzymatisch-chemische Verdaus von P-Glykoprotein

Die Voraussetzung zur Durchführung erfolgreicher Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente ist eine möglichst vollständige Abdeckung der Aminosäuresequenz von P-gp. Nach erfolgter Photoaffinitätsmarkierung mit einem photoaktivierbaren Liganden wird das Protein mit Hilfe verschiedener Enzyme bzw. chemischer Reagenzien in Peptide fragmentiert. Dabei ergibt sich für jedes verwendete Enzym bzw. chemische Reagenz durch bevorzugte Spaltung nach bestimmten Aminosäuren ein spezifisches Peptidmuster. Im Anschluss an den Verdau kann das resultierende Peptidgemisch mit einer chromatographischen Methode fraktioniert und die Masse der einzelnen Peptide nachfolgend massenspektrometrisch bestimmt werden. Durch Vergleich der Massen der experimentell erhaltenen Peptide mit den Massen der in einem simulierten Verdau (in silico-Verdau) theoretisch zu erwartenden Peptide, kann die Position einer Photoaffinitätsmarkierung innerhalb der Aminosäuresequenz des Proteins identifiziert werden. Hat eine Photoaffinitätsmarkierung stattgefunden, erkennt man dies anhand einer Massenzunahme um genau die Masse des eingesetzten Photoliganden.

Damit alle erfolgten Markierungen mit den eingesetzten Photoliganden detektiert werden können, ist eine vollständige Abdeckung der P-gp-Aminosäuresequenz wünschenswert. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin, Elastase, Proteinase K und Thermolysin, sowie das chemische Agens Bromcyan hinsichtlich ihrer Spaltungsspezifität und -effizienz gegenüber P-gp untersucht. Die verwendeten Spaltungs-Reagenzien unterscheiden sich dabei in der Anzahl und Art der bevorzugten Schnittstellen. Bromcyan spaltet spezifisch Peptidbindungen hinter der Aminosäure Methionin, wobei das Methionin in der Mehrzahl der Fälle zum Homoserinlaktone bzw. seltener zum Homoserin modifiziert wird. Für die Serinprotease Trypsin existieren zwei spezifische Schnittstellen C-terminal der beiden basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Die Serinprotease Chymotrypsin zeigt dagegen eine Präferenz für die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, sowie die unpolaren Aminosäuren Leucin und Isoleucin. Die Enzyme Pepsin, Elastase, Proteinase K und Thermolysin sind unspezifische Proteasen und zeichnen sich durch eine höhere Anzahl von Schnittstellen im Protein aus. Trotzdem werden auch für diese unspezifischen Proteinasen bevorzugte Spaltungsstellen postuliert, z. B. schneidet die

Endopeptidase Pepsin mit Vorliebe nach den beiden sauren Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure sowie hinter unpolare aliphatische Aminosäuren wie Alanin, Glycin, Leucin, Isoleucin und den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Für die mit dem Chymotrypsin verwandte Endopeptidase Elastase werden als überwiegende Schnittstellen die unpolare Aminosäuren Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin und Valin neben der polare Aminosäure Serin angegeben. Proteinase K aus dem Schlauchpilz *Tritirachium album* zeigt eine Präferenz für unpolare aliphatische und aromatische Aminosäuren. Die thermostabile Metalloprotease Thermolysin aus dem thermophilen Bakterium *Bacillus thermoproteolyticus* zeichnet sich dadurch aus, dass sie im Gegensatz zu allen anderen verwendeten Proteasen bei einem Temperaturoptimum von 65 - 75 °C auf der Aminoseite (N-terminal) von hydrophoben Aminosäuren wie Alanin, Isoleucin, Leucin, Valin und Phenylalanin spaltet. Die für den Verdau von P-gp verwendeten Enzyme gehören allesamt zur Gruppe der Peptidasen und werden nach der sogenannten EC-Systematik der Klasse der Hydrolasen zugeordnet. Die weitere Einteilung erfolgt nach der Art der katalysierten proteolytischen Reaktion bzw. nach der Art des aktiven Zentrums. Da für verschiedene Enzyme unterschiedliche Temperatur- und pH-Optima existieren und einige Enzyme aktivierende Zusätze wie z. B. Calcium-Ionen oder Tris benötigen, wurde für jedes verwendete Enzym ein eigener Verdau-Puffer hergestellt.

Trypsin und Chymotrypsin wurden dabei sowohl für den In-Gel- als auch für den In-Lösung-Verdau verwendet, alle anderen Enzyme und Bromcyan ausschließlich für den In-Lösung-Verdau. Eine besondere Gewichtung wurde der Sequenzabdeckung in den transmembranären Domänen zuteil, da in diesem Bereich die Bindungsstellen von P-gp postuliert werden (siehe Kapitel 1.3.3).

3.2.1 In-Gel-Verdau

Der In-Gel-Verdau von P-gp wurde in Anlehnung an ein Standardprotokoll aus der Arbeitsgruppe von Dr. Sabine Metzger am BMFZ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit den beiden Enzymen Trypsin und Chymotrypsin durchgeführt und nachfolgend

optimiert. Zum Vergleich wurde ein In-Gel-Verdau nach einem Protokoll von Dr. Sonja Hess vom Beckman Institute des California Institute of Technology durchgeführt.

3.2.1.1 In-Gel-Verdau Protokoll Dr. Metzger

Für die Vorbereitung des In-Gel-Verdau wurden als Erstes die in Tabelle 3.6 beschriebenen Puffer und Lösungen hergestellt. Anschließend wurde aus dem nach Kapitel 3.1.2 angefertigten und nach Kapitel 3.1.3 angefärbten Gel die P-gp-Bande mit einem scharfen Skalpell möglichst genau ausgeschnitten und in ca. 1 mm³ große Stücke zerteilt. Die Gelstücke wurden nachfolgend in ein 0,5 ml Eppendorf LoBind® Tube überführt und mit der Auswaschung von Salzen und anderen störenden Agenzien aus dem Gel begonnen.

Der erste Schritt bestand hierbei stets aus der Entfärbung der Gelstücke mit 15 - 50 % Methanol oder Ethanol, je nachdem, ob für die Anfärbung des Gels die normale Coomassie-Färbelösung oder die Sensitive Coomassie-Färbelösung verwendet wurde. Die Gelstücke wurden hierfür mit 100 µl der Methanol- bzw. Ethanol-Lösung versetzt und bei 37 - 45 °C unter Schütteln (400/min) für 30 min inkubiert. Darauf wurden die Gelstücke kurz zentrifugiert, die Methanol- bzw. Ethanol-Lösung mit einem Geloader-Tip abgenommen und verworfen. Waren die Gelstücke nach diesem ersten Entfärbeschritt noch nicht vollständig entfärbt, wurde der Entfärbeschritt ein zweites bzw. drittes Mal wiederholt. Nach erfolgreicher Entfernung des Coomassie-Farbstoffes wurden mehrere Waschschrte angeschlossen. In einem ersten Waschschrte wurden die Gelstücke mit 100 µl einer Mischung aus 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung pH 8,0 und 50 % Acetonitril versetzt und für 10 min bei RT unter Schütteln (400/min) inkubiert. Anschließend wurde die Waschlösung mit einem Geloader Tip abgenommen und verworfen. Die Gelstücke wurden darauf mit 100 µl frischer Waschlösung, bestehend aus 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung pH 8,0 / 50 % Acetonitril, versetzt und für 30 min bei RT unter Schütteln (400/min) inkubiert. Nachfolgend wurde die Waschlösung abgenommen und verworfen und der Waschschrte mit frischer Waschlösung noch zweimal wiederholt. In einem letzten Waschschrte wurden die Gelstücke dann mit 100

µl 100 % Acetonitril versetzt und für 30 min bei RT unter Schütteln (400/min) inkubiert. Dieser letzte Waschschrift führte zu einer vollständigen Dehydratisierung der Gelstücke, was durch einen Volumenverlust und eine Weißfärbung sichtbar wurde. Abschließend wurde kurz zentrifugiert, das Acetonitril abgenommen und verworfen und die Gelstücke für mindestens 30 min in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet.

Nach der Trocknung der Gelstücke wurde mit dem eigentlichen Verdau begonnen. Hierfür wurde die Trypsin- bzw. Chymotrypsin-Lösung laut Tabelle 3.6 hergestellt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert, um einen Eigenverdau der Enzyme möglichst gering zu halten. Anschließend wurden die Gelstücke mit 20 µl Trypsin- bzw. Chymotrypsin-Lösung versetzt und für 30 min bei RT rehydratisiert. Die Rehydratisierung konnte durch ein Aufquellen der Gelstücke mit einhergehender Volumenzunahme beobachtet werden. Nach Ablauf der 30 minütigen Inkubation mit der Enzym-Lösung wurde überschüssige Enzym-Lösung abgenommen und verworfen. Die Gelstücke wurden nachfolgend mit 50 - 70 µl 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung pH 8,0 (Trypsin-Verdau) bzw. einer Mischung aus 100 mM Tris-HCl / 10 mM Calciumchlorid pH 7,8 (Chymotrypsin-Verdau) überschichtet und über Nacht (12 - 16 h) beim jeweiligen Temperatur-Optimum des Enzyms (37 °C für Trypsin; 25 - 37 °C für Chymotrypsin) auf dem Thermoschüttler inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Gelstücke kurz abzentrifugiert, der Überstand mittels Geloader Tip abgenommen und in ein beschriftetes 0,5 ml Eppendorf LoBind® Tube überführt. Anschließend wurden 100 µl destilliertes Wasser zu den Gelstücken pipettiert, 5 min bei 400/min auf dem Schüttler geschüttelt und weitere 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Darauf wurden die Gelstücke abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und im beschrifteten Eppendorf LoBind® Tube gesammelt. Nachfolgend wurden 50 µl Elutionslösung laut Tabelle 3.6 zu den Gelstücken gegeben und für 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation der Gelstücke wurde der Überstand abgenommen und in das beschriftete Eppendorf LoBind® Tube überführt. Im Anschluss daran wurde dieser letzte Schritt mit jeweils 50 µl frischer Elutionslösung noch zweimal wiederholt. In einem letzten Elutionsschritt wurden die Gelstücke dann nach kurzer Zentrifugation mit 50 µl 100 % Acetonitril versetzt und für 30 min bei RT geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen und im beschrifteten Eppendorf LoBind®

Tube gesammelt. Die vereinigten Überstände aller Elutionsschritte wurden abschließend in der Vakuum-Zentrifuge bei RT getrocknet und bis zur Vermessung bei - 20 °C gelagert.

Tab. 3.6: Puffer und Lösungen für den In-Gel-Verdau.

Methanol 15 %		
2,25 ml	Methanol 100 %	15 % (V/V)
12,75 ml	Wasser	
Methanol 50 %		
7,50 ml	Methanol 100 %	50 % (V/V)
7,50 ml	Wasser	
Ethanol 15 %		
2,25 ml	Ethanol 100 %	15 % (V/V)
12,75 ml	Wasser	
Ethanol 50 %		
7,50 ml	Ethanol 100 %	50 % (V/V)
7,50 ml	Wasser	
Acetonitril 50 %		
25,0 ml	Acetonitril 100 %	50 % (V/V)
25,0 ml	Wasser	
Acetonitril 100 %		
Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 50 mM		pH 8,0
197,65 mg	Ammoniumhydrogencarbonat	50 mmol/l
ad 50,0 ml	Wasser	
Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 25 mM		pH 8,0
25,0 ml	Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 50 mM	25 mmol/l
25,0 ml	Wasser	
Elutionslösung (50 % ACN/5 % HCOOH/45 % H₂O)		
25,0 ml	Acetonitril 100 %	50 % (V/V)
2,50 ml	Ameisensäure 100 %	5 % (V/V)
22,50 ml	Wasser	45 % (V/V)
Salzsäure 1 mM		
0,05 ml	1 M Salzsäure	1 mmol/l
49,95 ml	Wasser	
Tris-HCl 100 mM / Calciumchlorid 10 mM		pH 7,8
605,7 mg	Tris	100 mmol/l

3.2.1.1 In-Gel-Verdau Protokoll Dr. Metzger

73,5 mg ad 50,0 ml	Calciumchlorid-Dihydrat Wasser	10 mmol/l
Trypsin-Lösung 0,1 µg/µl		
20 µg 200 µl	Trypsin 1 mM Salzsäure	0,1 µg/µl
Chymotrypsin-Lösung 0,1 µg/µl		
25 µg 250 µl	Chymotrypsin 1 mM Salzsäure	0,1 µg/µl

3.2.1.2 In-Gel-Verdau Protokoll Dr. Hess

Als erster Schritt der Vorbereitung des In-Gel-Verdaus wurden die in Tabelle 3.7 dargestellten Lösungen und Puffer hergestellt.

Anschließend wurde aus dem nach Kapitel 3.1.2 angefertigten und nach Kapitel 3.1.3 angefärbten Gel die P-gp-Bande mit einem scharfen Skalpell möglichst genau ausgeschnitten und in ca. 1 mm³ große Stücke zerteilt. Die Gelstücke wurden nachfolgend in ein 0,5 ml Eppendorf LoBind® Tube überführt und entfärbt. Für die Auswaschung des Coomassie-Farbstoffes wurden zunächst 100 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung zu den Gelstücken pipettiert und 5 - 10 min bei RT inkubiert. Darauf wurde die Lösung per Geloader Tip abgenommen und verworfen. Im Anschluss daran wurden 50 µl einer 1 : 1 (V/V) Mischung aus 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung und Acetonitril zu den Gelstücken gegeben und wiederum für 5 - 10 min bei RT geschüttelt. Auch diese Lösung wurde nachfolgend abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die beiden beschriebenen Entfärbeschritte noch ein zweites Mal wiederholt. Waren die Gelstücke danach immer noch nicht vollständig entfärbt, wurde ein dritter Entfärbeschritt durchgeführt.

Tab. 3.7: Lösungen und Puffer für den In-Gel-Verdau.

Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 50 mM		pH 8,0
197,65 mg ad 50,00 ml	Ammoniumhydrogencarbonat Wasser	50 mmol/l
Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 100 mM		pH 8,0
395,3 mg ad 50,00 ml	Ammoniumhydrogencarbonat Wasser	100 mmol/l
DTT-Lösung 10 mM in Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 100 mM		
1,54 mg ad 1,00 ml	Dithiothreitol Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 100 mM	10 mmol/l
Iodacetamid-Lösung 55 mM in Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 100 mM		
10,17 mg ad 1,00 ml	Iodacetamid Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 100 mM	55 mmol/l
Ameisensäure 1 % / Acetonitril 2 %		
0,15 ml	Ameisensäure 100 %	1 % (V/V)
0,30 ml	Acetonitril 100 %	2 % (V/V)
14,55 ml	Wasser	
Acetonitril 50 %		
7,50 ml	Acetonitril 100 %	50 % (V/V)
7,50 ml	Wasser	
Ameisensäure 1% in Acetonitril		
0,15 ml	Ameisensäure	1 % (V/V)
14,85 ml	Acetonitril 100 %	

Nach erfolgter Entfärbung wurde zur Spaltung potentieller Disulfidbrücken im Protein ein Reduktionsschritt mit 10 mM DTT-Lösung und im Anschluss daran ein Alkylierungsschritt mit 55 mM Iodacetamid-Lösung durchgeführt. Für die Reduktion wurden zunächst 25 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung und nachfolgend 50 µl frisch hergestellte 10 mM DTT-Lösung in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung zu den Gelstücken gegeben und bei 50 °C für 30 min inkubiert. Danach wurde die DTT-Lösung abgenommen und verworfen. Für die sich nun anschließende Alkylierung wurden zuerst 25 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung und darauf 50 µl frisch zubereitete 55 mM

Iodacetamid-Lösung in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung zu den Gelstücken pipettiert und für 20 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Nach abgeschlossener Alkylierung wurde die Iodacetamid-Lösung abgenommen und verworfen und zum eigentlichen Verdau mit Trypsin bzw. Chymotrypsin übergegangen.

Für den Trypsin-Verdau wurden die Gelstücke vor Zugabe der Trypsin-Lösung noch jeweils einmal für 5 min mit 100 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung und 100 µl Acetonitril gewaschen. Anschließend wurden die Gelstücke in 75 µl 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung rehydratisiert, mit 25 µl Trypsin-Lösung (6 ng/µl) überschichtet und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde der Überstand abgenommen und in ein beschriftetes Eppendorf LoBind® Tube überführt. Für die Extraktion der Peptide aus den Gelstücken wurden diese nacheinander für jeweils 5 min mit einer Mischung aus a) 100 µl 1 % Ameisensäure / 2 % Acetonitril b) 100 µl 1 : 1 (V/V) Acetonitril / Wasser und c) 100 µl 1 % Ameisensäure in Acetonitril bei RT geschüttelt und die Überstände im beschrifteten Eppendorf LoBind® Tube gesammelt. Die vereinigten Überstände wurden nachfolgend in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockne eingeeengt und bis zur massenspektrometrischen Analyse bei - 20 °C eingefroren.

Für den Chymotrypsin-Verdau wurden im Anschluss an die beiden Waschschriffe mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung und Acetonitril 25 µg Chymotrypsin in 25 µl destilliertem Wasser gelöst (Stammlösung: 1 µg/µl). Diese Lösung wurde darauf 1 : 10 mit einer Mischung aus 50 mM Tris-HCl pH 8,0 / 1 mM Calciumchlorid verdünnt (1 : 10 Verdünnung: 100 ng/µl). Von dieser 1 : 10 Verdünnung wurden 12,5 µl zu den Gelstücken gegeben (1,25 µg Chymotrypsin pro Verdau), mit 12,5 µl der Mischung aus 50 mM Tris-HCl pH 8,0 / 1mM Calciumchlorid überschichtet und bei 30 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde der Überstand abgenommen und in ein beschriftetes Eppendorf LoBind® Tube überführt. Die sich anschließende Extraktion der resultierenden Peptide aus den Gelstücken erfolgte analog dem Trypsin-Verdau sequentiell mit a) 100 µl 1 % Ameisensäure / 2 % Acetonitril b) 100 µl 1 : 1 (V/V) Acetonitril / Wasser und c) 100 µl 1 % Ameisensäure in Acetonitril für jeweils 5 min bei RT. Die Überstände wurden im beschrifteten Eppendorf LoBind® Tube vereinigt, in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

3.2.1.3 Kombiniertes In-Gel-Verdau

Zur Erhöhung der Sequenzabdeckung von P-gp, insbesondere in den transmembranären Domänen, wurden zwei einzelne In-Gel-Verdaus miteinander kombiniert. Hierfür wurden sowohl unterschiedliche Enzymkombinationen als auch Reihenfolgen und abgeänderte Enzym : Protein Verhältnisse der einzelnen Verdaus untersucht. Folgende Kombinationen des In-Gel-Verdaus wurden durchgeführt:

- a) 1. Trypsin-In-Gel-Verdau / 2. Chymotrypsin-In-Gel-Verdau
- b) 1. Chymotrypsin-In-Gel-Verdau / 2. Trypsin-In-Gel-Verdau
- c) 1. Trypsin-In-Gel-Verdau / 2. Trypsin-In-Gel-Verdau
- d) 1. Chymotrypsin-In-Gel-Verdau / 2. Chymotrypsin-In-Gel-Verdau

Dabei wurde der erste In-Gel-Verdau stets mit dem jeweiligen Enzym nach einem der beiden in Kapitel 3.2.1.1 bzw. 3.2.1.2 beschriebenen Protokolle durchgeführt. Nach der Extraktion der resultierenden Peptide aus den Gelstücken wurden diese in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet, die Überstände in einem beschrifteten Eppendorf LoBind® Tube gesammelt und mit dem zweiten In-Gel-Verdau begonnen. Hierfür wurden die Entfärb- und Waschschrte des ersten In-Gel-Verdaus weggelassen und direkt mit der Rehydratisierung der Gelstücke und der Zugabe der Enzym-Lösung fortgefahren. Die Inkubation über Nacht beim jeweiligen Temperatur-Optimum des verwendeten Enzyms und die sich anschließende Extraktion der entstandenen Peptide aus den Gelstücken, erfolgten analog dem ersten In-Gel-Verdau wie in Kapitel 3.2.1.1 bzw. 3.2.1.2 erläutert. Die resultierenden peptidhaltigen Überstände beider In-Gel-Verdaus wurden abschließend im selben beschrifteten Eppendorf LoBind® Tube vereinigt, in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockne eingengt und bis zur weiteren Verarbeitung bei - 20 °C gelagert.

3.2.2 In-Lösung-Verdau

Der In-Lösung-Verdau von P-gp wurde mit den Enzymen Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin, Elastase, Proteinase K und Thermolysin, sowie Bromcyan als chemischem Spaltungs-Reagenz in Anlehnung an ein Standardprotokoll für den Trypsin-Verdau aus der Arbeitsgruppe von Dr. Sabine Metzger (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) und die Produktinformationen der verwendeten Enzyme durchgeführt und nachfolgend optimiert. Dabei war der allgemeine Ablauf des In-Lösung-Verdaus für alle eingesetzten Verdau-Reagenzien gleich und bestand aus den folgenden Arbeitsschritten:

- 1) Suspension von 5 µl P-gp-Proteoliposomen im jeweiligen Verdau-Puffer
- 2) Herstellung der Enzym-(Stamm)Lösung
- 3) Zugabe der Enzym-Lösung in einem spezifischen Enzym : Protein Verhältnis
- 4) Inkubation für eine bestimmte Zeit beim jeweiligen Temperatur-Optimum des verwendeten Enzyms
- 5) Inaktivierung des Verdaus durch Erhitzen oder Alkalisierung
- 6) Trocknen der resultierenden Peptide in der Vakuum-Zentrifuge
- 7) Lagerung bei - 20 °C oder Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse

Einzig bei Bromcyan als Spaltungs-Reagenz wurde der Verdau nicht durch Hitze bzw. Alkalizusatz inaktiviert, sondern durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser oder 10 % Essigsäure und Trocknen in der Vakuum-Zentrifuge.

Variable Parameter des In-Lösung-Verdaus waren das Enzym : Protein Verhältnis, die Temperatur, die Inkubationszeit und die Tatsache, ob der Reaktionsansatz während des Verdaus geschüttelt wurde oder nicht. Diese Parameter wurden mit dem Ziel eines möglichst vollständigen Verdaus von P-gp entsprechend optimiert.

Zur Erhöhung der Sequenzabdeckung von P-gp wurden zusätzlich zur Optimierung der variablen Parameter weitere Optimierungs-Versuche unternommen. So wurden beispielsweise in Analogie zum In-Gel-Verdau Kombinations-Verdaus mit unterschiedlichen Enzym-Kombinationen unter Einsatz von sogenannten „Molecular

Weight Cut-Off (MWCO)-Filtern“ durchgeführt. Hierbei wird P-gp mit einem ersten Verdau-Reagenz vorverdaut und die resultierenden Peptide werden darauf mittels MWCO-Filter voneinander getrennt. Die kleinen Peptide können den Filter durch Zentrifugation passieren und werden in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen, während die großen Peptide im Filter zurück bleiben und nachfolgend in einem zweiten Verdau mit demselben oder einem anderen Enzym nachverdaut werden können. Für diese Kombinations-Verdaus wurden Trypsin, Chymotrypsin und Bromcyan miteinander kombiniert.

In einem weiteren Optimierungs-Versuch hinsichtlich einer besseren Sequenzabdeckung von P-gp wurde das Protein vor Zugabe des Verdau-Reagenzes durch Erhitzen und anschließendes sofortiges Abschrecken auf Eis denaturiert. Dabei wurden die Menge des eingesetzten Enzyms und die Inkubationszeit gedrittelt und P-gp in insgesamt drei Zyklen mit jeweils vorgeschalteter Denaturierung verdaut. Für diese Art des Verdaus wurden die beiden Enzyme Trypsin und Chymotrypsin verwendet.

Der abschließende Versuch, den Verdau von P-gp mit den genannten Reagenzien zu verbessern, bestand aus dem Einsatz von mit der Massenspektrometrie kompatiblen, säurelabilen Detergenzien. Diese fungieren bei neutralem pH-Wert als potente Detergenzien und bewirken eine Denaturierung des Proteins, so dass die eingesetzten Enzyme die vorher schwer zugänglichen hydrophoben Bereiche besser erreichen können. Nach abgeschlossenem Verdau können die Detergenzien durch den Zusatz von final 0,5 - 1 % Trifluoressigsäure (TFA) innerhalb von 15 - 30 min bei 37 °C bzw. RT zu Produkten abgebaut werden, die nicht mit der Massenspektrometrie interferieren. Zur Verfügung standen anionische, zwitterionische, kationische und nichtionische säurelabile Detergenzien, von denen in der vorliegenden Arbeit mit Ausnahme des kationischen Detergens, alle Detergenzien in verschiedenen Konzentrationen als Zusatz zum In-Lösung-Verdau mit Trypsin, Chymotrypsin und Elastase zum Einsatz kamen. So wurde für die drei verwendeten Enzyme die optimale Konzentration des am besten tolerierten und effizientesten Detergens ermittelt und für die nachfolgenden Verdaus übernommen.

3.2.2.1 Trypsin-In-Lösung-Verdau

Für den Trypsin-In-Lösung-Verdau wurden analog dem in Kapitel 3.2.2 beschriebenen allgemeinen Schema als Erstes 5 μl (5,7 μg ; $c = 1,14 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) aufgereinigtes P-gp in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 8 suspendiert. Das Gesamtvolumen des Verdau wurde dabei auf 100 μl festgesetzt und für die folgenden In-Lösung-Verdau übernommen.

Tab. 3.8: Lösungen für den Trypsin-In-Lösung-Verdau.

Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 25 mM		pH 8,0
98,83 mg ad 50,00 ml	Ammoniumhydrogencarbonat Wasser	25 mmol/l
Salzsäure 1 mM		
0,05 ml 49,95 ml	1 M Salzsäure Wasser	1 mmol/l
Trypsin-Lösung 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$		
20 μg 200 μl	Trypsin 1 mM Salzsäure	0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Anschließend wurde die Trypsin-Lösung ($c = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) durch Lösen von 20 μg Trypsin in 200 μl kalter 1 mM Salzsäure hergestellt und auf Eis gelagert. Da sich für den Trypsin-In-Lösung-Verdau ein Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 bewährt hat, wurde dieses Verhältnis auf alle mit Trypsin durchgeführten Verdau übertragen. Demnach wurden 2,85 μl (0,285 μg ; $c = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) Trypsin-Lösung zur P-gp-Suspension hinzugegeben und nachfolgend bei 37 °C für 2,5 h inkubiert. Die Inaktivierung des Verdau erfolgte durch 10 minütiges Erhitzen auf 95 °C und im Anschluss daran wurden die resultierenden Peptide in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und bis zur massenspektrometrischen Analyse bei - 20 °C eingefroren.

3.2.2.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau

Der Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau wurde in Analogie zum Trypsin-In-Lösung-Verdau durchgeführt. Auch hier wurden zunächst 5 μl (5,7 μg ; $c = 1,14 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) P-gp-Proteoliposomen in Verdau-Puffer suspendiert. Als Pufferlösung wurde jedoch im Unterschied zum Trypsin-Verdau eine Mischung aus 100 mM Tris-HCl und 10 mM Calciumchlorid verwendet, da Chymotrypsin zur Aktivierung Calcium-Ionen benötigt. Für das Endvolumen des Verdau wurden wiederum 100 μl gewählt und auch das Enzym : Protein Verhältnis wurde mit 1 : 20 übernommen.

Tab. 3.9: Lösungen für den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau.

Tris-HCl 100 mM / Calciumchlorid 10 mM			pH 7,8
605,7 mg	Tris		100 mmol/l
73,5 mg	Calciumchlorid-Dihydrat		10 mmol/l
ad 50,0 ml	Wasser		
Salzsäure 1 mM			
0,05 ml	1 M Salzsäure		1 mmol/l
49,95 ml	Wasser		
Chymotrypsin-Lösung 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$			
25 μg	Chymotrypsin		0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
250 μl	1 mM Salzsäure		

Die Chymotrypsin-Lösung ($c = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde durch Lösen von 25 μg Chymotrypsin in 250 μl kalter 1 mM Salzsäure angefertigt und anschließend auf Eis gelagert. Der Verdau wurde durch Zugabe von 2,85 μl (0,285 μg) Chymotrypsin-Lösung gestartet und für 2,5 h bei 25 °C inkubiert. Nachfolgend wurde der Verdau durch Hitzeinaktivierung des Chymotrypsins für 10 min bei 95 °C gestoppt und die entstandenen Peptide abschließend in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und bei - 20 °C gelagert.

3.2.2.3 Bromcyan-In-Lösung-Verdau

Der Bromcyan-In-Lösung-Verdau wurde zur Ermittlung des besten Verhältnisses von Bromcyan zu P-gp in vier verschiedenen Varianten durchgeführt. Die erste Version orientierte sich dabei an der Vorschrift nach Roberts et al. [106]. Hierfür wurden als Erstes 5 μl (5,7 μg ; $c = 1,14 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) aufgereinigtes P-gp in 75 μl 70 % Trifluoressigsäure (TFA) suspendiert. Anschließend erfolgte die Herstellung der Bromcyan-Stammlösung ($c = 1 \text{ mg}/\mu\text{l}$) durch Lösen von 100 mg Bromcyan in 100 μl 70 % TFA. Aus Stabilitätsgründen wurde die Bromcyan-Stammlösung bis zur Verwendung unter Lichtausschluss gelagert. Der Verdau wurde darauf durch Zugabe von 20 μl Bromcyan-Stammlösung (20 mg BrCN) gestartet und über Nacht bei RT unter Schütteln (400/min) und Lichtausschluss inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die entstandenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene eingengt und nachfolgend restliches Bromcyan durch zwei Waschschriffe mit destilliertem Wasser entfernt. Hierfür wurden im ersten Waschschriff 500 μl Wasser zu den Peptiden gegeben und anschließend in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Darauf erfolgte der zweite Waschschriff mit 100 μl Wasser und nachfolgendem Trocknen in der Vakuum-Zentrifuge. Abschließend wurden die Peptide bis zur Vermessung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Die zweite Ausführung des Bromcyan-Verdaus erfolgte in Anlehnung an eine Publikation von Dong et al. [107]. Dabei wurden 5 μl P-gp-Proteoliposomen (5,7 μg) in 45 μl 70 % Ameisensäure suspendiert und im Anschluss daran die Bromcyan-Stammlösung ($c = 1 \text{ mg}/\mu\text{l}$) durch Lösen von 100 mg Bromcyan in 100 μl 70 % Ameisensäure hergestellt. Durch Zugabe von 50 μl Bromcyan-Stammlösung (50 mg BrCN) wurde der Verdau daraufhin gestartet und über Nacht bei RT unter Schütteln und Lichtausschluss inkubiert. Am nächsten Morgen erfolgte dann die Trocknung der resultierenden Peptide in der Vakuum-Zentrifuge und im Anschluss daran wurde überschüssiges Bromcyan durch drei Waschschriffe mit 10 % Essigsäure und nachfolgendes Trocknen entfernt. Für die ersten beiden Waschschriffe wurden jeweils 20 μl 10 % Essigsäure zu den Peptiden pipettiert und anschließend zur Trockene eingedampft. Abschließend wurde der Rückstand ein letztes mal mit 100 μl 10 % Essigsäure gewaschen, die Peptide getrocknet und bis zur

weiteren Analyse bei - 20 °C aufbewahrt.

In der dritten und vierten Variante des Verdau von P-gp mit Bromcyan wurde das Protein mit einer Menge an Bromcyan versetzt, die dem 1000- bzw. 100-fach molaren Überschuss an Bromcyan über die 32 Methionin-Reste in der P-gp-Aminosäuresequenz entsprach. Bei einer Masse von 131 g/mol pro Methionin ergibt sich daraus eine Gesamtmasse von $32 * 131 \text{ g/mol} = 4192 \text{ g/mol}$. Hieraus errechnet sich bei einem angenommenen Molekulargewicht von P-gp von 142.743,91 g/mol ein Massenanteil an Methionin von $4192 \text{ g/mol} : 142.743,91 \text{ g/mol} = 0,0294 * 100 = 2,94 \%$. Setzt man pro Verdau 5 µl aufgereinigtes P-gp (5,7 µg) ein, resultiert daraus eine Methionin-Masse von $5,7 \text{ µg} * 0,0294 = 0,1676 \text{ µg}$ und entsprechend eine Methionin-Stoffmenge von $0,1676 \text{ µg} : 131 \text{ g/mol} = 1,279 * 10^{-3} \text{ µmol}$. Ein 100- bzw. 1000-facher Überschuss über diese Methionin-Stoffmenge entspricht dann 0,1279 µmol bzw. 1,279 µmol Bromcyan. Durch Einbeziehung der Molaren Masse von Bromcyan (105,93 g/mol) erhält man letztendlich die Masse an Bromcyan, die im Endvolumen des Verdau enthalten sein muss ($m = 13,55 \text{ µg}$ bzw. 135,48 µg).

Für die Durchführung wurden analog den ersten beiden Varianten zuerst 5 µl Pgp-Proteoliposomen (5,7 µg) in 70 % TFA bzw. 70 % Ameisensäure suspendiert. Das Volumen der TFA bzw. Ameisensäure wurde dabei so gewählt, dass sich zuzüglich des P-gp-Volumens und des Volumens der Bromcyan-Stammlösung ein Gesamtvolumen von 100 µl ergab. Anschließend wurde eine 0,1 M Bromcyan-Stammlösung durch Lösen von 10,59 mg Bromcyan in 1 ml 70 % TFA bzw. 70 % Ameisensäure hergestellt. Durch Zugabe von 1,28 µl (100-facher molarer Überschuss) bzw. 12,79 µl (1000-facher molarer Überschuss) dieser 0,1 M Bromcyan-Stammlösung zur P-gp-Suspension wurde der Verdau gestartet und über Nacht bei RT unter Schütteln und Lichtausschluss inkubiert. Daran schlossen sich am nächsten Morgen mehrere alternierende Trocknungs- und Waschschrte mit 10 % Essigsäure bzw. Wasser in der Vakuum-Zentrifuge an und abschließend wurden die getrockneten Peptide bis zur Analyse bei - 20 °C gelagert.

Tab. 3.10: Lösungen für den Bromcyan-Verdau.

Trifluoressigsäure (TFA) 70 %		
7,00 ml 3,00 ml	Trifluoressigsäure 100 % Wasser	70 % (V/V)
Ameisensäure 70 %		
7,00 ml 3,00 ml	Ameisensäure 100 % Wasser	70 % (V/V)
Essigsäure 10 %		
1,00 ml 9,00 ml	Essigsäure 100 % Wasser	10 % (V/V)
Bromcyan-Stammlösung 1 mg/μl		
100 mg ad 100 μl	Bromcyan TFA 70 % bzw. Ameisensäure 70 %	1 mg/μl
Bromcyan-Stammlösung 0,1 M		
10,59 mg ad 1,00 ml	Bromcyan TFA 70 % bzw. Ameisensäure 70 %	0,1 mol/l

3.2.2.4 Pepsin-In-Lösung-Verdau

Der Verdau von P-gp mit Pepsin wurde in Anlehnung an vier verschiedene Protokolle durchgeführt und entsprechend optimiert. Die vier Vorschriften wurden dabei im Hinblick auf die bestmögliche Sequenzabdeckung von P-gp untersucht und das Protokoll, welches die besten Ergebnisse lieferte, in der Folge als Standard-Protokoll für den Pepsin-Verdau etabliert.

Die erste Vorschrift basiert auf einer Veröffentlichung von Rietschel et al. [108] und verwendet 0,1 % Trifluoressigsäure und einen finalen Anteil von 10 % Methanol als Lösungsmittel. Nach diesem Protokoll wurden zunächst 5 μl (5,7 μg) aufgereinigtes P-gp in 10 μl Methanol suspendiert und anschließend für 2 x 10 min im Ultraschallbad inkubiert. Darauf wurde soviel 0,1 % Trifluoressigsäure hinzu pipettiert, dass zuzüglich

der Volumina an Methanol, P-gp und Pepsin-Stammlösung ein Gesamtvolumen von 100 µl resultierte. Im Anschluss daran wurde die Pepsin-Stammlösung in 0,1 % TFA bzw. 10 mM Salzsäure hergestellt und in einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 1 hinzugegeben. Der Verdau erfolgte daraufhin über Nacht bei RT unter leichtem Schütteln. Am nächsten Morgen wurde das Pepsin durch Zugabe von 1 N Natronlauge (pH > 8) inaktiviert und der Verdau somit gestoppt. Die entstandenen Peptide wurden abschließend in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und bei - 20 °C eingefroren.

Die zweite Vorschrift orientiert sich an der Produktinformation des verwendeten Pepsins von Sigma-Aldrich [109]. Laut diesem Protokoll wurden zuerst 5 µl P-gp-Proteoliposomen (5,7 µg) in 10 mM Salzsäure suspendiert und anschließend eine 0,4 %ige Pepsin-Stammlösung (c = 4 mg/ml) in 10 mM Salzsäure hergestellt. Auch hier wurde ein Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 1 gewählt und somit 1,43 µl der Pepsin-Stammlösung (5,7 µg Pepsin) zugegeben. Das Endvolumen des Verdau betrug damit 100 µl. Nachfolgend wurde bei 37 °C für 30 - 90 min inkubiert, der Verdau durch Zugabe von 1 N Natronlauge (pH > 8) gestoppt und die resultierenden Peptide in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene eingengt und bei - 20 °C gelagert.

Die dritte Vorschrift wurde freundlicherweise von Herrn Shahid Mehmood zur Verfügung gestellt und unterscheidet sich vom vorherigen Protokoll nach Sigma-Aldrich lediglich in der Inkubationszeit und der Konzentration der verwendeten Salzsäure. Nach dieser Vorschrift wurden 5 µl aufgereinigtes P-gp in 0,1 M Salzsäure suspendiert und für 10 min mit 1,43 µl 0,4 %iger Pepsin-Stammlösung in 0,1 M Salzsäure (Enzym : Protein Verhältnis = 1 : 1) bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Verdau durch Zugabe von 1 N Natronlauge (pH > 8) inaktiviert, die erhaltenen Peptide getrocknet und bei - 20 °C aufbewahrt.

Für die vierte und letzte Vorschrift wurde im Gegensatz zu den drei vorher beschriebenen Protokollen ein anderes Pepsin verwendet. Dieses Pepsin wurde von der Firma Protea bezogen und auf seine Effizienz hinsichtlich des Verdau von P-gp untersucht. Die erhaltene Sequenzabdeckung von P-gp wurde mit derjenigen Sequenzabdeckung verglichen, die unter Anwendung des Pepsins von Sigma-Aldrich erzielt worden war.

In Anlehnung an die Produktinformation des verwendeten Pepsins von Protea [110]

3.2.2.4 Pepsin-In-Lösung-Verdau

wurden zunächst 5 µl aufgereinigtes P-gp (5,7 µg) in 10 mM Salzsäure suspendiert. Anschließend wurde eine sogenannte „Master-Stock-Lösung“ (c = 0,1 µg/µl) durch Lösen von 10 µg Pepsin in 100 µl 10 mM Salzsäure angefertigt, aliquotiert und bei - 80 °C gelagert. Aus dieser Master-Stock-Lösung wurde durch Verdünnung im Verhältnis 1 : 50 mit 10 mM Salzsäure die eigentliche Pepsin-Verdauung hergestellt (c = 2 ng/µl). Von dieser Pepsin-Lösung wurden nachfolgend 57 µl (0,114 µg Pepsin) entsprechend einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 50 zur P-gp-Suspension gegeben. Das Gesamtvolumen des Verdau betrug damit 100 µl. Im Anschluss daran wurde für 6 h bzw. über Nacht bei 37 °C inkubiert, der Verdau durch Zugabe von 1 N Natronlauge gestoppt, die erhaltenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und bis zur Vermessung bei - 20 °C gelagert.

Tab. 3.11: Lösungen für den Pepsin-Verdau.

Trifluoressigsäure 10 %		
1,00 ml	Trifluoressigsäure 100 %	10 % (V/V)
9,00 ml	Wasser	
Trifluoressigsäure 0,1 %		
0,10 ml	Trifluoressigsäure 10 %	0,1 % (V/V)
9,90 ml	Wasser	
Salzsäure 0,1 M		
5,00 ml	Salzsäure 1 M	0,1 mol/l
45,00 ml	Wasser	
Salzsäure 10 mM		
0,50 ml	Salzsäure 1 M	10 mmol/l
49,50 ml	Wasser	
Pepsin-Stammlösung 0,4 %		
4,00 mg	Pepsin Sigma	0,4 % (m/V)
ad 1,00 ml	0,1 % TFA; 10 mM HCl; 0,1 M HCl	
Pepsin-Master-Stock-Lösung 0,1 µg/µl		
10 µg	Pepsin Protea	0,1 µg/µl
ad 100 µl	10 mM Salzsäure	
Pepsin-Verdauung 2 ng/µl		
2 µl	Pepsin-Master-Stock-Lösung	2 ng/µl
98 µl	10 mM Salzsäure	

3.2.2.5 Elastase-In-Lösung-Verdau

Das Pankreasenzym Elastase wurde von der Firma Promega bezogen und der Verdau von P-gp entsprechend einem in der Produktinformation enthaltenen Protokoll [111] durchgeführt.

Tab. 3.12: Lösungen für den Verdau mit Elastase.

Tris-HCl 50 mM		pH 9,0
302,85 mg ad 50,0 ml	Tris Wasser	50 mmol/l
Elastase-Stammlösung 1 µg/µl		
1,00 mg ad 1,00 ml	Elastase Wasser	1 µg/µl
Elastase-Verdaulösung 0,1 µg/µl		
100 µl 900 µl	Elastase-Stammlösung Wasser	0,1 µg/µl

Als erstes wurden 5 µl P-gp-Proteoliposomen (5,7 µg) in einem ausreichenden Volumen an 50 mM Tris-HCl pH 9 suspendiert, so dass sich für das Gesamtvolumen des Verdau inklusive der Elastase-Lösung 100 µl ergaben. Tris fungiert hierbei als Aktivator des Enzyms und muss im Verdau-Puffer enthalten sein und pH 9 stellt das pH-Optimum der Elastase dar. Anschließend wurde die Elastase-Stammlösung ($c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) durch Lösen des Enzyms in destilliertem Wasser hergestellt und nachfolgend mit Wasser im Verhältnis 1 : 10 verdünnt ($c = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Diese Elastase-Verdaulösung wurde im Anschluss daran in einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 ($2,85 \mu\text{l} = 0,285 \mu\text{g}$) zur P-gp-Suspension gegeben. Der Verdau erfolgte daraufhin bei 37 °C für 2,5 h unter Schütteln. Die Inaktivierung des Enzyms wurde durch 10 minütiges Erhitzen auf 95 °C bewirkt und die entstandenen Peptide darauffolgend in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene eingedampft und bei - 20 °C eingefroren.

3.2.2.6 Proteinase K-In-Lösung-Verdau

Proteinase K ist ein Enzym aus dem Schlauchpilz *Tritirachium album* und gehört zur Familie der Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen. Der Buchstabe „K“ steht für Keratin und reflektiert die außerordentlich stark ausgeprägte Fähigkeit der Proteinase K, Keratin abzubauen zu können. Haupteinsatzgebiete des Enzyms sind der Abbau von Proteinen in Zelllysaten und die Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien bzw. Zellen und Geweben für die Polymerase-Kettenreaktion, wobei die Proteinase K gleichzeitig als Exo- und Endopeptidase fungiert. Aktiviert durch Calcium-Ionen (1 - 5 mM) spaltet die Proteinase Proteine bevorzugt hinter hydrophoben Aminosäuren (aliphatische, aromatische und andere hydrophobe Aminosäuren). Ist die Inkubationszeit lang genug und die Enzymkonzentration hoch, werden Proteine vollständig verdaut. Entzieht man der Protease die Calcium-Ionen, sinkt die katalytische Aktivität um circa 80 %. Die verbleibende Aktivität reicht aus, um Proteine abzubauen, die üblicherweise Nukleinsäurepräparationen verunreinigen. Das pH-Optimum des Enzyms liegt bei 8, allerdings ist die Proteinase K in einem weiten Bereich von pH 4,5 - 12 stabil. Eine Steigerung der Aktivität kann durch Temperaturerhöhung von 37 °C auf 50 - 60 °C bzw. Zusatz von 0,5 - 1 % SDS erreicht werden. Inaktiviert wird Proteinase K durch Fällung mit Trichloressigsäure oder Erhitzen, wobei eine Temperatur von 95 °C und eine Dauer von 10 min nicht unterschritten werden sollte. Die Richtwerte für die Arbeitskonzentration bzw. Inkubationszeit liegen zwischen 50 - 200 µg/ml bzw. 30 min - über Nacht [112].

Für den Verdau von P-gp wurde eine gebrauchsfertige Lösung von Proteinase K in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 der Firma Roche verwendet [112]. Die Konzentration von Proteinase K in dieser Lösung betrug 19,2 mg/ml. Zunächst wurden 5 µl aufgereinigtes P-gp (5,7 µg) in einer Menge 10 mM Tris-HCl / 1mM Calciumchlorid pH 7,5 suspendiert, so dass ein Endvolumen von 100 µl für den Verdau resultierte. Anschließend wurde 1 µl der Proteinase K-Lösung (19,2 µg) zur P-gp-Suspension gegeben und bei 37 bzw. 65 °C für 30 min inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte darauf durch 15 minütiges Erhitzen bei 95 °C und die entstandenen Peptide wurden nachfolgend getrocknet und bei - 20 °C

eingefroren.

Zur Optimierung des Verdau wurden nachfolgend das Enzym : Protein Verhältnis und die Inkubationszeit variiert. Dabei wurden Enzym : Protein Verhältnisse von 1 : 1 und 1 : 20 und Inkubationszeiten von 1 h bis über Nacht im Hinblick auf die Sequenzabdeckung von P-gp untersucht. Hierfür wurde die Proteinase K-Lösung 1 : 10 bzw. 1 : 100 mit 10 mM Tris-HCl / 1 mM Calciumchlorid pH 7,5 verdünnt (c = 1,92 bzw. 0,192 mg/ml) und von dieser Lösung 2,97 µl (5,7 µg Proteinase K) bzw. 1,48 µl (0,285 µg Proteinase K) zur Proteinsuspension gegeben. Der Verdau erfolgte anschließend bei 37 bzw. 65 °C für 30 min. Inaktivierung des Verdau, Trocknung und Lagerung der erhaltenen Peptide wurden wie bereits beschrieben durchgeführt.

Tab. 3.13: Lösungen für den Verdau mit Proteinase K.

Tris-HCl 10 mM / Calciumchlorid 1 mM		pH 7,5
60,57 mg	Tris	10 mmol/l
8,50 mg	Calciumchlorid-Dihydrat	1 mmol/l
ad 50,00 ml	Wasser	
Proteinase K-Stammlösung Roche 19,2 mg/ml		
Proteinase K-Lösung 1,92 mg/ml		
5 µl	Proteinase K-Stammlösung Roche 19,2 mg/ml	1,92 mg/ml
45 µl	Tris-HCl 10 mM / Calciumchlorid 1 mM pH 7,5	
Proteinase K-Lösung 0,192 mg/ml		
1 µl	Proteinase K-Stammlösung Roche 19,2 mg/ml	0,192 mg/ml
99 µl	Tris-HCl 10 mM / Calciumchlorid 1 mM pH 7,5	

3.2.2.7 Thermolysin-In-Lösung-Verdau

Die thermostabile Metalloprotease Thermolysin aus dem Bakterium *Bacillus thermoproteolyticus rokko* zeichnet sich dadurch aus, dass sie im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymen bei hohen Temperaturen aktiv ist und somit als Alternative zu denaturierenden Reagenzien für den Verdau proteolytisch resistenter Proteine eingesetzt

3.2.2.7 Thermolysin-In-Lösung-Verdau

werden kann. Das Enzym wurde von der Firma Promega bezogen und der Verdau von P-gp in Anlehnung an ein in der Produktinformation enthaltenes Protokoll [113] durchgeführt.

Als Verdau-Puffer wurde laut Produktinformation eine Mischung aus 50 mM Tris-HCl und 0,5 mM Calciumchlorid pH 8,0 gewählt, da Thermolysin zur Aktivierung Calcium- bzw. Zinkionen als Kofaktoren benötigt. Das pH-Optimum des Enzyms liegt bei pH 8,0 und der Bereich für eine gute Verdau-Temperatur erstreckt sich von 65 - 95 °C. Das Enzym : Protein Verhältnis sollte zwischen 1 : 20 und 1 : 50 betragen und die Verdau-Zeit wird mit 30 min - 6 h angegeben. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt durch Zugabe von soviel 10 %iger Ameisensäure, dass ein Anteil von final 0,5 % Ameisensäure im Endvolumen des Verdau resultiert [113].

Für den Verdau von P-gp mit Thermolysin wurden als Erstes 5 µl P-gp (5,7 µg) in 92,15 µl 50 mM Tris-HCl / 0,5 mM Calciumchlorid pH 8,0 suspendiert. Anschließend wurde die Thermolysin-Stammlösung (c = 1 µg/µl) in 50 mM Tris-HCl / 0,5 mM Calciumchlorid pH 8,0 hergestellt und nachfolgend 1 : 10 mit Verdau-Puffer zur eigentlichen Verdaulösung verdünnt. Von dieser Verdaulösung wurden darauf 2,85 µl (0,285 µg Thermolysin) entsprechend einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 zur Proteinsuspension gegeben und bei einer Temperatur von 75 °C für 2,5 h inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte durch Zugabe von 6 µl 10 % Ameisensäure (0,5 % final) die Inaktivierung des Enzyms und die entstandenen Peptide wurden getrocknet und bei - 20 °C gelagert.

Tab. 3.14: Lösungen für den Verdau mit Thermolysin.

Tris-HCl 50 mM / Calciumchlorid 0,5 mM			pH 8,0
607,3 mg	Tris		50 mmol/l
7,35 mg	Calciumchlorid-Dihydrat		0,5 mmol/l
ad 100,0 ml	Wasser		
Thermolysin-Stammlösung 1 µg/µl			
1,00 mg	Thermolysin		1 µg/µl
ad 1,00 ml	Tris-HCl 50 mM / Calciumchlorid 0,5 mM pH 8,0		
Thermolysin-Verdaulösung 0,1 µg/µl			
100 µl	Thermolysin-Stammlösung 1 µg/µl		0,1 µg/µl
900 µl	Tris-HCl 50 mM / Calciumchlorid 0,5 mM pH 8,0		

3.2.2.8 Kombinations-Verdau unter Einsatz von MWCO-Filtern

Die Kombination verschiedener Verdau-Reagenzien miteinander stellt eine Möglichkeit dar, die transmembranäre Sequenzabdeckung von P-gp zu erhöhen. Hierbei wird das Protein zunächst mit einem ersten Spaltungs-Reagenz (z. B. Bromcyan) vorverdaut und die gebildeten Peptide anschließend durch Einsatz eines sogenannten „Molecular Weight Cut-Off (MWCO)-Filters“ entsprechend ihres Molekulargewichts voneinander getrennt. Abhängig von der Porengröße des MWCO-Filters können die Peptide das Molekularsieb entweder durch Zentrifugation passieren und in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen werden oder sie bleiben aufgrund ihrer Molekülgröße im Filter zurück. Simultan zur Trennung kleiner und großer Peptide voneinander findet also zusätzlich eine Aufkonzentrierung der im Filter zurückbleibenden Peptid-Fraktion statt.

Die zur Verfügung stehenden MWCO-Filter unterscheiden sich hinsichtlich des Poren bildenden Materials (z. B. Polyethersulfon, regenerierte Cellulose etc.), der Porengröße und des „Cut-Offs“ (1000 - 1.000.000 Da). Der Cut-Off ist definiert als die minimale Molekülmasse eines globulären Moleküls, welches durch die Filtermembran zurückgehalten wird und wird in der Einheit Dalton angegeben. Alle Moleküle deren Masse den Cut-Off übersteigt, werden im Filter zurückgehalten, während Moleküle mit niedrigerem Molekulargewicht die Filtermembran passieren können. In der Praxis sollte der gewählte MWCO mindestens 20 % niedriger sein als die Molmasse des abzutrennenden Moleküls.

In Abhängigkeit vom für den ersten Verdau verwendeten Spaltungs-Reagenz, entstehen Peptide unterschiedlicher Größe und Anzahl. Wird beispielsweise Bromcyan als Verdau-Reagenz eingesetzt, resultieren aufgrund der spezifischen Spaltung hinter der Aminosäure Methionin nur 32 Peptide mit überwiegend hohem Molekulargewicht, die gut durch MWCO-Filter aufkonzentriert und nachfolgend mit einem zweiten Verdau-Reagenz (z. B. Trypsin, Chymotrypsin oder Pepsin) nochmals gespalten werden können.

Durch Variation der Enzym-Kombinationen und MWCO-Filter können somit theoretisch

unterschiedliche Peptid-Muster von P-gp erzeugt werden.

Für die an P-gp durchgeführten Kombinations-Verdaus wurde ein MWCO-Filter mit einem Cut-Off von 3 kDa von der Firma Protea bezogen und für die Enzym-Kombinationen Bromcyan/Trypsin; Bromcyan/Chymotrypsin; Bromcyan/Pepsin; Trypsin/Chymotrypsin und Trypsin/Pepsin eingesetzt.

Tab. 3.15: Verwendete MWCO-Filter und Enzym-Kombinationen.

MWCO-Filter	Enzym-Kombination
Protea Ultrafiltration Tube 3K	Bromcyan/Trypsin
Protea Ultrafiltration Tube 3K	Bromcyan/Chymotrypsin
Protea Ultrafiltration Tube 3K	Bromcyan/Pepsin
Protea Ultrafiltration Tube 3K	Trypsin/Chymotrypsin
Protea Ultrafiltration Tube 3K	Trypsin/Pepsin

Der Verdau von P-gp mit dem ersten Spaltungs-Reagenz (Trypsin oder Bromcyan) wurde entsprechend den Kapiteln 3.2.2.1 und 3.2.2.3 durchgeführt. Für den Verdau mit Bromcyan wurde dabei die Variante mit 70 % Trifluoressigsäure als Lösungsmittel und einer Gesamtmenge von 20 mg Bromcyan gewählt. Kurz zusammengefasst wurden jeweils 5 µl aufgereinigtes P-gp (5,7 µg) im jeweiligen Verdau-Puffer (25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung pH 8 bzw. 70 % TFA) suspendiert, die Enzym-Lösung im entsprechenden Enzym : Protein Verhältnis (1 : 20 bzw. 20 mg) zugegeben und beim jeweiligen Temperatur-Optimum (37 °C bzw. RT) des Verdau-Reagenzes inkubiert (2,5 h bzw. über Nacht).

Im Anschluss daran wurde die Verdau-Lösung auf den MWCO-Filter gegeben und die Peptide durch Zentrifugation bei den in der Produktinformation angegebenen Drehzahlen in zwei Fraktionen aufgeteilt. Im Falle der 3K Protea Ultrafiltration Tubes wurde bei 16.100 x g für 30 min bzw. so lange zentrifugiert, bis fast keine Flüssigkeit mehr im Filter erkennbar war. Das peptidhaltige Zentrifugat wurde dabei in Eppendorf-Gefäßen aufgefangen, in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und bis zur Analyse bei - 20 °C

gelagert. Der peptidhaltige Rückstand wurde darauffolgend zur Entfernung von überschüssigem Bromcyan und Lösungsmittel des vorangegangenen Verdaus zwei bis dreimal mit 100 - 200 µl destilliertem Wasser gewaschen und die Waschlösung durch Zentrifugation in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt.

Daran anschließend wurde das zweite Verdau-Reagenz (Trypsin, Chymotrypsin oder Pepsin) im für das jeweilige Enzym charakteristischen Verdau-Puffer (25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung pH 8, 100 mM Tris-HCl / 10 mM Calciumchlorid pH 7,8 oder 10 mM Salzsäure) und Enzym : Protein Verhältnis (1 : 20 bzw. 1 : 1) dem peptidhaltigen Rückstand hinzugefügt und beim Temperatur-Optimum (37 °C bzw. 25 °C) für 2,5 h inkubiert. Der Verdau wurde nachfolgend durch 10 minütiges Erhitzen bei 95 °C bzw. Zugabe von 1 N Natronlauge (pH > 8) gestoppt und nochmals für 30 min bei den angegebenen Drehzahlen zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde wiederum in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt, in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und bei - 20 °C eingefroren.

Der verbleibende peptidhaltige Rückstand wurde in der Folge durch umgekehrtes Einsetzen des MWCO-Filters in ein neues Eppendorf-Gefäß und Zentrifugation für 2 min bei 100 x g aus dem Filter in das Eppendorf-Gefäß überführt, in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene eingengt und bis zur weiteren Analyse bei - 20 °C aufbewahrt.

3.2.2.9 In-Lösung-Verdau in Kombination mit Hitzedenaturierung

Die Hitzedenaturierung von P-gp wurde als Optimierungsversuch zur Erhöhung der Sequenzabdeckung im transmembranären Bereich in Anlehnung an ein Protokoll aus der Arbeitsgruppe von Dr. Sabine Metzger (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt und mit dem Verdau durch die Enzyme Trypsin und Chymotrypsin kombiniert. Bei der Durchführung wurden die Enzymmenge und die Inkubationszeit gedrittelt und entsprechend drei Zyklen aus Denaturierung und sich anschließendem Verdau pro P-gp-Probe gefahren. Die verwendeten Puffer und Lösungen sind den Tabellen 3.8 und 3.9 zu entnehmen.

In einem ersten Schritt wurden 5 µl (5,7 µg) aufgereinigtes P-gp in 92,2 µl des jeweiligen Verdau-Puffers (25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 8 bzw. 100 mM Tris-HCl / 10 mM Calciumchlorid pH 7,8) suspendiert. Anschließend fand die erste Denaturierung durch 10 minütiges Erhitzen auf 94 °C, gefolgt vom sofortigen Abschrecken auf Eis für 2 min, statt. Darauf wurde ein Drittel der Gesamtmenge an Trypsin bzw. Chymotrypsin hinzugegeben und beim entsprechenden Temperaturoptimum des Enzyms (37 °C bzw. 25 °C) für 50 min inkubiert. Beim gewählten Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 entsprach dies einem Sechzigstel der Proteinmenge (1/60 von 5,7 µg = 0,095 µg = 0,95 µl Enzym-Lösung (c = 0,1 µg/µl)). Im Anschluss daran wurde mit dem zweiten und dritten Zyklus fortgefahren, wobei der Denaturierungs-Schritt des nachfolgenden Zyklus gleichzeitig die Inaktivierung des vorangegangenen Verdau bewirkte. Nach Beendigung des dritten und letzten Zyklus wurde der Verdau durch Hitzeinaktivierung des jeweiligen Enzyms gestoppt, die resultierenden Peptide in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und bis zur weiteren Analyse bei - 20 °C aufbewahrt.

3.2.2.10 In-Lösung-Verdau mit massenkompatiblen Detergenzien

In einem weiteren Optimierungsversuch zur Erhöhung der transmembranären Sequenzabdeckung von P-gp, kamen mit der Massenspektrometrie kompatible, säurelabile Detergenzien zum Einsatz. Diese Reagenzien fungieren bei neutralem pH-Wert als potente Detergenzien, indem sie eine Solubilisierung des Proteins bewirken und lassen sich durch Zugabe von final 0,5 - 1 % Trifluoressigsäure innerhalb von 15 - 30 min bei 37 °C bzw. RT zu Produkten abbauen, die nicht mit der Massenspektrometrie interferieren. Durch den Zusatz von 0,05 - 2 % dieser Detergenzien zum jeweiligen Verdau-Puffer kann die Zugänglichkeit der hydrophoben transmembranären Bereiche für die eingesetzten Enzyme durch Entfaltung verbessert werden. Die erhöhte Zugänglichkeit geht mit einem effizienteren Verdau der transmembranären Domänen einher, was sich wiederum in einer gesteigerten Sequenzabdeckung dieser Bereiche zeigt.

Für den Verdau von P-gp wurden zwei anionische, ein nichtionisches und ein zwitterionisches säurelabiles Detergens eingesetzt und mit den Enzymen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase kombiniert. Die verwendeten Detergenzien unterscheiden sich in ihrer kritischen Mizellbildungskonzentration (Critical Micelle Concentration = CMC) und wurden in unterschiedlich hohen Konzentrationen den jeweiligen Verdau-Puffern zugesetzt. Durch Variation der Detergens-Konzentration wurde für einige der verwendeten Enzym-Detergens-Kombinationen die optimale Arbeitskonzentration des eingesetzten Detergens ermittelt. Für andere Enzym-Detergens-Kombinationen wurde dagegen eine fixe Detergens-Konzentration gewählt und der Einfluss des Detergens-Zusatzes auf die transmembranäre Sequenzabdeckung entsprechend untersucht.

Tab. 3.16: Übersicht der verwendeten Enzym-Detergens-Kombinationen.

Detergens	Eigenschaft	Enzym	Finale Konzentration
AALS II	anionisch	Trypsin	0,1 %
AALS II	anionisch	Chymotrypsin	0,1 - 2 %
ZALS I	zwitterionisch	Trypsin	0,1 %
ZALS I	zwitterionisch	Chymotrypsin	0,1 %
NALS II	nichtionisch	Chymotrypsin	0,05 - 1 %
ProteaseMAX®	anionisch	Trypsin	0,05 %
ProteaseMAX®	anionisch	Chymotrypsin	0,05 %
ProteaseMAX®	anionisch	Elastase	0,05 %

a) AALS II in Kombination mit Trypsin und Chymotrypsin

Von den vier zur Verfügung stehenden massenkompatiblen Detergenzien wurde als Erstes das AALS II (Anionic Acid Labile Surfactant) der Firma Protea mit einer CMC von 1,9 mM in einer finalen Konzentration von 0,1 % mit den Enzymen Trypsin und Chymotrypsin kombiniert. Anschließend wurden zur Ermittlung der optimalen Arbeitskonzentration von AALS II für den Verdau mit Chymotrypsin AALS II-Konzentrationen von final 0,5 - 2 %

untersucht. Der in der Produktinformation empfohlene Konzentrationsbereich von AALS II liegt zwischen 0,01 und 2 % final [114].

Für den Verdau von P-gp mit Trypsin bzw. Chymotrypsin unter Zusatz von 0,1 - 2 % AALS II wurden zunächst 5 µl P-gp-Proteoliposomen (5,7 µg) in einem entsprechenden Volumen des jeweiligen Verdau-Puffers (25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung pH 8 bzw. 100 mM Tris-HCl / 10 mM Calciumchlorid pH 7,8) suspendiert, so dass sich für das Gesamtvolumen des Verdau einschließlich der AALS II- und Enzymstammlösung 100 µl ergaben. Anschließend wurden zwei AALS II-Stammlösungen der Konzentration 1 % und 10 % in destilliertem Wasser hergestellt. Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer ist in Tabelle 3.17 beschrieben. Darauf folgend wurden die AALS II-Stammlösungen mit der P-gp-Suspension derart verdünnt, dass finale Konzentrationen von 0,1 %; 0,5 %; 1 %; 1,5 % und 2 % AALS II erhalten wurden. Der Verdau wurde im Anschluss daran durch Zugabe der Enzymstammlösung in einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 (2,85 µl Trypsin- bzw. Chymotrypsin-Lösung c = 0,1 µg/µl) gestartet und für 2,5 h beim jeweiligen Temperatur-Optimum des verwendeten Enzyms (37 °C bzw. 25 °C) inkubiert. Danach wurde der Verdau durch Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 min bei 95 °C gestoppt und das AALS II durch Zugabe von 11 µl Trifluoressigsäure 10 % (1 % final) innerhalb von 30 min bei RT zu massenkompatiblen Produkten abgebaut. Abschließend wurden die erhaltenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene eingengt und bei - 20 °C gelagert.

b) ZALS I in Kombination mit Trypsin und Chymotrypsin

Das zwitterionische Detergens ZALS I (Zwitterionic Acid Labile Surfactant) wurde ebenfalls von der Firma Protea bezogen und für den Verdau von P-gp in einer fixen Konzentration von 0,1 % mit den Enzymen Trypsin und Chymotrypsin kombiniert. Das Detergens hat eine CMC von 3,4 mM und wird üblicherweise in einem Konzentrationsbereich von 0,01 - 0,1 % eingesetzt [115].

Analog zum Verdau mit AALS II wurden als Erstes 5 µl (5,7 µg) aufgereinigtes P-gp in 82,2 µl 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 8 (Trypsin) bzw. 100 mM Tris-HCl / 10 mM Calciumchlorid pH 7,8 (Chymotrypsin) gelöst. Im Anschluss daran erfolgte die

Herstellung einer 1 %igen Lösung von ZALS I in destilliertem Wasser entsprechend Tabelle 3.17. Von dieser Lösung wurden daraufhin 10 µl zur P-gp-Suspension gegeben, so dass eine finale Konzentration von 0,1 % ZALS I resultierte. Nachfolgend wurden 2,85 µl Trypsin- bzw. Chymotrypsin-Lösung (0,1 µg/µl) entsprechend einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 zugegeben und für 2,5 h bei 37 °C bzw. 25 °C inkubiert. Danach schlossen sich die Inaktivierung des Verdau durch 10 minütiges Erhitzen bei 95 °C und die Zersetzung des ZALS I innerhalb von 30 min bei RT durch Zugabe von final 1 % Trifluoressigsäure an. Abschließend wurden die entstandenen Peptide getrocknet und bei - 20 °C aufbewahrt.

c) NALS II in Kombination mit Chymotrypsin

Das nichtionische Detergens NALS II (Non-Ionic Acid Labile Surfactant) wurde analog dem AALS II und ZALS I von der Firma Protea bezogen und als mit der Massenspektrometrie kompatible Alternative zu den nichtionischen Detergenzien Triton X-100 bzw. Tween 20 mit Chymotrypsin kombiniert. Das Tensid zeichnet sich durch eine sehr geringe CMC von 0,44 mM aus und wird üblicherweise in einem Konzentrationsbereich von 0,01 - 1 % eingesetzt [116].

Für den Verdau von P-gp mit Chymotrypsin unter Zusatz von NALS II wurden vier verschiedene Detergens-Konzentrationen von 0,05 - 1 % final gewählt, mit dem Ziel, die am besten tolerierte und effizienteste Konzentration zu bestimmen und für die nachfolgenden Verdau zu übernehmen. Hierfür wurde als Erstes eine 2 %ige Stammlösung von NALS II in einer Mischung aus 20 % Acetonitril in 100 mM Tris-HCl / 10 mM Calciumchlorid pH 7,8 laut Tabelle 3.17 hergestellt. Anschließend wurden pro Reaktionsansatz 5 µl aufgereinigtes P-gp (5,7 µg) in einem entsprechenden Volumen an Verdau-Puffer suspendiert, so dass sich für das Gesamtvolumen des Verdau einschließlich Detergens und Enzymstammlösung 100 µl ergaben. Darauffolgend wurde die 2 %ige NALS II-Stammlösung mit der P-gp-Suspension derart verdünnt, dass finale Konzentrationen von 0,05 %; 0,1 %; 0,5 % und 1 % NALS II erhalten wurden. Durch Zugabe von jeweils 2,85 µl Chymotrypsin-Lösung ($c = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) entsprechend einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 wurde der Verdau dann gestartet und bei 25 °C für 30 min bzw. 2,5 h inkubiert. Die Inaktivierung des Verdau erfolgte im Anschluss durch 10

minütiges Erhitzen auf 95 °C und nachfolgend wurde das NALS II durch Zugabe von final 1 % Trifluoressigsäure und 30 minütige Inkubation bei RT abgebaut. Die entstandenen Peptide wurden abschließend in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene eingedampft und bis zur weiteren Analyse bei - 20 °C gelagert.

d) ProteaseMAX® in Kombination mit Trypsin, Chymotrypsin und Elastase

Als vierter und letzter Vertreter der säurelabilen massenkompatiblen Detergenzien wurde das anionische ProteaseMAX® der Firma Promega hinsichtlich seines Einflusses auf die transmembranäre Sequenzabdeckung von P-gp untersucht. ProteaseMAX® ist chemisch gesehen ein hydrophobes anionisches Sulfonat mit einem Molekulargewicht von 425 Dalton und kann durch Zusatz von final 0,5 % Trifluoressigsäure innerhalb von 15 min bei 37 °C bzw. 5 minütiges Erhitzen auf 95 °C bei neutralem pH-Wert gespalten werden. Als Abbauprodukte entstehen eine hydrophile zwitterionische Verbindung mit einer Molekülmasse von 139 Dalton, eine neutrale hydrophobe Struktur mit einem Molekulargewicht von 238 Dalton und Ameisensäure, die allesamt nicht mit der Massenspektrometrie interferieren [117].

Tab. 3.17: Lösungen für den Verdau mit massenkompatiblen Detergenzien.

AALS II-Stammlösung 10 %		
5 mg ad 50 µl	AALS II Wasser	10 % (m/V)
AALS II-Stammlösung 1 %		
1 mg ad 100 µl	AALS II Wasser	1 % (m/V)
NALS II-Stammlösung 2 %		
5 mg ad 250 µl	NALS II 20 % Acetonitril in 100 mM Tris-HCl / 10 mM Calciumchlorid pH 7,8	2 % (m/V)
ZALS I-Stammlösung 1 %		
1 mg ad 100 µl	ZALS I Wasser	1 % (m/V)
ProteaseMAX®-Stammlösung 1 %		

3.2.2.10 In-Lösung-Verdau mit massenkompatiblen Detergenzien

1 mg ad 100 µl	ProteaseMAX® Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 50 mM pH 8	1 % (m/V)
ProteaseMAX®-Lösung 0,2 %		
20 µl 80 µl	ProteaseMAX®-Stammlösung 1 % Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 50 mM pH 8	0,2 % (m/V)
Acetonitril 20 % in Tris-HCl 100 mM / Calciumchlorid 10 mM		
50 µl 200 µl	Acetonitril 100 % 100 mM Tris-HCl / 10 mM Calciumchlorid pH 7,8	pH 7,8 20 % (V/V)
Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung 50 mM		
98,8 mg ad 25,0 ml	Ammoniumhydrogencarbonat Wasser	pH 8,0 25 mmol/l
Tris-HCl 100 mM / Calciumchlorid 10 mM		
605,7 mg 73,5 mg ad 50,0 ml	Tris Calciumchlorid-Dihydrat Wasser	pH 7,8 100 mmol/l 10 mmol/l
Tris-HCl 50 mM		
302,8 mg ad 50,0 ml	Tris Wasser	pH 9,0 50 mmol/l
Salzsäure 1 mM		
0,05 ml 49,95 ml	1 M Salzsäure Wasser	1 mmol/l
Trifluoressigsäure 10 %		
1,00 ml 9,00 ml	Trifluoressigsäure 100 % Wasser	10 % (V/V)
Chymotrypsin-Lösung 0,1 µg/µl		
25 µg 250 µl	Chymotrypsin 1 mM Salzsäure	0,1 µg/µl
Elastase-Stammlösung 1 µg/µl		
1,00 mg ad 1,00 ml	Elastase Wasser	1 µg/µl
Elastase-Lösung 0,1 µg/µl		
100 µl 900 µl	Elastase-Stammlösung 1 µg/µl Wasser	0,1 µg/µl
Trypsin-Lösung 0,1 µg/µl		
20 µg 200 µl	Trypsin 1 mM Salzsäure	0,1 µg/µl

Für den In-Lösung-Verdau von Membranproteinen mit Trypsin wird laut Produktinformation eine finale Konzentration von 0,05 % ProteaseMAX® empfohlen [117]. Diese ProteaseMAX®-Konzentration wurde für den Verdau von P-gp mit Trypsin, Chymotrypsin und Elastase übernommen.

Der Verdau von P-gp mit den drei Enzymen erfolgte in Anlehnung an das Standard-Protokoll in der Produktinformation von ProteaseMAX® [117]. Zuerst wurde eine 1 %ige Stammlösung von ProteaseMAX® in frisch zubereitetem 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 8 hergestellt und auf Eis gelagert. Aus dieser 1 %igen Stammlösung wurden dann durch Verdünnung im Verhältnis 1 : 5 mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer 100 µl einer 0,2 %igen ProteaseMAX®-Lösung hergestellt und ebenfalls auf Eis aufbewahrt. Die verbleibende 1 %ige ProteaseMAX®-Stammlösung wurde nachfolgend aliquotiert und bei - 20 °C eingefroren. Im Anschluss daran wurden pro Reaktionsansatz 5 µl aufgereinigtes P-gp (5,7 µg) in 20 µl 0,2 %iger ProteaseMAX®-Lösung unter Vortexen solubilisiert. Darauffolgend wurden 71,15 µl des jeweiligen Verdau-Puffers hinzugefügt (50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 8 für Trypsin; 100 mM Tris-HCl / 10 mM Calciumchlorid pH 7,8 für Chymotrypsin; 50 mM Tris-HCl pH 9 für Elastase). Vor Zugabe der jeweiligen Enzym-Lösung wurde allen drei Reaktionsansätzen noch 1 µl 1 %ige ProteaseMAX®-Stammlösung hinzugefügt und gut durchmischt. Damit betrug die finale Gesamtkonzentration von ProteaseMAX® bei einem Endvolumen von 100 µl pro Verdau 0,05 %. In der Folge wurden die jeweiligen Enzym-Lösungen wie in Tabelle 3.17 beschrieben hergestellt und entsprechend einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 dem Verdauansatz zugegeben. Der Verdau von P-gp erfolgte anschließend beim jeweiligen Temperatur-Optimum des Enzyms (37 °C oder 25 °C) für 3 h unter Schütteln. Danach wurde der Verdau durch 10 minütiges Erhitzen bei 95 °C gestoppt, gefolgt vom Abbau des ProteaseMAX® durch Zugabe von 0,5 % Trifluoressigsäure und 15 minütige Inkubation bei 37 °C. Abschließend wurden die erhaltenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und bei - 20 °C gelagert.

3.3 Photoaffinitätsmarkierungen von P-Glykoprotein

Die Photoaffinitätsmarkierung wurde vor über 50 Jahren von Westheimer und Mitarbeitern [118,119] entwickelt und stellt eine Technik zur Lokalisation von Bindungsstellen in einem Rezeptorprotein dar. Die Voraussetzung für die Durchführung von so genannten „Photoaffinity Labeling“-Experimenten sind dabei Liganden, die ein photoaktivierbares Strukturelement, das „Photophor“, besitzen. Geeignete, durch UV-Licht aktivierbare Strukturelemente sind beispielsweise Azide, Diazirine und Benzophenone. Nach Ausbildung des Bindungsgleichgewichts lassen sich diese funktionellen Gruppen durch Bestrahlung mit UV-Licht unter Absorption von Lichtquanten (Photonen) in reaktive Spezies überführen. Als reaktive Übergangszustände entstehen Nitrene, Carbene und Diradikale, die auf unterschiedliche Art und Weise mit dem Peptid-Rückgrat oder den Aminosäure-Seitenketten des Rezeptorproteins reagieren können. Alle drei gebildeten Zwischenzustände repräsentieren Elektrophile und es kommt somit bevorzugt zu Insertions- bzw. Additions-Reaktionen mit Nukleophilen. Die wichtigsten der für Azide und Benzophenone charakteristischen Reaktionen sind in den beiden nachfolgenden Abbildungen beschrieben.

Die Bildung der jeweiligen Endprodukte bringt demnach eine irreversible, kovalente Verknüpfung des Liganden mit dem Zielprotein mit sich. Erfolgt diese Verknüpfung von Ligand und Rezeptorprotein schneller als die Dissoziation des Ligand-Rezeptor-Komplexes, kommt es bevorzugt im Bereich der Bindungsstelle zur Ausbildung der Bindung und somit zu einer spezifischen Bindung. Im Anschluss daran kann das Zielprotein mit verschiedenen Spaltungs-Reagenzien proteolytisch abgebaut werden. In Abhängigkeit vom verwendeten Enzym ergeben sich charakteristische Peptidmuster, je nach der Präferenz für bestimmte Aminosäuren. Das entstandene Peptidgemisch wird in der Folge mit einer chromatographischen Methode entsalzt bzw. fraktioniert und die Masse der einzelnen Peptide dann massenspektrometrisch durch Messung des Verhältnisses von Masse zu Ladung bestimmt. Durch Vergleich der experimentell erhaltenen mit den theoretisch zu erwartenden Peptiden bzw. durch Vergleich mit den Peptiden einer ohne Photoligand bestrahlten Kontrolle, lassen sich erfolgreich markierte Peptide durch eine Massenzunahme um genau das Molekulargewicht des eingesetzten Photoliganden identifizieren. Auf diese Weise können Bindungsstellen innerhalb der

Primärstruktur des Zielproteins detektiert werden.

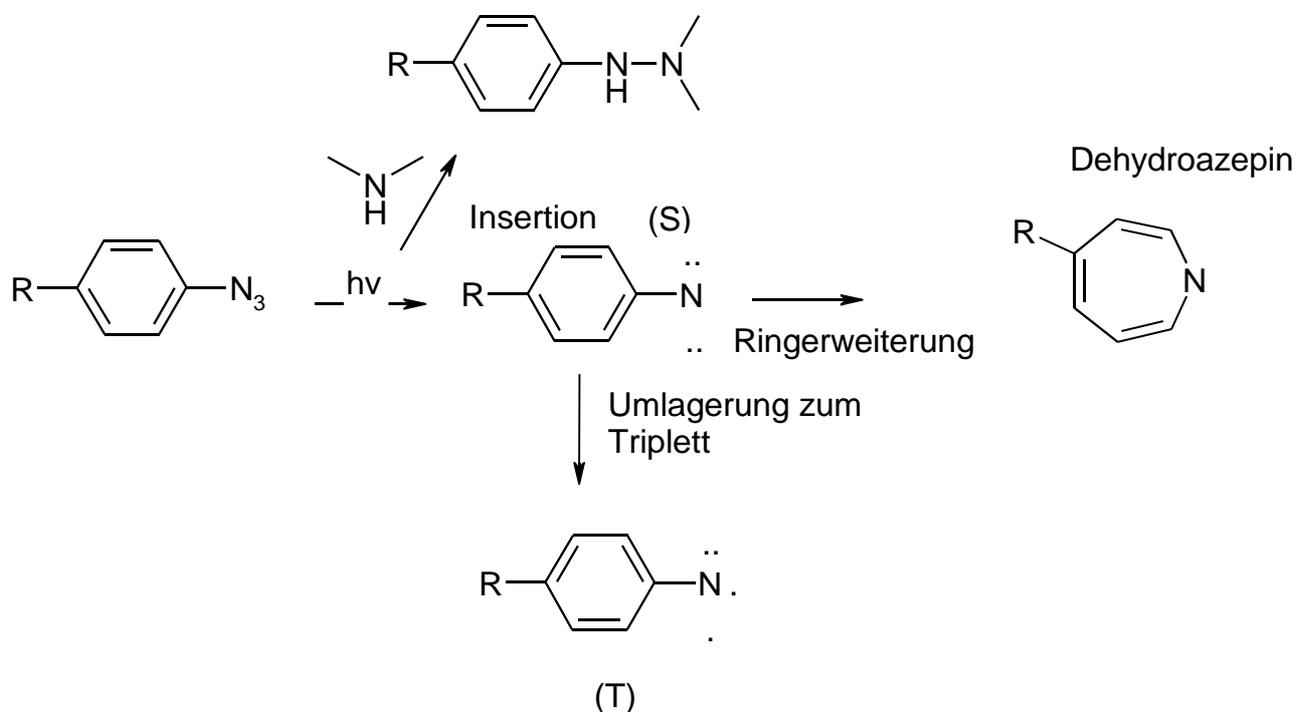


Abb. 3.1: Reaktionsmechanismus von Aziden (abgewandelt nach [120]). Durch die Bestrahlung mit UV-Licht kommt es zur Abspaltung von elementarem Stickstoff und Ausbildung eines Singulett-Nitrens. Dieses kann unter Radikalbildung aus einer N-H-Bindung ein Wasserstoffatom abstrahieren und nachfolgend mit dem dadurch ebenfalls gebildeten Peptidradikal unter Ausbildung einer N-N-Bindung rekombinieren. Weitere unerwünschte Reaktionswege sind die Umlagerung zum Triplett-Nitren bzw. die Ringerweiterung zum Dehydroazepin.

Das Benzophenon-Photophor hat gegenüber den Aziden und Diazirinen einige Vorteile. Zum einen sind Benzophenon-Gruppen bisweilen Teilstrukturen von Liganden, besitzen also eine „intrinsische Photoaktivierbarkeit“, während Azide und Diazirine oft nachträglich an bekannte Liganden gekoppelt werden müssen. Des weiteren zeichnen sich Benzophenone durch eine höhere chemische Stabilität und verminderte Lichtempfindlichkeit aus und sie können bereits mit langwelligem UV-Licht zwischen 350 und 370 nm aktiviert werden, wodurch eine wesentlich geringere Strahlenschädigung des Proteins gewährleistet ist.

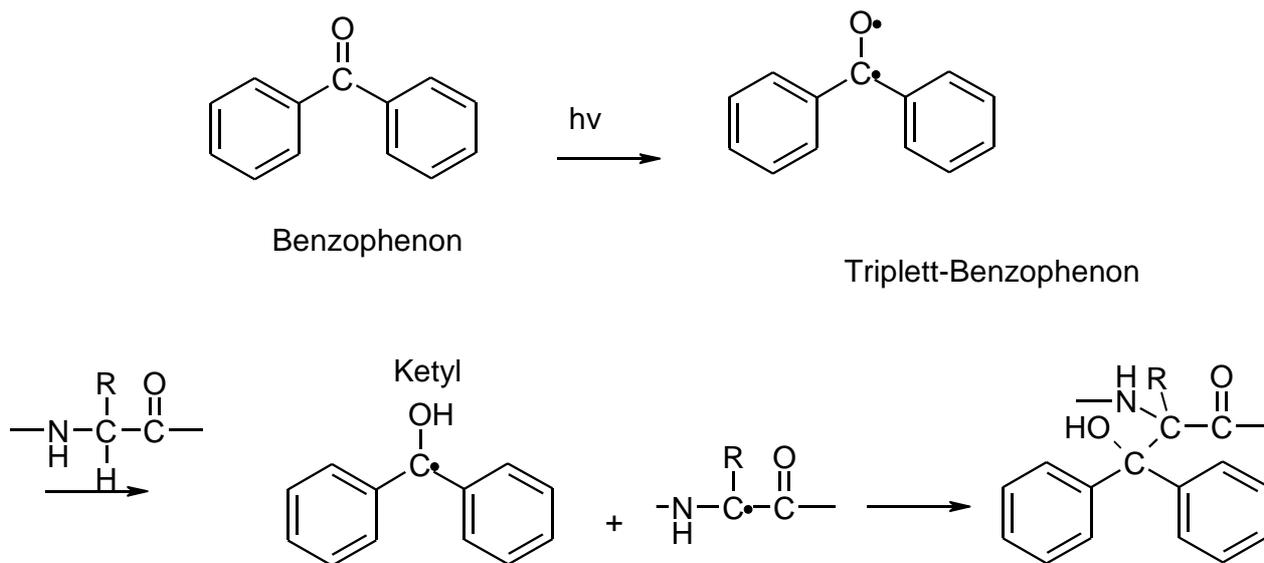


Abb. 3.2: Reaktionsmechanismus von Benzophenonen (abgewandelt nach [120, 121]). Die Absorption eines Photons führt zur Anregung eines Elektrons in den freien Elektronenpaaren des Sauerstoffs und in der Folge zu einem „ $n\pi^*$ -Übergang“. Hierbei wird ein Elektron von einem n -Orbital in ein antibindendes π^* -Orbital übertragen. In diesem angeregten Zustand liegen zwei ungepaarte Elektronen vor und das Photophor besitzt dadurch diradikalischen Charakter. Das unvollständig besetzte n -Orbital der Carbonylgruppe reagiert als Elektrophil mit C-H-Bindungen und es kommt durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms zur Ausbildung eines Ketyl- und Alkylradikals. Die beiden Radikale rekombinieren abschließend unter Ausbildung einer C-C-Bindung zum benzpinacolartigen Endprodukt.

Aus den genannten Gründen sollten für die Photoaffinitätsmarkierung von P-gp Liganden mit Benzophenon-Photophor verwendet werden.

Zuvor wurde jedoch zur Validierung der von Dr. Jens Meyer im Rahmen seiner Dissertation etablierten Methode für die Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente ein photoaktiverbares ATP-Analogon, das 8-Azido-ATP, eingesetzt. Dieser Photoligand bindet laut Literatur im Bereich der ATP-Bindungsstelle von P-gp [122, 123, 124], so dass die Übertragbarkeit und Anwendbarkeit der Methode auf das verwendete Testsystem überprüft werden konnte.

3.3.1 Photoaffinity Labeling mit 8-Azido-ATP

Das Adenosintriphosphat (ATP)-Analogon 8-Azido-ATP beinhaltet als photoaktivierbares Strukturelement eine Azid-Gruppe in Position 8 des Adenin-Grundgerüsts. Das Molekulargewicht der freien Säure beträgt etwa 548 g/mol und das UV-Absorptionsmaximum λ_{\max} liegt in einer wässrigen Lösung von pH 6 bei 281 nm. Die Struktur von 8-Azido-ATP ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

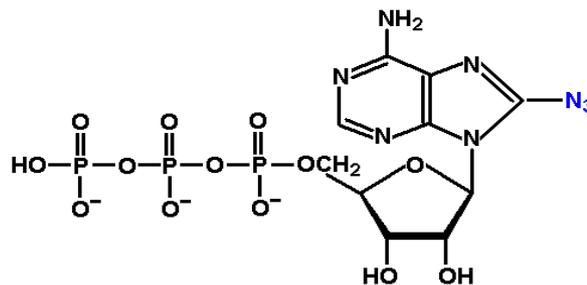


Abb. 3.3: Struktur von 8-Azido-ATP

Die Photoaffinitätsmarkierung von P-gp mit 8-Azido-ATP wurde in Anlehnung an ein von Dr. Jens Meyer etabliertes Protokoll [125] durchgeführt und an einigen Stellen modifiziert. Das 8-Azido-ATP wurde in Form einer 10 mM wässrigen Stammlösung von der Firma Biolog bezogen, aliquotiert und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der für das Photolabeling-Experiment verwendete Puffer wurde entsprechend einer Vorschrift von Sauna et al. [124] hergestellt und ist in Tabelle 3.18 beschrieben.

In zwei Quarzröhrchen von 100 μl Volumen wurden mit einer 100 μl Hamiltonspritze 22 μl (Probe) bzw. 25 μl (Kontrolle) Photolabeling-Puffer vorgelegt. Anschließend wurden mit einer 10 μl Hamiltonspritze jeweils 5 μl P-gp-Proteoliposomen zugegeben und mit Hilfe eines Mikrorührfisches vermischt. Nachfolgend wurde in eines der beiden Quarzröhrchen (Probe) noch 3 μl 10 mM 8-Azido-ATP-Stammlösung pipettiert und gemischt, so dass für Probe und Kontrolle ein Endvolumen von 30 μl resultierte. Die finale Konzentration von 8-Azido-ATP betrug somit 1 mM, was genau dem K_m -Wert entspricht. Probe und Kontrolle wurden daraufhin für 10 min in der Dunkelheit unter Eiskühlung und Rühren auf dem Magnetrührer inkubiert. Im Anschluss daran wurden die weiterhin eisgekühlte Probe und

3.3.1 Photoaffinity Labeling mit 8-Azido-ATP

Kontrolle in einem UV-Crosslinker bei zwei verschiedenen Wellenlängen $\lambda = 302 \text{ nm}$ und $\lambda = 365 \text{ nm}$ für eine definierte Zeitspanne (3; 6; 9; 12 min) bestrahlt. Die kürzerwellige Lichtquelle wurde gewählt, weil in einem zuvor aufgenommenen UV-Spektrum von 8-Azido-ATP die Absorption bei 365 nm nur marginal vorhanden war, bei 302 nm dagegen eine deutliche Absorption stattfand. Nach Beendigung der Bestrahlung wurden Probe und Kontrolle mit einer 10 μl Hamiltonspritze jeweils in ein 0,5 ml LoBind® Eppendorf-Gefäß überführt, mit 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 8 und Trypsin-Lösung ($c = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) entsprechend einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 versetzt und für 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde darauffolgend durch 10 minütiges Erhitzen bei 95 °C inaktiviert, die entstandenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und bis zur massenspektrometrischen Analyse bei - 20 °C gelagert.

Tab. 3.18: Photolabeling-Puffer nach Sauna et al. [124].

Natriumazid-Stammlösung 100 mM		
6,5 mg ad 1,0 ml	Natriumazid Wasser	100 mmol/l
Dithiothreitol-Stammlösung 1 M		
154,3 mg ad 1,0 ml	Dithiothreitol (DTT) Wasser	1 mol/l
Photolabeling-Puffer (ATPase Assay Buffer)		pH 6,8
108,6 mg	2-Morpholinoethansulfonsäure Natriumsalz	50 mmol/l
37,3 mg	Kaliumchlorid	50 mmol/l
7,6 mg	EGTA	2 mmol/l
20,3 mg	Magnesiumchlorid-Hexahydrat	10 mmol/l
7,3 mg	Ouabain	1 mmol/l
500 μl	Natriumazid-Stammlösung 100 mM *	5 mmol/l
20 μl	DTT-Stammlösung 1 M *	2 mmol/l
9,48 ml	Wasser	

Die Feststoffe wurden in einen 15 ml Falcon eingewogen und unter Vortexen in ca. 7 ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mittels pH-Meter überprüft und gegebenenfalls mit Salzsäure bzw. Natronlauge auf 6,8 eingestellt. Abschließend wurde das restliche Wasser hinzugegeben und die Pufferlösung bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt. Die mit einem * gekennzeichneten Bestandteile wurden erst kurz vor Gebrauch zugefügt.

Bei 8-Azido-ATP als Photoligand ist im Hinblick auf die Probenvorbereitung für die massenspektrometrische Analyse und die Massenspektrometrie selbst die Besonderheit zu beachten, dass es sich bei der Verbindung um ein Triphosphat mit hoher negativer Eigenladung handelt. Diese Eigenschaft bringt es mit sich, dass man das Molekül im üblicherweise für die Massenspektrometrie genutzten „positive mode“ der Ionisierung nur schlecht detektieren kann und somit in den weniger gebräuchlichen „negative mode“ der Ionisierung wechseln sollte. Der „negative mode“ birgt den Nachteil, dass die Signalintensität im Vergleich zum „positive mode“ deutlich niedriger ist. Eine Möglichkeit, der herabgesetzten Signalintensität entgegenzuwirken, stellt die Technik der Phosphopeptid-Anreicherung mit Titandioxid dar. In der Literatur wird diese Technik auch als Metal Oxide Affinity Chromatography (MOAC) bezeichnet [126]. Hierbei werden Peptide, die Phosphatgruppen tragen (z. B. durch posttranslationale Modifikation) an mit Titandioxid beschichtete magnetische Kügelchen gebunden und dadurch angereichert. Treibende Kraft der Anreicherung ist die starke Wechselwirkung der positiv geladenen Titankationen mit den Phosphatgruppen. Die meisten anderen Peptide werden durch mehrmaliges Waschen entfernt, allerdings binden unmodifizierte Peptide, die einen hohen Anteil an den sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat besitzen, ebenfalls an die Titandioxid Beads. Da mit 8-Azido-ATP markierte Peptide ebenfalls negativ geladen sind, sollten sich diese durch die MOAC-Technik gleichfalls anreichern lassen.

Die Anreicherung wurde entsprechend einem Protokoll aus der Arbeitsgruppe von Dr. Sabine Metzger am BMFZ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt und ist im Folgenden beschrieben. Die verwendeten Lösungen sind Tabelle 3.19 zu entnehmen.

Als Erstes wurden fünf 0,5 ml LoBind® Eppendorf-Gefäße für die unterschiedlichen Fraktionen der MOAC beschriftet: 1) FT TiO₂ 2) W TiO₂ 3) Elu TiO₂ 4) FT R3 5) Elu R3. Anschließend wurden die Peptide in 100 µl Auftragspuffer aufgenommen und für 10 min auf dem Schüttler inkubiert. Nachfolgend wurde diese Peptid-Lösung mit 0,3 mg Titandioxid Beads vermischt, für 10 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert und mit der Tischzentrifuge zum Pelletieren der Titandioxid Beads 1 min zentrifugiert.

Tab. 3.19: Lösungen für die TiO₂-Anreicherung.

Auftragspuffer: 80 % ACN / 5 % TFA / 1 M Glykolsäure			
800 µl	Acetonitril 100 %		80 % (V/V)
50 µl	Trifluoressigsäure 100 %		5 % (V/V)
76,1 mg	Glykolsäure		1 mol/l
150 µl	Wasser		
Waschpuffer 1: 80 % ACN / 1 % TFA			
800 µl	Acetonitril 100 %		80 % (V/V)
10 µl	Trifluoressigsäure 100 %		1 % (V/V)
190 µl	Wasser		
Waschpuffer 2: 20 % ACN / 0,5 % TFA			
200 µl	Acetonitril 100 %		20 % (V/V)
5 µl	Trifluoressigsäure 100 %		0,5 % (V/V)
795 µl	Wasser		
Elutionspuffer: 1 % Ammoniak-Lösung pH 11,3			
40 µl	Konz. Ammoniak-Lösung 25 %		1 % (V/V)
960 µl	Wasser		
Elutionspuffer ESI-MS: 60 % MeOH / 5 % TFA			
600 µl	Methanol 100 %		60 % (V/V)
50 µl	Trifluoressigsäure 100 %		5 % (V/V)
350 µl	Wasser		
Trifluoressigsäure 100 %			
Ameisensäure 100 %			
Ameisensäure 0,1 %			
1 µl	Ameisensäure 100 %		0,1 % (V/V)
999 µl	Wasser		
Titandioxid Beads			
DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure) Matrix in 70 % Acetonitril / 1 % Phosphorsäure			

Daraufhin wurde der Überstand abgenommen und als Fraktion der „nicht gebundenen Peptide“ in das erste LoBind® Eppendorf-Gefäß FT TiO₂ überführt. Die Titandioxid Beads wurden im Anschluss daran mit 50 µl Auftragspuffer gewaschen, durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand abgenommen und im LoBind® Eppendorf-Gefäß FT TiO₂

gesammelt. Danach wurden die Titandioxid Beads mit 50 µl Waschpuffer 1 gewaschen, zentrifugiert und der Überstand als Waschfraktion in das zweite LoBind® Eppendorf-Gefäß W TiO₂ überführt. Daran schloss sich ein zweiter Waschschriff mit 50 µl Waschpuffer 2 an und der Überstand wurde nach Zentrifugation und Pelletieren der Titandioxid Beads ebenfalls im LoBind® Eppendorf-Gefäß W TiO₂ gesammelt. Die Titandioxid Beads wurden in der Folge für 1 - 2 min in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Daran anschließend wurden die Phosphopeptide mit 45 µl Elutionspuffer für 10 min bei RT unter Schütteln von den Titandioxid Beads eluiert.

Während der Elutionszeit der Phosphopeptide wurde der R3-Tip vorbereitet. Hierfür wurden 1 - 3 cm Matrix auf einen Geloader Tip geladen und mit 50 µl 0,1 % Ameisensäure äquilibriert. Nach Ablauf der 10 minütigen Elutionszeit wurde der Elutionsansatz für 1 min zentrifugiert, der Überstand ohne Mitnahme von Titandioxid Beads abgenommen und in das dritte LoBind® Eppendorf-Gefäß Elu TiO₂ überführt. Nachfolgend wurden die Titandioxid Beads nochmals mit 20 µl frischem Elutionspuffer für 10 min bei RT unter Schütteln inkubiert und der Überstand nach Zentrifugation und Pelletieren der Beads ebenfalls in das LoBind® Eppendorf-Gefäß Elu TiO₂ pipettiert. Die vereinigten Überstände Elu TiO₂ wurden daraufhin mit einem Volumen an Trifluoressigsäure 100 % angesäuert, so dass eine finale Konzentration von 10 % Trifluoressigsäure resultierte. Diese Lösung wurde anschließend sukzessive auf den R3-Tip geladen und der Durchfluss als „ungebundene Fraktion“ im vierten LoBind® Eppendorf-Gefäß FT R3 gesammelt. Der R3-Tip wurde in der Folge mit 50 µl 0,1 % Ameisensäure gewaschen und die Waschfraktion ebenfalls in das LoBind® Eppendorf-Gefäß FT R3 überführt. Die Phosphopeptide wurden im Anschluss daran mit 45 µl Elutionspuffer ESI-MS vom R3-Tip in das fünfte LoBind® Eppendorf-Gefäß Elu R3 eluiert. Zusätzlich wurde eine zweite Elution für die Analyse mittels MALDI-TOF durchgeführt und das Eluat mit 1,5 - 2 µl 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) / 1 % Phosphorsäure direkt auf dem Target gemischt. Die gesammelten Fraktionen wurden abschließend in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und bei - 20 °C eingefroren.

3.3.2 Photoaffinity Labeling mit 2,4-Dihydroxybenzophenon

Die Grundlage für eine Photoaffinitätsmarkierung von P-gp mit 2,4-Dihydroxybenzophenon lieferte eine Publikation von Rancon et al. [127], in der postuliert wird, dass die Verbindung mit einem K_D -Wert von $1,15 \pm 0,36 \mu\text{M}$ mit der ATP-Bindungsstelle der Nukleotidbindungsdomäne (NBD) 2 interagiert. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit durch Photolabeling von P-gp mit 2,4-Dihydroxybenzophenon überprüft. Die Struktur von 2,4-Dihydroxybenzophenon ist in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 3.4) dargestellt. Wichtig für die Affinität zu P-gp sind laut der Veröffentlichung die Carbonylgruppe, die beiden Hydroxylgruppen in Position 2 und 4 und entweder keine Substitution des B-Ringes oder eine Methoxysubstitution in Position 4' [127].

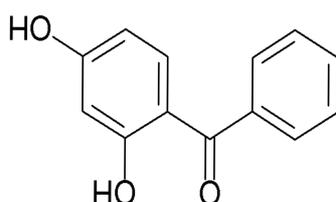


Abb. 3.4: Struktur von 2,4-Dihydroxybenzophenon

Das Photolabeling-Experiment mit 2,4-Dihydroxybenzophenon wurde mit UV-Licht zweier verschiedener Wellenlängen $\lambda = 365 \text{ nm}$ und $\lambda = 302 \text{ nm}$ durchgeführt. Die Absorption der Benzophenon-Partialstruktur ist bei beiden Wellenlängen ausreichend für eine Anregung des Carbonylsauerstoffs zum Diradikal. Die Bestrahlungsdauer wurde bei Einsatz der längerwelligen Lichtquelle auf 15 min festgesetzt, bei Verwendung des kürzerwelligen UV-Lichtes wurde zur Vermeidung von Proteinschäden eine kürzere Bestrahlungsdauer von 5 min gewählt. Auf der Basis des in der Publikation bestimmten K_D -Wertes von $1,15 \pm 0,36 \mu\text{M}$ wurden für die Photoaffinitätsmarkierung von P-gp zwei unterschiedliche Endkonzentrationen von $10 \mu\text{M}$ und 1 mM 2,4-Dihydroxybenzophenon eingesetzt. Als Kontrolle dienten Proteinproben, die ohne den Photoliganden mit der jeweiligen

3.3.2 Photoaffinity Labeling mit 2,4-Dihydroxybenzophenon

Lichtquelle über die entsprechende Zeit bestrahlt wurden. Erfolgreich markierte Peptide wurden nach enzymatischem Verdau mit Trypsin durch Vergleich der Übersichtsspektren von Kontrolle und Probe identifiziert und nachfolgend durch Aufnahme von MS/MS-Spektren sequenziert.

In 100 μ l Quarzröhrchen wurden 24 μ l (Probe) bzw. 25 μ l (Kontrolle) Markierungspuffer (10 mM Tris-HCl / 250 mM Saccharose pH 7,4) mit einer 100 μ l Hamiltonspritze vorgelegt. Nachfolgend wurden jeweils 5 μ l aufgereinigtes P-gp mittels 10 μ l Hamiltonspritze und ein Mikrorührfisch hinzugefügt und gut durchmischt. Im Anschluss daran wurden 30 mM und 300 μ M Stammlösungen von 2,4-Dihydroxybenzophenon in Dimethylsulfoxid (DMSO) laut Tabelle 3.20 hergestellt.

Tab. 3.20: Lösungen für das Photolabeling mit 2,4-Dihydroxybenzophenon.

Markierungspuffer: 10 mM Tris-HCl / 250 mM Saccharose pH 7,4		
12,1 mg	Tris	10 mmol/l
855,8 mg	Saccharose	250 mmol/l
ad 10,0 ml	Wasser	
2,4-Dihydroxybenzophenon-Stammlösung 30 mM		
6,57 mg	2,4-Dihydroxybenzophenon	30 mmol/l
ad 1,0 ml	Dimethylsulfoxid (DMSO)	
2,4-Dihydroxybenzophenon-Stammlösung 300 μ M		
10 μ l	2,4-Dihydroxybenzophenon-Stammlösung 30 mM	300 μ mol/l
990 μ l	Dimethylsulfoxid (DMSO)	

Für eine Endkonzentration von 10 μ M 2,4-Dihydroxybenzophenon wurde daraufhin 1 μ l der 300 μ M Stammlösung, für eine finale Konzentration von 1 mM 2,4-Dihydroxybenzophenon 1 μ l der 30 mM Stammlösung in das Probenquarzröhrchen pipettiert. Proben und Kontrollen wurden in der Folge 30 min bei RT unter Rühren inkubiert, anschließend 15 min auf Eis gekühlt und darauf unter andauerndem Rühren und Eiskühlung 15 min bei 365 nm bzw. 5 min bei 302 nm im UV-Crosslinker bestrahlt. Danach wurden die Ansätze mittels 100 μ l Hamiltonspritze in LoBind® Eppendorf-Gefäße

überführt, mit 67,2 μl 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 8 und 2,85 μl Trypsin-Lösung ($c = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) entsprechend einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 versetzt und 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde nachfolgend durch 10 minütiges Erhitzen bei 95 °C gestoppt, die Peptide in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und bis zur massenspektrometrischen Analyse bei - 20 °C aufbewahrt.

3.3.3 Photoaffinity Labeling mit H15 und H19

Die Photoaffinitätsmarkierung von P-gp mit dem Inhibitor H19 wurde bereits von Dr. Jens Meyer im Rahmen seiner Dissertation erfolgreich durchgeführt [125]. Allerdings erfolgte die Identifizierung der markierten Peptide lediglich nach tryptischem In-Gel-Verdau mittels MALDI-TOF auf der Ebene von Übersichtsspektren und sogenannten „Massen-Fits“. Dabei werden die experimentell erhaltenen Peptid-Massen mit den abhängig vom verwendeten Enzym theoretisch möglichen Peptid-Massen unter Berücksichtigung der Massenzunahme um die Masse des jeweiligen eingesetzten Photoliganden verglichen. Eine Identifizierung der gelabelten Peptide auf der Ebene der Aminosäuresequenz mittels Aufnahme von MS/MS-Spektren wurde im Rahmen der genannten Dissertation nicht durchgeführt. Aus diesem Grund sollte in der vorliegenden Arbeit eine Photoaffinitätsmarkierung von P-gp mit dem Photoliganden H19 nochmals erfolgen und die durch den Verdau mit der Protease Chymotrypsin erhaltenen Peptide nachfolgend mittels Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) analysiert werden. Die resultierenden Ergebnisse sollten anschließend mit den von Dr. Jens Meyer erzielten Ergebnissen verglichen werden. Zusätzlich zu der Verbindung H19 sollte noch das mit H19 strukturell verwandte Phenothiazin-Derivat H15 als Photoligand von P-gp verwendet werden. Beide Verbindungen beinhalten als Photophor eine Benzophenon-Partialstruktur und lassen sich somit bei UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 365 \text{ nm}$ anregen. Die Strukturen der beiden P-gp-Inhibitoren sind in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 3.5) dargestellt. H15 und H19 wurden von Dr. Matthias Schmidt (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie) zur Verfügung gestellt und stellen Phenothiazin-Derivate dar.

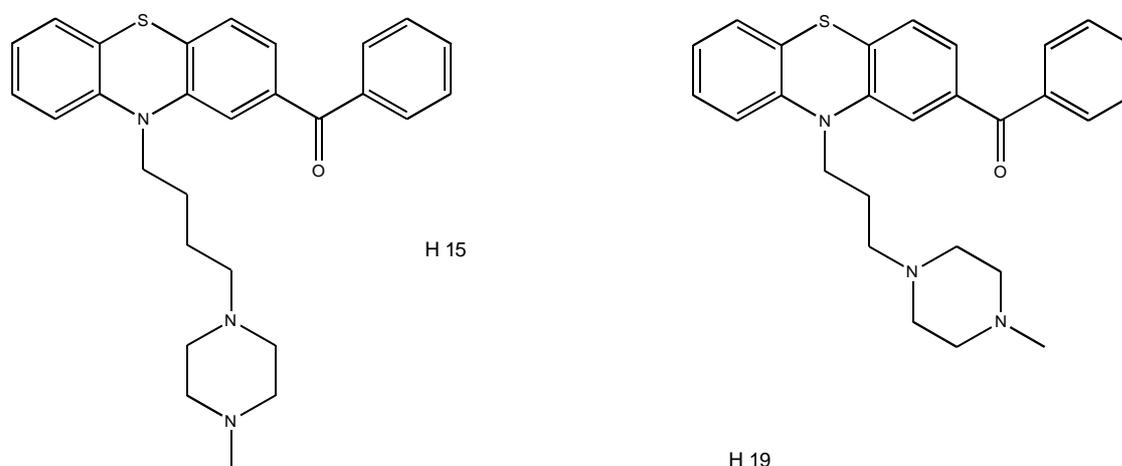


Abb. 3.5: Strukturformeln von H15 und H19

Für die beiden Photoliganden wurde in Anlehnung an die Dissertation von Dr. Jens Meyer eine Endkonzentration von jeweils 10 μM gewählt. Die Bestrahlungsdauer bei 365 nm wurde auf 20 min festgesetzt. Als Kontrolle dienten wiederum Proteinproben, die in Abwesenheit der Photoliganden bestrahlt wurden. Markierte Peptide wurden nach enzymatischem Verdau mit Chymotrypsin durch Vergleich der Übersichtsspektren von Kontrolle und Probe identifiziert.

In 100 μl Quarzröhrchen wurden 24 μl (Probe) bzw. 25 μl (Kontrolle) Markierungspuffer (10 mM Tris-HCl / 250 mM Saccharose pH 7,4) mit einer 100 μl Hamiltonspritze vorgelegt. Nachfolgend wurden jeweils 5 μl aufgereinigtes P-gp mittels 10 μl Hamiltonspritze und ein Mikrorührfisch hinzugefügt und gut durchmischt. Im Anschluss daran wurden 3 mM und 300 μM Stammlösungen von H15 und H19 in Dimethylsulfoxid laut Tabelle 3.21 hergestellt. Für eine Endkonzentration von 10 μM Photoligand-Lösung wurde daraufhin 1 μl der 300 μM Stammlösung in das Probenquarzröhrchen pipettiert. Proben und Kontrollen wurden in der Folge 30 min bei RT unter Rühren inkubiert, 15 min auf Eis gekühlt und anschließend unter andauerndem Rühren und Eiskühlung 20 min bei 365 nm im UV-Crosslinker bestrahlt. Danach wurden Proben und Kontrollen mittels 100 μl

3.3.3 Photoaffinity Labeling mit H15 und H19

Hamiltonspritze in LoBind® Eppendorf-Gefäße überführt und mit dem Spaltungs-Reagenz Chymotrypsin proteolytisch gespalten. Einzelheiten des Verbaus sind Kapitel 3.2.2.2 zu entnehmen. Nach erfolgter Spaltung wurden die erhaltenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene eingeeengt und bis zur massenspektrometrischen Analyse bei - 20 °C gelagert.

Tab. 3.21: Lösungen für das Photolabeling mit H15 und H19.

Markierungspuffer: 10 mM Tris-HCl / 250 mM Saccharose pH 7,4			
12,1 mg	Tris		10 mmol/l
855,8 mg	Saccharose		250 mmol/l
ad 10,0 ml	Wasser		
H15-Stammlösung 3mM			
1,37 mg	H15		3 mmol/l
ad 1,0 ml	Dimethylsulfoxid		
H15-Stammlösung 300 µM			
100 µl	H15-Stammlösung 3mM		300 µmol/l
900 µl	Dimethylsulfoxid		
H19-Stammlösung 3mM			
1,33 mg	H19		3 mmol/l
ad 1,0 ml	Dimethylsulfoxid		
H19-Stammlösung 300 µM			
100 µl	H19-Stammlösung 3mM		300 µmol/l
900 µl	Dimethylsulfoxid		

3.4 Massenspektrometrie

3.4.1 Theoretische Grundlagen der Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie (MS) stellt eine Analysetechnik zur Bestimmung des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) von Ionen im Hochvakuum dar. Ende der Achtzigerjahre des letzten Jahrhunderts führten die Arbeiten von John B. Fenn (USA) sowie Franz Hillenkamp, Michael Karas (Deutschland) und Koichi Tanaka (Japan) zur Entwicklung der Elektrospray-Ionisation (ESI) bzw. zur Entdeckung und Anwendung der Matrixassistenten Laserdesorption/Ionisation (MALDI). Diese „sanften“ Ionisationsmethoden machten die Überführung von intakten biologischen Makromolekülen wie Proteinen, komplexen Kohlenhydraten und mehrzähligen Nukleinsäuren in die Gasphase und somit ihre massenspektrometrische Analyse erst möglich. Fenn und Tanaka erhielten im Jahre 2002 für ihre methodischen Entwicklungen zur Identifizierung von biologischen Makromolekülen den Nobelpreis für Chemie. Beide Verfahren sind hinsichtlich ihrer spezifischen Anforderungen und Stärken komplementär und dominieren zusammen die Massenspektrometrie biologischer Systeme [129].

Mittels MALDI- und ESI-MS kann die Masse von biologischen Molekülen sehr genau bestimmt und dadurch ihre chemische Zusammensetzung verifiziert oder falsifiziert werden. Beispielsweise können posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen und Glykosylierungen bei bekannter Aminosäuresequenz aus der Differenz der berechneten und gemessenen Masse eines Proteins detektiert werden. Des Weiteren können unbekannte Proteine nach proteolytischer Spaltung, basierend auf der exakten Masse der entstandenen Peptide, durch Abgleich mit einer Sequenzdatenbank identifiziert werden. Kombiniert man zwei Massenanalysatoren miteinander, ergeben sich daraus weitergehende Möglichkeiten, zum Beispiel können im Anschluss an eine erste Massenanalyse ausgewählte Moleküle im Massenspektrometer fragmentiert und ihre Zerfallsprodukte nachfolgend analysiert werden (Tandem-MS). Dies macht es möglich, die Struktur neuer, bisher unbekannter Moleküle aufzuklären oder diese Moleküle durch Abgleich mit Datenbanken sicher zu identifizieren [129].

Die Empfindlichkeit der heutigen massenspektrometrischen Verfahren hängt von der Molekülmasse der zu analysierenden Strukturen ab und liegt für Peptide im

3.4.1 Theoretische Grundlagen der Massenspektrometrie

Subfemtombereich. Generell nimmt die Nachweisgrenze, unabhängig von der Substanzklasse, mit steigender Molekülmasse zu. Für kleine Proteine (< 20 kDa) beträgt diese Grenze 10 - 100 fmol, für mittelgroße Proteine werden 50 - 500 fmol benötigt und für große Proteine (> 50 kDa) 0,5 - 5 pmol [129].

Im einfachsten Fall setzt sich ein Massenspektrometer aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor zusammen. In der Ionenquelle werden aus der zu analysierenden Substanzprobe Ionen erzeugt bzw. freigesetzt, der Massenanalysator trennt die Ionen hinsichtlich des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) auf und der Detektor misst den erzeugten Ionenstrom. Als Ergebnis wird ein Massenspektrum erzeugt, in dem die relativen Häufigkeiten der Ionen gegen das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) aufgetragen sind [129].

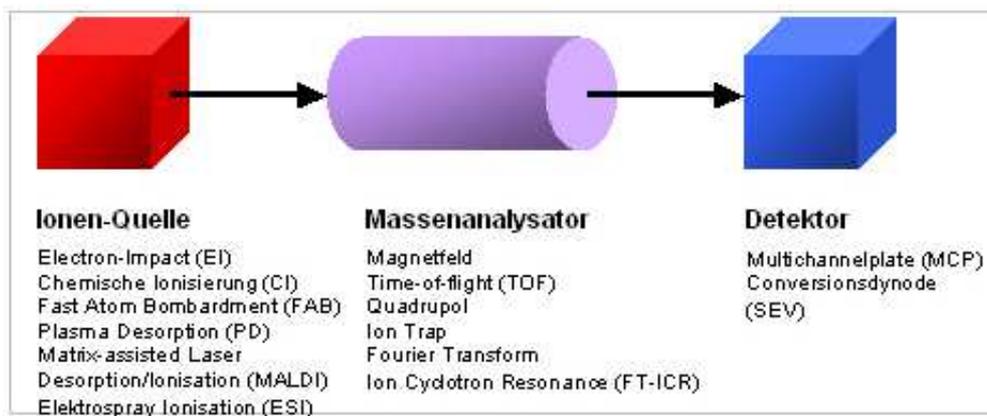


Abb. 3.6: Aufbau eines Massenspektrometers

Im Folgenden werden die einzelnen Schritte Ionisation, Massenanalyse und Ionendetektion kurz vorgestellt und die dabei verwendeten Techniken erläutert. Da in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit der ESI-MS gearbeitet wurde, wird diese Technik nachfolgend etwas detaillierter behandelt.

Ionisation

Die Ionisierung der Analytmoleküle in einem Massenspektrometer kann generell durch die Aufnahme bzw. den Verlust eines Elektrons, Protons oder Kations erfolgen. Erreicht wird dies beispielsweise durch Beschuss der Probe mit Elektronen (Elektronenstoß-Ionisation), durch reaktive Ionen, die ihre Ladung auf die Probenmoleküle übertragen (chemische Ionisation) oder durch Beschuss der Probe mit schnellen Atomen (fast atom bombardment), Ionen (Sekundärionen-Ionisation) oder Photonen (Laserdesorption/Ionisation). Für polare, nicht flüchtige und allgemein für größere biologische Moleküle sind die Ionisierung der gelösten Probe mittels ESI bzw. aus der festen Phase mittels MALDI die Methoden der Wahl [129].

ESI

Der Begriff „Elektrospray“ beschreibt die Dispersion einer Flüssigkeit in sehr viele kleine geladene Tröpfchen in einem elektrostatischen Feld, wobei eine definierte Ionisation und komplette Desolvatisierung der versprühten Analytmoleküle erfolgt [129]. „Desolvatisierung“ bedeutet an dieser Stelle „Transfer von Ionen aus der Lösung in die Gasphase bei Atmosphärendruck im elektrischen Feld“. Dieser Prozess lässt sich formal in vier Schritte unterteilen:

- 1) Bildung kleiner geladener Tröpfchen aus Elektrolyten
- 2) kontinuierlicher Lösungsmittelverlust dieser Tröpfchen durch Verdampfen, wobei die Ladungsdichte an der Tröpfchenoberfläche zunimmt
- 3) wiederholter spontaner Zerfall der Tröpfchen in Mikrotröpfchen (Coulomb-Explosionen)
- 4) Desolvatisierung der Analytmoleküle beim Transfer in das Massenspektrometer

Der ESI-Prozess beginnt mit der kontinuierlichen Zuführung des gelösten Analyten an die

Spitze einer leitfähigen Kapillare (metallbeschichtete Glaskapillare, Stahlkapillare). Zwischen Kapillarspitze und Massenspektrometer wird ein elektrisches Feld angelegt, welches die Analytlösung durchdringt und zu einer Trennung der Ladungsträger führt. Bei positiver Ionisierung entspricht die Kapillare der Anode (Pluspol) und das Massenspektrometer der Kathode (Minuspole). Positive Ionen werden an die Flüssigkeitsoberfläche gezogen und negative Ionen entsprechend in die entgegengesetzte Richtung geschoben, bis das elektrische Feld innerhalb der Flüssigkeit durch Umverteilung negativer und positiver Ionen aufgehoben ist. Die an der Flüssigkeitsoberfläche angehäuften positiven Ionen werden weiter in Richtung Kathode gezogen, wodurch ein charakteristischer Flüssigkeitskonus (Taylor-Konus) entsteht, da die Oberflächenspannung der Flüssigkeit dem elektrischen Feld entgegenwirkt. Ist das elektrische Feld ausreichend hoch, bleibt der Konus stabil und sendet von seiner Spitze einen kontinuierlichen, filamentartigen Flüssigkeitsstrom von wenigen Mikrometern Durchmesser aus. Dieser wird in einiger Entfernung von der Anode instabil und zerfällt in winzige, aneinandergereihte Tröpfchen, deren Oberfläche mit positiven Ladungen angereichert ist. Da keine negativen Gegenladungen mehr vorhanden sind, liegt eine positive Nettoladung vor. Verantwortlich für die Ladungen in den Tröpfchen ist dabei die elektrophoretische Trennung der Ionen. Die im Massenspektrum beobachteten positiven Ionen sind stets die Ionen, die bereits in der Flüssigkeit vorhanden waren. Die Ladungsbilanz innerhalb der Ionenquelle ergibt sich aus der chemischen Oxidation an der positiven Elektrode und der Reduktion an der negativen Elektrode [129].

Die zuerst gebildeten Tröpfchen haben einen Durchmesser von wenigen Mikrometern sowie eine hohe Ladungsdichte und befinden sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, Größe und Ladung nahe an der Stabilitätsgrenze (Rayleigh-Limit). Diese wird durch die abstoßende Coulomb-Kraft gleicher Ladungen und die zusammenhaltende Oberflächenspannung des Lösungsmittels bestimmt. Durch Verdunstung des Lösungsmittels schrumpfen die Tröpfchen bei gleichbleibender Ladung Q , bis der Radius r das Rayleigh-Limit unterschreitet und sie durch Abstoßung gleichnamiger Ladungen in viele kleine Tröpfchen von wenigen Nanometern Durchmesser zerfallen (Coulomb-Explosionen) [129].

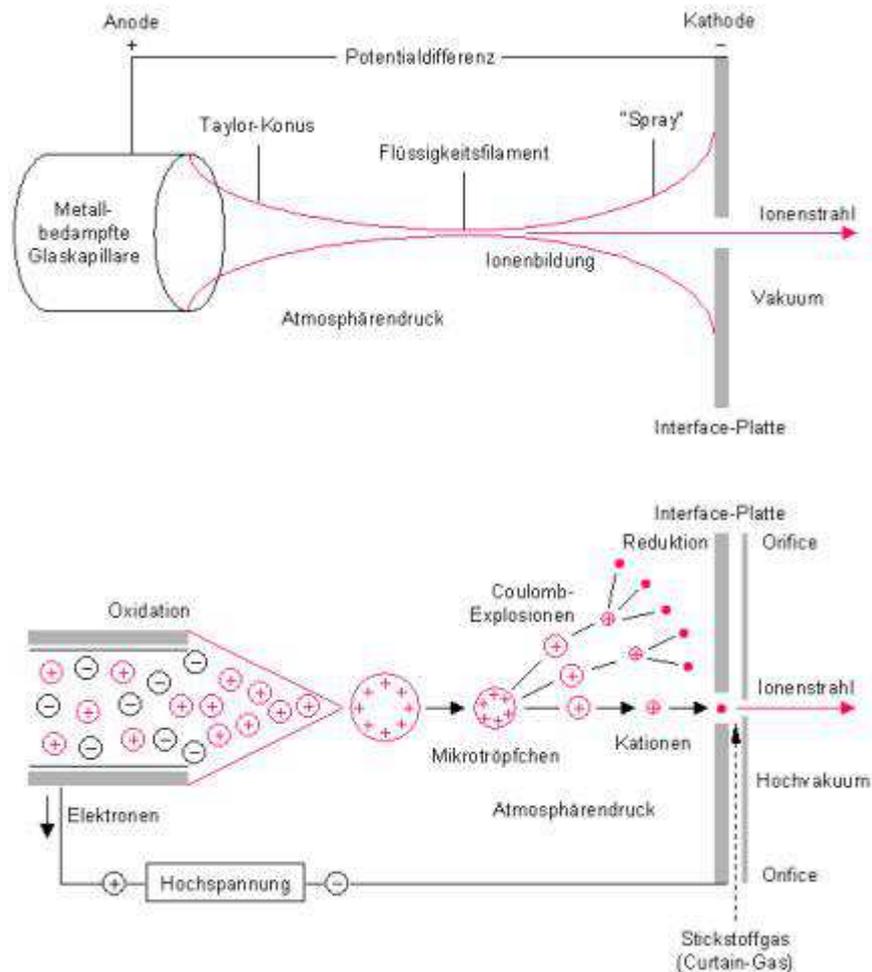


Abb. 3.7: Schematische Darstellung des makroskopischen und mikroskopischen ESI-Prozesses

Derzeit existieren zwei Modellvorstellungen, die den abschließenden Bildungsprozess der freien Gasphasenionen beschreiben. Die ältere stammt von Malcolm Dole, wird als „Modell des geladenen Rückstands“ bezeichnet und wurde später von Friedrich Röllgen zur „single ion in droplet theory“ ausgebaut. Kernthese dieses Modells ist, dass aus den primär gebildeten Tröpfchen durch eine Reihe aufeinanderfolgender Coulomb-Explosionen sehr kleine Tröpfchen entstehen, die nur noch ein einziges Analytmolekül enthalten.

Das zweite Modell wurde von J. Iribane und B. Thomson vorgeschlagen und als „Ionenemissionsmodell“ bezeichnet. Kernaussage dieser Theorie ist die direkte

Ionenemission aus hoch geladenen Tröpfchen, die noch viele Analytmoleküle enthalten. Oberhalb des Rayleigh-Limits werden freie Ionen in die Gasphase emittiert. Trotz Abnahme der Ladungen wird die Ionenemission durch kontinuierliche Abnahme des Tröpfchenradius infolge der Verdampfung des Lösungsmittels aufrechterhalten [129].

Die Elektrospray-Ionisation findet bei Atmosphärendruck statt, während die anschließende Analyse der freien Ionen im Hochvakuum erfolgt. Dies erfordert eine spezielle Schnittstelle (Interface) zur Gewährleistung des Übergangs der Ionen in den Massenanalysator. Hierbei steht der Ionisierungsraum über eine Mikroöffnung mit dem Massenspektrometer in Verbindung, durch die trockener, geheizter Stickstoff (curtain gas) in den Ionisierungsraum strömt. Der Stickstoff kollidiert mit den Molekülen des Elektrosprays, wodurch einerseits verhindert wird, dass eine hohe Zahl von Neutralteilchen ins Hochvakuum gesaugt und andererseits die Desolvatisierung der Ionen unterstützt wird [129].

Die Elektrosprayquelle besteht im Wesentlichen aus einer leitfähigen Kapillare, über die die Analytlösung kontinuierlich ins elektrische Feld injiziert wird und die gleichzeitig die Gegenelektrode zur Interfaceplatte für die Erzeugung der Potenzialdifferenz bildet. Empfindlichkeitsstudien haben ergeben, dass der Ionenstrom eher mit der Analytkonzentration korreliert als mit der pro Zeiteinheit versprühten Flüssigkeitsmenge [129]. Mit zunehmender Flussrate geht ein zunehmend größerer Anteil des Sprays im Ionisierungsraum verloren, während eine Reduktion der Flussrate eine Steigerung der Empfindlichkeit bei der massenspektrometrischen Analyse bewirkt. Aus diesen Gründen wurden in den letzten Jahren Nanoelektrosprayquellen entwickelt, die große Bedeutung bei der Online-Kopplung von ESI-MS- und Nano-HPLC-Systemen mit Flussraten von etwa 200 nl/min erlangt haben. Für die Analyse einzelner Proben können im Rahmen der „Offline-Nano-ESI“ 0,5 - 3 µl der Analytlösung auch direkt in die ESI-Kapillare injiziert werden. Hierbei befördert ein geringer Gasdruck die Probe kontinuierlich mit wenigen Nanolitern pro Minute ins elektrische Feld. Aufgrund der geringen Flussraten können entsprechend lange Messzeiten für kleine Probenmengen erreicht werden, was zur Optimierung von Messbedingungen und Akkumulation von Spektren schwacher Intensität von Vorteil sein kann. Ein Nachteil der feinen Kapillarspitzen ist die Gefahr der Verstopfung durch Mikropartikel oder Auskristallisieren des Analyten [129].

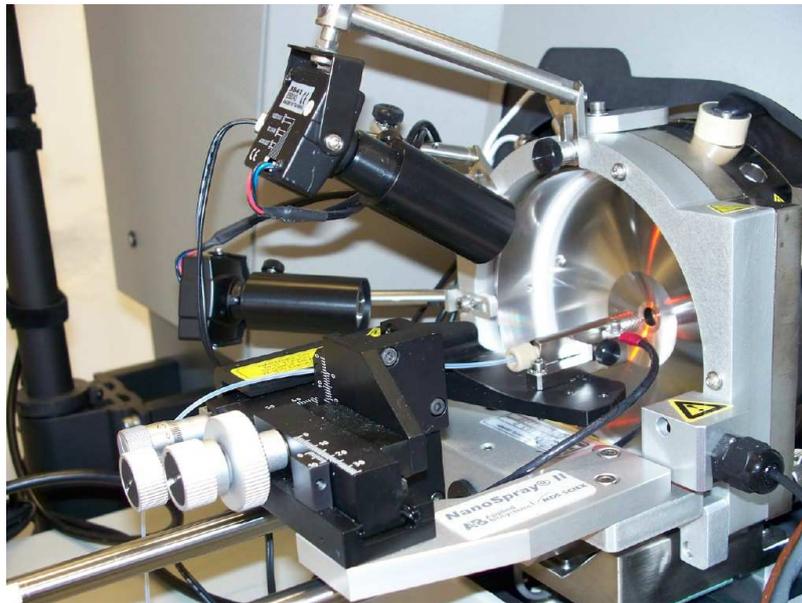


Abb. 3.8: Elektrosprayquelle

Die Bildung mehrfach geladener Ionen ist für den ESI-Prozess charakteristisch, im Massenspektrum beobachtet man für Peptide und Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend eine Serie von Ionensignalen mit einer Ladungsdifferenz von jeweils Eins, in der Regel durch Addition eines Protons im positiven Modus bzw. Subtraktion eines Protons im negativen Modus. Die Ladungsverteilung von Molekülonen hängt dabei von mehreren Faktoren ab: Mit zunehmender Masse und Anzahl basischer funktioneller Gruppen nimmt die mittlere Zahl von Ladungen zu, wobei dieser Effekt auch von der Zusammensetzung des Lösungsmittels abhängig ist [129]. Beispielsweise beobachtet man in sauren Puffersystemen, dass bei Peptiden mit einem Molekulargewicht unter 1000 Da die einfach geladenen und bis etwa 2000 Da die doppelt geladenen Ionen überwiegen.

Entsprechend dem Prinzip der ESI muss der Analyt in gelöster Form zur Spitze der Sprühkapillare geführt werden. Typische Lösungsmittel sind Gemische aus dipolaren organischen Lösungsmitteln (Methanol, Acetonitril) und - bei der Analyse im positiven Ionisierungsmodus - verdünnten wässrigen Säuren (0,01 - 1 % Ameisensäure, Essigsäure). Dabei beschleunigen die hohen Dampfdrücke der organischen Lösungsmittel die Verdampfung der Lösung und das saure Milieu unterstützt die Protonierung der

Analytmoleküle. Zusätze wie Puffer, Salze und Detergenzien stören den Elektrosprayprozess und erzeugen selbst starke Ionensignale, oftmals auch in Form von Ionenserien durch Bildung von Clustern oder Aggregaten. Eine hohe Empfindlichkeit der Messung sowie aussagekräftige Spektren werden in der Regel nur dann erreicht, wenn die Analytlösungen weitgehend frei von Puffern, Salzen und Detergenzien sind, was durch eine effektive Probenvorbereitung mittels RP-Nano-HPLC bzw. Entsalzen mit Hilfe von Pipettenspitzen, die RP-Säulenmaterial enthalten, erzielt wird [129].

Massenanalyse

Für die Analyse der Analytionen stehen verschiedene Massenanalysatoren zur Verfügung, die sich bezüglich der Trennung der Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis deutlich unterscheiden. Der Flugzeitanalysator (time-of-flight, TOF) trennt die Ionen nach ihrer Flugzeit in einem Messrohr nach gepulster Ionenerzeugung. Bei einem Quadrupolanalysator erfolgt die Trennung der Ionen im Hochfrequenzfeld eines Quadrupolsystems und bei der Verwendung von Ionenfallen nach Einfangen der Ionen in elektrischen, magnetischen oder Orbital-Ionenfallen. Insbesondere in der biologischen Massenspektrometrie werden häufig Hybridgeräte eingesetzt, bei denen mehrere (verschiedene) Massenanalysatoren gekoppelt sind. Generell können alle Massenanalysatoren mit MALDI und ESI als Ionenquelle kombiniert werden [129].

Eine wichtige Eigenschaft eines Massenanalysators ist das „Auflösungsvermögen“, also die Fähigkeit, Ionen mit geringer Massendifferenz noch voneinander trennen zu können. Die höchste Auflösung wird derzeit mit magnetischen Ionenfallen erreicht [129].

Ein weiterer wichtiger Parameter zur Beschreibung der Qualität eines Massenanalysators ist die Massengenauigkeit (mass accuracy). Sie gibt an, wie genau die Masse eines Moleküls bestimmt wurde, das heißt, wie stark die experimentell bestimmte Masse von der korrekten Masse abweicht und wird entweder als absoluter oder relativer Wert (meist parts per million, ppm) angegeben [129].

Da in der vorliegenden Arbeit mit Massenspektrometern gearbeitet wurde, die mit Flugzeit- und Quadrupolanalysatoren ausgestattet waren, sollen diese beiden Massenanalysatoren im Folgenden etwas genauer vorgestellt werden.

Der Flugzeitanalysator misst die Zeit, die zwischen dem Start der Ionen in der Ionenquelle und dem Eintreffen am Detektor vergeht. Die Ionen werden in der Ionenquelle durch das angelegte elektrostatische Feld auf eine kinetische Energie von einigen Kiloelektronenvolt beschleunigt und durchlaufen nachfolgend eine feldfreie Driftstrecke, in der sie nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z aufgetrennt werden. Dies funktioniert, da Ionen mit unterschiedlichen m/z -Werten bei gleicher kinetischer Energie unterschiedliche Geschwindigkeiten besitzen. Leichte Ionen erreichen den Detektor früher als schwere Ionen. Bei bekannter Beschleunigungsspannung und Flugstrecke lässt sich durch Messung der Flugzeit das m/z -Verhältnis bestimmen. Dieses ist dem Quadrat der Flugzeit proportional [129].

Der Quadrupolanalysator ist im Prinzip ein Massenfilter und es werden nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis zum Detektor durchgelassen. Erreicht wird dies durch die Anordnung von vier parallelen stabförmigen Metallelektroden (Quadrupol), an denen eine Gleichspannung und eine Wechselspannung anliegen. Dabei besitzen die gegenüberliegenden Stäbe die gleiche Polarität der Gleichspannung und die gleiche Phase der Wechselspannung, nebeneinander liegende Stäbe entsprechend eine entgegengesetzte Polarität und eine um 180° versetzte Phase. Unter dem Einfluss eines kombinierten Wechsel- und Gleichspannungsfeldes können Ionen eines definierten m/z -Verhältnisses den Quadrupol auf einer stabilen oszillierenden Bahn durchlaufen, während alle anderen Ionen mit unterschiedlichen m/z -Verhältnissen auf instabilen Bahnen fliegen und durch Kollision mit den Metallstäben gestoppt werden. Beim Scannen des Massenbereiches werden Gleichspannung und Frequenz der Wechselspannung gleichzeitig erhöht. Dadurch werden Ionen verschiedener Massen nacheinander in den stabilen Bereich des Quadrupolfeldes gebracht. Die Massentrennung und somit die Massenauflösung wird durch das Verhältnis von Gleichspannung zu Frequenz des Wechselfeldes erreicht. Dieses wird so gewählt, dass Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis in den Bereich der stabilen Oszillation gelangen. Zur Aufnahme eines Spektrums, das heißt für das Scannen der Quadrupole über den Massenbereich, sind zwei Parameter entscheidend: (1) die „Stufengröße“ (step size), in die der Scanbereich gleichmäßig unterteilt wird und (2) die Zeit (dwell time), mit der eine Stufe vermessen wird. Mit der Stufengröße wird die Genauigkeit, mittels dwell time die Empfindlichkeit der Massenbestimmung beeinflusst. Aus dem Produkt der beiden Parameter ergibt sich

die benötigte Scanzeit zur Aufnahme eines Spektrums [129].

Insbesondere in der biologischen Massenspektrometrie haben sich „Tandemmassenspektrometer“ bewährt, bei denen mehrere Massenanalytoren kombiniert vorliegen. So können die Ionen in einem ersten Analysator fragmentiert und im nachfolgenden Analysator analysiert werden. Die gebräuchlichsten Hybridgeräte stellen Triple-Quadrupol-Massenspektrometer, Tandem-TOF-Massenspektrometer, Quadrupol-TOF-Massenspektrometer und die Kombination aus Linearer Ionenfalle mit magnetischer Ionenfalle bzw. Orbital-Ionenfalle dar [129]. In der vorliegenden Arbeit wurde das Quadrupol-TOF-Massenspektrometer (QqTOF-MS) ausgerüstet mit einer nano-ESI-Quelle zur Aufnahme von Übersichts- und Fragmentationenspektren verwendet und soll daher im Folgenden etwas detaillierter vorgestellt werden.

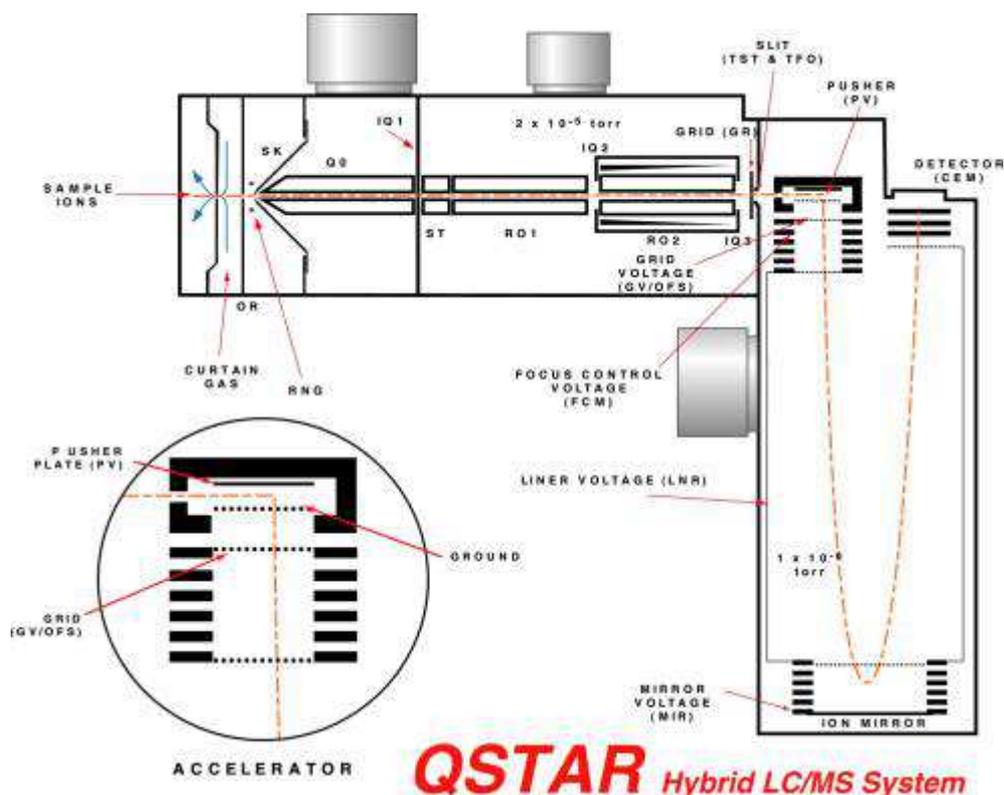


Abb. 3.9: Schematische Darstellung des verwendeten QqTOF-Massenspektrometers

Das QqTOF-MS ist ein Tandemmassenspektrometer, in dem die Stärken des Quadrupolanalysators (einfache Selektion von Vorläuferionen, kontrollierte effektive Fragmentierung) und des Reflektorflugzeitanalysators (unbegrenzter Massenbereich, hohes Auflösungsvermögen, hohe Nachweiseffizienz, sehr kurze Analysezeiten) kombiniert werden. Ausgestattet ist das QqTOF-MS mit drei Quadrupolen Q0 bis Q2 und einem Flugzeitanalysator (TOF). Der mit Wechselstrom betriebene Q0 fungiert hierbei als „Hilfsquadrupol“ und bewirkt eine Fokussierung und Überführung sämtlicher in der Ionenquelle erzeugter Ionen ins Zentrum des Quadrupolfeldes von Q1 (Massenfilter). Hier werden die Ionen nach ihrem m/z -Verhältnis gescannt, nachfolgend in eine Kollisionszelle (Q2), die mit einem inerten Gas (Stickstoff, Helium, Argon) gefüllt ist, überführt und dort durch Zusammenstöße mit den Gasmolekülen fragmentiert. Die Massenanalyse der resultierenden Fragmentionen erfolgt anschließend in einem orthogonal angeordneten Reflektor-TOF-MS [129].

Mit einem QqTOF-MS lassen sich verschiedene Arten von Fragmentionen-Analysen (MS/MS-Analysen) durchführen. Bei der „Produktionenanalyse“ wird Q1 als Massenfilter so eingestellt, dass nur Ionen eines bestimmten m/z -Verhältnisses zur Kollisionszelle Q2 durchgelassen werden. Diese „Vorläuferionen“ werden in der Folge in der Kollisionszelle fragmentiert und die erzeugten Produktionen im Anschluss nach ihrem m/z -Verhältnis im Reflektor-TOF analysiert.

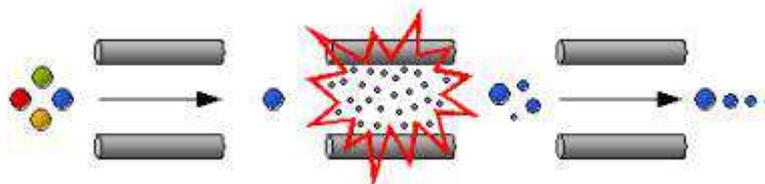


Abb. 3.10: Produktionenanalyse

Die Zuordnung zwischen Vorläufer- und Produktionen lässt sich auch in umgekehrter Reihenfolge durchführen. Hierzu werden die Ionen des gesamten Massenbereiches

beginnend mit niedrigen m/z -Verhältnissen schrittweise zu hohen m/z -Verhältnissen wie bei der Aufnahme eines normalen Massenspektrums durch Q1 transferiert und erreichen sequenziell die Kollisionszelle Q2, wo sie nacheinander fragmentiert werden. Entsprechend werden für alle selektierten Vorläuferionen die jeweils in Q2 erzeugten Produktionen im Reflektor-TOF analysiert und die dazu gehörigen MS/MS-Spektren aufgezeichnet. Mittels „Vorläuferionenanalyse“ kann in Molekülonen gezielt die Anwesenheit bestimmter Modifikationen, z. B. Glykosylierungen, über dafür spezifische Produktionen nachgewiesen werden.

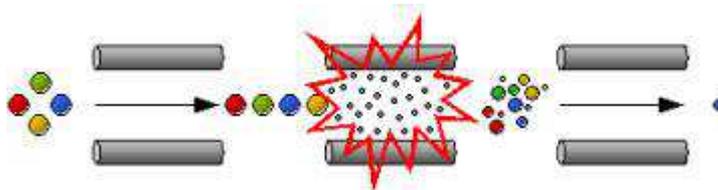


Abb. 3.11: Vorläuferionenanalyse

Auch der Verlust eines Neutralteilchens aus einer Fragmentierung kann nachgewiesen werden. Analog der Vorläuferionenanalyse werden die Ionen des gesamten Massenbereiches durch Q1 in Q2 überführt und nacheinander fragmentiert. Der Reflektor-TOF arbeitet synchron mit Q1 im Scanbetrieb, allerdings um die Masse des nachzuweisenden Neutralverlusts zurückversetzt. Dadurch werden Ionen nur dann am Detektor registriert, wenn ein entsprechendes Vorläuferion in Q2 eine Fragmentierung mit der selektierten Massendifferenz erzeugt. Durch „Neutralverlustanalyse“ können gezielt bestimmte Modifikationen, beispielsweise Phosphorylierungen von Peptiden, nachgewiesen werden [129].

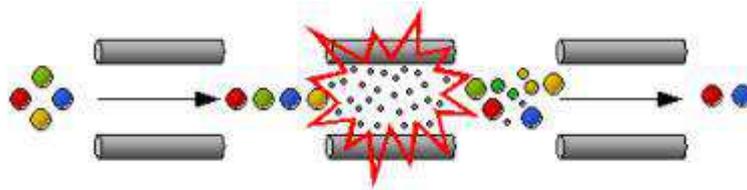


Abb. 3.12: Neutralverlustanalyse

In der vorliegenden Arbeit wurden nach der Aufnahme von Übersichtsspektren überwiegend Produktionsanalysen zur Identifizierung der Aminosäuresequenz der durch den Verdau von P-gp entstandenen Peptide und zum Nachweis von Photoaffinitätsmarkierungen durchgeführt. Daneben wurden zum Nachweis einer erfolgreichen Photoaffinitätsmarkierung von P-gp mit 8-Azido-ATP Vorläuferionenanalysen und Neutralverlustanalysen betrieben.

Massenbestimmung

Bei der Massenbestimmung wird generell zwischen der „Durchschnittsmasse“ (average mass), der „Monoisotopischen Masse“ und der „Nominellen Masse“ eines Moleküls bzw. Ions unterschieden. Die Durchschnittsmasse eines Ions berechnet sich aus den durchschnittlichen Atomgewichten der einzelnen Elemente unter Berücksichtigung aller Isotope. Die Monoisotopische Masse dagegen setzt sich aus den exakten Massen des jeweils häufigsten Isotops der enthaltenen Elemente zusammen. Bei der Nominellen Masse eines Ions werden aus Gründen der Vereinfachung nur die ganzzahligen Massen des jeweils häufigsten Isotops der enthaltenen Elemente zur Berechnung der Masse verwendet [129]. In der vorliegenden Arbeit wurden für alle analysierten Peptide und Photoliganden stets die Monoisotopischen Massen bestimmt.

3.4.2 Praktische Durchführung der massenspektrometrischen Analyse

Probenvorbereitung

Die durch den vorhergehenden enzymatisch-chemischen Verdau von P-gp generierten Peptide müssen vor ihrer massenspektrometrischen Analyse entsprechend aufbereitet werden, das heißt, den Ionisierungsprozess störende Salze und Pufferbestandteile müssen weitestgehend entfernt werden. Die Aufreinigung kann entweder „online“ durch Kopplung des Massenspektrometers mit einer nano-HPLC erfolgen, oder „offline“ durch Einsatz von Pipettenspitzen, die mit RP-C18 Säulenmaterial gefüllt sind (z. B. ZipTip® von Millipore). In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die offline-Aufbereitung mittels ZipTip® entsprechend der Produktinformation angewendet. Hierfür wurden die getrockneten Peptide in 10 µl einer Mischung aus 4 % Methanol / 1 % Ameisensäure in Wasser aufgenommen und unter Vortexen in Lösung gebracht. Nachfolgend wurde das RP-C18 Säulenmaterial in der Pipettenspitze durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren von jeweils 10 µl eines Gemisches aus 100 % Methanol / 1 % Ameisensäure aktiviert. Daran anschließend erfolgte die Äquilibrierung des Säulenmaterials mit der ESI-Elutionslösung (60 % Methanol / 1 % Ameisensäure in Wasser) und der Waschlösung (4 % Methanol / 1 % Ameisensäure in Wasser) durch mehrfaches Aufziehen und Ablassen von jeweils 10 µl der entsprechenden Lösung. Daraufhin wurde die RP-C18 Säule mit der Peptid-Lösung durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren beladen. Die Entsalzung erfolgte dann durch dreimaliges Waschen der an die Säule gebundenen Peptide mit jeweils 10 µl der Waschlösung. Die Waschfraktionen wurden dabei in einem beschrifteten LoBind® Gefäß gesammelt und für Eventualitäten aufbewahrt. Abschließend wurden die gereinigten Peptide mit 10 µl der ESI-Elutionslösung durch zehnmaliges Aufziehen und Ablassen von der C18 Säule in ein neues beschriftetes LoBind® Gefäß eluiert und nachfolgend massenspektrometrisch analysiert.

Tab. 3.22: Lösungen für die Probenvorbereitung

Waschlösung: 4 % Methanol / 1 % Ameisensäure		
40 µl	Methanol 100 %	4 % (V/V)
10 µl	Ameisensäure 100 %	1 % (V/V)
950 µl	Wasser	
ESI-Elutionslösung: 60 % Methanol / 1 % Ameisensäure		
600 µl	Methanol 100 %	60 % (V/V)
10 µl	Ameisensäure 100 %	1 % (V/V)
390 µl	Wasser	
ZipTip® Aktivierungslösung: 100 % Methanol / 1 % Ameisensäure		
1000 µl	Methanol 100 %	100 % (V/V)
11 µl	Ameisensäure 100 %	1 % (V/V)

Kalibrierung

Eine wichtige Voraussetzung für die genaue Bestimmung der Masse ist die Kalibrierung des verwendeten Massenspektrometers. Hierzu werden entsprechende Kalibriersubstanzen verwendet, deren exakte Masse bekannt ist. Zur Kalibrierung des für die massenspektrometrischen Analysen genutzten QSTAR XL Gerätes wurde für den Betrieb im positiven Ionisierungsmodus ein Kalibrand verwendet, der sich aus dem Caesiumatom und einem Referenzpeptid zusammensetzt. Der Kalibrand wurde aufgetaut, etwa ein Mikroliter in eine metallbeschichtete Glaskapillare von Proxeon® pipettiert und bei positiver Ionisierung und einer angelegten Spannung von 1200 Volt über den Massenbereich von m/z 100 - 1000 Dalton ein Übersichtsspektrum aufgenommen. Die exakten Massen des Caesiumatoms und des Referenzpeptids betragen 132,9049 und 828,5559 Dalton. Bei Abweichung der experimentell bestimmten Massen der beiden Kalibriersubstanzen von den Sollmassen, wurde das Massenspektrometer entsprechend kalibriert und gemessene Massen und Sollmassen damit angeglichen.

Aufnahme von Massenspektren

Etwa 1,5 µl der entsalzten Peptid-Lösung wurden in eine Proxeon® metallbeschichtete

Glaskapillare pipettiert und diese nachfolgend in das verwendete QSTAR XL nano-ESI-Qq-TOF Tandemmassenspektrometer eingespannt. Nach Anlegen einer Spannung von 1200 Volt für die positive Ionisierung bzw. maximal 1000 Volt für die negative Ionisierung und einem Wert für das Curtain Gas von 20 wurden über einen Massenbereich von m/z 300 - 1500 Dalton zunächst Übersichtsspektren über einen Zeitraum von 5 min aufgenommen. Ausgewählte Peptid-Signale wurden im Anschluss daran durch Umschalten in den MS/MS-Modus weiter fragmentiert und MS/MS-Spektren aufgenommen. Dabei wurden die folgenden Parameter-Einstellungen vorgenommen:

Die Masse des zu fragmentierenden Vorläuferions wurde im jeweiligen Ladungszustand auf zwei Nachkommastellen genau eingegeben. Anschließend wurde der zu scannende Massenbereich durch Eingabe der minimalen und maximalen Masse festgelegt. Dabei wurde als Minimum eine Masse von 50 Dalton und als Maximum die Monoisotopische Masse des Vorläuferions gewählt. Die Auflösung wurde zur Erhöhung der Signalintensität in der Mehrzahl der Fälle auf „Low Resolution“ gesetzt, nur bei Überlagerung von zwei oder mehr Peptid-Signalen wurde auf „Unit Resolution“ umgestellt. Für Kollisionsgas und Kollisionsenergie wurden Anfangswerte von 10 und 20 eingestellt und die Fragmentierung des Vorläuferions bei diesen Einstellungen beobachtet. Bei unzureichender Fragmentierung wurde die Kollisionsenergie in der Folge bis zur deutlichen Abnahme der Intensität des Vorläuferion-Signals schrittweise manuell erhöht.

Die nachfolgende Abbildung 3.13 zeigt die im Zuge der „Kollisions-induzierten Dissoziation“ ablaufende Fragmentierung eines Peptids. Durch Spaltung des Peptid-Rückgrats kommt es zur Ausbildung zweier verschiedener Arten von Fragmentionen, welche entweder den C-Terminus (x-, y- und z-Ionen) oder den N-Terminus (a-, b- und c-Ionen) des ursprünglichen Peptids enthalten. Die aus der Fragmentierung resultierenden Massenwerte liefern Informationen über die Aminosäuresequenz, welche anschließend zur Identifizierung des entsprechenden Peptids genutzt werden können.

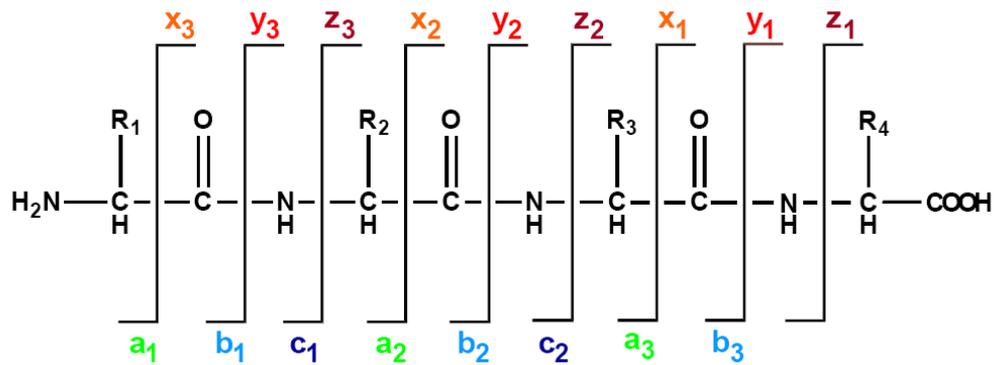


Abb. 3.13: Nomenklatur der Peptidfragmentierung nach Roepstorff und Fohlmann. Die stattfindende „Kollisions-induzierte Dissoziation“ führt zur Spaltung des Peptid-Rückgrats und in der Folge zur Bildung von Fragmentionen, welche entweder den C-Terminus (repräsentiert durch die Symbole x, y, z) oder den N-Terminus (dargestellt durch die Buchstaben a, b, c) des ursprünglichen Peptids umfassen.

Auswertung von Massenspektren / Datenanalyse

Die Aufnahme und Auswertung der Massenspektren erfolgte mit der zum QSTAR XL Massenspektrometer dazugehörigen Software Analyst QS Version 1.1 mit integriertem BioAnalyst Version 1.1.5. Durch die Verwendung von ESI zur Ionenerzeugung wurden neben einfach geladenen Molekülonen überwiegend Peptidionen mit Mehrfachladung (zweifach, dreifach und vierfach geladene Ionen) in den Massenspektren detektiert. Bei ausreichender Auflösung der Isotopenverteilung der mehrfach geladenen Signale konnte aus dem Abstand zwischen den einzelnen Isotopenpeaks Δm die Ladungszahl z unmittelbar abgeleitet werden:

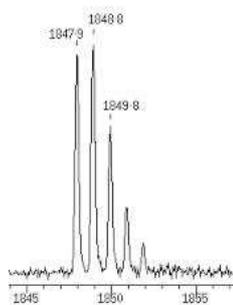


Abb. 3.14: Isotopenverteilung eines einfach geladenen Peptidions. Der Abstand zwischen den einzelnen Isotopenpeaks Δm beträgt 1 Dalton.

Bei einem Abstand von $\Delta m = 1; 0,5; 0,33$ oder $0,25$ ergab sich für z eine Ladung von 1, 2, 3 oder 4. Die Molekülmassen der mehrfach geladenen Peptidionen konnten dann aus den gemessenen m/z -Werten durch Multiplikation mit der Ladungszahl z und anschließende Subtraktion (positive Ionisierung) bzw. Addition (negative Ionisierung) der Masse der Ladungsträger (z. B. zwei, drei oder vier Protonen) bestimmt werden. Für einfach geladene Peptidionen musste lediglich die Masse des Ladungsträgers subtrahiert bzw. addiert werden. Somit konnte aus der Monoisotopischen Masse und der Ionenladung des mehrfach geladenen Peptidions die Monoisotopische Masse des dem Ion zugrunde liegenden, neutralen Peptidmoleküls (M) nach der folgenden Formel berechnet werden:

$$M_M = z * m - n * m_a$$

z = Ionenladung; m = registrierte Massezahl des Monoisotopischen Signals in m/z -Einheiten; n = Anzahl ionisierender Teilchen; m_a = Masse des angelagerten ionisierenden Teilchens

Im vorliegenden Fall ist $n = z = 1, 2, 3, 4...$ und die angelagerten Teilchen sind Protonen ($m_a = 1$).

Aus den aufgenommenen Übersichtsspektren wurden so die Molekülmassen der jeweils resultierenden Peptide aus dem Verdau von P-gp mit den verwendeten Spaltungsreagenzien bestimmt und nach absteigenden Massen, beginnend mit der höchsten Masse, geordnet.

Mit Hilfe des Programms GPMW 8.0 [130] wurde P-gp anschließend „in silico“ mit den jeweils eingesetzten Spaltungsreagenzien gespalten und dadurch eine Liste der zu erwartenden, theoretisch möglichen Peptidmassen erstellt. Hierfür wurde die unter der Nummer P08183 in der UniProt-Datenbank [131, 132] archivierte Aminosäuresequenz von humanem P-gp in das Programm importiert. Dabei wurden die folgenden Parameter vorgegeben:

Die Anzahl der nicht ausgeführten Spaltungen pro Peptid betrug 2 und die Thiolgruppe der Aminosäure Methionin konnte auch oxidiert als Sulfoxid (Massenzunahme um 16 Da) vorliegen. Die Monoisotopischen Massen $[M+H]^+$ bzw. $[M-H]^-$ der Peptide im einfach

positiven bzw. negativen Zustand wurden berechnet und nur Peptide mit einer Masse von mehr als 500 Da berücksichtigt.

Mit einer weiteren Funktion von GPMW konnte die Zuordnung von Aminosäuresequenzabschnitten zu experimentell bestimmten Peptidmassen erfolgen. Hierfür wurden die gemessenen m/z -Werte in Verbindung mit der dazugehörigen Ladungszahl z eingegeben und daraus die Monoisotopischen Massen berechnet. Die Massengenauigkeit (Toleranzgrenze für die Abweichung zwischen gemessener Masse und richtiger Masse) wurde auf 500 ppm festgelegt und das jeweilige Spaltungsreagenz für den Verdau von P-gp angegeben. Als Modifikationen wurden die Oxidation des Schwefels von Methionin zum Sulfoxid und Methylierungen berücksichtigt. Nach Eingabe aller erforderlichen Parameter wurde eine Liste der zur vorgegebenen Masse passenden P-gp-Aminosäuresequenzen unter Angabe der jeweiligen Massenabweichungen erstellt. Welche der vorgeschlagenen Aminosäuresequenzen nun die korrekte Peptidsequenz darstellte, wurde abschließend durch Sequenzierung des Peptids im MS/MS-Modus geklärt.

Für die massenspektrometrische Analyse der Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente wurde zunächst sowohl von der Kontrolle (P-gp ohne Photoligand bestrahlt) als auch von der Probe (P-gp mit Photoligand bestrahlt) ein Übersichtsspektrum aufgenommen. Daran anschließend wurden die beiden Spektren mit Hilfe der Analyst QS Software übereinander gelegt und auf Unterschiede untersucht. Signale, die nur im Spektrum der Probe, nicht aber im Spektrum der Kontrolle vorhanden waren, wurden dokumentiert und nachfolgend selektiert und fragmentiert, um Vorhandensein und Position der Photoaffinitätsmarkierung zu verifizieren und zu identifizieren. Alternativ hierzu wurden von den eingesetzten Photoliganden Übersichtsspektren und MS/MS-Spektren aufgenommen, um die exakten Monoisotopischen Massen der intakten Moleküle und die durch Fragmentierung resultierenden Massen der Bruchstücke zu bestimmen. Diese Massen wurden in der Folge von den im Probenspektrum detektierten Peptidmassen subtrahiert und die Differenzmassen daraufhin in das GPMW Programm eingegeben, um Vorschläge für die zu den jeweiligen Massen passenden Sequenzabschnitte in P-gp zu erhalten. Dabei wurde die Toleranzgrenze für die Abweichung zwischen gemessener Masse und theoretischer Masse wiederum auf 500 ppm festgesetzt und die

3.4.2 Praktische Durchführung der massenspektrometrischen Analyse

Spaltungsspezifität des für den Verdau der P-gp-Probe verwendeten Enzyms berücksichtigt.

3.5 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 3.23: Informationen zu den verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Substanz / Reagenz	Bezugsquelle und Bestellnummer
AALS II	Protea, ALS-210
Acrylamid-Lösung 30 % (m/V)	Applichem, A3626
Acetonitril	BDH Prolabo, 83639.320
Aluminiumsulfat x 16 H ₂ O	Fluka, 06421
Ameisensäure	Riedel-de Haën, 33015
Ammoniak-Lösung 25 %	Theo Geyer, 2672.2511
Ammoniumhydrogencarbonat	Fluka, 09832
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, A-3678
8-Azido-Adenosintriphosphat (ATP)	Biolog, A043
Bromcyan	Acros, 10040770
Bromphenolblau	Merck, 108122
Calciumchlorid-Dihydrat	Applichem, A1873
Chymotrypsin	Sigma, C3142
Chymotrypsin	Sigma, C6423
Chymotrypsin	Roche, 11418467001
Coomassie Brilliant Blau G-250	Applichem, A3480
Coomassie Brilliant Blau R-250	Roth, 3862.1
2,5-Dihydroxybenzoesäure	Fluka, 39319
3,4-Dihydroxybenzophenon	Aldrich, 579815
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Applichem, A1584
Dithiothreitol (DTT)	Applichem, A2948
Elastase	Promega, V189A
Eisessig	Theo Geyer, 2234.1000
Ethanol	BDH Prolabo, 20821.321
Ethylen-bis-(oxyethylennitrilo)- tetraessigsäure (EGTA)	Applichem, A0878
Glycerol (wasserfrei)	Applichem, A1123
Glycin	Applichem, A3707
Glykolsäure	Sigma-Aldrich, 124737

Fortsetzung - Chemikalien und Reagenzien

Substanz / Reagenz	Bezugsquelle und Bestellnummer
H15	Dr. Matthias Schmidt
H19	Dr. Matthias Schmidt
Iodoacetamid	Sigma, I-6125
Isopropanol	Riedel-de Haën, 34863
Kaliumchlorid	Merck, 1.04936.0500
Kaliumchlorid-Lösung, gesättigt	Aldrich, 319309
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Grüssing, 12087
Methanol	Riedel-de Haën, 32213
2-Morpholinoethansulfonsäure Natriumsalz	Applichem, A4731
NALS II	Protea, ALS-410
Natriumazid	Fluka, 71290
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, A2572
Natriumhydroxid	Acros, 13407
Ouabain Octahydrat	Fluka, 75640
Pepsin	Protea, PE-103
Pepsin	Sigma, P6887
Phosphorsäure 85 %	Merck, 1.00573.1000
ProteaseMAX® Surfactant	Promega, V2071
Proteinase K	Roche, 03115887001
Protein Marker unstain (10 - 150)	Applichem, A3993
Protein Marker stain (6,5 - 200)	Applichem, A5418
Protein Standard Precision Plus (All-Blue)	Bio-Rad, 161-0373
D(+)-Saccharose	Applichem, A2211
Salzsäure 37 %	BDH Prolabo, 20252.244
Salzsäure 1 mol/l	Roth, K025
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
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Applichem, A1148
Thermolysin	Promega, V400A
Trifluoressigsäure (TFA)	Riedel-de Haën, 61030

Fortsetzung - Chemikalien und Reagenzien

Substanz / Reagenz	Bezugsquelle und Bestellnummer
Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan (Tris)	Applichem, A2264
Trypsin	Sigma, T6567
Wasser p. a.	Wasseraufbereitungsanlage Elix, Millipore
ZALS I	Protea, ALS-200

3.6 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3.24: Informationen zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle und Bestellnummer
Indikatorpapier pH 5.5 - 9.0	Merck, 1.09569.0003
Multi-Flex 0,5 - 200 µl ECOFLEX Tips	Roth, Y419.1
Parafilm M	Pechiney Plasic Packaging, PM-996
Einmalpasteurpipette 4 ml non steril	VWR, VWRI612-1688
Einmalpasteurpipette 7 ml non steril	VWR, VWRI612-1681
Pipettenspitzen 0,5 - 10 µl TipONE	Starlab, S1111-3000
Pipettenspitzen 20 - 200 µl Yellow, Bevelled Tip	Starlab, S1111-1006
Pipettenspitzen 100 - 1000 µl TipONE Blue	Starlab, S1111-2021
Pipettenspitzen 101 - 1000 µl TipONE Clear	Starlab, S1111-2020
Pipettenspitzen 500 - 5000 µl Makro II	ratiolab, 2400650
Plastikeinmalpipetten 10 ml	Sarstedt, 86.1254.001
Plastikeinmalpipetten 25 ml	Sarstedt, 86.1685.001
PP-Röhrchen 15 ml	Greiner Bio-one, 188271
PP-Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-one, 227261
Protein LoBind® Tube 0,5 ml	Eppendorf, 0030108.094
3 kDa MWCO Ultrafiltration Tubes	Protea, SP-021
Proxeon® Borosilicate Emitters	ES 380
Quarzröhrchen 100 µl	Dr. Jens Meyer
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, 72.690

Fortsetzung - Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle und Bestellnummer
TubeONE 1,5 ml Amber Flatcap Microcentrifuge Tubes	Starlab, S1615-5507
Vivaspin® 500 10 K	Sartorius, VS0101
ZipTip® Pipette Tips	Millipore, ZTC18S096

3.7 Geräte und Zubehör

Tab. 3.25: Informationen zu den verwendeten Geräten und deren Zubehör

Gerät bzw. Zubehör	Hersteller, Nummer
Acculab VIC Waage	Sartorius, 24907108
Blotdokumentation	Versa Doc Imagine System 5000, Bio-Rad
Elektrophorese-/Blottingapparatur	Mini-Protean II, Bio-Rad
Gelelektrode	Ecotrode Gel, Metrohm, 6.0221.100
Hamiltonspritze 10 µl	Hamilton Bonaduz AG, 701N
Hamiltonspritze 100 µl	ITO Corporation, MS*100
Horizontalschüttler Rocker 25	Labnet, 11050660
Horizontalschüttler Red Rotor	Hofer Pharmacia Biotech
Kalomel pH-Elektrode (für pH-Meter)	Sigma, E6009-1EA
Kern Waage	Kern & Sohn, PCB 3500-2
Magnetrührer	RCT Basic, IKA Labortechnik
Massenspektrometer ESI	QSTAR XL, ABSciex Darmstadt
Massenspektrometer MALDI	Bruker
Minishaker	MS1, IKA Labortechnik
pH-Meter	φ720 pH-Meter, Beckman Coulter
pH-Meter	744, Metrohm
Sartorius Basic Waage	Sartorius, BA2105
Scanner	Astra 2200, UMAX
Schüttelthermostat	Thermomixer comfort, Eppendorf
Stromgeber für Mini-Protean II	PowerPac 200, Biorad, 285BR

3.7 Geräte und Zubehör

Fortsetzung - Geräte und Zubehör

Gerät bzw. Zubehör	Hersteller, Nummer
Thermostat	Thermostat Plus, Eppendorf
Tischzentrifuge	5451R, Eppendorf AG
Ultraschallbad	Sonorex Super RK106, Bandelin
UV-Crosslinker	CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP inc.
Vakuumzentrifuge	Speedvac SC110, Savant
Vakuumpumpe	PC5, Vacuubrand GmbH + Co KG
Vortexschüttler	Vortex Genie 2, Scientific Industries, G-560E
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore Elix, Millipore
Wasserbad	TW12, Julabo Labortechnik GmbH

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von P-gp

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteingemischen nach dem Molekulargewicht der einzelnen Proteine in einem elektrischen Feld. Als Trennmedium dient ein diskontinuierliches Gel auf der Basis von Polyacrylamid. Durch den Einsatz des anionischen Detergens SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) und des reduzierenden Agens Dithiothreitol (DTT) werden Eigenladungen der Proteine maskiert und Disulfidbrücken gespalten. Hierdurch erhalten die Proteine eine einheitliche negative Ladung und werden denaturiert, was ihre Auftrennung nach der Kettenlänge, proportional zur Molekülmasse, erlaubt.

In der vorliegenden Arbeit kam die diskontinuierliche, eindimensionale SDS-PAGE nach Lämmli et al. [103] zur Anwendung. Hierbei werden die Proteinproben vor dem Auftragen auf das Gel mit DTT reduziert und anschließend unter denaturierenden Bedingungen zuerst in einem großporigen Sammelgel (5 % Acrylamid) fokussiert und nachfolgend in einem Trenngel mit geringerer Porengröße (6 - 10 % Acrylamid) aufgetrennt.

Für den In-Gel-Verdau wurden von den nach [104] hergestellten P-gp-Proteoliposomen entsprechend den Kapiteln 3.1.2 und 3.1.3 SDS-PAGE-Gele angefertigt und die P-gp-Bande durch Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blau sichtbar gemacht.

In den nachfolgenden beiden Abbildungen 4.1 und 4.2 sind beispielhaft zwei typische Ergebnisse einer SDS-PAGE von aufgereinigtem P-gp unter Anwendung der regulären Coomassie-Färbung und der Sensitiven Coomassie-Färbung dargestellt. Pro Bahn sind jeweils 1 µg, 500 ng oder 300 ng Protein in Triplikaten aufgetragen. Die P-gp-Bande bei einem Molekulargewicht von ungefähr 140 kDa ist in fast allen Fällen deutlich zu erkennen. Lediglich im Falle der niedrigsten aufgetragenen Proteinmenge von 300 ng, detektiert mittels regulärer Coomassie-Färbung, ist die P-gp-Bande nur noch sehr schwach sichtbar.

4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von P-gp



Abb. 4.1: SDS-PAGE von aufgereinigtem P-gp nach Anfärbung mit Coomassie-Färbelösung. Banden 1 - 3: 1 µg P-gp; Banden 4 - 6: 500 ng P-gp; Banden 7 - 9: 300 ng P-gp; Bande 10: Marker.

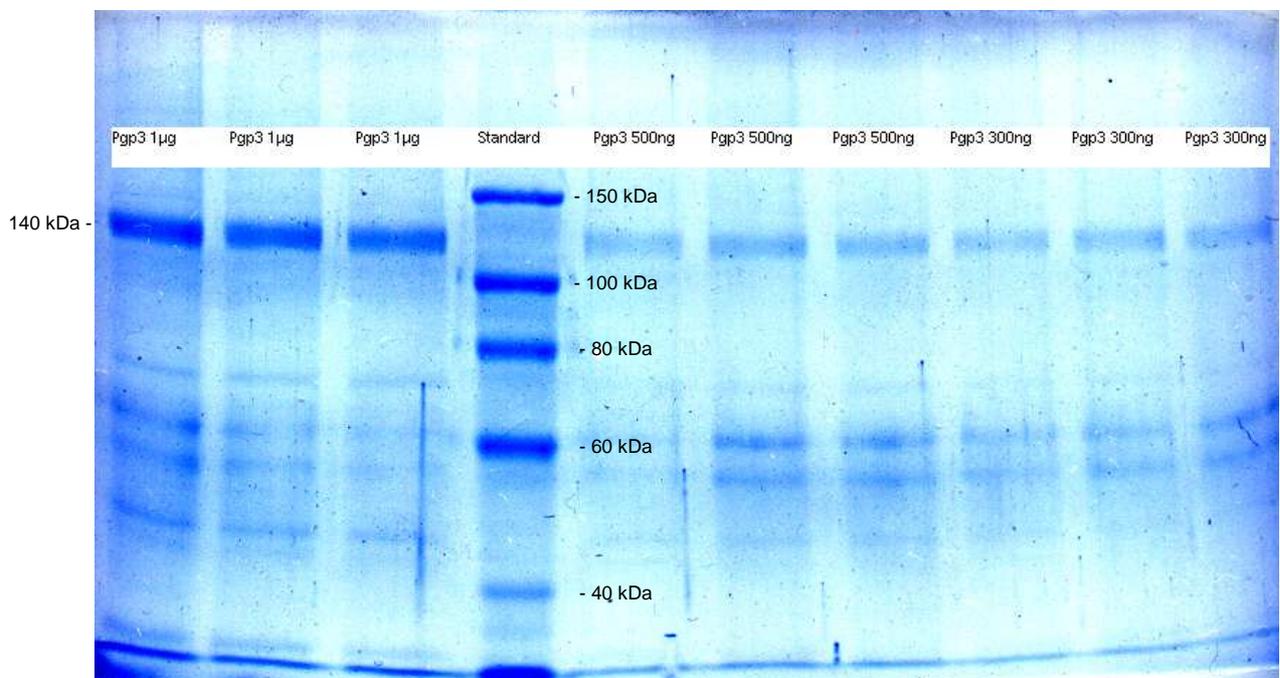


Abb. 4.2: SDS-PAGE von aufgereinigtem P-gp nach Anfärbung mit Sensitiver Coomassie-Färbelösung. Banden 1 - 3: 1 µg P-gp; Bande 4: Marker; Banden 5 - 7: 500 ng P-gp; Banden 8 - 10: 300 ng P-gp. Die P-gp-Bande bei ungefähr 140 kDa ist deutlich zu erkennen. Infolge der hohen Empfindlichkeit der Färbung wurden Verunreinigungen mit niedrigerem Molekulargewicht ebenfalls detektiert.

Dagegen ist in dem Gel, welches mittels Sensitiver Coomassie-Färbung angefärbt wurde, bei einer aufgetragenen Proteinmenge von 300 ng noch eine deutliche P-gp-Bande zu erkennen. An dieser Stelle zeigt sich die Überlegenheit der Sensitiven Coomassie-Färbung gegenüber der regulären Coomassie-Färbung hinsichtlich der Nachweisgrenze von Proteinen.

Zusätzlich zur P-gp-Bande sind bei einer Reihe der aufgetragenen P-gp-Proben einige schwächere Banden mit kleinerem Molekulargewicht zu sehen, bei denen es sich höchst wahrscheinlich um Verunreinigungen handelt, welche im Rahmen der P-gp-Aufreinigung mittels Nickelaffinitätschromatographie nicht vollständig abgetrennt werden konnten. Durch die starke Beladung des Gels mit Protein wurden diese Verunreinigungen ebenfalls detektiert, obwohl sie nur einen geringen Anteil an der Gesamtproteinmasse haben.

Darüber hinaus könnte es sich bei den schwächer angefärbten Banden geringeren Molekulargewichts auch um Bruchstücke von P-gp handeln, die im Zuge der Aufreinigung und Rekonstitution trotz des Einsatzes von Proteaseinhibitoren entstanden sind.

4.2 Enzymatisch-Chemische Verdau von P-gp

Die Voraussetzung für die Durchführung erfolgreicher Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente ist eine möglichst vollständige Abdeckung der Aminosäuresequenz von P-gp. Nach erfolgter Photoaffinitätsmarkierung mit einem photoaktivierbaren Liganden wird das Protein mit Hilfe verschiedener Enzyme bzw. chemischer Reagenzien in Peptide fragmentiert. Dabei ergibt sich für jedes verwendete Enzym bzw. chemische Reagenz durch bevorzugte Spaltung nach bestimmten Aminosäuren ein spezifisches Peptidmuster. Im Anschluss an den Verdau kann das resultierende Peptidgemisch mit einer chromatographischen Methode fraktioniert und die Masse der einzelnen Peptide massenspektrometrisch bestimmt werden. Durch Vergleich der Massen der experimentell erhaltenen Peptide mit den Massen der in einem simulierten Verdau (in silico-Verdau)

theoretisch zu erwartenden Peptide, kann die Position einer Photoaffinitätsmarkierung innerhalb der Aminosäuresequenz des Proteins identifiziert werden. Hat eine Photoaffinitätsmarkierung stattgefunden, erkennt man dies anhand einer Massenzunahme um genau die Masse des eingesetzten Photoliganden.

Damit alle erfolgten Markierungen mit den eingesetzten Photoliganden detektiert werden können, ist eine vollständige Abdeckung der P-gp-Aminosäuresequenz wünschenswert. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin, Elastase, Proteinase K und Thermolysin, sowie das chemische Agens Bromcyan hinsichtlich ihrer Spaltungsspezifität und -effizienz gegenüber P-gp untersucht.

Die verwendeten Spaltungs-Reagenzien unterscheiden sich dabei in der Anzahl und Art der bevorzugten Schnittstellen. Bromcyan spaltet spezifisch Peptidbindungen hinter der Aminosäure Methionin, wobei das Methionin in der Mehrzahl der Fälle zum Homoserinlaktone bzw. seltener zum Homoserin modifiziert wird. Für die Serinprotease Trypsin existieren zwei spezifische Schnittstellen C-terminal der beiden basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Die Serinprotease Chymotrypsin zeigt dagegen eine Präferenz für die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin sowie für die unpolaren Aminosäuren Isoleucin und Leucin. Die Enzyme Pepsin, Elastase, Proteinase K und Thermolysin sind unspezifische Proteasen und zeichnen sich durch eine höhere Anzahl von Schnittstellen im Protein aus. Trotzdem werden auch für diese unspezifischen Proteinasen bevorzugte Spaltungsstellen postuliert, z. B. schneidet die Endopeptidase Pepsin mit Vorliebe nach den beiden sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure, sowie hinter unpolaren aliphatischen Aminosäuren wie Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin und den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin. Für die mit Chymotrypsin verwandte Endopeptidase Elastase werden als überwiegende Schnittstellen die unpolaren aliphatischen Aminosäuren Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin und Valin neben der polaren aliphatischen Aminosäure Serin angegeben. Proteinase K aus dem Schlauchpilz *Tritirachium album* zeigt eine Präferenz für unpolare aliphatische und aromatische Aminosäuren. Die thermostabile Metalloprotease Thermolysin aus dem thermophilen Bakterium *Bacillus thermoproteolyticus* zeichnet sich dadurch aus, dass sie im Gegensatz zu allen anderen

verwendeten Proteasen bei einem Temperatur-Optimum von 65 - 75 °C auf der Aminoseite (N-terminal) von hydrophoben Aminosäuren wie Alanin, Isoleucin, Leucin, Valin und Phenylalanin spaltet.

Die für den Verdau von P-gp verwendeten Enzyme gehören allesamt zur Gruppe der Peptidasen und werden nach der sogenannten EC-Systematik der Klasse der Hydrolasen zugeordnet. Die weitere Einteilung erfolgt nach der Art der katalysierten proteolytischen Reaktion bzw. nach der Art des aktiven Zentrums. Da für die verschiedenen Enzyme unterschiedliche Temperatur- und pH-Optima existieren und einige Enzyme aktivierende Zusätze wie z. B. Calcium-Ionen oder Tris benötigen, wurde für jedes verwendete Enzym ein eigener Verdau-Puffer hergestellt.

Trypsin und Chymotrypsin wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl für den In-Gel- als auch für den In-Lösung-Verdau von P-gp verwendet, alle weiteren Enzyme und Bromcyan ausschließlich für den In-Lösung-Verdau. Eine besondere Gewichtung wurde der Sequenzabdeckung in den transmembranären Domänen zuteil, da in diesem Bereich die Bindungsstellen von P-gp postuliert werden (siehe Kapitel 1.3.3).

4.2.1 In-Gel-Verdau von P-gp

Der In-Gel-Verdau von aufgereinigtem P-gp wurde entsprechend Kapitel 3.2.1 mit den beiden Enzymen Trypsin und Chymotrypsin sowie Kombinationen derselben nach zwei verschiedenen Protokollen durchgeführt.

Hierfür wurde als erster Arbeitsschritt von den P-gp-Proteoliposomen entsprechend den Kapiteln 3.1.2 und 3.1.3 ein SDS-PAGE-Gel angefertigt und die P-gp-Bande durch Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blau bei einem Molekulargewicht von ungefähr 140 kDa detektiert. Zwei charakteristische Ergebnisse einer solchen SDS-PAGE nach Anfärbung mit a) Coomassie-Färbelösung und b) Sensitiver Coomassie-Färbelösung zeigen die Abbildungen 4.1 und 4.2 im vorhergehenden Kapitel 4.1. Aufgrund der deutlich höheren Empfindlichkeit der Sensitiven Coomassie-Färbung im Vergleich zur normalen Coomassie-Färbung und der Tatsache, dass zeitraubende Entfärbeschritte entfallen können, wurde diese als Standardmethode zur Detektion der P-gp-Bande für die

folgenden In-Gel-Verdau verwendet.

Zur Erzielung einer deutlich sichtbaren Bande im SDS-PAGE-Gel wurde in der vorliegenden Arbeit in der Regel eine Proteinmenge von 1 µg aufgereinigtem P-gp pro Bahn aufgetragen. Für den In-Gel-Verdau wurde die P-gp-Bande mit einem scharfen Skalpell möglichst genau ausgeschnitten, in circa 1 mm³ große Stücke zerteilt, entfärbt, gewaschen und mit dem jeweiligen Enzym in einem bestimmten Enzym : Protein Verhältnis versetzt. Der Verdau erfolgte dann über Nacht (12 - 16 h) beim jeweiligen Temperatur-Optimum des verwendeten Enzyms (25 - 37 °C). Nach der Hitzeinaktivierung des Verdau wurden die entstandenen Peptide aus der Gelmatrix eluiert und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

Die beiden für den In-Gel-Verdau verwendeten Pankreasenzyme Trypsin und Chymotrypsin zählen zu den Serinproteasen und zeichnen sich durch eine stark unterschiedliche Spaltungsspezifität aus. Die „Standardprotease“ Trypsin besitzt zwei spezifische Schnittstellen C-terminal von den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin [109, 129], während Chymotrypsin eher unspezifisch, aber mit einer deutlichen Präferenz hinter hydrophoben aliphatischen und aromatischen Aminosäuren wie Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin schneidet [112]. Auf der Basis dieser variierenden Schnittstellen sind stark abweichende Peptidmuster von P-gp zu erwarten, da insbesondere in den lipophilen transmembranären Bereichen keine Spaltungsstellen für Trypsin vorhanden sind, für Chymotrypsin dagegen gerade in diesem Bereich genügend Angriffspunkte bestehen. Aufgrund der Tatsache, dass die Bindungsstellen für Substrate und Modulatoren überwiegend in den TMDs postuliert werden [43 - 47; 66 - 69], ist es von großer Wichtigkeit, diese Bereiche mit einem geeigneten Spaltungsreagenz gut abzudecken. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit neben Trypsin, welches die transmembranären Domänen voraussichtlich schlecht bis überhaupt nicht abdeckt, auch Chymotrypsin für den In-Gel-Verdau von P-gp eingesetzt, um die Sequenzabdeckung in den TMDs entsprechend zu erhöhen.

Der In-Gel-Verdau von P-gp wurde in Anlehnung an zwei verschiedene Verdauprotokolle von Dr. Sabine Metzger (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) und Dr. Sonja Hess (California Institute of Technology) durchgeführt und durch Veränderung variabler

Parameter wie z. B. das Enzym : Protein Verhältnis, die Inkubationszeit und die Temperatur optimiert. Die beiden verwendeten Protokolle unterscheiden sich dabei hinsichtlich der eingesetzten Puffer-, Wasch- und Elutionslösungen, Enzym : Protein Verhältnisse sowie der Wasch- und Elutionsschritte und wurden in der vorliegenden Arbeit auf Äquivalenz bzw. Überlegenheit in Bezug auf die bestmögliche Sequenzabdeckung von P-gp untersucht.

4.2.1.1 Trypsin-In-Gel-Verdau von P-gp

Wie bereits erwähnt, wurde der In-Gel-Verdau von P-gp mit der Protease Trypsin in der vorliegenden Arbeit nach zwei verschiedenen Protokollen durchgeführt. Neben unterschiedlich zusammengesetzten Puffer-, Wasch- und Elutionslösungen sowie variierenden Wasch- und Elutionsschritten, bestand der Hauptunterschied im jeweils verwendeten Enzym : Protein Verhältnis. In Anlehnung an das Protokoll von Dr. Metzger wurde für den Verdau ein zweifacher Überschuss an Trypsin über die eingesetzte P-gp-Menge (1 µg) entsprechend einem Enzym : Protein Verhältnis von 2 : 1 zugegeben. Im Gegensatz dazu wurde nach dem Protokoll von Dr. Hess eine viel geringere Menge an Trypsin entsprechend einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 7 eingesetzt. Trotz dieser stark abweichenden Enzym : Protein Verhältnisse waren die mit den beiden Protokollen erzielten Ergebnisse vergleichbar. Dies zeigte sich dadurch, dass im Wesentlichen dieselben Peptide entstanden und somit eine äquivalente Sequenzabdeckung resultierte. Dies lässt den Schluss zu, dass die kleinere eingesetzte Menge an Trypsin für den In-Gel-Verdau von P-gp ausreichend ist und eine größere Enzymmenge nicht zu einer höheren Anzahl von Peptiden und damit auch nicht zu einer verbesserten Sequenzabdeckung von P-gp führt.

Aus diesem Grund wurden die mit den beiden Verdauprotokollen erreichten Ergebnisse zusammengefasst. Die nachfolgende Tabelle 4.1 zeigt die durch den In-Gel-Verdau mit Trypsin erzielte Sequenzabdeckung von P-gp. Von links nach rechts gelesen sind die Monoisotopischen Massen $[M+H]^+$ der detektierten Peptidsignale, die zugehörigen Aminosäuresequenzen, deren Position innerhalb der P-gp-Sequenz sowie ihre Topologie dargestellt. Alle abgebildeten Peptidsignale sind Übersichtsspektren des Trypsin-In-Gel-

Verdau von P-gp entnommen. Aufgrund von Elektrospray-Ionisation (ESI) als verwendeter Ionisierungsmethode und Aufnahme der Massenspektren im Positivmodus überwogen die zweifach und dreifach positiv geladenen Peptidsignale. Lediglich bei sehr großen Peptiden mit Monoisotopischen Massen von über 2500 Dalton wurden auch vierfach geladene Signale beobachtet. Von allen mehrfach geladenen Peptidsignalen wurden durch Multiplikation der Masse m mit der Ladungszahl z und nachfolgende Subtraktion der erforderlichen Anzahl an Protonen die Monoisotopischen Massen $[M+H]^+$ im einfach positiv geladenen Zustand berechnet (siehe Kapitel 3.4.2).

Tab. 4.1: Peptide aus dem Trypsin-In-Gel-Verdau von P-gp.

Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink dargestellt.

$[M+H]^+$	Sequenz	Position	Topologie
715,42	YMFVR	790-794	ICL 3
805,49	IIGVFTR	735-741	ECL 4
807,44	ELLAYAK	243-249	ICL 2
827,46	QRIAIAR/ QRIAIAR	537-543/ 1182-1188	NBD 1/ NBD 2
831,52	KELEGAGK	888-895	ICL 4
889,45	GSQAQDRK	674-681	Linker NBD 1-TM7
898,50	GAAYEIFK	360-367	Linker TM6-NBD 1
901,52	VVQEALDK	1213-1220	NBD 2
910,50	FYDPLAGK	1086-1093	NBD 2
912,51	TCIVIAHR	1226-1233	H-loop NBD 2
920,54	TVIAFGGQK	263-271	ICL 2
925,44	YSNWLDK	42-48	N-Terminus
928,56	LNVQWLR	1104-1110	NBD 2
936,52	FDTLVGER	520-527	NBD 1
973,54	IDDPETKR	742-749	ECL 4
995,56	SGHKPDNIK	381-389	Linker TM6-NBD 1
1058,62	VVSQEEIVR	1139-1147	NBD 2
1063,51	STTVQLMQR	434-442	Walker A NBD 1
1084,64	RLNVQWLR	1103-1110	NBD 2
1090,56	MLSGQALKDK	878-887	ICL 4
1103,56	SVRGSQAQDR	671-680	Linker NBD 1-TM7
1106,56	NVHFSYPSR	396-404	A-loop NBD 1
1108,58	YNKNLEEK	277-285	EAA-Motiv ICL 2
1123,67	GRTTIVIAHR	579-588	H-loop NBD 1
1132,62	TVVSLTQEQK	906-915	ICL 4
1163,61	IATEAIENFR	896-905	ICL 4
1201,56	EANAYDFIMK	506-515	NBD 1
1201,60	YMFVRSMLR	790-798	ICL 3

4.2.1.1 Trypsin-In-Gel-Verdau von P-gp

1207,55	ENVTMDEIEK	493-502	NBD 1
1234,72	NVHFSYPSRK	396-405	A-loop NBD 1
1236,55	QDVSWFDDPK	799-808	ICL 3
1254,67	EGRTCIVIAHR	1223-1233	H-loop NBD 2
1269,72	AGAVAEVLAAIR	250-262	ICL 2
1277,72	GQTLALVGSSGCGK	1063-1076	Walker A NBD 2
1389,70	EHGTHQQLLAQK	1253-1264	C-Terminus
1479,82	IIDNKPSIDSYSK	368-380	Linker TM6-NBD 1
1499,76	AVKEANAYDFIMK	503-515	NBD 1
1537,91	AKISAAHIIMIEK	1001-1014	Linker TM12-NBD 2
1553,67	SEIDALEMSSNDSR	646-659	Linker NBD 1-TM7
1582,87	EANIHFIESLPNK	1151-1164	NBD 2
1583,86	YGRENVTMDEIEK	490-502	NBD 1
1645,82	EALDESIPPVSFWR	686-699	Linker NBD 1-TM7
1661,84	NADVIAGFDDGVIVEK	594-609	NBD 1/Linker
1676,85	EANAYDFIMKLPK	506-519	NBD 1
1698,97	ILSFTDKELLAYAK (TM4)	235-249	TM4/ICL 2
1768,85	FEHMYAQLQVPYR	916-929	ICL 4
1845,01	NTTGALTTRLANDAAQVK	809-826	ICL 3
1848,01	ELEGAGKIATEAIENFR	889-905	ICL 4
1888,03	LSTIQNADLIVVFQNGR	1234-1250	NBD 2/C-Terminus
1894,89	LYDPTEGMVSVDGQDIR	443-459	NBD 1
2014,96	QEIGWFDVHDVGEINTR	158-174	ICL 1
2115,22	LSTIQNADLIVVFQNGRVK	1234-1252	NBD 2/C-Terminus
2130,07	GLNLKVQSGQTVALVGNSSGCGK	412-433	Walker A NBD 1
2134,91	SDINDTGFFMNLEEDMTR	96-113	ECL 1
2152,03	QDVSWFDDPKNTTGALTTR	799-817	ICL 3
2210,12	QPHILLLDEATSALDTESEK	1193-1212	Walker B/D-loop NBD 2
2249,06	LVTMQTAGNEVELENAADESK	625-645	Linker NBD 1-TM7
2399,32	EIIGVVSQEPVLFATTIAENIR	468-489	Q-loop NBD 1
2643,40	ILLLDEATSALDTESEAVVQVALDK	551-575	Walker B/D-loop NBD 1
2649,34	VQSGQTVALVGNSSGCGKSTTVQLMQR	417-442	Walker A NBD 1
2815,57	FLREIIGVVSQEPVLFATTIAENIR	465-489	Q-loop NBD 1
3092,60	QPHILLLDEATSALDTESEKVVQEALDK	1193-1220	Walker B/D-loop NBD 2
3783,84	LVTMQTAGNEVELENAADESKSEIDALEMSSNDSR	625-659	Linker NBD 1-TM7

Im Anschluss daran wurden diesen Monoisotopischen Massen mit Hilfe des Programms GPMW Version 8.0 [130] auf der Grundlage der unter der Nummer P08183 in der UniProt-Datenbank [131, 132] archivierten Aminosäuresequenz von humanem P-Glykoprotein die passenden Peptidsequenzen innerhalb von P-gp unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Parameter zugeordnet. Dabei wurde durch einen simulierten Verdau von P-gp (in silico-Verdau) mit dem Enzym Trypsin unter Einhaltung der vorgegebenen Parameter eine Liste aller theoretisch möglichen Massen erstellt und daraufhin mit den experimentell gefundenen Massen verglichen. Massenwerte, die

innerhalb einer Toleranzgrenze von 200 ppm gleich waren, wurden als identische Peptidsignale angesehen und mittels GPMW der entsprechenden Aminosäuresequenz in P-gp zugeordnet. Im Zweifelsfall oder bei Massengleichheit - das heißt, wenn zu der betrachteten Masse mehr als eine Aminosäuresequenz innerhalb der P-gp-Sequenz passte - wurde das entsprechende Peptidsignal selektiert und im MS/MS-Modus sequenziert, so dass durch Bestimmung der Abfolge der einzelnen Aminosäuren eine eindeutige Zuordnung der Masse zur richtigen Aminosäuresequenz in P-gp erfolgen konnte.

Bedingt durch die Spaltungsspezifität von Trypsin besteht der C-Terminus der resultierenden Peptide immer aus einer der beiden basischen Aminosäuren Arginin und Lysin. Dies hat zum Vorteil, dass die Auswertung von MS/MS-Spektren erleichtert wird und die Anzahl der theoretisch möglichen Peptide im Vergleich zu unspezifisch spaltenden Enzymen begrenzt ist. Andererseits birgt die ausschließliche Spaltung von Trypsin hinter den polaren Aminosäuren Arginin und Lysin den Nachteil, dass insbesondere die für die Bindung von Substraten und Modulatoren wichtigen lipophilen transmembranären Bereiche von P-gp durch das Fehlen von Schnittstellen wenig bis überhaupt nicht abgedeckt werden.

Betrachtet man die in Tabelle 4.1 aufgeführten Aminosäuresequenzen und deren Position innerhalb der P-gp-Sequenz sowie die im Folgenden gezeigte Abbildung 4.3, wird deutlich, dass alle gebildeten Peptide Bestandteil der extra- und intrazellulären Loop- und Linker-Regionen oder der Nukleotid-Bindungsdomänen sind und die transmembranären Domänen mit Ausnahme der letzten beiden Aminosäuren von TM 4 überhaupt nicht abgedeckt werden. Des Weiteren wird ersichtlich, dass auch in den Loop-Bereichen, Linker-Regionen und Nukleotid-Bindungsdomänen noch ein paar Lücken in der Aminosäuresequenz von P-gp vorhanden sind. Dieses Ergebnis ist aufgrund der Spaltungsexklusivität von Trypsin für die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin nicht verwunderlich und die schlechte Abdeckung der TMDs ein für Membranproteine typisches Phänomen. Bedingt durch das Fehlen von Schnittstellen in den transmembranären Bereichen entstehen voraussichtlich sehr große, teilweise stark hydrophobe Peptide. Diese lassen sich möglicherweise nur schwer aus der Gelmatrix extrahieren, neigen in wässrigen Lösungen eventuell zur Präzipitation, adsorbieren häufiger an die Wände der Gefäße für die Probenvorbereitung und werden dadurch im Massenspektrometer oftmals

4.2.1.1 Trypsin-In-Gel-Verdau von P-gp

nur schlecht ionisiert und detektiert [133]. Aus den genannten Gründen wurde deshalb neben Trypsin die mehr unspezifisch, dafür aber bevorzugt nach hydrophoben aliphatischen und aromatischen Aminosäuren spaltende Protease Chymotrypsin zur Verbesserung der Sequenzabdeckung in den TMDs eingesetzt.

In der Abbildung 4.3 ist die durch den In-Gel-Verdau von P-gp mit Trypsin erzielte Sequenzabdeckung graphisch veranschaulicht. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von humanem P-Glykoprotein. Durch Graufärbung hervorgehoben sind Sequenzabschnitte, welche laut der Uniprot-Datenbank [131, 132] sowie Loo and Clarke [134] den transmembranären Helices zugeordnet werden. Sequenzbereiche, die im Rahmen des Trypsin-In-Gel-Verdaus zweifelsfrei identifiziert und zugeordnet werden konnten, sind in rot dargestellt und betragen 47 % der gesamten P-gp-Sequenz.

1	MDLEGDRNGG	AKKKNFFKLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVFSMF	RYSNWLDKLY	
51	MVVGTLAAII	HGAGLPLMML	VFGEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRSDIND	TM 1
101	TGFFMNEED	MTRYAYYSYG	IGAGLVAAAY	IQVSFWCLAA	GRQIHKIRKQ	TM 2
151	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS	KINEGIGDKI	GMFFQSMATF	TM 3
201	FTGFIVGFTR	GWKLTLVILA	ISPVLGLSAA	VWAKILSSFT	DKELLAYAKA	TM 3 + 4
251	GAVAEVLAA	IRTVIAFGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG	TM 5
301	AAFLLIYASY	ALAFWYGTTL	VLSGEYSIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP	TM 5 + 6
351	SIEAFANARG	AAYEIFKIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIKG	NLEFRNVHFS	
401	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG	QTVALVGNSG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM	
451	VSVDGQDIRT	INVRFLREII	GVVSQEPVLF	ATTIAENIRY	GRENVTMDEI	
501	EKAVKEANAY	DFIMKLPHKF	DTLVGERGAQ	LSGGQKQRIA	IARALVRNPK	
551	ILLLDEATSA	LDTESEAVVQ	VALDKARKGR	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG	
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVTMQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA	
651	LEMSSNDSRS	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPPVSFWRI	
701	MKLNLTWPY	FVVGVFCAII	NGGLQPAFAI	IFSKIIGVFT	RIDDPETKRQ	TM 7
751	NSNLFSLFL	ALGIISFITF	FLQGFTFGKA	GEILTKRLRY	MVFRSMLRQD	TM 8
801	VSWFDDPKNT	TGALTTRLAN	DAAQVKGAIG	SRLAVITQNI	ANLGTGIIIS	TM 9
851	FIYGWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVEMKMLS	GQALKDKKEL	EGSGKIATEA	TM 9 + 10
901	IENFRTVVSL	TQEQKFEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY	TM 11
951	FSYAGCFRFG	AYLVAHKLMS	FEDVLLVFSA	VVFGAMAVGQ	VSSFAPDYAK	TM 11 + 12
1001	AKISAHHIIM	IIEKTPLIDS	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI	
1051	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSGCGKSTVV	QLLERFYDPL	AGKVLLDGKE	
1101	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNSRVV	SQEEIVRAAK	
1151	EANIHFHAFIES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KQRIAIARAL	VRQPHILLLD	
1201	EATSALDTES	EKVVQEALDK	AREGRTCIVI	AHRLSTIQNA	DLIVVFQNGR	
1251	VKEHGTHQQL	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKRQ			

Abb. 4.3: Graphische Darstellung der mittels Trypsin-In-Gel-Verdau abgedeckten Sequenzbereiche von P-gp. Abgebildet ist die Aminosäuresequenz von humanem P-Glykoprotein. Die zwölf transmembranären Helices sind durch Einfärbung in grau hervorgehoben. Sequenzbereiche, die im Rahmen des In-Gel-Verdaus von P-gp mit Trypsin eindeutig identifiziert und zugeordnet werden konnten, sind in rot dargestellt. Die erzielte Sequenzabdeckung beträgt 47 %.

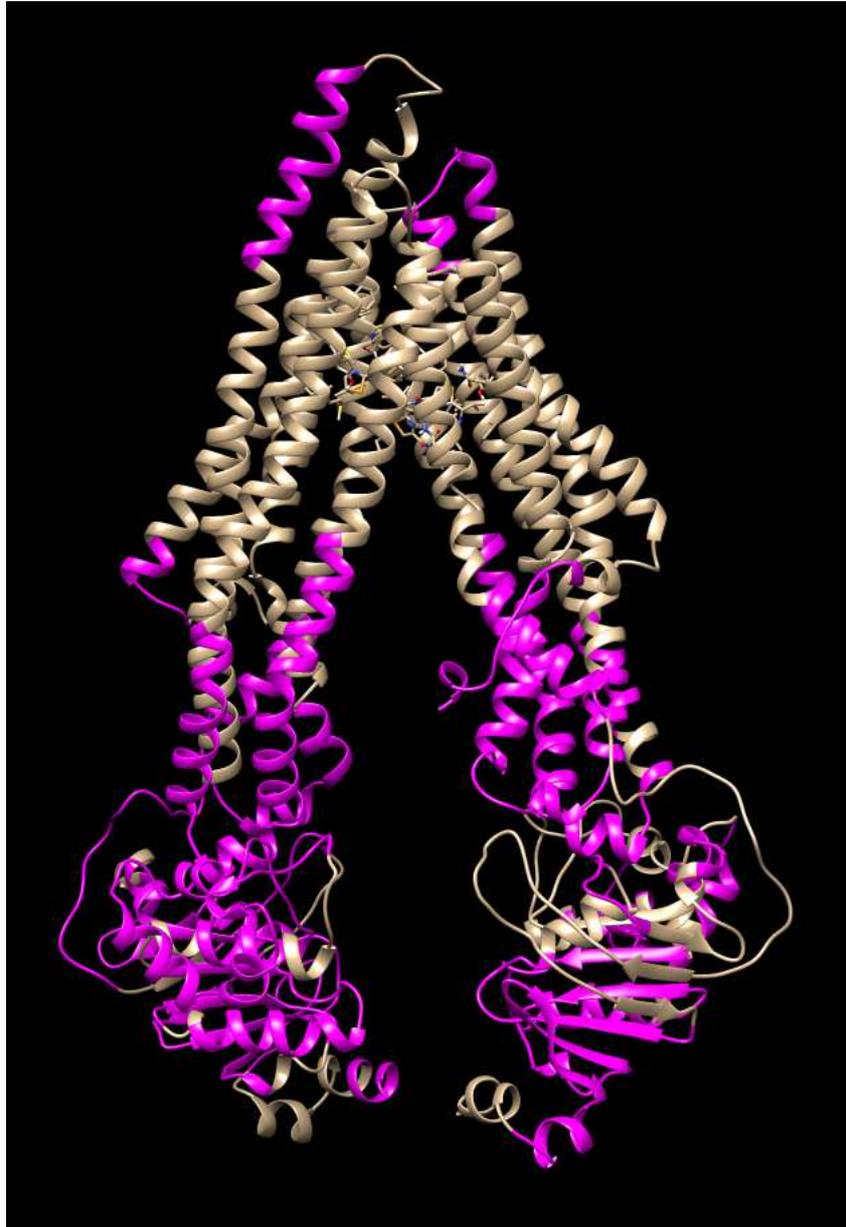


Abb. 4.4: Bildliche Darstellung der durch den Trypsin-In-Gel-Verdau erzielten Sequenzabdeckung von P-gp. Gezeigt ist ein von Melanie Hafner erstelltes Homologiemodell von humanem P-Glykoprotein mit dem gebundenem Liganden QZ59SSS basierend auf der Kristallstruktur von Maus P-gp (PDB ID 4M1M). In pink eingefärbt sind Sequenzabschnitte, die mittels Trypsin-In-Gel-Verdau von P-gp abgedeckt werden konnten. In weiß dargestellt sind die nicht abgedeckten Bereiche von P-gp. Es wird deutlich, dass sämtliche transmembranären Bereiche von der Sequenzabdeckung ausgespart blieben, während die übrigen Regionen sehr gut abgedeckt wurden. Die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung beträgt 47 %.

Es wird deutlich, dass die die Bindungsstellen beinhaltenden transmembranären Bereiche durch die angewandte Analyseverfahren fast überhaupt nicht abgedeckt werden und auch in den übrigen Bereichen noch einige kleinere Lücken in der Aminosäuresequenz vorhanden sind. Die erreichte Sequenzabdeckung ist in den TMDs für die Identifizierung modifizierter Bereiche im Rahmen von Photoaffinitätsmarkierungs-Experimenten viel zu niedrig und sollte darum durch den Einsatz von Enzymen mit besserer Zugänglichkeit zu diesen hydrophoben Bereichen gesteigert werden. Hierfür wurde zunächst die Protease Chymotrypsin ausgewählt, welche eine Präferenz für hydrophobe aliphatische und aromatische Aminosäuren aufweist und C-terminal von Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin Peptidbindungen spaltet.

4.2.1.2 Chymotrypsin-In-Gel-Verdau

Abweichend vom Trypsin-In-Gel-Verdau wurden für den Chymotrypsin-In-Gel-Verdau von P-gp insgesamt drei verschiedene Chymotrypsine der Firmen Sigma-Aldrich und Roche eingesetzt und im Hinblick auf die erzielte Sequenzabdeckung miteinander verglichen.

Der Chymotrypsin-In-Gel-Verdau von P-gp wurde in Analogie zum Trypsin-In-Gel-Verdau entsprechend den Kapiteln 3.2.1.1 und 3.2.1.2 durchgeführt. Dabei wurden die beiden variablen Parameter Verdautemperatur und Enzym : Protein Verhältnis hinsichtlich der bestmöglichen Sequenzabdeckung von P-gp optimiert. So konnte im Falle des als Erstes für den In-Gel-Verdau von P-gp verwendeten „TLCK Treated Chymotrypsins“ von Sigma-Aldrich der zuvor überwiegende Eigenverdau des Enzyms durch Erniedrigung der Verdautemperatur von 37 °C auf 30 °C stark verringert werden. Trotz dieser Verbesserung resultierten aus dem In-Gel-Verdau von P-gp mit dem genannten Chymotrypsin insgesamt nur fünf Peptide, woraus sich schlussfolgern lässt, dass dieses Chymotrypsin nicht für den In-Gel-Verdau von P-gp geeignet ist.

Aus diesem Grund wurde als nächstes ein „Sequencing Grade Chymotrypsin“ von der Firma Sigma-Aldrich bezogen und für den In-Gel-Verdau von P-gp eingesetzt. Entsprechend den beiden verwendeten Verdauprotokollen wurden Enzym : Protein

Verhältnisse von 2 : 1 (Protokoll Dr. Metzger) bzw. 1,25 : 1 und 0,125 : 1 (Protokoll Dr. Hess) gewählt. Durch Verringerung der Menge an Chymotrypsin von 1,25 µg auf 0,125 µg konnte auch in diesem Fall der Eigenverdau des Enzyms deutlich zurückgedrängt und zugunsten des Verdau von P-gp verschoben werden. Demnach ist für den In-Gel-Verdau von P-gp eine Chymotrypsinmenge von 0,125 µg (Enzym : Protein Verhältnis = 1 : 8) ausreichend und eine Erhöhung der Enzymmenge führt nicht zu einer verbesserten Sequenzabdeckung von P-gp.

Ein Vergleich der mit den beiden unterschiedlichen Verdauprotokollen erzielten Ergebnisse zeigte, dass analog dem Trypsin-In-Gel-Verdau im Wesentlichen dieselben Peptide gebildet wurden und die beiden Protokolle somit im Hinblick auf die erreichte Sequenzabdeckung von P-gp äquivalent sind. Deshalb wurden die mit den beiden Verdauprotokollen erzielten Ergebnisse zusammengefasst und in der nachfolgenden Tabelle 4.2 dargestellt.

Tab. 4.2: Peptide aus dem In-Gel-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin der Firma Sigma-Aldrich.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
1057,73	AKAGAVAEVL	248-258	ICL 2
1151,64	ATTIAENIRY	481-490	NBD 1
1158,67	DTLVGERGAQL	521-531	ABC-Motiv NBD 1
1291,77	IIEKTPLIDSY	1011-1021	Linker/NBD 2
1412,92	NYPTRPDIPVLQ	1043-1054	A-loop NBD 2
1618,89	DPTEGMVSVDGQDIR	445-459	NBD 1
1619,80	STKEALDESIPPVSF	683-697	Linker NBD 1-TM7
1634,85	DPTEGMoxVSVDGQDIR	445-459	NBD 1
1699,18	LREIIGVVSQEPVLF	466-480	Q-loop NBD 1
1725,81	STEGLMoxPNTLEGVTF	1022-1037	Linker/NBD 2
1891,04	LLDEATSALDTESEAVVQ	553-570	Walker B/D-loop NBD 1
2174,26	LLDEATSALDTESEAVVQVAL	553-573	Walker B/D-loop NBD 1
2261,31	LLDEATSALDTESEKVVQEAL	1198-1218	Walker B/D-loop NBD 2
2365,18	DPTEGMoxVSVDGQDIRTINVRF	445-465	NBD 1
2486,48	ILLLDEATSALDTESEKVVQEAL	1196-1218	Walker B/D-loop NBD 2
2693,40	QTAGNEVELENAADESKSEIDALEM	629-653	Linker NBD 1-TM7
2729,45	ANAGNLEDLMSNITNRSINDTGFF	80-104	ECL 1
2745,44	ANAGNLEDLMoxSNITNRSINDTGFF	80-104	ECL 1

Alle gezeigten Monoisotopischen Massen wurden in Analogie zum bereits beschriebenen Trypsin-In-Gel-Verdau (siehe Kapitel 4.2.1.1) berechnet. Durch Einbeziehung der Spaltungspräferenz von Chymotrypsin für die hydrophoben aliphatischen und aromatischen Aminosäuren Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin konnte eine Prioritätenliste aller möglichen Aminosäuresequenzen erstellt werden. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei Chymotrypsin im Gegensatz zu Trypsin aber um eine eher unspezifische Protease handelt, wurde zur zweifelsfreien Identifizierung der korrekten Aminosäuresequenz von jedem Peptidsignal ein MS/MS-Spektrum aufgenommen und die Abfolge der einzelnen Aminosäuren des Peptids bestimmt.

Betrachtet man die in Tabelle 4.2 dargestellten Aminosäuresequenzen und deren Topologie innerhalb von P-gp wird ersichtlich, dass alle entstandenen Peptide Bestandteil der extra- und intrazellulären Loop- und Linker-Regionen oder der Nukleotid-Bindungsdomänen sind und die transmembranären Domänen leider überhaupt nicht abgedeckt wurden. Des Weiteren wird deutlich, dass auch in den Loop-Bereichen, Linker-Regionen und Nukleotid-Bindungsdomänen noch viele Lücken aus nicht abgedeckten Aminosäuren vorhanden sind. Die erzielte Sequenzabdeckung von P-gp beträgt lediglich 216 von 1280 Aminosäuren = 17 % und liegt damit weit unter der mit Trypsin erreichten Sequenzabdeckung (47 %). Mit einem derartig schlechten Ergebnis war im Voraus nicht zu rechnen, da für das Enzym genügend Schnittstellen sowohl in den transmembranären Bereichen als auch in den Loop- und Linker-Regionen sowie in den NBDs vorhanden sind. Mögliche Ursachen für die niedrige Sequenzabdeckung können eine nicht vollständige Extraktion der Peptide aus der Gelmatrix, eine schlechte Zugänglichkeit für das Enzym durch starke Faltung des Proteins, eine unzureichende Inkubationszeit, eine zu geringe Aktivität des Enzyms, die Adsorption der entstandenen Peptide an die Wände der Gefäße für die Probenvorbereitung oder eine Kombination der genannten Faktoren sein. Viele der genannten Parameter, die als mögliche Gründe für die schlechte Sequenzabdeckung in Frage kommen, wurden bereits optimiert. So wurde durch mehrere sequenzielle Elutionsschritte versucht, die Extraktion der Peptide aus der Gelmatrix zu verbessern. Des Weiteren wurde durch Variation des Enzym : Protein Verhältnisses und der Inkubationszeit probiert, eine höhere Anzahl von Peptiden zu generieren. Alle Optimierungsversuche eingeschlossen, konnte für die Sequenzabdeckung

jedoch lediglich ein maximaler Wert von 17 % erzielt werden, wobei transmembranäre Bereiche ganz ausgespart blieben. Aus diesem Grund wurde zur weiteren Verbesserung der Sequenzabdeckung ein zweites Sequencing Grade Chymotrypsin von der Firma Roche bezogen und für den In-Gel-Verdau von P-gp eingesetzt.

Der Verdau von P-gp mit dem neuen Chymotrypsin erfolgte entsprechend den Angaben in der Produktinformation bei einem Temperatur-Optimum von 25 °C . Auch hier wurde das Enzym : Protein Verhältnis variiert und die beiden Verdauprotokolle auf Äquivalenz bzw. Überlegenheit untersucht. Es zeigte sich, dass wiederum keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der resultierenden Peptide bestanden. Deshalb wurden die Ergebnisse beider Verdaustrategien in einer gemeinsamen Tabelle (Tab. 4.3) zusammengefasst. Die Berechnung der dargestellten Monoisotopischen Massen sowie ihre Zuordnung zu den entsprechenden Aminosäuresequenzen innerhalb von P-gp erfolgten hierbei wie zuvor beschrieben.

Im Vergleich zur vorhergehenden Tabelle 4.2 mit den Ergebnissen des In-Gel-Verdaus von P-gp mit Sequencing Grade Chymotrypsin der Firma Sigma-Aldrich fällt auf, dass von den gebildeten Peptiden bereits einige bekannt sind. Dies lässt auf eine gewisse Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse schließen. Erfreulich ist, dass unter den abgedeckten Regionen erstmalig auch einige transmembranäre Bereiche (TM1, TM6 und TM9) enthalten sind, was gegenüber dem Trypsin-In-Gel-Verdau und den vorherigen Chymotrypsin-In-Gel-Verdaus einer wesentlichen Verbesserung entspricht. Jedoch überwiegen noch immer die Loop- und Linker-Regionen sowie die NBD-Bereiche. Insgesamt konnten 362 von 1280 Aminosäuren abgedeckt und die Sequenzabdeckung damit von 17 % auf 28 % gesteigert werden.

Festzuhalten ist, dass durch das Sequencing Grade Chymotrypsin von Roche im Vergleich zum Sequencing Grade Chymotrypsin von Sigma-Aldrich eine deutliche Verbesserung der Sequenzabdeckung von P-gp sowohl in den transmembranären Bereichen als auch in den Loop-, Linker- und NBD-Regionen erreicht werden konnte. Gegenüber dem In-Gel-Verdau mit Trypsin wurde trotz der insgesamt niedrigeren Sequenzabdeckung eine deutliche Erhöhung der transmembranären Sequenzabdeckung verzeichnet. Die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung von 28 % ist jedoch für die erfolgreiche Detektion von Photoaffinitätsmarkierungen noch zu gering. Aus diesem Grund wurden in der Folge zur

weiteren Verbesserung der Sequenzabdeckung kombinierte In-Gel-Verdau von P-gp mit den Enzymen Trypsin und Chymotrypsin durchgeführt und ihre Auswirkung auf die Sequenzabdeckung untersucht.

Tab. 4.3: Peptide aus dem In-Gel-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin der Firma Roche. Farbkodierung: Aminosäuresequenzen im Bereich der transmembranären Domänen sind in pink dargestellt. Neue Peptidsequenzen sind in blau eingefärbt. Bereits bekannte Peptide sind in schwarz abgebildet.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
805,52	QLLERF	1081-1086	NBD 2
890,54	AFIESLPN	1156-1163	NBD 2
	LTDDVSKI	175-182	ICL 1
932,56	LLDEATSAL	553-561/1198-1206	Walker B/D-loop
	LLLDEATSA	552-560/1197-1205	NBD 1 und 2
	VSQEPILF	1116-1123	Q-loop NBD 2
939,58	LAQKGIYF	1261-1268	C-Terminus
	GAKKKNFF	10-17	N-Terminus
961,64	AAIRTVIAF	259-267	ICL 2
	AIIHGAGLPL (TM1)	58-67	TM1
1016,62	VDGQDIRTI	453-461	NBD 1
1032,68	AAIIHGAGLPL (TM1)	57-67	TM1
1038,62	LTVFFSVLI (TM6)	332-340	TM6
1042,60	EAKRIGIKK	283-291	EAA-Motiv ICL 2
	KEANIHAFI	1150-1158	NBD 2
1057,66	AKAGAVAEVL	248-258	ICL 2
2267,32	GRENVTMDEIEKAVKEANAY	491-510	NBD 1
1699,09	LREIIGVVSQEPVLF	466-480	Q-loop NBD 1
1158,68	DTLVGERGAQL	521-531	ABC-Motiv NBD 1
1171,62	RSDINDTGFF	95-104	ECL 1
1178,64	FDDPKNTTGAL	804-814	ICL 3
1192,66	SVGQASPSIEAF (TM6)	344-355	TM6/Linker
1207,78	GGQKELERY	268-277	ICL 2
1291,78	IIEKTPLIDSY	1011-1021	NBD 2
1319,78	STIQNADLIVVF	1235-1246	NBD 2
1347,76	DTESEKVVQEAL	1207-1218	D-loop NBD 2
1392,85	KIIDNKPSIDSY	367-378	Linker TM6-NBD 1
1470,91	ANDAAQVKGAIGSRL (TM9)	819-833	ICL 3/TM9
1547,95	AIARALVRNPKILL	540-553	Walker B NBD 1
1582,90	NYTPRPDIPVLQGL	1043-1056	A-loop NBD 2
1699,08	LREIIGVVSQEPVLF	466-480	Q-loop NBD 1
1891,02	LLDEATSALDTESEAVVQ	553-570	Walker B/D-loop NBD 1
1891,06	IVSQEPILFDCSIAENI	1115-1131	Q-loop NBD 2
2261,26	LLDEATSALDTESEKVVQEAL	1198-1218	Walker B/D-loop NBD 2
2349,28	DPTEGMVSVDGQDIRTINVRF	445-465	NBD 1
2693,41	QTAGNEVELENAADESKSEIDALEM	629-653	Linker NBD 1-TM7

4.2.1.2 Chymotrypsin-In-Gel-Verdau

In der Abbildung 4.5 ist die durch den In-Gel-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin erzielte Sequenzabdeckung graphisch veranschaulicht. Sequenzbereiche, die im Rahmen des In-Gel-Verdau mit Sequencing Grade Chymotrypsin der Firma Sigma-Aldrich zweifelsfrei identifiziert und zugeordnet werden konnten, sind in grün eingefärbt. Aminosäuresequenzen, welche durch den In-Gel-Verdau mit Sequencing Grade Chymotrypsin der Firma Roche eindeutig identifiziert und zugeordnet werden konnten, sind in blau dargestellt. Überlappende Regionen, die mit beiden Chymotrypsinen abgedeckt werden konnten, sind in rot abgebildet.

1	MDLEGDRNGG	AKKKNFFKLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVFMSF	RYSNWLDKLY	
51	MVVGTLAAII	HGAGLPLMML	VFGEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRSDIND	TM 1
101	TGFFMNLEED	MTRYAYYYSG	IGAGVLVAAY	IQVSWFCLAA	GRQIHKIRKQ	TM 2
151	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS	KINEGIGDKI	GMFFQSMATF	TM 3
201	FTGFIVGFTR	GWKLTLVILA	ISPVLGLSAA	VWAKILSSFT	DKELLAYAKA	TM 3 + 4
251	GAVAEVLAA	IRTVIAFGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG	TM 5
301	AAFLLIYASY	ALAFWYGTTL	VLSGEYSIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP	TM 5 + 6
351	SIEAFANARG	AAYEIFKIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIKG	NLEFRNVHFS	
401	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG	QTVALVGNSG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM	
451	VSVDGQDIRT	INVRFLREII	GVVSQEPVLF	ATTIAENIRY	GRENVTMDEI	
501	EKAVKEANAY	DFIMKLPHKF	DTLVGERGAQ	LSGGQKQRIA	IARALVRNPK	
551	ILLLDEATSA	LDTESEAVVQ	VALDKARKGR	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG	
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVTMQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA	
651	LEMSSNDSRS	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPPVSFWRI	
701	MKLNLTWPY	FVVGVFCAII	NGGLQPAFAI	IFSKIIGVFT	RIDDPETKRQ	TM 7
751	NSNLFSLFL	ALGIISFITF	FLQGFTFGKA	GEILTKRLRY	MVFRSMLRQD	TM 8
801	VSWFDDPKNT	TGALTTRLAN	DAAQVKGAIG	SRLAVITQNI	ANLGTGIIIS	TM 9
851	FIYGWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVEMKMLS	GQALKDKKEL	EGSGKIATEA	TM 9 + 10
901	IENFRTVVSL	TQEQKFEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY	TM 11
951	FSYAGCFRFG	AYLVAHKLMS	FEDVLLVFSA	VVFGAMAVGQ	VSSFAPDYAK	TM 11 + 12
1001	AKISAHHIIM	IEKTPPLIDS	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI	
1051	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSGCGKSTVV	QLLERFYDPL	AGKVLDDGKE	
1101	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNSRVV	SQEEIVRAAK	
1151	EANIHFIES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KORIAIARAL	VRQPHLLLD	
1201	EATSALDTES	EKVVQEALDK	AREGRTCIVI	AHRLSTIQNA	DLIVVFQNGR	
1251	VKEHGTHQQL	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKRQ			

Abb. 4.5: Graphische Darstellung der mittels Chymotrypsin-In-Gel-Verdau erzielten Sequenzabdeckung von P-gp. Sequenzbereiche, die durch den In-Gel-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin der Firma Sigma-Aldrich zuverlässig abgedeckt wurden, sind in grün dargestellt. Sequenzen, die im Rahmen des In-Gel-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin der Firma Roche eindeutig identifiziert werden konnten, sind in blau abgebildet. Überlappende Aminosäuren, welche durch beide In-Gel-Verdau abgedeckt wurden, sind in rot eingefärbt. Die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung beträgt 422 von 1280 Aminosäuren = 33 %.

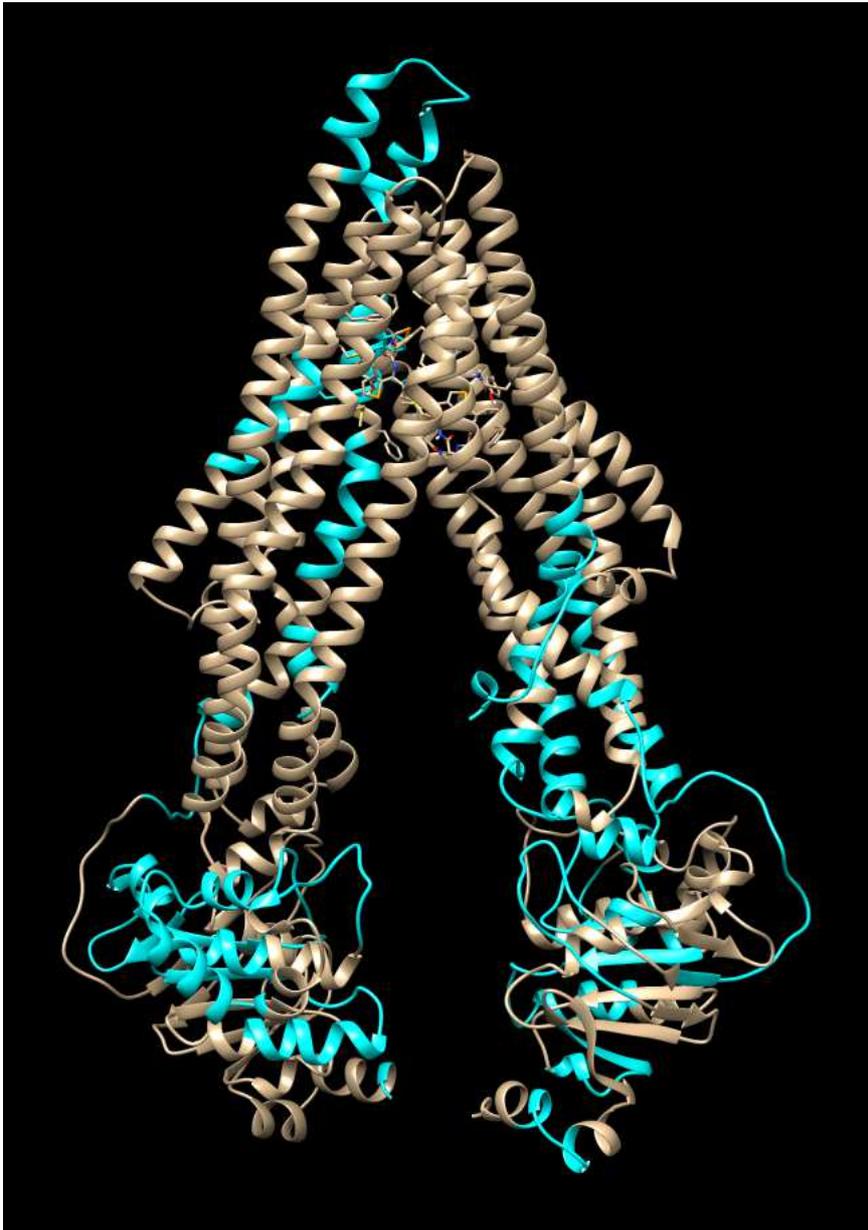


Abb. 4.6.: Bildliche Darstellung der durch den Chymotrypsin-In-Gel-Verdau erzielten Sequenzabdeckung von P-gp. In türkis eingefärbt sind Sequenzabschnitte, die mittels Chymotrypsin-In-Gel-Verdau von P-gp abgedeckt werden konnten. In weiß dargestellt sind die nicht abgedeckten Bereiche von P-gp. Es wird deutlich, dass im Gegensatz zum Trypsin-In-Gel-Verdau auch kleine Teile der transmembranären Domänen (TM1, TM6 und TM9) mit abgedeckt wurden. Die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung beträgt 33 %.

Die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung von P-gp beträgt 422 von 1280 Aminosäuren = 33 %. Es wird deutlich, dass die die Bindungsstellen beinhaltenden transmembranären

Bereiche durch die angewandte Analysemethode bisher nur wenig abgedeckt wurden und auch in den übrigen Bereichen noch einige größere Lücken in der Aminosäuresequenz vorhanden sind. Die erreichte Sequenzabdeckung ist - insbesondere in den TMDs - für die Identifizierung modifizierter Bereiche im Rahmen von Photoaffinitätsmarkierungs-Experimenten noch zu niedrig. Zur Erhöhung der Sequenzabdeckung wurden deshalb im Folgenden Kombinations-Verdau von P-gp In-Gel mit den beiden Enzymen Trypsin und Chymotrypsin in verschiedenen Konstellationen durchgeführt und ausgewertet.

4.2.1.3 Kombiniertes In-Gel-Verdau von P-gp

Zur Erhöhung der Sequenzabdeckung von P-gp - insbesondere in den transmembranären Domänen - wurden zwei einzelne In-Gel-Verdau miteinander kombiniert. Dabei wurden sowohl unterschiedliche Enzymkombinationen als auch Reihenfolgen, sowie abgeänderte Enzym : Protein Verhältnisse der einzelnen Verdau untersucht. Folgende Kombinationen des In-Gel-Verdau wurden durchgeführt:

- a) 1. Trypsin-In-Gel-Verdau / 2. Chymotrypsin-In-Gel-Verdau
- b) 1. Chymotrypsin-In-Gel-Verdau / 2. Trypsin-In-Gel-Verdau
- c) 1. Trypsin-In-Gel-Verdau / 2. Trypsin-In-Gel-Verdau
- d) 1. Chymotrypsin-In-Gel-Verdau / 2. Chymotrypsin-In-Gel-Verdau

Dabei wurde der erste In-Gel-Verdau stets mit dem entsprechenden Enzym nach einem der beiden in Kapitel 3.2.1.1 bzw. 3.2.1.2 beschriebenen Protokolle durchgeführt. Nach der Extraktion der resultierenden Peptide aus den Gelstücken wurden die peptidhaltigen Überstände in einem beschrifteten Eppendorf LoBind® Tube gesammelt, die Gelstücke in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und mit dem zweiten In-Gel-Verdau begonnen. Hierbei wurden die Entfärbe- und Waschschriffe des ersten In-Gel-Verdau weggelassen und direkt mit der Rehydratisierung der Gelstücke und der Zugabe der Enzym-Lösung fortgefahren. Die Inkubation über Nacht beim jeweiligen Temperatur-Optimum des verwendeten Enzyms und die sich anschließende Extraktion der entstandenen Peptide aus den Gelstücken erfolgten analog dem ersten In-Gel-Verdau wie in Kapitel 3.2.1.1

bzw. 3.2.1.2 erläutert. Die resultierenden peptidhaltigen Überstände beider In-Gel-Verdaus wurden abschließend im selben beschrifteten Eppendorf LoBind® Tube vereinigt, in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene eingeeengt und nach Entsalzung massenspektrometrisch analysiert.

Die Auswertung der unterschiedlichen Kombinations-Verdaus ergab, dass verglichen mit den separat durchgeführten Trypsin- und Chymotrypsin-In-Gel-Verdaus von P-gp so gut wie keine neuen Peptide generiert werden konnten. Die wenigen, im Zuge der Kombinations-Verdaus neu entstandenen Peptide, überlappten allesamt mit den bereits aus den einzelnen Trypsin- bzw. Chymotrypsin-In-Gel-Verdaus bekannten Peptiden, so dass insgesamt keine nennenswerte Verbesserung der Sequenzabdeckung erreicht werden konnte. Dabei wirkten sich bedauerlicherweise auch die im Rahmen der Kombinations-Verdaus unternommenen Optimierungsversuche wie zum Beispiel veränderte Enzym : Protein Verhältnisse, Reihenfolgen der einzelnen In-Gel-Verdaus oder Enzymkombinationen nicht positiv auf die Sequenzabdeckung von P-gp aus. Aus den erzielten Ergebnissen lässt sich somit schlussfolgern, dass die Kombination der einzelnen Trypsin- bzw. Chymotrypsin-In-Gel-Verdaus von P-gp miteinander gegenüber den separat durchgeführten Trypsin- und Chymotrypsin-In-Gel-Verdaus von P-gp keinen Vorteil im Hinblick auf die Sequenzabdeckung mit sich bringt.

4.2.2 In-Lösung-Verdau von P-gp

Aufgrund der Tatsache, dass die mittels In-Gel-Verdau von P-gp mit den beiden Enzymen Trypsin und Chymotrypsin erzielte Sequenzabdeckung - insbesondere in den transmembranären Domänen - noch größere Lücken aufwies und auch ein kombinierter In-Gel-Verdau keine nennenswerte Verbesserung brachte, wurde als Alternative ein In-Lösung-Verdau von P-gp mit den Enzymen Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin, Elastase, Proteinase K und Thermolysin sowie dem chemischen Agens Bromcyan durchgeführt.

Gegenüber dem In-Gel-Verdau besitzt der In-Lösung-Verdau einige wesentliche Vorteile. So ist beispielsweise der Zeitaufwand für einen In-Lösung-Verdau von P-gp deutlich

geringer als für einen In-Gel-Verdau, da für letzteren zuerst ein SDS-PAGE-Gel angefertigt, die P-gp-Bande durch Anfärbung detektiert, ausgeschnitten, wieder entfärbt und gewaschen werden muss, bevor der eigentliche Verdau mit dem entsprechenden Enzym über Nacht erfolgen kann. Des Weiteren müssen die entstandenen Peptide beim In-Gel-Verdau durch mehrere Elutionsschritte aus der Gelmatrix extrahiert werden, was gerade bei sehr großen und hydrophoben Peptiden zum Problem werden kann. Ein Vorteil des In-Gel-Verdaus im Vergleich zum In-Lösung-Verdau ist dagegen die Tatsache, dass durch den Zusatz von SDS eine Entfaltung des Proteins durch die denaturierenden Eigenschaften des Detergens stattfindet und damit eine bessere Zugänglichkeit für die Enzyme gegeben sein sollte. Allerdings besteht auch im Rahmen des In-Lösung-Verdaus die Möglichkeit, durch Hitzedenaturierung oder den Zusatz von mit der Massenspektrometrie kompatiblen Detergenzien, eine Entfaltung des Proteins und damit eine Verbesserung der Zugänglichkeit für die Enzyme zu erreichen. Die Auswirkungen der Hitzedenaturierung und des Zusatzes massenkompatibler Detergenzien auf die Sequenzabdeckung von P-gp in Kombination mit dem In-Lösung-Verdau wurden in der vorliegenden Arbeit für bestimmte Enzyme ebenfalls untersucht.

In einem ersten Versuch wurde ein In-Lösung-Verdau von P-gp mit der Protease Trypsin in Anlehnung an ein Standardprotokoll von Dr. Sabine Metzger (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt und die resultierenden Peptide im Folgenden mit denjenigen des Trypsin-In-Gel-Verdaus verglichen. Da die erzielten Ergebnisse vielversprechend waren, wurden im Anschluss daran weitere In-Lösung-Verdaus von P-gp mit den bereits erwähnten übrigen Verdau-Reagenzien durchgeführt.

4.2.2.1 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp

Der In-Lösung-Verdau von P-gp mit der Standardprotease Trypsin wurde entsprechend Kapitel 3.2.2.1 bei einer Temperatur von 37 °C (Temperatur-Optimum des Enzyms) über eine Zeit von 2,5 Stunden durchgeführt und durch zehnminütiges Erhitzen auf 95 °C gestoppt. Die gebildeten Peptide wurden anschließend in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und nach der Aufbereitung für die massenspektrometrische Analyse mittels

ESI-MS analysiert.

Die nachfolgende Tabelle 4.4 zeigt die im Rahmen des Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp erzeugten Peptide. Der Umstand, dass es für Trypsin nur zwei spezifische Schnittstellen (C-terminal von Arginin und Lysin) gibt und diese nicht gleichmäßig über die gesamte P-gp-Aminosäuresequenz verteilt sind, begründet die Entstehung sowohl sehr kleiner als auch sehr großer Peptide. So beläuft sich die Masse des kleinsten gebildeten Peptids auf 715,38 Dalton und die des größten Peptids auf 3319,88 Dalton. Betrachtet man die Positionen der resultierenden Peptide innerhalb der P-gp-Aminosäuresequenz, wird deutlich, dass mit Ausnahme kleiner Teile von TM1, TM4, TM8 und TM10 überwiegend Bereiche außerhalb der transmembranären Domänen abgedeckt werden konnten. In den Loop- und Linkerregionen sowie den Nukleotid-Bindungsdomänen ist die Sequenzabdeckung äußerst hoch und es gibt keine nennenswerten Lücken, während es sich in den transmembranären Domänen genau umgekehrt verhält. Dieses Resultat war gewissermaßen zu erwarten und bestätigt die Ergebnisse des Trypsin-In-Gel-Verdau, wobei jedoch sowohl die insgesamt erzielte als auch die transmembranäre Sequenzabdeckung des Trypsin-In-Lösung-Verdau sichtlich höher ausfallen als diejenigen des Trypsin-In-Gel-Verdau. Insgesamt konnten mit dem Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp 776 von 1280 Aminosäuren = 61 % abgedeckt werden, mit dem Trypsin-In-Gel-Verdau von P-gp dagegen nur 47 %.

Tab. 4.4: Peptide aus dem In-Lösung-Verdau von P-gp mit Trypsin.

Farbkodierung: Transmembranäre Bereiche sind in pink eingefärbt. Sequenzbereiche, die durch Zusatz von 10 % Methanol zum Verdau-Puffer abgedeckt wurden, sind in grün dargestellt. In blau abgebildet sind Sequenzen, die durch Hitzedenaturierung abgedeckt werden konnten.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
715,38	YMFVR	790-794	ICL 3
731,38	AGEILTK	780-786	ICL 3
777,42	LTDDVSK	175-181	ICL 1
805,50	IIGVFTR	735-741	ECL 4
847,48	MLSGQALK	878-885	ICL 4
859,48	NLEEAKR	280-286	EAA-Motiv ICL 2
898,48	GAAYEIFK	360-367	Linker TM6-NBD 1
898,62	ILKGLNLK	409-416	NBD 1

4.2.2.1 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp

910,48	FYDPLAGK	1086-1093	NBD 2
920,54	TVIAFGGQK	263-271	ICL 2
928,56	LNQVWLR	1104-1110	NBD 2
929,52	LANDAAQVK	818-826	ICL 3
934,50	NTTGALTTR	809-817	ICL 3
943,44	GNHDELMK	610-617	NBD 2/Linker
972,60	LLFLALGII (TM8)	757-765	TM8
973,58	IDDPETKR	742-749	ECL 4
1005,60	FGAYLVAHK	959-967	ECL 6
1014,67	VLLDGKEIK	1094-1102	NBD 2
1018,63	TINVRFLR	460-467	NBD 1
1024,57	NFFKLNNK	15-22	N-Terminus
1044,62	STVVQLLER	1077-1085	Walker A NBD 2
1048,63	TVIAFGGQKK	263-272	ICL 2
1049,68	QFFHAIMR	150-157	ICL 1
1058,58	VVSQEEIVR	1139-1147	NBD 2
1063,60	STTVQLMQR	434-442	Walker A NBD 1
1074,58	DKKELEGAGK	886-895	ICL 4
1079,64	STTVQLMoxQR	434-442 + Ox.	Walker A NBD 1
1106,54	NVHFSYPSR	396-404	A-loop NBD 1
1123,67	GRTTIVIAHR	579-588	H-loop NBD 1
1128,64	VVQEALDKAR	1213-1222	NBD 2
1132,62	TVVSLTQEQQ	906-915	ICL 4
1163,65	IATEAIENFR	896-905	ICL 4
1177,69	KQFFHAIMR	149-157	ICL 1
1178,71	VVGTAAIIHGAG (TM1)	52-64	TM 1
	VVSLTQEQQF	907-916	ICL 4
1185,64	LDGKEIKRLN	1096-1105	NBD 2
	VQVALDKARKG	569-579	NBD 1
	ANAYDFIMKL	507-516	NBD 1
1200,58	GNHDELMKEK	610-619	NBD 1/Linker
1201,58	EANAYDFIMK	506-515	NBD 1
1207,74	ENVTMDEIEK	493-502	NBD 1
1218,70	MLSGQALKDKK	878-888	ICL 4
1234,64	NVHFSYPSRK	396-405	A-loop NBD 1
1236,56	QDVSWFDDPK	799-808	ICL 3
1269,76	AGAVAEVLAAIR	250-262	ICL 2
1291,78	AGAVAEVLAAIR	250-262 + Na ⁺	ICL 2
1291,76	AGAVAEVLAAIR	250-262 + Na ⁺	ICL 2
1298,70	KPTVSVFSMFR	31-41	N-Terminus
1328,76	VVSQEEIVRAAK	1139-1150	NBD 2
1338,82	ISAAHIIMIEK	1003-1014	Linker/NBD 2
1354,75	ISAAHIIMoxIEK	1003-1014 + Ox.	Linker/NBD 2
1411,78	LPHKFDTLVGER	516-527	NBD 1
1470,80	LANDAAQVKGAIGSR	818-832	ICL 3
1479,77	IIDNKPSIDSYSK	368-380	Linker/NBD 1
1487,76	GIYFSMVSQAGTK	1265-1278	C-Terminus
1499,77	AVKEANAYDFIMK	503-515	NBD 1
1505,80	ENVTMDEIEKAVK	493-505	NBD 1
1507,90	PDIPVLQGLSLEVK	1048-1061	NBD 2
1553,68	SEIDALEMSSNDSR	646-659	NBD 1/Linker
1555,96	EKKPTVSVFSMFR	29-41	N-Terminus

4.2.2.1 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp

1582,84	EANIHFIESLPNK	1151-1164	NBD 2
1583,83	YGRENVTMDEIEK	490-502	NBD 1
1604,82	VQSGQTVALVGNSSGCGK	417-433	Walker A NBD 1
1643,89	GIYFSMVSQAGTKR	1265-1279	C-Terminus
1645,87	EALDESIPPVSFWR	686-699	Linker
1661,89	NADVIAGFDDGVIVEK	594-609	NBD 1
1667,83	EALDESIPPVSFWR	686-699 + Na ⁺	Linker
1675,96	YNKNLEEAKRIGIK	277-290	EAA-Motiv ICL 2
1677,10	VVEMKMLSGQALKDK (TM10)	873-887	TM10/ICL 4
1683,94	NADVIAGFDDGVIVEK	594-609 + Na ⁺	NBD 1
1683,94	KEKKPTVSVFSMFR	28-41	N-Terminus
1683,96	GTQLSGGQKQRIAIAR	1173-1188	ABC-Motiv NBD 2
1698,94	ILSSFTDKELLAYAK (TM4)	235-249	TM4/ICL 2
1711,90	SGHKPDNIKGNLEFR	381-395	Linker/NBD 1
1731,94	STRRSVRGSQAQDRK	667-681	Linker
1768,90	FEHMYAQLQVPYR	916-929	ICL 4
1847,95	ELEGAGKIATEAIENFR	889-905	ICL 4
1888,06	LSTIQNADLIVVFQNGR	1234-1250	NBD 2
1888,18	LSTIQNADLIVVFQNGR	1234-1250	NBD 2
1894,93	LYDPTEGMVSDGQDIR	443-459	NBD 1
1911,13	LSTIQNADLIVVFQNGR	1234-1250 + Na ⁺	NBD 2
1917,04	LYDPTEGMVSDGQDIR	443-459 + Ox.	NBD 1
1926,13	LYDPTEGMVSDGQDIR	443-459 + Na ⁺	NBD 1
1927,06	LSTIQNADLIVVFQNGR	1234-1250 + Na ⁺ /Ox.	NBD 2
1933,00	DKKEKKPTVSVFSMFR	26-41	N-Terminus
2014,99	LYDPTEGMVSDGQDIR	443-459 + Na ⁺ /Ox.	NBD 1
2018,04	QEIGWFDVHDVDELNTR	158-174	ICL 1
2058,16	EALDESIPPVSFWRIMK	686-702	Linker
2062,06	ELLAYAKAGAVAEVLAAR	243-262	ICL 2
2075,08	EANIHFIESLPNKYSTK	1151-1168	NBD 2
2130,14	LSTKEALDESIPPVSFWR	682-699	Linker
2134,96	GLNLKVQSGQTVALVGNSSGCGK	412-433	Walker A NBD 1
2152,00	SDINDTGFFMNLEEDMTR	96-113	ECL 1
2210,11	QDVSWFDDPKNTTGALTTR	799-817	ICL 3
2239,12	QPHILLDEATSALDTESEK	1193-1212	Walker B/D-loop NBD 2
2249,17	FEHMYAQLQVPYRNSLR	916-933	ICL 4
2359,28	LVTMQTAGNEVELENAADESK	625-645	NBD 1/Linker
2399,28	GAAYEIFKIIDNKPSIDSYK	360-380	Linker/NBD 1
2431,34	EIIGVVSQEPVLFATTIAENIR	468-489	Q-loop NBD 1
2436,32	KGQTLALVGSSGCGKSTVVQLLER	1062-1085	Walker A NBD 2
2437,27	EIIGVVSQEPVLFATTIAENIR	468-489 + Na ⁺ /Ox.	Q-loop NBD 1
2456,28	EIIGVVSQEPVLFATTIAENIR	468-489 + Na ⁺	Q-loop NBD 1
2478,22	IIDNKPSIDSYKSGHKPDNIK	368-389	Linker/NBD 1
2575,42	LYDPTEGMVSDGQDIRTINVR	443-464	NBD 1
2643,44	KLSTKEALDESIPPVSFWRIMK	681-702	Linker
2681,38	ILLLDEATSALDTESEAVVQVALDK	551-575	Walker B/D-loop NBD 1
2815,51	ILLLDEATSALDTESEAVVQVALDK	551-575 + Na ⁺ /Ox.	Walker B/D-loop NBD 1
2870,56	FLREIIGVVSQEPVLFATTIAENIR	465-489	Q-loop NBD 1
	ILLLDEATSALDTESEAVVQVALDKAR	551-577	Walker B/D-loop

4.2.2.1 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp

2882,60	TVVSLTQEQKFEHMYAQS LQVPYR	906-929	NBD 1 ICL 4
2892,52	AVKEANAYDFIMKLP HKFDTLVGER	503-527	NBD 1
2892,58	VVSQEEIVRAAKEANI HAFIESLPNK	1139-1164	NBD 2
2982,61	NPKILLLDEATSALD TESEAVVQVALDK	548-575	Walker B/D-loop NBD 1
3032,44	AHLGIVSQEPILFDCS IAENIAYGDNDR	1111-1138	Q-loop NBD 2
3317,74	EANI HAFIESLPNKYSTK VGDKGTQLSGGQK	1151-1181	ABC-Motiv NBD 2
3319,75	QPHILLLDEATSALD TESEKVVQEALDKAR	1193-1222	Walker B/D-loop NBD 2
3319,88	VVQEALDKAREGRTCIVIAHRLSTIQNADL	1213-1242	H-loop NBD 2
3531,91	ALVRQPHILLLDEATSALD TESEKVVQEALDK	1189-1220	Walker B/D-loop NBD 2
3783,72	LVTMQTAGNEVELENA ADESKSEIDALEMSSNDR	625-659	NBD 1/Linker
5150,63	TPLIDSYSTEGLMPNTLEGNVTFGEVVFNYPTRPDIPV LQGLSLEVK	1015-1061	A-loop NBD 2
5278,76	TPLIDSYSTEGLMPNTLEGNVTFGEVVFNYPTRPDIPV LQGLSLEVKK	1015-1062	A-loop NBD 2

Berücksichtigt man die Farbkodierung in Tabelle 4.4 wird ersichtlich, dass die Sequenzabdeckung von P-gp durch den Zusatz von 10 % Methanol zum Verdau-Puffer bzw. durch Hitzedenaturierung des Proteins noch einmal etwas gesteigert werden konnte. Der Methanolzusatz hatte den Zweck, die Löslichkeit der hydrophoben Peptide zu verbessern und somit ihre Präzipitation im wässrigen Verdau-Puffer zu verringern und die Hitzedenaturierung sollte durch Entfaltung des Proteins eine bessere Zugänglichkeit für die Enzyme bewirken. Laut der Tabelle wirkte sich insbesondere die Hitzedenaturierung positiv auf die Entstehung neuer Peptide aus und führte sogar zur Generierung zweier Peptide im Bereich der transmembranären Helices (TM1 und TM8). Insgesamt konnten durch den Methanolzusatz sowie die Hitzedenaturierung 62 zusätzliche Aminosäuren abgedeckt und die Sequenzabdeckung damit um 5 % auf 66 % (838 von 1280 Aminosäuren) erhöht werden.

Eine graphische Darstellung der mittels Trypsin-In-Lösung-Verdau erzielten Sequenzabdeckung von P-gp ist in der folgenden Abbildung 4.7 zu sehen. Es wird deutlich, dass die Sequenzabdeckung in den extra-membranären Bereichen mit Ausnahme von drei Lücken im ECL 1, in der NBD 1 und nahe des C-Terminus fast lückenlos ist, während dagegen die transmembranären Helices nur sehr spärlich abgedeckt werden konnten. Um die Sequenzabdeckung in den TMDs gezielt zu erhöhen,

4.2.2.1 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp

sollte als nächstes ein Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp durchgeführt werden, da dort für dieses Enzym im Gegensatz zu Trypsin ausreichend Schnittstellen vorhanden sind und das Problem der Entstehung zu großer und zu hydrophober Peptide somit nicht auftreten dürfte.

1	MDLEGDRNGG	AKKKNFFKLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVFSMF	RYSNWLDKLY	
51	MVVGTLAAII	HGAGLPLMML	VFGEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRSDIND	TM 1
101	TGFFMNLEED	MTRYAYYYSG	IGAGVLVAAY	IQVSFWCLAA	GRQIHKIRKQ	TM 2
151	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS	KINEGIGDKI	GMFFQSMATF	TM 3
201	FTGFIVGFTR	GWKLTLVILA	ISPVLGLSAA	VWAKILSSFT	DKELLAYAKA	TM 3 + 4
251	GAVAEVLAA	IRTVIAFGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG	TM 5
301	AAFLLIYASY	ALAFWYGTTL	VLSGEYSIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP	TM 5 + 6
351	SIEAFANARG	AAYEIFKIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIKG	NLEFRNVHFS	
401	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG	QTVALVGNSG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM	
451	VSVDGQDIRT	INVRFLREII	GVVSQEPVLF	ATTIAENIRY	GRENVTMDEI	
501	EKAVKEANAY	DFIMKLPHKF	DTLVGERGAQ	LSGGQKQRIA	IARALVRNPK	
551	ILLLDEATSA	LDTSEAVVQ	VALDKARKGR	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG	
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVTMQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA	
651	LEMSSNDSRS	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPPVSWFRI	
701	MKLNLTWPY	FVVGVFCAII	NGGLQPAFAI	IFSKIIGVFT	RIDDPETKRQ	TM 7
751	NSNLFSLFL	ALGIISFITF	FLQGFTEGKA	GEILTKRLRY	MVFRSMLRQD	TM 8
801	VSWFDDPKNT	TGALTTRLAN	DAAQVKGAIG	SRLAVITQNI	ANLGTGIIIS	TM 9
851	FIYGWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVVMKMLS	GQALKDKKEL	EGSGKIA TEA	TM 9 + 10
901	IENFRTVVSL	TQEQKFEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY	TM 11
951	FSYAGCFRFG	AYLVAHKLMS	FEDVLLVFS	VVFGAMAVGQ	VSSFAPDYAK	TM 11 + 12
1001	AKISAHHIIM	IEKTPLIDS	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI	
1051	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSGCGKSTVV	QLLERFYDPL	AGKVLDDGKE	
1101	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNSRVV	SQEEIVRAAK	
1151	EANIHFIES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KORIAIARAL	VRQPHILLLD	
1201	EATSALDTES	EKVVEALDK	AREGRTCIVI	AHRLSTIQNA	DLIVVFQNGR	
1251	VKEHGTHQQL	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKRQ			

Abb. 4.7: Graphische Darstellung der Sequenzabdeckung von P-gp erzielt mittels Trypsin-In-Lösung-Verdau. Sequenzbereiche, welche im Rahmen des In-Lösung-Verdau mit Trypsin eindeutig zugeordnet werden konnten, sind in rot dargestellt. Aminosäuren, die durch Hitzedenaturierung des Proteins bzw. Zusatz von 10 % Methanol zum Verdau-Puffer zusätzlich abgedeckt werden konnten, sind in blau bzw. grün eingefärbt. Die erzielte Sequenzabdeckung beträgt ohne Hitzedenaturierung und Methanolzusatz 61 %. Durch den Zusatz von 10 % Methanol zum Verdau-Puffer und Hitzedenaturierung von P-gp konnte die Sequenzabdeckung auf 66 % gesteigert werden.

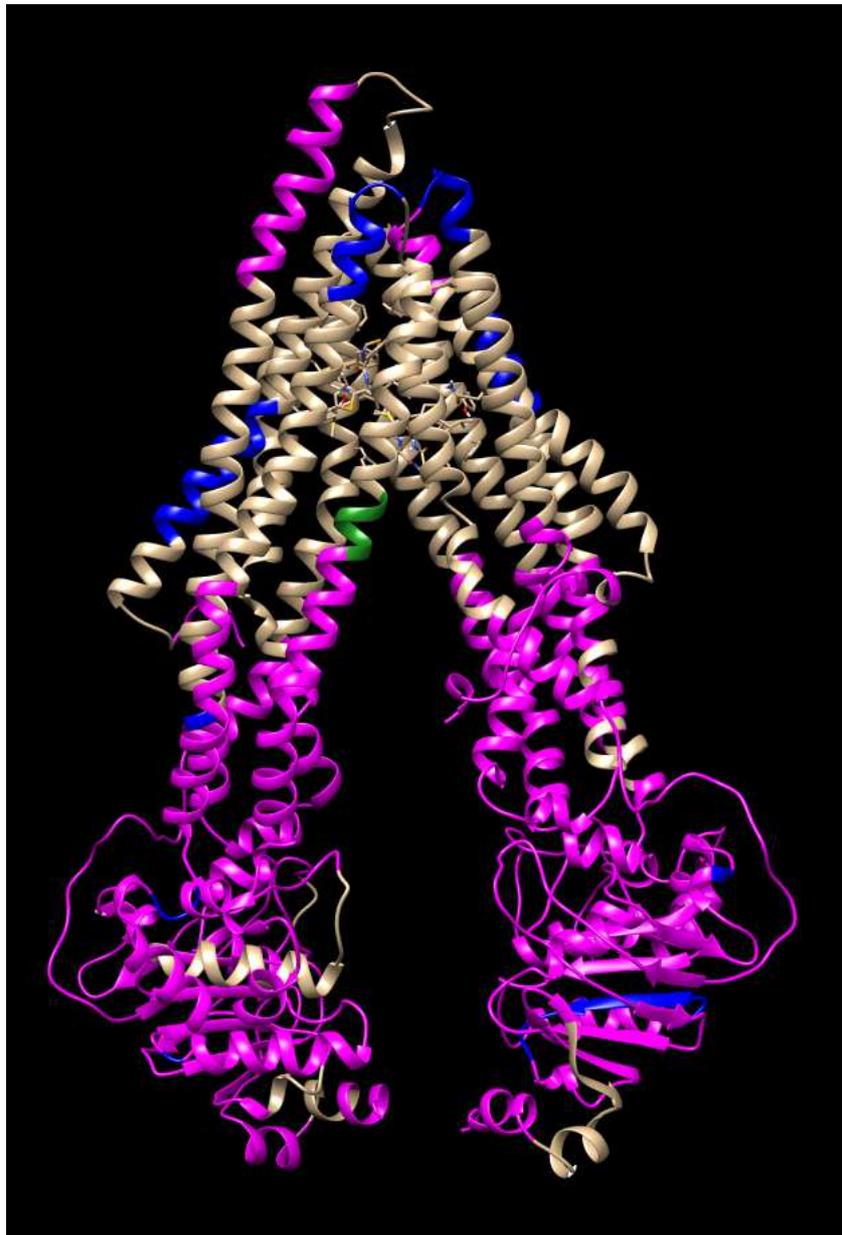


Abb. 4.8: Bildliche Darstellung der durch den Trypsin-In-Lösung-Verdau erzielten Sequenzabdeckung von P-gp. In pink eingefärbt sind Sequenzabschnitte, die durch den regulären Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp abgedeckt werden konnten. In blau abgebildet sind Bereiche, welche durch Hitzedenaturierung von P-gp zusätzlich abgedeckt wurden und in grün eingefärbt sind Sequenzen, die durch den Zusatz von 10 % Methanol zum Verdaupuffer darüber hinaus abgedeckt werden konnten. In weiß dargestellt sind die nicht abgedeckten Bereiche von P-gp. Es wird deutlich, dass durch die Hitzedenaturierung und den Methanolzusatz kleinere Teile der transmembranären Helices 1, 8 und 10 abgedeckt werden konnten. Die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung beträgt 66 %.

4.2.2.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp

Der Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp wurde entsprechend Kapitel 3.2.2.2 mit zwei verschiedenen Chymotrypsinen durchgeführt. Zunächst wurde ein In-Lösung-Verdau von P-gp mit Sequencing Grade Chymotrypsin der Firma Sigma-Aldrich über eine Zeit von 2,5 Stunden beim Temperatur-Optimum von 30 °C durchgeführt. Anschließend wurde der Verdau durch zehnmütiges Erhitzen auf 95 °C gestoppt, die entstandenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und nach erfolgter Aufbereitung für die Massenspektrometrie mittels ESI-MS analysiert.

In der nachfolgenden Tabelle 4.5 sind die resultierenden Peptide des In-Lösung-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin der Firma Sigma-Aldrich zusammengefasst. In schwarz dargestellt sind Peptide, die bereits aus dem Chymotrypsin-In-Gel-Verdau von P-gp bekannt waren, in blau abgebildet sind die im Rahmen des In-Lösung-Verdau neu hinzugekommenen Peptide. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink eingefärbt.

Bedingt durch die Tatsache, dass es sich bei Chymotrypsin um eine relativ unspezifisch spaltende Protease handelt und somit für ein und dieselbe Monoisotopische Masse meist mehrere passende Peptidsequenzen innerhalb der P-gp-Aminosäuresequenz existieren, wurden von den im Übersichtsspektrum detektierten Peptidsignalen MS/MS-Spektren aufgenommen und durch Bestimmung der Abfolge der einzelnen Aminosäuren des Peptids eine eindeutige Zuordnung der jeweils betrachteten Monoisotopischen Masse zur entsprechenden Aminosäuresequenz innerhalb von P-gp vorgenommen.

Schaut man sich die in der Tabelle 4.5 aufgeführten Peptide genauer an, wird deutlich, dass durch den In-Lösung-Verdau im Vergleich zum In-Gel-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin eine Reihe neuer Peptide generiert und die Sequenzabdeckung von 17 % auf 24 % (312 von 1280 Aminosäuren) gesteigert werden konnte. Allerdings zeichnet sich, was die abgedeckten Bereiche angeht, ein ähnliches Bild ab wie beim In-Gel-Verdau von P-gp.

Tab. 4.5: Peptide aus dem In-Lösung-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin von Sigma-Aldrich. Farbkodierung: Peptide, welche auch im Rahmen des In-Gel-Verdau mit Chymotrypsin gefunden wurden, sind in schwarz dargestellt. Peptide, die ausschließlich durch den In-Lösung-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin der Firma Sigma-Aldrich gebildet wurden, sind in blau abgebildet. Aminosäuren innerhalb der transmembranären Helices sind in pink eingefärbt.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
727,56	IAIARAL/	539-545/	NBD 1
	IAIARAL	1184-1190	NBD 2
939,54	LAQKGIYF	1261-1268	C-Terminus
963,54	IESLPNKY	1158-1165	NBD 2
1057,60	AKAGAVAEVLE	248-258	ICL 2
1102,66	GIVSQEPILF	1114-1123	Q-loop NBD 2
1151,64	ATTIAENIRY	481-490	NBD 1
1181,68	AFIESLPNKY	1156-1165	NBD 2
1291,76	IIEKTPLIDSY	1011-1021	Linker/NBD 2
1319,88	STIQNADLIVVF	1235-1246	NBD 2
1392,78	KIIDNKPSIDSY	367-378	Linker/NBD 1
	LSAAVWAKILSSF (TM4)	227-239	TM4/ICL 2
1412,80	NYPTRPDIPVLQ	1043-1054	A-loop NBD 2
1582,92	NYPTRPDIPVLQGL	1043-1056	A-loop NBD 2
1588,96	RLSTIQNADLIVVF	1233-1246	NBD 2
1618,80	DPTEGMVSVVDGQDIR	445-459	NBD 1
1699,02	LREIIGVVSQEPVLF	466-480	Q-loop NBD 1
1709,86	STEGLMPNTLEGNVTF	1022-1037	Linker/NBD 2
1805,94	STKEALDESIPPVFW	683-698	Linker
1890,96	LLDEATSALDTESEAVVQ	553-570	Walker B/D-loop NBD 1
1912,94	LLDEATSALDTESEAVVQ	553-570 + Na ⁺	Walker B/D-loop NBD 1
1969,06	AKILSSFTDKELLAYAKA (TM4)	233-250	TM4/ICL 2
2174,12	LLDEATSALDTESEAVVQVAL	553-573	Walker B/D-loop NBD 1
2196,16	LLDEATSALDTESEAVVQVAL	553-573 + Na ⁺	Walker B/D-loop NBD 1
2261,16	LLDEATSALDTESEKVVQEAL	1198-1218	Walker B/D-loop NBD 2
2267,20	GRENVTMDEIEKAVKEANAY	491-510	NBD 1
2283,19	LLDEATSALDTESEKVVQEAL	1198-1218 + Na ⁺	Walker B/D-loop NBD 2
2327,11	NADVIAGFDDGVIVEKGNHDEL	594-615	NBD 1
2349,22	DPTEGMVSVVDGQDIRTINVRV	445-465	NBD 1
2693,29	QTAGNEVELENAADESKSEIDALEM	629-653	NBD 1/Linker
2715,28	QTAGNEVELENAADESKSEIDALEM	629-653 + Na ⁺	NBD 1/Linker

So sind die erzeugten Peptide mit Ausnahme einer Sequenz im Bereich der TM4 allesamt Teil der extra- und intrazellulären Loops, Linker-Regionen und Nukleotid-Bindungsdomänen und die transmembranären Domänen bleiben wie schon im Falle des In-Gel-Verdau mit Trypsin und Chymotrypsin sowie des Trypsin-In-Lösung-Verdau ausgespart. Ein triftiger Grund für die schlechte Sequenzabdeckung in den TMDs trotz des Vorhandenseins ausreichender Schnittstellen für das Enzym ist möglicherweise die aufgrund starker Faltung des Proteins sehr schlechte Zugänglichkeit zu diesen hydrophoben Bereichen. Außerdem liefert die Tatsache, dass das Protein in Liposomen eingeschlossen ist und keine die Liposomen zerstörenden denaturierenden Zusätze verwendet wurden, einen weiteren Grund für die niedrige Sequenzabdeckung in den transmembranären Bereichen. Eine dritte Ursache könnte sein, dass sich das eingesetzte Chymotrypsin aufgrund einer zu geringen Aktivität nicht besonders gut für den Verdau von P-gp eignet. Hierfür würde sprechen, dass die erzielte Sequenzabdeckung auch in den theoretisch gut zugänglichen NBD-, Loop- und Linker-Regionen mit 24 % ziemlich niedrig ist und noch viele größere Lücken aus nicht abgedeckten Aminosäuren vorhanden sind. Deswegen wurde für weitere In-Lösung-Verdau von P-gp das Sequencing Grade Chymotrypsin der Firma Roche verwendet und die hiermit erreichte Sequenzabdeckung mit derjenigen des zuvor eingesetzten Chymotrypsins von Sigma-Aldrich verglichen.

Der In-Lösung-Verdau von P-gp mit Sequencing Grade Chymotrypsin der Firma Roche wurde entsprechend Kapitel 3.2.2.2 beim Temperatur-Optimum von 25 °C über eine Dauer von 2,5 Stunden durchgeführt. Im Anschluss daran wurde der Verdau durch zehnmütiges Erhitzen auf 95 °C inaktiviert, die gebildeten Peptide in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene eingengt und nach erfolgter Aufbereitung für die Massenspektrometrie mittels ESI-MS analysiert.

Die folgende Tabelle 4.6 zeigt die resultierenden Peptide des In-Lösung-Verdau von P-gp mit Sequencing Grade Chymotrypsin der Firma Roche. In schwarz eingefärbt sind Peptide, die bereits aus den vorausgegangenen In-Gel- bzw. In-Lösung-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin bekannt waren. In blau abgebildet sind die im Zuge des In-Lösung-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin der Firma Roche neu generierten Peptide. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink dargestellt. Die Berechnung der in der Tabelle zusammengefassten Monoisotopischen Massen aus den

detektierten Peptidsignalen sowie ihre Zuordnung zu den entsprechenden Aminosäuresequenzen innerhalb von P-gp erfolgten wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 4.2.1.2).

Tab. 4.6: Peptide aus dem In-Lösung-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin von Roche.
Farbkodierung: Transmembranäre Sequenzbereiche sind in pink eingefärbt. Peptide, die bereits aus vorherigen In-Gel- bzw. In-Lösung-Verdaus von P-gp mit Chymotrypsin bekannt waren, sind in schwarz abgebildet. Peptide, welche ausschließlich im Rahmen des In-Lösung-Verdaus von P-gp mit Chymotrypsin der Firma Roche gebildet wurden, sind in blau dargestellt.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
855,54	ISAAHIIM	1003-1010	Linker/NBD 2
862,56	VRQPHIL	1191-1197	Walker B NBD 2
899,58	EVKILKGL	406-413	NBD 1
939,58	LAQKGIYF	1261-1268	C-Terminus
	GAKKKNFF	10-17	N-Terminus
961,62	AAIRTVIAF	259-267	ICL 2
	AIIHGAGLPL (TM1)	58-67	TM1
963,54	IESLPNKY	1158-1165	NBD 2
1057,62	AKAGAVAEVL	248-258	ICL 2
1069,75	PSRKEVKIL	402-410	NBD 1
1098,60	KLPHKFDTL	515-523	NBD 1
1102,66	GIVSQEPILF	1114-1123	Q-loop NBD 2
1151,66	ATTIAENIRY	481-490	NBD 1
1181,66	AFIESLPNKY	1156-1165	NBD 2
1201,68	LVRQPHILL	1190-1199	Walker B NBD 2
1275,79	DFIMKLPHKF	511-520	NBD 1
1284,85	SGGQKQRIAIAR/	532-543	ABC-Motiv NBD 1
	SGGQKQRIAIAR	1177-1188	ABC-Motiv NBD 2
1291,74	IIEKTPILDSY	1011-1021	Linker/NBD 2
1319,88	STIQNADLIVVF	1235-1246	NBD 2
1341,74	STIQNADLIVVF	1235-1246 + Na ⁺	NBD 2
1392,82	KIIDNKPSIDSY	367-378	Linker/NBD 1
	LSAAVWAKILSSF (TM4)	227-239	TM4/ICL 2
1435,87	RTVVSLTQEQKF	905-916	ICL 4
1468,96	SGGQKQRIAIARAL/	532-545	ABC-Motiv NBD 1
	SGGQKQRIAIARAL	1177-1190	ABC-Motiv NBD 2
1579,93	RAHLGIVSQEPILF	1110-1123	Q-loop NBD 2
1582,93	NYPTRPDIPVLQGL	1043-1056	A-loop NBD 2
1582,93	IGSRLAVITQNIANL (TM9)	829-843	ICL 3/TM9
1588,96	RLSTIQNADLIVVF	1233-1246	NBD 2
1604,95	DFIMKLPHKFDTL	511-523	NBD 1
1606,86	KARKGRTTIVIAHR	575-588	H-loop NBD 1
1632,84	MVVGTLAAIIHGAGLP (TM1)	51-67	N-Terminus/TM1
1649,02	AHKLMSFEDVLLVF (TM12)	965-978	ECL 6/TM12
	IIMIEKTPILDSY	1008-1021	Linker/NBD 2

4.2.2.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp

1680,01	IAYGNSRVVSQEEI PSIEAFANARGAAYEI (TM6)	1131-1145 350-365	NBD 2 TM6/Linker
1693,09	LRAHLGIVSQEPILF	1109-1123	Q-loop NBD 2
1699,03	LREIIGVVVSQEPVLF	466-480	Q-loop NBD 1
1709,90	STEGLMPNTLEGNTVF	1022-1037	Linker/NBD 2
1771,06	SKSGHKPDNIKGNLEF	379-394	Linker/NBD 1
1796,02	DLEGDRNGGAKKKNFF	2-17	N-Terminus
1805,98	STKEALDESIPPVFW	683-698	Linker
1891,00	LLDEATSALDTESEAVVQ IVSQEPILFDCSIAENI	553-570 1115-1131	Walker B/D-loop Q-loop NBD 2
1935,10	ILAI SPVLGLSAAVWAKIL (TM4)	218-236	TM4
1950,01	RQDVSWFDDPKNTT GAL	798-814	ICL 3
1969,04	MDLEGDRNGGAKKKNFF	1-17 + 42	N-Terminus
1996,09	RTVVS LTQE QKFEHMY YDPTEGMVSV DQGDIRTI	905-920 444-461	ICL 4 NBD 1
2174,20	LLDEATSALDTESEAVVQVAL	553-573	Walker B/D-loop NBD 1
2196,10	LLDEATSALDTESEAVVQVAL	553-573 + Na ⁺	Walker B/D-loop NBD 1
2241,22	STEGLMPNTLEGNTVFGEVVF	1022-1042	Linker/NBD 2
2257,10	STEGLMoxPNTLEGNTVFGEVVF	1022-1042 + Ox.	Linker/NBD 2
2261,22	LLDEATSALDTESEKVVQEAL	1198-1218	Walker B/D-loop NBD 2
2267,23	GRENVTMDEIEKAVKEANAY	491-510	
2279,12	STEGLMoxPNTLEGNTVFGEVVF	1022-1042 + Na ⁺ /Ox.	Linker/NBD 2
2349,25	DPTEGMVSV DQGDIRTINVRF	445-465	NBD 1
2365,20	DPTEGMoxVSV DQGDIRTINVRF	445-465 + Ox.	NBD 1
2487,36	ILLDEATSALDTESEKVVQEAL	1196-1218	Walker B/D-loop NBD 2
2509,36	ILLDEATSALDTESEKVVQEAL	1196-1218 + Na ⁺	Walker B/D-loop NBD 2
2640,48	GDNSRVVSQEEIVRAAKEANIHAF	1134-1157	NBD 2
2694,28	QTAGNEVELENAADESKSEIDALEM	629-653	Linker
2697,31	GVFTRIDDPETKRQNSNLF SLLF (TM8)	737-759	ECL 4/TM8
2729,32	ANAGNLEDLMSNITNRS DINDTGFF	80-104	ECL 1
2745,31	ANAGNLEDLMoxSNITNRS DINDTGFF	80-104 + Ox.	ECL 1
2751,28	ANAGNLEDLMSNITNRS DINDTGFF	80-104 + Na ⁺	ECL 1
2767,30	ANAGNLEDLMoxSNITNRS DINDTGFF	80-104 + Na ⁺ + Ox.	ECL 1
2770,52	STVRNADVIAGFDDGVIVEKGNHDEL	590-615	NBD 1/Linker
2909,68	QRLYDPTEGMVSV DGEDIRTINVRF	441-465	NBD 1
3265,72	KLVTMQTAGNEVELENAADESKSEIDALEM	624-653	Linker
3281,65	KLVTMoxQTAGNEVELENAADESKSEIDALEM	624-653 + Ox.	Linker
4199,12	KLVTMQTAGNEVELENAADESKSEIDALEMSSNDRSSL	624-662	Linker

Betrachtet man die in Tabelle 4.6 dargestellten Ergebnisse wird deutlich, dass zusätzlich zu den bereits aus vorherigen In-Gel- und In-Lösung-Verdaus von P-gp mit Chymotrypsin bekannten Peptiden, eine große Anzahl neuer Peptide erhalten werden konnte. Insgesamt wurden 619 von 1280 Aminosäuren abgedeckt, was einer Sequenzabdeckung von 48 % entspricht. Im Vergleich zum In-Gel-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin der Firma Roche konnte die Sequenzabdeckung um 20 % verbessert werden. Gegenüber dem In-Lösung-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin der Firma Sigma-Aldrich betrug die Erhöhung der Sequenzabdeckung sogar 24 %. Erfreulich ist, dass nicht nur die Anzahl der Peptide in den Loop-, Linker- und NBD-Regionen, sondern ebenfalls diejenige in den transmembranären Bereichen erhöht werden konnte. So wurden erstmalig auch Aminosäuren innerhalb der transmembranären Helices 1, 6, 8, 9 und 12 neben der TM4 abgedeckt. Verglichen mit dem Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp schneidet der Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau zwar was die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung angeht sichtlich schlechter ab; dafür fällt die für die Durchführung von Photolabeling-Experimenten entscheidende Sequenzabdeckung in den transmembranären Domänen jedoch deutlich höher aus und unterstreicht somit den hohen Stellenwert des Chymotrypsins.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass der Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp dem Chymotrypsin-In-Gel-Verdau sowohl hinsichtlich der insgesamt erzielten als auch der transmembranären Sequenzabdeckung deutlich überlegen ist und somit in Zukunft als Methode der Wahl für den Verdau von P-gp angewendet werden sollte. Des weiteren ist ersichtlich, dass mit dem Sequencing Grade Chymotrypsin der Firma Roche wesentlich bessere Ergebnisse erzielt werden konnten als mit dem Sequencing Grade Chymotrypsin von Sigma-Aldrich, so dass für künftige In-Lösung-Verdaus von P-gp ausschließlich das Chymotrypsin von Roche eingesetzt werden sollte.

Eine graphische Darstellung der durch den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau erzielten Sequenzabdeckung von P-gp ist in der folgenden Abbildung 4.9 zu sehen. Sequenzbereiche, die im Rahmen des In-Lösung-Verdaus mit Sequencing Grade Chymotrypsin der Firma Sigma-Aldrich zweifelsfrei identifiziert und zugeordnet werden konnten, sind in grün eingefärbt. Aminosäuresequenzen, welche durch den In-Lösung-Verdau mit Sequencing Grade Chymotrypsin der Firma Roche eindeutig identifiziert und

4.2.2.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp

zugeordnet werden konnten, sind in blau dargestellt. Überlappende Regionen, die mit beiden Chymotrypsinen abgedeckt werden konnten, sind in rot abgebildet. Die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung von P-gp beträgt 637 von 1280 Aminosäuren = 50 %. Es wird deutlich, dass die Sequenzabdeckung in den extra-membranären Bereichen mit Ausnahme dreier Lücken (N-Terminus nahe TM1, ICL 1 und NBD 2) schon sehr zufriedenstellend ist. Dagegen ist die Abdeckung der transmembranären Domänen noch verbesserungswürdig, bedingt durch die Tatsache, dass die transmembranären Helices mit Ausnahme von TM1, TM4, TM8, TM9 und TM12 noch weitgehend ausgespart bleiben. Um die Sequenzabdeckung in den transmembranären Domänen noch weiter zu erhöhen, sollte als nächster Schritt ein In-Lösung-Verdau von P-gp mit Bromcyan durchgeführt werden.

1	MDLEGDRNGG	AKKKNF	KLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVF	SMF	RYSNWLDKLY	
51	MVVGTLAAII	HGAGLPL	MML	VFGEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRS	DIND	TM 1
101	TGFF	FMNLEED	MTRYAY	YSSG	IGAGVL	VAAAY	IQVSFWCLAA	GRQIHKIRKQ
151	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS	KINEGIGDKI	GMFFQSMATF			TM 2
201	FTGFIVGFTR	GWKLT	TLVILA	ISPVLGLSAA	VWAKILSSFT	DKELLAYAKA		TM 3
251	GAVAEVLAA	IRTVIA	FGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG		TM 3 + 4
301	AAFLLIYASY	ALAFWYG	TTL	VLSGEYSIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP		TM 5
351	SIEAFANARG	AAYEIF	KIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIKG	NLEFRNVHFS		TM 5 + 6
401	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG	QTVALVGN	NSG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM		
451	VSVDGQDIRT	INVRFLREII	GVVSQEPVLF	ATTIAENIRY	GRENVTMDEI			
501	EKAVKEANAY	DFIMKLP	PHKF	DTLVGERGAQ	LSGGQKQRIA	IARALVRNPK		
551	ILLLDEATSA	LDTESEAVVQ	VALDKARKGR	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG			
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVTMQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA			
651	LEMSSNDSRS	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPPVSFWRI			
701	MKLNLEWPY	FVVGVFCAII	NGGLQPAFAI	IFSKIIGVFT	RIDDPETKRQ			TM 7
751	NSNLFSLFL	ALGIISFITF	FLQGFTEGKA	GEILTKRLRY	MVFRSMLRQD			TM 8
801	VSWFDDPKNT	TGALTTRLAN	DAAQVKGAIG	SRLAVITQNI	ANLGTGIIIS			TM 9
851	FIYGWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVEMKMLS	GQALKDKKEL	EGSGKIA TEA			TM 9 + 10
901	IENFRTVVSL	TQEQKFEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY			TM 11
951	FSYAGCFRFG	AYLV	VAHKLMS	FEDVLLV	FSA	VVFGAMAVGQ	VSSFAPDYAK	TM 11 + 12
1001	AKISAAHIIM	IEKTPLIDS	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI			
1051	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSGCGKSTVV	QLLERFYDPL	AGKVLLDGKE			
1101	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNSRVV	SQEEIVRAAK			
1151	EANIHFIES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KQRIAIARAL	VRQPHILLLD			
1201	EATSALD TES	EKVVQEALDK	AREGRTCIVI	AHRLSTIQNA	DLIVVFQNGR			
1251	VKEHGTHQQL	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKRQ					

Abb. 4.9: Graphische Darstellung der durch den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp erzielten Sequenzabdeckung. Sequenzbereiche, welche durch den In-Lösung-Verdau mit Chymotrypsin der Firma Sigma-Aldrich abgedeckt werden konnten, sind in grün dargestellt. Bereiche, die im Rahmen des In-Lösung-Verdaus mit Chymotrypsin der Firma Roche eindeutig identifiziert wurden, sind in blau abgebildet. Überlappende Aminosäuren, welche durch beide In-Lösung-Verdaus abgedeckt werden konnten, sind in rot eingefärbt. Die erzielte Sequenzabdeckung von P-gp beträgt insgesamt 50 %.

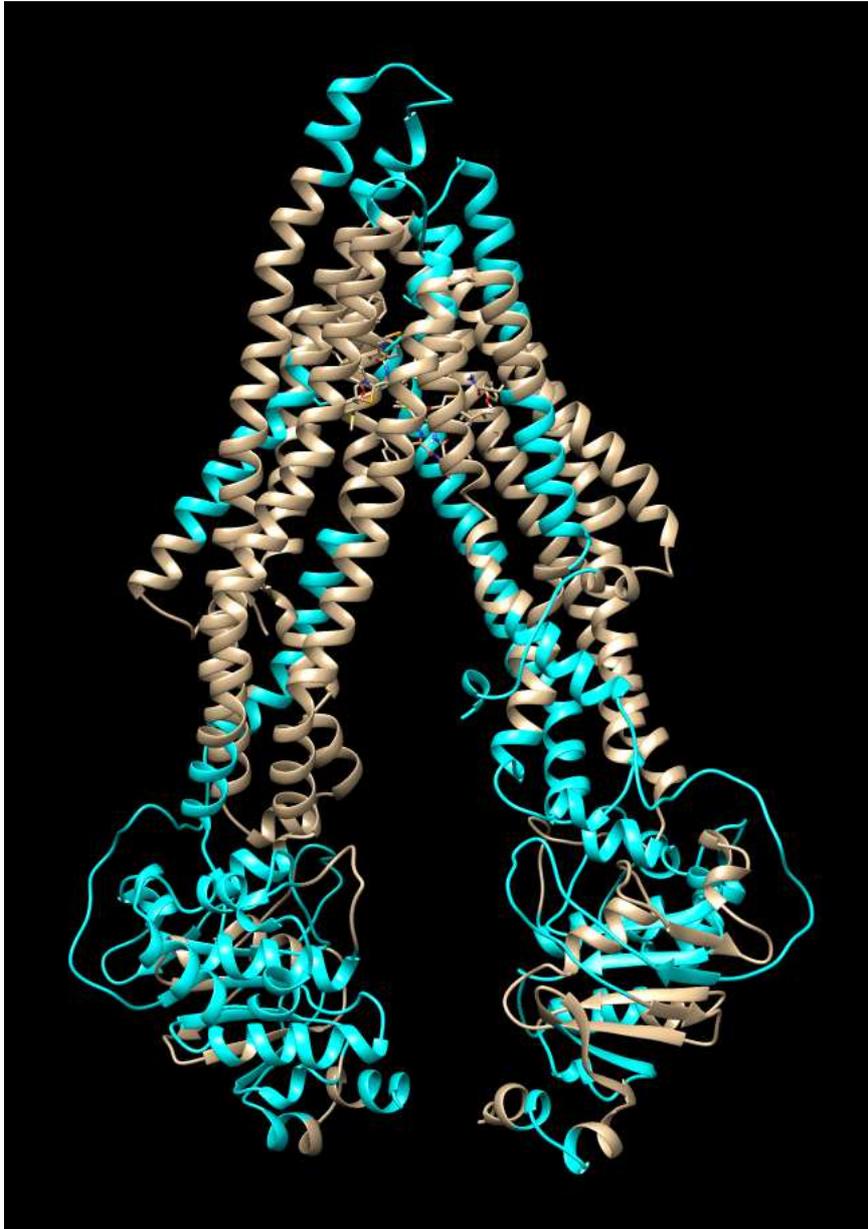


Abb. 4.10: Bildliche Darstellung der durch den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau erzielten Sequenzabdeckung von P-gp. In türkis eingefärbt sind Sequenzabschnitte, die durch den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp abgedeckt werden konnten. In weiß dargestellt sind die nicht abgedeckten Bereiche von P-gp. Es wird deutlich, dass im Unterschied zum Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp Teile der transmembranären Helices 1, 4, 8, 9 und 12 mit abgedeckt wurden und gegenüber dem Chymotrypsin-In-Gel-Verdau von P-gp die Abdeckung in den Loop- und Linker-Regionen sowie den Nukleotidbindungsdomänen erhöht werden konnte. Die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung beträgt 50 %.

4.2.2.3 Bromcyan-In-Lösung-Verdau von P-gp

Der In-Lösung-Verdau von P-gp mit Bromcyan wurde entsprechend Kapitel 3.2.2.3 zur Ermittlung des besten Verhältnisses von Bromcyan zu P-gp in vier verschiedenen Varianten durchgeführt. In Anlehnung an die ersten beiden Vorschriften wurde Bromcyan in einer Menge von 20 bzw. 50 mg zugegeben, während in der dritten und vierten Version ein 1000- bzw. 100-fach molarer Überschuss an Bromcyan über die 32 Methionine innerhalb der P-gp-Aminosäuresequenz eingesetzt wurde. Ein weiterer Unterschied zwischen den ersten beiden Varianten bestand in der verwendeten Säure (Ameisensäure versus Trifluoressigsäure). Allen Vorschriften gemeinsam war der Verdau über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln und Lichtausschluss.

Ein Vergleich der Übersichtsspektren der vier unterschiedlichen Verdaus erbrachte, dass der 100-fach molare Überschuss an Bromcyan über die 32 Methionine in der P-gp-Sequenz nicht ausreichend war, um alle derjenigen Peptide zu erzeugen, die mit den höheren Bromcyan-Mengen gebildet werden konnten. Dagegen lieferten die übrigen drei Verdaus hinsichtlich der detektierten Peptide identische Ergebnisse, so dass davon ausgegangen werden kann, dass ein 1000-fach molarer Überschuss an Bromcyan über die 32 Methionine in der P-gp-Sequenz (entsprechend 135,48 µg Bromcyan) ausreichend ist und eine Erhöhung der Bromcyan-Menge nicht mit einer Zunahme der Anzahl der resultierenden P-gp-Peptide einhergeht.

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Enzymen Trypsin und Chymotrypsin handelt es sich bei Bromcyan um ein chemisches Agens, das Peptidbindungen äußerst spezifisch hinter der Aminosäure Methionin spaltet, wobei das Methionin in das sogenannte „Homoserinlaktat“ bzw. seltener in das „Homoserin“ umgewandelt wird. Diese Modifikation geht mit einem Massenverlust von 48 bzw. 30 Dalton einher, was bei der Auswertung der Massenspektren entsprechend berücksichtigt werden muss. Bedingt durch die Tatsache, dass es lediglich eine Schnittstelle für Bromcyan gibt und in der P-gp-Sequenz insgesamt nur 32 Methionine vorhanden sind, können maximal 33 Peptide entstehen, was die Auswertung des Verdaus wesentlich vereinfacht. Da unter den theoretisch möglichen Peptiden keine Peptide mit identischer Masse vorkommen, genügt es, Übersichtsspektren des Verdaus aufzunehmen und die Aufnahme und Auswertung

zeitraubender MS/MS-Spektren kann somit entfallen. Von Nachteil ist allerdings, dass die 32 Methionine nicht gleichmäßig über die gesamte P-gp-Sequenz verteilt sind, sondern teils gehäuft vorkommen und teils weit auseinander liegen. Somit entstehen einerseits sehr kleine und andererseits äußerst große Peptide. Die sehr kleinen Peptide sind aufgrund ihres niedrigen Informationsgehalts nur von geringem Interesse und im Falle der sehr großen Peptide mit äußerst hohen Massen ist die Signalintensität oftmals dermaßen gering, dass nur schwer zwischen Signal und Rauschen unterschieden werden kann und eine Detektion somit ausbleibt.

In den nachfolgenden beiden Tabellen 4.7 und 4.8 sind die im Rahmen des In-Lösung-Verdau von P-gp mit Bromcyan erzielten Ergebnisse zusammengefasst. Tabelle 4.7 zeigt die resultierenden Peptide in der Homoserinlaktone-Form, während in Tabelle 4.8 die gebildeten Peptide in der Homoserin-Form dargestellt sind.

Tab. 4.7: Peptide aus dem BrCN-In-Lösung-Verdau von P-gp (Homoserinlaktone-Form). Gezeigt sind die aus dem Bromcyan-In-Lösung-Verdau von P-gp resultierenden Peptide mit der Aminosäure Methionin modifiziert zum Homoserinlaktone. Aminosäuren innerhalb der transmembranären Helices sind in pink eingefärbt.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
1161,55	QRLYDPTEGM	441-450	NBD 1
1408,82	KEKGIYFKLVTM	617-628	NBD 1/Linker
1475,70	TDIFANAGNLEDLM	76-89	ECL 1
1584,95	VVGTAAIIHGAGLPLM (TM1)	52-68	TM1
1587,80	FRYSNWLDKLYM	40-51	N-Terminus
1783,82	SNITNRSDINDTGFFM	90-105	ECL 1
1861,98	IIEKTPLIDSYSTEGLM	1011-1027	Linker/NBD 2
1937,95	DEIEKAVKEANAYDFIM	498-514	NBD 1
2150,23	LVFGEMTDIFANAGNLEDLM (TM1)	70-89	TM1/ECL 1
2427,30	AVGQVSSFAPDYAKAKISAAHIIM (TM12)	987-1010	TM12/Linker
2515,15	SNITNRSDINDTGFFMNLEEDM	90-111	ECL 1
2531,26	SNITNRSDINDTGFFMoxNLEEDM	90-111 + Ox.	ECL 1
2645,21	QTAGNEVELENAADESKSEIDALEM	629-653	Linker
3326,74	YAQSLQVPYRNSLRKAHIFGITFSFTQAM (TM11)	920-948	ICL 4/TM11
4009,01	RQEIGWFDVHDVVGELNTRLTDDVSKINEGIGDKIGM (TM3)	157-192	ICL 1/TM3

Von den 33 theoretisch möglichen Bromcyan-Peptiden konnten lediglich 15 experimentell durch den Bromcyan-In-Lösung-Verdau von P-gp erzeugt werden. Hierunter befinden sich erfreulicherweise vier Peptide mit Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices 1, 3, 11 und 12.

Tab. 4.8: Peptide aus dem BrCN-In-Lösung-Verdau von P-gp (Homoserin-Form). Aufgeführt sind die im Zuge des Bromcyan-In-Lösung-Verdau von P-gp entstandenen Peptide mit der Aminosäure Methionin modifiziert zum Homoserin. Aminosäuren innerhalb der transmembranären Helices sind in pink dargestellt.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
1426,83	KEKGIYFKLVTM	617-628	NBD 1/Linker
1493,71	TDIFANAGNLEDLM	76-89	ECL 1
1602,96	VVGT LAAIIHGAGLPLM (TM1)	52-68	TM1
1605,81	FRYSNWLDKLYM	40-51	N-Terminus
1801,84	SNITNRSNDINDTGFFM	90-105	ECL 1
1879,99	IIEKTPLIDSYSTEGLM	1011-1027	Linker/NBD 2
1955,96	DEIEKAVKEANAYDFIM	498-514	NBD 1
2445,31	AVGQV S FAPDYAKAKISAAHIIM (TM12)	987-1010	TM12/Linker
2663,22	QTAGNEVELENAADESKSEIDALEM	629-653	Linker
3344,75	YAQSLQVPYRNSLRKA HIFGITFSFTQAM (TM11)	920-948	ICL 4/TM11
4027,02	RQEIGWFDVHVDV GELNTRLTDDVSKINEGIGDKIGM (TM3)	157-192	ICL 1/TM3

Des weiteren wurden zwei Peptide, die eine verpasste Schnittstelle („missed cleavage“) enthalten und ein Peptid, bei dem das Methionin oxidiert vorliegt, gefunden. Diese 15 Peptide machen 241 von 1280 Aminosäuren = 19 % der gesamten P-gp-Aminosäuresequenz aus. Die mittels Bromcyan-In-Lösung-Verdau von P-gp erzielte Sequenzabdeckung liegt damit weit unterhalb der Sequenzabdeckungen, welche durch den Trypsin- bzw. Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp erreicht werden konnten. Allerdings ist der Anteil transmembranärer Bereiche an der gesamten Sequenzabdeckung bei Bromcyan im Vergleich zu Trypsin und Chymotrypsin deutlich höher. Der Grund für diese extrem niedrige Sequenzabdeckung ist wahrscheinlich die bereits erwähnte ungleichmäßige Verteilung der Methionine über die P-gp-Sequenz und dadurch bedingt die Bildung sowohl sehr kleiner als auch sehr großer Peptide. Diese sind entweder wegen ihres niedrigen Informationsgehaltes nicht von Interesse oder besitzen aufgrund ihrer

4.2.2.3 Bromcyan-In-Lösung-Verdau von P-gp

extrem hohen Masse eine so geringe Signalintensität, dass sie im Grundrauschen untergehen und damit nur schwer detektiert werden können.

In der folgenden Abbildung 4.11 ist die durch den Bromcyan-In-Lösung-Verdau von P-gp erzielte Sequenzabdeckung graphisch veranschaulicht. Sequenzabschnitte, die durch den In-Lösung-Verdau von P-gp mit Bromcyan eindeutig identifiziert und zugeordnet werden konnten, sind in rot eingefärbt. Es wird deutlich, dass die Sequenzabdeckung im Bereich der transmembranären Domänen im Vergleich zu derjenigen in den Linker-, Loop- und NBD-Regionen bei insgesamt sehr niedriger Sequenzabdeckung relativ hoch ist. So konnte die TM1 fast vollständig, TM11 und TM12 etwa zur Hälfte sowie der Anfang von TM3 durch den Bromcyan-In-Lösung-Verdau abgedeckt werden.

1	MDLEGDRNGG	AKKKNFFKLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVFMSM	RYSNWLDKLY	
51	MVVGTLAAII	HGAGLPLMML	VFGEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRSDIND	TM 1
101	TGFFMNLIED	MTRYAYYYS	IGAGVLAAY	IQVSWCLAA	GRQIHKIRKQ	TM 2
151	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS	KINEGIGDKI	GMFFQSMATF	TM 3
201	FTGFIVGFTR	GWKLTLVILA	ISPVLGLSAA	VWAKILSSFT	DKELLAYAKA	TM 3 + 4
251	GAVAEVLAA	IRTVIAFGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG	TM 5
301	AAFLLIYASY	ALAFWYGTTL	VLSGEYSIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP	TM 5 + 6
351	SIEAFANARG	AAYEIFKIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIKG	NLEFRNVHFS	
401	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG	QTVLVGNSG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM	
451	VSVDQDIRT	INVRFLREII	GVVSQEPVLF	ATTIAENIRY	GRENVTMDEI	
501	EKAVKEANAY	DFIMKLPKHF	DTLVGERGAQ	LSGGQKQRIA	IARALVRNPK	
551	ILLLDEATSA	LDTSEAVVQ	VALDKARKGR	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG	
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVTMQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA	
651	LEMSSNDSRS	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPPVSWFRI	
701	MKLNLTWPY	FVVGVFCAII	NGGLQPAFAI	IFSKIIGVFT	RIDDPETKRQ	TM 7
751	NSNLFSLFL	ALGIISFITF	FLQGFTFGKA	GEILTKRLRY	MVFRSMLRQD	TM 8
801	VSWFDDPKNT	TGALTTRLAN	DAAQVKAIG	SRLAVITQNI	ANLGTGIIIS	TM 9
851	FIYQWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVEMKMLS	GQALKDKKEL	EGSGKIATEA	TM 9 + 10
901	IENFRTVVSL	TQEQKFEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY	TM 11
951	FSYAGCFRFG	AYLVAHKLMS	FEDVLLVFSA	VVFGAMAVGQ	VSSFAPDYAK	TM 11 + 12
1001	AKISAAHIIM	II EKTPLIDS	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI	
1051	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSGCGKSTVV	QLLERFYDPL	AGKVLLDGKE	
1101	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNSRVV	SQEEIVRAAK	
1151	EANIHFIES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KQRIAIARAL	VRQPHILLLD	
1201	EATSALDTE	EKVVQEALDK	AREGRTCIVI	AHRLSTIQNA	DLIVVFQNGR	
1251	VKEHGTHQQL	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKRQ			

Abb. 4.11: Graphische Darstellung der Sequenzabdeckung von P-gp erzielt durch den In-Lösung-Verdau mit Bromcyan. Mittels BrCN-In-Lösung-Verdau von P-gp abgedeckte Sequenzbereiche sind in rot dargestellt. Die erreichte Sequenzabdeckung beträgt 19 %.

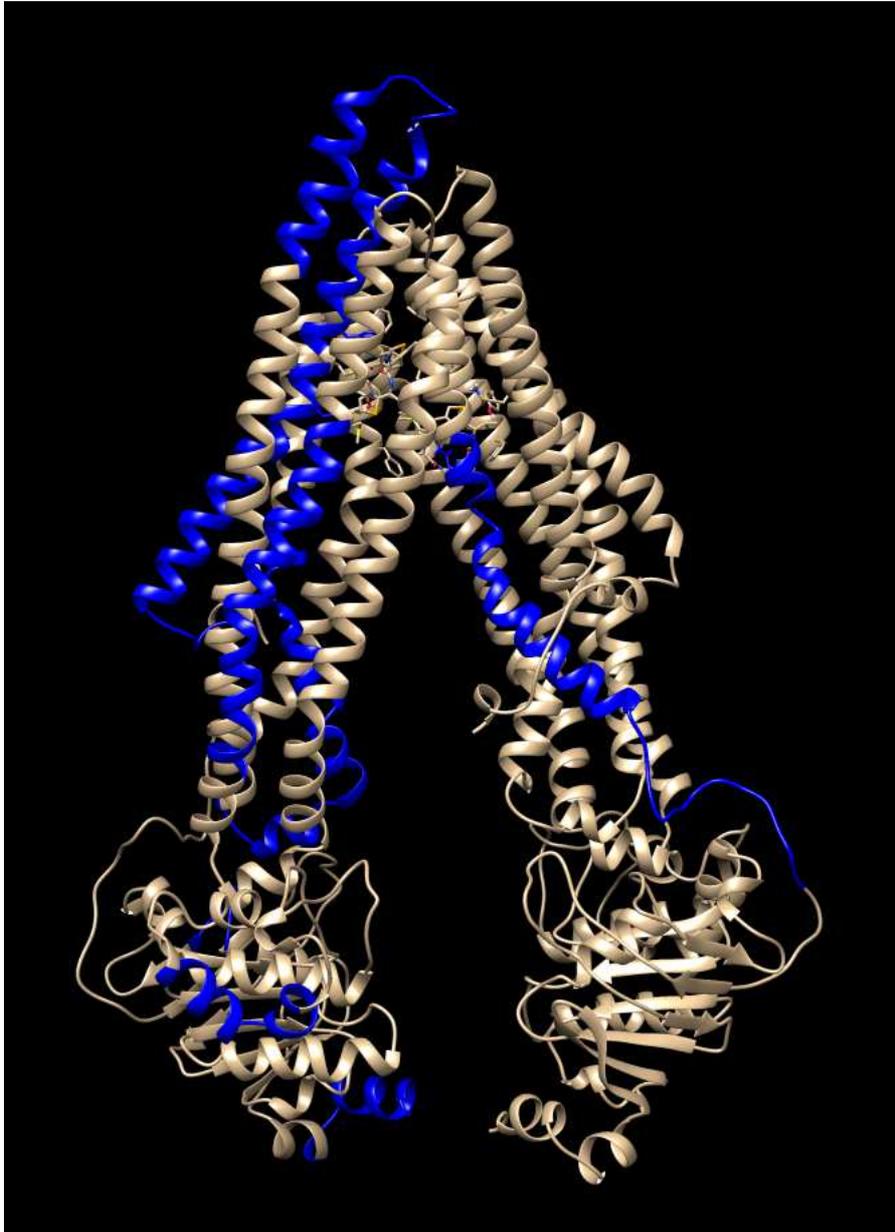


Abb. 4.12: Bildliche Darstellung der durch den Bromcyan-In-Lösung-Verdau erzielten Sequenzabdeckung von P-gp. In blau eingefärbt sind Sequenzabschnitte, die durch den Bromcyan-In-Lösung-Verdau von P-gp abgedeckt werden konnten. In weiß dargestellt sind die nicht abgedeckten Bereiche von P-gp. Es ist ersichtlich, dass die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung mit 19 % im Vergleich zu den vorhergehenden Verdau von P-gp mit Trypsin und Chymotrypsin sehr niedrig ist. Nichtsdestotrotz konnten größere Teile der transmembranären Helices 1, 11 und 12 sowie der Anfang der TM3 abgedeckt werden.

Verglichen mit der durch Trypsin bzw. Chymotrypsin insgesamt erzielten Sequenzabdeckung von P-gp, schneidet Bromcyan sichtlich schlechter ab. Betrachtet man dagegen ausschließlich die transmembranäre Sequenzabdeckung, ist Bromcyan Trypsin deutlich überlegen und Chymotrypsin zumindest äquivalent. Sehr positiv zu bewerten ist weiterhin, dass im Vergleich zu Chymotrypsin (TM4, TM8 und TM9) andere transmembranäre Helices (TM3 und TM11) abgedeckt werden konnten, so dass sich die beiden Spaltungs-Reagenzien in der Hinsicht sinnvoll ergänzen.

Um die Sequenzabdeckung von P-gp in den transmembranären Domänen gezielt noch weiter zu verbessern, sollte als nächstes die Endopeptidase Pepsin für den In-Lösung-Verdau zum Einsatz kommen. Diese unspezifische Protease spaltet mit Vorliebe nach den beiden sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure sowie hinter unpolare aliphatischen Aminosäuren wie Alanin, Glycin, Leucin, Isoleucin und den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin.

4.2.2.4 Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp

Der Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp wurde mit zwei verschiedenen Pepsinen der Firmen Sigma-Aldrich und Protea in Anlehnung an vier unterschiedliche Protokolle durchgeführt und entsprechend optimiert. Die vier Vorschriften wurden dabei im Hinblick auf die bestmögliche Sequenzabdeckung von P-gp untersucht und das Protokoll, welches die besten Ergebnisse lieferte, in der Folge als Standardprotokoll für den Pepsin-Verdau etabliert.

Die erste Vorschrift basiert auf einer Veröffentlichung von Rietschel et al. [108] und verwendet 0,1 %ige Trifluoressigsäure und einen finalen Anteil von 10 % Methanol als Lösungsmittel. Das von Sigma-Aldrich bezogene Pepsin wurde in 0,1 %iger Trifluoressigsäure gelöst und in einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 1 zur P-gp-Suspension gegeben. Der Verdau erfolgte daraufhin über Nacht bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln. Am nächsten Morgen wurde das Pepsin durch Zugabe von 1 N Natronlauge (pH > 8) inaktiviert und der Verdau somit gestoppt. Die entstandenen Peptide wurden abschließend in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und nach erfolgter

Aufbereitung für die Massenspektrometrie mittels ESI-MS analysiert.

Die zweite Vorschrift orientiert sich an der Produktinformation des verwendeten Pepsins von Sigma-Aldrich [109]. Nach diesem Protokoll wurde eine 0,4 %ige Pepsin-Stammlösung ($c = 4 \text{ mg/ml}$) in 10 mM Salzsäure hergestellt und in einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 1 zu den P-gp-Proteoliposomen gegeben. Nachfolgend wurde bei 37 °C für 30 - 90 Minuten inkubiert, der Verdau im Anschluss daran durch Zugabe von 1 N Natronlauge ($\text{pH} > 8$) gestoppt, die resultierenden Peptide in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene eingengt und nach erfolgter Entsalzung mittels ESI-MS analysiert.

Die dritte Vorschrift wurde freundlicherweise von Herrn Shahid Mehmood zur Verfügung gestellt und unterscheidet sich vom vorherigen Protokoll nach Sigma-Aldrich lediglich in der Inkubationszeit (10 Minuten) und der Konzentration der verwendeten Salzsäure (100 mM).

Für die vierte und letzte Vorschrift wurde im Gegensatz zu den drei zuvor beschriebenen Protokollen ein anderes Pepsin verwendet. Dieses Pepsin wurde von der Firma Protea bezogen und auf seine Effizienz hinsichtlich des Verdaus von P-gp untersucht. Die erhaltene Sequenzabdeckung von P-gp wurde mit derjenigen Sequenzabdeckung verglichen, die unter Einsatz des Pepsins von Sigma-Aldrich erzielt worden war.

In der folgenden Tabelle 4.9 sind die Ergebnisse des Pepsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp nach dem Protokoll von Rietschel et al. [108] zusammengefasst. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei Pepsin um eine sehr unspezifische Protease handelt, die sowohl hinter den sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure als auch C-terminal von unpolaren aliphatischen und aromatischen Aminosäuren wie Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin Peptidbindungen spaltet, existieren zum jeweils betrachteten Peptidsignal meist mehrere passende Aminosäuresequenzen mit identischer Masse innerhalb von P-gp. Um zu klären, welche der theoretisch möglichen Aminosäuresequenzen nun die korrekte Aminosäuresequenz darstellt, wurden alle detektierten Peptidsignale nacheinander selektiert und im MS/MS-Modus sequenziert, so dass durch Bestimmung der Abfolge der einzelnen Aminosäuren des Peptids eine eindeutige Zuordnung erfolgen konnte. Auffällig ist, dass die überwiegende Anzahl der resultierenden Peptide im zweifach positiv geladenen Zustand vorlag und die Monoisotopischen Massen mit Werten zwischen 648 und 1759 Dalton im Vergleich zu den

bisherigen Verdau von P-gp mit Trypsin, Chymotrypsin und Bromcyan relativ niedrig ausfielen. Dieses Phänomen liegt vermutlich in der hohen Anzahl von Schnittstellen für Pepsin innerhalb der P-gp-Aminosäuresequenz begründet. Je mehr Spaltungsstellen für das Enzym im Protein vorhanden sind, desto kleiner werden die gebildeten Peptide.

Tab. 4.9: Peptide aus dem Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp nach dem Protokoll von Rietschel et al. [108]. Aminosäuren innerhalb der transmembranären Helices sind in pink dargestellt.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
648,44	INVRF	461-465	NBD 1
660,48	WKLT(L) (TM4)	212-216	ECL 2/TM4
	WQLT(L) (TM9/10)	855-859	TM9/10
	LMQRL	439-443	NBD 1
760,42	FRFGAY (TM11)	957-962	TM11/ECL 6
822,52	AAIIHGAG(L) (TM1)	57-65	TM1
850,52	PLMMLVF (TM1)	66-72	TM1
	IKGNLEF	388-394	Linker/NBD 1
851,56	LLLAI(V)PI (TM10)	860-867	TM10
852,54	LFSLLFL (TM8)	754-760	TM8
872,46	FRYSNW	40-45	N-Terminus
935,56	RQEIGWF	157-163	ICL 1
	GIGDKIGMF (TM3)	185-193	ICL 1/TM3
972,56	RNGGAKKK(N)	7-15	N-Terminus
	FITFFLQG (TM8)	767-774	TM8
1056,68	IKRLNVQW	1101-1108	NBD 2
1065,76	LVRNPKILL	545-553	Walker B NBD 1
	VRNPKILLL	546-554	Walker B NBD 1
1082,66	FTFGKAGEIL (TM8)	775-784	TM8/ICL 3
1088,77	LVRQPHILL	1190-1198	Walker B NBD 2
	VRQPHILLL	1191-1199	Walker B NBD 2
1128,72	IIEKTPLIDS	1011-1020	Linker/NBD 2
1178,66	FDDPKNTTGAL	804-814	ICL 3
1180,68	LERFYDPLAG	1083-1092	NBD 2
1284,78	NYPTRPDIPVL	1043-1053	A-loop NBD 2
1315,96	RALVRQPHILL	1188-1198	Walker B NBD 2
1342,96	IMKLPHKFDL	513-523	NBD 1
1431,86	FYPTRPDIPVL	1042-1053	A-loop NBD 2
1630,00	VVFNYPTRPDIPVL	1040-1053	A-loop NBD 2
1651,99	VVFNYPTRPDIPVL	1040-1053 + Na ⁺	A-loop NBD 2
1692,78	IGDKIGMFFQSMATF (TM3)	186-200	ICL 1/TM3
1759,12	EVVFNYPTRPDIPVL	1039-1053	A-loop NBD 2

Des Weiteren kristallisierte sich erfreulicherweise heraus, dass der Anteil von Peptiden im Bereich der transmembranären Domänen verglichen mit dem Trypsin- und Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp ziemlich hoch ist. So konnten größere Teile der transmembranären Helices 1, 3, 8 und 10 sowie die terminalen Aminosäuren der TMs 4 und 11 abgedeckt werden. Insbesondere die Abdeckung der TMs 3, 8 und 10 ist sehr positiv zu bewerten, da diese Bereiche durch die vorherigen Verdau von P-gp mit Chymotrypsin und Bromcyan noch gar nicht bzw. nur in sehr geringem Ausmaß abgedeckt werden konnten.

Darüber hinaus wird deutlich, dass die Erhöhung des Anteils transmembranärer Peptide auf Kosten der Sequenzabdeckung in den Linker-, Loop- und NBD-Regionen ging. So konnte insgesamt lediglich eine Sequenzabdeckung von 16 % (207 von 1280 Aminosäuren) erreicht werden. Dieser Wert ist wesentlich niedriger als die für den Trypsin- und Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau erzielten Werte (61 % und 50 %) und liegt sogar noch unterhalb der mit Bromcyan erzielten Sequenzabdeckung (19 %). Das Hauptziel - die Erhöhung der Sequenzabdeckung in den transmembranären Domänen von P-gp - wurde jedoch sichtbar erreicht und die Abnahme der Sequenzabdeckung in den übrigen Bereichen dafür billigend in Kauf genommen.

Die mittels Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp nach der Vorschrift von Sigma-Aldrich erzielten Ergebnisse zeigt die im Folgenden abgebildete Tabelle 4.10. Peptide, die bereits aus dem zuvor durchgeführten Pepsin-In-Lösung-Verdau nach Rietschel et al. [108] bekannt waren, sind in schwarz dargestellt. In blau abgebildet sind die neu hinzugekommenen Peptide. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink eingefärbt.

Im Vergleich zur vorherigen Tabelle 4.9 mit den Ergebnissen aus dem Pepsin-In-Lösung-Verdau nach Rietschel et al. [108] fällt auf, dass eine hohe Anzahl neuer Peptide erzeugt werden konnte. Mögliche Gründe hierfür könnten die Erhöhung der Verdau-Temperatur von Raumtemperatur auf 37 °C und der Austausch der 0,1 %igen Trifluoressigsäure durch 10 mM Salzsäure sein. Die beiden veränderten Parameter entsprechen im Prinzip den physiologischen Bedingungen, unter denen das Pepsin im Organismus natürlicherweise vorliegt und arbeitet und könnten eine starke Aktivitätssteigerung des Enzyms bewirkt haben, so dass trotz Verkürzung der Inkubationszeit von über Nacht auf maximal 90

Minuten eine wesentlich bessere Sequenzabdeckung erzielt werden konnte.

Tab. 4.10: Peptide aus dem Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp nach dem Protokoll von Sigma-Aldrich [109]. Aminosäuren innerhalb der transmembranären Helices sind in pink dargestellt. Peptide, die bereits aus dem Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp nach dem Protokoll von Rietschel et al. [108] bekannt waren, sind in schwarz abgebildet. Neue Peptidsequenzen sind in blau eingefärbt.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
648,44	INVRF	461-465	NBD 1
660,48	WKLT(L) (TM4)	212-216	ECL 2/TM4
	WQLT(L) (TM9/10)	855-859	TM9/10
	LMQRL	439-443	NBD 1
672,44	IRTVIA	261-266	ICL 2
700,46	LREIIG	466-471	NBD 1
715,48	ILLLDE	551-556	Walker B NBD 1
	ILLLDE	1196-1201	Walker B NBD 2
	IGSRLAV (TM9)	829-835	ICL 3/TM9
754,52	LMMLVF (TM1)	67-72	TM1
760,44	FRFGAY (TM11)	957-962	TM11/ECL 6
763,52	SKIIGVF	733-739	ECL 4
	GQVLTVF (TM6)	329-335	TM6
775,44	LMMLVF (TM1)	67-72 + Na ⁺	TM1
804,46	SMATFFT (TM3)	196-202	TM3
	MTRYAY	111-116	ECL 1
809,46	IVPIIAIA (TM10)	864-871	TM10
	ADLIVVF	1240-1246	NBD 2
814,54	AAIRTVIA	259-266	ICL 2
816,44	ELEGAGKI	889-896	ICL 4
822,52	AAIIHGAGL (TM1)	57-65	TM1
822,52	LPNKYST	1161-1167	NBD 2
844,52	IIGVVSQE	469-476	Q-loop NBD 1
868,54	KGIFYFKL	619-625	NBD 1/Linker
	MKEKGIY	616-622	NBD 1/Linker
932,54	VAHKLMSF	964-971	ECL 6
	VRFLREI	463-469	NBD 1
936,54	FTDKELLA	239-246	ICL 2
944,54	MIIEKTPL	1010-1017	Linker/NBD 2
	GKSTVVQLL	1075-1083	Walker A NBD 2
948,54	RQEIGWF	157-163 + 13	ICL 1
	EFRNVHF	393-399	NBD 1
1018,69	IRTINVRF	458-465	NBD 1
1045,68	LVAHKLMSF	963-971	ECL 6
1057,56	SGGQKQRIAI	532-541	ABC-Motiv NBD 1
	SGGQKQRIAI	1177-1186	ABC-Motiv NBD 2
1065,79	LVRNPKILL	545-553	Walker B NBD 1
	VRNPKILLL	546-554	Walker B NBD 1
1073,71	WRIMKLNL	698-705	Linker

4.2.2.4 Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp

1077,79	ITFFLQGFT (TM8)	768-776	TM8
1088,77	LLLLAIVPII (TM10)	859-868	TM10
	LVRQPHILL	1190-1198	Walker B NBD 2
	VRQPHILLL	1191-1199	Walker B NBD 2
1100,68	NGGLQPAFAII (TM7)	721-731	TM7
	IINGGLQPAFA (TM7)	719-729	TM7
1128,70	IIEKTPLIDS	1011-1020	Linker/NBD 2
1140,60	GTGIIISFIYG (TM9)	844-854	TM9
	KFEHMYAQS	915-923	ICL 4
1170,70	YPTRPDIPVL	1044-1053	A-loop NBD 2
1174,74	LVAHKLMSFE	963-972	ECL 6
1180,66	LERFYDPLAG	1083-1092	NBD 2
1192,66	LERFYDPLAG	1083-1092 + 12	NBD 2
1205,74	APDYAKAKISAA	995-1006	Linker
1211,80	GQKQRIAIARA	534-544	ABC-Motiv NBD 1
	GQKQRIAIARA	1179-1189	ABC-Motiv NBD 2
1294,76	AAIIHGAGLPLMM (TM1)	57-69	TM1
1340,68	MQRLYDPTEGM	440-450	NBD 1
1342,84	IMKLPHKFDL	513-523	NBD 1
1451,86	IAHRLSTIQNADL	1230-1242	NBD 2
1489,90	FIMKLPHKFDL	512-523	NBD 1
	IFKIIDNKPSIDS	365-377	Linker/NBD 1
1510,08	ILAISPVLGLSAAVW (TM4)	218-232	TM4
1629,94	VVFNYPTRPDIPVL	1040-1053	A-loop NBD 2
1692,88	IGDKIGMFFQSMATF (TM3)	186-200	ICL 1/TM3
1758,98	EVVFNYPTRPDIPVL	1039-1053	A-loop NBD 2
1815,98	GEVFNYPTRPDIPVL	1038-1053	A-loop NBD 2
2090,20	IVVFQNGRVKEHGHQQL	1243-1260	NBD 2/C-Terminus
2092,21	IVVFQNGRVKEHGHQQL	1243-1260 + 2	NBD 2/C-Terminus
2116,20	IVVFQNGRVKEHGHQQL	1243-1260 + 26	NBD 2/C-Terminus
2225,17	FIESLPNKYSTKVGDKGTQL	1157-1176	ABC-Motiv NBD 2

Daneben wurde eine Reihe von bereits aus dem ersten Pepsin-In-Lösung-Verdau bekannten Peptiden gebildet, was auf eine gute Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse trotz des sehr unspezifischen Spaltungsverhaltens des Pepsins schließen lässt.

Betrachtet man die in der Tabelle aufgeführten Monoisotopischen Massen, erkennt man, dass im Gegensatz zum vorausgegangenen Pepsin-In-Lösung-Verdau nun auch einige große Peptide mit Massen von mehr als 2000 Dalton generiert werden konnten.

Vergleicht man die mit den beiden Verdau erzielten Ergebnisse im Hinblick auf die Sequenzabdeckung in den transmembranären Domänen wird deutlich, dass zusätzlich zu den bereits im ersten Verdau mit Pepsin größtenteils abgedeckten TMs 1, 3, 8 und 10 nun auch größere Bereiche der transmembranären Helices 4, 6, 7 und 9 abgedeckt werden

konnten. Damit bleiben als einzige bisher nicht durch Pepsin abgedeckte transmembranäre Bereiche die TMs 2, 5, 11 und 12 übrig. Von diesen konnten jedoch die TMs 11 und 12 zu größeren Teilen bereits mit Bromcyan abgedeckt werden.

In Analogie dazu konnte auch die Anzahl der Peptide in den Linker-, Loop- und NBD-Regionen sichtbar erhöht und die Sequenzabdeckung damit um 18 % gesteigert werden. Insgesamt wurden 429 von 1280 Aminosäuren = 34 % der gesamten P-gp-Sequenz abgedeckt. Dieser Wert reicht zwar immer noch nicht ganz an die Werte der mit Trypsin und Chymotrypsin erzielten Sequenzabdeckungen heran; berücksichtigt man jedoch ausschließlich die transmembranäre Sequenzabdeckung, ist der Pepsin-In-Lösung-Verdau dem Trypsin- und Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau weit überlegen.

Die Ergebnisse des nach der Vorschrift von Herrn Shahid Mehmood durchgeführten Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp zeigt die nachfolgende Tabelle 4.11. Bereits bekannte Peptide sind in schwarz dargestellt, neu entstandene Peptide sind in blau abgebildet, Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink eingefärbt.

Tab. 4.11: Peptide aus dem Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp nach dem Protokoll von Shahid Mehmood. Aminosäuren innerhalb der transmembranären Helices sind in pink abgebildet. Peptide, die bereits aus dem Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp nach den Protokollen von Rietschel et al. [108] bzw. Sigma-Aldrich [109] bekannt waren, sind in schwarz dargestellt. Neue Peptidsequenzen sind in blau eingefärbt.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
608,42	FKLVT	623-627	Linker
	ALAFW (TM5)	311-315	TM5
	TVIAFG	263-268	ICL 2
	RLRY	787-790	ICL 3
648,44	INVRF	461-465	NBD 1
700,46	LREIIG	466-471	NBD 1
760,44	FRFGAY (TM11)	957-962	TM11/ECL 6
763,52	SKIIGVF	733-739	ECL 4
763,52	AGVLVAAY (TM2)	123-130	TM2
792,50	LPNKYST	1161-1167	NBD 2
	GAKKKNF	10-16	N-Terminus
804,46	SMATFFT (TM3)	196-202	TM3
	MTRYAY	111-116	ECL 1
844,52	IIGVVSQE	469-476	Q-loop NBD 1

4.2.2.4 Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp

883,48	DVHDTVGEL YFKLVT	164-171 621-627	ICL 1 Linker
932,54	VAHKLMSF VRFLREI	964-971 463-469	ECL 6 NBD 1
944,54	MIIEKTPL GKSTVVQLL	1010-1017 1075-1083	Linker NBD 2 Walker A NBD 2
1018,69	IRTINVRF	458-465	NBD 1
1018,69	AFIESLPNK	1156-1164	NBD 2
1045,66	LVAHKLMSF	963-971	ECL 6
1045,66	IVSQEPILF	1115-1123	Q-loop NBD 2
1045,66	VRFLREII	463-470	NBD 1
1065,79	LVRNPKILL VRNPKILL	545-553 546-554	Walker B NBD 1 Walker B NBD 1
1077,79	LLLLAIVPII (TM10)	859-868	TM10
1088,72	LVRQPHILL	1190-1198	Walker B NBD 2
1088,72	YDPLAGKVLL	1087-1096	NBD 2
1128,70	IIKTPLIDS	1011-1020	Linker/NBD 2
1178,64	FDDPKNTTGAL	804-814	ICL 3
1190,62	MATFFTFGFIG (TM3)	197-207	TM3
1205,74	APDYAKAKISAA	995-1006	Linker
1291,88	VVGTLAIIHGAGL (TM1)	52-65	TM1
1292,88	IVRAAKEANIHA RALVRNPKILL	1145-1156 543-553	NBD 2 Walker B NBD 1
1294,74	AAIIHGAGLPLMM (TM1)	57-69	TM1
1315,81	RALVRQPHILL	1188-1198	Walker B NBD 2
1323,73	FIVGFTRGWKL(TM3/4)	204-214	TM3/ECL 2/TM4
1340,66	MQRLYDPTEGM	440-450	NBD 1
1342,84	IMKLPKFDL	513-523	NBD 1
1342,84	VFFSVLIGAFSVG (TM6)	334-346	TM6
1355,92	SGGQKQRIAIARA SGGQKQRIAIARA	532-544 1177-1189	ABC-Motiv NBD 1 ABC-Motiv NBD 2
1451,86	IAHRLSTIQNADL	1230-1242	NBD 2
1489,90	FIMKLPKFDL IFKIIDNKPSIDS	512-523 365-377	NBD 1 Linker
1785,04	EVVFNYPTRPDIVL MTRYAYYSIGIGAVL (TM2)	1039-1053 + 26 111-126	A-loop NBD 2 ECL 1/TM2
2090,20	IVVFQNGRVKEHGTHQQL	1243-1260	NBD 2/C-Terminus
2190,28	VGERGAQLSGGQKQRIAIARA	524-544 + 24	ABC-Motiv NBD 1

Im Hinblick auf das resultierende Peptid-Muster fällt auf, dass die bereits aus den beiden vorherigen Verdauungen von P-gp mit Pepsin bekannten Peptide überwiegen und nur wenige neue Peptide gebildet worden sind.

Verglichen mit den beiden zuvor durchgeführten Pepsin-In-Lösung-Verdauungen nach Rietschel et al. [108] bzw. Sigma-Aldrich [109] konnten zusätzlich zu den bereits abgedeckten transmembranären Bereichen Teile der noch fehlenden TMs 2 und 5 abgedeckt werden, womit nur noch die beiden transmembranären Helices 11 und 12 ausgespart bleiben.

Die erzielte Sequenzabdeckung beträgt 393 von 1280 Aminosäuren = 31 % und liegt damit zwischen den Sequenzabdeckungen, welche mit den beiden anderen Protokollen erreicht werden konnten. Das beste Ergebnis lieferte mit 34 % abgedeckten Aminosäuren das Protokoll von Sigma-Aldrich [109], am schlechtesten schnitt die Vorschrift nach Rietschel et al. [108] mit 16 % Sequenzabdeckung ab. Aus diesem Grund wurde die Vorschrift von Sigma-Aldrich als Standardprotokoll für die zukünftigen Pepsin-In-Lösung-Verdaus etabliert.

Als letztes wurde das von der Firma Protea bezogene Pepsin für den Verdau von P-gp eingesetzt und hinsichtlich der erzielten Sequenzabdeckung mit dem Pepsin von Sigma-Aldrich verglichen. Der Verdau wurde dabei entsprechend Kapitel 3.2.2.4 in Anlehnung an die Produktinformation des verwendeten Pepsins [110] durchgeführt. Kurz zusammengefasst wurde das Pepsin in einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 50 zur P-gp-Suspension gegeben und im Anschluss daran für 6 Stunden bzw. über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde daraufhin durch Zugabe von 1 N Natronlauge gestoppt, die erhaltenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und nach Aufbereitung für die Massenspektrometrie mittels ESI-MS analysiert.

Die Auswertung der Massenspektren ergab, dass zum einen fast überhaupt keine P-gp-Peptide gebildet wurden und zum anderen die wenigen von P-gp stammenden Peptide schon alle aus den zuvor durchgeführten Verdaus von P-gp mit dem anderen Pepsin von Sigma-Aldrich bekannt waren. Eine mögliche Ursache hierfür könnte das verwendete Enzym : Protein Verhältnis sein, welches mit 1 : 50 wesentlich kleiner war als in den vorherigen Verdaus (1 : 1). Bedingt durch die Tatsache, dass mit dem zuvor eingesetzten Pepsin von Sigma-Aldrich bereits eine sehr zufriedenstellende Sequenzabdeckung von P-gp erreicht werden konnte, wurden keine weiteren Optimierungsversuche mit dem Pepsin von Protea unternommen.

In der nachfolgenden Abbildung 4.13 ist die durch den Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp erzielte Sequenzabdeckung graphisch veranschaulicht. Sequenzbereiche, die im Rahmen des Pepsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp nach verschiedenen Verdau-Protokollen abgedeckt werden konnten, sind unterschiedlich eingefärbt. In grün abgebildet sind Sequenzen, die mit dem Protokoll von Rietschel et al. [108] abgedeckt wurden. In blau dargestellt sind Aminosäuren, welche mit dem Protokoll von Sigma-Aldrich [109]

4.2.2.4 Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp

abgedeckt werden konnten. In türkis eingefärbt sind Bereiche, die mit dem Protokoll von Herrn Shahid Mehmood identifiziert und zugeordnet werden konnten. Überlappende Aminosäuresequenzen sind in rot dargestellt. Die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung von P-gp beträgt 583 von 1280 Aminosäuren = 46 %. Dabei konnten bis auf die transmembranären Helices 11 und 12 alle übrigen TMs zumindest teilweise abgedeckt werden, was bis dato noch mit keinem anderen Enzym gelang. Verglichen damit ist die Sequenzabdeckung in den Linker- und Loop-Bereichen sowie den Nukleotid-Bindungsdomänen etwas lückenhaft und liegt deutlich unterhalb der mit Trypsin und Chymotrypsin erreichten Sequenzabdeckung.

1	MDLEGRNGG	AKKKNF	FKLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVFSMF	RYSNWLDKLY	
51	MVVGTLAAII	HGAGLPLMML	VF	GEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRSDIND	TM 1
101	TGFFMNLEED	MTRYAYYSSG	IGAGVLVAAY	IQVSWCLAA	GRQIHKIRKQ		TM 2
151	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS	KINEGIGDKI	GMFFQSMATF		TM 3
201	FTGFIVGFTR	GWKLTLVILA	ISPVGLLSAA	VWAKILSSFT	DKELLAYAKA		TM 3 + 4
251	GAVAEVLAA	IRTVIAFGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG		TM 5
301	AAFLLIYASY	ALAFWYGTTL	VLSGEYSIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP		TM 5 + 6
351	SIEAFANARG	AAYEIFKIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIKG	NLEFRNVHFS		
401	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG	QTVALVGNNG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM		
451	VSVDGQDIRT	INVRFLREII	GVVSQEPVLF	ATTIAENIRY	GRENVTMDEI		
501	EKAVKEANAY	DFIMKLPHKF	DTLVGERGAQ	LSGGQKQRIA	IARALVRNPK		
551	LLLLDEATSA	LDTSEAVVQ	VALDKARKGR	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG		
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVTMQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA		
651	LEMSSNDSRS	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPPVSWFRI		
701	MKLNLTWPY	FVVGVFCAII	NGGLQPAFAI	IFSKIIGVFT	RIDDPETKRQ		TM 7
751	NSNLFSLFL	ALGIISFITF	FLQGFTFGKA	GEILTKRLRY	MVFRSMLRQD		TM 8
801	VSWFDDPKNT	TGALTTRLAN	DAAQVKGAIG	SRLAVITQNI	ANLGTGIIIS		TM 9
851	FIYQWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVEMKMLS	GQALKDKKEL	EGSGKIATEA		TM 9 + 10
901	IENFRTVSL	TQEQKFEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY		TM 11
951	FSYAGCFRFG	AYLVAHKLMS	FEDVLLVFSA	VVFGAMAVGQ	VSSFAPDYAK		TM 11 + 12
1001	AKISAAHIIM	IEKTPPLIDS	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI		
1051	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSGCGKSTVV	QLLERFYDPL	AGKVLLDGKE		
1101	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNSRVV	SQEEIVRAAK		
1151	EANIHAFIES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KQRIAIARAL	VRQPHILLLD		
1201	EATSALDTES	EKVVQEALDK	AREGRTCIVI	AHRLSTIQNA	DLIVVFQNGR		
1251	VKEHGTHQQL	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKRQ				

Abb. 4.13: Graphische Darstellung der mittels Pepsin-In-Lösung-Verdau erzielten Sequenzabdeckung von P-gp. Sequenzbereiche, die im Zuge des Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp nach verschiedenen Verdau-Protokollen abgedeckt werden konnten, sind unterschiedlich eingefärbt. In grün abgebildet sind Sequenzen, die mit dem Protokoll von Rietschel et al. [108] abgedeckt wurden. In blau dargestellt sind Aminosäuren, welche mit dem Protokoll von Sigma-Aldrich abgedeckt werden konnten. In türkis eingefärbt sind Bereiche, die mit dem Protokoll von Herrn Shahid Mehmood identifiziert und zugeordnet werden konnten. Überlappende Aminosäuresequenzen sind in rot dargestellt. Die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung von P-gp beträgt 583 von 1280 Aminosäuren = 46 %.

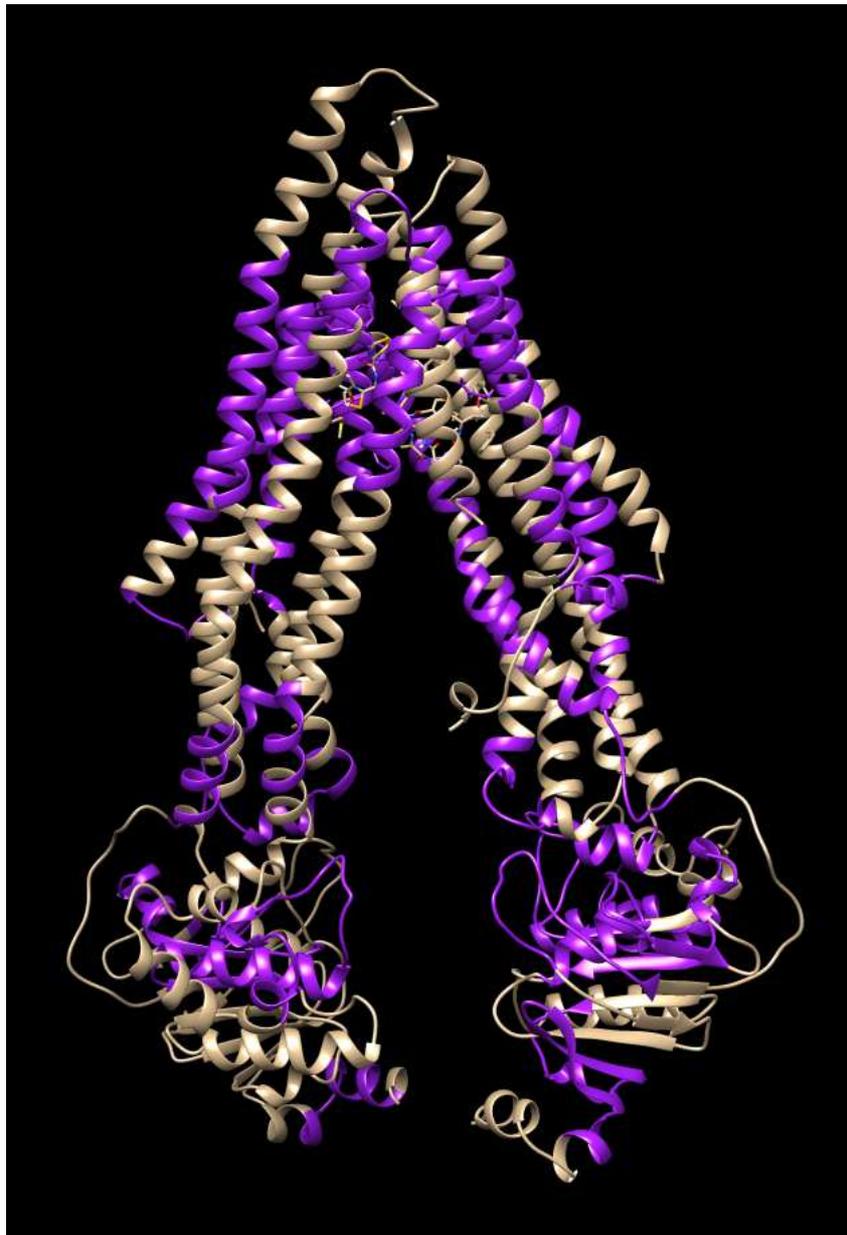


Abb. 4.14: Bildliche Darstellung der durch den Pepsin-In-Lösung-Verdau erzielten Sequenzabdeckung von P-gp. In violett eingefärbt sind Sequenzabschnitte, die durch den Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp abgedeckt werden konnten. In weiß dargestellt sind die nicht abgedeckten Bereiche von P-gp. Es ist ersichtlich, dass die transmembranäre Sequenzabdeckung im Vergleich zu den vorhergehenden Verdau von P-gp mit Trypsin, Chymotrypsin und Bromcyan stark erhöht ist. So konnten größere Teile aller transmembranären Helices bis auf die TMs 11 und 12 abgedeckt werden. Die insgesamt erreichte Sequenzabdeckung beträgt 46 %.

Um neben einer passablen Abdeckung in den transmembranären Domänen auch eine zufriedenstellende Abdeckung der Linker- und Loop-Bereiche sowie der Nukleotid-Bindungsdomänen zu erhalten, sollte als nächstes ein In-Lösung-Verdau von P-gp mit der unspezifischen Protease Elastase durchgeführt werden. Dieses Enzym spaltet bevorzugt hinter den unpolaren aliphatischen Aminosäuren Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin und Valin sowie der polaren Aminosäure Serin.

4.2.2.5 Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp

Der In-Lösung-Verdau von P-gp mit Elastase wurde entsprechend Kapitel 3.2.2.5 in Anlehnung an die Produktinformation des Enzyms von Promega [111] durchgeführt. Demnach wurde die Protease in einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 zu den P-gp-Proteoliposomen gegeben und bei einer Temperatur von 37 °C für 2,5 Stunden unter Schütteln inkubiert. Der Verdau wurde im Anschluss daran durch zehnmütiges Erhitzen auf 95 °C gestoppt, die entstandenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und nach erfolgter Aufbereitung für die Massenspektrometrie mittels ESI-MS analysiert.

In der im Folgenden gezeigten Tabelle 4.12 sind die Ergebnisse des Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp dargestellt. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind dabei in pink eingefärbt.

Tab. 4.12: Peptide aus dem Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp. Aminosäuren im Bereich der zwölf transmembranären Helices sind in pink dargestellt.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
633,38	FFHAI	151-155	ICL 1
	FHAIMox	152-156 + Ox.	ICL 1
663,44	SLLFLA (TM8)	756-761	ECL 4/TM8
	IHGAGLP (TM1)	60-66	TM1
	HGAGLPL (TM1)	61-67	TM1
669,42	YFKLV	622-626	NBD 1/Linker
708,44	SFWRI	696-700	Linker
739,46	HIIMII	1007-1012	Linker/NBD 2
751,44	FWRIM	697-701	Linker

4.2.2.5 Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp

	VFRSML	792-797	Linker
755,46	HIIMoxII	1007-1012 + Ox.	Linker/NBD 2
	EMTDIF	74-79	ECL 1
763,46	RQPHIL	1192-1197	Walker B NBD 2
788,44	NWLDKL	44-49	N-Terminus
819,47	FIESLPN	1157-1163	NBD 2
878,50	IENFRTV	901-907	ICL 4
883,60	AYEIFKI	362-368	Linker/NBD 1
	LKGLNLKV	410-417	NBD 1
890,54	IIHGAGLPL (TM1)	59-67	TM1
921,54	HIFGITFS (TM11)	936-943	TM11
922,56	NLTEWPY	704-710	Linker
932,66	WFDVHDV	162-168 + Ox.	ICL 1
933,58	NTRLTDDV	172-179	ICL 1
957,54	RLANDAAQV	817-825	ICL 3
975,64	LVRQPHIL	1190-1197	Walker B NBD 2
	VRQPHILL	1191-1198	Walker B NBD 2
996,58	AYEIFKII	362-369	Linker/NBD 1
1023,56	SFTDKELLA	238-246	ICL 2
	TDKELLAYA	240-248	ICL 2
1035,52	KSEIDALEM	645-653	Linker
1036,52	VFRSMLRQ	792-799	ICL 3
	VFSMFRYS	36-43	N-Terminus
1046,62	RLTDDVSKI	174-182	ICL 1
	RKQFFHAI	148-155	ICL 1
1052,54	VFSMoxFRYS	36-43 + Ox.	N-Terminus
	MSFEDVLLV (TM12)	969-977	ECL 6/TM12
	LERFYDPL	1083-1090	NBD 2
1071,73	LLDGKEIKR	1095-1103	NBD 2
	LDGKEIKRL	1096-1104	NBD 2
1076,58	KGNLEFRNV	389-397	Linker/NBD 1
1092,60	HLGIVSQEPI	1112-1121	Q-loop NBD 2
1103,64	SVDGQDIRTI	452-461	NBD 1
1104,60	QSLQVPYRN	922-930	ICL 4
1114,68	SFIYGWQLT (TM9/10)	850-858	TM9/ECL 5/TM10
1122,58	KSEIDALEMS	645-654	Linker
1129,66	VFGEMTDIFA (TM1)	71-80	TM1/ECL 1
1184,83	LLDGKEIKRL	1095-1104	NBD 2
1191,64	QSLQVPYRNS	922-931	ICL 4
1201,75	RFLREIIGVV	464-473	NBD 1
1205,78	LSTKEALDESI	682-692	Linker
1206,62	AGFDDGVIVEKG	599-610	NBD 1/Linker
1229,62	MKLPHKFDL	514-523	NBD 1
1249,75	HFSYPSRKEV	398-407	A-loop NBD 1
1250,64	ATEAIENFRTV	897-907	ICL 4
1254,66	NIHAFIESLPN	1153-1163	NBD 2
1261,68	NTRLTDDVSKI	172-182	ICL 1
1267,76	NLTEWPYFVV (TM7)	704-713	Linker/TM7
1273,60	GWFDVHDV GEL	161-171	ICL 1
1293,68	QLLERFYDPL	1081-1090	NBD 2
1315,84	NVRFLREIIGV	462-472	NBD 1
1333,72	MVSVDGQDIRTI	450-461	NBD 1

4.2.2.5 Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp

1349,70	ATEAIENFRTVV	897-908	ICL 4
1382,86	FSVLIGAFSVGQAS (TM6)	336-349	TM6
1414,87	NVRFLREIIGVV	462-473	NBD 1
1418,72	ALDTESEKVVQEA	1205-1217	D-loop NBD 2
1421,74	QLLERFYDPLAG	1081-1092	NBD 2
1450,70	QLMQRLYDPTEG	438-449	NBD 1
1464,80	KILSSFTDKELLA (TM4)	234-246	TM4/ICL 2
1465,84	NARGAAYEIFKII	357-369	Linker
	AAHIIMoxIIEKTPL	1005-1017 + Ox.	Linker/NBD 2
1488,70	GWFDVHVDVGE LNT	161-173	ICL 1
1493,98	LVRNPKILLLDEA	545-557	Walker B NBD 1
1533,78	DVIAGFDDGVIVEKG	596-610	NBD 1/Linker
1552,76	EKTPLIDSYSTEGL	1013-1026	Linker/NBD 2
1558,82	LDESIPVFSWRI	688-700	Linker
1559,84	FNYPTRPDIPVLQ	1042-1054	A-loop NBD 2
1581,88	TTVQLMoxQRLYDPT	435-447 + Ox.	Walker A NBD 1
1611,76	SLTQE QKFEHMYA	909-921	ICL 4
	TQE QKFEHMoxYAQS	911-923 + Ox.	ICL 4
1653,82	SWFDDPKNTTGALTT	802-816	ICL 3
1665,82	AYGDNRSRVVSQEIV	1132-1146	NBD 2
1667,02	RAAKEANIHFIESL	1147-1161	NBD 2
1680,92	QLMQRLYDPTEGMV	438-451	NBD 1
1682,11	LVRNPKILLLDEATS	545-559	Walker B NBD 1
1710,85	VSLTQE QKFEHMYA	908-921	ICL 4
1729,96	FNYPTRPDIPVLQGL	1042-1056	A-loop NBD 2
1751,92	FNYPTRPDIPVLQGL	1042-1056 + Na ⁺	A-loop NBD 2
1775,14	LDTESEKVVQEALDKA	1206-1221	D-loop NBD 2
1810,90	RYGRENVTMDEIEKA	489-503	NBD 1
1826,98	RYGRENVTMoxDEIEKA	489-503 + Ox.	NBD 1
1845,94	ALDTESEKVVQEALDKA	1205-1221	D-loop NBD 2
1874,98	RNADVIAGFDDGVIVEKG	593-610	NBD 1/Linker
1894,92	EKTPLIDSYSTEGLMPN	1013-1029	Linker/NBD 2
1931,14	MRQEIGWFDVHVDVGE L	156-171	ICL 1
2043,97	IMRQEIGWFDVHVDVGE L	155-171	ICL 1
2103,07	AYEIFKIIDNKPSIDSYS	362-379	Linker/NBD 1
2109,02	EKTPLIDSYSTEGLMPNTL	1013-1031	Linker/NBD 2
2227,36	QSLQVYPYRNSLRKAHIFGI (TM11)	922-940	ICL 4/TM11
2312,44	FIESLPNKYSTKVGDKGTQLS	1157-1177	ABC-Motiv NBD 2
2318,20	AYEIFKIIDNKPSIDSYSKS	362-381	Linker/NBD 1
2337,40	IAFGGQKKE LERYNKNLEEA	265-284	ICL 2
2393,11	QRLYDPTEGMVSV DQGDIRTI	441-461	NBD 1
2396,20	MLRQDVSWFDDPKNTTGALTT	796-816	ICL 3
2436,36	VIAFGGQKKE LERYNKNLEEA	264-284	ICL 2
2625,28	EKTPLIDSYSTEGLMoxPNTLEG NVT	1013-1036 + Ox.	Linker/NBD 2
2660,40	NIHAFIESLPNKYSTKVGDKGTQL	1153-1176	ABC-Motiv NBD 2
2747,52	NIHAFIESLPNKYSTKVGDKGTQLS	1153-1177	ABC-Motiv NBD 2
2765,38	QLMQRLYDPTEGMVSV DQGDIRTI	438-461	NBD 1
2781,58	QLMQRLYDPTEGMoxVSV DQGDIRTI	438-461 + Ox.	NBD 1

Analog zu Pepsin wurden aufgrund des unspezifischen Spaltungsverhaltens der Elastase - C-terminal von Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin, Valin und Serin - von allen detektierten Peptidsignalen MS/MS-Spektren aufgenommen.

Schaut man sich die in der Tabelle aufgeführten Peptidsignale etwas genauer an, wird deutlich, dass die resultierenden Monoisotopischen Massen mit Werten zwischen 633 und 2781 Dalton ungefähr in der Größenordnung der Massen des Verdau von P-gp mit Pepsin liegen, wobei die größten mit Elastase erzeugten P-gp-Peptide im Vergleich zu Pepsin etwa vier bis fünf Aminosäuren mehr umfassen. Bedingt ist dies durch die Ähnlichkeit der beiden Proteasen im Hinblick auf die Anzahl und Art der bevorzugten Spaltungsstellen innerhalb der P-gp-Aminosäuresequenz. Auffällig ist, dass beim Verdau von P-gp mit Elastase im Gegensatz zum Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp die Aminosäure Methionin des öfteren oxidiert als Sulfoxid vorliegt. Diese Tatsache könnte in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Verdau-Puffer begründet sein.

Vergleicht man das resultierende Peptid-Muster des Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp mit demjenigen des Pepsin-In-Lösung-Verdau, erkennt man, dass sich das Verhältnis von Peptiden im Bereich der transmembranären Domänen zu Peptiden in den Linker-, Loop- und NBD-Regionen zugunsten der extra-membranären Bereiche verschoben hat. Mit anderen Worten, die Sequenzabdeckung in den Loop- und Linker-Regionen sowie den Nukleotid-Bindungsdomänen liegt deutlich über derjenigen des Pepsin-In-Lösung-Verdau, während im Vergleich dazu die transmembranäre Sequenzabdeckung etwas geringer ausfällt. So konnten größere Teile der TMs 1, 6, 8, 9 und 11 sowie kleinere Bereiche der TMs 4, 7 und 12 abgedeckt werden. Ausgespart blieben dagegen die transmembranären Helices 2, 3, 5 und 10. Die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung von P-gp ist mit 573 von 1280 Aminosäuren = 45 % fast identisch mit derjenigen des Pepsin-In-Lösung-Verdau (46 %). Verglichen mit den übrigen bis dato durchgeführten In-Lösung-Verdau von P-gp mit Trypsin, Chymotrypsin und Bromcyan, konnte die Abdeckung der transmembranären Bereiche in allen drei Fällen verbessert werden. Darüber hinaus konnte gegenüber Bromcyan auch die Sequenzabdeckung in den extra-membranären Regionen von P-gp deutlich erhöht werden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass das Ziel, mit Hilfe des Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp eine gleichermaßen zufriedenstellende Sequenzabdeckung sowohl in

4.2.2.5 Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp

den transmembranären Domänen als auch in den Loop-, Linker- und NBD-Bereichen zu erzielen, erreicht werden konnte.

In der nachfolgenden Abbildung 4.15 ist die durch den Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp erzielte Sequenzabdeckung graphisch veranschaulicht. Die mit Elastase abgedeckten Sequenzabschnitte von P-gp sind in rot dargestellt. Die Sequenzabdeckung in den Loop- und Linker-Regionen sowie den Nukleotid-Bindungsdomänen konnte gegenüber dem Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp sichtbar verbessert werden, liegt jedoch unterhalb der mit Trypsin und Chymotrypsin erzielten Sequenzabdeckung in diesen Bereichen. Dafür fiel die Sequenzabdeckung in den transmembranären Domänen im Vergleich zu Trypsin, Chymotrypsin und Bromcyan deutlich höher aus.

1	MDLEGRNGG	AKKKNFFKLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVF SMF	RYSNWL DKLY	
51	MVVGTLAA II	HGAGLPL MML	VF GEMTD I FA	NAGNLEDLMS	NITNRS DIND	TM 1
101	TGFFM N LEED	MTRYAY Y SSG	IGAGVL V AA Y	IQV S FWCLAA	GRQ I HK IR KQ	TM 2
151	FF HAIMR Q E I	GW FVD V HD V GE	LN TRLT DD V S	K IN EGIGDK I	GM FF Q S MA T F	TM 3
201	FTGFIVGFTR	GWKLT L VILA	ISPVL G LSAA	VWAK IL SS F T	DK ELLAYAKA	TM 3 + 4
251	GAVAE E VLAA	IRT V IA F GG Q	KK ELERY N KN	LEE AKRIGIK	KAITANISIG	TM 5
301	AAFLLI Y ASY	ALAFW Y GTTL	VLSGE Y SIGQ	VLTV F FS V LI	GA FSV G Q AS P	TM 5 + 6
351	SIEAFAN ARG	AA YE I FK I ID	NK PSID S YSK	SG HKPD NI KG	NL EFR N VH F S	
401	Y PSR KE V K IL	K GL N LKV Q SG	QTVAL V GNSG	CGK S TT V Q L M	QR LYD P TE G M	
451	V SD G Q D IR T	IN VR F L R E I I	GV SQEP V LF	ATTIA E NIR Y	GR ENV T M D E I	
501	E KAV KE AN AY	DFIM K L P HK F	DT LVGER GA Q	L SG GQ K Q R IA	IARAL V R N PK	
551	I LL L DE A T S A	LDT E SE A V V Q	VALDK A R K GR	TTIVIA H R L S	T V R N AD V I A G	
601	F DD G V I VE K G	NHDE L M K E K G	I Y FK L V T M Q T	AGNE V E L E N A	A D ES K S E I D A	
651	L E M S S ND S RS	SLIR K R S TRR	SVR G S Q A Q DR	K L S T K E A L D E	S I P P V S F W R I	
701	M K L N L T E W P Y	F V V G V F C A I I	NGGL Q P A F A I	I F S K I I G V F T	RID D P E T K R Q	TM 7
751	NS N L F S L L F L	AL GI I S F I T F	FLQ G F T F G K A	GE I L T K R L R Y	M V F R S M L R Q D	TM 8
801	V S W F D D P K N T	T G A L T T R L A N	D A A Q V K G A I G	S R L A V I T Q N I	A N L G T G I I I S	TM 9
851	F I Y G W Q L T L L	LL A I V P I I A I	AG V V E M K M L S	G Q A L K D K K E L	E G S G K I A T E A	TM 9 + 10
901	I E N F R T V V S L	T Q E Q K F E H M Y	A Q S L Q V P Y R N	S L R K A H I F G I	T F S F T Q A M M Y	TM 11
951	F S Y A G C F R F G	AYL V A H K L M S	F E D V L L V F S A	V V F G A M A V G Q	V S S F A P D Y A K	TM 11 + 12
1001	AK I S A A H I I M	I I E K T P L I D S	Y S T E G L M P N T	L E G N V T F G E V	V F N Y P T R P D I	
1051	P V L Q L S L E V	KK G Q T L A L V G	SS G C G K S T V V	Q L L E R F Y D P L	A G K V L L D G K E	
1101	I K R L N V Q W L R	A H L G I V S Q E P	I L F D C S I A E N	I A Y G D N S R V V	S Q E E I V R A A K	
1151	E A N I H A F I E S	L P N K Y S T K V G	D K G T Q L S G G Q	K Q R I A I A R A L	V R Q P H I L L L D	
1201	E A T S A L D T E S	E K V V Q E A L D K	A R E G R T C I V I	A H R L S T I Q N A	D L I V V F Q N G R	
1251	V K E H G T H Q Q L	LA Q K G I Y F S M	V S V Q A G T K R Q			

Abb. 4.15: Graphische Darstellung der durch den Elastase-In-Lösung-Verdau erzielten Sequenzabdeckung von P-gp. Die mittels Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp abgedeckten Sequenzbereiche sind in rot dargestellt. Die erzielte Sequenzabdeckung beträgt 573 von 1280 Aminosäuren = 45 %.

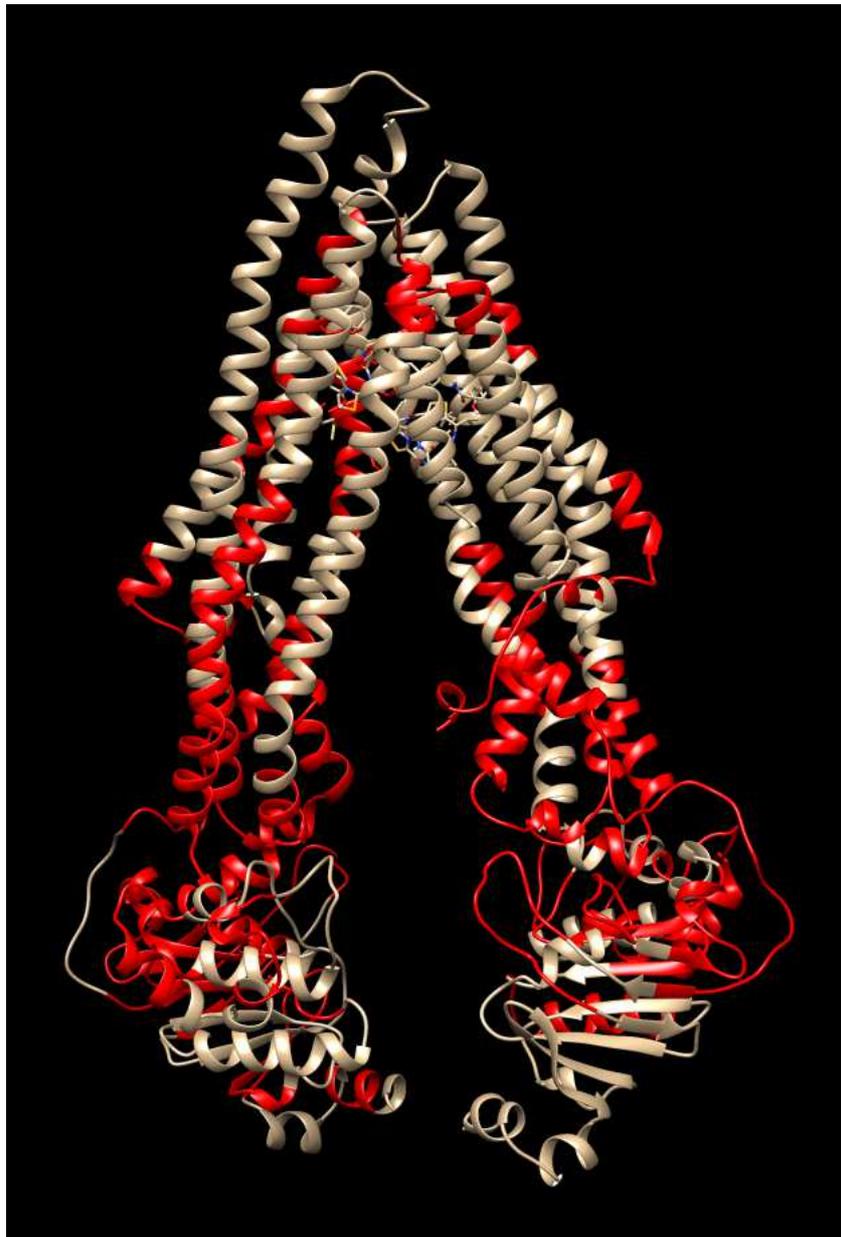


Abb. 4.16: Bildliche Darstellung der durch den Elastase-In-Lösung-Verdau erzielten Sequenzabdeckung von P-gp. In rot eingefärbt sind Sequenzabschnitte, die durch den Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp abgedeckt werden konnten. In weiß dargestellt sind die nicht abgedeckten Bereiche von P-gp. Es wird deutlich, dass die transmembranäre Sequenzabdeckung im Vergleich zum Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp niedriger ausfällt, verglichen mit Trypsin, Chymotrypsin und Bromcyan jedoch erhöht ist. So konnten Teile der transmembranären Helices 1, 4, 6, 7, 8, 9, 11 und 12 abgedeckt werden. Die insgesamt erreichte Sequenzabdeckung liegt mit 45 % im selben Bereich wie die durch den Pepsin-In-Lösung- bzw. Trypsin-In-Gel-Verdau erzielten Sequenzabdeckungen.

Als nächster Schritt wurde in der vorliegenden Arbeit ein In-Lösung-Verdau von P-gp mit Proteinase K aus dem Schlauchpilz *Tritirachium album* durchgeführt. Dieses Enzym zeigt eine Präferenz für unpolare aliphatische und aromatische Aminosäuren und sollte im Hinblick auf die erzielte Sequenzabdeckung von P-gp mit den bereits verwendeten Spaltungsreagenzien verglichen werden.

4.2.2.6 In-Lösung-Verdau von P-gp mit Proteinase K

Der In-Lösung-Verdau von P-gp mit Proteinase K wurde entsprechend Kapitel 3.2.2.6 in Anlehnung an die Produktinformation des Enzyms von Roche [112] durchgeführt und nachfolgend optimiert. Proteinase K ist ein Enzym aus dem Schlauchpilz *Tritirachium album* und gehört zur Familie der Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen. Der Buchstabe „K“ steht für Keratin und reflektiert die außerordentlich stark ausgeprägte Fähigkeit der Protease, Keratin abzubauen zu können. Haupteinsatzgebiete des Enzyms sind der Abbau von Proteinen in Zelllysaten und die Isolierung von Nukleinsäuren aus Bakterien bzw. Zellen und Geweben für die Polymerase-Kettenreaktion, wobei Proteinase K gleichzeitig als Exo- und Endopeptidase fungiert. Aktiviert durch Calcium-Ionen (1 - 5 mmol/l) spaltet die Proteinase Proteine bevorzugt hinter hydrophoben aliphatischen und aromatischen Aminosäuren. Ist die Inkubationszeit lang genug und die Enzymkonzentration hoch, werden Proteine vollständig verdaut. Entzieht man der Protease die Calcium-Ionen, sinkt die katalytische Aktivität um circa 80 %. Die verbleibende Aktivität reicht aus, um Proteine abzubauen, die üblicherweise Nukleinsäurepräparationen verunreinigen. Das pH-Optimum des Enzyms liegt bei 8, allerdings ist Proteinase K in einem weiten Bereich von pH 4,5 - 12 stabil. Eine Steigerung der Aktivität kann durch Temperaturerhöhung von 37 °C auf 50 - 60 °C bzw. Zusatz von 0,5 - 1 % SDS erreicht werden. Inaktiviert wird Proteinase K durch Fällung mit Trichloressigsäure oder Erhitzen, wobei eine Temperatur von 95 °C und eine Dauer von 10 Minuten nicht unterschritten werden sollte. Die Richtwerte für die Arbeitskonzentration bzw. Inkubationszeit liegen zwischen 50 - 200 µg/ml bzw. 30 min - über Nacht [112].

Für den P-gp-Verdau wurde eine gebrauchsfertige Lösung von Proteinase K in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 der Firma Roche verwendet [112]. Die Konzentration von Proteinase K in

dieser Lösung betrug 19,2 mg/ml. Zunächst wurden 5 µl aufgereinigtes P-gp (5,7 µg) in einer Menge 10 mmol/l Tris-HCl / 1mmol/l Calciumchlorid pH 7,5 suspendiert, so dass ein Endvolumen von 100 µl für den Verdau resultierte. Anschließend wurde 1 µl der Proteinase K-Lösung (19,2 µg) zur P-gp-Suspension gegeben und bei 37 bzw. 65 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte daraufhin durch 15 minütiges Erhitzen bei 95 °C, gefolgt von der Trocknung der erhaltenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge, ihrer Entsalzung und massenspektrometrischen Analyse per ESI-MS.

Zur Optimierung des Verdaus wurden nachfolgend das Enzym : Protein Verhältnis und die Inkubationszeit variiert. Dabei wurden Enzym : Protein Verhältnisse von 1 : 1 und 1 : 20 und Inkubationszeiten von 1 h bis über Nacht im Hinblick auf die Sequenzabdeckung von P-gp untersucht. Hierfür wurde die Proteinase K-Lösung 1 : 10 bzw. 1 : 100 mit 10 mmol/l Tris-HCl / 1 mmol/l Calciumchlorid pH 7,5 verdünnt ($c = 1,92$ bzw. $0,192$ mg/ml) und von dieser Lösung 2,97 µl (5,7 µg Proteinase K) bzw. 1,48 µl (0,285 µg Proteinase K) zur Proteinsuspension gegeben. Der Verdau erfolgte anschließend bei 37 bzw. 65 °C . Die Inaktivierung des Verdaus, die Trocknung und die Analyse der erhaltenen Peptide wurden wie bereits beschrieben durchgeführt.

Die im Rahmen des Verdaus von P-gp mit Proteinase K erzielten Ergebnisse sind in der nachfolgend gezeigten Tabelle 4.13 zusammengefasst. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink abgebildet.

Die unspezifische Spaltung von Proteinase K C-terminal von unpolaren aliphatischen und aromatischen Aminosäuren führt dazu, dass es für viele der betrachteten Monoisotopischen Massen theoretisch mehrere passende Aminosäuresequenzen mit identischer Masse innerhalb der P-gp-Sequenz gibt. Welche dieser theoretisch möglichen Aminosäuresequenzen sich nun tatsächlich hinter dem jeweiligen Peptidsignal verbirgt, kann nur durch Sequenzierung des Peptids im MS/MS-Modus geklärt werden. Aus diesem Grund wurden von allen in der Tabelle aufgeführten Peptidsignalen MS/MS-Spektren aufgenommen und durch Bestimmung der Abfolge der einzelnen Aminosäuren des Peptids die jeweils korrekte Aminosäuresequenz identifiziert und der entsprechenden Monoisotopischen Masse zugeordnet.

Betrachtet man die in Tabelle 4.13 zusammengefassten Ergebnisse des Proteinase K-In-Lösung-Verdaus von P-gp etwas genauer, fällt sofort auf, dass die Anzahl der

entstandenen Peptide äußerst klein und die erzielte Sequenzabdeckung mit 158 von 1280 abgedeckten Aminosäuren = 12 % noch deutlich niedriger ist als diejenige des Verdau von P-gp mit Bromcyan (19 %). Trotz dieser sehr geringen Sequenzabdeckung konnten größere Bereiche der transmembranären Helices 4, 7, 8 und 11 sowie die Anfänge der TMs 6, 9 und 12 mit Proteinase K abgedeckt werden.

Des weiteren wird deutlich, dass die gebildeten Peptide im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Verdau von P-gp verhältnismäßig klein sind, was wahrscheinlich durch die hohe Anzahl von Schnittstellen innerhalb der P-gp-Aminosäuresequenz und die dadurch bedingte sehr unspezifische Spaltung zustande kommt. So wurde lediglich ein Peptid mit einer Monoisotopischen Masse von mehr als 2000 Dalton und nur zwei Peptide mit Monoisotopischen Massen größer 1500 Dalton detektiert.

Tab. 4.13: Peptide aus dem In-Lösung-Verdau von P-gp mit Proteinase K. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink abgebildet.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
642,40	AYEIF	362-366	Linker
651,42	LDKLY	46-50	N-Terminus
667,42	VLSGEY (TM6)	321-326	ECL 3/TM6
673,46	QVALDK	570-575	NBD 1
	GAIGSRL (TM9)	827-833	ICL 3/TM9
703,46	GLSAAVW (TM4)	226-232	TM4
822,48	SFEDVLL (TM12)	970-976	ECL 6/TM12
843,46	NIHAFIE	1153-1159	NBD 2
	VQVALDKA	569-576	NBD 1
916,52	ANAGNLEDL	80-88	ECL 1
	INGGLQPAF (TM7)	720-728	TM7
939,52	ERFYDPL	1084-1090	NBD 2
1046,74	ALVRQPHIL	1189-1197	Walker B NBD 2
1047,60	CGKSTVVQLL	1074-1083	Walker A NBD 2
1085,62	CGKSTVVQLL	1074-1083 + Ox. + Na ⁺	Walker A NBD 2
1123,58	LERFYDPLA	1083-1091	NBD 2
1275,91	DFIMKLPHKF	511-520	NBD 1
	FIMKLPHKFD	512-521	NBD 1
1672,08	FSYAGCFRFGAYLVA (TM11)	951-965	TM11/ECL 6
1685,92	IQNADLIVVFQNGRV	1237-1251	NBD 2
2224,28	SFITFFLQGFTEGKAGEILT (TM8)	766-785	TM8/ICL 3

4.2.2.6 In-Lösung-Verdau von P-gp mit Proteinase K

Ein möglicher Grund für die geringe Sequenzabdeckung von lediglich 12 % könnte der übermäßige Eigenverdau des Enzyms sein. Die Übersichtsspektren des Proteinase K-In-Lösung-Verdau von P-gp enthielten fast nur Peptide, welche aus dem Eigenverdau der Protease resultierten. Dabei wurde bezüglich der differierenden Verdau-Temperatur von 37 bzw. 65 °C kein wesentlicher Unterschied zwischen dem jeweils erzeugten Peptid-Muster beobachtet. Die von den beiden bei 37 bzw. 65 °C durchgeführten P-gp-Verdau mit Proteinase K aufgenommenen Übersichtsspektren sind quasi deckungsgleich, wie in der folgenden Abbildung 4.17 zu sehen ist.

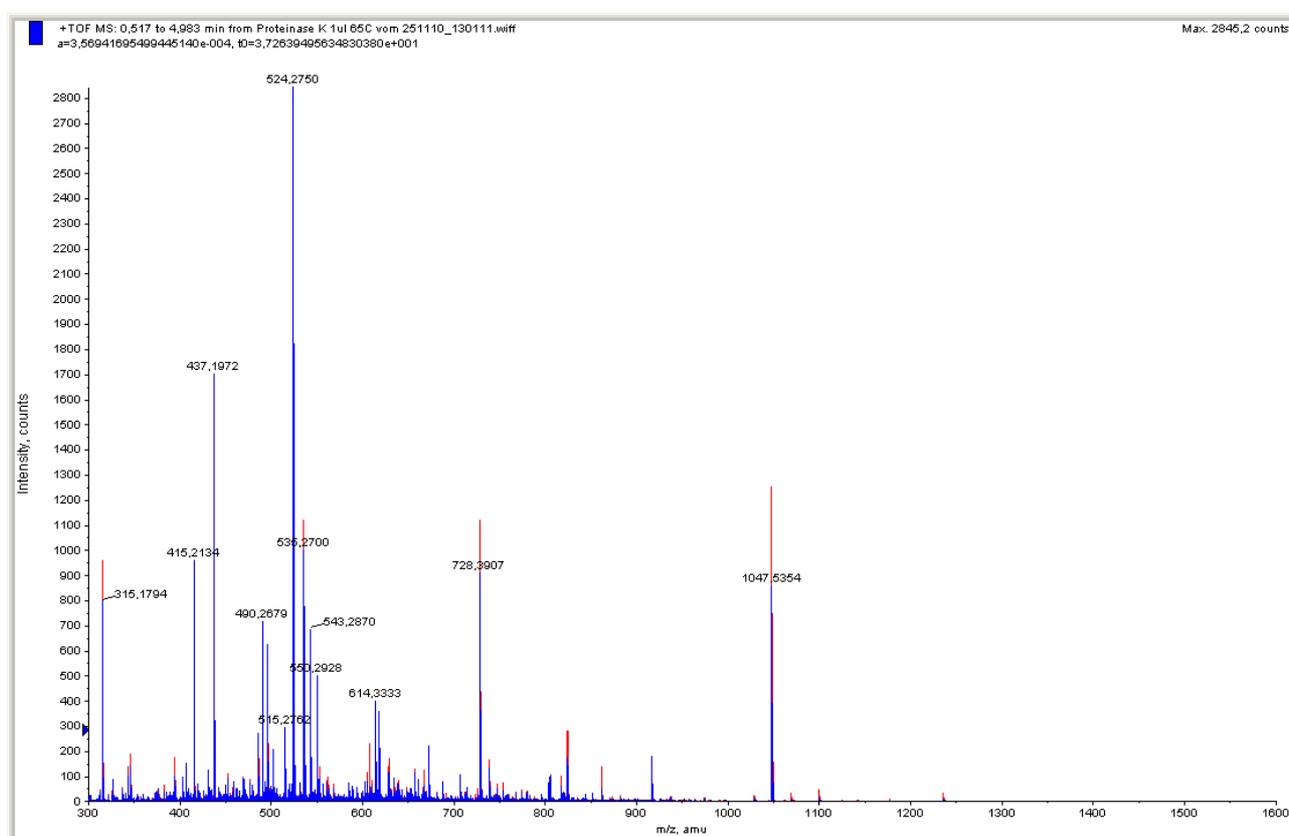


Abb. 4.17: Überlagerte Übersichtsspektren des In-Lösung-Verdau von P-gp mit Proteinase K bei 37 °C und 65 °C. In rot dargestellt ist das Übersichtsspektrum des Verdau bei 37 °C, in blau abgebildet ist das Übersichtsspektrum des Verdau bei 65 °C. Die beiden Übersichtsspektren wurden übereinander gelegt, um Unterschiede hinsichtlich des Peptid-Musters zu detektieren.

4.2.2.6 In-Lösung-Verdau von P-gp mit Proteinase K

Die Abbildung zeigt die übereinander gelegten Übersichtsspektren des Proteinase K-In-Lösung-Verdau von P-gp bei 37 und 65 °C. In blau dargestellt ist das Übersichtsspektrum des Verdau bei 65 °C, in rot abgebildet ist das Übersichtsspektrum des Verdau bei 37 °C. Es wird deutlich, dass eine Erhöhung der Verdau-Temperatur von 37 °C auf 65 °C weder den Eigenverdau des Enzyms noch den Verdau von P-gp durch die Protease sichtlich beeinflusst und die beiden Übersichtsspektren mit wenigen Ausnahmen in Bezug auf die Signalintensität einiger Peptide deckungsgleich sind.

Auch die im Zuge der Optimierung des Verdau von P-gp mit Proteinase K vorgenommene Erniedrigung des Enzym : Protein Verhältnisses von 3 : 1 auf 1 : 1 bzw. 1 : 20 sowie die Verlängerung der Inkubationszeit von 30 Minuten auf 1 Stunde bzw. über Nacht, führten bedauerlicherweise nicht zu einer sichtbaren Verbesserung des Verdau von P-gp und damit auch nicht zu einer Erhöhung der Sequenzabdeckung. Zwar konnte der Eigenverdau von Proteinase K durch Verringerung des Enzym : Protein Verhältnisses ein wenig zurückgedrängt werden, jedoch wurde dadurch keine wesentliche Verbesserung des P-gp-Verdau, gemessen an der Anzahl der gebildeten P-gp-Peptide, beobachtet. Graphisch veranschaulicht ist dies in der im Folgenden gezeigten Abbildung 4.18.

Die Abbildung zeigt zwei Übersichtsspektren des Verdau von P-gp mit Proteinase K bei einer Temperatur von 37 °C unter Einsatz zweier verschiedener Enzym : Protein Verhältnisse (3 : 1 versus 1 : 1) in Überlagerung. In blau dargestellt ist der Verdau unter Verwendung eines Enzym : Protein Verhältnisses von 3 : 1, in rot abgebildet ist der Verdau bei einem gewählten Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 1. Es ist ersichtlich, dass zwischen den beiden überlagerten Spektren im Hinblick auf das resultierende Peptid-Muster kein Unterschied besteht und sie sich mit Ausnahme der Signalintensität bei einigen Peptide decken.

Die Verlängerung der Inkubationszeit wirkte sich leider ebenfalls nicht positiv auf die Sequenzabdeckung von P-gp aus, was im Nachhinein betrachtet auch nicht verwunderlich ist, da eine Verlängerung der Inkubationszeit neben der erwünschten Erhöhung der Anzahl von P-gp-Peptiden gleichzeitig eine unerwünschte Erhöhung der Peptide aus dem Eigenverdau von Proteinase K bedeutet.

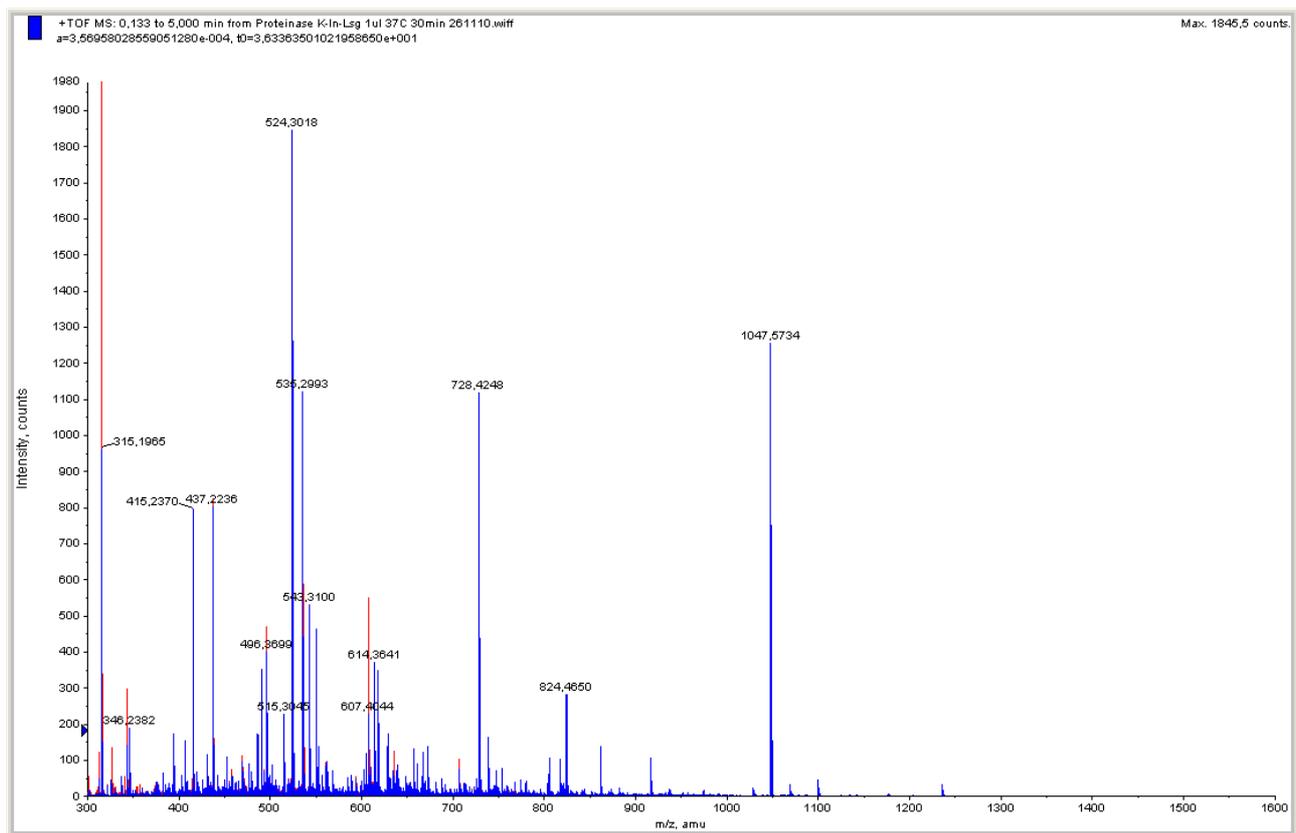


Abb. 4.18: Übereinander gelegte Übersichtsspektren zweier unterschiedlicher In-Lösungs-Verdaus von P-gp mit Proteinase K. In blau dargestellt sind die resultierenden Peptide bei einem eingesetzten Enzym : Protein Verhältnis von 3 : 1. In rot abgebildet sind die erzeugten Peptide unter Anwendung eines Enzym : Protein Verhältnisses von 1 : 1. Beide Verdaus wurden bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Die beiden Übersichtsspektren wurden überlagert, um Unterschiede bezüglich des Peptid-Musters zu detektieren. Abgesehen von der Signalintensität einiger Peptide sind die beiden Spektren deckungsgleich.

Die bei der Vorstellung des Enzyms zu Anfang erwähnte mögliche Aktivitätssteigerung durch den Zusatz von 0,5 - 1 % SDS wurde nicht untersucht, da aus vorherigen Versuchen zur Denaturierung der Liposomen und Solubilisierung des Proteins bereits bekannt war, dass schon geringe Mengen an SDS jegliche Peptidsignale unterdrücken und auch mit einer effizienten Entsalzung keine vollständige Entfernung des SDS aus der Probe erreicht werden konnte.

Die durch den Proteinase K-In-Lösungs-Verdau von P-gp erzielte Sequenzabdeckung ist in der nachfolgenden Abbildung 4.19 graphisch veranschaulicht. Die mit Proteinase K abgedeckten Sequenzabschnitte von P-gp sind in rot dargestellt und betragen 158 von 1280 Aminosäuren = 12 %. Damit ist die mit Proteinase K erzielte Sequenzabdeckung von allen bis dato eingesetzten Spaltungsreagenzien bei weitem die niedrigste und der

4.2.2.6 In-Lösung-Verdau von P-gp mit Proteinase K

Versuch, die Sequenzabdeckung sowohl in den transmembranären Bereichen als auch in den Loop-, Linker- und NBD-Regionen noch weiter zu verbessern, leider gescheitert. Trotz dieser insgesamt sehr geringen Sequenzabdeckung konnten größere Teile der TMs 4, 7, 8 und 11 sowie die Anfänge der TMs 6, 9 und 12 abgedeckt werden. Ganz ausgespart blieben dagegen die transmembranären Helices 1, 2, 3, 5 und 10.

1	MDLEGRNGG	AKKKNFFKLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVFSMF	RYSNWL LDKLY	
51	MVVGTLAII	HGAGLPLMML	VFGEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRSNDIND	TM 1
101	TGFFMNL	EEDMTRYAYYS	GIGAGVLVAAY	IQVSFWCLAA	GRQIHKIRKQ	TM 2
151	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS	KINEGIGDKI	GMFFQSMATF	TM 3
201	FTGFIVGFTR	GWKLTLVILA	ISPVL GLSAA	VWAK SSFT	DKELLAYAKA	TM 3 + 4
251	GAVAEVLAA	IRTVIAFGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG	TM 5
301	AAFLLIYASY	ALAFWYGTTL	VLSGEYSIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP	TM 5 + 6
351	SIEAFANARG	AAYEIFKIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIKG	NLEFRNVHFS	
401	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG	QTVALVGNSG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM	
451	VSVDGQDIRT	INVRFLREII	GVVSQEPVLF	ATTIAENIRY	GRENVTMDEI	
501	EKAVKEANAY	DFIMKLPHKF	DTLVGERGAQ	LSGGQKQRIA	IARALVRNPK	
551	ILLLDEATSA	LDTESEAV VQ	VALDKARKGR	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG	
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVTMQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA	
651	LEMSSNDSRS	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPPVSFWRI	
701	MKLNLTEWPY	FVVGVFCAI I	NGGLQPAFAI	IFSKIIGVFT	RIDDPETKRQ	TM 7
751	NSNLFSLFL	ALGII SFITF	FLQGFTEGKA	GEILTKRLRY	MVFRSMLRQD	TM 8
801	VSWFDDPKNT	TGALTTRLAN	DAAQVK GAIG	SRLAVITQNI	ANLGTGIIIS	TM 9
851	FIYGWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVEMKMLS	GQALKDKKEL	EGSGKIATEA	TM 9 + 10
901	IENFRTVVSL	TQEQKFEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY	TM 11
951	FSYAGCFRFG	AYLVAHKLMS	FEDVLLVFS	VVFGAMAVGQ	VSSFAPDYAK	TM 11 + 12
1001	AKISAAHIIM	IIEKTPIDS	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI	
1051	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSG CGKSTVV	QLLERFYDPL	AGKVLDDGKE	
1101	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNSRVV	SQEEIVRAAK	
1151	EANIHFIES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KQRIAIARAL	VRQPHILLLD	
1201	EATSALDTES	EKVVEALDK	AREGRTCIVI	AHRLST IQNA	DLIVVFQNGR	
1251	VKEHGTHQQL	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKRQ			

Abb. 4.19: Graphische Darstellung der mittels In-Lösung-Verdau von P-gp mit Proteinase K erzielten Sequenzabdeckung. Sequenzbereiche, die durch den In-Lösung-Verdau mit Proteinase K abgedeckt werden konnten, sind in rot dargestellt. Die erzielte Sequenzabdeckung beträgt 158 von 1280 Aminosäuren = 12 %.

Zum Abschluss der separaten enzymatisch-chemischen In-Lösung-Verdau von P-gp wurde in der vorliegenden Arbeit als letztes Spaltungsreagenz die thermostabile Metalloprotease Thermolysin aus dem Bakterium *Bacillus thermoproteolyticus rokko* für den Verdau von P-gp eingesetzt und im Hinblick auf die erzielte Sequenzabdeckung mit den bis dahin verwendeten Verdau-Reagenzien verglichen. Das besondere an diesem Enzym ist seine bei hohen Temperaturen bestehende bleibende katalytische Aktivität sowie

die Spaltung von Peptidbindungen N-terminal von hydrophoben Aminosäuren wie Alanin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin und Valin.

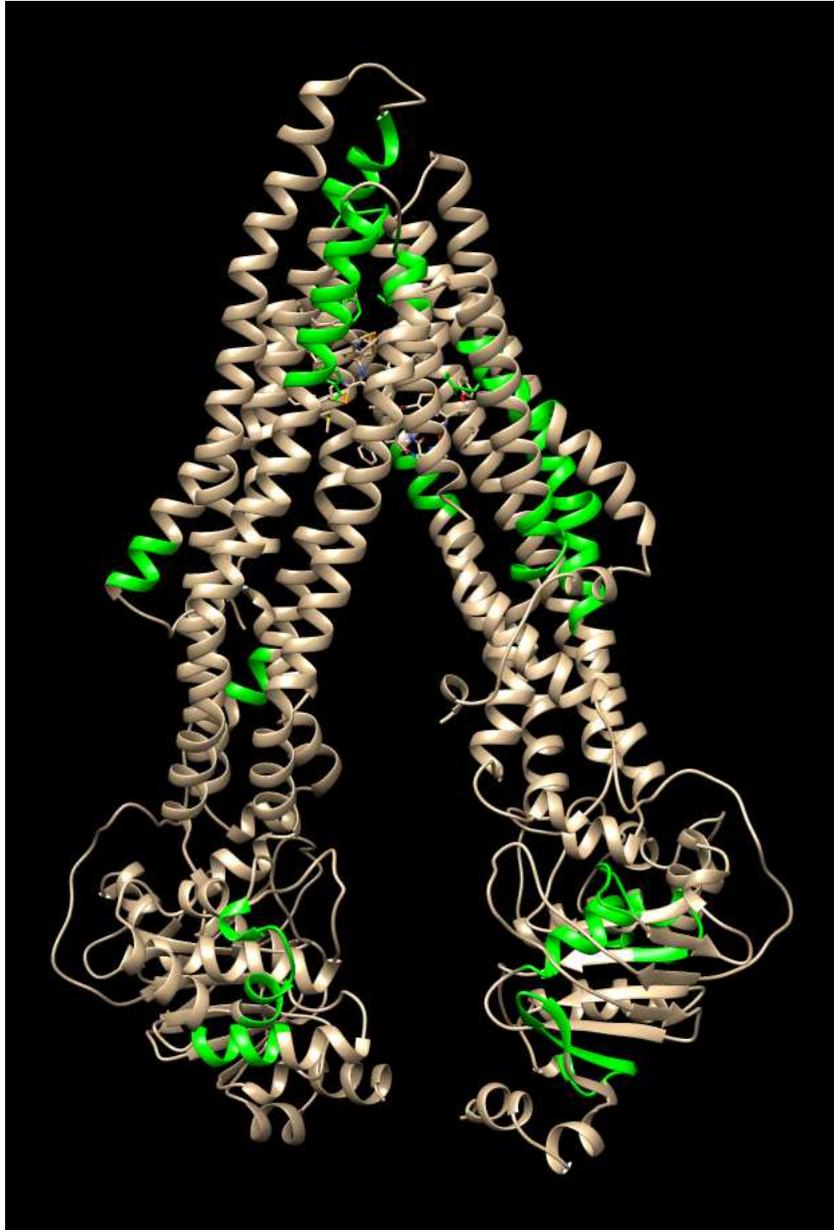


Abb. 4.20: Bildliche Darstellung der durch den Verdau von P-gp mit Proteinase K erzielten Sequenzabdeckung. In grün eingefärbt sind Sequenzabschnitte, die durch den Verdau von P-gp mit Proteinase K abgedeckt werden konnten. In weiß dargestellt sind die nicht abgedeckten Bereiche von P-gp. Die insgesamt erreichte Sequenzabdeckung liegt mit 12 % noch unterhalb der mit Bromcyan erzielten Sequenzabdeckung und stellt damit das bisher schlechteste Ergebnis dar. Trotz dieser sehr niedrigen Sequenzabdeckung wurden Teile der transmembranären Helices 4, 6, 7, 8, 9, 11 und 12 mit abgedeckt.

4.2.2.7 Thermolysin-In-Lösung-Verdau von P-gp

Die thermostabile Metalloprotease Thermolysin aus dem Bakterium *Bacillus thermoproteolyticus rokko* zeichnet sich dadurch aus, dass sie im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymen bei hohen Temperaturen aktiv ist und somit als Alternative zu denaturierenden Reagenzien für den Verdau proteolytisch resistenter Proteine eingesetzt werden kann. Das Enzym wurde von der Firma Promega bezogen und der Verdau von P-gp entsprechend Kapitel 3.2.2.7 in Anlehnung an ein in der Produktinformation enthaltenes Protokoll [113] durchgeführt.

Als Verdau-Puffer wurde laut Produktinformation eine Mischung aus 50 mmol/l Tris-HCl und 0,5 mmol/l Calciumchlorid pH 8,0 gewählt, da Thermolysin zur Aktivierung Calcium- bzw. Zinkionen als Kofaktoren benötigt. Das pH-Optimum des Enzyms liegt bei pH 8,0 und der Bereich für eine gute Verdau-Temperatur erstreckt sich von 65 - 95 °C. Das Enzym : Protein Verhältnis sollte zwischen 1 : 20 und 1 : 50 betragen und als Inkubationszeit werden 30 Minuten bis 6 Stunden angegeben. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgt durch Zugabe von soviel 10 %iger Ameisensäure, dass ein Anteil von final 0,5 % Ameisensäure im Endvolumen des Verdau enthalten ist [113].

Für den Verdau von P-gp mit Thermolysin wurden als Erstes 5 µl P-gp (5,7 µg) in 92,15 µl 50 mmol/l Tris-HCl / 0,5 mmol/l Calciumchlorid pH 8,0 suspendiert. Anschließend wurde die Thermolysin-Stammlösung (c = 1 µg/µl) in 50 mmol/l Tris-HCl / 0,5 mmol/l Calciumchlorid pH 8,0 hergestellt und nachfolgend 1 : 10 mit Verdau-Puffer zur eigentlichen Verdau-Lösung verdünnt. Von dieser Verdau-Lösung wurden daraufhin 2,85 µl (0,285 µg Thermolysin) entsprechend einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 zur Proteinsuspension gegeben und bei einer Temperatur von 75 °C für 2,5 h inkubiert. Im Anschluss daran erfolgte durch Zugabe von 6 µl 10 %iger Ameisensäure (0,5 % final) die Inaktivierung des Enzyms und die entstandenen Peptide wurden nachfolgend getrocknet und nach Aufbereitung für die Massenspektrometrie mittels ESI-MS analysiert.

In der im Folgenden gezeigten Tabelle 4.14 sind die Ergebnisse des Thermolysin-In-Lösung-Verdau von P-gp zusammengefasst. Aufgrund der unspezifischen Spaltung von

Peptidbindungen N-terminal von hydrophoben Aminosäuren wie Alanin, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin und Valin existiert zu vielen der detektierten Peptidsignale mehr als eine passende Aminosäuresequenz mit identischer Monoisotopischer Masse innerhalb von P-gp

Tab. 4.14: Peptide aus dem Thermolysin-In-Lösung-Verdau von P-gp. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink dargestellt.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
606,40	LMMLV (TM1)	67-71	TM1
648,44	INVRF	461-465	NBD 1
818,48	DLEGDRN	2-8	N-Terminus
860,60	LQVPYRNS	924-931	ICL 4
924,64	YMVVGTAA (TM1)	50-58	N-Terminus/TM1
	IHGAGLPLM (TM1)	60-68	TM1
	VFRSMLR	792-798	ICL 3
976,64	IATEAIEN	896-903	ICL 4
1013,62	FSYPSRKE	399-406	A-loop NBD 1
1110,68	FIESLPNKY	1157-1165	NBD 2
1185,76	LDGKEIKRLN	1096-1105	NBD 2
	QLSGGQKQRIA	530-540	Walker A NBD 1
1220,72	MVSVDGQDIRT	450-460	NBD 1
2154,08	FGGQKKELERYNKNLEEA	267-284 -1	ICL 2
2415,19	VIAGFDDGVIVEKGNHDELMKE	597-618	NBD 1/Linker

Die Klärung, welche dieser theoretisch möglichen Aminosäuresequenzen sich in der Praxis nun tatsächlich hinter dem entsprechenden Peptidsignal verbirgt, kann nur durch Fragmentierung des Peptids in seine Aminosäuren erfolgen. Aus diesem Grund wurden alle beobachteten Peptidsignale nacheinander selektiert und im MS/MS-Modus sequenziert, so dass durch Bestimmung der Abfolge der einzelnen Aminosäuren eine eindeutige Zuordnung der korrekten Aminosäuresequenz zur jeweiligen Monoisotopischen Masse erfolgen konnte.

Betrachtet man die in der Tabelle aufgeführten Ergebnisse etwas näher, fällt sofort die sehr geringe Anzahl gebildeter P-gp-Peptide auf. Insgesamt konnten aus dem Verdau von P-gp mit Thermolysin lediglich 12 Peptide erhalten werden. Dies entspricht einer Sequenzabdeckung von nur 11 % (145 von 1280 abgedeckten Aminosäuren), womit der

Thermolysin-In-Lösung-Verdau von P-gp sogar noch schlechter ausfällt als der Verdau von P-gp mit Proteinase K. Von den transmembranären Domänen konnte lediglich die TM1 abgedeckt werden, alle übrigen transmembranären Helices sowie große Teile der Nukleotid-Bindungsdomänen, Loop- und Linker-Regionen blieben ausgespart. Mit einem Ergebnis dieser Form war im Voraus nicht zu rechnen, da für Thermolysin innerhalb der P-gp-Aminosäuresequenz ausreichend Schnittstellen vorhanden sind und durch die hohe Verdau-Temperatur von 75 °C zusätzlich eine Denaturierung des Proteins stattfindet, so dass die Zugänglichkeit für das Enzym zu den stark gefalteten Bereichen sogar erleichtert sein sollte. Die Auswertung der MS/MS-Spektren zeigte jedoch, dass in Analogie zum Verdau von P-gp mit Proteinase K, die überwiegende Anzahl der im Übersichtsspektrum detektierten Peptide aus dem Eigenverdau des Thermolysins stammte. Demnach hat es den Anschein, als würde sich die Metalloprotease Thermolysin lieber selbst verdauen, anstatt P-gp zu verdauen.

Aufgrund der wenig vielversprechenden Ergebnisse wurden keine weiteren Optimierungsversuche für den Verdau von P-gp mit Thermolysin unternommen, auch unter dem Gesichtspunkt, dass durch die zuvor durchgeführten Verdaus von P-gp mit Trypsin, Chymotrypsin, Bromcyan, Pepsin, Elastase und Proteinase K zusammengenommen bereits eine gute, für Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente ausreichende Sequenzabdeckung erzielt werden konnte.

Die durch den Thermolysin-In-Lösung-Verdau von P-gp erzielte Sequenzabdeckung ist in der nachfolgenden Abbildung 4.21 graphisch veranschaulicht. Die mittels Thermolysin-In-Lösung-Verdau abgedeckten Sequenzbereiche sind in rot eingefärbt und machen 145 von 1280 Aminosäuren aus. Dies entspricht einer Sequenzabdeckung von lediglich 11 % und stellt damit das Minimum aller bis dato erzielten Sequenzabdeckungen dar.

4.2.2.7 Thermolysin-In-Lösung-Verdau von P-gp

1	MDLEGDRNGG	AKKKNFFKLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVFSMF	RYSNWLDKLY	
51	MVVGTLAAII	HGAGLPLMML	VFGEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRSNDIND	TM 1
101	TGFFMNLEED	MTRYAYYYSG	IGAGVLVAAY	IQVSWFCLAA	GRQIHKIRKQ	TM 2
151	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS	KINEGIGDKI	GMFFQSMATF	TM 3
201	FTGFIVGFTR	GWKLTLVILA	ISPVLGLSAA	VWAKILSSFT	DKELLAYAKA	TM 3 + 4
251	GAVAEVLAA	IRTVIAFGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG	TM 5
301	AAFLLIYASY	ALAFWYGTTL	VLSGEYSIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP	TM 5 + 6
351	SIEAFANARG	AAYEIFKIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIKG	NLEFRNVHFS	
401	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG	QTVALVGNSG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM	
451	VSVDGQDIRT	INVRFLREII	GVVSQEPVLF	ATTIAENIRY	GRENVTMDEI	
501	EKAVKEANAY	DFIMKLPHKF	DTLVGERGAQ	LSGGQKORIA	IARALVRNPK	
551	ILLLDEATSA	LDTSEAVVQ	VALDKARKGR	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG	
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVTMQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA	
651	LEMSSNDSRS	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPPVSWFRI	
701	MKLNLTWPY	FVVGVFCAII	NGGLQPAFAI	IFSKIIGVFT	RIDDPETKRQ	TM 7
751	NSNLFSLFL	ALGIISFITF	FLQGFTFGKA	GEILTKRLRY	MVFRSMLRQD	TM 8
801	VSWFDDPKNT	TGALTTRLAN	DAAQVKGAIG	SRLAVITQNI	ANLGTGIIIS	TM 9
851	FIYGWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVVEMKMLS	GQALKDKKEL	EGSGKIATEA	TM 9 + 10
901	IENFRTVVSL	TQEQKFEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY	TM 11
951	FSYAGCFRFG	AYLVAHKLMS	FEDVLLVFSA	VVFGAMAVGQ	VSSFAPDYAK	TM 11 + 12
1001	AKISAAHIIM	IIKTPLIDS	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI	
1051	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSGCGKSTVV	QLLERFYDPL	AGKVLLDGKE	
1101	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNSRVV	SQEEIVRAAK	
1151	EANIHAFIES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KORIAIARAL	VRQPHILLLD	
1201	EATSALDTES	EKVVQEALDK	AREGRTCIVI	AHRLSTIQNA	DLIVVFQNGR	
1251	VKEHGTHQQL	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKRQ			

Abb. 4.21: Graphische Darstellung der durch den Thermolysin-In-Lösung-Verdau von P-gp erzielten Sequenzabdeckung. Die mittels Thermolysin-In-Lösung-Verdau abgedeckten Sequenzbereiche sind in rot dargestellt. Die erzielte Sequenzabdeckung beträgt 145 von 1280 Aminosäuren = 11 %.

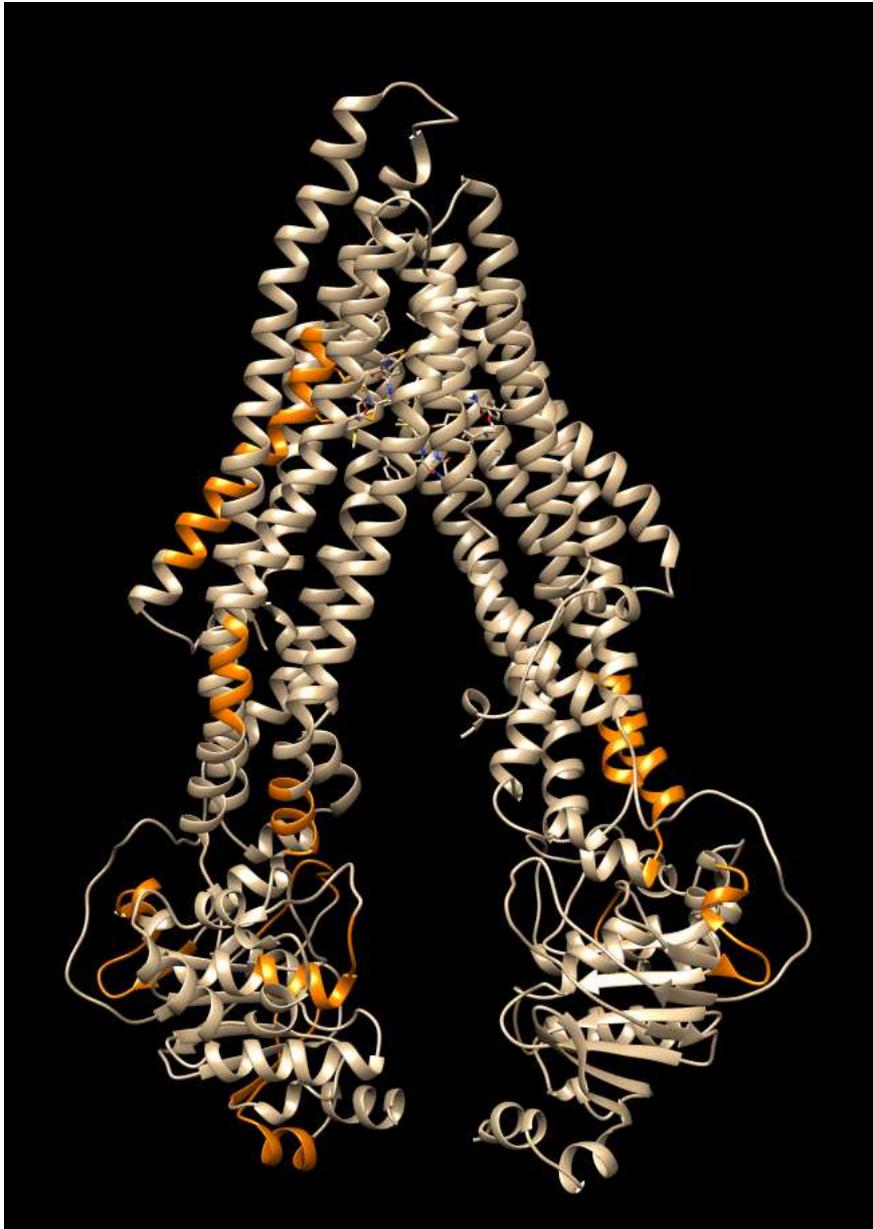


Abb. 4.22: Bildliche Darstellung der durch den Verdau von P-gp mit Thermolysin erzielten Sequenzabdeckung. In orange eingefärbt sind Sequenzabschnitte, die durch den Verdau von P-gp mit Thermolysin abgedeckt werden konnten. In weiß dargestellt sind die nicht abgedeckten Bereiche von P-gp. Es wird deutlich, dass die insgesamt erreichte Sequenzabdeckung mit 11 % sogar noch niedriger ausfällt als die mit Proteinase K erzielte Sequenzabdeckung von 12 %. Auch die Abdeckung in den transmembranären Domänen ist mit der ausschließlichen Abdeckung der TM1 viel geringer als beim Verdau von P-gp mit Proteinase K.

4.2.2.8 Kombinations-Verdaus von P-gp unter Einsatz eines MWCO-Filters

Die Kombination verschiedener Verdau-Reagenzien miteinander stellt eine Möglichkeit dar, die Sequenzabdeckung der transmembranären Bereiche von P-gp zu erhöhen. Die Idee dahinter ist die, dass das Membranprotein zunächst mit einem ersten Spaltungsreagenz (z. B. Bromcyan) vorverdaut wird, die gebildeten Peptide anschließend durch Zentrifugation unter Einsatz eines sogenannten „Molecular Weight Cut-Off (MWCO)-Filters“ entsprechend ihres Molekulargewichts voneinander getrennt werden und die im Filter zurückgebliebenen, teilweise sehr großen Peptide abschließend mit einem zweiten Spaltungsreagenz nochmals verdaut und dadurch verkleinert werden. Die Abtrennung der durch das erste Spaltungsreagenz erzeugten (kleinen) Peptide soll einerseits verhindern, dass diese durch das zweite Spaltungsreagenz so stark abgebaut werden, dass sie aufgrund ihres zu geringen Informationsgehalts für die Auswertung nicht mehr von Nutzen sind; andererseits soll die durch die Abtrennung erreichte Verringerung der Menge der leicht zugänglichen Regionen den Verdau der proteolytisch resistenten, transmembranären Bereiche des Proteins durch das zweite Spaltungsreagenz fördern. Die zwischengeschalteten Zentrifugationsschritte ermöglichen hierbei den notwendigen Pufferaustausch und die Entfernung von überschüssigem Spaltungsreagenz.

Für die Kombinations-Verdaus von P-gp mit den Enzym-Kombinationen Bromcyan/Trypsin; Bromcyan/Chymotrypsin; Bromcyan/Pepsin; Trypsin/Chymotrypsin und Trypsin/Pepsin wurde der Protea Ultrafiltration Tube 3K mit einem Cut-Off von 3 kDa eingesetzt. Der „Cut-Off“ ist definiert als die minimale Molekülmasse eines globulären Moleküls, welches durch die Filtermembran zurückgehalten wird und wird in der Einheit Dalton angegeben. Alle Moleküle deren Masse den Cut-Off übersteigt, werden im Filter zurückgehalten, während Moleküle mit niedrigerem Molekulargewicht die Filtermembran passieren können.

Durch mehrere Zentrifugationsschritte bei den entsprechenden Drehzahlen laut Produktinformation und Auffangen der peptidhaltigen Verdau-Lösung in unterschiedlichen Eppendorf-Gefäßen, wurden pro Enzym-Kombination jeweils drei

verschiedene Peptid-Fractionen erhalten: 1) Peptid-Fraktion 1. Verdau-Reagenz 2) Peptid-Fraktion 1. + 2. Verdau-Reagenz 3) Rückstand 1. + 2. Verdau-Reagenz. Diese drei Peptid-Fractionen wurden anschließend getrennt voneinander massenspektrometrisch analysiert und auf neu gebildete Peptide untersucht.

4.2.2.8.1 Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters

Der kombinierte In-Lösung-Verdau von P-gp mit Trypsin und Chymotrypsin unter Verwendung des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters wurde entsprechend Kapitel 3.2.2.8 durchgeführt. Hierfür wurde P-gp zunächst mit Trypsin entsprechend Kapitel 3.2.2.1 vorverdaut und die resultierenden Peptide nach erfolgter Inaktivierung des Enzyms durch Zentrifugation bei 16.100 x g über 30 Minuten hinsichtlich ihres Molekulargewichts in zwei Fractionen aufgeteilt. Peptide mit einer Molekülmasse < 3 kDa konnten den MWCO-Filter passieren und wurden in einem Eppendorf-Gefäß als „Trypsin-Fraktion“ aufgefangen, während alle Peptide mit einem Molekulargewicht > 3 kDa im Filter zurückgehalten wurden. Zu den im Filter zurückgebliebenen tryptischen P-gp-Peptiden wurde im Anschluss daran Chymotrypsin gegeben und unter den in Kapitel 3.2.2.2 beschriebenen Bedingungen nochmals verdaut. Die durch den Verdau mit Chymotrypsin erzeugten Peptide wurden im Folgenden nach Inaktivierung der Protease analog zu den Peptiden des vorausgegangenen Trypsin-Verdau mittels Zentrifugation bei 16.100 x g über 30 Minuten nach ihrer Molekülmasse in zwei Fractionen aufgeteilt. Peptide mit einem Molekulargewicht < 3 kDa konnten den MWCO-Filter wiederum passieren und bildeten in einem neuen Eppendorf-Gefäß aufgefangen die sogenannte „Trypsin/Chymotrypsin-Fraktion“. Alle großen Peptide mit einer Molekülmasse > 3 kDa blieben im Filter zurück und wurden in der Folge durch umgekehrtes Einsetzen des MWCO-Filters in ein neues Eppendorf-Gefäß und Zentrifugation für 2 Minuten bei 100 x g aus dem Filter in das Eppendorf-Gefäß überführt. Diese Fraktion wurde als „Rückstand“ des kombinierten Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp bezeichnet. Die drei erhaltenen Peptid-Fractionen wurden abschließend in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und nach erfolgter Aufbereitung für die Massenspektrometrie jeweils separat

voneinander per ESI-MS analysiert.

In den nachfolgenden beiden Tabellen 4.15 und 4.16 sind die durch den kombinierten Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp neu gebildeten Peptide zusammengefasst. Tabelle 4.15 zeigt dabei die in der Trypsin/Chymotrypsin-Fraktion gefundenen neuen Peptide, Tabelle 4.16 die im Rückstand detektierten neuen Peptide. Aufgrund des unspezifischen Spaltungsverhaltens von Chymotrypsin wurden von allen aufgeführten Peptidsignalen MS/MS-Spektren aufgenommen.

Tab. 4.15: Neue Peptide aus der Trypsin/Chymotrypsin-Fraktion des kombinierten Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink dargestellt. Im Zuge des Kombinations-Verdau neu abgedeckte Aminosäuren sind fett gedruckt abgebildet.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie	Art des Peptids
644,42	VLLDGK	1094-1099	NBD 2	tryptisch
800,48	IESLPNK	1158-1164	NBD 2	gemischt
	IYASYAL (TM5)	306-312	TM5	chymotryptisch
880,48	AGAVAEVL	250-258 + Na ⁺	ICL 2	gemischt
882,60	AIMRQEI	154-160 + Na ⁺	ICL 1	chymotryptisch
	LAISPVLGL (TM4)	219-227	TM4	chymotryptisch
901,52	VVQEALDK	1213-1220	NBD 2	tryptisch
952,54	TDKELLAY	240-247	ICL 2	chymotryptisch
972,56	LLFLALGII (TM8)	757-765	TM8	chymotryptisch
988,56	ATTIAENIR	481-489	NBD 1	gemischt
1031,58	DDPKNTTGAL	805-814	ICL 3	chymotryptisch
	MoxKEKGIYF	616-623 + Ox.	NBD 1/Linker	chymotryptisch
1254,67	DVHDVGELNTR	164-174	ICL 1	gemischt

Die Auswertung der Trypsin/Chymotrypsin-Fraktion ergab, dass insgesamt 13 neue P-gp-Peptide mit Monoisotopischen Massen zwischen 644 und 1254 Dalton gebildet wurden. Aufgrund der Tatsache, dass in drei Fällen einem einzigen Peptidsignal jeweils zwei Aminosäuresequenzen mit identischer Masse zugeordnet werden konnten, wurden lediglich 10 Peptidsignale detektiert. Von den identifizierten Peptiden wiesen drei Peptide eine Modifikation (Natriumanlagerung und Oxidation) auf. Erfreulich ist, dass unter den neu erzeugten Peptiden auch drei Peptide im Bereich der transmembranären Helices 4, 5 und 8 waren. Von diesen drei TMs konnte die TM4 bereits durch den

4.2.2.8.1 Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters

separaten Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau zu größeren Teilen abgedeckt werden. Die Abdeckung der TMs 5 und 8 ist dagegen neu und somit sehr positiv zu bewerten.

Im Rückstand des kombinierten Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp wurden insgesamt 22 neue Peptide mit Monoisotopischen Massen zwischen 988 und 2327 Dalton detektiert. Diese Peptide hätten eigentlich aufgrund ihrer niedrigen Molekülmasse von weniger als 3 Kilodalton in der Trypsin/Chymotrypsin-Fraktion auftreten müssen. Es scheint jedoch, als würde der MWCO-Filter nur wesentlich kleinere Peptide mit deutlich geringeren Massen als 3 Kilodalton passieren lassen.

Tab. 4.16: Neue Peptide aus dem Rückstand des kombinierten Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink dargestellt. Hervorgehoben sind die durch den Kombinations-Verdau neu abgedeckten Aminosäuren (fett gedruckt).

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie	Art des Peptids
988,64	ATTIAENIR	481-489	NBD 1	gemischt
1063,64	STTVQLMQR	434-442	Walker A NBD 1	tryptisch
1138,54	MNLEEDMTR	105-113	ECL 1	gemischt
1254,66	DVHDTVGLNTR	164-174	ICL 1	gemischt
1264,68	IIDNKPSIDSY	368-378	Linker	gemischt
1279,68	TVVSLTQEQKF	906-916	ICL 4	gemischt
1423,84	AHLGIVSQEPILF	1111-1123	Q-loop NBD 2	gemischt
1461,91	AHIFGITFSFTQA (TM11)	935-947 + Na ⁺	ICL 4/TM11	gemischt
1489,82	EALDESIPPVSFW	686-698	Linker	gemischt
1599,85	YGRENVTMoxDEIEK	490-502 + Ox.	NBD 1	gemischt
1620,97	NYPTRPDIPVLQGL	1043-1056 + Na ⁺ + Ox.	A-loop NBD 2	chymotryptisch
	DFIMoxKLPFKFDL	511-523 + Ox.	NBD 1	chymotryptisch
1673,92	NADVIAGFDDGVIVEK	594-609 +12	NBD 1	tryptisch
1683,97	NADVIAGFDDGVIVEK	594-609 + Na ⁺	NBD 1	tryptisch
1793,92	QDVSWFDDPKNTTGAL	799-814	ICL 3	gemischt
1846,03	FLREIIGVVSQEPVLF	465-480	Q-loop NBD 1	gemischt
1848,01	ILLLDEATSALDTESEK	1196-1212	Walker B/D- loop NBD 2	gemischt
1856,06	TVVSLTQEQKFEHMoxY	906-920 + Ox.	ICL 4	gemischt
1910,95	LYDPTEGMoxVSDGQDIR	443-459 + Ox.	NBD 1	tryptisch
2193,16	LLDEATSALDTESEAVVQVAL	553-573 + 19	Walker B/D- loop NBD 1	chymotryptisch
	ILLLDEATSALDTESEKVVQ	1196-1215 + 19	Walker B/D- loop NBD 2	chymotryptisch
2327,20	NADVIAGFDDGVIVEKGNHDEL	594-615	NBD 1	gemischt

Des Weiteren fällt auf, dass von den gebildeten Peptiden viele Peptide eine Modifikation in Form einer Natriumanlagerung oder Oxidation aufweisen, so dass es sich strenggenommen nicht wirklich um „neue“ Peptide handelt, sondern vielmehr um bereits bekannte modifizierte Peptide. Nichtsdestotrotz konnten daneben einige tatsächlich neue, bis dato unbekannte Peptide erzeugt und die Sequenzabdeckung von P-gp damit noch ein wenig verbessert werden. Besonders positiv ist dabei die Entstehung eines Peptids im Bereich der transmembranären Helix 11 zu bewerten, welches im Zuge des separaten Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp nicht erzeugt werden konnte.

In der nachfolgenden Abbildung 4.23 ist die durch den kombinierten Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp im Vergleich zu den separaten In-Lösung-Verdau zusätzlich erzielte Sequenzabdeckung graphisch veranschaulicht. Mittels kombiniertem Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau zusätzlich abgedeckte Bereiche sind in rot dargestellt. Es lässt sich festhalten, dass durch den kombinierten Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters, verglichen mit den einzelnen In-Lösung-Verdau von P-gp, insgesamt nur 30 Aminosäuren zusätzlich abgedeckt werden konnten, da es große Überschneidungen zwischen den neu detektierten Peptiden und den bereits bekannten Peptiden gibt. Dies entspricht einer Steigerung der Sequenzabdeckung um 2,3 %.

4.2.2.8.1 Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters

1	MDLEGDRNGG	AKKKNFFKLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVFSMF	RYSNWLDKLY	
51	MVVGTLAAII	HGAGLPLMML	VFGEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRSNDIND	TM 1
101	TGFFMNLEED	MTRYAYYYSG	IGAGVLVAAY	IQVSFWCLAA	GRQIHKIRKQ	TM 2
151	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS	KINEGIGDKI	GMFFQSMATF	TM 3
201	FTGFIVGFTR	GWKLTLVILA	ISPVLGLSAA	VWAKILSSFT	DKELLAYAKA	TM 3 + 4
251	GAVAEVLAA	IRTVIAFGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG	TM 5
301	AAFLLIYASY	ALAFWYGTTL	VLSGE SIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP	TM 5 + 6
351	SIEAFANARG	AAYEIFKIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIKG	NLEFRNVHFS	
401	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG	QTVALVGNNG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM	
451	VSVDGQDIRT	INVRFLREII	GVVSQEPVLF	ATTIAENIRY	GRENVTMDEI	
501	EKAVKEANAY	DFIMKLPHKF	DTLVGERGAQ	LSGGQKQRIA	IARALVRNPK	
551	ILLLDEATSA	LDTESEAVVQ	VALDKARKGR	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG	
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVMTQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA	
651	LEMSSNDSRS	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPPVSWFRW	
701	MKLNLEWPTY	FVVGVFCAII	NGGLQPAFAI	IFSKIIGVFT	RIDDPETKRO	TM 7
751	NSNLFSLFL	ALGII SFITF	FLQGFTFGKA	GEILTKRLRY	MVFRSMLRQD	TM 8
801	VSWFDDPKNT	TGALTTRLAN	DAAQVKGAIG	SRLAVITQNI	ANLGTGIIIS	TM 9
851	FIYGWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVEMKMLS	GQALKDKKEL	EGSGKIATEA	TM 9 + 10
901	IENFRTVVS	TQEKFHEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY	TM 11
951	FSYAGCFRFG	AYLVAHKLMS	FEDVLLVFS	VVFGAMAVGQ	VSSFAPDYAK	TM 11 + 12
1001	AKISAAHIIM	IIEKTPLIDS	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI	
1051	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSGCGKSTVV	QLLERFYDPL	AGKVLLDGKE	
1101	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNSRVV	SQEEIVRAAK	
1151	EANIHFIES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KQRIAIARAL	VRQPHILLLD	
1201	EATSALDTE	EKVVEALDK	AREGRTCIVI	AHRLSTIQNA	DLIVVFQNGR	
1251	VKEHGTHQQL	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKRQ			

Abb. 4.23: Graphische Darstellung der durch den kombinierten Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters zusätzlich erzielten Sequenzabdeckung. Die mittels kombiniertem Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau zusätzlich abgedeckten Sequenzbereiche sind in rot dargestellt. Die erzielte Sequenzabdeckung beträgt 30 von 1280 Aminosäuren = 2,3 %.

4.2.2.8.2 Trypsin/Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters

Der kombinierte In-Lösung-Verdau von P-gp mit Trypsin und Pepsin unter Verwendung des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters wurde analog zum bereits beschriebenen Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau (siehe Unterkapitel 4.2.2.8.1) durchgeführt. Für den Verdau mit Pepsin wurde hierbei das Verdauprotokoll nach Sigma-Aldrich verwendet.

Die folgenden beiden Tabellen 4.17 und 4.18 zeigen die durch den kombinierten Trypsin/Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp neu gebildeten Peptide, wobei Tabelle 4.17 die in der Trypsin/Pepsin-Fraktion beobachteten neuen Peptide und Tabelle 4.18 die im Rückstand detektierten neuen Peptide dargestellt. Aufgrund der zahlreichen

Spaltungsmöglichkeiten von Pepsin innerhalb der P-gp-Aminosäuresequenz wurden von allen aufgeführten Peptidsignalen MS/MS-Spektren aufgenommen und durch Sequenzierung des Peptids die korrekte Aminosäuresequenz innerhalb von P-gp identifiziert.

Tab. 4.17: Neue Peptide aus der Trypsin/Pepsin-Fraktion des kombinierten Trypsin/Pepsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink dargestellt. Im Zuge des Kombinations-Verdaus neu abgedeckte Aminosäuren sind fett gedruckt abgebildet.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie	Art des Peptids
720,48	QPHILL	1193-1198	Walker B NBD 2	gemischt
	IFSKII (TM7)	731-736	TM7/ECL 4	Pepsin
836,48	VTMDEIE	495-501	NBD 1	Pepsin
842,50	TEWPYF (TM7)	706-711	Linker/TM7	Pepsin
870,50	VVSQEPVL	472-479	Q-loop NBD 1	Pepsin
988,60	VSDGQDIR	451-459	NBD 1	gemischt
1012,52	AMoxAVGQVSSF (TM12)	985-994 + Ox.	TM12	Pepsin
1024,62	HILLLDEAT	1195-1203	Walker B NBD 2	Pepsin
	VQAGTKRQH	1273-1281	C-Terminus	Pepsin

In der Trypsin/Pepsin-Fraktion wurden entsprechend Tabelle 4.17 insgesamt 9 neue P-gp-Peptide überwiegend pepsinischen Ursprungs mit Monoisotopischen Massen zwischen 720 und 1024 Dalton gefunden. Darunter befanden sich auch drei Peptide mit Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices 7 und 12. Insbesondere die Abdeckung der TM12 ist sehr erfreulich, da diese neben der TM11 als einzige transmembranäre Helix im Rahmen des separaten Pepsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp nicht abgedeckt werden konnte.

Die Auswertung des Rückstands des kombinierten Trypsin/Pepsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp ergab, dass insgesamt 8 neue Peptide meist pepsinischer Herkunft mit Monoisotopischen Massen zwischen 720 und 1388 Dalton gebildet wurden. Dabei fällt auf, dass 4 von den 8 detektierten Peptiden bereits in der Trypsin/Pepsin-Fraktion gefunden wurden und aufgrund ihres geringen Molekulargewichts von deutlich weniger als 3 Kilodalton überhaupt nicht in den Rückstand hätten gelangen dürfen. Auch die

übrigen vier Peptide hätten entsprechend ihrer Molekülmasse von weniger als 3 Kilodalton eigentlich in der Trypsin/Pepsin-Fraktion beobachtet werden müssen.

Dieses Phänomen, dass der verwendete MWCO-Filter anscheinend nur Peptide mit wesentlich kleineren Massen als 3 Kilodalton passieren lässt, ist bereits aus dem zuvor durchgeführten kombinierten Trypsin/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp bekannt. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die Zentrifugation aufgrund zu kurzer Zeiten bzw. zu niedriger Drehzahlen nicht ausreichend war, um die resultierenden Peptide hinsichtlich ihres Molekulargewichts sauber voneinander zu trennen.

Tab. 4.18: Neue Peptide aus dem Rückstand des kombinierten Trypsin/Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink dargestellt. Hervorgehoben sind die durch den Kombinations-Verdau neu abgedeckten Aminosäuren (fett gedruckt).

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie	Art des Peptids
720,48	QPHILL IFSKII (TM7)	1193-1198 731-736	Walker B NBD 2 TM7/ECL 4	gemischt Pepsin
988,60	VSVDGQDIR	451-459	NBD 1	gemischt
1012,52	AMoxAVGQVSSF (TM12)	985-994 + Ox.	TM12	Pepsin
1024,62	HILLLDEAT VQAGTKRQH	1195-1203 1273-1281	Walker B NBD 2 C-Terminus	Pepsin Pepsin
1310,64	AAIIHGAGLPLMMox (TM1)	57-69 + Ox.	TM1	Pepsin
1388,72	YDPLAGKVLLDGK	1087-1099	NBD 2	gemischt

Unter den neu detektierten Peptiden befinden sich wiederum drei Peptide mit Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices (TM1, TM7 und TM12). Hiervon konnten die TMs 1 und 7 bereits zu großen Teilen durch den separaten Pepsin-In-Lösung-Verdau abgedeckt werden. Dagegen wurde die Abdeckung der TM12 im Zuge der zuvor durchgeführten einzelnen In-Lösung-Verdau von P-gp mit Trypsin und Pepsin nicht erreicht und stellt damit eine Verbesserung dar.

In der nachfolgenden Abbildung 4.24 ist die durch den kombinierten Trypsin/Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp zusätzlich erzielte Sequenzabdeckung graphisch veranschaulicht. Die neu abgedeckten Sequenzabschnitte sind in rot dargestellt.

4.2.2.8.2 Trypsin/Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters

1	MDLEGDRNGG	AKKKNFFKLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVFSMF	RYSNWLDKLY	
51	MVVGTLAAII	HGAGLPLMML	VFGEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRSNDIND	TM 1
101	TGFFMNLEED	MTRYAYYYSG	IGAGVLVAAY	IQVSFWCLAA	GRQIHKIRKQ	TM 2
151	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS	KINEGIGDKI	GMFFQSMATF	TM 3
201	FTGFIVGFTR	GWKLTLVILA	ISPVLGLSAA	VWAKILSSFT	DKELLAYAKA	TM 3 + 4
251	GAVAEVLAA	IRTVIAFGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG	TM 5
301	AAFLLIYASY	ALAFWYGTTL	VLSGEYSIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP	TM 5 + 6
351	SIEAFANARG	AAYEIFKIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIKG	NLEFRNVHFS	
401	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG	QTVALVGNSG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM	
451	VSVDGQDIRT	INVRFLREII	GVVSQEPVLF	ATTIAENIRY	GRENVTMDEI	
501	EKAVKEANAY	DFIMKLPHKF	DTLVGERGAQ	LSGGQKQRIA	IARALVRNPK	
551	ILLLDEATSA	LDTESEAVVQ	VALDKARKGR	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG	
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVTMQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA	
651	LEMSSNDSRS	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPPVSFWRI	
701	MKLNLT TEWPY	FVVG VFCAII	NGGLQPAFAI	I FSKIIGVFT	RIDDPETKRQ	TM 7
751	NSNLFSLFL	ALGIISFITF	FLQGFTFGKA	GEILTKRLRY	MVFRSMLRQD	TM 8
801	VSWFDDPKNT	TGALTTRLAN	DAAQVKGAIG	SRLAVITQNI	ANLGTGIIIS	TM 9
851	FIYGWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVEMKMLS	GQALKDKKEL	EGSGKIATEA	TM 9 + 10
901	IENFRTVVSL	TQEKFHEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY	TM 11
951	FSYAGCFRFG	AYLVAHKLMS	FEDVLLVFS	VVFG AMAVGQ	VSSF APDYAK	TM 11 + 12
1001	AKISAAHIIM	IIEKTPLIDS	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI	
1051	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSGCGKSTVV	QLLERFYDPL	AGKVLLDGKE	
1101	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNSRVV	SQEEIVRAAK	
1151	EANIHFIES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KORIAIARAL	VRQPHILLLD	
1201	EATSALDTE	EKVVEALDK	AREGRTCIVI	AHRLSTIQNA	DLIVVFQNGR	
1251	VKEHGTHQQL	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKR Q			

Abb. 4.24: Graphische Darstellung der durch den kombinierten Trypsin/Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters erzielten Sequenzabdeckung. Die mittels kombiniertem Trypsin/Pepsin-In-Lösung-Verdau zusätzlich abgedeckten Sequenzbereiche sind in rot dargestellt. Die erzielte Sequenzabdeckung beträgt 18 von 1280 Aminosäuren = 1,4 %.

Dadurch, dass die im Zuge des kombinierten Trypsin/Pepsin-In-Lösung-Verdau neu beobachteten Peptide zu großen Teilen mit den bereits aus den separaten Trypsin- und Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp bekannten Peptiden überlappen, konnten insgesamt nur 18 Aminosäuren zusätzlich abgedeckt werden. Dies entspricht einer Steigerung der Sequenzabdeckung um 1,4 %.

4.2.2.8.3 Bromcyan/Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters

Der kombinierte Bromcyan/Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Anwendung des

4.2.2.8.3 Bromcyan/Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters

Protea Ultrafiltration 3K MWCO-Filters wurde in Analogie zu den bereits beschriebenen Kombinations-Verdaus (siehe Unterkapitel 4.2.2.8.1 und 4.2.2.8.2) durchgeführt. Dabei wurde für den Vorverdau mit Bromcyan die Variante mit 70 % Trifluoressigsäure als Lösungsmittel und einer Gesamtmenge von 20 mg Bromcyan gewählt.

In der nachfolgenden Tabelle 4.19 sind die im Zuge des kombinierten Bromcyan/Trypsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp neu entstandenen Peptide zusammengefasst. Von allen aufgeführten Peptidsignalen wurden MS/MS-Spektren aufgenommen.

Tab. 4.19: Neue Peptide aus dem kombinierten Bromcyan/Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp. Aminosäuren innerhalb der transmembranären Helices sind in pink abgebildet.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie	Art des Peptids
1543,88	NAADESKSEIDALEM	639-653 + 31	Linker	BrCN
	VLAARTVIAFGGQK	257-271	ICL 2	tryptisch
1817,12	RSVRGSAQDRKLSTK	670-685	Linker	tryptisch
2150,23	LVFGEMTDIFANAGNLEDLM (TM1)	70-89	TM1/ECL 1	BrCN
2455,48	AVGQVSSFAPDYAKAKISAAHIIM (TM12)	987-1010 + 28	TM12/Linker	BrCN
2515,15	SNITNRSDINDTGFFMNLEEDM	90-111	ECL 1	BrCN
2531,26	SNITNRSDINDTGFFMoxNLEEDM	90-111 + Ox.	ECL 1	BrCN
2725,18	QTAGNEVELENAADESKSEIDALEM	629-653 + 81	Linker	BrCN
2776,51	ILLLDEATSALDTESEAVVQVALDK	551-575 + 134	Walker B/D-loop NBD 1	tryptisch
3354,96	YAQSLQVPYRNSLRKAHIFGITFSFTQAM (TM11)	920-948 + 28	ICL 4/TM11	BrCN
3374,00	YAQSLQVPYRNSLRKAHIFGITFSFTQAM (TM11)	920-948	ICL 4/TM11	BrCN

Insgesamt konnten durch den kombinierten Verdau von P-gp mit Bromcyan und Trypsin 11 neue Peptide mit Monoisotopischen Massen zwischen 1543 und 3374 Dalton erzeugt werden. Verglichen mit den zuvor beschriebenen Kombinations-Verdaus von P-gp weisen die gebildeten Peptide deutlich höhere Molekülmassen auf und wurden deshalb überwiegend im Rückstand detektiert.

Es wird deutlich, dass etwa die Hälfte der aufgeführten Peptide modifiziert ist und damit strenggenommen keine wirklich neuen Peptide sondern bereits aus den einzelnen Verdaus von P-gp mit Bromcyan bzw. Trypsin bekannte Peptide darstellt.

4.2.2.8.3 Bromcyan/Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters

Unter den detektierten Peptidsignalen befinden sich auch vier Peptide mit Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices 1, 11 und 12. Diese TMs wurden jedoch auch durch den separaten Bromcyan-In-Lösung-Verdau von P-gp größtenteils abgedeckt, so dass keine weitere Verbesserung der Sequenzabdeckung in den transmembranären Domänen durch den Kombinations-Verdau erzielt werden konnte. Auch die übrigen Peptide sind meist Teil von Regionen, die bereits durch die einzelnen In-Lösung-Verdaus von P-gp mit Bromcyan und Trypsin abgedeckt werden konnten.

Somit lautet das abschließende Fazit, dass durch den kombinierten In-Lösung-Verdau von P-gp mit Bromcyan und Trypsin unter Einsatz des Protea Ultrafiltration 3K MWCO-Filters keine weitere Verbesserung der Sequenzabdeckung von P-gp erreicht werden konnte.

4.2.2.8.4 Bromcyan/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters

Der kombinierte Bromcyan/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Anwendung des Protea Ultrafiltration 3K MWCO-Filters wurde analog zum bereits beschriebenen Bromcyan/Trypsin-In-Lösung-Verdau (siehe Unterkapitel 4.2.2.8.3) durchgeführt.

Die nachfolgende Tabelle 4.20 zeigt die im Rahmen des kombinierten Bromcyan/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp neu gebildeten Peptide. Der Tabelle ist zu entnehmen, dass durch den Kombinations-Verdau von P-gp mit Bromcyan und Chymotrypsin insgesamt 7 neue Peptide mit Monoisotopischen Massen zwischen 2337 und 4526 Dalton erzeugt werden konnten, die aufgrund ihres hohen Molekulargewichts alle im Rückstand gefunden wurden. Im Vergleich zu den vorausgegangenen Kombinations-Verdaus weisen die detektierten Peptidsignale wesentlich höhere Massen auf, was darauf zurückgeführt werden kann, dass es sich in der Mehrzahl der Fälle um Bromcyan-Peptide handelt.

Tab. 4.20: Neue Peptide aus dem kombinierten Bromcyan/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp. Aminosäuren innerhalb der transmembranären Helices sind in pink abgebildet. Hervorgehoben sind die durch den Kombinations-Verdau neu abgedeckten Aminosäuren (fett gedruckt).

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie	Art des Peptids
2337,37	ISFITFFLQGF TFGKAGEILT (TM8)	765-785	TM8/ICL 3	chymotryptisch
2444,35	VSVQAGTKRQH HHHHHHHHHH	1271-1290	C-Terminus	BrCN
2560,55	RKQFFHAIMRQEIGWFDVHD AVGQVSSF FAPDYAKAKISAAHIIMI (TM12)	148-167 987-1011 + 28	ICL 1 TM12/Linker	chymotryptisch gemischt
2629,36	QTAGNEVELENAADESKSEIDALEM	629-653 - 16	Linker	BrCN
4294,60	DLEGDRNGGAKKKNFFKLNKSEKDKK EKKPTVSVFSM	2-39	N-Terminus	BrCN
4526,70	LSGQALKDKKKELEGAGKIATEAIENFRT VVSLTQEQKFEHM	879-919	ICL 4	BrCN

In Analogie zum bereits beschriebenen Bromcyan/Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp liegt ein Teil der beobachteten Peptide modifiziert vor und stellt damit genaugenommen keine neuen Peptide, sondern bereits aus den einzelnen Verdaus von P-gp mit Bromcyan bzw. Chymotrypsin bekannte Peptide dar. Es sind dies die Peptide in Position 987-1011 mit [M+H]⁺ = 2560,55 und 629-653 mit [M+H]⁺ = 2629,36. Beim erstgenannten Peptid ist es zu einer Massenzunahme von 28 Dalton gekommen, was einer Carbonylierung durch die eingesetzte Ameisensäure oder Trifluoressigsäure entsprechen könnte. Dagegen wurde im zweiten Fall ein Massenverlust von 16 Dalton verzeichnet, was dem Verlust eines Sauerstoffes gleichkommen würde.

Die übrigen fünf Peptide wurden in den separat durchgeführten Verdaus von P-gp mit Bromcyan und Chymotrypsin bisher noch nicht beobachtet und sind somit tatsächlich neu. Ein möglicher Grund dafür, warum diese fünf Peptide nun im Zuge des Kombinations-Verdaus von P-gp mit Bromcyan und Chymotrypsin detektiert worden sind, könnte die durch die Zentrifugation stattfindende Aufkonzentrierung der im Filter zurückbleibenden Peptide und die daraus resultierende Erhöhung der Signalintensität sein.

Von den neu gebildeten Peptiden befinden sich erfreulicherweise drei Peptide im Bereich

4.2.2.8.4 Bromcyan/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters

der transmembranären Helices 8, 11 und 12. Hiervon konnten die TMs 11 und 12 bereits durch den separaten Bromcyan-In-Lösung-Verdau von P-gp zu einem großen Teil abgedeckt werden, während dagegen die Abdeckung der TM8 neu und damit sehr positiv zu bewerten ist.

In der nachfolgenden Abbildung 4.25 ist die durch den Kombinations-Verdau von P-gp mit Bromcyan und Chymotrypsin zusätzlich erzielte Sequenzabdeckung graphisch veranschaulicht. Die zusätzlich abgedeckten Sequenzabschnitte sind in rot dargestellt.

1	MDLEGDRNGG	AKKKNFF KLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVFSMF	RYSNWLDKLY	
51	MVVGTLAAII	HGAGLPLMML	VFGEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRSNDIND	TM 1
101	TGFFMNLEED	MTRYAYYYSG	IGAGVLVAAY	IQVSWFCLAA	GRQIHKIR KKQ	TM 2
151	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS	KINEGIGDKI	GMFFQSMATF	TM 3
201	FTGFIVGFTR	GWKLTLVILA	ISPVGLLSAA	VWAKILSSFT	DKELLAYAKA	TM 3 + 4
251	GAVAEVLAA	IRTVIAFGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG	TM 5
301	AAFLLIYASY	ALAFWYGTTL	VLSGEYSIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP	TM 5 + 6
351	SIEAFANARG	AAYEIFKIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIKG	NLEFRNVHFS	
401	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG	QTVALVGNSG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM	
451	VSVDGQDIRT	INVRFLREII	GVVSQEPVLF	ATTIAENIRY	GRENVTMDEI	
501	EKAVKEANAY	DFIMKLPHKF	DTLVGERGAQ	LSGGQKQRIA	IARALVRNPK	
551	ILLLDEATSA	LDTESEAVVQ	VALDKARKGR	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG	
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVTMQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA	
651	LEMSSNDSRS	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPPVSFWRI	
701	MKLNLEWEPY	FVVGVFCAII	NGGLQPAFAI	IFSKIIGVFT	RIDDPETKRQ	TM 7
751	NSNLFSLFL	ALGI ISFITF	FLQGFTFGKA	GEILT KRLRY	MVFRSMLRQD	TM 8
801	VSWFDDPKNT	TGALTTRLAN	DAAQVKGAIG	SRLAVITQNI	ANLGTGIIIS	TM 9
851	FIYGWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVEMKMLS	GQALKDKKEL	EGSGKIATEA	TM 9 + 10
901	IENF RTVVSL	TQEQKFEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY	TM 11
951	FSYAGCFRFG	AYLVAHKLMS	FEDVLLVFSA	VVFGAMAVGQ	VSSFAPDYAK	TM 11 + 12
1001	AKISAAHIIM	IIEKTPLIDS	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI	
1051	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSGCGKSTVV	QLLERFYDPL	AGKVLDDGKE	
1101	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNSRVV	SQEEIVRAAK	
1151	EANIHFVIES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KQRIAIARAL	VRQPHILLLD	
1201	EATSALDTES	EKVVQEALDK	AREGRTCIVI	AHRLSTIQNA	DLIVVFQNGR	
1251	VKEHGTHQQL	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKRQ			

Abb. 4.25: Graphische Darstellung der durch den kombinierten Bromcyan/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters erzielten Sequenzabdeckung. Die mittels kombiniertem Bromcyan/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau zusätzlich abgedeckten Sequenzbereiche sind in rot dargestellt. Die erzielte Sequenzabdeckung beträgt 88 von 1280 Aminosäuren = 6,9 %.

Insgesamt konnten durch den kombinierten Bromcyan/Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp, verglichen mit den separaten In-Lösung-Verdaus mit Bromcyan und

Chymotrypsin, 88 Aminosäuren zusätzlich abgedeckt werden. Dies entspricht einer Steigerung der Sequenzabdeckung um 6,9 %.

4.2.2.8.5 Bromcyan/Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters

Der kombinierte Bromcyan/Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration 3K MWCO-Filters wurde in Analogie zu den bereits beschriebenen Kombinations-Verdaus mit Bromcyan und Trypsin bzw. Chymotrypsin (siehe Unterkapitel 4.2.2.8.3 und 4.2.2.8.4) durchgeführt.

In der nachfolgenden Tabelle 4.21 sind die durch den kombinierten Bromcyan/Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp neu erzeugten Peptide aufgeführt.

Tab. 4.21: Neue Peptide aus dem kombinierten Bromcyan/Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp. Aminosäuren innerhalb der transmembranären Helices sind in pink abgebildet. Im Zuge des Kombinations-Verdaus neu abgedeckte Aminosäuren sind fett gedruckt dargestellt.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie	Art des Peptids
831,48	FSFTQAM (TM11)	942-948	TM11	gemischt
870,50	KLTLVILA (TM4)	213-220	ECL 2/TM4	Pepsin
882,52	VVSQEPVL	472-479 + 12	Q-loop NBD 1	Pepsin
916,54	PTEGMVSVD	446-454 - 18	NBD 1	Pepsin
	GALTTRLAN	812-820	ICL 3	Pepsin
927,54	VRNADVIAG	592-600 + 13	NBD 1	Pepsin
1140,70	LVFSAVFGAM (TM12)	976-986	TM12	gemischt
1192,66	LERFYDPLAG	1083-1092 + 12	NBD 2	Pepsin

Insgesamt konnten durch den Kombinations-Verdau von P-gp mit Bromcyan und Pepsin 8 neue Peptide mit Monoisotopischen Massen zwischen 831 und 1192 Dalton erzeugt werden. Verglichen mit den zuvor beschriebenen Kombinations-Verdaus von P-gp besitzen die gebildeten Peptide aufgrund des unspezifischen Spaltungsverhaltens von

Pepsin sichtlich kleinere Molekülmassen und wurden deshalb überwiegend in der Bromcyan/Pepsin-Fraktion, in geringerem Ausmaß aber auch im Rückstand detektiert. Die Tatsache, dass der Cut-Off des Filters nicht eingehalten wird, wurde bereits in den zuvor beschriebenen Kombinations-Verdaus beobachtet. Auch das Phänomen, dass ein Teil der detektierten Peptide modifiziert vorliegt und somit keine wirklich neuen Peptide darstellt, ist bereits aus den zuvor durchgeführten Kombinations-Verdaus bekannt. Die modifizierten Peptide befinden sich in den Positionen 472-479; 446-454; 592-600 und 1083-1092 der P-gp-Aminosäuresequenz. In drei Fällen ist es zu einer Massenzunahme von 12 bzw. 13 Dalton und in einem Fall zu einem Massenverlust von 18 Dalton gekommen. Der Massenverlust von 18 Dalton könnte der Abspaltung eines Wassermoleküls entsprechen, für die Massenzunahmen konnte dagegen keine plausible Erklärung gefunden werden.

Unter den neu entstandenen Peptiden befinden sich auch drei Peptide mit Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices 4, 11 und 12. Von diesen TMs konnte im Zuge des separaten Bromcyan-In-Lösung-Verdaus von P-gp bereits die erste Hälfte der TM11 sowie die zweite Hälfte der TM12 und im Rahmen des separaten Pepsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp ein großer Teil der TM4 abgedeckt werden. Somit ist es erfreulich, dass durch den kombinierten In-Lösung-Verdau von P-gp mit Bromcyan und Pepsin nun auch die noch fehlende erste Hälfte der TM12 abgedeckt und daneben die in den einzelnen Verdaus von P-gp mit Bromcyan und Pepsin erzielte Sequenzabdeckung in den transmembranären Helices 4 und 11 reproduziert werden konnte.

In der folgenden Abbildung 4.26 ist die durch den Kombinations-Verdau von P-gp mit Bromcyan und Pepsin zusätzlich erzielte Sequenzabdeckung graphisch veranschaulicht. Die zusätzlich abgedeckten Sequenzbereiche sind in rot dargestellt. Insgesamt konnten durch den kombinierten Bromcyan/Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp, verglichen mit den separaten In-Lösung-Verdaus von P-gp mit Bromcyan und Pepsin, 34 Aminosäuren zusätzlich abgedeckt werden. Dies entspricht einer Steigerung der Sequenzabdeckung um 2,7 %.

4.2.2.8.5 Bromcyan/Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters

1	MDLEGDRNGG	AKKKNFFKLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVFSMF	RYSNWLDKLY	
51	MVVGTLAII	HGAGLPLMML	VFGEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRSNDIND	TM 1
101	TGFFMNLEED	MTRYAYYYSG	IGAGVLVAAY	IQVSFWCLAA	GRQIHKIRKQ	TM 2
151	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS	KINEGIGDKI	GMFFQSMATF	TM 3
201	FTGFIVGFTR	GWKLTLVILA	ISPVLGLSAA	VWAKILSSFT	DKELLAYAKA	TM 3 + 4
251	GAVAEVLAA	IRTVIAFGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG	TM 5
301	AAFLLIYASY	ALAFWYGTTL	VLSGEYSIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP	TM 5 + 6
351	SIEAFANARG	AAYEIFKIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIKG	NLEFRNVHFS	
401	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG	QTVALVGNSG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM	
451	VSVD GQDIRT	INVRFLREII	GVVSQE PVLF	ATTIAENIRY	GRENVTMDEI	
501	EKAVKEANAY	DFIMKLPHKF	DTLVGERGAQ	LSGGQKQRIA	IARALVRNPK	
551	ILLLDEATSA	LDTESEAVVQ	VALDKARKGR	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG	
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVTMQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA	
651	LEMSSNDSRS	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPPVSFWRI	
701	MKLNLTWPY	FVVGVFCAII	NGGLQPAFAI	IFSKIIGVFT	RIDDPETKRQ	TM 7
751	NSNLFSLFL	ALGIISFITF	FLQGFTEGKA	GEILTKRLRY	MVFRSMLRQD	TM 8
801	VSWFDDPKNT	TGAL TTRLAN	DAAQVKGAIG	SRLAVITQNI	ANLGTGIIIS	TM 9
851	FIYGWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVEMKMLS	GQALKDKKEL	EGSGKIATEA	TM 9 + 10
901	IENFRTVVSL	TQEQKFEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY	TM 11
951	FSYAGCFRFG	AYLVAHKLMS	FEDVL LVFSA	VVFGAM AVGQ	VSSFAPDYAK	TM 11 + 12
1001	AKISAHHIIM	IIEKTPLIDS	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI	
1051	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSGCGKSTVV	QLLERFYDPL	AGKVLLDGKE	
1101	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNSRVV	SQEEIVRAAK	
1151	EANIHFVIES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KORIAIARAL	VRQPHILLLD	
1201	EATSALDTE	EKVVQEALDK	AREGRTCIVI	AHRLSTIQNA	DLIVVFQNGR	
1251	VKEHGTHQQL	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKRQ			

Abb. 4.26: Graphische Darstellung der durch den kombinierten Bromcyan/Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Einsatz des Protea Ultrafiltration Tube 3K MWCO-Filters erzielten Sequenzabdeckung. Die durch den kombinierten Bromcyan/Pepsin-In-Lösung-Verdau zusätzlich abgedeckten Sequenzbereiche sind in rot dargestellt. Die erzielte Sequenzabdeckung beträgt 34 von 1280 Aminosäuren = 2,7 %.

4.2.2.9 In-Lösung-Verdau in Kombination mit Hitzedenaturierung

Die Hitzedenaturierung in Kombination mit dem Trypsin- bzw. Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp wurde als weiterer Optimierungsversuch zur Erhöhung der Sequenzabdeckung in den transmembranären Domänen entsprechend Kapitel 3.2.2.9 durchgeführt. Hierfür wurde sowohl die Enzymmenge als auch die Inkubationszeit gedrittelt und demnach drei Zyklen aus Denaturierung und sich anschließendem Verdau pro P-gp-Probe gefahren. Das Aufsplitten des Verdau in drei Zyklen erfolgte auf der Basis von Vorversuchen, die gezeigt hatten, dass hierdurch eine Verbesserung der

Sequenzabdeckung zu verzeichnen war. Nach Beendigung des dritten Zyklus wurde der Verdau durch Hitzeinaktivierung des jeweiligen Enzyms gestoppt, die resultierenden Peptide in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und nach erfolgter Aufbereitung für die Massenspektrometrie mittels ESI-MS analysiert.

4.2.2.9.1 Trypsin-In-Lösung-Verdau in Verbindung mit Hitzedenaturierung von P-gp

Die folgende Tabelle 4.22 zeigt die im Zuge der Kombination aus Trypsin-In-Lösung-Verdau und Hitzedenaturierung von P-gp - verglichen mit dem regulären Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp ohne Hitzedenaturierung - neu entstandenen Peptide. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink abgebildet. Von allen aufgeführten Peptidsignalen wurden MS/MS-Spektren aufgenommen und durch Bestimmung der Abfolge der einzelnen Aminosäuren der Peptide die korrekten Aminosäuresequenzen innerhalb der P-gp-Sequenz identifiziert.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass durch den Einsatz der Hitzedenaturierung in Verbindung mit dem Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp 15 neue Peptidsignale generiert werden konnten. Aufgrund der Tatsache, dass bei zwei Peptidsignalen mehr als eine passende Aminosäuresequenz gefunden wurde, konnten insgesamt 18 neue Peptide erzeugt werden. Von diesen befinden sich erfreulicherweise zwei Peptide im Bereich der transmembranären Helices 1 und 8. Demnach konnte das Protein durch die Hitzedenaturierung ein wenig entfaltet und somit die Zugänglichkeit für das Enzym zu den transmembranären Bereichen etwas verbessert werden. Dadurch, dass die neu gebildeten Peptide jedoch zu großen Teilen mit den bereits aus dem regulären Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp ohne Hitzedenaturierung bekannten Peptiden überlappen, konnten lediglich 56 Aminosäuren zusätzlich abgedeckt werden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass durch die Hitzedenaturierung von P-gp zwar keine wesentliche Verbesserung der Sequenzabdeckung insgesamt erreicht wurde, im Vergleich zum Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp ohne Hitzedenaturierung jedoch erstmalig eine Sequenzabdeckung im Bereich der transmembranären Domänen (TM1 und TM8) erzielt werden konnte.

Tab. 4.22: Peptide aus dem Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit Hitzedenaturierung. Aufgeführt sind nur diejenigen Peptide, welche durch die Hitzedenaturierung von P-gp neu entstanden sind. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink dargestellt. Im Zuge des Kombinations-Verdau neu abgedeckte Aminosäuren sind fett gedruckt abgebildet.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
972,60	LLFLALGII (TM8)	757-765	TM8
973,58	IDDPETKR	742-749	ECL 4
1005,60	FGAYLVAHK	959-967	ECL 6
1177,69	KQFFHAIMR	149-157	ICL 1
1178,71	VVGTAAIIHGAG (TM1)	52-64	TM1
	VVSLTQEQKF	907-916	ICL 4
1185,64	LDGKEIKRLN	1096-1105	NBD 2
	VQVALDKARKG	569-579	NBD 1
	ANAYDFIMKL	507-516	NBD 1
1291,78	AGAVAEVLAAIR	250-262 + Na ⁺	ICL 2
1354,75	ISAAHIIMoxIIIEK	1003-1014 + Ox.	Linker
1507,90	PDIPVLQGLSLEVK	1048-1061	NBD 2
1555,96	EKKPTVSVFSMFR	29-41	N-Terminus
1583,83	YGRENVTMDEIEK	490-502	NBD 1
2062,20	EANIHFIESLPNKYSTK	1151-1168	NBD 2
2437,27	EIIGVVSQEPVLFATTIAENIR	468-489 + Na ⁺	Q-loop NBD 1
2681,38	ILLLDEATSALDTESEAVVQVALDK	551-575 + Na ⁺ /Ox.	Walker B/D-loop
3319,88	VVQEALDKAREGRTCIVIAHRLSTIQNADL	1213-1242	H-loop NBD 2

In der nachfolgend gezeigten Abbildung 4.27 ist die im Rahmen des Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Verbindung mit Hitzedenaturierung erzielte Sequenzabdeckung graphisch veranschaulicht. Sequenzabschnitte, welche im Zuge des separaten In-Lösung-Verdau mit Trypsin eindeutig zugeordnet werden konnten, sind in rot dargestellt. Aminosäuren, die durch Hitzedenaturierung des Proteins zusätzlich abgedeckt werden konnten, sind in blau eingefärbt. Die erzielte Sequenzabdeckung beträgt ohne Hitzedenaturierung des Proteins 61 %. Durch Hitzedenaturierung von P-gp konnte die Sequenzabdeckung um 4 % auf 65 % gesteigert werden.

4.2.2.9.1 Trypsin-In-Lösung-Verdau in Verbindung mit Hitzedenaturierung von P-gp

1	MDLEGDRNGG	AKKKNFFKLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVFSMF	RYSNWLDKLY	
51	MVVGTLAAII	HGAGLPLMML	VFGEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRS ^D IND	TM 1
101	TGFFMNLEED	MTRYAYYYSG	IGAGVLVAAY	IQVSWCLAA	GRQIHKIRK ^Q	TM 2
151	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS	KINEGIGDKI	GMFFQSMATF	TM 3
201	FTGFIVGFTR	GWKLTIVILA	ISPVLGLSAA	VWAK ^I LSSTF	DKELLAYAKA	TM 3 + 4
251	GAVAEVLLAA	IRTVIAFGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG	TM 5
301	AAFLLIYASY	ALAFWYGTTL	VLSGEYSIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP	TM 5 + 6
351	SIEAFANARG	AAEYIFKIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIKG	NLEFRNVHFS	
401	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG	QTVALVGNSG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM	
451	VSVDGQDIRT	INVRFLREII	GVVSQEPVLF	ATTIAENIRY	GRENVTMDEI	
501	EKAVKEANAY	DFIMKLPKHF	DTLVGERGAQ	LSGGQKQRIA	IARALVRNPK	
551	ILLLDEATSA	LDTESEAVVQ	VALDKARK ^G R	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG	
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVTMQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA	
651	LEMSSNDSRS	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPVVSFWRI	
701	MKLNLTWPY	FVVGVFCAII	NGGLQPAFAI	IFSKIIGVFT	RIDDPETKRQ	TM 7
751	NSNLFSLFL	ALGIISFITF	FLQGFTFGKA	GEILTKRLRY	MVFRSMLRQD	TM 8
801	VSWFDDPKNT	TGALTTRLAN	DAAQVKGAIG	SRLAVITQNI	ANLGTGIIIS	TM 9
851	FIYGWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVEMKMLS	GQALKDKKEL	EGSGKIATEA	TM 9 + 10
901	IENFRTVVSL	TQEQKFEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY	TM 11
951	FSYAGCFRFG	AYLVAHKLMS	FEDVLLVFSA	VVFGAMAVGQ	VSSFAPDYAK	TM 11 + 12
1001	AKISAAHIIM	IEKTPLIDS	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI	
1051	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSGCGKSTVV	QLLERFYDPL	AGKVLLDGKE	
1101	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNRRVV	SQEEIVRAAK	
1151	EANIHFIES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KQRIAIARAL	VRQPHILLLD	
1201	EATSALDTES	EKVVQEALDK	AREGRTCIVI	AHRLSTIQNA	DLIVVFQNGR	
1251	VKEHGTHQQL	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKRQ			

Abb. 4.27: Graphische Darstellung der Sequenzabdeckung von P-gp erzielt mittels Trypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit Hitzedenaturierung. Sequenzbereiche, welche im Rahmen des separaten In-Lösung-Verdau mit Trypsin eindeutig zugeordnet werden konnten, sind in rot dargestellt. Aminosäuren, die durch Hitzedenaturierung des Proteins zusätzlich abgedeckt werden konnten, sind in blau eingefärbt.

4.2.2.9.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Verbindung mit Hitzedenaturierung von P-gp

Neben Trypsin wurde auch die Protease Chymotrypsin in Kombination mit Hitzedenaturierung für den In-Lösung-Verdau von P-gp eingesetzt.

Abweichend vom zuvor beschriebenen Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit Hitzedenaturierung konnten im Zuge des Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Verbindung mit Hitzedenaturierung von den in Tabelle 4.23 zusammengefassten, neu detektierten Peptidsignalen leider keine MS/MS-Spektren aufgenommen werden, da aufgrund eines technischen Defektes des verwendeten Massenspektrometers die

4.2.2.9.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Verbindung mit Hitzedenaturierung von P-gp

Selektion und Fragmentierung der beobachteten Peptidsignale im MS/MS-Modus nicht möglich war. Aus diesem Grund existieren in den meisten Fällen zu jedem aufgeführten Peptidsignal mehrere passende Aminosäuresequenzen mit identischer Monoisotopischer Masse innerhalb der P-gp-Sequenz. Die Zuordnung der abgebildeten Sequenzabschnitte zum jeweiligen Peptidsignal erfolgte hier unter Berücksichtigung der bevorzugten Schnittstellen von Chymotrypsin innerhalb der Aminosäuresequenz von P-gp (C-terminal von Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin) sowie unter Einhaltung einer Massentoleranz für die Abweichung zwischen theoretischer und experimentell bestimmter Monoisotopischer Masse von 300 ppm. Des Weiteren wurde das Vorliegen von bestimmten Modifikationen, beispielsweise die Oxidation des Schwefels der Aminosäure Methionin zum Sulfoxid und die damit verbundene Massenzunahme berücksichtigt.

Tab. 4.23: Peptide aus dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit Hitzedenaturierung von P-gp. Dargestellt sind Peptide, welche durch Hitzedenaturierung von P-gp neu entstanden sein könnten. Peptidsequenzen, die bereits durch den regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau ohne Hitzedenaturierung abgedeckt werden konnten, sind in schwarz abgebildet. Potenziell neu abgedeckte Aminosäuresequenzen außerhalb der TMDs sind in blau dargestellt. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Domänen sind in pink eingefärbt, wobei potenziell neu abgedeckte transmembranäre Aminosäuren fett gedruckt abgebildet sind.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
796,50	GTHQQL	1255-1261	C-Terminus
1098,58	DCSIAENIAY	1124-1133	NBD 2
	KLPHKFDTL	515-523	NBD 1
	NIANLGTGIII (TM9)	839-849	TM9
1122,58	EKAVKEANAY	501-510	NBD 1
	AKAKISAAHII	999-1009	Linker
1134,58	NGRVKEHGTH	1248-1257	NBD 2/C-Terminus
	ANAGNLEDLMS	80-90	ECL 1
1172,58	LVFGEMTDIF (TM1)	70-79	TM1/ECL 1
	VEKGNHDELM	607-616	NBD 1/Linker
	RSDINDTGFF	95-104	ECL 1
	GSRLAVITQNI (TM9)	830-840	ICL 3/TM9
	KGLNLKVQSGQ	411-421	NBD 1
1182,58	DDGVIVEKGNH	602-612	NBD 1/Linker
	ANARGAAYEIF	356-366	Linker
1212,64	EMSSNDSRSSL	652-662	Linker
	SFTQAMMYFS (TM11)	943-952	TM11

4.2.2.9.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Verbindung mit Hitzedenaturierung von P-gp

1226,60	TFSFTQAMMY (TM11)	941-950	TM11
1523,78	VFRSMLRQDVSW	792-803	ICL 3
	TDIFANAGNLEDLM	76-89	ECL 1
1540,70	IDSYSTEGLMPNTL	1018-1031	Linker/NBD 2
1562,70	NDTGFFMNLEEDM	99-111	ECL 1
1597,84	GQVLTVFFSVLIGAF (TM6)	329-343	TM6
1598,86	DGKEIKRLNVQWL	1097-1109	NBD 2
	LDGKEIKRLNVQW	1096-1108	NBD 2
	VFGEMTDIFANAGNL (TM1)	71-85	TM1/ECL 1
1655,96	RFGAYLVAHKLMoxSF	958-971 + Ox.	ECL 6
1679,92	FSVLIGAFSVGQASPSI (TM6)	336-352	TM6/Linker
	FKLVTMQTAGNEVEL	623-637	NBD 1/Linker
	PSIEAFANARGAAYEI (TM6)	350-365	TM6/Linker
	IAYGDNSRVVSQEEI	1131-1145	NBD 2
1736,92	EPVLFATTIAENIRY	476-490	NBD 1
	PNTLEGNVTFGEVVFN	1028-1043	Linker/NBD 2
1752,88	TFGKAGEILTKRLRY (TM8)	776-790	TM8/ICL 3
	VRNPKILLLDEATSAL	546-561	Walker B NBD 1
	ANLGTGIISFIYGWQ (TM9/10)	841-856	TM9/10
1844,86	SYPSRKEVKILKGLNL	400-415	A-loop NBD 1
	PLMMLVFGEMoxTDIFAN (TM1)	66-81 + Ox.	TM1/ECL 1
1870,93	AGCFRFGAYLVAHKLMS (TM11)	954-970	TM11/ECL 6
	RKAHIFGITFSFTQAMox (TM11)	933-948 + Ox.	ICL 4/TM11
1969,91	IQVSFWCLAAGRQIHKI (TM2)	131-147	TM2/ICL 1
	FTQAMMYFSYAGCFRF (TM11)	944-959	TM11/ECL 6
1984,96	ASPSIEAFANARGAAYEIF (TM6)	348-366	TM6/Linker
	TKRLRYMVFRSMLRQ	785-799	ICL 3
	ALKDKKELEGAGKATEAI	883-901	ICL 4
2045,05	IHGAGLPLMMLVFGEMTDI (TM1)	60-78	TM1/ECL 1
	DESIPPVFSWRIMKLN	689-705	Linker
2212,03	RIMKLNLEWPYFVVGVF (TM7)	699-716	Linker/TM7
	FSVLIGAFSVGQASPSIEAFAN (TM6)	336-357	TM6/Linker
	AYYYSGIGAGVLAAYIQVSF (TM2)	115-135	ECL 1/TM2
	KLNLTEWPYFVVGVFCAII (TM7)	702-720	Linker/TM7
	LAQKGIYFSMVSQAGTKRQ	1261-1280	C-Terminus
2295,10	LGIVSQEPILFDCSIAENIAY	1113-1133	Q-loop NBD 2
	LFLALGIISFITFFLQGFTF (TM8)	758-777	TM8
2476,54	AYAKAGAVAEVLAAIRTVIAFGGQ	246-270	ICL 2
	FLQGFTFGKAGEILTKRLRYM (TM8)	771-791	TM8/ICL 3
	SLEVKKGQTLALVGSSGCGKSTTVQ	1057-1081	Walker A NBD 2
	NLKVQSGQTVALVNSGCGKSTTVQ	414-438	Walker A NBD 1
2994,55	GVVSQEPVLFATTIAENIRYGRENTM	471-497	Q-loop NBD 1
	GVFTRIDDPETKRQNSNLFLLFLAL (TM8)	737-762	ECL 4/TM8
	VRNPKILLLDEATSALDTESEAVVQVAL	546-573	Walker B/D-loop
4141,00	LALGIISFITFFLQGFTFGKAGEILTKRLRYMVFRS (TM8)	760-795	TM8/ICL 3
	RAAKEANIHFIESLPNKYSTKVGDKGTQLSGGQKQRI	1147-1184	ABC-Motiv NBD 2

4.2.2.9.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Verbindung mit Hitzedenaturierung von P-gp

Die Tabelle spiegelt somit lediglich die theoretisch maximal mögliche Sequenzabdeckung des Chymotrypsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp in Kombination mit Hitzedenaturierung wider und die Frage, ob sich wirklich alle der aufgeführten Aminosäuresequenzen oder nur ein Teil davon hinter den entsprechenden Peptidsignalen verbirgt, könnte nur durch Sequenzierung der Peptide im MS/MS-Modus geklärt werden. Aufgrund von Erfahrungswerten aus der Auswertung zahlreicher vorheriger Verdaus ist jedoch anzunehmen, dass die in der Praxis tatsächlich erzielte Sequenzabdeckung von P-gp niedriger ausgefallen sein wird als die theoretisch mögliche Sequenzabdeckung.

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass durch die Hitzedenaturierung von P-gp vor dem eigentlichen Verdau mit Chymotrypsin maximal 27 neue Peptidsignale respektive 64 Aminosäuresequenzen generiert worden sein könnten. Von diesen theoretisch möglichen Peptiden läge ein wesentlicher Teil auch im Bereich der transmembranären Domänen und demnach würden neben den Anfängen der transmembranären Helices 7 und 10 die TMs 1, 2, 6, 8, 9 und 11 zu einem Großteil abgedeckt werden. Damit wären die einzigen ausgesparten transmembranären Bereiche die TMs 3, 4, 5 und 12. Auch in den übrigen extra-membranären Regionen wäre eine deutliche Zunahme der Sequenzabdeckung zu verzeichnen. Insgesamt würde die maximal mögliche Sequenzabdeckung 950 von 1280 Aminosäuren = 74 % betragen. Dies entspräche im Vergleich zum regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp ohne Hitzedenaturierung einer maximalen Steigerung der Sequenzabdeckung um 313 Aminosäuren = 24 %.

Die Erfahrung aus der Auswertung zahlreicher MS/MS-Spektren chymotryptischer Verdaus von P-gp hat allerdings gezeigt, dass immer dann, wenn eine Aminosäuresequenz im Bereich der transmembranären Domänen neben einer Sequenz in den Nukleotidbindungsdomänen, Loop- oder Linker-Regionen zum beobachteten Peptidsignal passte, in der überwiegenden Anzahl der Fälle diejenige Sequenz als korrekt identifiziert wurde, welche sich außerhalb der TMDs befand. Des weiteren konnten in der Regel nur ein bis zwei aller möglichen Aminosäuresequenzen pro detektiertem Peptidsignal im MS/MS-Spektrum nachgewiesen werden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die durch die Tabelle wiedergegebene theoretisch höchstmögliche Sequenzabdeckung von 74 % als auch die starke Zunahme der abgedeckten transmembranären Regionen eher unwahrscheinlich ist und die in der Praxis tatsächlich

erzielte Sequenzabdeckung vermutlich deutlich niedriger ausgefallen sein wird.

Wird pro Peptidsignal lediglich eine passende Aminosäuresequenz innerhalb von P-gp berücksichtigt und gibt man in den Fällen, wo neben einer Sequenz in den TMDs auch eine Sequenz in den NBDs, Loop- oder Linker-Regionen möglich ist, jeweils dem extramembranären Peptid den Vorzug, erhält man eine wesentlich realistischere Sequenzabdeckung von 65 % (= 836 Aminosäuren), wobei sich der Anteil der abgedeckten Aminosäuren in den TMDs sichtlich reduziert hat und sich nur noch auf die TM11 erstreckt. Nichtsdestotrotz scheint es, als hätte durch die Hitzedenaturierung eine Entfaltung des Proteins stattgefunden, infolge der es dann durch die verbesserte Zugänglichkeit für das Enzym zu der sichtbaren Steigerung der Sequenzabdeckung von 50 % auf 65 % gekommen ist. Diese 15 %ige Erhöhung repräsentiert also das „Minimum“ der Verbesserung der Sequenzabdeckung von P-gp. Erhöht man die Anzahl der berücksichtigten Aminosäuresequenzen pro Peptidsignal bei ansonsten gleichbleibenden Bedingungen auf zwei, so wird als „Maximum“ der Verbesserung der Sequenzabdeckung ein Wert von 19 % (= 245 Aminosäuren) erhalten und die unter realistischen Gesichtspunkten maximal erreichbare Sequenzabdeckung beläuft sich demnach auf 69 %. Der „wahre“ Wert der erzielten Sequenzabdeckung liegt mit großer Wahrscheinlichkeit zwischen dem bestimmten Minimal- und Maximalwert der Sequenzabdeckung.

Somit lässt sich abschließend das Fazit ziehen, dass die Kombination aus Hitzedenaturierung und Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau dem separaten Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Bezug auf die erzielte Sequenzabdeckung überlegen und dem Trypsin-In-Lösung-Verdau in Verbindung mit Hitzedenaturierung äquivalent zu sein scheint. Das exakte Ausmaß der Überlegenheit konnte aufgrund des Fehlens von MS/MS-Daten jedoch leider nicht bestimmt werden.

4.2.2.10 In-Lösung-Verdau mit massenkompatiblen Detergenzien

In einem weiteren Optimierungsversuch zur Erhöhung der Sequenzabdeckung in den transmembranären Regionen von P-gp kamen mit der Massenspektrometrie kompatible, säurelabile Detergenzien zum Einsatz. Diese Reagenzien fungieren bei neutralem pH-

Wert als potente Detergenzien, indem sie eine Solubilisierung des Proteins bewirken und lassen sich durch Zugabe von final 0,5 - 1 % Trifluoressigsäure innerhalb von 15 - 30 min bei 37 °C bzw. Raumtemperatur zu Produkten abbauen, die nicht mit der Massenspektrometrie interferieren. Durch den Zusatz von 0,05 - 2 % dieser Detergenzien zum jeweiligen Verdau-Puffer kann die Zugänglichkeit der hydrophoben transmembranären Bereiche für die eingesetzten Enzyme durch Entfaltung verbessert werden. Die erhöhte Zugänglichkeit geht mit einem effizienteren Verdau der transmembranären Domänen einher, was sich wiederum in einer gesteigerten Sequenzabdeckung dieser Bereiche zeigt.

Für den Verdau von P-gp wurden zwei anionische, ein nichtionisches und ein zwitterionisches säurelabiles Detergens eingesetzt und mit den Enzymen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase kombiniert. Die verwendeten Detergenzien unterscheiden sich in ihrer kritischen Mizellbildungskonzentration (Critical Micelle Concentration = CMC) und wurden in unterschiedlich hohen Konzentrationen den jeweiligen Verdau-Puffern zugesetzt. Durch Variation der Detergens-Konzentration wurde für einige der verwendeten Enzym-Detergens-Kombinationen die optimale Arbeitskonzentration des eingesetzten Detergens ermittelt. Für andere Enzym-Detergens-Kombinationen wurde dagegen eine fixe Detergens-Konzentration gewählt und der Einfluss des Detergens-Zusatzes auf die transmembranäre Sequenzabdeckung entsprechend untersucht.

Tab. 4.24: Übersicht der verwendeten Enzym-Detergens-Kombinationen

Detergens	Eigenschaft	Enzym	Finale Konzentration
AALS II	anionisch	Trypsin	0,1 %
AALS II	anionisch	Chymotrypsin	0,1 - 2 %
ZALS I	zwitterionisch	Trypsin	0,1 %
ZALS I	zwitterionisch	Chymotrypsin	0,1 %
NALS II	nichtionisch	Chymotrypsin	0,05 - 1 %
ProteaseMAX®	anionisch	Trypsin	0,05 %
ProteaseMAX®	anionisch	Chymotrypsin	0,05 %
ProteaseMAX®	anionisch	Elastase	0,05 %

Von den vier zur Verfügung stehenden massenkompatiblen Detergenzien wurde als Erstes das AALS II (Anionic Acid Labile Surfactant) der Firma Protea mit einer CMC von 1,9 mM in einer finalen Konzentration von 0,1 % mit den Enzymen Trypsin und Chymotrypsin kombiniert. Anschließend wurden zur Ermittlung der optimalen Arbeitskonzentration von AALS II für den Verdau mit Chymotrypsin AALS II-Konzentrationen von final 0,5 - 2 % untersucht. Der in der Produktinformation empfohlene Konzentrationsbereich von AALS II liegt zwischen 0,01 und 2 % final [114].

4.2.2.10.1 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit AALS II

Für den Verdau von P-gp mit Trypsin unter Zusatz von 0,1 % AALS II wurden entsprechend Kapitel 3.2.2.10 zunächst 5 µl P-gp-Proteoliposomen (5,7 µg) in einem ausreichenden Volumen an 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung pH 8 suspendiert, so dass sich für das Gesamtvolumen des Verdau einschließlich der AALS II- und Enzymstammlösung 100 µl ergaben. Anschließend wurde eine AALS II-Stammlösung der Konzentration 1 % in destilliertem Wasser hergestellt. Darauf folgend wurde die AALS II-Stammlösung mit der P-gp-Suspension derart verdünnt, dass eine finale Konzentrationen von 0,1 % AALS II resultierte. Der Verdau wurde im Anschluss daran durch Zugabe der Enzymstammlösung in einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 (2,85 µl Trypsin-Lösung c = 0,1 µg/µl) gestartet und für 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Verdau durch Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 Minuten bei 95 °C gestoppt und das AALS II durch Zugabe von 11 µl Trifluoressigsäure 10 % (1 % final) innerhalb von 30 Minuten bei Raumtemperatur zu massenkompatiblen Produkten abgebaut. Abschließend wurden die erhaltenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene eingeeengt und nach erfolgter Aufbereitung für die Massenspektrometrie mittels ESI-MS analysiert.

In der folgenden Tabelle 4.25 sind die durch den Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Verbindung mit 0,1 % AALS II - verglichen mit dem regulären Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp ohne Detergens - möglicherweise neu entstandenen Peptide zusammengefasst.

Da von den in der Tabelle aufgeführten Peptidsignalen in Analogie zum bereits beschriebenen Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit Hitzedenaturierung

(siehe Unterkapitel 4.2.2.9.2) aufgrund technischer Probleme des verwendeten Massenspektrometers keine MS/MS-Spektren aufgenommen werden konnten, existiert zu den meisten der abgebildeten Peptidsignale mehr als eine passende Aminosäuresequenz innerhalb von P-gp.

Tab. 4.25: Peptide aus dem Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit AALS II. Aufgeführt sind Peptide, welche durch den Zusatz von 0,1% AALS II möglicherweise neu gebildet worden sind. Bereits durch den regulären Trypsin-In-Lösung-Verdau abgedeckte Sequenzen sind in schwarz abgebildet. Durch den Zusatz von AALS II möglicherweise neu abgedeckte Aminosäuren sind in blau eingefärbt. Aminosäuren innerhalb der transmembranären Helices sind in pink dargestellt, wobei potenziell neu abgedeckte Aminosäuren in den TMDs fett gedruckt abgebildet sind.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
939,40	YSNWLDK	42-48 + Methyl	N-Terminus
940,56	GIYFKLVT	620-627	NBD 1/Linker
1299,74	GAIGSRLAVITQN (TM9)	827-839	ICL 3/TM9
	VEKGNHDELMK	607-617	NBD 1/Linker
1314,73	KPTVSVFSMoxFR	31-41 + Ox.	N-Terminus
1354,86	ISAAHIIMoxIIEK	1003-1014 + Ox.	Linker
1503,80	GIYFSMoxVSVQAGTK	1265-1278 + Ox.	C-Terminus
	LRYMoxVFRSMoxLR	788-798 + 2x Ox.	ICL 3
1564,80	KELERYNKNEE	272-283	ICL 2
	GQTLALVGSSGCGKSTV	1063-1079	Walker A NBD 2
	ALVRNPKILLLDEA	544-557	Walker B NBD 1
1604,84	VQSGQTVALVGNSSGCGK	417-433	Walker A NBD 1
1657,86	EAFANARGAAYEIFK	353-367	Linker
1658,89	SGQALKDKKELEGAGK	880-895	ICL 4
1675,85	YNKNLEEAKRIGIK	277-290	ICL 2
	NADVIAGFDDGVIVEK	594-609 + Methyl	NBD 1
1679,89	GRTTIVIAHRLSTVR	579-593	H-loop NBD 1
1689,88	YNKNLEEAKRIGIK	277-290 + Methyl	ICL 2
	NADVIAGFDDGVIVEK	594-609 + 2x Methyl	NBD 1
1698,96	ILSSFTDKELLAYAK (TM4)	235-249	TM4/ICL 2
1731,90	STRRSVRGSQAQDRK	667-681	Linker
1732,90	LSTKEALDESIPPVSF	682-697	Linker
	KVQSGQTVALVGNSSGCGK	416-433	Walker A NBD 1
	ANAGNLEDLMSNITNR	80-95	ECL 1
1749,90	SEKDKKEKKPTVSVF	23-37	N-Terminus
	LLAIVPIIAIAGVEMK (TM10)	861-877	TM10/ICL 4
	LTLVILAI SPVLGLSAAV (TM4)	214-231	TM4
1750,90	YGDNSRVVSQEEIVR	1133-1147	NBD 2
	STVVQLLERFYDPLA	1077-1091	Walker A NBD 2
1778,95	GAAYEIFKIIDNKPSI	360-375	Linker
	KAITANISIGAAFLLIY (TM5)	291-307	ICL 2/TM5

4.2.2.10.1 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit AALS II

1869,98	IEKAVKEANAYDFIMK	500-515	NBD 1
	EHGTHQQLLAQGIYF	1253-1268	C-Terminus
1932,90	INDTGFFMNLEEDMTR	98-113	ECL 1
	ANIHFIESLPNKYSTK	1152-1168	NBD 2
	AGVVEMKMLSGQALKDKK (TM10)	871-888	TM10/ICL 4
2027,02	FRSMLRQDVSWFDDPK	793-808	ICL 3
	IGIKKAITANISIGAAFLI (TM5)	287-306	ICL 2/TM5
2028,10	EKGIYFKLVMTQTAGNEV	618-635	NBD 1/Linker
	HKFDTLVGERGAQLSGGQK	518-536	ABC-Motiv NBD 1
2045,02	FGAMAVGQVSSFAPDYAKAK (TM12)	983-1002	TM12/Linker
	TESEKVVQEALDKAREGR	1208-1225	NBD 2
	SSLIRKRSTRRSVRGSQA	660-677	Linker
	EIKRLNVQWLR AHLGIV	1100-1116	NBD 2
2119,06	MVSVDGQDIRTINVRFLR	450-467	NBD 1
	FLREIIGVVSQEPVLFATT	465-483	Q-loop NBD 1
2148,10	IGMFFQSMATFFTFGIVGF (TM3)	190-208	TM3
	STVVQLLERFYDPLAGKVL	1077-1095	Walker A NBD 2
2150,94	SDINDTGFFMNLEEDMoxTR	96-113 + Ox.	ECL 1
2164,09	ATEAIENFRTVVSLTQEOK	897-915	ICL 4
	AKISAAHIIMIEKTP LIDS	1001-1020	Linker/NBD 2
2166,94	AENIRYGRENVTMDEIEK	485-502	NBD 1
	NGGAKKKNFFKLNNKSEKD	8-26	N-Terminus
2172,90	GSQAQDRKLSTKEALDESIP	674-693	Linker
	SSLIRKRSTRRSVRGSQAQ	660-678	Linker
2182,09	FLQGFTFGKAGEILTKRLR (TM8)	771-789	TM8/ICL 3
	NLEEAKRIGIKKAITANISI (TM5)	280-299	ICL 2/TM5
2193,12	DKKEKKPTVSVFSMoxFRYS	26-43 + Ox.	N-Terminus
2198,14	LNLTEWPYFVVGVFCAIIN (TM7)	703-721	Linker/TM7
2214,10	NADVIAGFDDGVIVEKGNHDE	594-614	NBD 1/Linker
2215,15	IIDNKPSIDSYSGHKKPDN	368-387	Linker/NBD 1
	ISAAHIIMIEKTP LIDSY	1003-1022	Linker/NBD 2
	IIAIAGVVEMKMLSGQALKDK (TM10)	867-887	TM10/ICL 4
2297,16	QQLLAQGIYFSMVSQAGTK	1258-1278	C-Terminus
2326,20	ILSSFTDKELLAYAKGAVAAE (TM4)	235-256	TM4/ICL 2
	TCIVIAHRLSTIQNADLIVVF	1226-1246	H-loop NBD 2
2359,20	GAAYEIFKIIDNKPSIDSYSK	360-380	Linker/NBD 1
2360,18	AYIQVSFWCLAAGRQIHKIR (TM2)	129-148	TM2/ICL 1
2412,20	SAAVWAKILSSFTDKELLAYAK (TM4)	228-249	TM4/ICL 2
	MoxDLEGDRNGGAKKKNFFKLNN	1-21 + Ox.	N-Terminus
2421,32	EIIGVVSQEPVLFATTIAENIR	468-489 + Na ⁺	Q-loop NBD 1
	IGMFFQSMATFFTFGIVGFTR (TM3)	190-210 + Ox.	TM3/ECL 2
	YMVFRSMLRQDVSWFDDPK	790-808	ICL 3
2429,36	TINVRFLREIIGVVSQEPVLF	460-480	Q-loop NBD 1
	ENVTMDEIEKAVKEANAYDFI	493-513	NBD 1
2437,30	YMoxVFRSMLRQDVSWFDDPK	790-808 + Ox.	ICL 3
	FGGQKKELERYNKNLEEAKR	267-286	ICL 2
	AREGRTCIVIAHRLSTIQNADL	1221-1242	H-loop NBD 2
	LNNKSEKDKKEKKPTVSVFSM	19-39	N-Terminus
	IGMoxFFQSMoxATFFTFGIVGFTR (TM3)	190-210 + 2x Ox.	TM3/ECL 2
	EIIGVVSQEPVLFATTIAENIR	468-489 + Ox. + Na ⁺	Q-loop NBD 1
2443,33	SSLIRKRSTRRSVRGSQAQDR	660-680	Linker
2451,34	RNGGAKKKNFFKLNNKSEKDK	7-27	N-Terminus

4.2.2.10.1 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit AALS II

	KNFFKLNNKSEKDKKEKKPT	14-33	N-Terminus
	AVKEANAYDFIMKLPKFDL	503-523	NBD 1
	YMoxVFRSMoxLRQDVSWFDDPK	790-808 + 2x Ox.	ICL 3
2616,40	LMSFEDVLLVFSAVVFGAMAVGQVS (TM12)	968-992	ECL 6/TM12
	ELERYNKNLEEAKRIGIKKAIT (TM5)	273-294	ICL 2/TM5
	LTDDVSKINEGIGDKIGMFFQ SMA (TM3)	175-198	ICL 1/TM3
2665,42	VQSGQTVALVGNSSGCGKSTTVQLMoxQR	417-442 + Ox.	Walker A NBD 1
	TVIAFGGQKELERYNKNLEEAK	263-285	ICL 2
2681,38	NGGAKKKNFFKLNNKSEKDKKEK	8-30	N-Terminus
2682,40	FIESLPNKYSTKVGDKGTQLSGGQK	1157-1181	ABC-Motiv NBD 2
	VSLTQEQKFEHMYAQLQVPYR	908-929	ICL 4
	AGEILTKRLRYMVFRSMLRQDV	780-801	ICL 3
	IPVLQGLSLEVKKGQTLALVGSSGCGK	1050-1076	Walker A NBD 2
	LTLVILAI SPVLGLSAAVWAKILSSF (TM4)	214-239	TM4/ICL 2
2687,41	SRSSLIRKRSTRRSVRGSQAQDR	658-680	Linker
	YFKLVTMQTAGNEVELENAADESK	622-645	Linker
	ELERYNKNLEEAKRIGIKKAITA (TM5)	273-295	ICL 2/TM5
2688,43	ENVTMDEIEKAVKEANAYDFIMK	493-515	NBD 1
2730,49	ILLLDEATSALDTESEKVVQEALDK	1196-1220	Walker B/D-loop
	EHGTHQQLLAQKGIYFSMVSVQAGT	1253-1277	C-Terminus
	AAKEANIHFIESLPNKYSTKVGDK	1148-1172	NBD 2
	IAGVEMKMLSGQALKDKKELEGAGK (TM10)	870-895	TM10/ICL 4
2920,45	VTMDEIEKAVKEANAYDFIMKLPK	495-519	NBD 1
	FTFGKAGEILTKRLRYMVFRSMLR (TM8)	775-798	TM8/ICL 3
2964,55	PHILLLDEATSALDTESEKVVQEALDK	1194-1220	Walker B/D-loop
	QPHILLLDEATSALDTESEKVVQEALD	1193-1219	Walker B/D-loop
3062,53	QDVSWFDDPKNTTGALTTRLANDAAQVK	799-826	ICL 3
3063,52	MoxLSGQALKDKKELEGAGK IATEAIENFR	878-905 + Ox.	ICL 4
3075,64	INEGIGDKIGMFFQSMATFFTFGIVGFT (TM3)	182-209	ICL 1/TM3
3166,48	LDTESEKVVQEALDKAREGRTCIVIAHR	1206-1233	D-loop/H-loop
	TTIVIAHRLSTVRNADVIAGFDDGVIVEKG	581-610	H-loop NBD 1
3193,60	GQTLALVGSSGCGKSTVVQLLERFYDPLAGK	1063-1093	Walker A NBD 2
	LRKAHIFGITFSFTQAMMYFSYAGCFR (TM11)	932-958	ICL 4/TM11
	KGRTTIVIAHRLSTVRNADVIAGFDDGVIV	578-607	H-loop NBD 1
3282,79	SGHKPDNIKGNLEFRNVHFSYPSRKEVK	381-408	A-loop NBD 1
3295,66	VELENAADESKSEIDALEMSSNDRSSLIR	635-664	Linker
3531,88	ALVRQPHILLLDEATSALDTESEKVVQEALDK	1189-1220	Walker B/D-loop
3569,77	LSTVRNADVIAGFDDGVIVEKGNHDELMKEKGI	589-621	NBD 1/Linker
	TCIVIAHRLSTIQNADLIVVFQNGRVKEHGTH	1226-1257	H-loop NBD 2
	TGIIISFIYGWQLTLLLLAIVPIIAIGVEMK (TM9/10)	845-877	TM9/TM10/ICL 4
3570,76	ISAAHIIMIEKTPLIDSYSTEGLMPNTLEGNV	1003-1035	Linker/NBD 2
	KIRKQFFHAIMRQEIGWFDVHDVGE LNTR	146-174	ICL 1
3822,82	NEVELENAADESKSEIDALEMSSNDRSSLIRKR	633-666	Linker
	SEIDALEMSSNDRSSLIRKRSTRRSVRGSQAQD	646-679	Linker
	KLMSFEDVLLVFSAVVFGAMAVGQVSSFAPDYAKA K (TM12)	967-1002	ECL 6/TM12/Linker
	MDLEGDRNGGAKKKNFFKLNNKSEKDKKEKKPT	1-33	N-Terminus
	DIPVLQGLSLEVKKGQTLALVGSSGCGKSTVVQLLER	1049-1085	Walker A NBD 2
3837,79	VTMDEIEKAVKEANAYDFIMKLPKFDLTVGER	495-527	NBD 1
	AADESKSEIDALEMSSNDRSSLIRKRSTRRSVR	640-673	Linker
	KLSTKEALDESIPPVFSWRIMKLNLTWPYFV (TM7)	681-712	Linker/TM7

Die Zuordnung der dargestellten Monoisotopischen Massen zu den entsprechenden Sequenzabschnitten erfolgte unter Berücksichtigung der beiden spezifischen Schnittstellen für Trypsin innerhalb der Aminosäuresequenz von P-gp (C-terminal von Arginin und Lysin) sowie unter Einhaltung einer Massentoleranz für die Abweichung zwischen theoretischer und experimentell bestimmter Monoisotopischer Masse von 300 ppm. Dabei wurden auch semitryptische Peptide mit eingeschlossen, was bedeutet, dass das Enzym einmal spezifisch hinter Arginin bzw. Lysin und einmal unspezifisch nach einer der übrigen Aminosäuren die Peptidbindung gespalten hat. Außerdem wurde das Vorliegen bestimmter Modifikationen, zum Beispiel die Oxidation des Schwefels der Aminosäure Methionin zum Sulfoxid sowie die Anlagerung von Natriumionen an die sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat bzw. OH-Gruppen beinhaltende Aminosäuren wie Serin und die damit verbundenen Massenzunahmen berücksichtigt.

Aufgrund des Fehlens von MS/MS-Daten gibt die Tabelle 4.25 somit lediglich die theoretisch maximal mögliche Sequenzabdeckung des Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit 0,1 % AALS II wieder und es ist sehr wahrscheinlich, dass die im Zuge des Verdau tatsächlich erzielte Sequenzabdeckung von P-gp aus den bereits genannten Gründen (siehe Unterkapitel 4.2.2.9.2) deutlich niedriger ausgefallen ist. Unter der Annahme von nur einer Aminosäuresequenz pro Peptidsignal und Priorisierung der Sequenzabschnitte außerhalb der transmembranären Domänen, erscheint eine Sequenzabdeckung von 77 % unter Einschluss von Teilen der transmembranären Helices 2, 3, 4, 7 und 8 realistisch. Dies käme einer Verbesserung um 16 % (= 206 Aminosäuren) gleich.

Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Kombination aus AALS II und Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp dem separaten In-Lösung-Verdau von P-gp mit Trypsin ohne Zusatz von Detergens überlegen zu sein scheint, auch wenn das exakte Ausmaß dieser Überlegenheit aufgrund des Nichtvorhandenseins von MS/MS-Daten bedauerlicherweise nicht bestimmt werden konnte.

4.2.2.10.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit AALS II

Für den Verdau von P-gp mit Chymotrypsin unter Zusatz von 0,1 - 2 % AALS II wurden entsprechend Kapitel 3.2.2.10 zunächst 5 µl P-gp-Proteoliposomen (5,7 µg) in einem ausreichenden Volumen 100 mM Tris-HCl / 10 mM Calciumchlorid pH 7,8 suspendiert, so dass sich für das Gesamtvolumen des Verdaus einschließlich der AALS II- und Enzymstammlösung 100 µl ergaben. Anschließend wurden zwei AALS II-Stammlösungen der Konzentration 1 % und 10 % in destilliertem Wasser hergestellt. Darauffolgend wurden die AALS II-Stammlösungen mit der P-gp-Suspension derart verdünnt, dass finale Konzentrationen von 0,1 %; 0,5 %; 1 %; 1,5 % und 2 % AALS II erhalten wurden. Der Verdau wurde im Anschluss daran durch Zugabe der Enzymstammlösung in einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 (2,85 µl Chymotrypsin-Lösung c = 0,1 µg/µl) gestartet und für 2,5 Stunden bei 25 °C inkubiert. Danach wurde der Verdau durch Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 Minuten bei 95 °C gestoppt und das AALS II durch Zugabe von 11 µl Trifluoressigsäure 10 % (1 % final) innerhalb von 30 Minuten bei Raumtemperatur zu massenkompatiblen Produkten abgebaut. Abschließend wurden die erhaltenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und nach erfolgter Aufbereitung für die Massenspektrometrie mittels ESI-MS analysiert.

Die folgende Tabelle 4.26 zeigt die durch den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit 0,1 - 2 % AALS II - verglichen mit dem regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp ohne Zusatz von Detergens - neu gebildeten Peptide. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink eingefärbt. Von allen aufgeführten Peptidsignalen wurden MS/MS-Spektren aufgenommen, daran anschließend durch Bestimmung der Abfolge der einzelnen Aminosäuren der Peptide die korrekten Aminosäuresequenzen innerhalb von P-gp identifiziert und abschließend den entsprechenden Monoisotopischen Massen zugeordnet.

Der Tabelle ist zu entnehmen, dass durch den Zusatz von 0,1 - 2 % AALS II insgesamt 72 neue Peptidsignale mit Monoisotopischen Massen zwischen 672 und 3422 Dalton generiert werden konnten. Aufgrund der Tatsache, dass in einigen Fällen für ein einziges Peptidsignal mehrere korrekte Aminosäuresequenzen innerhalb der P-gp-Sequenz identifiziert wurden, übersteigt die Anzahl der zugeordneten Aminosäuresequenzen

diejenige der beobachteten Peptidsignale und beläuft sich auf insgesamt 96 Stück inklusive Modifikationen (Oxidation des Schwefels der Aminosäure Methionin zum Sulfoxid bzw. Anlagerung von Natriumionen an die sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat sowie OH-Gruppen beinhaltende Aminosäuren wie Serin).

Tab. 4.26: Peptide aus dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit AALS II. Aufgeführt sind nur diejenigen Peptide, welche durch den Zusatz von 0,1 - 2 % AALS II neu entstanden sind. Aminosäuren innerhalb der transmembranären Helices sind in pink dargestellt.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
672,44	RNVHF	395-399	NBD 1
708,52	IVIAHR	583-588	H-loop NBD 1
	IVIAHR	1228-1233	H-loop NBD 2
	VIAHRL	584-589	H-loop NBD 1
	VIAHRL	1229-1234	H-loop NBD 2
726,46	RFGAYL	958-963	ECL 6
750,48	VTFGEVV	1035-1041	NBD 2
757,38	AGCFRFG (TM11)	954-960	TM11/ECL 6
	VGTLAAIL (TM1)	53-60	TM1
765,48	AKILSSF (TM4)	233-239	TM4/ICL 2
771,48	RKAHIF (TM11)	933-938	ICL 4/TM11
791,50	AIIFSKI (TM7)	729-735	TM7/ECL 4
	SIGAAFL (TM5)	298-305	TM5
	ISIGAAFL (TM5)	297-304	TM5
	TESEKVV	1208-1214	NBD 2
826,52	AQKGIYF	1262-1268	C-Terminus
836,54	YSGIGAGVL (TM2)	118-126	TM2
839,58	VRNPKIL	546-552	Walker B NBD 1
850,50	MVSVDGQD	450-457	NBD 1
858,52	VRAAKEAN	1146-1153	NBD 2
	YSGIGAGVL (TM2)	118-126 + Na ⁺	TM2
	KKGQTLAL	1061-1068	NBD 2
878,56	IAENIRY	484-490	NBD 1
	RQNSNLF	749-755	ECL 4
886,60	WQLTLLL (TM10)	855-861	TM10
922,62	TIVIAHRL	582-589	H-loop NBD 1
932,54	LLDEATSAL	553-561	Walker B NBD 1
	LLDEATSAL	1198-1206	Walker B NBD 2
935,60	TFGKAGEIL (TM8)	776-784	TM8/ICL 3
	RQEIGWF	157-163	ICL 1
948,56	EFRNVHF	393-399	NBD 1
954,56	FVGVFCAI (TM7)	711-719	TM7
	LLDEATSAL	553-561 + Na ⁺	Walker B NBD 1
	LLDEATSAL	1198-1206 + Na ⁺	Walker B NBD 2

4.2.2.10.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit AALS II

1000,60	DFIMKLPH	511-518	NBD 1
1016,65	DFIMoxKLPH	511-518 + Ox.	NBD 1
1031,60	DDPKNTTGAL	805-814	ICL 3
1068,68	SFEDVLLVF (TM12)	970-978	ECL 6/TM12
	GNVTFGEVVF	1033-1042	Linker/NBD 2
	YAQSLQVPY	920-928	ICL 4
1122,76	EKAVKEANAY	501-510	NBD 1
1124,68	GIVSQEPILF	1114-1123 + Na ⁺	Q-loop NBD 2
1133,68	STKVGDKGTQL	1166-1176	ABC-Motiv NBD 2
1158,66	DTLVGERGAQL	521-531	ABC-Motiv NBD 1
	ILLLDEATSAL	551-561	Walker B NBD 1
1165,72	LLERFYDPL	1082-1090	NBD 2
1180,72	ILLLDEATSAL	551-561 + Na ⁺	Walker B NBD 1
1189,63	DDPETKRQNS	743-752	ECL 4
1192,62	SVGQASPSIEAF (TM6)	344-355	TM6/Linker
1241,80	RNSLRKAHIF (TM11)	929-938	ICL 4/TM11
1260,60	DTESEAVVQVAL	562-573	D-loop NBD 1
1275,84	DFIMKLPHKF	511-520	NBD 1
1291,74	AYAKAGAVAEVVL	246-258	ICL 2
1291,84	DFIMoxKLPHKF	511-520 + Ox.	NBD 1
1301,70	MNLEEDMTRY	105-114	ECL 1
1317,66	MNLEEDMoxTRY	105-114 + Ox.	ECL 1
1319,88	SYPSRKEVKIL	400-410	A-loop NBD 1
1327,90	TQNIANLGTGIII (TM9)	837-849	TM9
1347,76	DTESEKVVQEAL	1207-1218	D-loop NBD 2
1367,83	DVHDVGEINTRL	164-175	ICL 1
1407,88	ERFYDPLAGKVL	1084-1095	NBD 2
1422,76	MIIEKTPLIDSY	1010-1021	Linker/NBD 2
	MVVGTLAAIIHGAGL (TM1)	51-65	N-Terminus/TM1
1430,83	LLIYASYALAFW (TM5)	304-315	TM5
1449,76	EGAGKIATEAIENF	891-904	ICL 4
1466,80	KRQNSNLFSLLF (TM8)	748-759	ECL 4/TM8
	TANISIGAAFLLIY (TM5)	294-307	TM5
	FSYPSRKEVKIL	399-410	A-loop NBD 1
1470,91	ANDAAQVKGAIGSR (TM9)	819-833	ICL 3/TM9
1520,92	ERFYDPLAGKVLL	1084-1096	NBD 2
	LERFYDPLAGKVL	1083-1095	NBD 2
1556,14	KGLNLKVQSGQTVL	411-425	NBD 1
1600,99	VPYRNSLRKAHIF (TM11)	926-938	ICL 4/TM11
1634,20	LLERFYDPLAGKVL	1082-1095	NBD 2
	LERFYDPLAGKVLL	1083-1096	NBD 2
1700,04	APDYAKAKISAAHIIM	995-1010	Linker
1700,90	SNITNRSINDTGFF	90-104	ECL 1
1716,16	APDYAKAKISAAHIIMox	995-1010 + Ox.	Linker
1719,01	VSDGQDIRTINVRF	451-465	NBD 1
1744,00	LTEWPYFVVGVFCAI (TM7)	705-719	Linker/TM7
	TEWPYFVVGVFCAII (TM7)	706-720	Linker/TM7
1747,24	LLERFYDPLAGKVLL	1082-1096	NBD 2
1782,16	EIFKIIDNKPSIDSY	364-378	Linker
1817,96	MVFRSMoxLRQDVSWF	791-804 + Ox.	ICL 3
	YMVFRSMLRQDVSW	790-803	ICL 3
1939,24	KVLLDGKEIKRLNVQW	1093-1108	NBD 2

4.2.2.10.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit AALS II

1962,04	EVELENAADESKSEIDAL	634-651	Linker
2012,36	RTVVSLTQEQQFEHMoxY	905-920 + Ox.	ICL 4
2191,24	KDKKELEGAGKIMATEAIENF	885-904	ICL 4
2283,24	GRENVTMoxDEIEKAVKEANAY	491-510 + Ox.	NBD 1
2289,48	SGGQKQRIAIARALVRNPKIL	532-552	ABC-Motiv/Walker B
2312,50	SGGQKQRIAIARALVRQPHIL	1177-1197	ABC-Motiv/Walker B
2422,36	GDNSRVVSQEEIVRAAKEANIH	1134-1155	NBD 2
2666,80	NYPTRPDIPVLQGLSLEVKKGQTL	1043-1066	A-loop NBD 2
3399,84	ATTIAENIRYGRENVTMDEIEKAVKEANAY	481-510	NBD 1
3422,95	AYAKAGAVAEVLAIRTVIAFGGQKKELERY	246-277	ICL 2

Die Versuche zur Ermittlung der optimalen AALS II-Konzentration ergaben, dass eine finale Konzentration von 0,1 % AALS II die besten Resultate lieferte und größere Mengen an AALS II nicht zu besseren Ergebnissen im Hinblick auf die Sequenzabdeckung in den transmembranären Domänen führten. Lediglich eine vergleichsweise höhere Signalintensität von großen Peptiden mit hohem Molekulargewicht war zu verzeichnen.

Betrachtet man die identifizierten Peptide etwas genauer, wird deutlich, dass sich erfreulicherweise ein wesentlicher Anteil von ihnen im Bereich der transmembranären Domänen befindet. So konnten neben kleinen Bereichen der TMs 4, 8, 11 und 12 die transmembranären Helices 1, 2, 5, 6, 7, 9 und 10 zu einem Großteil abgedeckt werden, so dass lediglich die TM 3 noch von der Sequenzabdeckung ausgespart bleibt. Gegenüber dem regulären In-Lösung-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin ohne Zusatz von Detergens konnten erstmals auch die transmembranären Helices 2, 5, 7, 10 und 11 abgedeckt werden. Darüber hinaus konnte in den Nukleotid-Bindungsdomänen sowie den Loop- und Linker-Regionen ebenfalls eine deutliche Zunahme der abgedeckten Bereiche erzielt werden. Verglichen mit dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp ohne Zusatz von AALS II konnte die Sequenzabdeckung um 283 Aminosäuren von 637 auf 920 Aminosäuren erhöht werden. Dies entspricht einer Steigerung der abgedeckten Sequenzbereiche um 22 % von 50 auf 72 % und unterstreicht damit die Effektivität des verwendeten Detergens, das Membranprotein zu solubilisieren und dadurch die Zugänglichkeit für das Enzym zu den vorher nur schwer erreichbaren Regionen zu erhöhen.

Eine graphische Darstellung der durch den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit 0,1 - 2 % AALS II erzielten Sequenzabdeckung von P-gp ist in der folgenden Abbildung 4.28 zu sehen. Sequenzbereiche, die durch den regulären

4.2.2.10.2 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit AALS II

Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp ohne Detergens abgedeckt werden konnten, sind in rot dargestellt. Sequenzabschnitte, welche durch den Zusatz von 0,1 - 2 % AALS II zusätzlich abgedeckt werden konnten, sind in blau abgebildet. Die Sequenzabdeckung konnte durch den Zusatz von 0,1 - 2 % AALS II um 283 Aminosäuren respektive 22 % erhöht werden. Die Tatsache, dass unter den neu abgedeckten Bereichen viele transmembranäre Bereiche sind, verdeutlicht die Effizienz des eingesetzten Detergens, die Zugänglichkeit der zuvor schwer erreichbaren Regionen für die Protease Chymotrypsin zu verbessern.

1	MDLEGDRNGG	AKKKNFFKLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVFMSF	RYSNWLDKLY	
51	MVVGTLAAII	HGAGLPLMML	VFGEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRSNDIND	TM 1
101	TGFFMNLEED	MTRYAYYYSG	IGAGVLVAAY	IQVSWFCLAA	GRQIHKIRKQ	TM 2
151	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS	KINEGIGDKI	GMFFQSMATF	TM 3
201	FTGFIVGFTR	GWKLTLLVILA	ISPVLGLSAA	VWAKILSSFT	DKELLAYAKA	TM 3 + 4
251	GAVAEVLLAA	IRTVIAFGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG	TM 5
301	AAFLLIYASY	ALAFWYGTTL	VLSGEYSIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP	TM 5 + 6
351	SIEAFANARG	AAYEIFKIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIKG	NLEFRNVHFS	
401	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG	QTVALVGNSG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM	
451	VSDGQDIRT	INVRFLREII	GVVSQEPVLF	ATTIAENIRY	GRENVTMDEI	
501	EKAVKEANAY	DFIMKLPKHF	DTLVGERGAQ	LSGGQKORIA	IARALVRNPK	
551	ILLLDEATSA	LDTESEAVVQ	VALDKARKGR	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG	
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVTMQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA	
651	LEMSSNDSRS	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPVVSFWRI	
701	MKLNLTWPY	FVVGVFCAII	NGGLQPAFAI	IFSKIIGVFT	RIDDPETKRQ	TM 7
751	NSNLFSLFL	ALGIISFITF	FLQGFTEFGKA	GEILTKRLRY	MVFRSMLRQD	TM 8
801	VSWFDDPKNT	TGALTTRLAN	DAAQVKGAIG	SRLAVITQNI	ANLGTGIIIS	TM 9
851	FIYGWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVEMKMLS	GQALKDKKEL	EGSGKIATEA	TM 9 + 10
901	IENFRTVVS	TQEQKFEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY	TM 11
951	FSYAGCFRFG	AYLVAHKLMS	FEDVLLVFA	VVFGAMAVGQ	VSSFAPDYAK	TM 11 + 12
1001	AKISAAHIIM	IIEKTPLIDS	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI	
1051	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSGCGKSTVV	QLLERFYDPL	AGKVLLDGKE	
1101	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNSRVV	SQEEIVRAAK	
1151	EANIHFIES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KQRIAIARAL	VRQPHILLLD	0
1201	EATSALDTES	EKVVQEALDK	AREGRTCIVI	AHRLSTIQNA	DLIVVFQNGR	
1251	VKEHGTHQQL	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKRQ			

Abb. 4.28: Graphische Darstellung der durch den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit 0,1 - 2 % AALS II erzielten Sequenzabdeckung. Sequenzbereiche, welche durch den regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau ohne Detergens abgedeckt werden konnten, sind in rot eingefärbt. Sequenzabschnitte, die durch den Zusatz von 0,1 - 2 % AALS II zusätzlich abgedeckt werden konnten, sind in blau dargestellt. Die Sequenzabdeckung konnte durch den Zusatz von AALS II um 283 Aminosäuren von 637 auf 920 Aminosäuren erhöht werden. Dies entspricht einer Steigerung um 22 % von 50 auf 72 %.

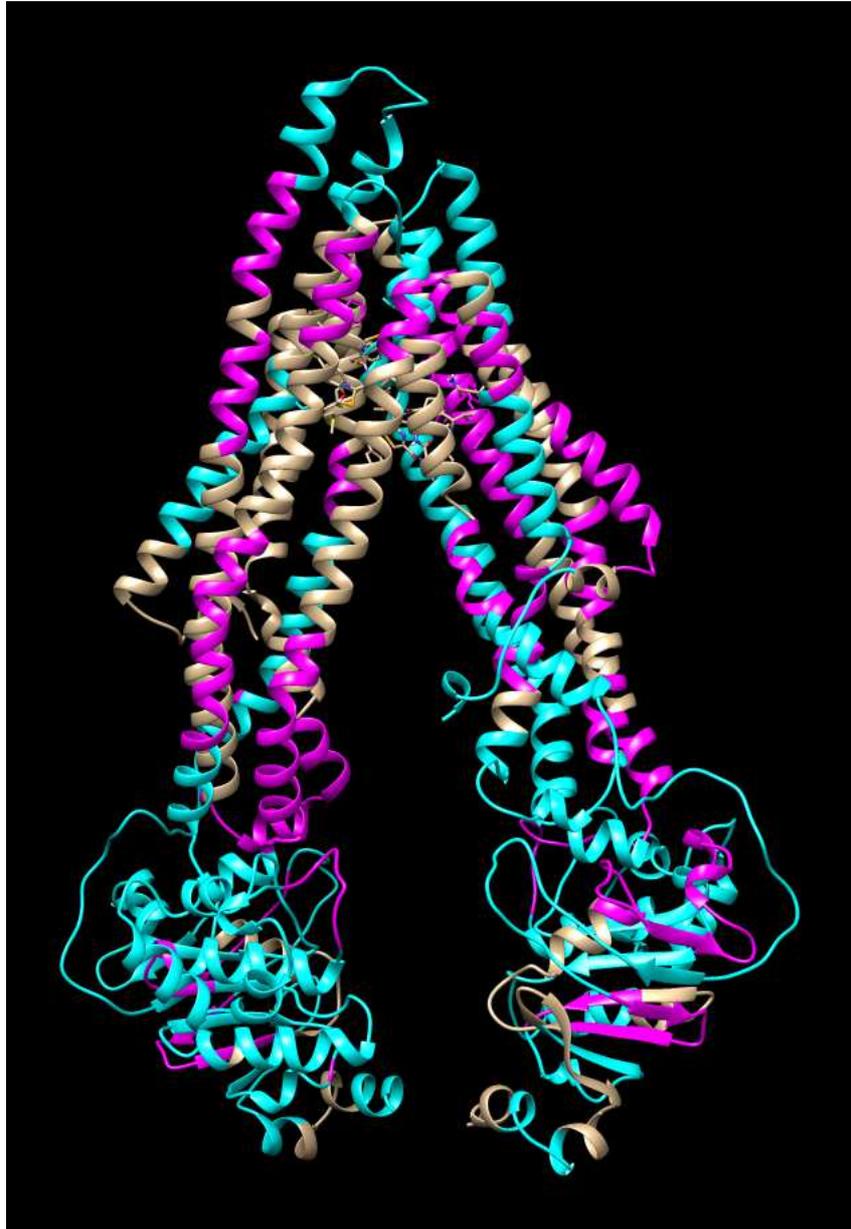


Abb. 4.29: Bildliche Darstellung der durch den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Zusatz von 0,1 - 2 % AALS II erzielten Sequenzabdeckung. Bereiche, die durch den regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau ohne Detergens abgedeckt werden konnten, sind in türkis eingefärbt. Regionen, welche durch den Zusatz von AALS II zusätzlich abgedeckt wurden, sind in pink dargestellt. In weiß abgebildet sind Sequenzen, die von der Sequenzabdeckung ausgespart blieben. Es wird deutlich, dass durch den AALS-Zusatz eine erhebliche Steigerung der Sequenzabdeckung, insbesondere in den transmembranären Domänen, erreicht werden konnte. So wurden mit Ausnahme der TM3 alle transmembranären Helices zumindest teilweise abgedeckt. Die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung beträgt 72 %, was einer Steigerung um 22 % entspricht.

4.2.2.10.3 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ZALS I

Das zwitterionische Detergens ZALS I (Zwitterionic Acid Labile Surfactant) wurde ebenfalls von der Firma Protea bezogen und für den Verdau von P-gp in einer fixen Konzentration von 0,1 % mit den Enzymen Trypsin und Chymotrypsin kombiniert. Das Detergens besitzt eine CMC von 3,4 mM und wird üblicherweise in einem Konzentrationsbereich von 0,01 - 0,1 % eingesetzt [115].

Analog dem Verdau mit AALS II wurden entsprechend Kapitel 3.2.2.10 als Erstes 5 µl (5,7 µg) aufgereinigtes P-gp in 82,2 µl 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 8 gelöst. Im Anschluss daran erfolgte die Herstellung einer 1 %igen Lösung von ZALS I in destilliertem Wasser. Von dieser Lösung wurden daraufhin 10 µl zur P-gp-Suspension gegeben, so dass eine finale Konzentration von 0,1 % ZALS I resultierte. Nachfolgend wurden 2,85 µl Trypsin-Lösung (0,1 µg/µl) entsprechend einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 zugegeben und für 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Daran schlossen sich die Inaktivierung des Verdau durch 10 minütiges Erhitzen bei 95 °C und die Zersetzung des ZALS I innerhalb von 30 Minuten bei Raumtemperatur durch Zugabe von final 1 % Trifluoressigsäure an. Abschließend wurden die entstandenen Peptide getrocknet und nach erfolgter Aufbereitung für die Massenspektrometrie mittels ESI-MS analysiert.

In der nachfolgenden Tabelle 4.27 sind die durch den Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit 0,1 % ZALS I - verglichen mit dem regulären Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp ohne Detergens - möglicherweise neu entstandenen Peptide zusammengefasst.

Wegen technischer Probleme des verwendeten Massenspektrometers konnten von den in der Tabelle aufgeführten Peptidsignalen leider wiederum keine MS/MS-Spektren aufgenommen werden, weshalb in den meisten Fällen für jedes Peptidsignal mehrere passende Aminosäuresequenzen mit identischer Monoisotopischer Masse innerhalb der P-gp-Sequenz existieren. Die Zuordnung der dargestellten Aminosäuresequenzen zu den entsprechenden Monoisotopischen Massen erfolgte dabei analog zum bereits beschriebenen Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit AALS II (siehe Unterkapitel 4.2.2.10.1).

Tab. 4.27: Peptide aus dem Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ZALS I. Aufgeführt sind Peptide, welche durch den Zusatz von 0,1 % ZALS I möglicherweise neu gebildet worden sind. Bereits durch den regulären Trypsin-In-Lösung-Verdau abgedeckte Sequenzen sind in schwarz abgebildet. Durch den Zusatz von ZALS I möglicherweise neu abgedeckte Aminosäuren sind in blau eingefärbt. Aminosäuren innerhalb der transmembranären Domänen sind in pink dargestellt, wobei potenziell neu abgedeckte transmembranäre Aminosäuren fett gedruckt abgebildet sind.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
1354,74	ISAAHIIMoxIIIEK	1003-1014 + Ox.	Linker
1396,64	Y YYY S GIGAGVL (TM2)	114-126	ECL 1/TM2
	KEKKPTVSVFSMox	28-39 + Ox.	N-Terminus
	KEVKILKGLNLK	405-416 + Methyl	NBD 1
1503,74	GIYFSMoxVSVQAGTK	1265-1278 + Ox.	C-Terminus
	L RYMox V FR S Mox L R	788-798 + 2x Ox.	ICL 3
1657,80	E AFANAR G AAYEIFK	353-367	Linker
1658,80	SGQALKDKKELEGAGK	880-895	ICL 4
1675,80	YNKNLEEAKRIGIK	277-290	ICL 2
	NADVIAGFDDGVIVEK	594-609 + Methyl	NBD 1
1689,84	YNKNLEEAKRIGIK	277-290 + Methyl	ICL 2
1703,82	LDTESEKVVQEALDK	1206-1220	D-loop NBD 2
	I RK Q FFHAIMR Q E	147-159	ICL 1
	NVHFSYPSR K EV K I	396-409	A-loop NBD 1
1704,82	DESIPPVFWRIMK	689-702	Linker
1884,92	V SF W CL A AG R Q I HKIR (TM2)	133-148	TM2/ICL 1
2026,96	FRSMLRQDVSWFDDPK	793-808	ICL 3
2027,96	E K GIY F KLVTMQTAGNEV	618-635	NBD 1/Linker
	HKFDTLVGER G A Q L S GG Q K	518-536	ABC-Motiv NBD 1
	A H I F G I T S F T Q A M Mox Y F (TM11)	935-951 + Ox.	ICL 4/TM11
2044,96	F G A M A V G Q V S S F A P D Y A K A K (TM12)	983-1002	TM12/Linker
	TESEKVVQEALDKAREGR	1208-1225	NBD 2
	S SL I R K R S T R R S V R G S Q A	660-677	Linker
	E I K R L N V Q W L R A H L G I V	1100-1116	NBD 2
2048,02	KEKKPTVSVFSMFRYSN	28-44	N-Terminus
	ELEGSGKATEAIENFRTV	889-907	ICL 4
	K K E L E R Y N K N L E E A K R	271-286	ICL 2
	DINDTGFFMNLEEDMTR	97-113	ECL 1
	FDTLVGER G A Q L S GG Q K Q R	520-538	ABC-Motiv NBD 1
2049,01	NIAYGDNRSRVVSQEEIVR	1130-1147	NBD 2
	VALVGN S G C G K STTVQLMQR	423-442	Walker A NBD 1
2193,07	DKKEKKPTVSVFSMoxFRYS	26-43 + Ox.	N-Terminus
2198,11	L N L T E W P Y F V G V F C A I I N (TM7)	703-721	Linker/TM7
2199,11	LTDDVSKIN E G I G D K I G M F F (TM3)	175-194	ICL 1/TM3
	V L A A I R T V I A F G G Q K K E L E R	257-276	ICL 2
2221,27	KPTVSVFSMoxFRYS N W L D K	31-48 + Ox.	N-Terminus
2655,32	S Mox L R Q D V S W F D D P K N T T G A L T T R	795-817 + Ox.	ICL 3
2681,32	N G G A K K K N F F K L N N K S E K D K K E K	8-30	N-Terminus
2730,40	E H G T H Q Q L L A Q KGIYFSMoxVSVQAGT	1253-1277	C-Terminus

4.2.2.10.3 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ZALS I

	ILLLDEATSALDTESEKVVQEALDK	1196-1220	Walker B/D-loop
	IAGVVEMK MLSGQALKDKKELEGAGK (TM10)	870-895	TM10/ICL 4
3005,44	LRYMVF R SMLR QDVSWFDDPKNTT	788-811	ICL 3
	FEHMYAQLQVPYRNSLR KAHIFGI (TM11)	916-940	ICL 4/TM11
	AIRTVIAFGGQ KKELER YNKNLEEAK	260-285	ICL 2
3006,43	LVTMQTAGNEVELENAADESKSEIDALE	625-652	Linker
	LMQRLYDPT EGMVSVDGQDIR TINVR	439-464	NBD 1
	NGGAKKK NFFKLN NKSEKDKKE KPT	8-33	N-Terminus
	IGMoxFFQSMATFFTGFIVGFT RGWKL T (TM3/4)	190-215 + Ox.	TM3/ECL 2/TM4
	LNNK SEKDKKE KPTVSVFS MoxFRYS		
		19-43 + Ox.	N-Terminus
3060,48	MRQEIGWFDVHDV GELNTRLTDDVSK	156-181	ICL 1
	RLRYMVF R SMLR QDVSWFDDPKNT	787-810	ICL 3
	AIARALVRQPHILLLDEATSALDTESEK	1185-1212	Walker B/D-loop
	GIISFITF L QGFTFGK AGEILTK RLR (TM8)	763-789	TM8/ICL 3
3075,52	INEGIGDKIGMFFQSMATFFTGFIVGFT (TM3)	182-209	ICL 1/TM3
3137,44	LVTMQTAGNEVELENAADESKSEIDALEM	625-653	Linker
	PILFDCSIAENIAYGDNSRVVS QEEIVR	1120-1147	NBD 2
	VQSGQTV ALVGN SGCGKSTTVQ L MQRLYD P	417-446	Walker A NBD 1
	AREGRTCIVIAHRLSTIQ NADLIV FQ N	1221-1248	H-loop NBD 2
	KGQTLALV GSSGCGKSTVVQ LLERFYD PLA	1062-1091	Walker A NBD 2
	QTLALV GSSGCGKSTVVQ LLERFYD PLAGK	1064-1093	Walker A NBD 2
	GSSGCGKSTVVQ LLERFYD PLAGKVLLDGK	1070-1099	Walker A NBD 2
	TCIVIAHRLSTIQ NADLIV FQ NGR VKE	1226-1253	H-loop NBD 2
3139,39	HKPDNIKGNLEFRNVHFSYPSR KEVK	383-408	A-loop NBD 1
	KFDTLVGER GAQLSGGQKQRI AIARALVR	519-547	ABC-Motiv NBD 1
3366,82	STTVQ L MQRLYDPT EGMVSVDGQDIR TINVR	434-463	Walker A NBD 1
3367,81	RSTRRSV RGSQAQDRKLSTKEALDESIPPV	666-695	Linker
	LMSFEDVLLVFS AV VGAMAVGQVSS FAPDYA (TM12)	968-999	ECL 6/TM12/Linker
	VQSGQTV ALVGN SGCGKSTTVQ L MQRLYD PTE	417-448	Walker A NBD 1
3562,72	ARGAAYE IFKIIDNKPSIDSYSGH KPDNIK	358-389	Linker/NBD 1
	VVGAMAVGQVSS FAPDY AKAK ISAAHIIMIEK (TM12)	981-1014	TM12/Linker
3569,62	LSTVR NADVIAGFDDGVIVEKGNHDELM KEKGI	589-621	NBD 1/Linker
	TCIVIAHRLSTIQ NADLIV FQ NGR VKEHGTH	1226-1257	H-loop/NBD 2
	TGIIISFIY GWQL TLLLLAIVPIIAIAGV EMK (TM9/10)	845-877	ICL 3/TM9/ECL 5/TM10/ICL 4
3570,68	ISAAHIIMIEK TPLID SYSTEGLMPNT LEGNV	1003-1035	Linker/NBD 2
	KIRKQFF HAIMRQEIGWFDVHDV GELNTR	146-174	ICL 1
3811,84	IHAFIESLPNKYSTKVGDKGT QLSGGQKQRI AIAR	1154-1188	ABC-Motiv NBD 2
3815,72	RSVRGSQAQDRKLSTKEALDESIPPV SFWRIMK	670-702	Linker
	LTLVILAI SPV LGLSAAV WAKILSSFTDK L LAYAK (TM4)	214-249	TM4/ICL 2
4283,00	IAIARALVRQPHILLLDEATSALDTESEKVVQEALDKA R	1184-1222	Walker B/D-loop NBD 2
4447,16	FEHMYAQLQVPYRNSLR KAHIFGITFSFTQ AMMY FS (TM11)	916-952	ICL 4/TM11
	RTTIVIAHRL LSTVR NADVIAGFDDGVIVEKGNHDEL MKEK	580-619	H-loop NBD 1
4504,20	GRTTIVIAHRL LSTVR NADVIAGFDDGVIVEKGNHDE LMKEK	579-619	H-loop NBD 1

4.2.2.10.3 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ZALS I

4520,28	GRTTIVIAHRL LSTVR NADVIAGFDDGVIVEKGNHDE LMoxKEK	579-619 + Ox.	H-loop NBD 1
5151,60	NADVIAGFDDGVIVEKGNHDELMKEK GIYFK LVTMQ TAGNEVELENA GLNLKVQSGQTVALVGNSGCGKSTTVQLMQRLYDP TEGMVSVDDGQDIRT	594-640 412-460	NBD 1/Linker Walker A NBD 1
	LSTVR NADVIAGFDDGVIVEKGNHDELMKEK GIYFK LVTMQTAGNEV	589-635	NBD 1/Linker
5167,55	NADVIAGFDDGVIVEKGNHDELMoxKEK GIYFK LVT MQTAGNEVELENA GLNLKVQSGQTVALVGNSGCGKSTTVQLMQRLYDP TEGMoxVSVDDGQDIRT	594-640 + Ox. 412-460 + Ox.	NBD 1/Linker Walker A NBD 1
	LSTVR NADVIAGFDDGVIVEKGNHDELMKEK GIYFK LVTMoxQTAGNEV	589-635 + Ox.	NBD 1/Linker
	QVFSWCLAAGRQIHKIRK QFFHAIMRQEIGWFDVH DVGELNTR (TM2)	132-174	TM2/ICL 1
	GWKLT LVLAI SPVLGLSAAVWAKIL SSFTDKELLAY AKAGAVAEVLAA (TM4)	211-260	ECL 2/TM4/ICL 2
5544,90	VKGAIGS RLAVITQNIANLGTGIIISFIYGWQLTLLL LAIVPIAIAGVVEMK (TM9/10)	825-877	ICL 3/TM9/ECL 5/TM10/ICL 4
5558,70	WFDVHDVGEINTRLTDDVSKINEGIGDKIGMFFQS MATFFTGFIVGFTR (TM3)	162-210	ICL 1/TM3/ECL 2
	QRLYDPTEGMVSVDDGQDIRTINVRFLREIIGVVSQEP VLFATTIAENIR	441-489	Q-loop NBD 1
5573,75	GNHDELMKEK GIYFK LVTMQTAGNEVELENAADES KSEIDALEMSSNDSR	610-659	NBD 1/Linker
5588,80	NVHFSYPSR KEVK ILKGLNLKVQSGQTVALVGNSGC GKSTTVQLMQRLYDP GNHDELMKEK GIYFK LVTMQTAGNEVELENAADES KSEIDALEMoxSSNDSR	396-446 610-659 + Ox.	A-loop/Walker A NBD 1 NBD 1/Linke

Somit gibt die Tabelle lediglich die maximal mögliche Sequenzabdeckung des Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit 0,1 % ZALS I wieder und die im Zuge des Verdau tatsächlich erzielte Sequenzabdeckung von P-gp ist höchstwahrscheinlich deutlich geringer als die theoretisch mögliche Sequenzabdeckung. Diese Hypothese wird gestützt durch Erfahrungswerte aus der Auswertung zahlreicher MS/MS-Spektren, welche ergeben haben, dass in der Regel nur ein bis zwei aller theoretisch passenden Aminosäuresequenzen in den Fragmentspektren nachgewiesen werden konnten.

Geht man von lediglich einer Aminosäuresequenz pro Peptidsignal aus und gibt Sequenzabschnitten in den Nukleotidbindungsdomänen, Loop- und Linker-Regionen den Vorzug vor Peptidsequenzen in den transmembranären Domänen, resultiert eine Sequenzabdeckung von 76 %. Gegenüber dem regulären Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp ohne Detergens (61 %) entspräche dies einer Verbesserung um 15 % inklusive der

Abdeckung der transmembranären Helices 9 und 10 sowie kleinerer Bereiche der TMs 2, 3 und 7.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Zusatz von 0,1 % ZALS I zum Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp anscheinend eine deutliche Erhöhung der Sequenzabdeckung - auch in den transmembranären Domänen - bewirkt hat. Das Ausmaß dieser Verbesserung konnte aufgrund des Fehlens von MS/MS-Daten jedoch leider nicht bestimmt werden.

4.2.2.10.4 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ZALS I

Der Verdau von P-gp mit Chymotrypsin unter Zusatz von 0,1 % ZALS I wurde in Analogie zum bereits beschriebenen Trypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit 0,1 % ZALS I entsprechend Kapitel 3.2.2.10 durchgeführt. Die einzigen Unterschiede bestanden im verwendeten Verdau-Puffer (100 mM Tris-HCl / 10 mM Calciumchlorid pH 7,8) und in der Verdau-Temperatur (25 °C).

Die folgende Tabelle 4.28 zeigt die im Zuge des Chymotrypsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp in Kombination mit 0,1 % ZALS I gebildeten Peptide. Abweichend vom Trypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit 0,1 % ZALS I wurden aufgrund des unspezifischeren Spaltungsverhaltens des Chymotrypsins von allen aufgeführten Peptidsignalen MS/MS-Spektren aufgenommen, durch Bestimmung der Abfolge der einzelnen Aminosäuren der Peptide die korrekten Aminosäuresequenzen innerhalb von P-gp identifiziert und den entsprechenden Monoisotopischen Massen zugeordnet.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass insgesamt 35 Peptidsignale mit Monoisotopischen Massen zwischen 672 und 2640 Dalton generiert werden konnten. Aufgrund der Tatsache, dass in einigen Fällen für ein einziges Peptidsignal mehrere korrekte Aminosäuresequenzen innerhalb von P-gp identifiziert werden konnten, übersteigt die Anzahl der zugeordneten Aminosäuresequenzen diejenige der beobachteten Peptidsignale und beläuft sich auf insgesamt 45 Stück inklusive einer Modifikation (Oxidation des Schwefels der Aminosäure Methionin zum Sulfoxid).

Tab. 4.28: Peptide aus dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Zusatz von 0,1 % ZALS I. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink dargestellt. Peptide, welche bereits aus dem regulären In-Lösung-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin ohne Zusatz von Detergens bekannt waren, sind in schwarz abgebildet. Peptide, die auch im Rahmen des Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit AALS II gebildet wurden, sind in blau eingefärbt. Durch den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Zusatz von 0,1 % ZALS I neu entstandene Peptide sind in rot dargestellt.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
672,40	RNVHF	395-399	NBD 1
726,46	RFGAYL	958-963	ECL 6
750,46	VTFGEVV	1035-1041	NBD 2
757,38	AGCFRFG (TM11)	954-960	TM11/ECL 6
	VGTLAAII (TM1)	53-60	TM1
826,58	AQKGIYF	1262-1268	C-Terminus
836,54	YSGIGAGVL (TM2)	118-126	TM2
839,56	VRNPKIL	546-552	Walker B NBD 1
862,58	VRQPHIL	1191-1197	Walker B NBD 2
878,54	IAENIRY	484-490	NBD 1
	RQNSNLF	749-755	ECL 4
939,58	LAQKGIYF	1261-1268	C-Terminus
	GAKKKNFF	10-17	N-Terminus
948,56	EFRNVHF	393-399	NBD 1
961,62	AAIRTVIAF	259-267	ICL 2
	AIHAGLPL (TM1)	58-67	TM1
1102,66	GIVSQEPILF	1114-1123	Q-loop NBD 2
1151,66	ATTIAENIRY	481-490	NBD 1
1158,66	DTLVGERGAQL	521-531	ABC-Motiv NBD 1
	ILLLDEATSAL	551-561	Walker B NBD 1
1291,74	IIEKTPLIDSY	1011-1021	Linker/NBD 2
1291,74	AYAKAGAVAEVL	246-258	ICL 2
1319,80	SYPSRKEVKIL	400-410	A-loop NBD 1
1319,88	STIQNADLIVVF	1235-1246	NBD 2
1392,82	KIIDNKPSIDSY	367-378	Linker
	LSAAVWAKILSSF (TM4)	227-239	TM4/ICL 2
1468,96	SGGQKQRIAIARAL	532-545	ABC-Motiv NBD 1
	SGGQKQRIAIARAL	1177-1196	ABC-Motiv NBD 2
1582,93	NYPTRPDIPVLQGL	1043-1056	A-loop NBD 2
	IGSRLAVITQNIANL (TM9)	829-843	ICL 3/TM9
1588,96	RLSTIQNADLIVVF	1233-1246	NBD 2
1693,09	LRAHLGIVSQEPILF	1109-1123	Q-loop NBD 2
1699,03	LREIIGVVSQEPVLF	466-480	Q-loop NBD 1
1716,16	APDYAKAKISAAHIIMox	995-1010 + Ox.	Linker
1719,01	VSVDGQDIRTINVRF	451-465	NBD 1
1770,97	SKSGHKPDNIKGNLEF	379-394	Linker/NBD 1
1891,00	LLDEATSALDTESEAVVQ	553-570	Walker B/D-loop
	IVSQEPILFDCSIAENI	1115-1131	Q-loop NBD 2

4.2.2.10.4 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ZALS I

2174,20	LLDEATSALDTESEAVVQVAL	553-573	Walker B/D-loop
2241,22	STEGLMPNTLEGNTVTFGEVVF	1022-1042	Linker/NBD 2
2261,11	LLDEATSALDTESEKVVQEAL	1198-1218	Walker B/D-loop
2267,23	GRENVTMDEIEKAVKEANAY	491-510	NBD 1
2349,10	DPTEGMVSVGQDIRTINVRF	445-465	NBD 1
2487,36	ILLLDEATSALDTESEKVVQEAL	1196-1218	Walker B/D-loop
2640,48	GDNSRVVSQEEIVRAAKEANIHF	1134-1157	NBD 2

Beachtet man die Farbkodierung der in der Tabelle zusammengefassten Peptidsignale und zugehörigen Aminosäuresequenzen wird deutlich, dass bis auf eine Ausnahme alle aufgeführten Peptidsignale und Aminosäuresequenzen bereits aus dem regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau ohne Detergens (in schwarz dargestellt) bzw. dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit 0,1 - 2 % AALS II (in blau abgebildet) bekannt sind. Demnach konnte durch den Zusatz von 0,1 % ZALS I lediglich ein einziges neues, bis dato unbekanntes Peptid (SYPSRKEVKIL) erzeugt werden (in rot dargestellt). Des weiteren fällt auf, dass die Anzahl der detektierten Peptidsignale und zugehörigen Aminosäuresequenzen im Vergleich zum bereits beschriebenen Verdau von P-gp mit Chymotrypsin unter Zusatz von AALS II verhältnismäßig niedrig ist. So konnten insgesamt lediglich 686 Aminosäuren = 54 % abgedeckt werden, was gegenüber dem regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp ohne Zusatz von Detergens (637 Aminosäuren = 50 %) einer Steigerung der Sequenzabdeckung um nur 49 Aminosäuren = 4 % entspricht. Dagegen konnte mit dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit 0,1 - 2 % AALS II eine Sequenzabdeckung von 920 Aminosäuren = 72 % erzielt werden, was einer Verbesserung der Sequenzabdeckung um 22 % gleichkommt.

Damit lässt sich abschließend zusammenfassen, dass die Kombination aus dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp und 0,1 - 2 % AALS II der Verbindung aus 0,1 % ZALS I und dem In-Lösung-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin deutlich überlegen ist, sowohl im Hinblick auf die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung, als auch hinsichtlich der abgedeckten transmembranären Regionen. Durch den Zusatz von 0,1 % ZALS I konnten lediglich die transmembranären Helices 1, 2, 4, 9 und 11 abgedeckt werden, mit der Zugabe von 0,1 - 2 % AALS II hingegen alle transmembranären Helices mit Ausnahme der TM 3.

Eine graphische Darstellung der durch den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in

4.2.2.10.4 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ZALS I

Kombination mit 0,1 % ZALS I erzielten Sequenzabdeckung von P-gp ist in der folgenden Abbildung 4.30 zu sehen. Sequenzbereiche, die im Rahmen des regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau abgedeckt werden konnten, sind in rot abgebildet. Sequenzabschnitte, welche durch den Zusatz von 0,1 % ZALS I zusätzlich abgedeckt werden konnten, sind in blau dargestellt. Die Sequenzabdeckung konnte durch den Zusatz von 0,1 % ZALS I lediglich um 49 Aminosäuren von 637 auf 686 Aminosäuren erhöht werden. Dies entspricht einer Verbesserung der Sequenzabdeckung um nur 4 % von 50 auf 54 %.

1	MDLEGDRNGG	AKKKNFFKLN	NKSEKDKKEK	KPTVSVFMSF	RYSNWLDKLY	
51	MVVGTLAAII	HGAGLPLMML	VFGEMTDIFA	NAGNLEDLMS	NITNRSNDIND	TM 1
101	TGFFMNLEED	MTRYAYYYSG	IGAGVLVAAY	IQVSWFCLAA	GRQIHKIRKQ	TM 2
151	FFHAIMRQEI	GWFDVHDVGE	LNTRLTDDVS	KINEGIGDKI	GMFFQSMATF	TM 3
201	FTGFIVGFTR	GWKLTIVILA	ISPVLGLSAA	VWAKILSSFT	DKELLAYAKA	TM 3 + 4
251	GAVAEVLAA	IRTVIAFGGQ	KKELERYNKN	LEEAKRIGIK	KAITANISIG	TM 5
301	AAFLLIYASY	ALAFWYGTTL	VLSGEYSIGQ	VLTVFFSVLI	GAFSVGQASP	TM 5 + 6
351	SIEAFANARG	AAYEIFKIID	NKPSIDSYSK	SGHKPDNIKG	NLEFRNVHFS	
401	YPSRKEVKIL	KGLNLKVQSG	QTVALVGNSG	CGKSTTVQLM	QRLYDPTEGM	
451	VSVDGQDIRT	INVRFLREII	GVVSQEPVLF	ATTIAENIRY	GRENVTMDEI	
501	EKAVKEANAY	DFIMKLPHKF	DTLVGERGAQ	LSGGQKORIA	IARALVRNPK	
551	ILLLDEATSA	LDTESEAVVQ	VALDKARKGR	TTIVIAHRLS	TVRNADVIAG	
601	FDDGVIVEKG	NHDELMKEKG	IYFKLVTMQT	AGNEVELENA	ADESKSEIDA	
651	LEMSSNDSRS	SLIRKRSTRR	SVRGSQAQDR	KLSTKEALDE	SIPPVSFWRI	
701	MKLNLTWPY	FVVGVFCAII	NGGLQPAFAI	IFSKIIGVFT	RIDDPETKRQ	TM 7
751	NSNLFSLFL	ALGIISFITF	FLQGFTFGKA	GEILTKRLRY	MVFRSMLRQD	TM 8
801	VSWFDDPKNT	TGALTTRLAN	DAAQVKGAIG	SRLAVITQNI	ANLGTGIIIS	TM 9
851	FIYGWQLTLL	LLAIVPIIAI	AGVEMKMLS	GQALKDKKEL	EGSGKIATEA	TM 9 + 10
901	IENFRTVVSL	TQEQKFEHMY	AQSLQVPYRN	SLRKAHIFGI	TFSFTQAMMY	TM 11
951	FSYAGCFRFG	AYLVAHKLMS	FEDVLLVFA	VVFGAMAVGQ	VSSFAPDYAK	TM 11 + 12
1001	AKISAAHIIM	IIKPTPLIDS	YSTEGLMPNT	LEGNVTFGEV	VFNYPTRPDI	
1051	PVLQGLSLEV	KKGQTLALVG	SSGCGKSTVV	QLLERFYDPL	AGKVLLDGKE	
1101	IKRLNVQWLR	AHLGIVSQEP	ILFDCSIAEN	IAYGDNRRVV	SQEEIVRAAK	
1151	EANIHFIES	LPNKYSTKVG	DKGTQLSGGQ	KQRIAIARAL	VRQPHILLLD	
1201	EATSALDTES	EKVVQEALDK	AREGRTCIVI	AHRLSTIQNA	DLIVVFQNGR	
1251	VKEHGTHQQL	LAQKGIYFSM	VSVQAGTKRQ			

Abb. 4.30: Graphische Darstellung der durch den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit 0,1 % ZALS I erzielten Sequenzabdeckung. Sequenzbereiche, welche durch den regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau abgedeckt werden konnten, sind in rot eingefärbt. Sequenzabschnitte, die durch den Zusatz von 0,1 % ZALS I zusätzlich abgedeckt werden konnten, sind in blau dargestellt und umfassen 49 Aminosäuren. Dies entspricht einer Erhöhung der Sequenzabdeckung um 4 % von 50 auf 54 %.

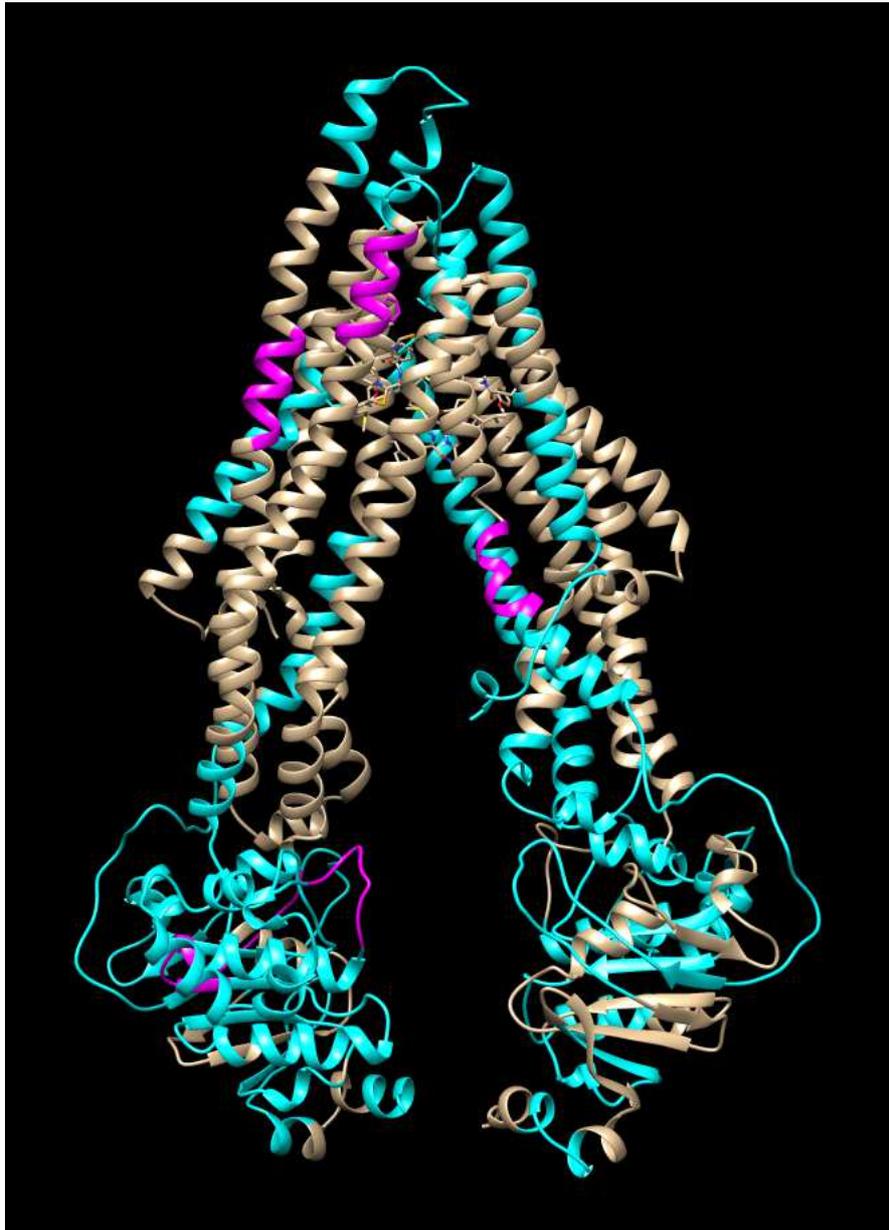


Abb. 4.31: Bildliche Darstellung der durch den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Zusatz von 0,1 % ZALS I erzielten Sequenzabdeckung. Bereiche, die durch den regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau ohne Detergens abgedeckt werden konnten, sind in türkis eingefärbt. Regionen, welche durch den Zusatz von ZALS I zusätzlich abgedeckt wurden, sind in pink dargestellt. In weiß abgebildet sind Sequenzen, die von der Sequenzabdeckung ausgespart blieben. Es wird deutlich, dass durch den ZALS-Zusatz nur eine geringfügige Verbesserung der Sequenzabdeckung erreicht werden konnte. So wurden die transmembranären Helices 1, 2, 4, 9 und 11 abgedeckt. Die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung beträgt 54 %, was einer Erhöhung um lediglich 4 % gleichkommt.

4.2.2.10.5 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit NALS II

Das nichtionische Detergens NALS II (Non-Ionic Acid Labile Surfactant) wurde in Analogie zu AALS II und ZALS I von der Firma Protea bezogen und als mit der Massenspektrometrie kompatible Alternative zu den nichtionischen Detergenzien Triton X-100 bzw. Tween 20 mit der Protease Chymotrypsin kombiniert. Das Tensid zeichnet sich durch eine sehr geringe CMC von 0,44 mM aus und wird üblicherweise in einem Konzentrationsbereich von 0,01 - 1 % eingesetzt [116].

Entsprechend Kapitel 3.2.2.10 wurden für den Verdau von P-gp mit Chymotrypsin unter Zusatz von NALS II vier verschiedene Detergens-Konzentrationen von 0,05 - 1 % final gewählt, mit dem Ziel, die am besten tolerierte und effizienteste Konzentration zu bestimmen und für die nachfolgenden Verdaus zu übernehmen. Hierfür wurde als Erstes eine 2 %ige Stammlösung von NALS II in einer Mischung aus 20 % Acetonitril in 100 mM Tris-HCl / 10 mM Calciumchlorid pH 7,8 hergestellt. Anschließend wurden pro Reaktionsansatz 5 µl aufgereinigtes P-gp (5,7 µg) in einem ausreichenden Volumen an Verdau-Puffer suspendiert, so dass sich für das Gesamtvolumen des Verdaus einschließlich Detergens und Enzymstammlösung 100 µl ergaben. Darauffolgend wurde die 2 %ige NALS II-Stammlösung mit der P-gp-Suspension derart verdünnt, dass finale Konzentrationen von 0,05 %; 0,1 %; 0,5 % und 1 % NALS II erhalten wurden. Durch Zugabe von jeweils 2,85 µl Chymotrypsin-Lösung ($c = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) entsprechend einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 wurde der Verdau dann gestartet und bei 25 °C für 30 Minuten bzw. 2,5 Stunden inkubiert. Die Inaktivierung des Verdaus erfolgte im Anschluss daran durch 10 minütiges Erhitzen auf 95 °C und nachfolgend wurde das NALS II durch Zugabe von final 1 % Trifluoressigsäure und 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur abgebaut. Die entstandenen Peptide wurden abschließend in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene eingedampft und nach erfolgter Aufbereitung für die Massenspektrometrie mittels ESI-MS analysiert.

Abweichend von den zuvor beschriebenen Chymotrypsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp in Kombination mit AALS II und ZALS I (siehe Unterkapitel 4.2.2.10.2 und 4.2.2.10.4) konnten im Falle des Chymotrypsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp in Verbindung mit NALS II wegen eines technischen Defekts des eingesetzten Massenspektrometers von den in der

Tabelle 4.29 zusammengefassten Peptidsignalen leider keine MS/MS-Spektren aufgenommen werden. Aus diesem Grund gibt es - bedingt durch das unspezifische Spaltungsverhalten des Chymotrypsins - in den meisten Fällen zu jedem aufgeführten Peptidsignal mehr als eine passende Aminosäuresequenz mit identischer Monoisotopischer Masse innerhalb von P-gp. Die Zuordnung der abgebildeten Aminosäuresequenzen zur jeweiligen Monoisotopischen Masse erfolgte hier unter Berücksichtigung der bevorzugten Schnittstellen von Chymotrypsin innerhalb der Aminosäuresequenz von P-gp (C-terminal von Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin) sowie unter Einhaltung einer Massentoleranz für die Abweichung zwischen theoretischer und experimentell bestimmter Monoisotopischer Masse von 300 ppm. Des weiteren wurde das Vorliegen von bestimmten Modifikationen, beispielsweise die Oxidation des Schwefels der Aminosäure Methionin zum Sulfoxid und die damit verbundene Massenzunahme berücksichtigt.

Tab. 4.29: Peptide aus dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit 0,05 - 1 % NALS II. Aufgeführt sind Peptide, welche durch den Zusatz von 0,05 - 1 % NALS II möglicherweise neu entstanden sind. Peptidsequenzen, die bereits durch den Zusatz von 0,1 - 2 % AALS II bzw. 0,1 % ZALS I abgedeckt werden konnten, sind in schwarz abgebildet. Neu detektierte Peptidsignale sind fett gedruckt und potenziell neu abgedeckte Aminosäuresequenzen außerhalb der TMDs in blau dargestellt. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Domänen sind in pink eingefärbt, wobei potenziell neu abgedeckte transmembranäre Aminosäuren fett gedruckt abgebildet sind.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
672,44	RNVHF	395-399	NBD 1
726,54	RFGAYL	958-963	ECL 6
750,54	VTFGEVV	1035-1041	NBD 2
795,62	HGAGLPLM (TM1)	61-68	TM1
	WLR AHL	1108-1113	NBD 2
	VIAHRLS	584-590	H-loop NBD 1
	VIAHRLS	1229-1235	H-loop NBD 2
798,68	LDKLYMox	46-51 + Ox.	N-Terminus
	YMoxVVGTL (TM1)	50-56 + Ox.	N-Terminus/TM1
821,62	FRTVVSL	904-910	ICL 4
	ASPSIEAF (TM6)	348-355	TM6/Linker
	VTMQTAGN	626-633	Linker
	EDLMSNI	86-92	ECL 1
822,60	AAIIHGAGL (TM1)	57-65	TM1
	TFGKAGEI (TM8)	776-783	TM8/ICL 3

4.2.2.10.5 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit NALS II

	VGFTRGW (TM3)	206-212	TM3/ECL 2
	SFEDVLL (TM12)	970-976	ECL 6/TM12
	GRENVTMox	491-497 + Ox.	NBD 1
824,60	SLRKAHI (TM11)	931-937	ICL 4/TM11
826,52	AQKGIYF	1262-1268	C-Terminus
836,60	YSGIGAGVL (TM2)	118-126	TM2
836,62	TKRLRY	785-790	ICL 3
	TRYAYY	112-117	ECL 1
	AYYYSGI (TM2)	115-121	ECL 1/TM2
839,58	VRNPKIL	546-552	Walker B NBD 1
850,60	MVSVDGQD	450-457	NBD 1
850,61	PLMMLVF (TM1)	66-72	TM1
	ESLPNKY	1159-1165	NBD 2
874,60	MVVGTLAAI (TM1)	51-59	N-Terminus/TM1
	SFITFFL (TM8)	766-772	TM8
	ISFITFF (TM8)	765-771	TM8
878,64	IAENIRY	484-490	NBD 1
	RQNSNLF	749-755	ECL 4
900,60	MKLPHKF	514-520	NBD 1
	VKGAIGSRL (TM9)	825-833	ICL 3/TM9
	GITFSFTQ (TM11)	939-946	TM11
	SFIYGWQ (TM9/10)	850-856	TM9/ECL 5/TM10
915,64	EEAKRIGI	282-289	ICL 2
	GIKKAITAN (TM5)	288-296	ICL 2/TM5
943,68	GWQLTLL (TM10)	854-861	ECL 5/TM10
	KRLNVQW	1102-1108	NBD 2
	AVITQNIAN (TM9)	834-842	TM9
	EEDMTRY	108-114	ECL 1
963,64	IESLPNKY	1158-1165	NBD 2
971,68	GAYLVAHKL	960-968	ECL 6
	SLRKAHIF (TM11)	931-938	ICL 4/TM11
972,68	ITFFLQGF (TM8)	768-775	TM8
	LLFLALGII (TM8)	757-765	TM8
1003,70	MFRYSNW	39-45	N-Terminus
	MoxVVGTLAAII (TM1)	51-60 + Ox.	N-Terminus/TM1
1053,74	SNLFSLLFL (TM8)	752-760	ECL 4/TM8
	GAMAVGQVSSF (TM12)	984-994	TM12
	AHRLSTVRN	586-594	H-loop NBD 1
	KFEHMYAQ	915-922	ICL 4
	AENIAYGDNS	1128-1137	NBD 2
1054,74	YMoxVVGTLAAI (TM1)	50-59 + Ox.	N-Terminus/TM1
	NSNLFSLLF (TM8)	751-759	ECL 4/TM8
	LRKAHIFGI (TM11)	932-940	ICL 4/TM11
1077,76	SGIGAGVLAAY (TM2)	119-130	TM2
	SVLIGAFSVGQ (TM6)	337-347	TM6
	TANISIGAAFLL (TM5)	294-304	TM5
1101,80	TQNIANLGTGI (TM9)	837-847	TM9
1118,82	TTGALTTRLAN	810-820	ICL 3
	GAYLVAHKLMox	960-969 + Ox.	ECL 6
	GITFSFTQAMox (TM11)	939-948 + Ox.	TM11
1133,80	STKVGDKGTQL	1166-1176	ABC NBD 2
1142,82	AGKVLLDGKEI	1091-1101	NBD 2

4.2.2.10.5 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit NALS II

1194,43	ALAFWYGTTL (TM5) FANAGNLEDLM RYSNWLDKL	311-320 79-87 41-49	TM5/ECL 3 ECL 1 N-Terminus
1196,74	KLMSFEDVLL (TM12) LGTGIIISFIY (TM9) NEGIGDKIGMoxF (TM3)	967-976 843-853 183-193 + Ox.	ECL 6/TM12 TM9 ICL 1/TM3
1207,84	AIIFSKIIIGVF (TM7) GGQKKELERY	729-739 268-277	TM7/ECL 4 ICL 2
1315,92	KDKKELEGAGKI	885-896	ICL 4
1352,12	ARGAAYEIFKII NSNLFLLFLAL (TM8) AKILSSFTDKEL (TM4)	358-369 751-762 233-244	Linker ECL 4/TM8 TM4/ICL 2
1367,84	PSRKEVKILKGL DVHDVGELNTRL IYASYALAFWY (TM5) FITFFLQGFTF (TM8)	402-413 164-175 306-316 767-777	NBD 1 ICL 1 TM5 TM8
1430,86	LLIYASYALAFW (TM5) FFQSMATFFTGF (TM3)	304-315 193-204	TM5 TM3
1524,08	VFRSMLRQDVSW TDIFANAGNLEDLM	792-803 76-89	ICL 3 ECL 1
1563,38	RIMKLNLEWPY DDPETKRQNSNLF GGQKKELERYNKN	699-710 743-755 268-280	Linker ECL 4 ICL 2
1573,00	SAVVFGAMoxAVGQVSSF (TM12) SIGAAFLLIYASYAL (TM5)	979-994 + Ox. 298-312	TM12 TM5
1580,04	RAHLGIVSQEPILF	1110-1123	Q-loop NBD 2
1621,02	DFIMoxKLPKFDL	511-523 + Ox.	NBD 1
1631,08	KKAITANISIGAAFL (TM5) YDPLAGKVLLDGKEI TEWPYFVGVFCAI (TM7) LVAHKLMoxSFEDVLL (TM12)	290-305 1087-1101 706-719 963-976 + Ox.	ICL 2/TM5 NBD 2 Linker/TM7 ECL 6/TM12
1633,98	LERFYDPLAGKVLL LLERFYDPLAGKVL LGIVSQEPILFDCSI	1083-1096 1082-1095 1113-1127	NBD 2 NBD 2 Q-loop NBD 2
1659,96	LAYAKAGAVAEVLAAL RNSLRKAHIFGITF (TM11)	245-261 929-942	ICL 2 ICL 4/TM11
1669,02	LKGLNLKVQSGQTVAL IHKIRKQFFHAIM YPTRPDIPVLQGLSL SLQVPYRNSLRKAH (TM11) PYFVGVFCAIINGGL (TM7)	410-425 144-156 1044-1058 923-936 709-724	NBD 1 ICL 1 A-loop NBD 2 ICL 4/TM11 Linker/TM7
1693,16	LRAHLGIVSQEPILF	1109-1123	Q-loop NBD 2
1719,10	VSVDGQDIRTINVRF	451-465	NBD 1
1737,10	EPVLFATTIAENIRY PNTLEGNVTFGEVVFN	476-490 1028-1043	NBD 1 Linker/NBD 2
1752,96	TFGKAGEILTKRLRY (TM8) VRNPKILLLDEATSAL	776-790 546-561	TM8/ICL 3 Walker B NBD 1
1771,00	SKSGHKPDNIKGNLEF	379-394	Linker/NBD 1
1782,21	AKAGAVAEVLAAIRTVI SLQVPYRNSLRKAHI (TM11) EIFKIIDNKPSIDSY GTGIIISFIYGWQLTL (TM9/10)	248-265 923-937 364-378 844-859	ICL 2 ICL 4/TM11 Linker TM9/ECL 5/TM10

4.2.2.10.5 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit NALS II

1783,22	NYPTRPDIPVLQGLSL	1043-1058	A-loop NBD 2
1787,22	VGFTRGWKLTLVILAI (TM3/4)	206-221	TM3/ECL 2/TM4
	LALGIISFITFFLQGF (TM8)	760-775	TM8
	FRFGAYLVAHKLMSF (TM11)	957-971	TM11/ECL 6
	TRIDDPETKRQNSNL	740-754	ECL 4
1909,12	KLPHKFDTLVGERGAQL	515-531	ABC NBD 1
1939,26	IYGWQLTLLLLAIVPII (TM9/10)	852-868	TM9/ECL 5/TM10
	LKGLNLKVQSGQTVALVGN	410-428	Walker A NBD 1
	VIAHRLSTVRNADVIAGF	584-601	H-loop NBD 1
	ATTIAENIRYGRENTM	481-497	NBD 1
	TDDVSKINEGIGDKIGMF (TM3)	176-193	ICL 1/TM 3
	FKLVTMoxQTAGNEVELEN	623-639 + Ox.	Linker
1981,18	AQSLQVPYRNSLRKAHI (TM11)	921-937	ICL 4
1985,22	ALKDKKELEGSGKIATEAI	883-901	ICL 4
	TKRLRYMVFRSMLRQ	785-799	ICL 3
	ASPSIEAFANARGAAYEIF (TM6)	348-366	TM6/Linker
	VFSMoxFRYSNWLDKLY	36-50 + Ox.	N-Terminus
2012,28	RTVVSLTQEQQFEHMoxY	905-920 + Ox.	ICL 4
2012,28	LQVPYRNSLRKAHIFGI (TM11)	924-940	ICL 4/TM11
	VSQEPILFDCSIAENIAY	1116-1133	Q-loop NBD 2
2013,21	DTLVGERGAQLSGGQKQRI	521-539	ABC NBD 1
	AMoxMYFSYAGCFRFGAYL (TM11)	947-963 + Ox.	TM11/ECL 6
	EQKFEHMoxYAQSLQVPY	913-928 + Ox.	ICL 4
2073,64	KQRIAIARALVRNPKILL	536-553	Walker B NBD 1
2095,30	MoxATFFFTGFIVGFTRGWKL (TM3)	197-214 + Ox.	TM3/ECL 2
	HGAGLPLMMLVFGEMTDIF (TM1)	61-79 + Ox.	TM1 /ECL 1
2163,34	GRVKEHGTHQQLLAQKGIY	1249-1267	C-Terminus
	VTFGEVFNYPTRPDIPVL	1035-1053	A-loop NBD 2
2212,30	RIMKLNLTWPYFVGVVF (TM7)	699-716	Linker/TM7
	LAQKGIYFSMVSQAGTKRQ	1261-1280	C-Terminus
	KLNLTEWPYFVGVVFCAII (TM7)	702-720	Linker/TM7
	AYYSYGIGAGVLVAAYIQVSF (TM2)	115-135	ECL 1/TM2
	FSVLIGAFSVGQASPSIEAFAN (TM6)	336-357	TM6/Linker
2213,38	SAAVWAKILSSFTDKELLAY (TM4)	228-247	TM4/ICL 2
	RYSNWLDKLYMVVGTAAI (TM1)	41-59	N-Terminus/TM1
	TEWPYFVGVVFCAIINGGLQ (TM7)	706-725	Linker/TM7
	YFSYAGCFRFGAYLVAHKL (TM11)	950-968	TM11/ECL 6
	ADVIAGFDDGVIVEKGNHDEL	595-615	NBD 1/Linker
2267,42	GRENVTMDEIEKAVKEANAY	491-510	NBD 1
2283,38	GRENVTMoxDEIEKAVKEANAY	491-510 + Ox.	NBD 1
2284,36	GDNSRVVSQEEIVRAAKEANI	1134-1154	NBD 2
	RQEIGWFDVHDVGELNTRL	157-175	ICL 1
2295,42	LFLALGIISFITFFLQGF (TM8)	758-777	TM8
	LGIVSQEPILFDCSIAENIAY	1113-1133	Q-loop NBD 2
2296,48	FVGVVFCAIINGGLQPAFAIIF (TM7)	711-732	TM7/ECL 4
	ATTIAENIRYGRENTMDEI	481-500	NBD 1
	AFIESLPNKYSTKVGDKGTQL	1156-1176	ABC NBD 2
	IVGFTRGWKLTLVILAI (TM3/4)	205-225	TM3/ECL 2/TM4
2422,54	GDNSRVVSQEEIVRAAKEANIH	1134-1155	NBD 2
2423,48	WCLAAGRQIHKIRKQFFHAI (TM2)	136-155	TM2/ICL 1
	NTRLTDDVSKINEGIGDKIGMF (TM3)	172-193	ICL 1/TM3
2431,40	DFIMoxKLPFKFDTLVGERGAQL	511-531 + Ox.	ABD NBD 1

4.2.2.10.5 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit NALS II

	MoxRQEIGWFDVHDVGEINTRL	156-175 + Ox.	ICL 1
	FSYAGCFRFGAYLVAHKLMoxSF (TM11)	951-971 + Ox.	TM11/ECL 6
2568,40	TTRLANDAAQVKGAIGSRLAVITQN (TM9)	815-839	ICL 3/TM9
	ASPSIEAFANARGAAYEIFKIIDN (TM6)	348-371	TM6/Linker
2583,65	STKVGDKGTQLSGGQKQRIAIARAL	1166-1190	ABC NBD 2
	VHFSYPSRKEVKILKGLNLKVQ	397-418	A-loop NBD 1
2640,67	GDNSRVVSQEEIVRAAKEANIHF	1134-1157	NBD 2
2640,67	LDKLYMVGTLAAIHGAGLPLMML (TM1)	46-70	N-Terminus/TM1
	RIAIARALVRQPHILLLDEATSAL	1183-1206	Walker B NBD 2
2666,53	NYPTRPDIPVLQGLSLEVKKGQTL	1043-1066	A-loop NBD 2
2693,41	QTAGNEVELENAADESKSEIDALEM	629-653	Linker
2693,41	SGCGKSTVVQLLERFYDPLAGKVLL	1072-1096	Walker A NBD 2
2711,44	VRNPKILLLDEATSALDTESEAVVQ	546-570	Walker B/D-loop
2712,52	FKLNNKSEKDKKEKKPTVSVFSM	17-39	N-Terminus
	KLNNKSEKDKKEKKPTVSVFSMF	18-40	N-Terminus
	TEWPYFVVGVFCAIINGGLQPAFAI (TM7)	706-730	Linker/TM7
2883,56	KFDTLVGERGAQLSGGQKQRIAIARAL	519-546	ABC NBD 1
	NKNLEEAKRIGIKKAITANISIGAAFL (TM5)	278-304	ICL 2/TM5
	FHAIMRQEIGWFDVHDVGEINTRL	152-175	ICL 1
	DSYSTEGLMPNTLEGNTFGEVFN	1019-1044	A-loop NBD 2
	FQSMoxATFFTGFIVGFRGWKLTIVI (TM3)	194-218 +Ox.	TM3
2925,60	PPVSFWRIMKLNLEWVYFVVGVF (TM7)	693-716	Linker/TM7
	LQVPYRNSLRKAHIFGITFSFTQAM (TM11)	924-948	ICL 4/TM11
	QRLYDPTEGMoxVSVVDGQDIRTINVR	441-465 + Ox.	NBD 1
3013,64	AKAKISAAHIIMIEKTPLIDSYSTEGL	999-1026	Linker/NBD 2
	GGQKKELERYNKNLEEAKRIGIKKAI	268-293	ICL 2
	AENIRYGRENVTMDEIEKAVKEANAY	485-510	NBD 1
3415,84	ATTIAENIRYGRENVTMDEIEKAVKEANAY	481-510 + Ox.	NBD 1
	KGNLNKVQSGQTVALVNGSGCGKSTTVQLMQRL	411-443	Walker A NBD 1
	LSGQALKDKKELEGAGKIAEAIENFRVVSL	879-910	ICL 4
3459,80	VIAHRLSTVRNADVIAGFDDGIVEKGNHDEL	584-615	H-loop NBD 1
	APDYAKAKISAAHIIMIEKTPLIDSYSTEGL	995-1026	Linker/NBD 2
	RQDVSWFDDPKNTTGALTTRLANDAAQVKGAI	798-829	ICL 3
	DDPETKRQNSNLFSLFLALGIISFITFFL (TM8)	743-772	ECL 4/TM8
3584,95	GDNSRVVSQEEIVRAAKEANIHFIESLPNKY	1134-1165	NBD 2
3585,96	NVQWLRHLGIVSQEPILFDCSIAENIAYGDN	1105-1136	Q-loop NBD 2
	SGCGKSTTVQLMQRLYDPTEGMVSVVDGQDIRTI	429-461	Walker A NBD 1
	AKAKISAAHIIMIEKTPLIDSYSTEGLMoxPNTL	999-1031 + Ox.	Linker/NBD 2
	EHMoxYAQSLQVPYRNSLRKAHIFGITFSFTQ (TM11)	917-946 + Ox.	ICL 4/TM11
4038,10	EEDMoxTRYAYYSYGIGAGVLVAAYIQVSWCLAAGRQ (TM2)	108-143 + Ox.	ECL 1/TM2/ICL 1

Die Tabelle reflektiert demnach nur die durch den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Verbindung mit 0,05 - 1 % NALS II maximal erreichbare Sequenzabdeckung und es ist anzunehmen, dass die in der Praxis tatsächlich erzielte Sequenzabdeckung von P-gp wie bereits zuvor beschrieben (siehe Unterkapitel 4.2.2.10.1 und 4.2.2.10.3) wesentlich niedriger ausgefallen ist.

Die Versuche zur Ermittlung der optimalen NALS II-Konzentration ergaben, dass mit der höchsten eingesetzten Konzentration von final 1 % NALS II die größte Anzahl von Peptidsignalen erzeugt und damit voraussichtlich die beste Sequenzabdeckung erzielt werden konnte. Beachtet man die Farbkodierung der Tabelle wird deutlich, dass ein großer Teil der aufgeführten Peptidsequenzen bereits durch die vorherigen Chymotrypsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp in Kombination mit AALS II und ZALS I abgedeckt werden konnte (in schwarz dargestellt). Die in blau eingefärbten Aminosäuren könnten durch den Zusatz von NALS II darüber hinaus abgedeckt worden sein. Geht man aufgrund der unspezifischen Spaltung des Chymotrypsins von zwei Aminosäuresequenzen pro Peptidsignal aus und gibt Sequenzabschnitten in den NBDs, Loop- und Linker-Regionen den Vorzug vor Peptidsequenzen innerhalb der TMDs, ergäbe sich als „Maximum“ eine Sequenzabdeckung von insgesamt 1089 Aminosäuren = 85 % unter Einschluss größerer Teile der transmembranären Helices 2, 3 und 8. Dies entspräche verglichen mit dem regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau ohne Zusatz von Detergens einer maximalen Verbesserung um 35 % und gegenüber dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit AALS II einer maximalen Erhöhung um 13 %. Unter Berücksichtigung von nur einer Aminosäuresequenz pro Peptidsignal ergäbe sich ein „Minimum“ der Sequenzabdeckung von 1053 Aminosäuren = 82 % unter Einschluss derselben transmembranären Helices und damit ein vergleichbares Ergebnis, was höchstwahrscheinlich durch den hohen Grad an überlappenden Peptiden bzw. Aminosäuren begründet ist. Demnach beliefe sich die minimale Verbesserung der Sequenzabdeckung im Vergleich zum regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau ohne Zusatz von Detergens auf 32 % und gegenüber dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit AALS II auf 10 %. Der in Wahrheit erzielte Wert für die Sequenzabdeckung befindet sich voraussichtlich im Bereich zwischen Minimum und Maximum.

Somit lässt sich abschließend das Fazit ziehen, dass die Kombination aus 0,05 - 1 % NALS II und dem In-Lösung-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin sowohl dem separaten Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau ohne Zusatz von Detergens als auch den In-Lösung-Verdaus von P-gp mit Chymotrypsin unter Zusatz von AALS II und ZALS I sichtlich überlegen zu sein scheint. Bedauerlicherweise konnte das Ausmaß dieser Überlegenheit aufgrund technischer Probleme des verwendeten Massenspektrometers, welche die

Aufnahme bzw. Auswertung von MS/MS-Spektren unmöglich machten, nicht näher bestimmt werden. Eine plausible Erklärung für die potenziell deutlich verbesserte Sequenzabdeckung könnte im Falle der höchsten eingesetzten NALS II-Konzentration der Anteil von 10 % Acetonitril im Verdau-Puffer sein. Durch das organische Lösungsmittel werden hydrophobe Peptide besser solubilisiert und neigen damit im wässrigen Verdau-Puffer nicht mehr so stark zur Präzipitation bzw. zur Adhäsion an die Wände der verwendeten Probengefäße.

4.2.2.10.6 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®

Als vierter und letzter Vertreter der säurelabilen massenkompatiblen Detergenzien wurde das anionische ProteaseMAX® der Firma Promega hinsichtlich seines Einflusses auf die transmembranäre Sequenzabdeckung von P-gp untersucht. ProteaseMAX® ist chemisch gesehen ein hydrophobes anionisches Sulfonat mit einem Molekulargewicht von 425 Dalton und kann durch Zusatz von final 0,5 % Trifluoressigsäure innerhalb von 15 min bei 37 °C bzw. 5 minütiges Erhitzen auf 95 °C bei neutralem pH-Wert gespalten werden. Als Abbauprodukte entstehen eine hydrophile zwitterionische Verbindung mit einer Molekülmasse von 139 Dalton, eine neutrale hydrophobe Struktur mit einem Molekulargewicht von 238 Dalton und Ameisensäure, welche allesamt nicht mit der Massenspektrometrie interferieren [117].

Für den In-Lösung-Verdau von Membranproteinen mit Trypsin wird laut Produktinformation eine finale Konzentration von 0,05 % ProteaseMAX® empfohlen [117]. Diese ProteaseMAX®-Konzentration wurde für den Verdau von P-gp mit Trypsin, Chymotrypsin und Elastase übernommen.

Der Verdau von P-gp mit den drei Enzymen erfolgte in Anlehnung an das Standardprotokoll in der Produktinformation von ProteaseMAX® [117]. Zuerst wurde eine 1 %ige Stammlösung von ProteaseMAX® in frisch zubereitetem 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 8 hergestellt und auf Eis gelagert. Aus dieser 1 %igen Stammlösung wurden daraufhin durch Verdünnung im Verhältnis 1 : 5 mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer 100 µl einer 0,2 %igen ProteaseMAX®-Lösung

4.2.2.10.6 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®

hergestellt und ebenfalls auf Eis aufbewahrt. Im Anschluss daran wurden pro Reaktionsansatz 5 µl aufgereinigtes P-gp (5,7 µg) in 20 µl 0,2 %iger ProteaseMAX®-Lösung unter Vortexen solubilisiert. Darauf folgend wurden 71,15 µl des jeweiligen Verdau-Puffers hinzugefügt (50 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 8 für Trypsin; 100 mM Tris-HCl / 10 mM Calciumchlorid pH 7,8 für Chymotrypsin; 50 mM Tris-HCl pH 9 für Elastase). Vor Zugabe der jeweiligen Enzym-Lösung wurde allen drei Reaktionsansätzen noch 1 µl 1 %ige ProteaseMAX®-Stammlösung hinzugefügt und gut durchmischt. Damit betrug die finale Gesamtkonzentration an ProteaseMAX® bei einem Endvolumen von 100 µl pro Verdau 0,05 %. In der Folge wurden die jeweiligen Enzym-Lösungen wie in Tabelle 3.17 beschrieben hergestellt und entsprechend einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 dem Reaktionsansatz zugegeben. Der Verdau von P-gp erfolgte anschließend beim jeweiligen Temperatur-Optimum des Enzyms (37 °C oder 25 °C) für 3 Stunden unter Schütteln. Danach wurde der Verdau durch 10 minütiges Erhitzen bei 95 °C gestoppt, gefolgt vom Abbau des ProteaseMAX® durch Zugabe von 0,5 % Trifluoressigsäure und 15 minütige Inkubation bei 37 °C. Abschließend wurden die erhaltenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und nach erfolgter Aufbereitung für die Massenspektrometrie mittels ESI-MS analysiert.

In der nachfolgenden Tabelle 4.30 sind die durch den Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit 0,05 % ProteaseMAX® - verglichen mit dem regulären Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp ohne Detergens - möglicherweise neu entstandenen Peptide zusammengefasst.

Die Zuordnung der in der Tabelle aufgeführten Aminosäuresequenzen zu den entsprechenden neu detektierten Peptidsignalen erfolgte in Analogie zu den bereits beschriebenen In-Lösung-Verdau von P-gp mit Trypsin unter Zusatz von AALS II und ZALS I (siehe Unterkapitel 4.2.2.10.1 und 4.2.2.10.3).

Bedingt dadurch, dass aufgrund technischer Probleme des verwendeten Massenspektrometers wiederum keine MS/MS-Spektren aufgenommen werden konnten und es in den meisten Fällen mehr als eine passende Peptidsequenz zur jeweils betrachteten Monoisotopischen Masse gibt, spiegelt die Tabelle lediglich die durch den Trypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit 0,05 % ProteaseMAX® maximal erreichbare Sequenzabdeckung wieder und die in der Praxis tatsächlich erzielte Sequenzabdeckung von P-gp fällt aus den bereits genannten Gründen (siehe Unterkapitel 4.2.2.10.1 und

4.2.2.10.3) voraussichtlich um einiges niedriger aus.

Tab. 4.30: Peptide aus dem Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Zusatz von 0,05 % ProteaseMAX®. Aufgeführt sind Peptide, welche durch den Zusatz von 0,05 % ProteaseMAX® möglicherweise neu gebildet worden sind. Bereits durch den regulären Trypsin-In-Lösung-Verdau abgedeckte Sequenzen sind in schwarz abgebildet. Durch den Zusatz von ProteaseMAX® möglicherweise neu abgedeckte Aminosäuren sind in blau eingefärbt. Aminosäuren innerhalb der transmembranären Domänen sind in pink dargestellt, wobei potenziell neu abgedeckte transmembranäre Aminosäuren fett gedruckt abgebildet sind.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
851,41	MoxDLEGDR	1-7 + Ox.	N-Terminus
936,60	FDTLVGER	520-527	NBD 1
982,60	IAIARALVR	1184-1192	NBD 2
	IAIARALVR	539-547	NBD 1
1320,64	VFTRIDDPETK	738-748	ECL 4
	TFGKAGEILTKR (TM8)	776-787	TM8/ICL 3
1341,76	GKAGEILTKRLR (TM8)	778-789	TM8/ICL 3
	IGIKKAITANISI (TM5)	287-299	ICL 2/TM5
	LYDPTEGMoxVSVD	443-454 + Ox.	NBD 1
1374,76	ILLLDEATSALDT	551-563	Walker B/D-loop
	IIGVFTRIDDP	735-746	ECL 4
	ESEKVVQEALDK	1209-1220	NBD 2
	AITANISIGAAFLL (TM5)	292-305	ICL 2/TM5
	RYMVFRSMoxLR	789-798 + Ox.	ICL 3
	RLRYMVFRSMox	787-796 + Ox.	ICL 3
1396,76	YAYYSYGIGAGVL (TM2)	114-126	ECL 1/TM2
	KEKKPTVSVFSMox	28-39 + Ox.	N-Terminus
1682,86	AFAIIFSKIIGVFTR (TM7)	727-741	TM7/ECL 4
	GNSGCGKSTTVQLMoxQR	427-442 + Ox.	Walker A NBD 1
1683,84	KEKKPTVSVFSMFR	28-41	N-Terminus
	GTQLSGGQKQRIAIAR	1173-1188	ABC-Motiv NBD 2
1703,90	LDTESEKVVQEALDK	1206-1220	D-loop NBD 2
	IRKQFFHAIMRQE	147-159	ICL 1
	NVHFSYPSRKEVKI	396-409	A-loop NBD 1
1732,99	KVQSGQTVALVGNCGK	416-433	Walker A NBD 1
	LSTKEALDESIPPVSF	682-697	Linker
	ANAGNLEDLMSNITNR	80-95	ECL 1
1752,86	ALVRNPKILLLDEATS	544-559	Walker B NBD 1
	KKKNFFKLNNKSEK	12-25	N-Terminus
	IMKLNLTWPYFVV (TM7)	700-713	Linker/TM7
	ISFITFFLQGFTFGK (TM8)	765-779	TM8
1855,12	EVKILKGLNLKVQSGQT	406-422	NBD 1
	QRIAIARALVRQPHIL	1182-1197	Walker B NBD 2
	STTVQLMoxQRLYDPTEG	434-449 + Ox.	Walker A NBD 1
1877,08	IDDPETKRQNSNLFSL (TM8)	742-757	ECL 4/TM8

4.2.2.10.6 Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®

2135,10	SDINDTGFFMNLEEDMTR LTLVILAISPVGLLSAAVWAK (TM4)	96-113 214-234	ECL 1 TM4
2192,20	IKGNLEFRNVHFSYPSRK IIFSKIIGVFTRIDDPETK (TM7)	388-405 730-748	A-loop NBD 1 TM7/ECL 4
2247,34	GRTTIVIAHRLSTVRNADVI TKEALDESIPPVSVFRIMK	579-598 684-702	H-loop NBD 1 Linker
2914,51	IAIAGVEMKMLSGQALKDKKELEGAGK (TM 10) ELERYNKNLEEAKRIGIKKAITANI (TM5) SLIRKRSTRRSVRSQAQDRKLSTK	868-895 273-297 661-685	TM10/ICL 4 ICL 2/TM5 Linker
2931,55	STVVQLLERFYDPLAGKVLLDGKEIK	1077-1102	Walker A NBD 2
3108,46	ELESGKIATEAIENFRTVVSLTQEQKF DLEGDRNGGAKKKNFFKLNNKSEKDKK	889-916 2-28	ICL 4 N-Terminus
3112,48	LTDDVSKINEGIGDKIGMFFQSMATFFT (TM3) STRRSVRSQAQDRKLSTKEALDESIPP	175-202 667-694	ICL 1/TM3 Linker
3171,73	QVFSWCLAAGRQIHKIRKQFFHAIMR (TM2) RSTRRSVRSQAQDRKLSTKEALDESIP ISAAHIIMIEKTPLIDSYSTEGLMPNTL SVLIGAFSVGQASPSIEAFANARGAAYEIFK (TM6) ELERYNKNLEEAKRIGIKKAITANISIG (TM5)	132-157 666-693 1003-1031 337-367 273-300	TM2/ICL 1 Linker Linker/NBD 2 TM6/Linker ICL 2/TM5

Wird pro beobachtetem Peptidsignal nur eine mögliche Aminosäuresequenz berücksichtigt und darüber hinaus Peptidsequenzen in den Nukleotidbindungsdomänen, Loop- und Linker-Regionen jeweils Priorität vor Peptiden innerhalb der transmembranären Domänen eingeräumt, ergäbe sich eine wesentlich realistischere Sequenzabdeckung von 64,4 %. Dies entspräche im Vergleich zum regulären Trypsin-In-Lösung-Verdau ohne Detergens einer Erhöhung um 3,4 % (= 43 Aminosäuren) und läge damit in derselben Größenordnung wie die mit Hilfe der Hitzedenaturierung erzielte Verbesserung der Sequenzabdeckung (4 %).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Kombination aus ProteaseMAX® und Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp gegenüber dem separaten In-Lösung-Verdau von P-gp mit Trypsin ohne Zusatz von Detergens einen kleinen Vorteil zu haben scheint, auch wenn das Ausmaß der Verbesserung aufgrund des Fehlens von MS/MS-Daten leider nicht näher bestimmt werden konnte.

Verglichen mit den Trypsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp in Kombination mit AALS II bzw. ZALS I wurden deutlich weniger neue Peptidsignale und dazu passende Aminosäuresequenzen innerhalb von P-gp detektiert, so dass folglich auch die maximal erreichbare Sequenzabdeckung von 81 % im Vergleich zu AALS II um 9 % und gegenüber ZALS I um 7 % geringer ausfällt.

4.2.2.10.7 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®

Der Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Zusatz von 0,05 % ProteaseMAX® wurde analog dem bereits beschriebenen Trypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit ProteaseMAX® (siehe Unterkapitel 4.2.2.10.6) durchgeführt. Die einzigen Unterschiede bestanden im verwendeten Puffer (100 mM Tris-HCl / 10 mM Calciumchlorid pH 7,8) und in der Temperatur (25 °C).

Aufgrund der zu erwartenden Komplexität des Übersichtsspektrums - bedingt durch die unspezifische Spaltung von Peptidbindungen C-terminal von Glutamin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Serin, Tryptophan und Tyrosin - wurden die im Zuge des Verdau von P-gp mit Chymotrypsin unter Zusatz von 0,05 % ProteaseMAX® entstandenen Peptide nach Bindung an eine RP-C18 Säule und Entsalzung entsprechend ihrer Lipophilie mit zunehmendem Methanolanteil im Fließmittel in drei Fraktionen eluiert. Die erste Fraktion wies einen Methanolgehalt von 20 % auf und enthält voraussichtlich überwiegend kleine und hydrophile Peptide. Mit einem Methanolanteil von 40 % überwiegen in der zweiten Fraktion vermutlich die mittelgroßen, stärker hydrophoben Peptide und in der dritten Fraktion mit einem Gehalt von 60 % Methanol sind hauptsächlich die großen bzw. stark hydrophoben Peptide zu erwarten.

Die Zuordnung der in der nachfolgenden Tabelle 4.31 abgebildeten Aminosäuresequenzen zu den jeweils detektierten Peptidsignalen erfolgte in Analogie zum zuvor beschriebenen Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit NALS II (siehe Unterkapitel 4.2.2.10.5).

Bedingt durch die Tatsache, dass wegen technischer Defekte des eingesetzten Massenspektrometers wiederum keine MS/MS-Daten erhoben werden konnten, gibt die Tabelle lediglich die durch den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Verbindung mit 0,05 % ProteaseMAX® und Elution mit 20 % Methanol maximal erreichbare Sequenzabdeckung von P-gp wieder. Aus den bereits genannten Gründen (siehe Unterkapitel 4.2.2.10.5) ist jedoch davon auszugehen, dass die im Zuge des Verdau tatsächlich erzielte Sequenzabdeckung von P-gp um einiges geringer ist.

Geht man in Anbetracht des unspezifischen Spaltungsverhaltens des Chymotrypsins von höchstens zwei Aminosäuresequenzen pro Peptidsignal aus und gibt Peptiden in den

4.2.2.10.7 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®

Nukleotidbindungsdomänen, Loop- und Linker-Regionen jeweils den Vorzug vor Sequenzen in den transmembranären Domänen, würde eine der Realität näher kommende „maximale“ Sequenzabdeckung von 87 % erhalten werden. Dies käme verglichen mit dem regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau ohne Detergens einer höchstmöglichen Verbesserung um 37 % und gegenüber der Kombination aus AALS II und dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau einer maximalen Erhöhung um 15 % unter Einschluss größerer Teile der transmembranären Helices 3, 6, 7, 8, 10, 11 und 12 gleich. Zählt man dagegen nur eine Aminosäuresequenz pro Peptidsignal, erhielte man eine „minimale“ Sequenzabdeckung von 79 % (= 1009 Aminosäuren), wobei sich der Anteil der abgedeckten transmembranären Helices auf die TMs 3, 6, 7 und 12 reduzieren würde. Dieser Wert entspräche im Vergleich zum regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau ohne Detergens einer minimalen Verbesserung um 29 % und gegenüber dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau unter Zusatz von AALS II einer minimalen Erhöhung der Sequenzabdeckung um 7 %.

Tab. 4.31: Peptide aus der 20 % Methanol-Fraktion des Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit 0,05 % ProteaseMAX®. Aufgeführt sind Peptide, welche durch den Zusatz von 0,05 % ProteaseMAX® möglicherweise neu entstanden sind. Peptidsequenzen, die bereits durch den Zusatz von 0,1 - 2 % AALS II bzw. 0,1 % ZALS I abgedeckt werden konnten, sind in schwarz abgebildet. Potenziell neu abgedeckte Aminosäuresequenzen außerhalb der TMDs sind in blau dargestellt. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Domänen sind in pink eingefärbt, wobei potenziell neu abgedeckte transmembranäre Aminosäuren fett gedruckt abgebildet sind.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
676,48	MRQEI	156-160	ICL 1
	RIMoxKL	699-703 + Ox.	Linker
875,52	SNWLDKL	43-49	N-Terminus
883,44	DVHDVGEL	164-171	ICL 1
	MVFRSML	791-797	ICL 3
905,50	AQSLQVPY	921-928	ICL 4
949,54	LTKRLRY	784-790	ICL 3
952,50	TDKELLAY	240-247	ICL 2
	WYGTTLVL (TM5)	315-322	TM5/ECL 3
975,54	YDPLAGKVL	1087-1095	NBD 2
	NYPTRPDI	1043-1050	A-loop NBD 2
	VRQP HILL	1191-1198	Walker B NBD 2
990,52	DESIPPVSF	689-697	Linker
	EPVLFATTI	476-484	NBD 1

4.2.2.10.7 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®

997,50	ARGAAYEIF	358-366	Linker
	HAIMRQEI	153-160	ICL 1
	DVHVDGELN	164-172	ICL 1
	VAAYIQVFS (TM2)	127-135	TM2
	GEMTDIFAN	73-81	ECL 1
	AIARALVRQ	1185-1193	NBD 2
	QLTLLLLAI (TM10)	856-864	TM10
1002,54	SFITFFLQ (TM8)	766-773	TM8
	DSYSTEGLM	1019-1027	Linker/NBD 2
1030,58	KVQSGQTVAl	416-425	NBD 1
	FDVHVDGEL	163-171	ICL 1
1043,56	VFSAVVFGAMox (TM12)	977-986 + Ox.	TM12
1062,20	STEGLMPNTL	1022-1031	Linker/NBD 2
	KLVTMQTAGN	624-633	Linker
1065,56	EKTPLIDSY	1013-1021	Linker/NBD 2
	SSNDSRSSLI	654-663	Linker
	VRNPKILLL	546-554	Walker B NBD 1
	TLLLLAIVPI (TM10)	858-867	TM10
1130,62	RLSTIQNADL	1233-1242	NBD 2
1133,62	STKVGDKGTQL	1166-1176	ABC-Motiv NBD 2
	GGLQPAFAIIF (TM7)	722-732	TM7/ECL 4
	DIRTINVRF	457-465	NBD 1
	SKIIGVFTRI	733-742	ECL 4
1170,50	NLEEDMTRY	106-114	ECL 1
1171,56	VEKGNHDELM	607-616	NBD 1/Linker
	RSDINDTGFF	95-104	ECL 1
	LVFGEMTDIF (TM1)	70-79	TM1/ECL 1
	GSRLAVITQNI (TM9)	830-840	ICL 3/TM9
	KGNLNKVQSGQ	411-421	NBD 1
1178,58	FDDPKNTTGAL	804-814	ICL 3
	IEKTPLIDSY	1012-1021	Linker
1185,62	LDGKEIKRLN	1096-1105	NBD 2
	GKAGEILTKRL (TM8)	778-788	TM8/ICL 3
	SNWLDKLYMox	43-51 + Ox.	N-Terminus
1211,76	VPIIAIAGVVEM (TM10)	865-876	TM10/ICL 4
	SGCGKSTTVQLM	429-440	Walker A NBD 1
1215,58	LGIVSQEPILF	1113-1123	Q-loop NBD 2
	MoxYAQSLQVPY	919-928 + Ox.	ICL 4
	MSFEDVLLVF (TM12)	969-978	ECL 6/TM12
1225,60	DELMKEKGIY	613-622	NBD 1/Linker
	FKLVTMoxQTAGN	623-633 + Ox.	Linker
1257,70	NLKVQSGQTVAl	414-425	NBD 1
1264,64	MSNITNRS DIN	89-99	ECL 1
	VLSGEYSIGQVL (TM6)	321-332	ECL 3/TM6
1336,64	GAYLV AHKLMSF	960-971	ECL 6
1340,62	TQE QKFEHMY	911-920	ICL 4
	EEDMTRYAYY	108-117	ECL 1
1402,68	YGTTLVLSGEYSI (TM5/6)	316-328	TM5/ECL 3/TM6
1412,74	NYPTRPDIPVLQ	1043-1054	A-loop NBD 2
	LDGKEIKRLNVQ	1096-1107	NBD 2
	VLTVFFSVLIGAF (TM6)	331-343	TM6
	VQSMoxATFFTGFI (TM3)	194-205 + Ox.	TM3

4.2.2.10.7 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®

1418,70	GITFSFTQAMoxMY (TM11) KIRKOFFHAIM	939-950 + Ox. 146-156	TM11 ICL 1
1448,66	QAMMYFSYAGCF (TM11) FMNLEEDMTRY	946-957 104-114	TM11 ECL 1
1459,68	YGTTLVLSGEYSIG (TM5/6) GEYSIGQVLTVFF (TM6)	316-329 324-336	TM5/ECL 3/TM6 TM6
1484,72	FEDVLLVFSAVVF (TM12) MVFRSMoxLRQDVS VSVQAGTKRQHHH	971-983 791-802 + Ox. 1271-1283	ECL 6/TM12 ICL 3 C-Terminus
1506,67	GEVVFNYPTRPDI LDKLYMVGTLAAI (TM1) DKLYMVGTLAAII (TM1)	1038-1050 46-59 47-60	A-loop NBD 2 N-Terminus/TM1 N-Terminus/TM1
1509,72	HDELMKEKGIYF AYDFIMKLPHKF	612-623 509-520	NBD 1/Linker NBD 1
1532,66	KLVTMQTAGNEVEL SVLIGAFSVGQASPSI (TM6)	624-637 337-352	Linker TM6/Linker
1534,70	FHAIMRQEIGWF	152-163	ICL 1
1553,69	SNITNRSDINDTGF FSLLFLALGIIFSI (TM8)	90-103 755-768	ECL 1 ECL 4/TM8
1557,72	VGVFCAIINGGLQPA (TM7)	712-727	TM7
1873,96	LEEDMTRYAYYSIGI (TM2)	107-121	ECL 1/TM2
2166,04	SMATFFTGFIVGFTRGWKL (TM3/4)	196-214	TM3/ECL 2/TM4

Die nachfolgend abgebildete Tabelle 4.32 zeigt die durch den Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit 0,05 % ProteaseMAX® möglicherweise neu gebildeten und in der 40 % Methanol-Fraktion gefundenen P-gp-Peptide. Es wird deutlich, dass aufgrund des höheren Methanolanteils im Vergleich zur 20 % Methanol-Fraktion insgesamt 24 neue Peptidsignale mit überwiegend hohen Monoisotopischen Massen detektiert werden konnten.

Da auf die Erhebung von MS/MS-Daten aus den bereits genannten Gründen ebenfalls verzichtet werden musste, gibt es zu den in der Tabelle aufgeführten Peptidsignalen in den meisten Fällen wiederum mehrere passende Aminosäuresequenzen mit identischer Monoisotopischer Masse innerhalb von P-gp, weshalb die Anzahl der zugeordneten Aminosäuresequenzen diejenige der beobachteten Peptidsignale übersteigt. Die Auswertung zahlreicher MS/MS-Spektren hat jedoch gezeigt, dass in der Regel nur ein bis zwei aller theoretisch möglichen Aminosäuresequenzen pro Peptidsignal in den MS/MS-Spektren nachgewiesen werden konnten. Unter Beachtung dieses Erfahrungswerts und Berücksichtigung von Überlappungen mit Aminosäuresequenzen aus der 20 % Methanol-Fraktion sowie Priorisierung von Peptidsequenzen außerhalb der transmembranären

Domänen würde als „Maximum“ eine Abdeckung von weiteren 76 Aminosäuren (= 6 %) und als „Minimum“ eine Abdeckung von 29 zusätzlichen Aminosäuren (= 2 %) resultieren. Die angenommene „maximale“ additive Sequenzabdeckung der beiden Fraktionen beliefe sich demnach auf 93 % unter Einschluss größerer Bereiche aller transmembranären Helices mit Ausnahme der TMs 4 und 5, die postulierte „minimale“ additive Sequenzabdeckung auf 81 % unter sichtlicher Verringerung des Ausmaßes an abgedeckten transmembranären Bereichen.

Tab. 4.32: Peptide aus der 40 % Methanol-Fraktion des Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Zusatz von 0,05 % ProteaseMAX®. Aufgeführt sind Peptide, welche durch den Zusatz von 0,05 % ProteaseMAX® möglicherweise neu entstanden sind und nicht bereits in der 20 % Methanol-Fraktion (Tab. 4.36) gefunden wurden. Peptidsequenzen, die bereits durch den Zusatz von 0,1 - 2 % AALS II bzw. 0,1 % ZALS I abgedeckt werden konnten, sind in schwarz abgebildet. Potenziell neu abgedeckte Aminosäuresequenzen außerhalb der TMDs sind in blau dargestellt. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Domänen sind in pink eingefärbt, wobei potenziell neu abgedeckte transmembranäre Aminosäuren fett gedruckt abgebildet sind.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
1260,64	DTESEAVVQVAL	562-573	D-loop NBD 1
	GDKIGMFFQSM (TM3)	187-197	ICL 1/TM3
	MYFSYAGCFRF (TM11)	950-959	TM11/ECL 6
1284,68	NYPTRPDIPVL	1043-1053	A-loop NBD 2
	AIINGGLQPAFAI (TM7)	718-730	TM7
	LKGLNLKVQSGQ	410-421	NBD 1
1329,68	LSGQALKDKKEL	879-890	ICL 4
	GMFFQSMoxATFF (TM3)	191-201 + Ox.	TM3
1352,68	GAYLVAHKLMoxSF	960-971 + Ox.	ECL 6
	GEMTDIFANAGNL	73-85	ECL 1
	ITNRSDINDTGF	92-103	ECL 1
1373,70	TFSFTQAMMYF (TM11)	941-951	TM11
1448,68	FMNLEEDMTRY	104-114	ECL 1
	DTGFFMNLEEDM	100-111	ECL 1
1481,72	VGNSGCGKSTTVQLM	426-440	Walker A NBD 1
	YSGIGAGVLVAAYIQ (TM2)	118-132	TM2
	TGFIVGFTRGWKL (TM3)	202-214	TM3/ECL 2
	EHMoxYAQSLQVPY	917-928 + Ox.	ICL 4
1506,72	GEVVFNYPTRPDI	1038-1050	A-loop NBD 2
	LDKLYM^VVGTLAAI (TM1)	46-59	N-Terminus/TM1
	DKLYM^VVGTLAAII (TM1)	47-60	N-Terminus/TM1
1535,74	MNLEEDMTRYAY	105-116	ECL 1
	IMIIEKTPLIDSY	1009-1021	Linker

4.2.2.10.7 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®

1540,74	FTQAMoxMYFSYAGCF (TM11) IDSYSTEGLMPNTL	945-957 + Ox. 1018-1031	TM11 Linker/NBD 2
1556,78	SAVVFAMAVGQVSSF (TM12) IDSYSTEGLMoxPNTL	979-994 1018-1031 + Ox.	TM12 Linker/NBD 2
1562,72	NDTGFFMNLEEDM	99-111	ECL 1
1600,78	IAIAGVVMoxKMLSGQ (TM10) PPVFSWRIMKLN	868-882 + Ox. 693-705	TM10/ICL 4 Linker
1631,76	VPYRNSLRKAHIF (TM11) KEKGIYFKLVTMoxQ QNGRVKEHGTHQQL	926-938 617-629 + Ox. 1247-1260	ICL 4/TM11 NBD 1/Linker NBD 2/C-Terminus
1637,78	TNRSDINDTGFFMN	93-106	ECL 1
1722,88	AYYSGIGAGVLAAY (TM2) GFTFGKAGEILTKRL (TM8)	115-130 774-788	ECL 1/TM2 TM8/ICL 3
1731,76	EDLMoxSNITNRSIN	86-99 + Ox.	ECL 1
1731,76	LLAIVPIIAIAGVVMox (TM10) SMFRYSNWLDKLY	861-876 + Ox. 38-50	TM10/ICL 4 N-Terminus
1831,80	GMFFQSMATFFTGFI (TM3) SYPSRKEVKILKGLN	191-205 400-414	TM3 A-loop NBD 1
1831,80	IHGAGLPLMoxMLVFGEM (TM1) MKEKGIYFKLVTMoxQ MSNITNRSINDTGFF	60-75 + Ox. 616-629 + Ox. 89-104	TM1/ECL 1 NBD 1/Linker ECL 1
1870,95	SNITNRSINDTGFFM	90-105	ECL 1
1870,95	VSDGQDIRTINVR	451-466	NBD 1
1871,95	AGCFRFGAYLVAHKLMS (TM11) RKAHIFGITFSFTQAMox (TM11) GEYSIGQVLTVFFSVLI (TM6) LVLSGEYSIGQVLTVFF (TM6)	954-970 933-948 + Ox. 324-340 320-336	TM11/ECL 6 ICL 4/TM11 ECL 3/TM6 ECL 3/TM6
1912,93	RTINVRFLREIIGVVS	459-474	NBD 1
1931,94	WRIMoxKLNLTWPYF (TM7) HGAGLPLMMLVFGEMTDI (TM1) DESIPPVFSWRIMKLN	698-711 + Ox. 61-78 689-704	Linker/TM7 TM1/ECL 1 Linker
2295,07	LVFSAVVFAMoxAVGQVSSF (TM12) LGIVSQEPILFDCSIAENIAY	976-994 + Ox. 1113-1133	TM12 Q-loop NBD 2
2670,04	FRTVVSLTQEQQFEHMYAQLSQ	904-925	ICL 4

In der im Folgenden gezeigten Tabelle 4.33 sind die in der 60 % Methanol-Fraktion des Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Verbindung mit 0,05 % ProteaseMAX® möglicherweise neu entstandenen Peptide zusammengefasst. Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass verglichen mit der 40 % Methanol-Fraktion aufgrund des noch höheren Methanolgehalts noch einmal 23 zusätzliche Peptidsignale respektive 57 mögliche Aminosäuresequenzen mit überwiegend hohen Monoisotopischen Massen detektiert werden konnten.

Tab. 4.33: Peptide aus der 60 % Methanol-Fraktion des Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Zusatz von 0,05 % ProteaseMAX®. Aufgeführt sind Peptide, welche durch den Zusatz von 0,05 % ProteaseMAX® möglicherweise neu entstanden sind und nicht bereits in der 20 % oder 40 % Methanol-Fraktion (Tab. 4.36 und 4.37) gefunden wurden. Peptidsequenzen, die bereits durch den Zusatz von 0,1 - 2 % AALS II bzw. 0,1 % ZALS I abgedeckt werden konnten, sind in schwarz abgebildet. Potenziell neu abgedeckte Aminosäuresequenzen außerhalb der TMDs sind in blau dargestellt. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Domänen sind in pink eingefärbt, wobei potenziell neu abgedeckte transmembranäre Aminosäuren fett gedruckt abgebildet sind.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
1375,72	AQSLQVPYRNSL	921-932	ICL 4
	NTRLTDDVSKIN	172-183	ICL 1
	SFTQAMMYFSY (TM11)	943-953	TM11
1414,78	VGERGAQLSGGQKQ	524-537	ABC-Motiv NBD 1
	FLQGFTFGKAGEI (TM8)	771-783	TM8/ICL 3
	IHGAGLPLMoxMLVF (TM1)	60-72 + Ox.	TM1
1573,90	QLLAQKGIYFSMox	1259-1270 + Ox.	C-Terminus
	IGVVSQEPVLFATTI	470-484	Q-loop NBD 1
1598,92	RKRSTRRSVGRSQ	664-676	Linker
	DGKEIKRLNVQWL	1097-1109	NBD 2
1668,77	LDGKEIKRLNVQW	1096-1108	NBD 2
	VFGEMTDIFANAGNL (TM1)	71-85	TM1/ECL 1
	PYFVVGVFCAIINGGL (TM7)	709-724	Linker/TM7
	SLQVPYRNSLRKAH (TM11)	923-936	ICL 4/TM11
	YTPRPDIPVLQGLSL	1044-1058	A-loop NBD 2
	IHKIRKQFFHAIM	144-156	ICL 1
1753,80	LKGLNLKVQSGQTVAL	410-425	NBD 1
	MPNTLEGNVTFGEVVF	1027-1042	Linker/NBD 2
	SFTQAMMYFSYAGCF (TM11)	943-957	TM11
1827,84	ANDAAQVKGAGSRLAVI (TM9)	819-836	ICL 3/TM9
	QLLAQKGIYFSMoxVSVQ	1259-1274 + Ox.	C-Terminus
1940,88	FGITFSFTTQAMMYFSY (TM11)	938-953	TM11
	SGIGAGVLVAAYIQVSFWC (TM2)	119-137	TM2
1942,12	SMoxATFFTFGIVGFTRGW (TM3)	196-212 + Ox.	TM3/ECL 2
	DKLYMVGTLAAIIHGAGL (TM1)	47-65	N-Terminus/TM1
	TTRLANDAAQVKGAGSRL (TM9)	815-833	ICL 3/TM9
	GAGLPLMMLVFGEMTDIF (TM1)	62-79	TM1/ECL 1
	IHGAGLPLMMLVFGEMTDI (TM1)	60-78	TM1/ECL 1
2045,02	MRQEIGWFDVHDVGELN	156-172	ICL 1
	DESIPPVSWRIMKLN	689-705	Linker
2063,02	LRQDVSWFDDPKNTTGAL	797-814	ICL 3
2070,98	PLMMLVFGEMTDIFANAGN (TM1)	66-84	TM1/ECL 1
	SLRKAHIFGITFSFTTQAMox (TM11)	931-948 + Ox.	ICL 4/TM11
	LDKLYMoxVVGTLAAIIHGAGL (TM1)	46-65 + Ox.	N-Terminus/TM1
2131,98	DRKLSTKEALDESIPVVSF	679-697	Linker
2148,04	LDEATSALDTESEKVVQEQAL	1199-1218	Walker B/D-loop
2182,33	GIVSQEPILFDCSIAENIAY	1114-1133	Q-loop NBD 2
	FLALGIISFITFFLQGFTF (TM8)	759-777	TM8

4.2.2.10.7 Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®

2422,18	SMoxATFFTFGIVGFTRGWKL (TM3/4)	196-214 + Ox.	TM3/ECL 2/TM4
2611,52	GDNSRVVSQEEIVRAAKEANIH	1134-1155	NBD 2
	MDLEGDRNGGAKKKNFFKLNNS	1-23	N-Terminus
	WLRHLGIVSQEPILFDCSIAEN	1108-1130	Q-loop NBD 2
	GQTVALVGNCGKSTTVQLMQRLY	420-444	Walker A NBD 1
	FKLVTMQTAGNEVELENAADESKS	623-646	Linker
2630,20	KKAITANISIGAAFLLIYASYALAF (TM5)	290-314	ICL 2/TM5
2752,24	HAIMRQEIGWFDVHDVGELNTRL	153-175	ICL 1
3005,38	KLVTMQTAGNEVELENAADESKSEIDAL	624-651	Linker
3040,48	MQRLYDPTTEGMVSDGQDIRTINVRF	440-465	NBD 1
	AHRLSTIQNADLIVVFQNGRVKEHGTH	1231-1257	H-loop NBD 2
	FVVGVFCAIINGGLQPAFAIIFSKIIGVF (TM7)	711-739	TM7/ECL 4
3140,44	TQAMMYFSYAGCFRFGAYLVAHKLMSF (TM11)	945-971	TM11/ECL 6
	SFTQAMMYFSYAGCFRFGAYLVAHKLM (TM11)	943-969	TM11/ECL 6
	DVHDVGELNTRLTDDVSKINEGIGDKIGM (TM3)	164-192	ICL 1/TM3
	GKAGEILTKRLRYMVFRSMLRQDVSW (TM8)	778-803	TM8/ICL 3
3512,60	SLRKAHIFGITFSSFTQAMoxMYFSYAGCF (TM11)	931-957 + Ox.	ICL 4/TM11
	LLDEATSALDTESEAVVQVALDKARKGRITIVI	553-585	Walker B/D-loop
	IAIAGVEMKMLSGQALKDKKELEGSGKIATEAI	868-901	TM10/ICL 4
	(TM10)		

Unter Einhaltung derselben Parameter wie für die beiden zuvor beschriebenen Fraktionen würde bei einer Berücksichtigung von zwei Aminosäuresequenzen pro Peptidsignal abzüglich der Überschneidungen mit der 40 % Methanol-Fraktion eine „maximale“ zusätzliche Abdeckung von 35 Aminosäuren = 3 % resultieren. Als Summe der Sequenzabdeckungen aus allen drei Fraktionen ergäbe sich demnach ein maximaler Wert von 96 %, wobei mit Ausnahme der TM 4 alle transmembranären Helices zu größeren Teilen mit abgedeckt werden würden. Wird dagegen lediglich eine Aminosäuresequenz pro Peptidsignal gezählt, erhielte man als „minimale“ additive Sequenzabdeckung aus allen drei Fraktionen einen Wert von 82 % unter sichtbarer Erniedrigung des Anteils an abgedeckten Bereichen in den transmembranären Domänen.

Somit lautet das abschließende Fazit, dass mit der Kombination aus dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp und ProteaseMAX® die bisher beste Sequenzabdeckung erzielt worden zu sein scheint. Wegen des Nichtvorhandenseins von MS/MS-Daten fehlt jedoch der finale Beweis für diese für das Membranprotein P-gp außergewöhnlich hohe Sequenzabdeckung und aus diesem Grund ist dieser Wert mit großer Vorsicht und nur unter Vorbehalt zu betrachten.

4.2.2.10.8 Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®

Der Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp unter Zusatz von 0,05 % ProteaseMAX® wurde entsprechend Kapitel 3.2.2.10 in Analogie zu den bereits beschriebenen In-Lösung-Verdau von P-gp mit Trypsin und Chymotrypsin in Kombination mit ProteaseMAX® durchgeführt.

Wegen der zu erwartenden Komplexität des Übersichtsspektrums - bedingt durch die äußerst unspezifische Spaltung von Peptidbindungen C-terminal von unpolaren aliphatischen Aminosäuren wie Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin und Valin neben der polaren Aminosäure Serin - wurden die im Zuge des Verdau gebildeten Peptide analog dem zuvor beschriebenen Verdau von P-gp mit Chymotrypsin unter Zusatz von ProteaseMAX® (siehe Unterkapitel 4.2.2.10.7) ihrer Lipophilie entsprechend in drei Fraktionen (20, 40 und 60 % Methanol) eluiert.

Bedauerlicherweise konnten aus den bereits genannten Gründen auch von den im Rahmen dieses Verdau neu detektierten Peptidsignalen keine MS/MS-Spektren aufgenommen werden, weshalb in den meisten Fällen wiederum zu jeder aufgeführten Monoisotopischen Masse mehrere passende Aminosäuresequenzen innerhalb von P-gp existieren. Die Zuordnung der abgebildeten Aminosäuresequenzen zu den jeweiligen Peptidsignalen erfolgte hier unter Berücksichtigung der bevorzugten Schnittstellen von Elastase innerhalb der Aminosäuresequenz von P-gp sowie unter Einhaltung einer Massentoleranz für die Abweichung zwischen theoretischer und experimentell bestimmter Monoisotopischer Masse von 300 ppm.

Die im Folgenden gezeigte Tabelle 4.34 reflektiert damit ebenfalls lediglich die durch den Elastase-In-Lösung-Verdau in Verbindung mit 0,05 % ProteaseMAX® und Elution mit 40 bzw. 60 % Methanol maximal erzielbare Sequenzabdeckung von P-gp. Offen bleibt die Frage, welche der aufgeführten Aminosäuresequenzen sich jeweils hinter dem entsprechenden Peptidsignal verbergen. Die Auswertung zahlreicher MS/MS-Spektren hat jedoch gezeigt, dass im Regelfall nur ein bis zwei aller theoretisch möglichen Aminosäuresequenzen pro Peptidsignal in den MS/MS-Spektren nachgewiesen werden

konnten und die in der Praxis tatsächlich erzielte Sequenzabdeckung von P-gp demnach deutlich geringer ausfiel als die theoretisch höchstmögliche Sequenzabdeckung. Hinzu kommt, dass in den Fällen, wo neben einer Sequenz im Bereich der transmembranären Domänen auch ein Peptid in den Nukleotidbindungsdomänen, Loop- oder Linker-Regionen möglich war, fast immer der Sequenzabschnitt außerhalb der TMDs als korrekt identifiziert wurde.

Tab. 4.34: Peptide aus der 40 % und 60 % Methanol-Fraktion des In-Lösung-Verdaus von P-gp mit Elastase unter Zusatz von 0,05 % ProteaseMAX®. Aufgeführt sind Peptide, welche durch den Zusatz von 0,05 % ProteaseMAX® möglicherweise neu entstanden sind. Peptidsequenzen, die bereits durch den regulären In-Lösung-Verdau von P-gp mit Elastase ohne Zusatz von Detergens abgedeckt werden konnten, sind in schwarz abgebildet. Potenziell neu abgedeckte Aminosäuresequenzen außerhalb der TMDs sind in blau dargestellt. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Domänen sind in pink eingefärbt, wobei potenziell neu abgedeckte transmembranäre Aminosäuren fett gedruckt abgebildet sind.

[M+H] ⁺	Sequenz	Position	Topologie
781,46	SAVFGAM (TM12)	979-986	TM12
	VGSSGCGKS	1069-1077	Walker A NBD 2
	DINDTGF	97-103	ECL 1
	MYFSYA (TM11)	949-954	TM11
847,44	QDRKLST	678-684	Linker
	KMLSGQAL	877-884	ICL 4
	IMIEKT	1009-1015	Linker
	DDPKNTTG	805-812	ICL 3
	LLVFSAVV (TM12)	975-982	TM12
	GMFFQSM (TM3)	191-197	TM3
	MLRQDVS	796-802	ICL 3
848,44	PSIEAFAN (TM6)	350-357	TM6/Linker
	VPYRNSL	926-932	ICL 4
	STEGLMPN	1022-1029	Linker/NBD 2
	AVVFGAMAV (TM12)	980-988	TM12
864,48	ENFRTVV	902-908	ICL 4
	NVTFGEVV	1034-1041	Linker/NBD 2
	AGVEMKM (TM10)	871-878	TM10/ICL 4
	SKIIGVFT	733-740	ECL 4
	DCSIAENI	1124-1131	NBD 2
	DELMKEKGIY	613-622	NBD 1/Linker
	AYEIFKIIDN	362-371	Linker
1225,62	YSTEGLMPNTL	1021-1031	Linker/NBD 2
	FSYAGCFRFGA (TM11)	951-961	TM11/ECL 6
	SIGAAFLLIYAS (TM5)	298-309	TM5
	CIVIAHRLSTI	1227-1237	H-loop NBD 2
	SFEDVLLVFS (TM12)	970-980	ECL 6/TM12

4.2.2.10.8 Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®

1240,54	TFSFTQAMMY (TM11)	941-950	TM11
	QNIANLGTGIII (TM9)	838-849	TM9
	FFQSMATFFT (TM3)	193-202	TM3
	AVGQVSSFAPDY (TM12)	987-998	TM12/Linker
	VGQVSSFAPDYA (TM12)	988-999	TM12/Linker
	HAIMRQEIGW	153-162	ICL 1
	TGFIVGFTRGW (TM3)	202-212	TM3/ECL 2
	YSGIGAGVLVAAY (TM2)	118-130	TM2
	YYSIGIGAGVLVAA (TM2)	117-129	ECL 1/TM2
	GWQLTLLLLAI (TM10)	854-864	ECL 5/TM10
1338,58	GFTFFGKAGEILT (TM8)	774-785	TM8/ICL 3
	HKIRKQFFH	145-153	ICL 1
	DEATSALDTESEA	555-567	Walker B/D-loop
	SWFDDPKNTTGA	802-813	ICL 3
	AHRLSTIQNADL	1231-1242	H-loop NBD 2
	AHRLSTVRNADV	586-597	H-loop NBD 1
	YAQSLQVPYRN	920-930	ICL 4
	ISIGAAFLLIYAS (TM5)	297-309	TM5
	FATTIAENIRYG	480-491	NBD 1
	PHKFDTLVGERG	517-528	NBD 1
1355,52	YPTRPDIPVLQG	1044-1055	A-loop NBD 2
	KRLRYMVFRS	786-795	ICL 3
	MKEKGIYFKLV	616-626	NBD 1/Linker
	SGGQKQRIAIARA	1177-1189	ABC-Motiv NBD 2
	SGGQKQRIAIARA	532-544	ABC-Motiv NBD 1
	AEVLAAIRTVIA	254-266	ICL 2
	IGSRLAVITQNIA (TM9)	829-841	ICL 3/TM9
	AIGSRLAVITQNI (TM9)	828-840	ICL 3/TM9
	MAVGQVSSFAPDY (TM12)	986-998	TM12/Linker
	VFGEMTDIFANAG (TM1)	71-83	TM1/ECL 1
1371,62	AAAIQVSWFCLA (TM2)	128-139	TM2
	AYIQVSWFCLAA (TM2)	129-140	TM2
	KEANIHAFIESL	1150-1161	NBD 2
	IYFKLVTMQTAG	621-632	NBD 1/Linker
	KGLNLKVQSGQTV	411-423	NBD 1
	PIIAIAGVEMKM (TM10)	866-878	TM10/ICL 4
	RIDDPETKRQN	741-751	ECL 4
	VFQNGRVKEHGT	1245-1256	NBD 2
	FFSVLIGAFSVGQ (TM6)	335-347	TM6
	RLSTVRNADVIAG	588-600	NBD 1
1392,64	LIRKRSTRRSV	662-672	Linker
	TDIFANAGNLEDL	76-88	ECL 1
	LEDLMSNITNRS	85-96	ECL 1
	LMPNTLEGNVTFG	1026-1038	Linker/NBD 2
	SYALAFWYGTTL (TM5)	309-320	TM5/ECL 3
	ALVGSSGCGKSTVVQ	1067-1081	Walker A NBD 2
	VALVGNSSGCGKSTTV	423-437	Walker A NBD 1
	KIIDNKPSIDSY	367-378	Linker
	KIATEAIENFRT	895-906	ICL 4
	VQLLERFYDPL	1080-1090	NBD 2
1392,64	PHILLLDEATSAL	1194-1206	Walker B NBD 2
	PTRPDIPVLQGLS	1045-1057	NBD 2

4.2.2.10.8 Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®

1397,64	LSAAVWAKILSSF (TM4)	227-239	TM4/ICL 2
	DNKPSIDSYKSG	370-382	Linker/NBD 1
	EQKFEHMYAQS	913-923	ICL 4
	YDPTEGMVSVDDGQ	444-456	NBD 1
1447,68	TGIISFIYGWQ (TM9/10)	845-856	TM9/ECL 5/TM10
	AIINGGLQPAFAII (TM7)	718-731	TM7
	LLDGKEIKRLNV	1095-1106	NBD 2
	KILKGLNLKVQSG	408-420	NBD 1
	DSYSKSGHKPDNI	376-388	Linker/NBD 1
	IDSYSKSGHKPDN	375-387	Linker/NBD 1
	MDEIEKAVKEANA	497-509	NBD 1
	VRNADVIAGFDDGV	592-605	NBD 1
	MVSVDDGQDIRTIN	450-462	NBD 1
	AGNEVELENAADES	631-644	Linker
	TRLTDDVSKINEG	173-185	ICL 1
	KGNLEFRNVHFS	389-400	NBD 1
	STIQNADLIVVFQ	1235-1247	NBD 2
	INGGLQPAFAIIFS (TM7)	720-733	TM7/ECL 4
	KAGEILTKRLRY (TM8)	779-790	TM8/ICL 3
	1478,76	QVSFWCLAAGRQI (TM2)	132-144
IQVSFWCLAAGRQ (TM2)		131-143	TM2/ICL 1
TEAIENFRTVVSL		898-910	ICL 4
EAIENFRTVVSLT		899-911	ICL 4
GEILTKRLRYMV		781-792	ICL 3
GQTVALVGNSSGCGKST		420-435	Walker A NBD 1
TLALVGSSGCGKSTVV		1065-1080	Walker A NBD 2
TLVLSGEYSIGQVL (TM6)		319-332	ECL 3/TM6
LVLSSGEYSIGQVLT (TM6)		320-333	ECL 3/TM6
QEPILFDCSIAEN		1118-1130	Q-loop NBD 2
EAVVQVALDKARKG		566-579	NBD 1
1483,68		TRGWKLTLVILAI (TM3/4)	209-221
	VSSFAPDYAKAKIS (TM12)	991-1004	TM12/Linker
	RLAVITQNIANLGT (TM9)	832-845	TM9
	AQVKGAIGSRLAVIT (TM9)	823-837	ICL 3/TM9
	IDNKPSIDSYKSG	369-382	Linker
1510,68	AVGQVSSFAPDYAKA (TM12)	987-1001	TM12/Linker
	TGIISFIYGWQL (TM9/10)	845-857	TM9/ECL 5/TM10
	GIIISFIYGWQLT (TM9/10)	846-858	TM9/ECL 5/TM10
	GNSGCGKSTTVQLMQ	427-441	Walker A NBD 1
	EQKFEHMYAQSL	913-924	ICL 4
	LLDEATSALDTESEA	553-567	Walker B/D-loop
1564,70	GIGAGVLVAAYIQVSF (TM2)	120-135	TM2
	IAHRLSTIQNADLI	1230-1243	H-loop NBD 2
	IAHRLSTVRNADLI	585-598	H-loop NBD 1
	IIHGAGLPLMMLVFGEM (TM1)	59-75	TM1/ECL 1
1828,92	PLMMLVFGEMTDIFAN (TM1)	66-81	TM1/ECL 1
	EKVVQEALDKAREGRT	1211-1226	NBD 2
	VFNYPTRPDIPVLQGL	1041-1056	A-loop NBD 2
	DKLYMVVGTLAIIHGAG (TM1)	47-64	N-Terminus/TM1
	DINDTGFFMNLEEDMT	97-112	ECL 1
	QTAGNEVELENAADESKS	629-646	Linker
1891,72	YIQVSFWCLAAGRQIH (TM2)	130-145	TM2/ICL 1

	QKKELERYNKNLEEA	270-284	ICL 2
	FQNGRVKEHGTHQQLL	1246-1261	NBD 2/C-Terminus
1953,20	RIAIARALVRQPHILL	1183-1199	Walker B NBD 2
	QVKGAIGSR LAVITQNIAN (TM9)	824-842	ICL 3/TM9
	RQJHKIRKQFFHAIM	142-156	ICL 1
	REGRTCIVIAHRLSTIQ	1222-1238	H-loop NBD 2
	NAYDFIMKLPFKFDL	508-523	NBD 1
	HAIMRQEIGWFDVHDV	153-168	ICL 1
	SMFRYSNWLDKLYM V (TM1)	38-52	N-Terminus
	MLRQDVSWFDDPKNTT	796-811	ICL 3
1961,16	KEIKRLNVQWLRHLG	1099-1114	NBD 2
	QTLALVGSSGCGKSTVVQLL	1064-1083	Walker A NBD 2
	DKELLAYAKAGAVAEVLA	241-259	ICL 2
	NIHAFIESLPNKYSTKV	1153-1169	NBD 2
	KEANIHAFIESLPNKYS	1150-1166	NBD 2
1987,80	NLEEDMTRYAY YSGI (TM2)	106-121	ECL 1/TM2
	FGEMTDIFANAGNLEDLM (TM1)	72-89	TM1/ECL 1
	TKEALDESIPPVSFWRI	684-700	Linker
	STKVGDKGTQLSGGQKQRI	1166-1184	ABC-Motiv NBD 2
2174,96	AGV VEMKMLSGQALKDKKEL (TM10)	871-890	TM10/ICL 4
	PTRPDIPVLQGLSLEVKKGQ	1045-1064	NBD 2
2200,03	LVFGEMTDIFANAGNLEDLM (TM1)	70-89	TM1/ECL 1
	MLVFGEMTDIFANAGNLEDL (TM1)	69-88	TM1/ECL 1
	DDVSKINEGIGDKIGMFFQS (TM3)	177-196	ICL 1/TM3
	FQSMATFFTGFIVGFTRGW (TM3)	194-212	TM3/ECL 2
	LSGEYSIGQVLTVFFSVLIGA (TM6)	322-342	ECL 3/TM6
	KLNNKSEKDKKEKKPTVSV	18-36	N-Terminus
	LAYAKAGAVAEVLAIRTVIA	245-266	ICL 2
	YPSRKEVKILKGLNLKVQS	401-419	A-loop NBD 1
	SYPSRKEVKILKGLNLKVQ	400-418	A-loop NBD 1
2401,06	VFGEMTDIFANAGNLEDLMSNI (TM1)	71-92	TM1/ECL 1
	LVFGEMTDIFANAGNLEDLMSN (TM1)	70-91	TM1/ECL 1
	DNKPSIDSYSGHKKPDNIKGN	370-391	Linker/NBD 1
2403,04	MNLEEDMTRYAY YSGIGAGV (TM2)	105-125	ECL 1/TM2
	FGEMTDIFANAGNLEDLMSNIT (TM1)	72-93	TM1/ECL 1
	GCFRFGAYLVAHKLSMFED VL (TM11/12)	955-975	TM11/ECL 6/TM12
	GQKKELERYNKNLEEAKRIG	269-288	ICL 2
	GGQKKELERYNKNLEEAKRI	268-287	ICL 2
	FGKAGEILTKRLRYMVFRSM (TM8)	777-796	TM8/ICL 3
2424,01	SKSGHKPDNIKGNLEFRNVHF	379-399	Linker/NBD 1
	KSGHKPDNIKGNLEFRNVHFS	380-400	Linker/NBD 1
	PPVSFWRIMKLNLTWPYF (TM7)	693-711	Linker/TM7
2502,10	VFGEMTDIFANAGNLEDLMSNIT (TM1)	71-93	TM1/ECL 1
	SAAHIIMIEKTPLIDSYSTEGL	1004-1026	Linker/NBD 2
	DFIMKLPFKFDLTVGERGAQLS	511-532	ABC-Motiv NBD 1
	DLIVVFQNGRVKEHGTHQQLLA	1241-1262	NBD 2/C-Terminus
	ADLIVVFQNGRVKEHGTHQQLL	1240-1261	NBD 2/C-Terminus
	LEVKKGQTLALVGSSGCGKSTVVQL	1058-1082	Walker A NBD 2
	EVKKGQTLALVGSSGCGKSTVVQLL	1059-1083	Walker A NBD 2
2524,09	TDIFANAGNLEDLMSNITNRSDI	76-98	ECL 1
	YAGCFRFGAYLVAHKLSMFED V (TM11/12)	953-974	TM11/ECL 6/TM12
	MQRLYDPTEGMVSVDDGQDIRTI	440-461	NBD 1

4.2.2.10.8 Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp in Kombination mit ProteaseMAX®

	FGAMAVGQVSSFAPDYAKAKISAAH (TM12)	983-1007	TM12/Linker
	EPVLFATTIAENIRYGRENTM	476-497	NBD 1
	GQASPSIEAFANARGAAYEIFKII (TM6)	346-369	TM6/Linker
	VQWLRHLGIVSQEPILFDCSI	1106-1127	Q-loop NBD 2
	IGAAFLLIYASYALAFWYGTTLV (TM5)	299-321	TM5/ECL 3
	GAAFLLIYASYALAFWYGTTLV (TM5)	300-322	TM5/ECL 3
	CIVIAHRLSTIQNADLIVVFQNG	1227-1249	H-loop NBD 2
2615,14	AAVWAKILSSFTDKELLAYAKAGA (TM4)	229-252	TM4/ICL 2
	MNLEEDMTRYAYYYSGIGAGVLY (TM2)	105-127	ECL 1/TM2
	NSGCGKSTTVQLMQRLYDPTGEMV	428-451	Walker A NBD 1
	LVFGEMTDIFANAGNLEDLMSNIT (TM1)	70-93	TM1/ECL 1
	HIIMIEKTPLIDSYSTEGLMPN	1007-1029	Linker/NBD 2
2859,28	GCFRFGAYLVAHKLMSFEDVLLV (TM11/12)	955-977	TM11/ECL 6/TM12
	VFGEMTDIFANAGNLEDLMSNITNRS (TM1)	71-96	TM1/ECL 1
	SGCGKSTTVQLMQRLYDPTGEMVSDG	429-455	Walker A NBD 1
	FRFGAYLVAHKLMSFEDVLLVFSV (TM11/12)	957-981	TM11/ECL 6/TM12
	FKLNNSEKDKKEKKPTVSVFSMF	17-40	N-Terminus
	FFKLNNSEKDKKEKKPTVSVFSM	16-39	N-Terminus
	QALKDKKELEGAGKIATEAIENFRTV	882-907	ICL 4
2966,35	GFFMNLEEDMTRYAYYYSGIGAGVLY (TM2)	102-127	ECL 1/TM2
	MIEKTPLIDSYSTEGLMPNTLEGNT	1010-1036	Linker/NBD 2
	AYEIFKIIDNKPSIDSYSGHKKPDN	362-387	Linker/NBD 1
	VEKGNHDELMKEKGIYFKLVTMQTAG	607-632	NBD 1/Linker
	DGQDIRTINVRFLREIIGVVSQEPVL	454-479	Q-loop NBD 1

In der Tabelle sind die in der 40 % und 60 % Methanol-Fraktion - verglichen mit dem regulären Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp ohne Zusatz von Detergens - neu detektierten Peptidsignale zusammengefasst. Die 20 % Methanol-Fraktion wies gegenüber dem separaten Elastase-In-Lösung-Verdau ohne ProteaseMAX® keine neuen Peptidsignale auf und wurde aus diesem Grund nicht mit abgebildet.

Unter der Annahme von zwei Aminosäuresequenzen pro Peptidsignal sowie Priorisierung von Sequenzabschnitten in den Nukleotidbindungsdomänen, Loop- und Linker-Regionen käme man auf eine „maximale“ Sequenzabdeckung von 67 % (= 858 Aminosäuren) unter Einschluss kleinerer Bereiche der transmembranären Helices 1, 9, 10, 11 und 12. Dies entspräche im Vergleich zum regulären Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp ohne Zusatz von Detergens einer höchstmöglichen Verbesserung um 22 % inklusive der Abdeckung eines wesentlichen Teils der TM10. Wird dagegen nur eine Aminosäuresequenz pro Peptidsignal berücksichtigt, beliefte sich die „minimale“ Sequenzabdeckung auf einen Wert von lediglich 50 % (= 634 Aminosäuren), wobei die transmembranäre Sequenzabdeckung deutlich abnehmen und sich auf die TM12 beschränken würde.

Verglichen mit dem regulären Elastase-In-Lösung-Verdau ohne Detergens käme dies einer Verbesserung um nur 5 % gleich. Im Gegensatz zum Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit NALS II, wo für „Minimum“ und „Maximum“ der Sequenzabdeckung fast identische Werte bestimmt wurden und verglichen mit der Kombination aus Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau und ProteaseMAX®, bei der die Abweichung zwischen Minimal- und Maximalwert höchstens 14 % betrug, wirkt sich beim Elastase-In-Lösung-Verdau unter Zusatz von ProteaseMAX® die Verringerung der berücksichtigten Aminosäuresequenzen pro Peptidsignal von zwei auf eine dem Anschein nach deutlich negativer auf die Sequenzabdeckung aus.

Abschließend kann das Fazit gezogen werden, dass die Verbindung aus Elastase-In-Lösung-Verdau und ProteaseMAX® in Bezug auf die Sequenzabdeckung von P-gp sichtlich besser abzuschneiden scheint als der separate In-Lösung-Verdau mit Elastase ohne Zusatz von Detergens. Bedauerlicherweise konnte das Ausmaß dieser Überlegenheit aufgrund des Fehlens von MS/MS-Daten jedoch nicht näher bestimmt werden.

4.3 Photoaffinitätsmarkierungen von P-gp

Die vor mehr als 50 Jahren von Westheimer und Mitarbeitern [118, 119] entwickelte Photoaffinitätsmarkierung stellt eine Technik zur Lokalisation von Bindungsstellen in einem Rezeptorprotein dar. Die Voraussetzung für die Durchführung von so genannten „Photoaffinity Labeling“-Experimenten sind dabei Liganden, welche ein photoaktivierbares Strukturelement, das „Photophor“, besitzen. Geeignete, durch UV-Licht aktivierbare Strukturelemente sind beispielsweise Azide, Diazirine und Benzophenone. Nach Ausbildung des Bindungsgleichgewichts lassen sich diese funktionellen Gruppen durch Bestrahlung mit UV-Licht unter Absorption von Lichtquanten (Photonen) in reaktive Spezies überführen. Als reaktive Übergangszustände entstehen Nitrene, Carbene und Diradikale, die auf unterschiedliche Art und Weise mit dem Peptid-Rückgrat oder den Aminosäure-Seitenketten des Rezeptorproteins reagieren können. Alle drei gebildeten Zwischenzustände repräsentieren Elektrophile und es kommt somit bevorzugt zu Insertions- bzw. Additions-Reaktionen mit Nukleophilen.

Erfolgt die Verknüpfung von Ligand und Rezeptorprotein schneller als die Dissoziation des Ligand-Rezeptor-Komplexes, kommt es bevorzugt im Bereich der Bindungsstelle zur Ausbildung der Bindung und somit zu einer spezifischen Bindung. Im Anschluss daran kann das Zielprotein mit verschiedenen Spaltungsreagenzien proteolytisch abgebaut werden. In Abhängigkeit vom verwendeten Enzym ergeben sich charakteristische Peptidmuster, je nach der Präferenz für bestimmte Aminosäuren. Das entstandene Peptidgemisch wird in der Folge mit einer chromatographischen Methode entsalzt bzw. fraktioniert und die Masse der einzelnen Peptide dann massenspektrometrisch durch Messung des Verhältnisses von Masse zu Ladung (m/z) bestimmt. Durch Vergleich der experimentell erhaltenen mit den theoretisch zu erwartenden Peptiden bzw. durch Vergleich mit den Peptiden einer ohne Photoligand bestrahlten Kontrolle, lassen sich erfolgreich markierte Peptide durch eine Massenzunahme um genau das Molekulargewicht des eingesetzten Photoliganden identifizieren. Auf diese Weise können Bindungsstellen innerhalb der Primärstruktur des Zielproteins detektiert werden.

Das Benzophenon-Photophor hat gegenüber den Aziden und Diazirinen einige Vorteile. Zum einen sind Benzophenon-Gruppen bisweilen Teilstrukturen von Liganden, besitzen also eine „intrinsische Photoaktivierbarkeit“, während Azide und Diazirine oft nachträglich an bekannte Liganden gekoppelt werden müssen. Des Weiteren zeichnen sich Benzophenone durch eine höhere chemische Stabilität und verminderte Lichtempfindlichkeit aus und sie können bereits mit langwelligem UV-Licht zwischen 350 und 370 nm aktiviert werden, wodurch eine wesentlich geringere Strahlenschädigung des Proteins gewährleistet ist.

Aus den genannten Gründen sollten für die Photoaffinitätsmarkierung von P-gp Liganden mit Benzophenon-Photophor verwendet werden. Hierzu gehören das 2,4-Dihydroxybenzophenon, welches laut Literatur mit der ATP-Bindungsstelle der NBD 2 interagieren soll [127], sowie die beiden Phenothiazin-Derivate H15 und H19.

Zuvor wurde jedoch zur Validierung der von Dr. Jens Meyer im Rahmen seiner Dissertation etablierten Methode für die Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente ein photoaktiverbares ATP-Analogon, das 8-Azido-ATP, eingesetzt. Dieser Photoligand bindet laut Literatur im Bereich der ATP-Bindungsstelle von P-gp [122, 123, 124], so dass die Übertragbarkeit und Anwendbarkeit der gewählten Methode auf das verwendete

Testsystem überprüft werden konnte.

4.3.1 Photoaffinity Labeling von P-gp mit 8-Azido-ATP

Das Adenosintriphosphat (ATP)-Analogon 8-Azido-ATP beinhaltet als photoaktivierbares Strukturelement eine Azid-Gruppe in Position 8 des Adenin-Grundgerüsts. Das Molekulargewicht der freien Säure beträgt etwa 548 g/mol und das UV-Absorptionsmaximum λ_{max} liegt in einer wässrigen Lösung von pH 6 bei 281 nm. Die Struktur von 8-Azido-ATP ist in der nachfolgenden Abbildung 4.32 dargestellt.

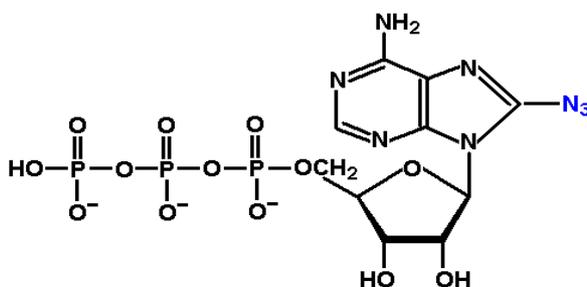


Abb. 4.32: Struktur von 8-Azido-ATP

Die Photoaffinitätsmarkierung von P-gp mit 8-Azido-ATP wurde entsprechend Kapitel 3.3.1 in Anlehnung an ein von Dr. Jens Meyer etabliertes Protokoll [125] durchgeführt und an einigen Stellen modifiziert. Das 8-Azido-ATP wurde in Form einer 10 mM wässrigen Stammlösung von der Firma Biolog bezogen, aliquotiert und bis zur Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Der für das Photolabeling-Experiment verwendete Puffer wurde entsprechend einer Vorschrift von Sauna et al. [124] hergestellt und ist in Tabelle 3.18 beschrieben.

In zwei Quarzröhrchen von 100 μl Volumen wurden mit einer 100 μl Hamiltonspritze 22 μl (Probe) bzw. 25 μl (Kontrolle) Photolabeling-Puffer vorgelegt. Anschließend wurden mit einer 10 μl Hamiltonspritze jeweils 5 μl P-gp-Proteoliposomen ($c = 1,14\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zugegeben und mit Hilfe eines Mikrorührfisches vermischt. Nachfolgend wurde in eines

der beiden Quarzröhrchen (Probe) noch 3 μl 10 mM 8-Azido-ATP-Stammlösung pipettiert und gemischt, so dass für Probe und Kontrolle ein Endvolumen von 30 μl resultierte. Die finale Konzentration von 8-Azido-ATP betrug somit 1 mmol/l, was dem K_m -Wert entspricht. Probe und Kontrolle wurden daraufhin für 10 Minuten in der Dunkelheit unter Eiskühlung und Rühren auf dem Magnetrührer inkubiert. Im Anschluss daran wurden die weiterhin eisgekühlte Probe und Kontrolle in einem UV-Crosslinker bei zwei verschiedenen Wellenlängen $\lambda = 302 \text{ nm}$ und $\lambda = 365 \text{ nm}$ für eine definierte Zeitspanne (3; 6; 9; 12 min) bestrahlt. Die kürzerwellige Lichtquelle wurde gewählt, weil in einem zuvor aufgenommenen UV-Spektrum von 8-Azido-ATP die Absorption bei 365 nm nur marginal vorhanden war, bei 302 nm dagegen eine deutliche Absorption stattfand. Nach Beendigung der Bestrahlung wurden Probe und Kontrolle mit einer 10 μl Hamiltonspritze jeweils in ein 0,5 ml LoBind® Eppendorf-Gefäß überführt, mit 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 8 und Trypsin-Lösung ($c = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) entsprechend einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 versetzt und für 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde darauffolgend durch 10 minütiges Erhitzen bei 95 °C inaktiviert, die entstandenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und nach erfolgter Aufbereitung massenspektrometrisch analysiert.

Bei 8-Azido-ATP als Photoligand ist im Hinblick auf die Probenvorbereitung sowie die massenspektrometrische Analyse selbst die Besonderheit zu beachten, dass es sich bei der Verbindung um ein Triphosphat mit hoher negativer Eigenladung handelt. Diese Eigenschaft bringt es mit sich, dass man das Molekül im üblicherweise für die Massenspektrometrie genutzten „positive mode“ der Ionisierung möglicherweise nur schlecht detektieren kann und somit in den weniger gebräuchlichen „negative mode“ der Ionisierung wechseln muss. Der „negative mode“ birgt den Nachteil, dass die Signalintensität im Vergleich zum „positive mode“ deutlich niedriger ist. Eine Möglichkeit, der herabgesetzten Signalintensität entgegenzuwirken, stellt die Technik der Phosphopeptid-Anreicherung mit Titandioxid dar. In der Literatur wird diese Technik auch als Metal Oxide Affinity Chromatography (MOAC) bezeichnet [126]. Hierbei werden Peptide, die Phosphatgruppen tragen (z. B. durch posttranslationale Modifikation) an mit Titandioxid beschichtete magnetische Kügelchen gebunden und dadurch angereichert. Treibende Kraft der Anreicherung ist die starke Wechselwirkung der positiv geladenen Titankationen mit den Phosphatgruppen. Die meisten anderen Peptide werden durch

mehrmaliges Waschen entfernt, allerdings binden unmodifizierte Peptide, die einen hohen Anteil an den sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat besitzen, ebenfalls an die Titandioxid Beads. Da mit 8-Azido-ATP markierte Peptide ebenfalls negativ geladen sind, sollten sich diese durch die MOAC-Technik gleichfalls anreichern lassen.

Die Anreicherung wurde entsprechend einem Protokoll aus der Arbeitsgruppe von Dr. Sabine Metzger am BMFZ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt und ist in Kapitel 3.3.1 beschrieben. Die verwendeten Lösungen sind Tabelle 3.19 zu entnehmen.

Vor der Durchführung des eigentlichen Photoaffinity Labeling-Experiments wurde als Erstes durch Aufnahme zweier Übersichtsspektren - einmal im Positivmodus und einmal im Negativmodus der Ionisierung - die Monoisotopische Masse von 8-Azido-ATP sowohl bei positiver Ionisierung $[M+H]^+$ als auch bei negativer Ionisierung $[M-H]^-$ bestimmt und damit gleichzeitig die Detektierbarkeit des Photoliganden in beiden Aufnahmemodi sichergestellt. Die aufgenommenen Übersichtsspektren von 8-Azido-ATP sind in den nachfolgenden beiden Abbildungen 4.33 und 4.34 dargestellt.

Auffällig ist, dass bei positiver Ionisierung von 8-Azido-ATP das Signal der einfachen Natriumanlagerung bei einem m/z von 570,99 am intensivsten ist, während im Negativmodus der Peak des unmodifizierten 8-Azido-ATPs bei einem m/z von 546,91 die höchste Intensität aufweist. Außerdem sind im Falle der negativen Ionisierung von 8-Azido-ATP zwei Fragmente des Moleküls bei Masse-zu-Ladungsverhältnissen von 518,92 bzw. 466,94 sichtbar, die aus der Abspaltung von molekularem Stickstoff (N_2) aus der Azid-Gruppe in Position 8 bzw. dem Verlust einer Phosphat-Gruppe (HPO_3^-) resultieren. Hieraus lässt sich bereits die hohe Instabilität des Photoliganden ableiten, so dass sich als Konsequenz die Notwendigkeit der Berücksichtigung von Fragmenten des 8-Azido-ATPs bei der Auswertung der Photoaffinity Labeling-Experimente ergibt.

4.3.1 Photoaffinity Labeling von P-gp mit 8-Azido-ATP

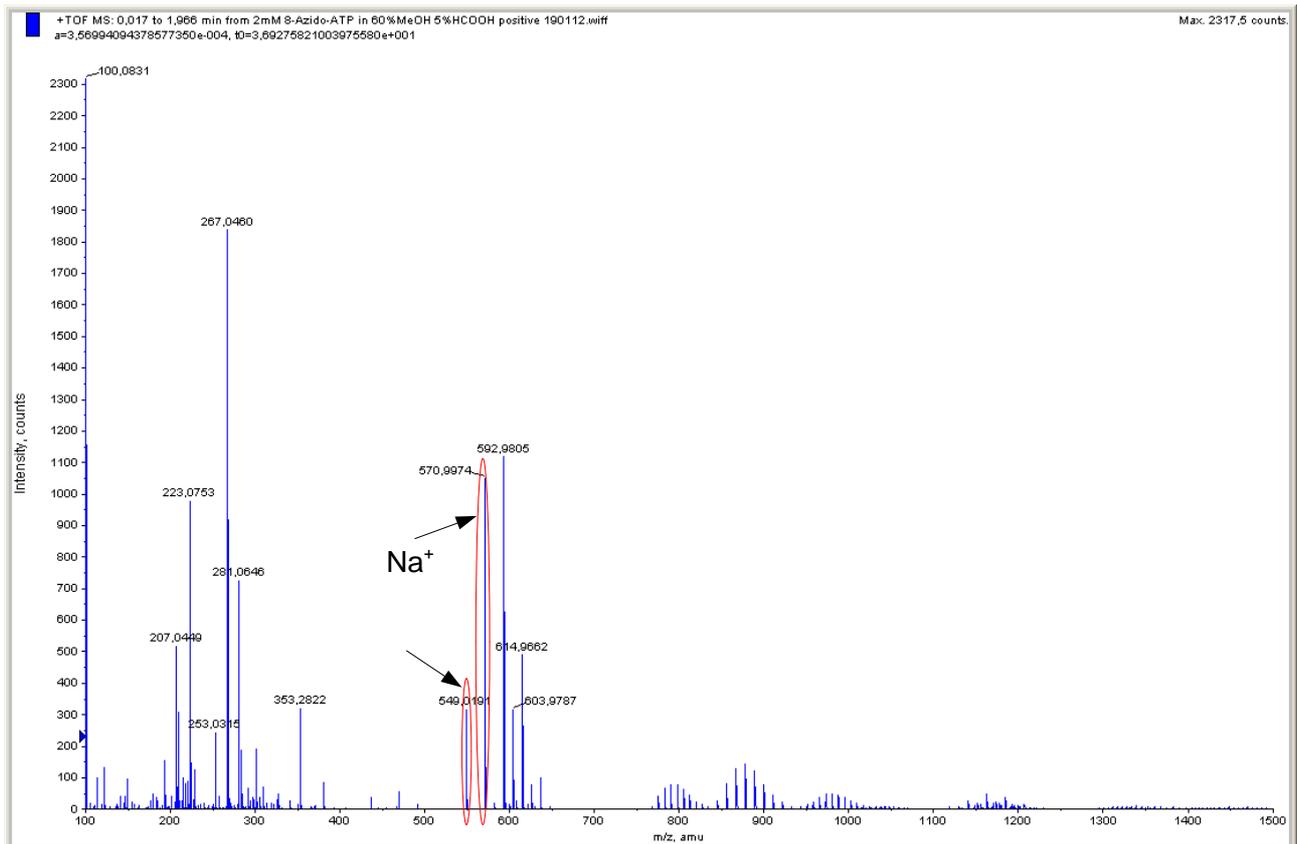


Abb. 4.33: Übersichtsspektrum von 8-Azido-ATP bei positiver Ionisierung via ESI-MS. Rot eingekreist sind die Signale des unmodifizierten Photoliganden ($m/z = 549,02$) sowie der einfachen Natriumanlagerung ($m/z = 570,99$).

4.3.1 Photoaffinity Labeling von P-gp mit 8-Azido-ATP

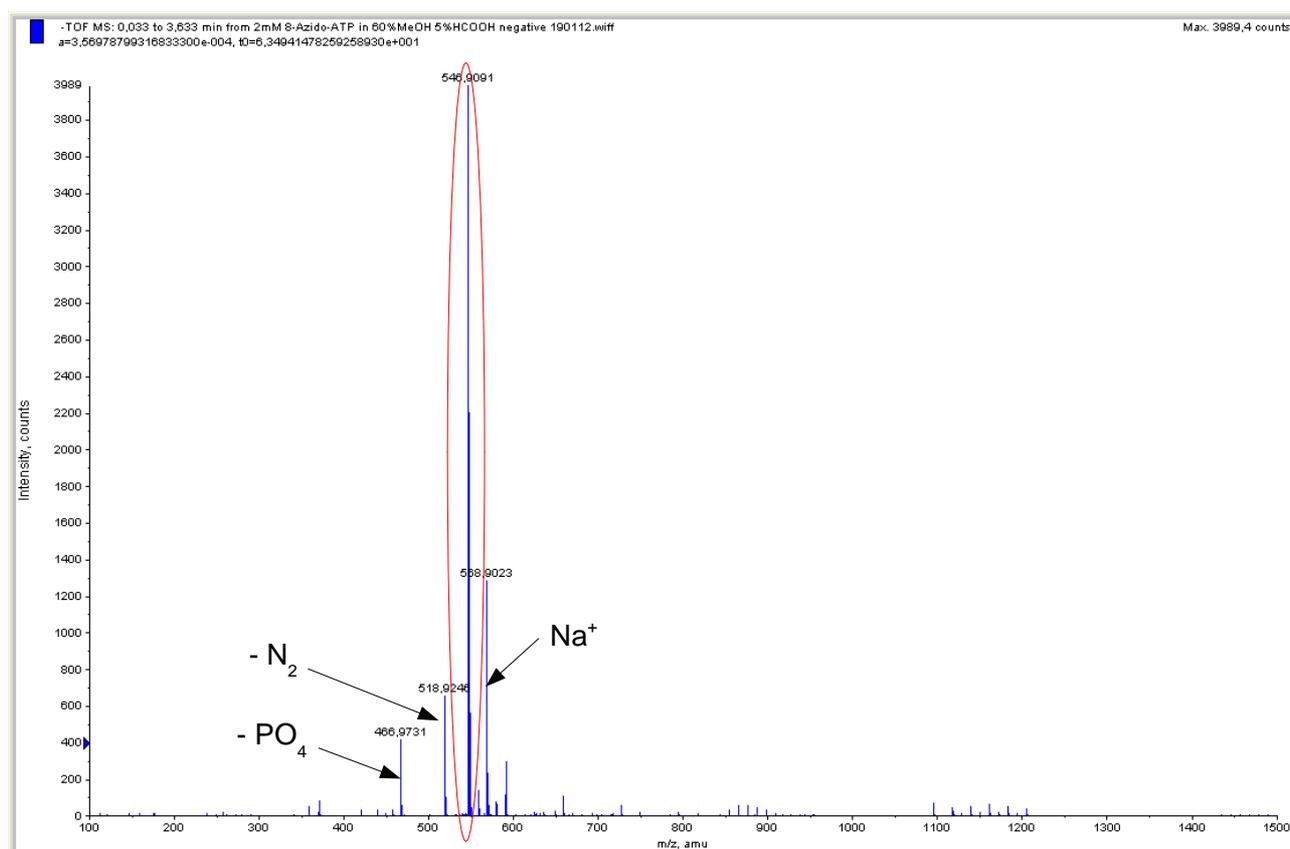


Abb. 4.34: Übersichtsspektrum von 8-Azido-ATP bei negativer Ionisierung via ESI-MS. Rot eingekreist ist das Signal des unmodifizierten Photoliganden bei einem m/z von 546,91. Mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet sind Signale, welche Fragmente des 8-Azido-ATPs darstellen und durch Abspaltung von molekularem Stickstoff aus der Azid-Gruppe in Position 8 ($m/z = 518,92$) bzw. Verlust einer Phosphat-Gruppe ($m/z = 466,94$) entstanden sind.

Aus diesem Grund wurde vor Beginn der Photoaffinity Labeling-Experimente zunächst ein Fragmentspektrum des 8-Azido-ATPs bei positiver Ionisierung im MS/MS-Modus aufgenommen und hieraus eine Liste aller beobachteten Monoisotopischen Massen der resultierenden Fragmente erstellt. Das erhaltene Fragmentspektrum sowie die daraus abgeleiteten Fragmente inklusive der dazugehörigen Monoisotopischen Massen sind in den folgenden beiden Abbildungen 4.35 und 4.36 gezeigt.

4.3.1 Photoaffinity Labeling von P-gp mit 8-Azido-ATP

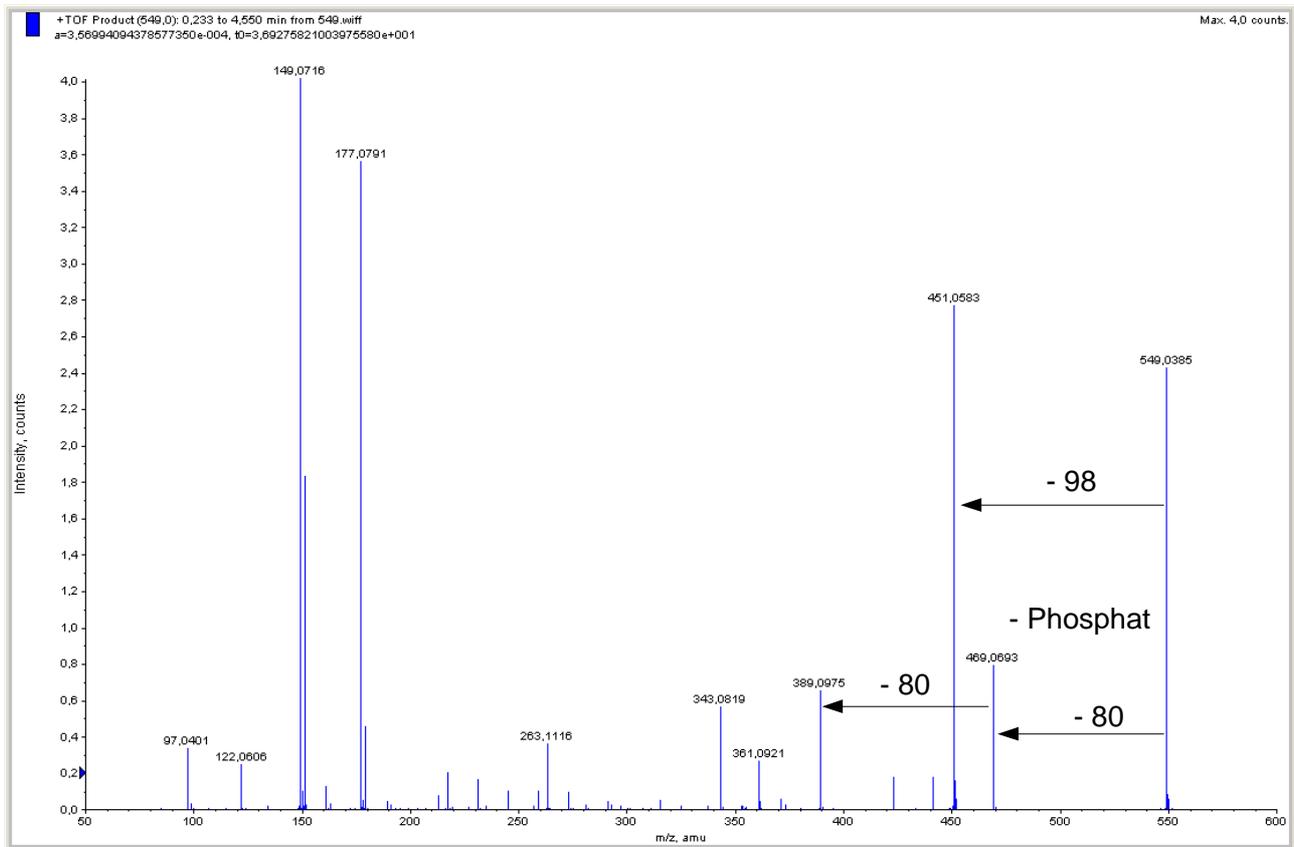


Abb. 4.35: Fragmentspektrum von 8-Azido-ATP bei positiver Ionisierung mittels ESI-MS. Der intakte Photoligand erscheint bei einem m/z von 549,02. Die Abspaltung einer Phosphat-Gruppe führt zu Signalen bei Masse-zu-Ladungsverhältnissen von 451,05 (- H_3PO_4) und 469,06 (- HPO_3^-) und der Verlust von zwei Phosphat-Gruppen ergibt ein Signal bei einem m/z von 389,09 (- $2 \times \text{HPO}_3^-$).

Die Auswertung des Fragmentspektrums ergab, dass das 8-Azido-ATP bei ausreichender Energiezufuhr fast vollständig in seine Grundbausteine Adenin, Ribose und Phosphat fragmentiert wurde. Insbesondere die Abspaltung von ein bzw. zwei Phosphat-Gruppen sowie von molekularem Stickstoff erfolgten sehr schnell und bereits bei niedriger Energiezufuhr, während für den Zerfall in die beiden Grundbausteine Adenin und Ribose deutlich höhere Energiemengen aufgewendet werden mussten. Der intakte Photoligand erscheint im Fragmentspektrum bei einem m/z von 549,02, der Verlust einer Phosphat-Gruppe wird durch Masse-zu-Ladungsverhältnisse von 451,05 (- H_3PO_4) bzw. 469,06 (- HPO_3^-) angezeigt und die Abspaltung von zwei Phosphat-Gruppen ergibt ein Signal bei

einem m/z von 389,09. Damit ergeben sich unter Einbeziehung aller theoretisch möglichen Fragmente die in der Abbildung 4.36 aufgeführten Monoisotopischen Massen, welche bei der Auswertung der Photoaffinity Labeling-Experimente von P-gp mit 8-Azido-ATP berücksichtigt werden müssen.

Auswertung MS/MS-Spektren

- Berücksichtigung von Massen, die aus dem Zerfall des 8-Azido-ATP resultieren → Massendifferenz

- + 521 (- N₂)
- + 441 (- N₂, HPO₃⁻)
- + 361 (- N₂, 2x HPO₃⁻)
- + 281 (- N₂, 3x HPO₃⁻)
- + 147 (- N₂, 3x HPO₃⁻, Ribose)
- - 80 / 98 (Verlust HPO₃⁻ / H₃PO₄)

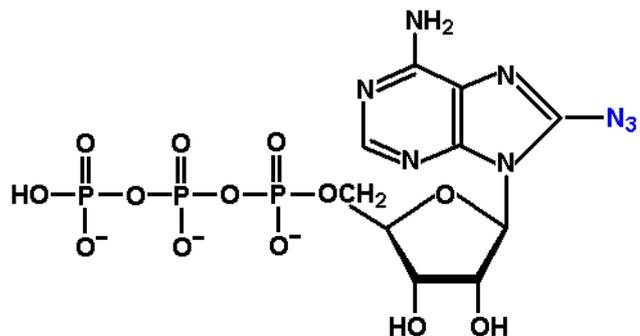


Abb. 4.36: Fragmente aus dem Zerfall des 8-Azido-ATPs. Die Abbildung zeigt die Monoisotopischen Massen $[M+H]^+$ sämtlicher Fragmente, welche durch den Zerfall des 8-Azido-ATPs entstehen können und bei der Auswertung der Photoaffinity Labeling-Experimente entsprechend berücksichtigt werden müssen.

Aufgrund der beschriebenen Besonderheiten von 8-Azido-ATP als Photoligand wurden zwei verschiedene Strategien für die Probenvorbereitung und massenspektrometrische Analyse erfolgreich markierter P-gp-Peptide verfolgt und im Hinblick auf die erzielten Ergebnisse miteinander verglichen. Die erste Strategie bestand aus der regulären Probenvorbereitung und Aufnahme von Massenspektren im Positivmodus der Ionisierung

entsprechend Kapitel 3.4.2. Die zweite Strategie repräsentierte die Anreicherung von durch 8-Azido-ATP markierten Peptiden mittels MOAC-Technik, gefolgt von der Aufnahme von Massenspektren im Positivmodus und im Negativmodus. Der Gedanke hinter dem Einsatz der MOAC-Technik war, dass sich mit 8-Azido-ATP markierte P-gp-Peptide aufgrund ihrer negativen Ladung in Analogie zu phosphorylierten Peptiden anreichern lassen, dadurch im Massenspektrum eine höhere Signalintensität zeigen und letztendlich in der Flut von unmodifizierten P-gp-Peptiden leichter detektiert werden können. Durch mehrere Waschschriffe sollten die meisten unmodifizierten P-gp-Peptide entfernt werden. Lediglich Peptide, welche wegen ihres hohen Anteils an sauren Aminosäuren (Aspartat und Glutamat) eine negative Nettoladung besitzen, stellen Störfaktoren dar. Aufgrund der Tatsache, dass sich der Photoligand besser im Negativmodus detektieren ließ als bei positiver Ionisierung, wurden die mit Hilfe der MOAC-Technik vorbereiteten Peptide in beiden Aufnahmemodi vermessen. Hierbei wurde neben Elektrospray-Ionisation auch MALDI-TOF für die massenspektrometrische Analyse eingesetzt. Beiden Strategien gingen identische Photoaffinity Labeling-Experimente mit P-gp voraus, bei denen immer jeweils eine Kontrolle (P-gp ohne Photoligand) und eine Probe (P-gp mit 1 mM 8-Azido-ATP) über eine definierte Zeitspanne (3; 6; 9 oder 12 Minuten) mit UV-Licht zweier verschiedener Wellenlängen (302 nm oder 365 nm) bestrahlt wurden. Auch der sich an die Photolabeling-Experimente anschließende In-Lösung-Verdau von P-gp mit der Standardprotease Trypsin laut Kapitel 3.3.1 wurde in beiden Fällen genau gleich durchgeführt. Die Wahl von Trypsin für den In-Lösung-Verdau von P-gp im Anschluss an die Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente erfolgte auf der wissenschaftlichen Grundlage, dass der Photoligand 8-Azido-ATP als ATP-Analogon im Bereich der ATP-Bindungsstelle von P-gp bindet [122, 123, 124]. Die ATP-Bindungsstelle von P-gp sowie die daran angrenzenden Regionen werden durch den Trypsin-In-Lösung-Verdau gut abgedeckt und einen weiteren Vorteil bietet die spezifische Spaltung der Protease nach den beiden basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, was die Aufnahme sowie die zeitintensive Auswertung von MS/MS-Spektren nicht erforderlich und Trypsin somit zum Enzym der 1. Wahl für den Verdau von P-gp macht.

Die Detektion von mit 8-Azido-ATP erfolgreich markierten Peptiden erfolgte durch Aufnahme von Übersichtsspektren des Trypsin-In-Lösung-Verdau der Kontrolle sowie der Probe und anschließende Überlagerung dieser Spektren. Signale, welche ausschließlich

im Probenspektrum beobachtet werden konnten, wurden im jeweiligen Ladungszustand dokumentiert und daraufhin durch Multiplikation der Masse m mit der Ladungszahl z und nachfolgende Subtraktion der erforderlichen Anzahl an Ladungsträgern in die Monoisotopischen Massen umgerechnet. Im Anschluss daran wurden von diesen Monoisotopischen Massen die aus dem Fragmentspektrum von 8-Azido-ATP resultierenden Massen (siehe Abbildungen 4.35 und 4.36) subtrahiert. Die so erhaltenen neuen Monoisotopischen Massen wurden in das GPMW Programm eingegeben und unter Beachtung aller vorgegebenen Parameter für den In-Lösung-Verdau von P-gp mit Trypsin (siehe Kapitel 3.4.2) den passenden Peptiden innerhalb der P-gp-Aminosäuresequenz zugeordnet. Dabei wurden ausschließlich die beiden spezifischen Schnittstellen für Trypsin C-terminal von Arginin und Lysin berücksichtigt sowie eine Toleranzgrenze für die Abweichung zwischen experimentell bestimmter und theoretischer Monoisotopischer Masse von 300 ppm eingehalten.

Die massenspektrometrische Analyse der mittels MOAC-Technik gewonnenen Peptide ergab, dass zwar einige bereits bekannte unmodifizierte P-gp-Peptide mit einem hohen Anteil an den sauren Aminosäuren Aspartat und Glutamat gefunden wurden, bedauerlicherweise aber kein einziges durch 8-Azido-ATP markiertes Peptid detektiert werden konnte. Hieraus lässt sich ableiten, dass die Bindung und Anreicherung von negativ geladenen P-gp-Peptiden mit Hilfe der MOAC-Technik im Allgemeinen zu funktionieren scheint, denn sonst hätten die negativ geladenen unmodifizierten P-gp-Peptide ebenfalls nicht detektiert werden können. Als mögliche Ursache für das Fehlen von markierten P-gp-Peptiden kommt somit als Erstes ein nicht erfolgreich verlaufenes Photoaffinity Labeling des Proteins mit dem Photoliganden 8-Azido-ATP in Betracht. Möglicherweise war die eingesetzte finale Konzentration des Photoliganden von 1mmol/l nicht hoch genug für ein effizientes Photolabeling von P-gp oder das Ausmaß der erfolgten Markierung von P-gp mit 8-Azido-ATP war so gering, dass die modifizierten P-gp-Peptide aufgrund ihrer sehr niedrigen Signalintensität im Rauschen untergingen und somit nicht detektiert wurden. Da die Photoaffinitätsmarkierung von Proteinen mit photoaktivierbaren Liganden durch viele verschiedene Faktoren (z. B. Proteinkonzentration, Konzentration des Photoliganden, Bestrahlungsdauer, Wellenlänge der verwendeten Lichtquelle, Lichtdurchlässigkeit der Probenlösung etc.) beeinflusst wird und zusätzlich einen vom Zufall gesteuerten Prozess darstellt (Photoaktivierung

erfolgreich?, geeigneter Reaktionspartner vorhanden?, Umlagerung/Stabilisierung?), kann das Ausmaß des Photolabelings von Experiment zu Experiment erheblich schwanken und gegebenenfalls so gering ausfallen, dass die Empfindlichkeit des zur Analyse verwendeten Massenspektrometers für eine Detektion nicht mehr ausreicht. Aus diesem Grund kann nicht abschließend geklärt werden, ob das der Probenvorbereitung mittels MOAC-Technik vorausgegangene Photoaffinity Labeling von P-gp mit 8-Azido-ATP erfolgreich stattgefunden hat oder nicht.

Dagegen ergab die massenspektrometrische Analyse der entsprechend Kapitel 3.4.2 regulär aufbereiteten und im Positivmodus vermessenen Peptide des Trypsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp nach durchgeführtem Photolabeling mit 8-Azido-ATP die in der nachfolgenden Tabelle 4.35 zusammengefassten „Massen-Fits“.

Dargestellt sind von links nach rechts die im Probenspektrum detektierten Peptidsignale im jeweiligen Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z), die entsprechenden Monoisotopischen Massen $[M+H]^+$, die subtrahierten Massen des Photoliganden, die sich aus der Subtraktion ergebenden Monoisotopischen Massen der markierten Peptide, deren Positionen innerhalb der P-gp-Sequenz, die räumliche Lage der Markierung innerhalb der P-gp-Struktur sowie die Aminosäuresequenzen der markierten Peptide. Die Werte der subtrahierten Massen repräsentieren hierbei die aus dem MS/MS-Spektrum von 8-Azido-ATP erhaltenen Fragmente. Sämtliche in der äußersten Spalte von links abgebildeten Peptidsignale der Tabelle entstammen im Positivmodus aufgenommenen Übersichtsspektren des Trypsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp nach Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 302$ nm über eine definierte Zeitspanne in Anwesenheit von final 1 mmol/l 8-Azido-ATP. Im Gegensatz dazu führte die Verwendung der längerwelligen Lichtquelle ($\lambda = 365$ nm) für die Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente augenscheinlich nicht zu einer erfolgreichen Markierung von P-gp mit dem Photoliganden, was durch die nur marginal vorhandene UV-Absorption von 8-Azido-ATP bei dieser Wellenlänge erklärt werden kann.

Tab. 4.35: Massen-Fits aus dem Photoaffinity Labeling von P-gp mit 8-Azido-ATP und nachfolgendem Trypsin-In-Lösung-Verdau. Dargestellt sind von links nach rechts das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) des jeweiligen Peptidsignals, die Monoisotopische Masse im einfach positiv geladenen Zustand, die subtrahierte Masse des Photoliganden, die sich nach der Subtraktion ergebende Monoisotopische Masse des markierten Peptids, die Position der Markierung innerhalb der P-gp-Sequenz, die räumliche Lage der Markierung innerhalb der P-gp-Struktur und die Aminosäuresequenz des markierten Peptids. Die Werte der subtrahierten Masse repräsentieren verschiedene Fragmente des 8-Azido-ATPs, welche zuvor durch Aufnahme eines Fragmentspektrums bestimmt wurden.

m/z	$[M+H]^+$	Subtrahierte Masse	Berechnete Masse	Position	Topologie	Sequenz
452,59 ³⁺	1355,77	360	995,77	381-389	Linker Nähe A-loop	SGHKPDNIK
496,97 ³⁺	1488,91	360	1128,91	1213-1222	NBD 1 NBD 2 Zwischen D- und H-loop	VVQEALDKAR
501,95 ³⁺	1503,85	440	1063,85	434-442	Walker A	STTVQLMQR
505,97 ³⁺	1515,91	520	995,91	381-389	NBD 1 Linker Nähe A-loop	SGHKPDNIK
766,03 ³⁺	2296,09	360	1936,09	1077-1093	Walker A NBD 2	STVVQLLERFYD PLAGK
910,80 ³⁺	2730,40	520	2210,40	1193-1212	Walker B + D-loop NBD 2	QPHILLLDEATSA LDTESEK
1125,96 ⁴⁺	4500,84	520	3980,84	1104-1138 + Na ⁺ + Ox.	Q-loop NBD 2	LNVQWLRAHLGI VSQEPILFDCSIAE NIAYGDNSR

Darüber hinaus wurde deutlich, dass die Bestrahlungsdauer einen wichtigen Parameter für den Erfolg der Photoaffinity Labeling-Experimente überhaupt sowie für das Ausmaß der Photoaffinitätsmarkierung von P-gp mit 8-Azido-ATP darstellte. Unter ansonsten gleichbleibenden Bedingungen wurden Zeitspannen für die Bestrahlung von 3, 6, 9 oder 12 Minuten gewählt und hinsichtlich des erfolgten Photolabelings von P-gp mit dem Photoliganden verglichen. Dabei zeigte sich, dass eine Bestrahlungsdauer von 3 bzw. 6 Minuten für eine erfolgreiche Photoaffinitätsmarkierung von P-gp mit 1 mM 8-Azido-ATP noch zu kurz war und erst ab einer Bestrahlungszeit von 9 Minuten ein Labeling von P-gp mit dem Photoliganden stattfand. Da sich die verwendete Lichtquelle mit einer

Wellenlänge von $\lambda = 302$ nm bereits nahe des Bereiches befindet, in dem üblicherweise aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin UV-Licht absorbieren ($\lambda = 280$ nm), ist eine Strahlenschädigung des Proteins bei längerer Bestrahlungsdauer nicht gänzlich auszuschließen. Demnach sollte die Bestrahlungszeit so kurz wie möglich, parallel dazu aber lang genug für die erfolgreiche Photoaktivierung und irreversible Bindung des Photoliganden an das Protein gewählt werden. Da eine Bestrahlungsdauer von 9 Minuten für den erfolgreichen Ablauf des Photoaffinity Labelings von P-gp mit 8-Azido-ATP ausreichend zu sein scheint, sollte wegen der stärkeren Strahlenschädigung des Proteins von einer Verlängerung der Bestrahlungszeit auf 12 Minuten abgesehen werden.

Aus der Tabelle 4.35 ist ersichtlich, dass im Rahmen der Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente mit P-gp und 8-Azido-ATP insgesamt 7 Regionen innerhalb der P-gp-Sequenz durch 8-Azido-ATP markiert wurden. Dabei fällt auf, dass von diesen sieben markierten Regionen zwei Bereiche unmittelbar aneinandergrenzen (AS 1193-1212 und AS 1213-1222). Damit liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Markierung durch den Photoliganden um eine spezifische Bindung handelt. Untersucht man die markierten Peptidsequenzen im Hinblick auf ihre räumliche Lage innerhalb der P-gp-Struktur, wird deutlich, dass alle markierten Regionen entweder Teil der ATP-Bindungsstelle sind oder sich in unmittelbarer Nähe zu dieser befinden. Damit befinden sich die erzielten Ergebnisse in gutem Einklang mit Literaturdaten, die besagen, dass das 8-Azido-ATP im Bereich der ATP-Bindungsstelle von P-gp binden soll [122, 123, 124].

Die markierten Peptide innerhalb der P-gp-Aminosäuresequenz sind in der Tabelle nach aufsteigenden Massen angeordnet. Beginnend mit der kleinsten Masse, erfolgte die Markierung von P-gp N-terminal des A-loops in der NBD 1 durch ein 360 Dalton großes Fragment des 8-Azido-ATPs. Dasselbe Peptid (AS 381-389) wurde auch durch das intakte 8-Azido-ATP-Molekül der Masse 520 Dalton markiert. Das nächstgrößere markierte Peptid befindet sich in der NBD 2 N-terminal des Q-loops, daran angrenzend wurde ein Peptid in der NBD 2 markiert, welches sowohl das Walker B-Motiv als auch den D-loop beinhaltet. Die weiteren markierten Peptidsequenzen innerhalb der P-gp-Sequenz umfassen das Walker A-Motiv in der NBD 1 und NBD 2, einen Bereich N-terminal des Walker A-Motivs in der NBD 1 sowie den Q-loop in der NBD 2. Es überwiegen zu gleichen Teilen die

4.3.1 Photoaffinity Labeling von P-gp mit 8-Azido-ATP

Markierungen durch das intakte 8-Azido-ATP-Molekül (520 Dalton) und ein Fragment (360 Dalton), welches durch den Verlust zweier Phosphat-Gruppen entstanden ist. Daneben fand eine Markierung von P-gp durch ein 440 Dalton schweres 8-Azido-ATP-Fragment statt, welches durch die Abspaltung einer Phosphat-Gruppe gebildet worden ist.



Abb. 4.37: Bildliche Darstellung der durch 8-Azido-ATP markierten Bereiche innerhalb der P-gp-Topologie. Potenziell gelabelte Regionen sind in pink eingefärbt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Photoaffinity Labeling von P-gp mit 8-Azido-ATP als Photoligand erfolgreich durchgeführt werden konnte und die experimentell erzielten Ergebnisse für die Photoaffinitätsmarkierungen mit Literaturdaten sehr gut in Einklang stehen. Da das Photolabeling von P-gp mit 8-Azido-ATP auch zur Testung der Übertragbarkeit und Anwendbarkeit der von Dr. Jens Meyer im Rahmen seiner Dissertation etablierten Methode für die Durchführung von Photoaffinitätsmarkierungs-Experimenten gedacht war, kann an dieser Stelle das Fazit gezogen werden, dass die Methode erfolgreich auf das eigene Testsystem übertragen und angewandt werden konnte. Aus diesem Grund wurde die beschriebene Methode auch für die weiteren Photoaffinity Labeling-Experimente mit den Verbindungen 2,4-Dihydroxybenzophenon, H15 und H19 eingesetzt.

4.3.2 Photoaffinity Labeling von P-gp mit 2,4-Dihydroxybenzophenon

Die Photoaffinitätsmarkierung von P-gp mit 2,4-Dihydroxybenzophenon erfolgte auf der Grundlage einer Publikation von Rancon et al. [127], in der postuliert wird, dass die Verbindung mit einem K_D -Wert von $1,15 \pm 0,36 \mu\text{M}$ mit der ATP-Bindungsstelle der NBD 2 von P-gp interagiert. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit durch das Photolabeling von P-gp mit 2,4-Dihydroxybenzophenon überprüft. Die Struktur von 2,4-Dihydroxybenzophenon ist in der nachfolgenden Abbildung 4.38 dargestellt.

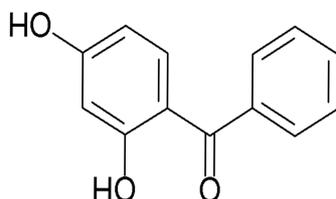


Abb. 4.38: Struktur von 2,4-Dihydroxybenzophenon

Wichtig für die Affinität zu P-gp sind laut der Veröffentlichung die Carbonylgruppe, die beiden Hydroxylgruppen in Position 2 und 4 und entweder keine Substitution des B-Ringes oder eine Methoxysubstitution in Position 4' [127]. Das Photolabeling-Experiment mit 2,4-Dihydroxybenzophenon wurde in Analogie zur Photoaffinitätsmarkierung von P-gp mit 8-Azido-ATP mit UV-Licht zweier verschiedener Wellenlängen $\lambda = 365 \text{ nm}$ und $\lambda = 302 \text{ nm}$ durchgeführt. Die Absorption der Benzophenon-Partialstruktur ist bei beiden Wellenlängen ausreichend für eine Anregung des Carbonylsauerstoffs zum Diradikal. Die Bestrahlungsdauer wurde bei Einsatz der längerwelligen Lichtquelle auf 15 Minuten festgesetzt, bei der Verwendung des kürzerwelligen UV-Lichtes wurde dagegen zur Vermeidung von Proteinschäden eine kürzere Bestrahlungszeit von 5 Minuten gewählt. Auf der Basis des in der Publikation angegebenen K_D -Wertes von $1,15 \pm 0,36 \text{ }\mu\text{M}$ wurden für die Photoaffinitätsmarkierung von P-gp zwei unterschiedliche Endkonzentrationen von $10 \text{ }\mu\text{mol/l}$ und 1 mmol/l 2,4-Dihydroxybenzophenon eingesetzt. Als Kontrolle dienten wiederum Proteinproben, die ohne den Photoliganden mit der jeweiligen Lichtquelle über die entsprechende Zeit bestrahlt wurden. Erfolgreich markierte Peptide wurden nach enzymatischem Verdau von P-gp mit Trypsin durch Vergleich der Übersichtsspektren von Kontrolle und Probe identifiziert.

Die praktische Durchführung des Photolabeling-Experiments mit 2,4-Dihydroxybenzophenon ist im Folgenden kurz zusammengefasst. In $100 \text{ }\mu\text{l}$ Quarzröhrchen wurden $24 \text{ }\mu\text{l}$ (Probe) bzw. $25 \text{ }\mu\text{l}$ (Kontrolle) Markierungspuffer (10 mmol/l Tris-HCl / 250 mmol/l Saccharose pH 7,4) mit einer $100 \text{ }\mu\text{l}$ Hamiltonspritze vorgelegt. Nachfolgend wurden mit Hilfe einer $10 \text{ }\mu\text{l}$ Hamiltonspritze jeweils $5 \text{ }\mu\text{l}$ aufgereinigtes P-gp sowie ein Mikrorührfisch hinzugefügt und gut durchmischt. Im Anschluss daran wurden 30 mmol/l und $300 \text{ }\mu\text{mol/l}$ Stammlösungen von 2,4-Dihydroxybenzophenon in Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Für eine Endkonzentration von $10 \text{ }\mu\text{mol/l}$ 2,4-Dihydroxybenzophenon wurde daraufhin $1 \text{ }\mu\text{l}$ der $300 \text{ }\mu\text{mol/l}$ Stammlösung, für eine finale Konzentration von 1 mmol/l 2,4-Dihydroxybenzophenon $1 \text{ }\mu\text{l}$ der 30 mmol/l Stammlösung in das Probenquarzröhrchen pipettiert. Proben und Kontrollen wurden in der Folge 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert, anschließend 15 Minuten auf Eis gekühlt und darauf unter andauerndem Rühren und Eiskühlung 15 Minuten bei 365 nm bzw. 5 Minuten bei 302 nm im UV-Crosslinker bestrahlt. Danach wurden die Ansätze mittels $100 \text{ }\mu\text{l}$ Hamiltonspritze in LoBind® Eppendorf-Gefäße überführt, mit $67,2 \text{ }\mu\text{l}$ 25 mmol/l

4.3.2 Photoaffinity Labeling von P-gp mit 2,4-Dihydroxybenzophenon

Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 8 und 2,85 μl Trypsin-Lösung ($c = 0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) entsprechend einem Enzym : Protein Verhältnis von 1 : 20 versetzt und 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde nachfolgend durch 10 minütiges Erhitzen bei 95 °C gestoppt, die Peptide in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und nach erfolgter Aufbereitung mittels ESI-MS analysiert.

Analog zu den vorausgegangenen Photolabeling-Experimenten mit 8-Azido-ATP wurde vor dem eigentlichen Photoaffinity Labeling von P-gp mit 2,4-Dihydroxybenzophenon zunächst ein Übersichtsspektrum des Photoliganden zur Bestimmung seiner exakten Monoisotopischen Masse bei positiver Ionisierung aufgenommen. Das resultierende Übersichtsspektrum ist in der nachfolgenden Abbildung 4.39 gezeigt

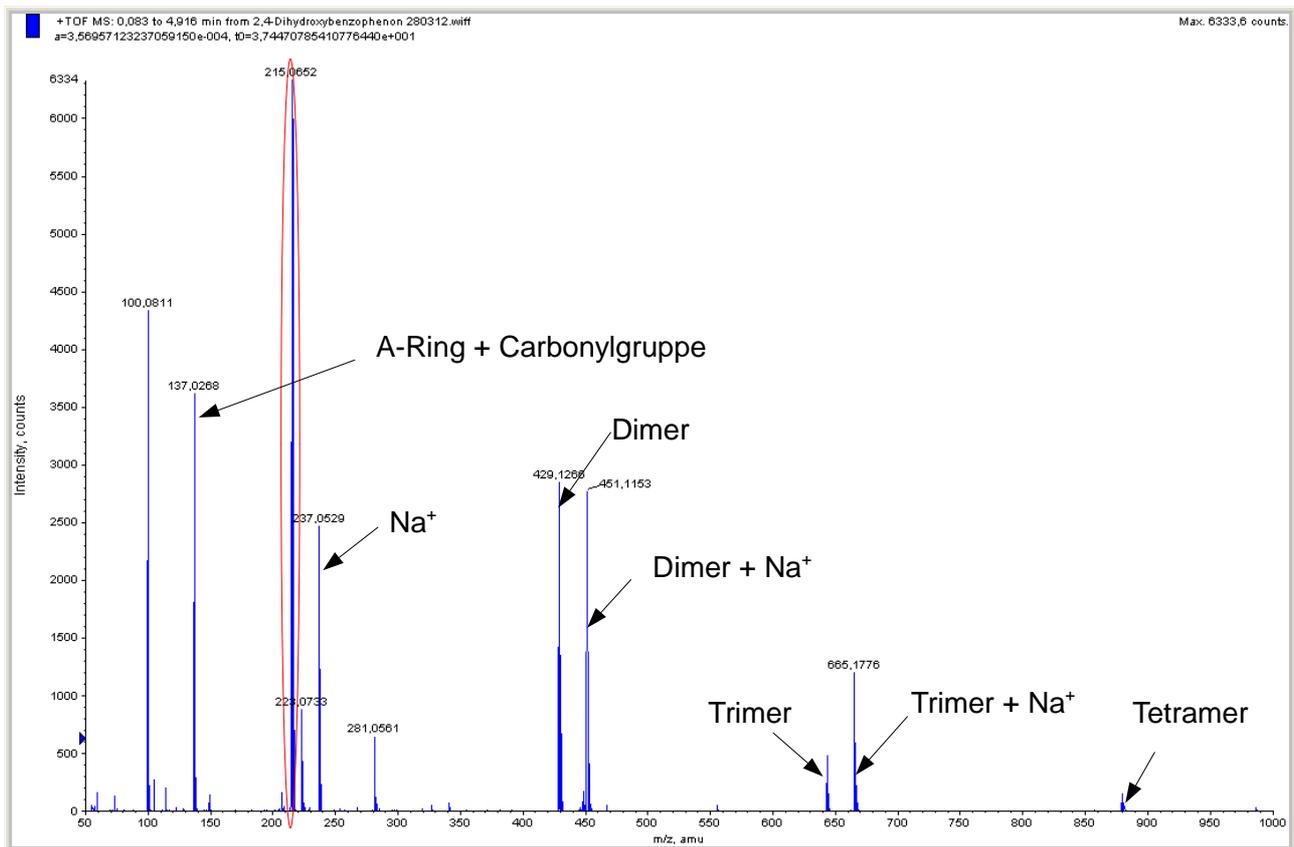


Abb. 4.39: Übersichtsspektrum von 2,4-Dihydroxybenzophenon bei positiver Ionisierung. Das intakte Molekül ergibt ein Signal bei einem m/z von 215,06 (rot eingekreist). Die übrigen Signale repräsentieren Aggregate des intakten Photoliganden (Dimer, Trimer und Tetramer sowie deren Natriumanlagerungen) bzw. Fragmente (z. B. A-Ring + Carbonylgruppe bei $m/z = 137,02$).

4.3.2 Photoaffinity Labeling von P-gp mit 2,4-Dihydroxybenzophenon

Der intakte Photoligand erscheint bei einem Signal von $m/z = 215,06$ und ist im Übersichtsspektrum durch eine rote Ellipse gekennzeichnet. Darüber hinaus sind einige weitere Signale zu sehen, die entweder Aggregate des intakten Moleküls (Dimer, Trimer, Tetramer sowie deren Natriumanlagerungen) oder Fragmente des 2,4-Dihydroxybenzophenons (z. B. A-Ring + Carbonylgruppe bei $m/z = 137,02$) darstellen. Aufgrund der Tatsache, dass der Photoligand bereits bei der Aufnahme des Übersichtsspektrums ohne die Zufuhr von Kollisionsenergie zerfallen ist, wurde im Anschluss daran ein Fragmentspektrum von 2,4-Dihydroxybenzophenon im MS/MS-Modus zur Bestimmung der exakten Monoisotopischen Massen der resultierenden Bruchstücke aufgenommen. Das erhaltene Fragmentspektrum von 2,4-Dihydroxybenzophenon ist in der folgenden Abbildung 4.40 zu sehen.

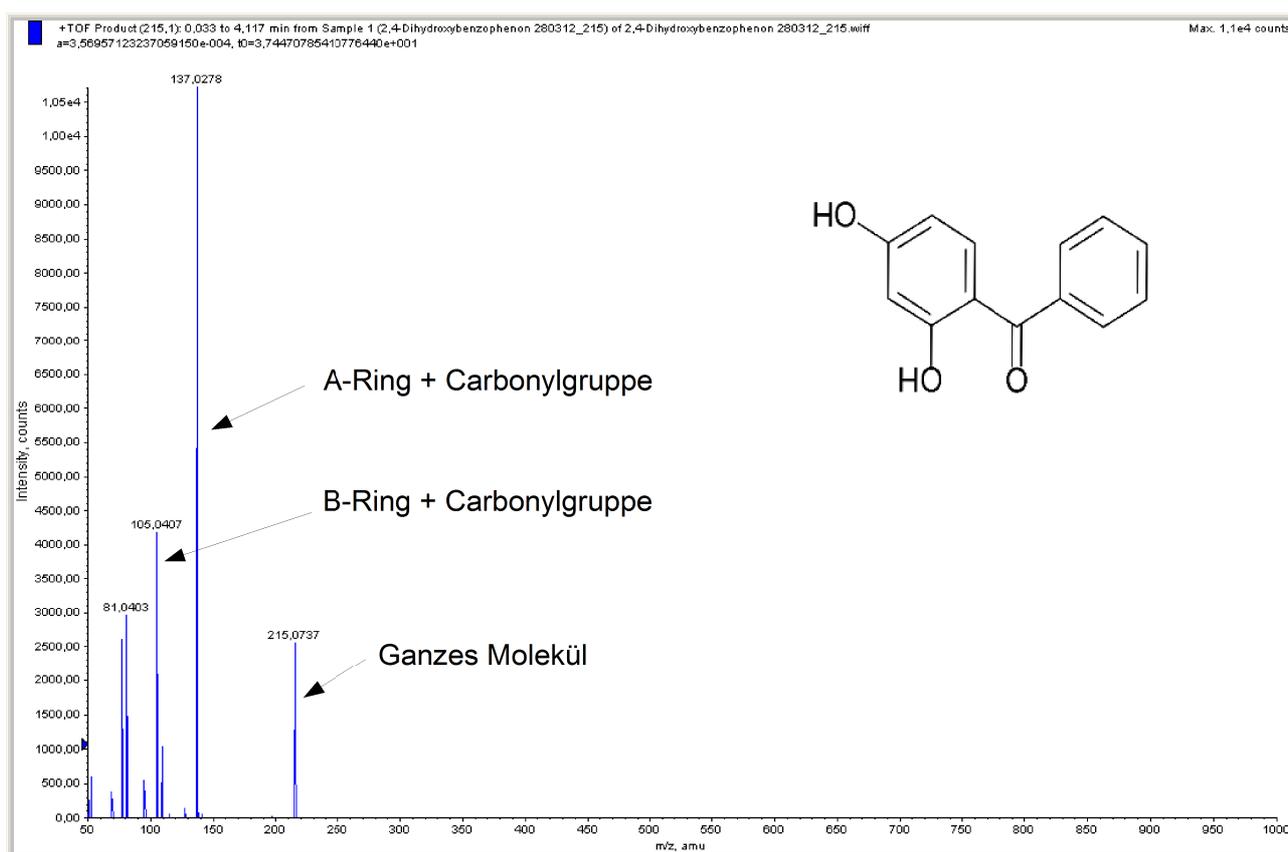


Abb. 4.40: MS/MS-Spektrum von 2,4-Dihydroxybenzophenon. Das intakte Molekül (Precursor) ist bei einem m/z von 215,07 zu sehen. Die beiden Signale bei Masse-zu-Ladungsverhältnissen von 137,02 und 105,04 repräsentieren die zwei Hauptfragmente der Verbindung: A-Ring + Carbonylgruppe und B-Ring + Carbonylgruppe.

4.3.2 Photoaffinity Labeling von P-gp mit 2,4-Dihydroxybenzophenon

Aus dem abgebildeten MS/MS-Spektrum des 2,4-Dihydroxybenzophenons ist ersichtlich, dass der Photoligand in zwei Hauptfragmente bei Masse-zu-Ladungsverhältnissen von 137,02 und 105,04 zerfällt, wobei das Bruchstück mit der höheren Masse den A-Ring samt Carbonylgruppe und das Fragment mit der kleineren Masse den B-Ring inklusive Carbonylgruppe darstellt. Durch Abspaltung der Carbonylgruppe vom A- bzw. B-Ring resultieren zwei weitere Signale bei einem m/z von 109,03 bzw. 77,04, welche in dem gezeigten MS/MS-Spektrum nur sehr schlecht zu sehen sind. Aus diesem Grund ist in der nachfolgenden Abbildung 4.41 ein vergrößerter Ausschnitt des zuvor abgebildeten MS/MS-Spektrums von 2,4-Dihydroxybenzophenon dargestellt, in dem die Signale des A- und B-Rings bei Masse-zu-Ladungsverhältnissen von 109,03 und 77,04 durch rote Ellipsen gekennzeichnet sind.

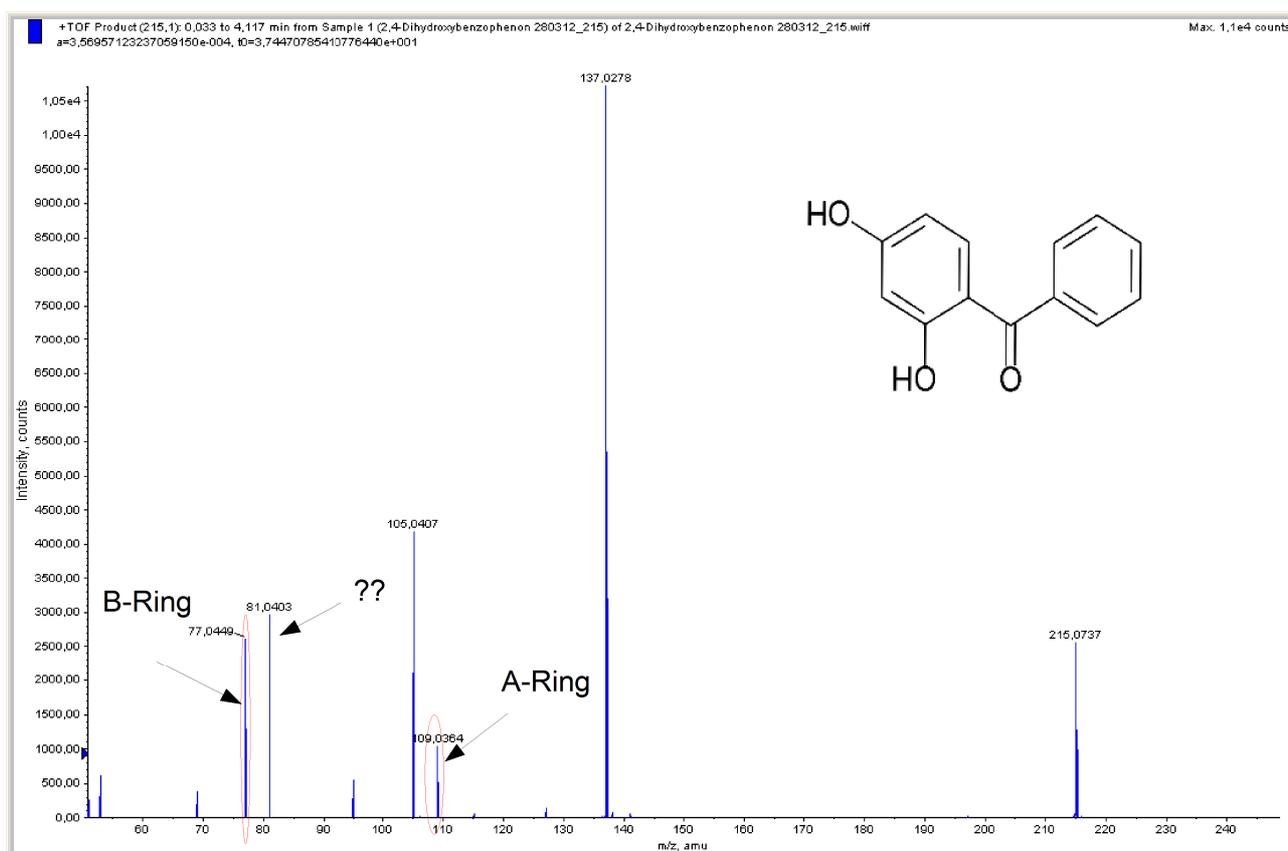


Abb. 4.41: Vergrößerter Ausschnitt des zuvor gezeigten MS/MS-Spektrums von 2,4-Dihydroxybenzophenon. Die beiden durch Abspaltung der Carbonylgruppe vom A- bzw. B-Ring resultierenden Signale sind im abgebildeten Spektrum durch rote Ellipsen gekennzeichnet.

Die Detektion von mit 2,4-Dihydroxybenzophenon erfolgreich markierten P-gp-Peptiden erfolgte in Analogie zum bereits beschriebenen Photolabeling von P-gp mit 8-Azido-ATP (siehe Kapitel 4.3.1) mit dem Unterschied, dass hier die aus dem Fragmentspektrum von 2,4-Dihydroxybenzophenon resultierenden Massen (siehe Abbildungen 4.40 und 4.41) von den Monoisotopischen Massen der Peptidsignale subtrahiert wurden.

Die erneute Wahl von Trypsin für den In-Lösung-Verdau von P-gp im Anschluss an die Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente erfolgte auf der wissenschaftlichen Grundlage, dass der Photoligand 2,4-Dihydroxybenzophenon mit der ATP-Bindungsstelle der NBD 2 von P-gp interagieren soll [127]. Die ATP-Bindungsstelle von P-gp sowie die daran angrenzenden Regionen werden durch den Trypsin-In-Lösung-Verdau gut abgedeckt. Außerdem bietet die spezifische Spaltung der Protease nach den beiden basischen Aminosäuren Arginin und Lysin wiederum den Vorteil, dass Aufnahme und zeitaufwendige Auswertung von MS/MS-Spektren entfallen können und Trypsin somit das Enzym der Wahl für den Verdau von P-gp darstellt.

Aus der massenspektrometrischen Analyse der entsprechend Kapitel 3.4.2 aufbereiteten und im Positivmodus vermessenen Peptide des Trypsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp nach durchgeführtem Photolabeling mit 2,4-Dihydroxybenzophenon ergaben sich die in der nachfolgenden Tabelle 4.36 zusammengefassten „Massen-Fits“.

Die Werte der subtrahierten Massen repräsentieren jeweils die im MS/MS-Spektrum von 2,4-Dihydroxybenzophenon beobachteten Fragmente. Die Farbkodierung der Tabelle gibt Auskunft über die für das Photolabeling verwendete Lichtquelle. In schwarz dargestellt sind die durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm für 15 Minuten markierten Regionen von P-gp. In blau abgebildet sind die mittels Bestrahlung bei 302 nm über 5 Minuten gelabelten Peptidsequenzen innerhalb von P-gp und in rot eingefärbt sind Bereiche, die mit UV-Licht beider Wellenlängen erfolgreich markiert werden konnten.

Tab. 4.36: Massen-Fits aus dem Photoaffinity Labeling von P-gp mit 2,4-Dihydroxybenzophenon und anschließendem Verdau mit Trypsin. Die Werte der subtrahierten Massen repräsentieren unterschiedliche Fragmente des 2,4-Dihydroxybenzophenons, welche zuvor durch Aufnahme eines Fragmentspektrums bestimmt wurden.

Farbkodierung: In schwarz abgebildet sind die durch Bestrahlung bei 365 nm für 15 min markierten Regionen von P-gp. In blau dargestellt sind mittels Bestrahlung bei 302 nm für 5 min gelabelte Sequenzen von P-gp. In rot eingefärbt sind Bereiche, die mit UV-Licht beider Wellenlängen erfolgreich markiert werden konnten.

m/z	[M+H] ⁺	Subtrahierte Masse	Berechnete Masse	Position	Topologie	Sequenz
1049,42 ¹⁺	1049,42	137	912,42	1226-1233	H-loop NBD 2	TCIVIAHR
1145,61 ²⁺	2290,22	215	2075,22	682-699	Linker NBD 1	LSTKEALDESIPP VSFWR
1391,56 ¹⁺	1391,56	137	1254,56	1223-1233	H-loop NBD 2	EGRTCIVIAHR
				406-416	NBD 1 zw. A-loop und Walker A	EVKILKGLNLK
1476,78 ²⁺	2952,56	137	2815,56	465-489	Q-loop NBD 1	FLREIIGVVSQEP VLFATTIAENIR
1390,78 ²⁺	2780,56	137	2643,56	551-575	Walker B + D-loop NBD 1	ILLLDEATSALDT ESEAVVQVALDK
1234,62 ²⁺	2468,24	137	2331,24	272-290	EAA-Motiv ICL 2	KELERYNKNLEEA KRIGIK
				273-291	EAA-Motiv ICL 2	ELERYNKNLEEAK RIGIKK
				1148-1168	Nähe ABC- Motiv NBD 2	AAKEANIHFIES LPNKYSTK
1173,59 ²⁺	2346,18	215	2131,18	412-433	Walker A NBD 1	GLNLKVQSGQTV ALVGNSSGCGK
		137	2209,18	1193-1212	Walker B + D-loop NBD 2	QPHILLLDEATSA LDTESEK
1123,61 ²⁺	2246,22	137	2109,22	646-664	Linker NBD 1 - TM7	SEIDALEMSSNDS RSSLIR
875,36 ²⁺	1749,72	215	1534,72	1086-1099	NBD 2 zw. Walker A und Q-loop	FYDPLAGKVLLD GK
859,19 ³⁺	2575,57	215	2360,57	360-380	Linker TM6 - NBD 1	GAAYEIFKIIDNKP SIDSYSK

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass im Zuge der Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente möglicherweise vierzehn Regionen innerhalb der P-gp-Aminosäuresequenz durch 2,4-Dihydroxybenzophenon markiert werden konnten. Von diesen 14 Regionen wurden drei Bereiche durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm für 15 Minuten, neun Peptidsequenzen durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm über 5 Minuten und eine Region unter Verwendung beider Lichtquellen über die jeweilige Bestrahlungszeit erfolgreich mit 2,4-Dihydroxybenzophenon gelabelt.

Auffällig ist, dass sich von den markierten Peptidsequenzen in drei Fällen jeweils zwei Peptidsequenzen überlappen (AS 1226-1233/AS 1223-1233; AS 406-416/AS 412-433; AS 272-290/AS 273-291), was die Vermutung nahelegt, dass es sich bei der Markierung durch den Photoliganden um eine spezifische Bindung handelt. Des Weiteren erkennt man bei der Betrachtung der subtrahierten Massen, dass die Markierung des Proteins mit dem Hauptfragment A-Ring + Carbonylgruppe (137 Dalton) wesentlich häufiger stattgefunden hat als diejenige mit dem intakten Photoliganden (215 Dalton).

Untersucht man die potenziell gelabelten Peptidsequenzen in Bezug auf ihre Topologie wird deutlich, dass alle markierten Regionen entweder Teil einer der beiden ATP-Bindungsstellen (NBD 1 oder NBD 2) sind oder sich in unmittelbarer Nähe zu diesen befinden. Die potenziell gelabelten Bereiche umfassen in der NBD 1 die Linker-Region, eine Sequenz N-terminal des Walker A-Motivs, den Q-loop, das Walker B-Motiv, den D-loop, das Walker A-Motiv und eine Sequenz N-terminal des A-loops. Innerhalb der NBD 2 konnten möglicherweise parallel dazu der H-loop, eine Sequenz N-terminal des ABC-Motivs, das Walker B-Motiv, der D-loop sowie eine Sequenz C-terminal des Walker A-Motivs mit 2,4-Dihydroxybenzophenon markiert werden. Darüber hinaus wurde eine mögliche Markierung des ICL 2 in der NBD 1 beobachtet.



Abb. 4.42: Bildliche Darstellung der durch 2,4-Dihydroxybenzophenon markierten Sequenzen innerhalb von P-gp. Potenziell gelabelte Bereiche sind in pink eingefärbt.

Aufgrund der Tatsache, dass wegen technischer Probleme des verwendeten Massenspektrometers von den in der Tabelle aufgeführten Peptidsignalen mit einer Ausnahme (1391,56¹⁺) keine MS/MS-Spektren aufgenommen bzw. ausgewertet werden

konnten, passen in drei Fällen mehrere Aminosäuresequenzen innerhalb der P-gp-Sequenz von ihrer Masse her zu dem betrachteten Peptidsignal und die Frage, welche der abgebildeten Peptidsequenzen sich nun tatsächlich hinter dem entsprechenden Peptidsignal verbirgt, muss an dieser Stelle in zwei von drei Fällen unbeantwortet bleiben, da die eindeutige Identifizierung der korrekten Aminosäuresequenz sowie der Position des Photoliganden innerhalb der Peptidsequenz nur durch Sequenzierung des Peptids im MS/MS-Modus erfolgen kann. In einem Fall wurde das im Probenspektrum detektierte Peptidsignal (1391,56¹⁺) jedoch selektiert und daran anschließend im MS/MS-Modus in seine Aminosäuren fragmentiert, um zu überprüfen, welche der beiden möglichen Peptidsequenzen (EGRTCIVIAHR oder EVKILKGLNLK) nun die korrekte Aminosäuresequenz darstellt, ob eine Bestimmung der Position der Photoaffinitätsmarkierung auf Aminosäureebene möglich ist und wenn ja, an welche der Aminosäuren des Peptids der Photoligand gebunden hat.

Das resultierende MS/MS-Spektrum des Peptidsignals 1391,56¹⁺ ist in der nachfolgenden Abbildung 4.43 dargestellt. Durch rote Ellipsen gekennzeichnet sind Signale, welche Teilsequenzen des Peptids repräsentieren. Hierbei stellt das kleine Signal ganz rechts mit einer Monoisotopischen Masse von 1391,56 Dalton das intakte Peptid, den sogenannten Precursor, dar. Das Signal links des Precursors bei einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 1049,42 zeigt eine um 342 Dalton kleinere Monoisotopische Masse als das intakte Peptid und ist durch den Verlust der drei Aminosäuren Glutamat, Glycin und Arginin (EGR) entstanden. Noch weiter links fällt ein äußerst intensives Signal mit einer Monoisotopischen Masse von 707,31 Dalton auf. Die Differenz zum vorhergehenden Signal mit dem m/z 1049,42 beträgt abermals 342 Dalton, was in diesem Falle der Abspaltung der beiden Aminosäuren Threonin und Cystein inklusive gebundenem Photoliganden (A-Ring + Carbonylgruppe) entspricht. Die beiden rot markierten Signale ganz links im Spektrum mit Masse-zu-Ladungsverhältnissen von 293,24 und 343,17 repräsentieren den C-Terminus (HR) und N-Terminus (EGR) des Peptids. Die Differenz zwischen dem Signal des N-Terminus und dem darauffolgenden Signal mit der Monoisotopischen Masse 547,21 Dalton beträgt genau 204 Dalton, was der Summe der Massen der beiden Aminosäuren Threonin (101 Dalton) und Cystein (103 Dalton) entspricht. Das letzte rot gekennzeichnete Signal im Spektrum bei einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 759,26 zeigt eine um 212 Dalton höhere Masse als das vorhergehende Signal der Masse 547,21

4.3.2 Photoaffinity Labeling von P-gp mit 2,4-Dihydroxybenzophenon

Dalton. Diese Massendifferenz repräsentiert die Summe der beiden Aminosäuren Valin (99 Dalton) und Leucin (113 Dalton).

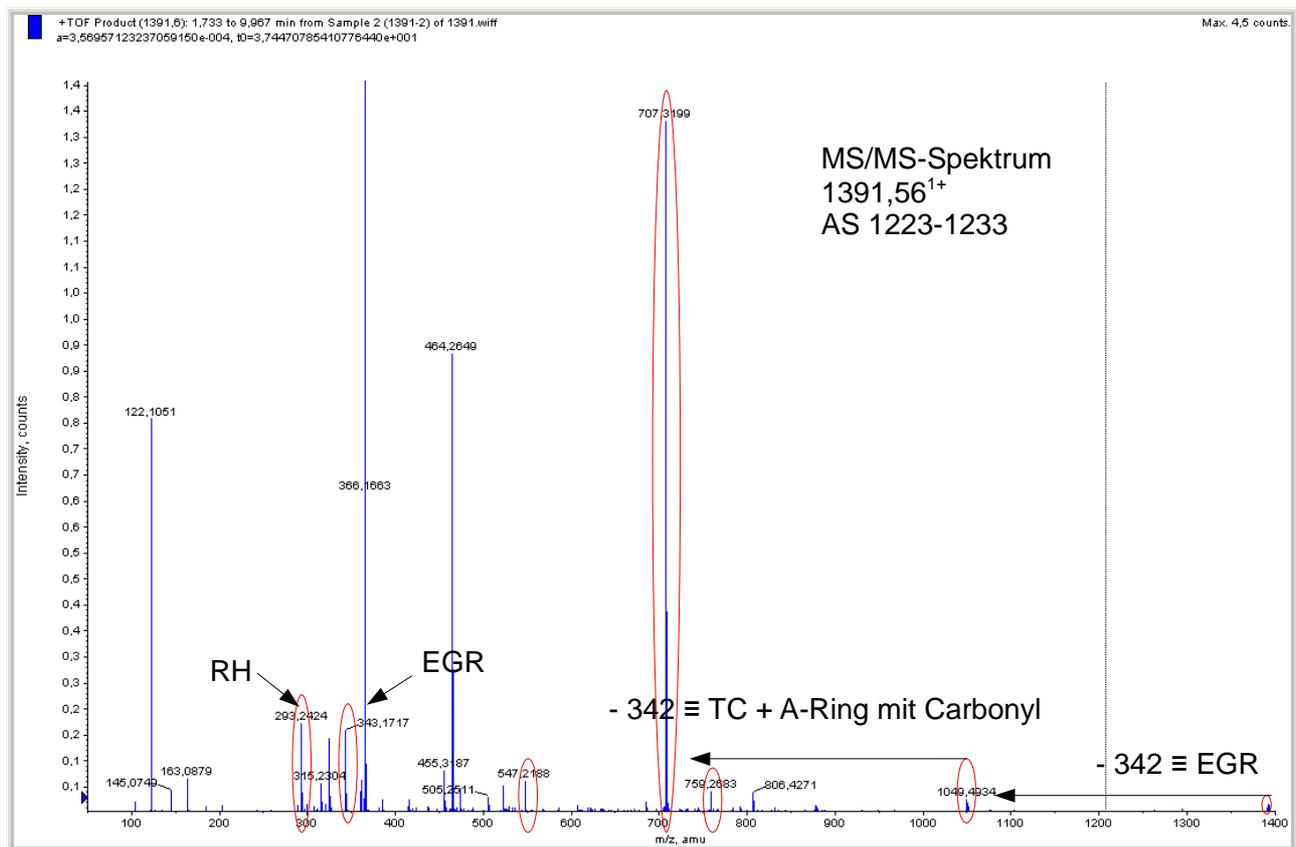


Abb. 4.43: MS/MS-Spektrum des Peptidsignals 1391,56¹⁺. Dargestellt ist am Beispiel des Peptidsignals 1391,56¹⁺ die Identifizierung der korrekten Aminosäuresequenz des Peptids sowie die Bestimmung der Position der erfolgten Photoaffinitätsmarkierung durch 2,4-Dihydroxybenzophenon innerhalb der Peptidsequenz. Signale, welche Teilsequenzen des Peptids repräsentieren, sind durch rote Ellipsen gekennzeichnet.

Unter Einbeziehung aller beobachteten Signale sowie ihres Zusammenhangs miteinander lautet die korrekte Aminosäuresequenz zum Peptidsignal 1391,56¹⁺ somit zweifelsfrei EGRTCIVIAHR. Diese Peptidsequenz beinhaltet den H-loop der NBD 2 und entspricht den Aminosäuren 1223-1233 der P-gp-Sequenz. Außerdem konnte das Photolabeling des Peptids mit 2,4-Dihydroxybenzophenon bestätigt und darüber hinaus sogar die Position der Photoaffinitätsmarkierung innerhalb des Peptids auf die beiden Aminosäuren

Threonin und Cystein in Position 1226 und 1227 eingegrenzt werden.

In der Literatur ist im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen lediglich eine Interaktion des 2,4-Dihydroxybenzophenons mit der ATP-Bindungsstelle der NBD 2 von P-gp beschrieben [127]. Dieses Fakt schließt jedoch nicht automatisch aus, dass der Photoligand nicht ebenfalls mit der in der NBD 1 enthaltenen ATP-Bindungsstelle von P-gp wechselwirken kann. Somit lässt sich abschließend das Fazit ziehen, dass die in der Literatur postulierte Interaktion von 2,4-Dihydroxybenzophenon mit der ATP-Bindungsstelle der NBD 2 von P-gp in der vorliegenden Arbeit durch Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente bestätigt werden konnte. Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit eine zusätzliche Wechselwirkung von 2,4-Dihydroxybenzophenon mit der ATP-Bindungsstelle der NBD 1 beobachtet, für die es allerdings noch keinen Hinweis durch Literaturdaten gibt.

4.3.3 Photoaffinity Labeling von P-gp mit H15

Das Phenothiazin-Derivat H15 beinhaltet als Photophor eine Benzophenon-Partialstruktur und lässt sich somit durch UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 365$ nm anregen. Die Struktur des P-gp-Inhibitors ist in der nachfolgenden Abbildung 4.44 dargestellt. Die Verbindung weist ein Molekulargewicht von 457 g/mol auf und wurde dankenswerterweise von Dr. Matthias Schmidt (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie) zur Verfügung gestellt.

Für den Photoliganden wurde in Anlehnung an die Dissertation von Dr. Jens Meyer eine Endkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ gewählt und die Bestrahlungsdauer bei 365 nm auf 20 Minuten festgesetzt. Als Kontrolle dienten wiederum Proteinproben, die in Abwesenheit des Photoliganden bestrahlt wurden. Markierte Peptide wurden nach enzymatischem Verdau von P-gp mit Chymotrypsin durch Vergleich der Übersichtsspektren von Kontrolle und Probe identifiziert. Die praktische Durchführung des Photolabeling-Experiments ist nachfolgend kurz zusammengefasst.

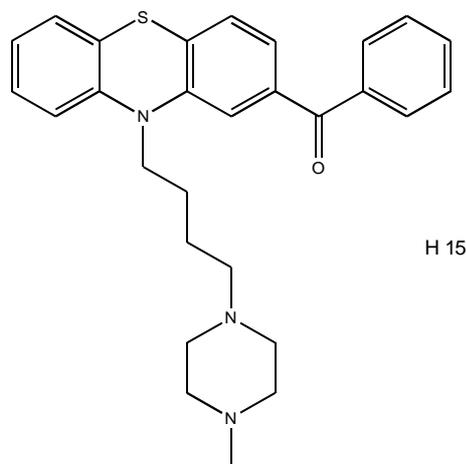


Abb. 4.44: Strukturformel von H15

In 100 μl Quarzröhrchen wurden 24 μl (Probe) bzw. 25 μl (Kontrolle) Markierungspuffer (10 mmol/l Tris-HCl / 250 mmol/l Saccharose pH 7,4) mit einer 100 μl Hamiltonspritze vorgelegt. Nachfolgend wurden jeweils 5 μl aufgereinigtes P-gp mittels 10 μl Hamiltonspritze und ein Mikrorührfisch hinzugefügt und gut durchmischt. Im Anschluss daran wurden 3 mmol/l und 300 $\mu\text{mol/l}$ Stammlösungen von H15 in Dimethylsulfoxid laut Tabelle 3.21 hergestellt. Für eine Endkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ Photoligand-Lösung wurde daraufhin 1 μl der 300 $\mu\text{mol/l}$ Stammlösung in das Probenquarzröhrchen pipettiert. Proben und Kontrollen wurden in der Folge 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert, 15 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend unter andauerndem Rühren und Eiskühlung 20 Minuten bei 365 nm im UV-Crosslinker bestrahlt. Danach wurden Proben und Kontrollen mittels 100 μl Hamiltonspritze in LoBind® Eppendorf-Gefäße überführt und mit dem Spaltungsreagenz Chymotrypsin proteolytisch gespalten. Einzelheiten des Verdaus sind Kapitel 3.2.2.2 zu entnehmen. Nach Beendigung des Verdaus wurden die erhaltenen Peptide in der Vakuum-Zentrifuge zur Trockene eingengt und nach erfolgter Aufbereitung mittels ESI-MS analysiert.

In Analogie zu den vorhergehenden Photolabeling-Experimenten mit 8-Azido-ATP und 2,4-Dihydroxybenzophenon wurde vor dem eigentlichen Photoaffinity Labeling von P-gp mit H15 zunächst ein Übersichtsspektrum des Photoliganden zur Bestimmung seiner exakten

4.3.3 Photoaffinity Labeling von P-gp mit H15

Monoisotopischen Masse bei positiver Ionisierung aufgenommen. Das resultierende Übersichtsspektrum ist in der nachfolgenden Abbildung 4.45 gezeigt.

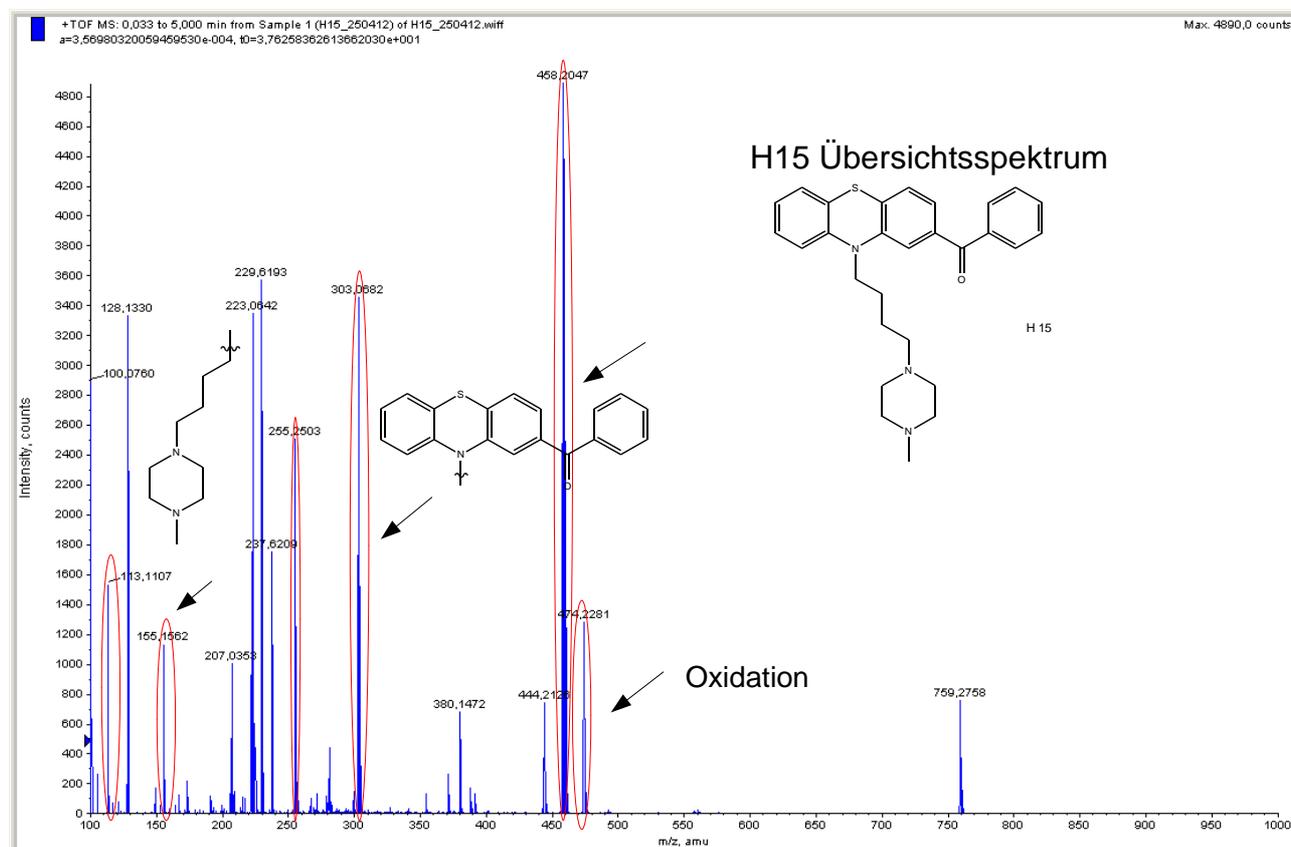


Abb. 4.45: Übersichtsspektrum von H15 bei positiver Ionisierung. Signale, die von H15 stammen, sind durch rote Ellipsen gekennzeichnet. Das intakte Molekül ergibt einen Peak bei $m/z = 458,20$. Zusätzlich erscheint es in oxidierter Form bei einem m/z von $474,22$. Die übrigen Signale bei Masse-zu-Ladungsverhältnissen von $303,06$; $255,25$; $155,15$ und $113,11$ repräsentieren verschiedene Fragmente des Photoliganden (Einzelheiten siehe Text).

Sämtliche von H15 stammenden Signale sind im abgebildeten Übersichtsspektrum durch rote Ellipsen gekennzeichnet. Das unversehrte Molekül erscheint in Form von zwei unterschiedlichen Peaks bei Masse-zu-Ladungsverhältnissen von $458,20$ und $474,22$. Das letztgenannte Signal stellt dabei höchstwahrscheinlich eine Oxidation des Photoliganden dar. Alle übrigen Signale repräsentieren verschiedene Fragmente von H15; beispielsweise ergibt die Abspaltung des Linkers samt Piperazin-Ring vom Phenothiazin-Grundgerüst zwei unterschiedliche Peaks bei Masse-zu-Ladungsverhältnissen von $303,06$ (Phenothiazin

4.3.3 Photoaffinity Labeling von P-gp mit H15

+ Benzophenon) und 155,15 (Linker + methyliertes Piperazin). Das Signal bei einem m/z von 113,11 ist durch den Verlust dreier CH_2 -Gruppen des Linkers aus dem Signal mit $m/z = 155,15$ hervorgegangen und entspricht dem methylierten Piperazin-Ring inklusive der verbliebenen CH_2 -Gruppe.

Aufgrund der Tatsache, dass der Photoligand bereits bei der Aufnahme des Übersichtsspektrums ohne die Zufuhr von Kollisionsenergie zerfallen ist, wurde im Anschluss daran ein Fragmentspektrum von H15 zur Bestimmung der exakten Monoisotopischen Massen der resultierenden Bruchstücke aufgenommen. Das erhaltene Fragmentspektrum von H15 ist in der folgenden Abbildung 4.46 zu sehen.

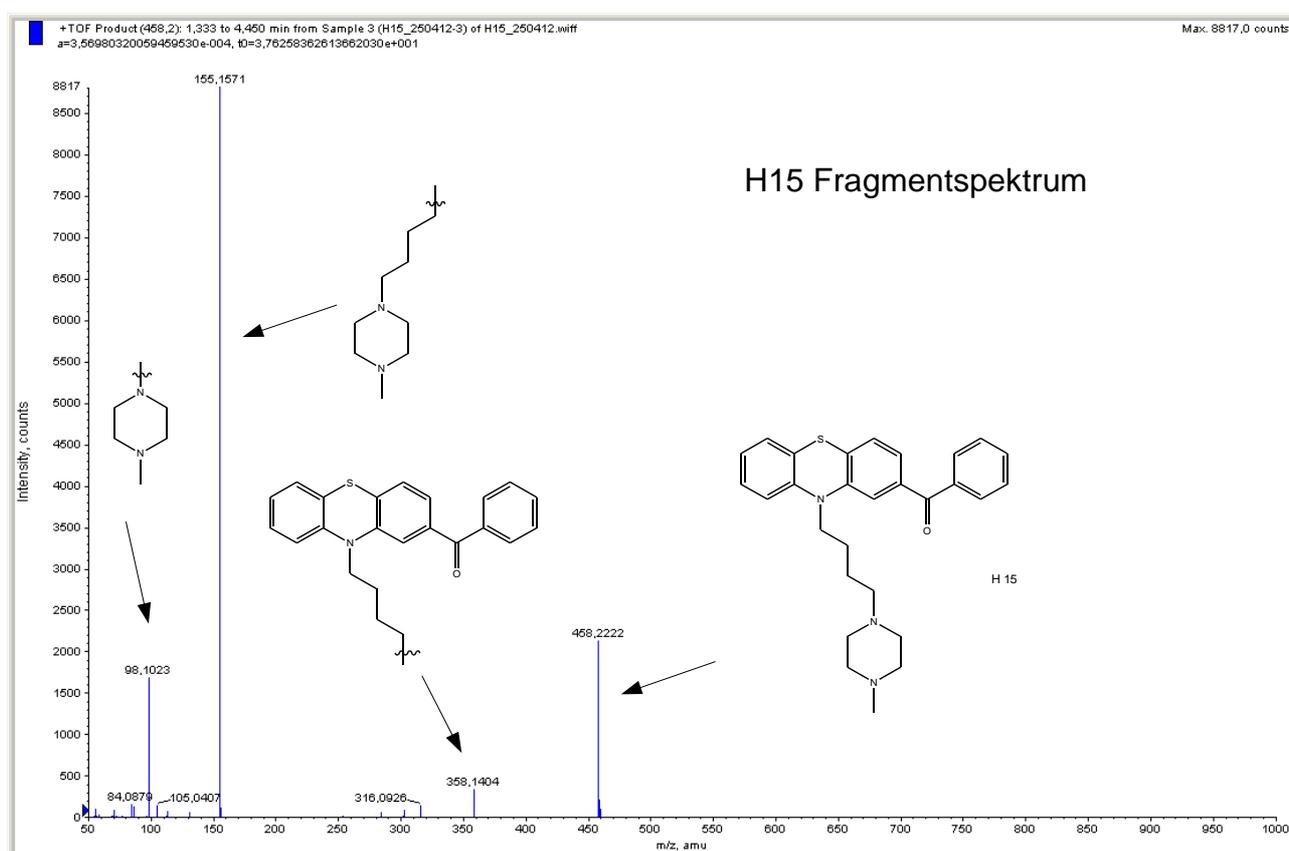


Abb. 4.46: MS/MS-Spektrum von H15. Das intakte Molekül (Precursor) ist bei einem m/z von 458,22 zu sehen. Die drei mit schwarzen Pfeilen markierten Signale bei Masse-zu-Ladungsverhältnissen von 358,14; 155,15 und 98,10 repräsentieren die Hauptfragmente der Verbindung: Phenothiazin-Grundgerüst + Benzophenon + Linker, methylierter Piperazin-Ring + Linker sowie methylierter Piperazin-Ring ohne Linker.

Aus dem gezeigten MS/MS-Spektrum von H15 ist ersichtlich, dass der Photoligand in drei Hauptfragmente bei Masse-zu-Ladungsverhältnissen von 358,14; 155,15 und 98,10 zerfällt, wobei das Bruchstück mit der größten Masse das Phenothiazin-Grundgerüst inklusive Benzophenon und Linker repräsentiert, das Fragment mit der mittleren Masse den methylierten Piperazin-Ring samt Linker darstellt und das Bruchstück mit der kleinsten Masse dem Piperazin-Ring ohne Linker entspricht. Darüber hinaus konnte im abgebildeten Fragmentspektrum von H15 ein kleiner Peak bei einem m/z von 316,09 beobachtet werden. Dieses Signal ist durch die Abspaltung von drei CH_2 -Gruppen des Linkers aus dem Signal bei einem Masse-zu-Ladungsverhältnis von 358,14 (Phenothiazin-Grundgerüst + Benzophenon + Linker) hervorgegangen und repräsentiert das Phenothiazin-Grundgerüst inklusive des Benzophenons und der verbliebenen CH_2 -Gruppe des Linkers.

Die Detektion von mit H15 markierten P-gp-Peptiden erfolgte durch Aufnahme von Übersichtsspektren des Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau der Kontrolle sowie der Probe und anschließende Überlagerung dieser Spektren. Signale, welche ausschließlich im Probenspektrum beobachtet werden konnten, wurden im jeweiligen Ladungszustand dokumentiert und daraufhin durch Multiplikation der Masse m mit der Ladungszahl z , gefolgt von der Subtraktion der erforderlichen Anzahl an Ladungsträgern, in die entsprechenden Monoisotopischen Massen $[M+H]^+$ umgerechnet. Im Anschluss daran wurden von diesen Monoisotopischen Massen die aus dem Fragmentspektrum von H15 resultierenden Massen (siehe Abbildung 4.46) subtrahiert. Die so erhaltenen neuen Monoisotopischen Massen wurden in das GPMW Programm eingegeben und unter Berücksichtigung aller vorgegebenen Parameter für den In-Lösung-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin (siehe Kapitel 3.4.2) den passenden Peptiden innerhalb der P-gp-Aminosäuresequenz zugeordnet. Dabei wurden sowohl die bevorzugten Schnittstellen von Chymotrypsin innerhalb der P-gp-Aminosäuresequenz (C-terminal von Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin) berücksichtigt als auch eine Toleranzgrenze für die Abweichung zwischen experimentell bestimmter und theoretischer Monoisotopischer Masse von 300 ppm eingehalten.

Die Wahl von Chymotrypsin für den In-Lösung-Verdau von P-gp im Anschluss an die Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente erfolgte auf der wissenschaftlichen Grundlage,

dass der Photoligand H15 als P-gp-Inhibitor mit den innerhalb der transmembranären Domänen lokalisierten Bindungsstellen von P-gp interagieren soll [43 - 47, 49, 67 - 82]. Die transmembranären Helices wurden aufgrund des Mangels an spezifischen Schnittstellen von der Standardprotease Trypsin so gut wie überhaupt nicht abgedeckt (siehe Kapitel 4.2.2.1). Auch mit dem chemischen Spaltungsreagenz Bromcyan konnte lediglich eine teilweise Abdeckung der transmembranären Helices 1, 3, 11 und 12 erreicht werden (siehe Kapitel 4.2.2.3). Verglichen damit, wurden mit den beiden unspezifischen Proteasen Pepsin und Elastase zufriedenstellendere Sequenzabdeckungen der transmembranären Bereiche erzielt (siehe Kapitel 4.2.2.4 und 4.2.2.5). Aufgrund des sehr unspezifischen Spaltungsverhaltens dieser beiden Enzyme würde sich die Auswertung der Photolabeling-Experimente jedoch äußerst schwierig gestalten. Somit ergab sich als Enzym der Wahl das Chymotrypsin, welches einen guten Kompromiss zwischen einer passablen transmembranären Sequenzabdeckung, bedingt durch das Vorhandensein ausreichender Schnittstellen in den TMDs (siehe Kapitel 4.2.2.2) und der Auswertbarkeit der Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente aufgrund des spezifischeren Spaltungsverhaltens darstellt.

Aus der massenspektrometrischen Analyse der entsprechend Kapitel 3.4.2 aufbereiteten und im Positivmodus vermessenen Peptide des Chymotrypsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp nach durchgeführtem Photoaffinity Labeling mit H15 resultierten die in der nachfolgenden Tabelle 4.37 zusammengefassten „Massen-Fits“.

Die Werte der subtrahierten Massen repräsentieren jeweils die im MS/MS-Spektrum von H15 beobachteten Fragmente. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink eingefärbt. Der Tabelle ist zu entnehmen, dass insgesamt 9 potenzielle Markierungen mit mehr als 60 theoretisch möglichen Aminosäuresequenzen innerhalb der P-gp-Topologie detektiert werden konnten. Die Vielzahl der von der Masse her passenden Peptide innerhalb der P-gp-Sequenz liegt hier sowohl in der unspezifischen Spaltung des Chymotrypsins als auch in der Menge der beobachteten Fragmente von H15 begründet.

4.3.3 Photoaffinity Labeling von P-gp mit H15

Tab. 4.37: Massen-Fits aus dem Photoaffinity Labeling von P-gp mit H15 und nachfolgendem Verdau mit Chymotrypsin. Die Werte der subtrahierten Massen repräsentieren unterschiedliche Fragmente von H15, welche zuvor durch Aufnahme eines Fragmentspektrums bestimmt wurden. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink abgebildet.

m/z	[M+H] ⁺	Subtrahierte Masse	Berechnete Masse	Position	Topologie	Sequenz
526,96 ³⁺	1578,88	458,22	1120,66	341-352 768-777	TM6/Linker TM8	GAFSVGQASPSI ITFFLQGFTF
540,96 ³⁺	1620,88	458,22	1162,66	591-601 57-68 702-710 491-500	Linker TM1 Linker NBD 1	TVRNADVIAGF AAIIHGAGLPLM KLNLTEWPY GRENVTMDEI
		358,14	1262,74	921-931 1247-1257	ICL 4 NBD 2	AQSLQVPYRNS QNGRVKEHGTH
		303,07	1317,81	305-315 105-114 + Ox. 61-72 + 2x Ox.	TM5 ECL 1 TM1	LIYASYALAFW MNLEEDMoxTRY HGAGLPLMoxMoxLV F
579,66 ³⁺	1736,98	458,22	1278,76	228-239	TM4/ICL 2	SAAVWAKILSSF
		358,14	1378,84	1011-1022 937-948 + Ox. 1022-1034 + Ox. 612-622 + Ox.	Linker TM11 Linker Linker	IIEKTPLIDSYS IFGITFSFTQMox STEGLMoxPNTLEGN HDELMoxKEKGIY
615,64 ³⁺	1844,92	458,22	1386,70	213-225 236-247 93-104 1187-1198	ECL 2/TM4 TM4/ICL 2 ECL 1 Walker B	KLTLVILAI SPVL LSSFTDKELLAY TNRSDINDTGFF ARALVRQPHILL
		358,14	1486,78	865-878 + Ox. 789-799 786-796	TM10/ICL 4 ICL 3 ICL 3	VPIIAIAGV VEMKMox RYMVFRSMLRQ KRLRYMVFRSM
		316,09	1528,83	815-829 66-78 + 2x Ox.	ICL 3 TM1/ECL 1	TTRLANDAAQVKGAI PLMoxMoxLVFGEMT DI
643,65 ³⁺	1928,95	458,22	1470,73	819-833 865-878	ICL 3/TM9 TM10/ICL 4	ANDAAQVKGAIGSRL VPIIAIAGV VEMKM
		358,14	1570,81	704-716	Linker/TM7	NLTEWPYFVVGVF

4.3.3 Photoaffinity Labeling von P-gp mit H15

				1185-1198	Walker B	AIARALVRQPHILL
		316,09	1612,86	972-986 + Ox.	ECL 6/TM12	EDVLLVFS Mox
758,59 ²⁺	1516,18	458,22	1057,96	1010-1018	Linker	MIIEKTPLI
				1009-1017	Linker	IMIIEKTPL
				532-541	ABC-Motiv	SGGQKQRIAI
				1177-1186	ABC-Motiv	SGGQKQRIAI
				248-258	ICL 2	AKAGAVAEVVL
				819-829	ICL 3	ANDAAQVKGAI
				99-107	ECL 1	NDTGFFMNL
				68-76	TM1/ECL 1	MMLVFGEMT
				71-79	TM1/ ECL 1	VFGEMTDIF
				763-772	TM8	GIISFITFFL
		358,14	1158,04	1261-1270	C-Terminus	LAQKGIYFSM
				524-535	ABC-Motiv	VGERGAQLSGGQ
				521-531	ABC-Motiv	DTLVGERGAQL
816,92 ⁴⁺	3264,68	458,22	2806,46	854-879	TM10/ICL 4	GWQLTLLLLLAIVPIIAI AGVEMKML
				562-587	D-loop/ H-loop	DTESEAVVQVALDKA RKGRTTIVIAH
		358,14	2906,54	945-969	TM11/ECL 6	TQAMMYFSYAGCFR FGAYLVAHKLM
				830-856	ICL 3/TM9/ TM10	GSRLAVITQNIANLG TGIISFIYGWQ
		316,09	2948,59	187-212	ICL 1/ TM3/ECL 2	GDKIGMFFQSMATFF TGFIVGFTRGW
1237,56 ¹⁺	1237,56	458,22	779,34	1109-1115	NBD 2	LRAHLGI
				852-857	TM9/10	IYGWQL
				131-136	TM2	IQVSFW
		358,14	879,42	191-197 + 2x Ox.	TM3	GMoxFFQSMox
		316,09	921,47	972-979	ECL 6/TM12	EDVLLVFS
				197-204	TM3	MATFFTGF
1265,59 ¹⁺	1265,59	458,22	807,37	844-852	TM9	GTGIIISF
				712-719	TM7	VGVFCAI
		358,14	907,45	751-758	ECL 4/TM8	NSNFLSLL
				944-950 + Ox.	TM11	FTQAMMoxY
				945-951 + Ox.	TM11	TQAMMoxYF
		316,09	949,50	784-790	ICL 3	LTKRLRY

Bedauerlicherweise musste in der vorliegenden Arbeit die Frage, welches der vielen theoretisch möglichen Peptide nun das markierte Peptid darstellt, aufgrund des Fehlens von MS/MS-Daten unbeantwortet bleiben, da wegen technischer Probleme des verwendeten Massenspektrometers keine Aufnahme bzw. Auswertung von Fragmentspektren erfolgen konnte und somit eine Sequenzierung leider nicht möglich war. Demnach kann über die Lage der potenziell markierten Regionen innerhalb der P-gp-Topologie nur spekuliert werden. Diese erstrecken sich möglicherweise auf Teile der meisten transmembranären Helices und intrazellulären Loops. Darüber hinaus könnten Teilsequenzen der beiden Nukleotidbindungsdomänen, der Linker-Regionen, der extrazellulären Loops 1, 2, 4 und 6 sowie des C-Terminus mit H15 markiert worden sein. Dass in der Praxis eine Markierung aller genannten Regionen mit H15 stattgefunden haben soll, ist jedoch als äußerst unwahrscheinlich anzusehen.

Ein Abgleich dieser potenziell markierten Bereiche mit Literaturdaten würde ein hohes Maß an Übereinstimmungen ergeben. Bezogen auf die P-gp-Sequenz lägen diese Übereinstimmungen zwischen den Aminosäuren in Position 182 und 1171. Dieser Bereich umfasst die transmembranären Helices 3 - 12, die extrazellulären Loops 2 - 6, die intrazellulären Loops 2 - 4 sowie beide Nukleotidbindungsdomänen. Dagegen wurde für die Sequenzabschnitte N-terminal der Aminosäure 182 und C-terminal der Aminosäure 1171 in keiner der publizierten Vergleichsarbeiten eine Markierung identifiziert und folglich konnte in diesen Regionen auch keine Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen gefunden werden.

Bei genauerer Betrachtung der Tabelle wird deutlich, dass ein paar der möglicherweise markierten Peptidsequenzen direkt aneinandergrenzen und sich teilweise sogar überlappen. Außerdem erkennt man, dass sich in einigen Fällen mehrere der abgebildeten Peptide zu einem gemeinsamen Sequenzbereich zusammenfassen lassen. Diese Beobachtung könnte bedeuten, dass in der Tat gewisse Regionen bevorzugt durch den Photoliganden markiert worden sind. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass eine Markierung mit H15 in diesen Bereichen tatsächlich stattgefunden hat und die Annahme unterstützt, dass es sich bei der Markierung um eine spezifische Bindung im Bereich der Bindungsstelle des Photoliganden handelt.

Ein Vergleich der herangezogenen Publikationen hinsichtlich des verwendeten Photoliganden, der Methode zur Identifizierung markierter Sequenzabschnitte sowie des Spenderorganismus ergab diesbezüglich erhebliche Unterschiede. So wurde neben humanem P-Glykoprotein [47, 136, 139] auch P-gp aus dem Hamster [135, 138] und der Maus [137, 140] eingesetzt, welche eine zu mehr als 90 % identische Aminosäuresequenz aufweisen. Dagegen zeigen die verwendeten Photoliganden aufgrund der Tatsache, dass es sich um Abwandlungen bekannter Substrate und Modulatoren von P-gp handelt, eine hohe strukturelle Diversität. Zum Einsatz kamen photoaktivierbare Derivate der P-gp-Modulatoren Nicardipin (Azidopin [136] und Iodipin [135]), Dexniguldipin (B9209-005 [139]), Prazosin (Iodoaryl-Azidoprazosin [137, 138]) und Propafenon (GPV51 [47]) sowie der P-gp-Substrate Paclitaxel (3'-BzDC-Taxol und 7-BzDC-Taxol [140]) und Daunomycin (Iodomycin [135]). Auch die zur Identifizierung markierter Peptide verwendeten Analysemethoden Immunopräzipitation (IP), Massenspektrometrie (MS) und Kombinationen aus der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit der Edmansequenzierung (LC-Edman) oder der Massenspektrometrie (LC-MS) zeigten bezüglich der Genauigkeit, mit der der Ort der Modifikation durch den Photoliganden bestimmt werden konnte, deutliche Unterschiede. So betrug das kleinste mit Hilfe der Immunopräzipitation detektierte Fragment 29 Aminosäuren [137]. Daneben wurden jedoch auch markierte Peptide mit einer Länge von über 240 Aminosäuren beobachtet [136]. Zu einer besseren Eingrenzung des Ortes der Modifikation führte die LC-Edman-Analyse, bei der das kleinste Peptid mit 42 Aminosäuren zwar etwas größer ausfiel als bei der Immunopräzipitation, das größte Fragment jedoch mit 82 Aminosäuren wesentlich kleiner war. Die besten Ergebnisse lieferte allerdings die Analyse der Peptide mit Hilfe der Massenspektrometrie. Hierbei konnte der Ort der Markierung auf minimal 4 bis maximal 59 Aminosäuren eingegrenzt und somit die bis dato beste Auflösung erreicht werden.

Trotz der beschriebenen Unterschiede wurde eine Region innerhalb der P-gp-Sequenz (Aminosäuren 243 - 271) von vier der insgesamt acht in der Literatur verwendeten Photoliganden markiert. Zusätzlich dazu erfolgte in unmittelbarer Nähe dieses Sequenzabschnittes eine Markierung durch das Propafenon-Derivat GPV51. Auch für den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Photoliganden H15 könnten in dem erwähnten Sequenzbereich zwei unmittelbar aneinandergrenzende markierte Peptide identifiziert

worden sein (Aminosäuren 236 - 247 und 248 - 258), sowie eine Markierung in der direkten Umgebung dieser Region (Aminosäuren 228 - 239). Die genannte Sequenz würde sich innerhalb der P-gp-Topologie im Bereich des intrazellulären Loops zwischen der TM4 und der TM5 (ICL 2) befinden.

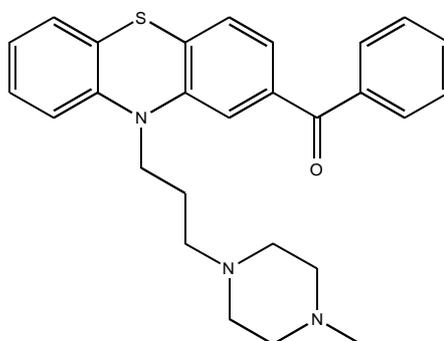
Darüber hinaus wurden die in der vorliegenden Arbeit identifizierten potenziellen Markierungen auf ein von Globisch et al. [68] auf der Basis des bakteriellen ABC-Transporters Sav 1866 erstelltes Homologiemodell von P-gp übertragen und überprüft, inwieweit Übereinstimmungen zwischen den drei postulierten Bindungsstellen des Modells und den möglicherweise gefundenen markierten Peptiden bestanden. Die drei theoretischen Bindungsstellen des Homologiemodells stehen in guter Übereinstimmung mit Bereichen, die sich in Mutations-, Crosslinking- und Photoaffinitätsmarkierungs-Experimenten als wichtig für die Ligand / Rezeptor-Interaktion herausgestellt haben und befinden sich zwischen den Aminosäuren 69 und 1004 innerhalb der P-gp-Sequenz. Die Bindungsstelle 1 setzt sich demnach überwiegend aus den vier intrazellulären Loops ICL 1 - 4 zusammen. Daneben sind die Linker-Regionen zwischen den Nukleotidbindungsdomänen und den transmembranären Helices 6 und 12 sowie die unteren Teile der transmembranären Helices 2, 5, 8 und 11 an dieser Bindungsstelle beteiligt [68]. Von den genannten Bereichen könnten in der vorliegenden Arbeit mehrere Abschnitte durch den Photoliganden H15 markiert worden sein, so dass sich für die Bindungsstelle 1 möglicherweise eine gute Übereinstimmung ergibt.

Die putativen Bindungsstellen 2 und 3 des Modells werden hauptsächlich von den transmembranären Helices gebildet. Dabei setzt sich die Bindungsstelle 2 aller Voraussicht nach aus den transmembranären Helices 3, 4, 5, 6 und 8 sowie aus den extrazellulären Loops 2, 3 und 4 zusammen. Überträgt man die in der vorliegenden Arbeit möglicherweise identifizierten Peptide auf diesen Bereich wird deutlich, dass mit Ausnahme des dritten extrazellulären Loops (ECL 3) alle übrigen Regionen durch den Photoliganden H15 markiert worden sein könnten und damit ebenfalls eine gute Übereinstimmung für die Bindungsregion 2 bestehen würde. Die dritte Bindungsstelle wird letztendlich von Aminosäuren der transmembranären Helices 1, 2, 9, 10, 11 und 12 sowie der extrazellulären Loops 1 und 6 gebildet. Der Abgleich mit der vorliegenden Arbeit zeigt, dass wiederum viele der genannten Regionen durch den Photoliganden H15

markiert worden sein könnten und sich somit ebenfalls eine gute Übereinstimmung ergeben sollte.

4.3.4 Photoaffinity Labeling von P-gp mit H19

Das Phenothiazin-Derivat H19 besitzt analog dem im vorhergehenden Kapitel 4.3.3 beschriebenen Photoliganden H15 als photoaktivierbares Strukturelement eine Benzophenon-Partialstruktur und lässt sich somit ebenfalls durch UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 365 \text{ nm}$ anregen. Die Struktur des P-gp-Inhibitors ist in der nachfolgenden Abbildung 4.48 dargestellt. Die Verbindung unterscheidet sich von H15 lediglich in der Länge des Linkers zwischen dem Phenothiazin-Grundgerüst und dem Piperazin-Ring und weist ein Molekulargewicht von 443 g/mol auf. Auch H19 wurde dankenswerterweise von Dr. Matthias Schmidt (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie) zur Verfügung gestellt.



H 19

Abb. 4.48: Strukturformel von H19

Analog zu H15 wurde für den Photoliganden H19 eine Endkonzentration von $10 \mu\text{mol/l}$ gewählt und die Bestrahlungsdauer bei 365 nm auf 20 Minuten festgesetzt. Als Kontrolle

4.3.4 Photoaffinity Labeling von P-gp mit H19

dienten wiederum Proteinproben, die in Abwesenheit des Photoliganden bestrahlt wurden. Markierte Peptide wurden nach enzymatischem Verdau von P-gp mit Chymotrypsin durch Vergleich der Übersichtsspektren von Kontrolle und Probe identifiziert. Die praktische Durchführung des Photolabeling-Experimentes erfolgte dabei in gleicher Weise wie für H15 beschrieben.

In Analogie zu den vorhergehenden Photolabeling-Experimenten mit 8-Azido-ATP, 2,4-Dihydroxybenzophenon und H15 wurde vor dem eigentlichen Photoaffinity Labeling von P-gp mit H19 zunächst ein Übersichtsspektrum des Photoliganden zur Bestimmung seiner genauen Monoisotopischen Masse bei positiver Ionisierung aufgenommen. Das resultierende Übersichtsspektrum ist in der nachfolgenden Abbildung 4.49 gezeigt.

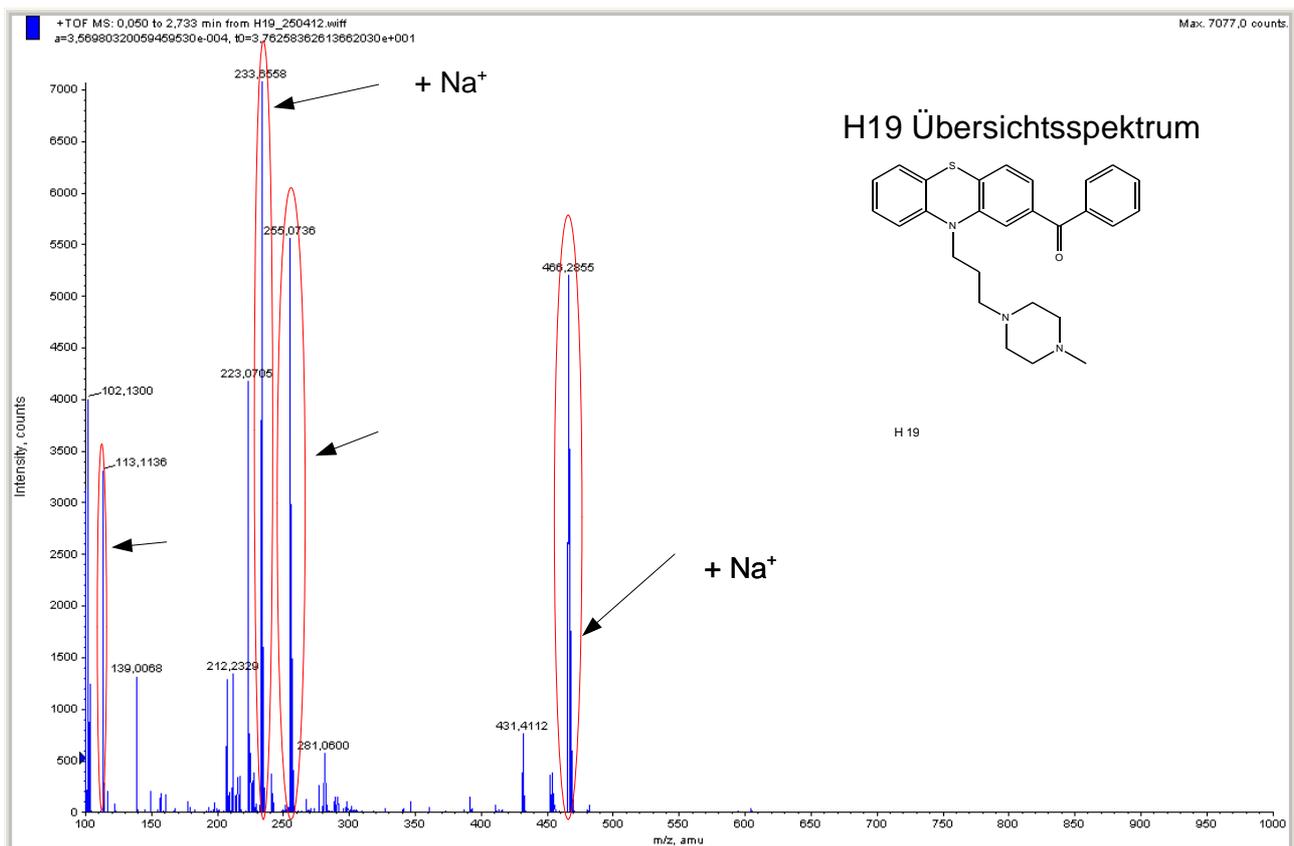


Abb. 4.49: Übersichtsspektrum von H19 bei positiver Ionisierung. Signale, die von H19 stammen, sind durch rote Ellipsen gekennzeichnet. Das intakte Molekül erscheint in Form der Natriumanlagerung bei zwei unterschiedlichen Signalen von 466,28¹⁺ und 233,65²⁺. Die übrigen Signale bei Masse-zu-Ladungsverhältnissen von 255,07 und 113,11 repräsentieren verschiedene Fragmente des Photoliganden (Einzelheiten siehe Text).

Alle von H19 stammenden Signale sind im abgebildeten Übersichtsspektrum durch rote Ellipsen gekennzeichnet. Das unversehrte Molekül erscheint in Form von zwei unterschiedlichen Peaks bei Masse-zu-Ladungsverhältnissen von 466,28 (einfach positiv geladener Zustand) und 233,65 (zweifach positiv geladener Zustand). Alle übrigen Signale repräsentieren verschiedene Fragmente von H19. So entspricht das Signal bei einem m/z von 113,11 dem methylierten Piperazin-Ring inklusive einer verbliebenen CH_2 -Gruppe des Linkers und der Peak bei einem m/z von 255,07 dem Phenothiazin-Grundgerüst plus Carbonylgruppe der Benzophenon-Partialstruktur und zwei CH_2 -Gruppen des Linkers.

Dadurch bedingt, dass der Photoligand wiederum bereits bei der Aufnahme des Übersichtsspektrums ohne die Zufuhr von Kollisionsenergie zerfallen ist, wurde im Anschluss daran ein Fragmentspektrum von H19 zur Bestimmung der exakten Monoisotopischen Massen der resultierenden Bruchstücke aufgenommen. Das erhaltene Fragmentspektrum von H19 ist in der folgenden Abbildung 4.50 zu sehen.

Aus dem gezeigten MS/MS-Spektrum von H19 wird deutlich, dass der Photoligand in zwei Hauptfragmente bei Masse-zu-Ladungsverhältnissen von 255,09 und 113,11 zerfällt, wobei das Bruchstück mit der größeren Masse das Phenothiazin-Grundgerüst inklusive der Carbonylgruppe und zwei CH_2 -Gruppen des Linkers repräsentiert und das Fragment mit der kleineren Masse dem methylierten Piperazin-Ring plus einer CH_2 -Gruppe des Linkers entspricht.

Die Detektion von mit H19 möglicherweise markierten P-gp-Peptiden erfolgte in Analogie zu H15 (siehe Kapitel 4.3.3) durch Aufnahme von Übersichtsspektren des Chymotrypsin-Lösung-Verdau der Kontrolle sowie der Probe und anschließende Überlagerung dieser Spektren. Der einzige Unterschied bestand darin, dass von den detektierten Monoisotopischen Massen die aus dem Fragmentspektrum von H19 resultierenden Massen (siehe Abbildung 4.50) subtrahiert wurden.

4.3.4 Photoaffinity Labeling von P-gp mit H19

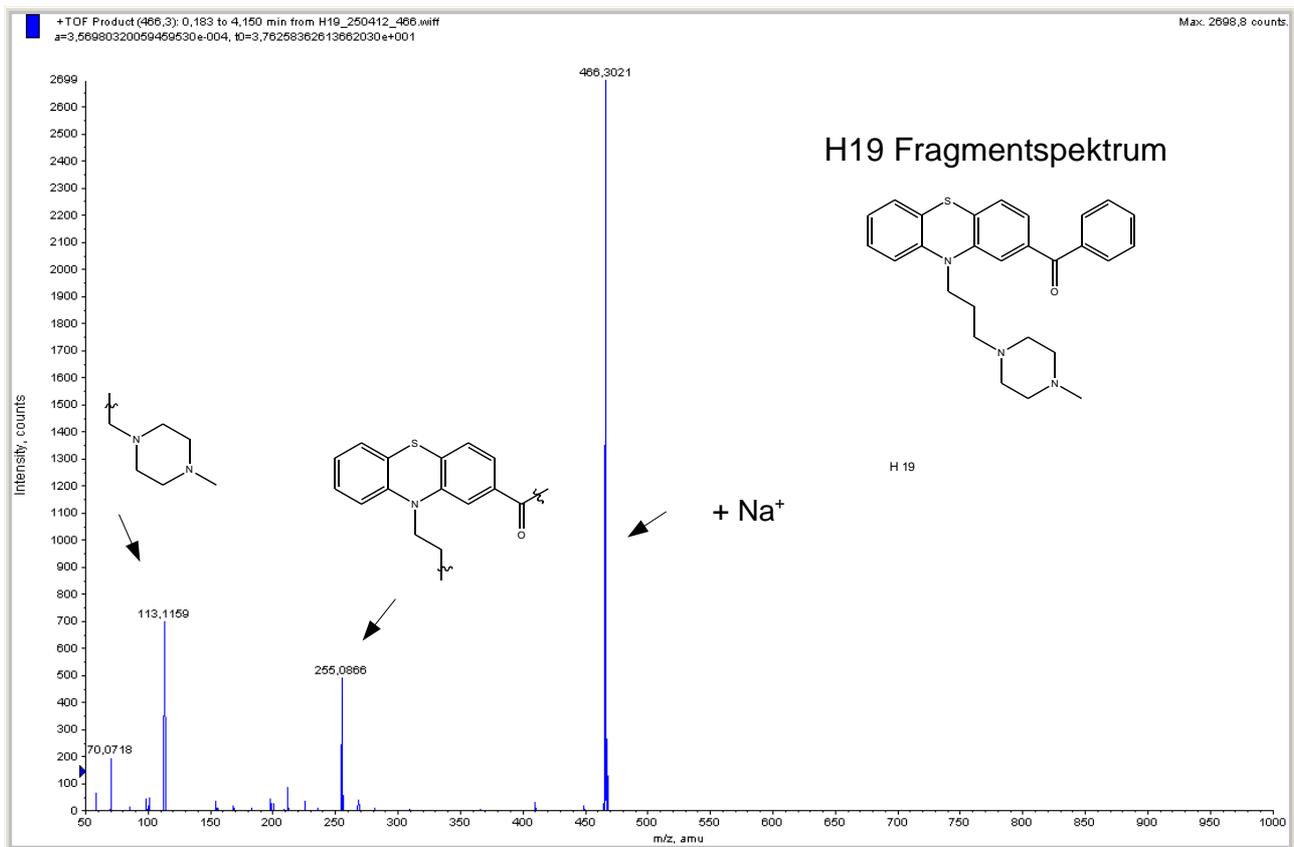


Abb. 4.50: MS/MS-Spektrum von H19. Das intakte Molekül (Precursor) ist bei einem m/z von 466,30 in Form der Natriumanlagerung zu sehen. Die mit schwarzen Pfeilen markierten Signale bei Masse-zu-Ladungsverhältnissen von 255,09 und 113,11 repräsentieren die beiden Hauptfragmente der Verbindung: Phenothiazin-Grundgerüst inklusive Carbonylgruppe und zwei CH₂-Gruppen des Linkers sowie methylierter Piperazin-Ring plus eine CH₂-Gruppe des Linkers.

Aus der massenspektrometrischen Analyse der entsprechend Kapitel 3.4.2 aufbereiteten und im Positivmodus vermessenen Peptide des Chymotrypsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp nach durchgeführtem Photoaffinity Labeling mit H19 ergaben sich die in der nachfolgenden Tabelle 4.38 zusammengefassten „Massen-Fits“.

Die Werte der subtrahierten Massen repräsentieren hierbei die im MS/MS-Spektrum von H19 beobachteten Fragmente. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink eingefärbt.

Tab. 4.38: Massen-Fits aus dem Photoaffinity Labeling von P-gp mit H19 und nachfolgendem Verdau mit Chymotrypsin. Die Werte der subtrahierten Massen repräsentieren unterschiedliche Fragmente von H19, welche zuvor durch Aufnahme eines Fragmentspektrums des Photoliganden bestimmt wurden. Aminosäuren im Bereich der transmembranären Helices sind in pink abgebildet.

m/z	[M+H] ⁺	Subtrahierte Masse	Berechnete Masse	Position	Topologie	Sequenz
866,15 ⁴⁺	3461,60	444,28	3017,32	195-221	TM3/ECL 2/TM4	QSMATFFFTGFIVGF TRGWKLTLLVILAI
				879-906	ICL 4	LSGQALKDKKELEG AGKIAATEAIENFRT
				762-788	TM8/ICL 3	LGIIISFITFFLQGFTF GKAGEILTKRL
				1028-1054	A-loop NBD 2	PNTLEGNVTFGEV VFNYPTRPDIPVLQ
				352-378	Linker	IEAFANARGAAYEIF KIIDNKPSIDSY
				929-953	ICL 4/TM11	RNSLRKAHIFGITFS FTQAMMYFSY
				791-816	ICL 3	MVFRSMLRQDVSW FDDPKNTTGALTT
				622-648	Linker	YFKLVTMQTAGNEV ELENAADESKSEI
				81-107	ECL 1	NAGNLEDLMSNITN RSDINDTGFFMNL
				941-966	TM11/ECL 6	TFSFTQAMMYFSYA GCFRFGAYLVAH
				92-116	ECL 1	ITNRSINDTTGFF MNLEEDMTRYAY
				511-537 + Ox.	ABC-Motiv NBD 1	DFIMoxKLPKFDL VGERGAQLSGGQK Q
				255,09	3206,51	1016-1044
501-528	NBD 1	EKAVKEANAYDFIM				

4.3.4 Photoaffinity Labeling von P-gp mit H19

				KLPHKFDTLVGERG
	982-1012	TM12 /Linker	VFGAMAVGQVSSFA PDYAKAKISAHHIIMI I	
	993-1021	TM12 /Linker	SFAPDYAKAKISAHH IIMIEKTPLIDSY	
	288-317	ICL 2/TM5	GIKKAITANISIGAAF LLIYASYALAFWYG	
	816-847	ICL 3/TM9	TRLANDAAQVKGAI GSR LAVITQNIANL GTGI	
	353-381	Linker	EAFANARGAAYEIFK IIDNKPSIDSYSKS	
	488-514	NBD 1	IRYGRENVTMDEIE KAVKEANAYDFIM	
	76-104	ECL 1	TDIFANAGNLEDLM SNITNRS DINDTGFF	
	504-531 + Ox.	ABC-Motiv NBD 1	VKEANAYDFIMoxK LPHKFDTLVGERGA QL	
	954-982 + Ox.	TM11/ECL 6/TM12	AGCFRFGAYLVAHK LMoxSFEDVLLVFSA VV	
	187-214 + Ox.	TM3/ECL 2/TM4	GDKIGMoxFFQSMA TFFTG FIVGFTRGW KL	
	911-936 + Ox.	ICL 4/TM11	TQE QKFEHMoxYA QSLQVPYRNSLRKA H	
	180-208 + Ox.	ICL 1/TM3	SKINEGIGDKIGMFF QSMoxATFFTG FIV GF	
466,28	2995,32	279-306	ICL 2/TM5	KNLEEAKRIGIKKAI TANISIGAAFLLI
		712-740	TM7/ECL 4	VGVFCAIINGGLQ PAFIIFSKIIGVFT
		542-569	Walker B/	ARALVRNPKILLLDE

4.3.4 Photoaffinity Labeling von P-gp mit H19

					D-loop	ATSALDTESEAVV
				546-573	Walker B/ D-loop	VRNPKILLLLDEATSA LDTESEAVVQVAL
				736-761	ECL 4/TM8	IGVFTRIDDPETKR QNSNLFSLLFLA
				737-762	ECL 4/TM8	GVFTRIDDPETKRQ NSNLFSLLFLAL
				983-1011	TM12/ Linker	FGAMAVGQVSSFAP DYAKAKISAAHIIMI
				471-497	Q-loop NBD 1	GVVSQEPVLFATTIA ENIRYGRENVTM
				794-819 + Ox.	ICL 3	RSMoxLRQDVSWF DDPKNTTGALTTRL A
				963-990 + Ox.	ECL 6/TM12	LVAHKLMoxSFEDVL LVFSAVVFAMAVG Q
				967-994 + Ox.	ECL 6/TM12	KLMoxSFEDVLLVFS AVVFAMAVGQVSS F
				926-950 + Ox.	ICL 4/TM11	VPYRNSLRKAHIFGI TFSFTQAMMoxY
				1009-1035 + Ox.	Linker	IMoxIIEKTPLIDSYS TEGLMPNTLEGNV
				939 -964 + Ox.	TM11/ECL 6	GITFSFTQAMMoxY FSYAGCFRFGAYLV
1099,89 ³⁺	3297,67	466,28	2831,39	967-993	ECL 6/TM12	KLMSFEDVLLVFSV VFGAMAVGQVSS
				83-107	ECL 1	GNLEDLMSNITNRS DINDTGFFMNL
				668-692	Linker	TRRSVRGSQAQDR KLSTKEALDESI
				466-490	Q-loop NBD 1	LREIIGVVSQEPVLF ATTIAENIRY
				532-557	ABC-Motiv Walker B	SGGQKQRIAIARAL VRNPKILLLDEA

4.3.4 Photoaffinity Labeling von P-gp mit H19

		526-551	ABC-Motiv Walker B	ERGAQLSGGQKQRI AIARALVRNPKI
		839-864	TM9/TM10	NIANLGTGIIISFIYG WQLTLLLLAI
		47-73	N-Terminus /TM1	DKLYMVVGTLAIIH GAGLPLMMLVFG
		926-949 + Ox.	ICL 4/TM11	VPYRNSLRKAHIFGI TFSFTQAMMox
		992-1017 + Ox.	TM12/ Linker	SSFAPDYAKAKISAA HIIMoxIIEKTPL
444,28	2853,39	623-648	NBD 1 Linker	FKLVTMQTAGNEVE LENAADESKSEI
		929-952	ICL 4/TM11	RNSLRKAHIFGITFS FTQAMMYFS
		767-790	TM8/ICL 3	FITFFLQGFTFGKA GEILTKRLRY
		1177-1202	ABC-Motiv Walker B	SGGQKQRIAIARAL VRQPHILLLDEA
		395-418	A-loop NBD 1	RNVHFSYPSRKEVK ILKGLNLKVQ
		1107-1131	Q-loop NBD 2	QWLRAHLGIVSQEP ILFDCSIAENI
		76-101	ECL 1	TDIFANAGNLEDLM SNITNRSINDT
		153-176 + Ox.	ICL 1	HAIMoxRQEIGWFD VHDVGELNTRLT
		952-976 + Ox.	TM11/ECL 6/TM12	SYAGCFRFGAYLVA HKLMoxSFEDVLL
		768-791 + Ox.	TM8/ICL 3	ITFFLQGFTFGKAG EILTKRLRYMox
		773-796 + Ox.	TM8/ICL 3	QGFTFGKAGEILTK RLRYMoxVFRSM
255,09	3042,58	327-356	TM6/ Linker	SIGQVLTVFFSVLIG AFSVGQASPSIEAFA
		157-182	ICL 1	RQEIGWFDVHDVG

4.3.4 Photoaffinity Labeling von P-gp mit H19

						ELNTRLTDDVSKI
				990-1017	TM12/ Linker	QVSSFAPDYAKAKIS AAHIIMIEKTPL
				459-485	Q-loop NBD 1	RTINVRFLREIIGVV SQEPVLFATTIA
				1177-1204	ABC-Motiv Walker B	SGGQKQRIAIARAL VRQPHILLLDEATS
				336-365	TM6/ Linker	FSVLIGAFSVGQAS PSIEAFANARGAAYE I
				337-366	TM6/ Linker	SVLIGAFSVGQASPS IEAFANARGAAYEIF
				698-723 + Ox.	Linker/ TM7	WRIMoxKLNLTWEP YFVGVFCAIINGG
				927-951 + Ox.	ICL 4/TM11	PYRNSLRKAHIFGIT FSFTQAMMoxYF
				937-962 + Ox.	TM11/ECL 6	IFGITFSFTQAMMox YFSYAGCFRFGAY
				938-963 + Ox.	TM11/ECL 6	FGITFSFTQAMMox YFSYAGCFRFGAYL
1271,66 ¹⁺	1271,66	466,28	805,38	1081-1086	NBD 2	QLLERF
				124-131	TM2	GVLVAAYI
				736-742	ECL 4	IGVFTRI
				62-69 + Ox.	TM1	GAGLPLMMox
				869-876 + Ox.	TM10/ICL 4	AIAGVVEMox
				155-160 + Ox.	ICL 1	IMoxRQEI
		444,28	827,38	1038-1044	A-loop NBD 2	GEVVFNY
				311-317	TM5	ALAFWYG
				129-135	TM2	AYIQVSF
				963-969 + Ox.	ECL 6	LVAHKLMox
		255,09	1016,57	167-175	ICL 1	DVGELNTRL

4.3.4 Photoaffinity Labeling von P-gp mit H19

453-461	NBD 1	VDGQDIRTI
511-518 + Ox.	NBD 1	DFIMoxKLPH
509-516 + Ox.	NBD 1	AYDFIMoxKL

Aus der abgebildeten Tabelle geht hervor, dass insgesamt nur 3 Peptide mit potenzieller Markierung durch H19 im Probenspektrum detektiert werden konnten. Unter Berücksichtigung aller im MS/MS-Spektrum von H19 beobachteten Fragmente sowie der Tatsache, dass von den in der Tabelle aufgeführten Peptidsignalen wegen technischer Probleme des eingesetzten Massenspektrometers leider wiederum keine MS/MS-Spektren aufgenommen und ausgewertet werden konnten, geht aufgrund des unspezifischen Spaltungsverhaltens des für den Verdau verwendeten Chymotrypsins die Anzahl der theoretisch passenden Aminosäuresequenzen innerhalb der P-gp-Sequenz weit über diejenige der beobachteten Peptidsignale hinaus. Deshalb muss in Analogie zu H15 die Frage, welche der gezeigten theoretisch möglichen Aminosäuresequenzen nun die korrekte Peptidsequenz zum jeweils betrachteten Signal darstellt, auch an dieser Stelle wegen der Nichtverfügbarkeit von MS/MS-Daten unbeantwortet bleiben, denn nur durch die Bestimmung der Abfolge der einzelnen Aminosäuren kann das korrekte Peptid innerhalb der P-gp-Sequenz identifiziert werden. Dies hat zur Folge, dass Aussagen über die Lage der potenziellen Markierungen innerhalb der P-gp-Topologie mit größter Spekulation behaftet sind.

Unter den mit H19 möglicherweise markierten Regionen sind laut der Tabelle Peptidsequenzen, die einen Großteil aller transmembranären Helices von P-gp umfassen würden. Weitere potenziell markierte Bereiche außerhalb der transmembranären Domänen wären Teile der NBD 1 (ABC-Motiv, Walker B-Motiv, A-, D- und Q-loop), der NBD 2 (ABC-Motiv, Walker B-Motiv, A- und Q-loop), der Linker-Regionen zwischen den beiden NBDs und den angrenzenden transmembranären Helices (TM6 - NBD 1, NBD 1 - TM7, TM12 - NBD 2) sowie fast aller extra- und intrazellulären Loop-Regionen (ECL 1, 2, 4 und 6, ICL 1, 2, 3 und 4). Außerdem wurde eine mögliche Markierung N-terminal der TM1 beobachtet. Im Vergleich mit H15 würde sich ein hohes Maß an Überschneidungen bezüglich der möglicherweise markierten Bereiche innerhalb der P-gp-Topologie

ergeben, was aufgrund der sehr ähnlichen Struktur der beiden Photoliganden auch anzunehmen war.

Vergleicht man die in der vorliegenden Arbeit ermittelten potenziellen Photoaffinitätsmarkierungen für H19 mit den von Dr. Jens Meyer erzielten Ergebnissen für das Photolabeling von P-gp mit H19, scheint ein hoher Grad an Übereinstimmungen in Bezug auf die markierten Bereiche vorzuliegen. So könnten die von Dr. Jens Meyer identifizierten Markierungen von P-gp mit H19 im Bereich der TM3, der ICLs 1 - 4, der NBDs 1 und 2 und der Linker-Regionen in der vorliegenden Arbeit reproduziert worden sein [125]. Für einen Großteil der möglicherweise markierten Regionen würden darüber hinaus Überschneidungen mit Literaturangaben existieren [47, 135 - 140].

Übertrüge man die in der vorliegenden Arbeit identifizierten potenziellen Markierungen auf das von Globisch et al. [68] erstellte Homologiemodell von P-gp, so würde auch hier ein hohes Maß an Übereinstimmung für alle drei postulierten Bindungsregionen resultieren.

5 Zusammenfassung

Der ABC-Transporter P-Glykoprotein stellt den aus medizinischer Sicht wohl wichtigsten humanen ABC-Transporter dar. Aufgrund seiner ubiquitären Expression in Geweben mit Barrierefunktion sowie seiner ausgeprägten Polyspezifität, hat das Transportprotein großen Einfluss auf die Pharmakokinetik vieler auf dem Markt oder in der Entwicklungsphase befindlicher Arzneistoffe und ist darüber hinaus am Phänomen der klassischen Multidrug Resistenz beteiligt. Trotz jahrelanger intensiver Erforschung von P-gp, konnte die genaue Funktionsweise des Proteins bis heute nicht abschließend geklärt werden und vor dem Hintergrund des äußerst breiten Substratspektrums stellt sich die Frage nach der Art, Anzahl, Lokalisation und Spezifität der potenziellen Bindungsstellen, über welche die Interaktionen vermittelt werden. Die Aufklärung der vier genannten Aspekte konnte bis heute noch nicht abschließend erfolgen, allerdings wurde eine Vielzahl von Untersuchungen publiziert, welche die Existenz mehrerer Bindungsstellen für unterschiedliche Liganden postulieren. Trotz der großen Anzahl von Studien, die sich mit der Erklärung des Bindungsverhaltens an P-gp beschäftigen, konnte bis dato nicht aufgeklärt werden, ob die verschiedenen Bindungsstellen als unterschiedliche, bevorzugte - teils benachbarte oder sogar überlappende - Erkennungsregionen innerhalb einer großen Bindungstasche realisiert sind, oder aber als einzelne, räumlich getrennte Bindungsstellen vorliegen. Der Kerninhalt der vorliegenden Arbeit sollte daher aus der Charakterisierung potenzieller Bindungsstellen für ausgewählte photoaktivierbare P-gp-Modulatoren mit Hilfe einer Kombination aus Photoaffinitätsmarkierung, enzymatischem Verdau und massenspektrometrischer Analyse von P-gp bestehen.

Die Voraussetzung für die Durchführbarkeit erfolgreicher Photoaffinitätsmarkierungsexperimente ist eine möglichst vollständige Abdeckung der Aminosäuresequenz von P-gp, damit alle erfolgten Markierungen des Proteins mit den verwendeten Photoliganden auch detektiert werden können. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Pepsin, Elastase, Proteinase K und Thermolysin sowie das chemische Agens Bromcyan separat oder in Kombination für den Verdau von P-gp eingesetzt und im Hinblick auf ihre Spaltungsspezifität und -effizienz gegenüber P-gp charakterisiert. Darüber hinaus wurden einige der genannten Spaltungsreagenzien mit

Hitzenaturierung oder massenkompatiblen Detergenzien kombiniert und bezüglich ihres Einflusses auf die Sequenzabdeckung von P-gp untersucht.

Als erstes wurde ein In-Gel-Verdau von P-gp mit den Enzymen Trypsin und Chymotrypsin sowohl separat als auch in Kombination durchgeführt. Mit dem Trypsin-In-Gel-Verdau von P-gp konnte eine maximale Sequenzabdeckung von 47 % erzielt werden, wobei die abgedeckten Regionen sich auf die extra-membranären Bereiche beschränkten und eine Abdeckung der transmembranären Domänen leider ausblieb. Demgegenüber konnten durch den Chymotrypsin-In-Gel-Verdau von P-gp bei einer maximalen Sequenzabdeckung von 33 % Teile der transmembranären Helices 1, 6 und 9 abgedeckt werden. Die Kombination der beiden Enzyme in unterschiedlichen Reihenfolgen und Enzym : Protein Verhältnissen führte bedauerlicherweise nicht zu einer weiteren Verbesserung der Sequenzabdeckung von P-gp.

Nach Abschluss der In-Gel-Verdaus wurden die verschiedenen In-Lösung-Verdaus von P-gp durchgeführt. Begonnen wurde dabei mit dem Trypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp, durch den eine höchstmögliche Sequenzabdeckung von 61 % erreicht werden konnte. Im Vergleich zum Trypsin-In-Gel-Verdau entspricht dies einer Steigerung der Sequenzabdeckung um 14 %, wobei die transmembranären Bereiche jedoch wiederum von der Abdeckung ausgespart blieben. Als nächstes wurde daher ein In-Lösung-Verdau von P-gp mit Chymotrypsin unternommen, durch den bei einer Sequenzabdeckung von insgesamt 50 % erfreulicherweise auch größere Anteile der transmembranären Helices 1, 4, 9 und 12 neben kleinen Bereichen der TMs 6 und 8 abgedeckt werden konnten. Gegenüber dem Chymotrypsin-In-Gel-Verdau konnten die abgedeckten Regionen somit um die transmembranären Helices 4, 8 und 12 erweitert und die insgesamt erzielte Sequenzabdeckung um 17 % verbessert werden. Das Fazit aus der Gegenüberstellung von In-Gel- und In-Lösung-Verdau von P-gp lautet demnach, dass der In-Lösung-Verdau dem In-Gel-Verdau sowohl hinsichtlich der insgesamt erreichten Sequenzabdeckung als auch in Bezug auf die Abdeckung der transmembranären Bereiche bei weitem überlegen ist.

Zur weiteren Erhöhung der Sequenzabdeckung in den transmembranären Domänen wurden in der Folge In-Lösung-Verdaus von P-gp mit dem chemischen Spaltungsreagenz Bromcyan sowie den Enzymen Pepsin, Elastase, Proteinase K und Thermolysin durchgeführt. Der In-Lösung-Verdau von P-gp mit Bromcyan ergab bei einer insgesamt

sehr geringen Sequenzabdeckung von lediglich 19 % eine fast vollständige Abdeckung der TM1 neben einer ca. 50 %igen Abdeckung der transmembranären Helices 11 und 12 sowie des Anfangs der TM3. Mit dem Pepsin-In-Lösung-Verdau von P-gp konnten weitere, bis dato noch von der Sequenzabdeckung ausgesparte, transmembranäre Bereiche abgedeckt werden. Es sind dies die transmembranären Helices 2, 3, 5, 7 und 10, welche zusätzlich zu den bereits durch die vorhergehenden In-Lösung-Verdaus von P-gp mit Chymotrypsin und Bromcyan abgedeckten TMs 1, 4, 6, 8 und 9 zu einem Großteil abgedeckt wurden. Mit Ausnahme der TMs 11 und 12 konnten im Rahmen des Pepsin-In-Lösung-Verdaus von P-gp bei einer insgesamt erzielten Sequenzabdeckung von 46 % somit alle transmembranären Helices zu größeren Teilen abgedeckt werden. Diese Erhöhung der transmembranären Sequenzabdeckung ging jedoch auf Kosten der Abdeckung in den übrigen Bereichen und so ist die erreichte Sequenzabdeckung in den Linker- und Loop-Regionen sowie den Nukleotidbindungsdomänen eher lückenhaft. Im Vergleich dazu, lieferte der In-Lösung-Verdau von P-gp mit Elastase ein ausgeglicheneres Resultat hinsichtlich der Sequenzabdeckung in den transmembranären und extra-membranären Bereichen. Bei einer nahezu identischen insgesamt erreichten Sequenzabdeckung von 45 %, konnten Teile der transmembranären Helices 1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11 und 12 abgedeckt werden. Ausgespart blieben lediglich die TMs 2, 3 und 5. Im Gegensatz dazu ergab sowohl der In-Lösung-Verdau von P-gp mit Proteinase K als auch der Thermolysin-In-Lösung-Verdau ein ganz anderes Bild dadurch, dass mit beiden Verdaus nur sehr niedrige Sequenzabdeckungen von 12 bzw. 11 % erzielt werden konnten. Trotz dieser äußerst geringen Sequenzabdeckung wurden im Zuge des Verdaus von P-gp mit Proteinase K größere Bereiche der transmembranären Helices 4, 7, 8 und 11 sowie die Anfänge der TMs 6, 9 und 12 abgedeckt, während dagegen durch den Thermolysin-In-Lösung-Verdau lediglich die TM1 abgedeckt werden konnte. Zusammenfassend lässt sich für die separaten In-Lösung-Verdaus von P-gp das Fazit ziehen, dass mit keinem der verwendeten Spaltungsreagenzien alleine eine gleichermaßen zufriedenstellende Sequenzabdeckung in den transmembranären Domänen und den extra-membranären Regionen erzielt werden konnte und daher in Zukunft für den Verdau von P-gp immer mehrere Spaltungsreagenzien miteinander kombiniert werden sollten.

Im Anschluss an die separaten In-Lösung-Verdaus von P-gp wurden zur weiteren Verbesserung der Sequenzabdeckung in den transmembranären Domänen Kombinations-

Verdaus mit Bromcyan, Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin unter Verwendung eines Molecular Weight Cut-Off (MWCO)-Filters durchgeführt. Hierbei wurden die Kombinationen Bromcyan/Trypsin, Bromcyan/Chymotrypsin, Bromcyan/Pepsin, Trypsin/Chymotrypsin und Trypsin/Pepsin in Verbindung mit einem 3K MWCO-Filter eingesetzt. Für alle fünf genannten Enzym-Kombinationen konnten insgesamt nur sehr geringe Verbesserungen der Sequenzabdeckung zwischen 1,4 % und 6,9 % erreicht werden, in einem Fall wurde sogar überhaupt keine Steigerung der Sequenzabdeckung beobachtet. Nichtsdestotrotz konnte mit vier der fünf durchgeführten Kombinations-Verdaus entweder die Anzahl oder der Anteil der abgedeckten transmembranären Helices im Vergleich zu den separaten Verdaus erhöht werden.

Anschließend an die Kombinations-Verdaus wurden In-Lösung-Verdaus mit den Enzymen Trypsin und Chymotrypsin in Verbindung mit Hitzedenaturierung von P-gp durchgeführt. Hierfür wurden Enzymmenge sowie Inkubationszeit gedrittelt und demnach drei Zyklen aus Denaturierung und sich anschließendem Verdau gefahren. Für den Trypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit Hitzedenaturierung konnte verglichen mit dem separaten Trypsin-In-Lösung-Verdau eine geringfügige Verbesserung der Sequenzabdeckung um 4 % unter Abdeckung eines Teils der transmembranären Helices 1 und 8 erzielt werden. Im Zuge der Kombination aus Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau und Hitzedenaturierung konnten aufgrund technischer Defekte des verwendeten Massenspektrometers leider keine MS/MS-Daten erhoben werden. Daraus ergibt sich die Konsequenz, dass der ermittelte Wert von 74 % lediglich die theoretisch mögliche Sequenzabdeckung widerspiegelt und die Frage, welche der theoretisch möglichen Peptidsequenzen nun die korrekten Aminosäuresequenzen darstellen, leider unbeantwortet bleiben muss. Die Auswertung zahlreicher MS/MS-Spektren chymotryptischer Verdaus hat jedoch gezeigt, dass die in der Praxis erzielte Sequenzabdeckung von P-gp - bedingt durch die Tatsache, dass in der Regel nur ein bis zwei aller theoretisch möglichen Aminosäuresequenzen pro Peptidsignal in den Fragmentspektren nachweisbar waren - immer sichtlich niedriger ausfiel als die maximal mögliche Sequenzabdeckung. Außerdem kristallisierte sich heraus, dass immer wenn eine Sequenz in den transmembranären Domänen neben einem Peptid in den Nukleotidbindungsdomänen, Loop- oder Linker-Regionen möglich war, in der überwiegenden Anzahl der Fälle der Sequenzabschnitt außerhalb der TMDs als richtig identifiziert wurde. Unter der Annahme von nur einer Aminosäuresequenz pro

Monoisotopische Masse sowie Priorisierung von Peptiden in den NBDs, Loop- und Linker-Regionen ergäbe sich somit eine der Realität eher entsprechende Sequenzabdeckung von 65 %. Dies käme verglichen mit dem regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp einer Verbesserung um 15 % unter potenzieller Abdeckung der TM11 gleich. Diese 15 %ige Erhöhung repräsentiert also das „Minimum“ der Verbesserung der Sequenzabdeckung von P-gp. Erhöht man die Anzahl der berücksichtigten Aminosäuresequenzen pro Peptidsignal bei ansonsten gleichbleibenden Bedingungen auf zwei, so wird als „Maximum“ der Verbesserung der Sequenzabdeckung ein Wert von 19 % (= 245 Aminosäuren) erhalten und die unter realistischen Gesichtspunkten maximal erreichbare Sequenzabdeckung beläuft sich demnach auf 69 %. Der „wahre“ Wert der erzielten Sequenzabdeckung liegt mit großer Wahrscheinlichkeit zwischen dem bestimmten Minimal- und Maximalwert der Sequenzabdeckung. Abschließend lässt sich das Fazit ziehen, dass durch die Hitzedenaturierung eine Entfaltung des Proteins stattgefunden zu haben scheint, wodurch die Zugänglichkeit für das Enzym entsprechend erhöht wurde.

Als finaler Versuch zur Erhöhung der transmembranären Sequenzabdeckung von P-gp wurden In-Lösung-Verdaus mit den Enzymen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase in Kombination mit massenkompatiblen Detergenzien durchgeführt. Hierbei wurde Trypsin mit 0,1 % AALS II (anionisch); 0,1 % ZALS I (zwitterionisch) und 0,05 % ProteaseMAX® (anionisch) kombiniert, Chymotrypsin mit 0,1 - 2 % AALS II; 0,1 % ZALS I; 0,05 - 1 % NALS II (nichtionisch) und 0,05 % ProteaseMAX® und Elastase mit 0,05 % ProteaseMAX®. Im Zuge der Kombinationen aus Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau und AALS II bzw. ZALS I wurden jeweils MS/MS-Daten erhoben, so dass in beiden Fällen das exakte Ausmaß der jeweiligen Erhöhung der Sequenzabdeckung bestimmt werden konnte. Für die Verbindung aus Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau und AALS II betrug die Verbesserung der Sequenzabdeckung gegenüber dem separaten Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau 22 %, wobei erstmals eine Abdeckung der transmembranären Helices 2, 5, 7 und 11 neben den bereits zuvor abgedeckten TMs 1, 4, 6, 8, 9 und 12 erreicht werden konnte. Demgegenüber wurde mit der Kombination aus Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau und ZALS I lediglich eine Erhöhung der Sequenzabdeckung um 4 % erzielt und es konnten verglichen mit dem separaten Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau keine weiteren transmembranären Helices abgedeckt werden.

Abweichend davon wurden bei allen übrigen genannten Kombinationen - bedingt durch technische Probleme des verwendeten Massenspektrometers, welche die Aufnahme bzw. Auswertung von MS/MS-Spektren unmöglich machten - nur Übersichtsspektren der Verdau aufgenommen. Dies hatte zur Folge, dass lediglich die theoretisch maximal möglichen Sequenzabdeckungen ermittelt sowie weitere potenziell abgedeckte Bereiche in den transmembranären Domänen und extra-membranären Regionen aufgezeigt werden konnten. Wie bereits erwähnt, hat die Auswertung von zahlreichen MS/MS-Spektren der vorherigen Verdau jedoch ergeben, dass in der Regel nicht mehr als zwei verschiedene Peptide pro Signal nachgewiesen werden konnten, so dass davon auszugehen ist, dass die in der Praxis tatsächlich erzielte Sequenzabdeckung wahrscheinlich deutlich unter der maximal möglichen Sequenzabdeckung liegt. Außerdem stellte sich heraus, dass immer, wenn als Massen-Fit ein transmembranäres Peptid neben einem Peptid außerhalb der transmembranären Domänen möglich war, in der überwiegenden Anzahl der Fälle das extra-membranäre Peptid als korrekt identifiziert wurde.

Für die Kombinationen aus Trypsin-In-Lösung-Verdau und AALS II, ZALS I sowie ProteaseMAX® wurden gegenüber dem separaten In-Lösung-Verdau mit Trypsin maximale Steigerungen der Sequenzabdeckung von 25 %, 23 % sowie 16 % ermittelt. Potenziell abgedeckte Bereiche in den transmembranären Domänen umfassen bei allen drei Kombinationen die TMs 2, 3, 4, 7 und 10 sowie in Anwesenheit von AALS II die TMs 5, 9, 11 und 12, bei Zusatz von ZALS I die TMs 8, 9, 11 und 12 und bei Zugabe von ProteaseMAX® die TMs 5, 6 und 8. In der Praxis ist eine dermaßen starke Erhöhung der Sequenzabdeckung insbesondere in den transmembranären Domänen jedoch äußerst unwahrscheinlich. Aus diesem Grund wurde nachfolgend für jede Monoisotopische Masse nur noch eine Aminosäuresequenz berücksichtigt sowie Sequenzabschnitten in den Nukleotidbindungsdomänen, Loop- und Linker-Regionen jeweils Priorität vor Peptiden in den transmembranären Domänen eingeräumt. Die so erhaltene „realitätsadjustierte“ Sequenzabdeckung würde sich damit für den Trypsin-In-Lösung-Verdau unter Zusatz von AALS II auf 77 % unter Einschluss von Teilen der transmembranären Helices 2, 3, 4, 7 und 8 belaufen und käme einer Verbesserung um 16 % (= 206 Aminosäuren) gleich. Für die Kombination aus Trypsin-in-Lösung-Verdau und ZALS I ergäbe sich demnach eine „realistische“ Sequenzabdeckung von 76 %, was verglichen mit dem regulären Trypsin-In-

Lösung-Verdau von P-gp ohne Detergens (61 %) einer Verbesserung um 15 % inklusive der Abdeckung der transmembranären Helices 9 und 10 sowie kleinerer Bereiche der TMs 2, 3 und 7 entspräche. Demgegenüber schneidet die Verbindung aus ProteaseMAX® und Trypsin-In-Lösung-Verdau mit einer angenommenen Sequenzabdeckung von 64,4 % deutlich schlechter ab. Dieses Ergebnis entspräche im Vergleich zum regulären Trypsin-In-Lösung-Verdau ohne Detergens einer Erhöhung um lediglich 3,4 % (= 43 Aminosäuren) und läge damit in derselben Größenordnung wie die mit Hilfe der Hitzedenaturierung erzielte Verbesserung der Sequenzabdeckung (4 %).

Die Verbindung aus dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau von P-gp und NALS II ergab im Vergleich zum separaten Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau ohne den Zusatz von Detergens eine höchstmögliche Verbesserung der Sequenzabdeckung um 44 %. Ein Abgleich dieser potenziell abgedeckten Sequenzabschnitte mit den im Zuge des Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit AALS II abgedeckten Sequenzen ergab ein hohes Maß an Überlappungen. Geht man aufgrund der unspezifischen Spaltung des Chymotrypsins von zwei Aminosäuresequenzen pro Peptidsignal aus und gibt Sequenzabschnitten in den NBDs, Loop- und Linker-Regionen den Vorzug vor Peptidsequenzen innerhalb der TMDs, ergäbe sich eine der Realität näher kommende maximale Sequenzabdeckung von insgesamt 1089 Aminosäuren = 85 % unter Einschluss größerer Teile der transmembranären Helices 2, 3 und 8. Dies entspräche verglichen mit dem regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau ohne Zusatz von Detergens einer maximalen Verbesserung um 35 % und gegenüber dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit AALS II einer höchstmöglichen Erhöhung von 13 %. Unter Berücksichtigung von nur einer Aminosäuresequenz pro Peptidsignal ergäbe sich ein „Minimum“ der Sequenzabdeckung von 1053 Aminosäuren = 82 % unter Einschluss derselben transmembranären Helices und damit ein vergleichbares Ergebnis, was höchstwahrscheinlich durch den hohen Grad an überlappenden Peptiden bzw. Aminosäuren begründet ist. Demnach belief sich die minimale Verbesserung der Sequenzabdeckung im Vergleich zum regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau ohne Zusatz von Detergens auf 32 % und gegenüber dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit AALS II auf 10 %. Der in Wahrheit erzielte Wert für die Sequenzabdeckung befindet sich voraussichtlich im Bereich zwischen dem postulierten „Minimum“ und „Maximum“.

Ein scheinbar noch besseres Resultat lieferte die Kombination aus dem Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau und ProteaseMAX®. Unter der Annahme von nicht mehr als zwei Aminosäuresequenzen pro Peptidsignal und Priorisierung von Sequenzabschnitten außerhalb der TMDs ergäbe sich als „maximale realitätsadjustierte“ Sequenzabdeckung ein Wert von 96 %, wobei mit Ausnahme der TM 4 alle transmembranären Helices zu größeren Teilen mit abgedeckt werden würden. Gegenüber dem regulären Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau ohne Zusatz von Detergens käme das erzielte Ergebnis einer maximalen Verbesserung um 46 % und im Vergleich zur Kombination aus AALS II und Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau einer höchstmöglichen Erhöhung um 24 % gleich. Wird dagegen lediglich eine Aminosäuresequenz pro Peptidsignal gezählt, erhielte man als „minimale“ additive Sequenzabdeckung aus allen drei Fraktionen einen Wert von 82 % unter sichtbarer Erniedrigung des Anteils an abgedeckten Bereichen in den transmembranären Domänen. Hieraus lässt sich das Fazit ziehen, dass mit dieser Kombination die bisher beste Sequenzabdeckung von P-gp erzielt worden zu sein scheint. Wegen des Nichtvorhandenseins von MS/MS-Daten fehlt jedoch der finale Beweis für diese für das Membranprotein P-gp außergewöhnlich hohe Sequenzabdeckung und aus diesem Grund ist der ermittelte Wert mit großer Vorsicht und nur unter Vorbehalt zu betrachten.

Als Abschluss der Verdau-Experimente wurde die Verbindung aus dem Elastase-In-Lösung-Verdau und ProteaseMax® untersucht. Die „maximale realitätsadjustierte“ Sequenzabdeckung für diese Kombination beliefe sich unter Annahme von zwei Aminosäuresequenzen pro Peptidsignal sowie Priorisierung von Sequenzabschnitten in den NBDs, Loop- und Linker-Regionen auf insgesamt 67 % (= 858 Aminosäuren) unter Einschluss kleinerer Bereiche der transmembranären Helices 1, 9, 10, 11 und 12. Dieses Ergebnis entspräche im Vergleich zum regulären Elastase-In-Lösung-Verdau von P-gp ohne Zusatz von Detergens einer maximalen Verbesserung um 22 % inklusive der Abdeckung eines wesentlichen Teils der TM10. Wird dagegen nur eine Aminosäuresequenz pro Peptidsignal berücksichtigt, beliefe sich die „minimale realitätsadjustierte Sequenzabdeckung“ auf einen Wert von lediglich 50 % (= 634 Aminosäuren), wobei die transmembranäre Sequenzabdeckung deutlich abnehmen und sich auf die TM12 beschränken würde. Verglichen mit dem regulären Elastase-In-Lösung-Verdau ohne Detergens käme dies einer Verbesserung um nur 5 % gleich. Im Gegensatz

zum Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau in Kombination mit NALS II, wo für „Minimum“ und „Maximum“ der Sequenzabdeckung fast identische Werte bestimmt wurden und verglichen mit der Kombination aus Chymotrypsin-In-Lösung-Verdau und ProteaseMax®, bei der die Abweichung zwischen Minimal- und Maximalwert höchstens 14 % betrug, wirkt sich beim Elastase-In-Lösung-Verdau unter Zusatz von ProteaseMax® die Verringerung der berücksichtigten Aminosäuresequenzen pro Peptidsignal von zwei auf eine dem Anschein nach deutlich negativer auf die Sequenzabdeckung aus.

Nach Abschluss der Verdau-Experimente wurde mit dem Photoaffinity Labeling von P-gp begonnen. Hierbei wurde zur Validierung der verwendeten Photolabeling-Methode als Erstes eine Photoaffinitätsmarkierung von P-gp mit dem ATP-Analogon 8-Azido-ATP durchgeführt, welches laut Literatur mit der ATP-Bindungsstelle interagieren soll. Als Spaltungsreagenz wurde Trypsin ausgewählt, da die Nukleotidbindungsdomänen von P-gp durch den Verdau mit Trypsin gut abgedeckt werden konnten und die spezifische Spaltung der Protease außerdem einen Vorteil für die Auswertbarkeit der Massenspektren darstellt. Die Auswertung ergab, dass möglicherweise 7 Regionen innerhalb der P-gp-Sequenz durch 8-Azido-ATP markiert wurden. Bei der Untersuchung dieser potenziell markierten Peptidsequenzen im Hinblick auf ihre räumliche Lage innerhalb der P-gp-Struktur wurde deutlich, dass alle markierten Regionen entweder Teil der ATP-Bindungsstelle waren oder sich in unmittelbarer Nähe zu dieser befanden. Die potenziell gelabelten Bereiche umfassen innerhalb der NBD 1 die Linker-Region nahe des A-loops sowie das Walker A-Motiv, während in der NBD 2 möglicherweise parallel dazu das Walker A-Motiv, das Walker B-Motiv, der D-loop, der Q-loop sowie eine Sequenz zwischen D- und H-loop erfolgreich markiert werden konnten. Damit stünden die experimentell erzielten Ergebnisse in gutem Einklang mit Literaturdaten und darüber hinaus konnte die Eignung der eingesetzten Photolabeling-Methode für die Durchführung von Photoaffinity Labeling-Experimenten bestätigt werden.

Als nächstes wurde eine Photoaffinitätsmarkierung von P-gp mit dem Inhibitor 2,4-Dihydroxybenzophenon versucht. Dieser Photoligand soll laut Literatur mit der NBD 2 von P-gp wechselwirken. Aus den bereits genannten Gründen wurde als Spaltungsreagenz wiederum Trypsin ausgewählt. Die Auswertung der Massenspektren ergab, dass für insgesamt 14 Bereiche innerhalb von P-gp eine mögliche Markierung mit dem

Photoliganden detektiert werden konnte. Die Untersuchung der potenziell gelabelten Peptidsequenzen in Bezug auf ihre Topologie führte zu dem Ergebnis, dass alle möglicherweise markierten Regionen entweder Teil einer der beiden ATP-Bindungsstellen (NBD 1 oder NBD 2) waren oder sich in unmittelbarer Nähe zu diesen befanden. Die potenziell markierten Bereiche umfassen in der NBD 1 die Linker-Region, eine Sequenz N-terminal des Walker A-Motivs, den Q-loop, das Walker B-Motiv, den D-loop, das Walker A-Motiv und eine Sequenz N-terminal des A-loops. Innerhalb der NBD 2 konnten möglicherweise parallel dazu der H-loop, eine Sequenz N-terminal des ABC-Motivs, das Walker B-Motiv, der D-loop sowie eine Sequenz C-terminal des Walker A-Motivs mit 2,4-Dihydroxybenzophenon markiert werden. Zusätzlich hierzu wurde eine mögliche Markierung des ICL 2 beobachtet.

Im Gegensatz zu 8-Azido-ATP ergab die Auswertung der Massen-Fits für das Photolabeling mit 2,4-Dihydroxybenzophenon in drei Fällen mehr als eine passende Aminosäuresequenz innerhalb von P-gp. Aus diesem Grund wurde am Beispiel des Peptidsignals 1391,56¹⁺ durch Fragmentierung im MS/MS-Modus überprüft, 1) welche der beiden möglichen Peptidsequenzen (EGRTCIVIAHR oder EVKILKGLNLK) nun die richtige Aminosäuresequenz darstellt, 2) ob eine Bestimmung der Position der Photoaffinitätsmarkierung auf Aminosäureebene möglich ist und wenn dies der Fall ist, 3) an welche Aminosäure des Peptids der Photoligand gebunden hat. Die Auswertung des resultierenden MS/MS-Spektrums ergab unter Berücksichtigung aller detektierten Signale sowie ihres Zusammenhangs miteinander die Aminosäuresequenz EGRTCIVIAHR als korrektes Peptid zum Signal 1391,56¹⁺. Dieser Sequenzabschnitt beinhaltet den H-loop der NBD 2 und entspricht den Aminosäuren 1223-1233 der P-gp-Aminosäuresequenz. Darüber hinaus konnte die Position der Markierung mit 2,4-Dihydroxybenzophenon innerhalb dieses Peptids auf die beiden Aminosäuren Threonin und Cystein in Position 1226 und 1227 der P-gp-Aminosäuresequenz eingegrenzt werden. Demnach kann die Frage, ob mit der eingesetzten massenspektrometrischen Analysemethode die Bestimmung der Position einer Photoaffinitätsmarkierung auf Aminosäureebene möglich ist, scheinbar mit ja beantwortet werden.

Somit lässt sich abschließend das Fazit ziehen, dass die in der Literatur postulierte Interaktion von 2,4-Dihydroxybenzophenon mit der ATP-Bindungsstelle der NBD 2 von P-

gp in der vorliegenden Arbeit durch die Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente bestätigt werden konnte. Darüber hinaus wurde eine weitere Wechselwirkung von 2,4-Dihydroxybenzophenon mit der ATP-Bindungsstelle der NBD 1 von P-gp beobachtet, für die es noch keinen Hinweis durch Literaturdaten gab.

Im Anschluss an die Experimente mit 2,4-Dihydroxybenzophenon wurden die Phenothiazin-Derivate H15 und H19 für das Photolabeling von P-gp eingesetzt. Die beiden P-gp-Modulatoren unterscheiden sich strukturell lediglich in der Länge des Linkers zwischen dem Phenothiazin-Grundgerüst und dem Piperazin-Ring. In Anlehnung an bereits von Dr. Jens Meyer mit H19 durchgeführte Photoaffinity Labeling-Experimente wurde für beide Photoliganden eine Endkonzentration von 10 µmol/l gewählt und die Bestrahlungsdauer mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm auf 20 Minuten festgesetzt. Möglicherweise markierte Peptide wurden nach enzymatischem Verdau von P-gp mit Chymotrypsin durch Vergleich der Übersichtsspektren von Kontrolle und Probe identifiziert. Bedingt durch die Tatsache, dass die beiden Modulatoren mit den innerhalb der transmembranären Domänen lokalisierten Bindungsstellen von P-gp interagieren sollen, diese Bereiche von der Standardprotease Trypsin jedoch fast überhaupt nicht abgedeckt werden konnten, wurde im Unterschied zur Dissertation von Dr. Jens Meyer in der vorliegenden Arbeit das Chymotrypsin als Spaltungsreagenz ausgewählt. Dieses Enzym stellt einen Kompromiss zwischen einer akzeptablen transmembranären Sequenzabdeckung und der Auswertbarkeit der Photoaffinitätsmarkierungs-Experimente dar.

Der Abgleich der Proben- und Kontrollspektren (Probe = mit Photoligand bestrahlt; Kontrolle = ohne Photoligand bestrahlt) des Photolabelings von P-gp mit H15 ergab insgesamt 9 potenzielle Markierungen mit mehr als 60 theoretisch möglichen Aminosäuresequenzen innerhalb der P-gp-Topologie. Die Vielzahl der von der Masse her passenden Peptide innerhalb der P-gp-Sequenz liegt hier sowohl in der unspezifischen Spaltung des Chymotrypsins als auch in der Menge der beobachteten Fragmente von H15 begründet. Bedauerlicherweise musste in der vorliegenden Arbeit die Frage, welches der vielen theoretisch möglichen Peptide nun das markierte Peptid darstellt, aufgrund des Fehlens von MS/MS-Daten unbeantwortet bleiben, da wegen technischer Probleme des verwendeten Massenspektrometers keine Aufnahme bzw. Auswertung von

Fragmentspektren erfolgen konnte und somit eine Sequenzierung leider nicht möglich war. Demnach kann über die Lage der potenziell markierten Regionen innerhalb der P-gp-Topologie nur spekuliert werden. Diese erstrecken sich möglicherweise auf Teile der meisten transmembranären Helices und intrazellulären Loops. Darüber hinaus könnten Teilsequenzen der beiden Nukleotidbindungsdomänen, der Linker-Regionen, der extrazellulären Loops 1, 2, 4 und 6 sowie des C-Terminus mit H15 markiert worden sein. Dass in der Praxis eine Markierung aller genannten Regionen mit H15 stattgefunden haben soll, ist jedoch als äußerst unwahrscheinlich einzustufen.

Ein Abgleich dieser potenziell markierten Bereiche mit Literaturdaten ergibt ein hohes Maß an Übereinstimmungen. Bezogen auf die P-gp-Sequenz liegen diese Übereinstimmungen zwischen den Aminosäuren in Position 182 und 1171. Dieser Bereich umfasst die transmembranären Helices 3 - 12, die extrazellulären Loops 2 - 6, die intrazellulären Loops 2 - 4 sowie beide Nukleotidbindungsdomänen. Dagegen wurde für die Sequenzabschnitte N-terminal der Aminosäure 182 und C-terminal der Aminosäure 1171 in keiner der publizierten Vergleichsarbeiten eine Markierung identifiziert und folglich konnte in diesen Regionen auch keine Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen gefunden werden.

Überträgt man die in der vorliegenden Arbeit ermittelten möglichen Markierungen von P-gp mit H15 auf ein von Globisch et al. erstelltes P-gp-Homologiemodell, ergäbe sich wiederum eine gute Übereinstimmung mit den drei potenziellen Bindungsstellen des Modells. Diese befinden sich voraussichtlich zwischen den Aminosäuren in Position 69 und 1004 der P-gp-Sequenz. Die Bindungsstelle 1 setzt sich wahrscheinlich überwiegend aus den vier intrazellulären Loops zusammen; daneben sind die Linker-Regionen zwischen den Nukleotidbindungsdomänen und den TMs 6 und 12 sowie die unteren Teile der TMs 2, 5, 8 und 11 aller Voraussicht nach an dieser Bindungsstelle beteiligt. Die Bindungsstellen 2 und 3 des Modells werden dagegen aller Wahrscheinlichkeit nach von den transmembranären Helices gebildet, wobei sich die Bindungsstelle 2 aus den TMs 3, 4, 5, 6 und 8 sowie den extrazellulären Loops 2 - 4 und die Bindungsstelle 3 aus den TMs 1, 2, 9, 10, 11 und 12 sowie den extrazellulären Loops 1 und 6 zusammensetzt.

Die Auswertung der Photolabeling-Experimente von P-gp mit H19 erbrachte lediglich 3 potenzielle Markierungen. Unter Berücksichtigung aller beobachteten Fragmente von

H19 sowie des unspezifischen Spaltungsverhaltens des Chymotrypsins beläuft sich die Anzahl der theoretisch möglichen und von der Masse her passenden Peptidsequenzen innerhalb von P-gp jedoch auf über 80 Stück. Da sich aufgrund technischer Probleme des eingesetzten Massenspektrometers die Aufnahme bzw. Auswertung von MS/MS-Spektren wiederum sehr schwierig gestaltete, muss in Analogie zu H15 auch hier die Frage, welches der theoretisch möglichen Peptide nun das markierte Peptid repräsentiert, offen bleiben und von daher sind Aussagen über die Lage der potenziellen Markierungen innerhalb der P-gp-Topologie mit größter Spekulation behaftet.

Auffällig ist, dass sich die möglicherweise durch H19 markierten Regionen sehr stark mit den Bereichen überlappen, für die eine potenzielle Markierung mit H15 beobachtet wurde. Dieser hohe Grad an Übereinstimmung könnte durch die sehr nahe strukturelle Verwandtschaft der beiden Photoliganden begründet sein und lässt ein ähnliches Bindungsverhalten gegenüber P-gp vermuten. Zusätzlich zu den bereits für H15 postulierten Regionen könnten die durch H19 markierten Bereiche das Walker B-Motiv sowie A- und Q-loop der NBD 1, A- und Q-loop der NBD 2, den ECL 1 und eine Sequenz N-terminal der TM1 umfassen. Analog zu H15 ergibt sich somit für den Abgleich der durch H19 markierten Regionen mit Literaturangaben ein hohes Maß an Übereinstimmungen.

Literaturverzeichnis

- [1] Dean, M.; Annilo, T., Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annual review of genomics and human genetics* **2005**, *6*, 123-42.
- [2] Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakacs, G.; Varadi, A., Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev* **2006**, *86* (4), 1179-236.
- [3] Seeger, M. A.; van Veen, H. W., Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters. *Biochim Biophys Acta* **2009**, *1794* (5), 725-37.
- [4] Linton, K. J., Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* **2007**, *22*, 122-30.
- [5] Higgins, C. F., ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual review of cell biology* **1992**, *8*, 67-113.
- [6] Dean, M.; Rzhetsky, A.; Allikmets, R., The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* **2001**, *11* (7), 1156-66.
- [7] Hollenstein, K.; Frei, D. C.; Locher, K. P., Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* **2007**, *446* (7132), 213-6.
- [8] Saier, M. H., Jr.; Paulsen, I. T., Phylogeny of multidrug transporters. *Seminars in cell & developmental biology* **2001**, *12* (3), 205-13.
- [9] Nikaido, H.; Hall, J. A., Overview of bacterial ABC transporters. *Methods Enzymol* **1998**, *292*, 3-20.
- [10] Chang, G., Retraction of "Structure of MsbA from *Vibrio cholera*: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation" [J. Mol. Biol. (2003) 330 419-430]. *J Mol Biol* **2007**, *369* (2), 596.
- [11] Ward, A.; Reyes, C. L.; Yu, J.; Roth, C. B.; Chang, G., Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (48), 19005-10.
- [12] Glavinas, H.; Krajcsi, P.; Cserepes, J.; Sarkadi, B., The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. *Current drug delivery* **2004**, *1* (1), 27-42.
- [13] Zaitseva, J.; Jenewein, S.; Jumpertz, T.; Holland, I. B.; Schmitt, L., H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB. *EMBO J* **2005**, *24* (11), 1901-10.
- [14] Hollenstein, K.; Dawson, R. J.; Locher, K. P., Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol* **2007**, *17* (4), 412-8.
- [15] Oswald, C.; Holland, I. B.; Schmitt, L., The motor domains of ABC-transporters. What can structures tell us? *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **2006**, *372* (6), 385-99.

- [16] Higgins, C. F., Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* **2007**, *446* (7137), 749-57.
- [17] Borst, P.; Elferink, R. O., Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* **2002**, *71*, 537-92.
- [18] Szakacs, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M. M., Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5* (3), 219-34.
- [19] Schinkel, A. H.; Jonker, J. W., Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* **2003**, *55* (1), 3-29.
- [20] Alvarez, A. I.; Perez, M.; Prieto, J. G.; Molina, A. J.; Real, R.; Merino, G., Fluoroquinolone efflux mediated by ABC transporters. *J Pharm Sci* **2008**, *97* (9), 3483-93.
- [21] Henry, M.; Alibert, S.; Rogier, C.; Barbe, J.; Pradines, B., Inhibition of efflux of quinolines as new therapeutic strategy in malaria. *Current topics in medicinal chemistry* **2008**, *8* (7), 563-78.
- [22] Reddy, M. M.; Light, M. J.; Quinton, P. M., Activation of the epithelial Na⁺ channel (ENaC) requires CFTR Cl⁻ channel function. *Nature* **1999**, *402* (6759), 301-4.
- [23] Takahashi, K.; Kimura, Y.; Nagata, K.; Yamamoto, A.; Matsuo, M.; Ueda, K., ABC proteins: key molecules for lipid homeostasis. *Medical molecular morphology* **2005**, *38* (1), 2-12.
- [24] Mellor, H. R.; Callaghan, R., Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response. *Pharmacology* **2008**, *81* (4), 275-300.
- [25] Eckford, P. D.; Sharom, F. J., ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev* **2009**, *109* (7), 2989-3011.
- [26] Choi, C. H., ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer cell international* **2005**, *5*, 30.
- [27] Ozben, T., Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett* **2006**, *580* (12), 2903-9.
- [28] Juliano, R. L.; Ling, V., A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **1976**, *455* (1), 152-62.
- [29] Ueda, K.; Cardarelli, C.; Gottesman, M. M.; Pastan, I., Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84* (9), 3004-8.
- [30] Lockhart, A. C.; Tirona, R. G.; Kim, R. B., Pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in cancer and chemotherapy. *Mol Cancer Ther* **2003**, *2* (7), 685-98.
- [31] Gillet, J. P.; Efferth, T.; Remacle, J., Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1775* (2), 237-62.
- [32] Bates, S. E. In *ABC Proteins: From Bacteria to Man*, 1st ed.; Academic Press: San Diego, California, **2003**; Chapter Solving the Problem of Multidrug Resistance: ABC Transporters in Clinical Oncology, pp 359-391.

- [33] Ross, D. D.; Nakanishi, T., Impact of breast cancer resistance protein on cancer treatment outcomes. *Methods in molecular biology* **2010**, *596*, 251-90.
- [34] Gillet, J. P.; Gottesman, M. M., Mechanisms of multidrug resistance in cancer. *Methods in molecular biology* **2010**, *596*, 47-76.
- [35] Chen, C. J.; Chin, J. E.; Ueda, K.; Clark, D. P.; Pastan, I.; Gottesman, M. M.; Roninson, I. B., Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **1986**, *47* (3), 381-9.
- [36] Ambudkar, S. V.; Dey, S.; Hrycyna, C. A.; Ramachandra, M.; Pastan, I.; Gottesman, M. M., Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1999**, *39*, 361-98.
- [37] Leslie, E. M.; Deeley, R. G.; Cole, S. P., Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology* **2005**, *204* (3), 216-37.
- [38] Wiese, M.; Pajeva, I. K., Structure-activity relationships of multidrug resistance reversers. *Curr Med Chem* **2001**, *8* (6), 685-713.
- [39] Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M., Processing mutations located throughout the human multidrug resistance P-glycoprotein disrupt interactions between the nucleotide binding domains. *J Biol Chem* **2004**, *279* (37), 38395-401.
- [40] Srinivas, E.; Murthy, J. N.; Rao, A. R.; Sastry, G. N., Recent advances in molecular modeling and medicinal chemistry aspects of phospho-glycoprotein. *Curr Drug Metab* **2006**, *7* (2), 205-17.
- [41] Gribar, J. J.; Ramachandra, M.; Hrycyna, C. A.; Dey, S.; Ambudkar, S. V., Functional characterization of glycosylation-deficient human P-glycoprotein using a vaccinia virus expression system. *J Membr Biol* **2000**, *173* (3), 203-14.
- [42] Loo, T. W.; Clarke, D. M., The human multidrug resistance P-glycoprotein is inactive when its maturation is inhibited: potential for a role in cancer chemotherapy. *FASEB J* **1999**, *13* (13), 1724-32.
- [43] Loo, T. W.; Clarke, D. M., Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *J Membr Biol* **2005**, *206* (3), 173-85.
- [44] Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M., Transmembrane segment 7 of human P-glycoprotein forms part of the drug-binding pocket. *Biochem J* **2006**, *399* (2), 351-9.
- [45] Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M., Transmembrane segment 1 of human P-glycoprotein contributes to the drug-binding pocket. *Biochem J* **2006**, *396* (3), 537-45.
- [46] Pleban, K.; Kopp, S.; Csaszar, E.; Peer, M.; Hrebicek, T.; Rizzi, A.; Ecker, G. F.; Chiba, P., P-glycoprotein substrate binding domains are located at the transmembrane domain/transmembrane domain interfaces: a combined photoaffinity labeling-protein homology modeling approach. *Mol Pharmacol* **2005**, *67* (2), 365-74.
- [47] Ecker, G. F.; Csaszar, E.; Kopp, S.; Plagens, B.; Holzer, W.; Ernst, W.; Chiba, P.,

- 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* (3), 637-48.
- [48] Shapiro, A. B.; Corder, A. B.; Ling, V., P-glycoprotein-mediated Hoechst 33342 transport out of the lipid bilayer. *Eur J Biochem* **1997**, *250* (1), 115-21.
- [49] Loo, T. W.; Clarke, D. M., Do drug substrates enter the common drug-binding pocket of P-glycoprotein through "gates"? *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *329* (2), 419-22.
- [50] Omote, H.; Al-Shawi, M. K., Interaction of transported drugs with the lipid bilayer and P-glycoprotein through a solvation exchange mechanism. *Biophys J* **2006**, *90* (11), 4046-59.
- [51] Gerlach, J. H.; Endicott, J. A.; Juranka, P. F.; Henderson, G.; Sarangi, F.; Deuchars, K. L.; Ling, V., Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. *Nature* **1986**, *324* (6096), 485-9.
- [52] Raviv, Y.; Pollard, H. B.; Bruggemann, E. P.; Pastan, I.; Gottesman, M. M., Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells. *J Biol Chem* **1990**, *265* (7), 3975-80.
- [53] Higgins, C. F.; Gottesman, M. M., Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* **1992**, *17* (1), 18-21.
- [54] Kol, M. A.; de Kruijff, B.; de Kroon, A. I., Phospholipid flip-flop in biogenic membranes: what is needed to connect opposite sides. *Seminars in cell & developmental biology* **2002**, *13* (3), 163-70.
- [55] Sharom, F. J., Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1). *Biochem Cell Biol* **2006**, *84* (6), 979-92.
- [56] Ferte, J., Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur J Biochem* **2000**, *267* (2), 277-94.
- [57] McDevitt, C. A.; Crowley, E.; Hobbs, G.; Starr, K. J.; Kerr, I. D.; Callaghan, R., Is ATP binding responsible for initiating drug translocation by the multidrug transporter ABCG2? *FEBS J* **2008**, *275* (17), 4354-62.
- [58] Deeley, R. G.; Westlake, C.; Cole, S. P., Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* **2006**, *86* (3), 849-99.
- [59] Senior, A. E.; al-Shawi, M. K.; Urbatsch, I. L., The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett* **1995**, *377* (3), 285-9.
- [60] Higgins, C. F.; Linton, K. J., The ATP switch model for ABC transporters. *Nature structural & molecular biology* **2004**, *11* (10), 918-26.
- [61] Sauna, Z. E.; Ambudkar, S. V., About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Mol*

- Cancer Ther* **2007**, *6* (1), 13-23.
- [62] Sauna, Z. E.; Kim, I. W.; Nandigama, K.; Kopp, S.; Chiba, P.; Ambudkar, S. V., Catalytic cycle of ATP hydrolysis by P-glycoprotein: evidence for formation of the E.S reaction intermediate with ATP-gamma-S, a nonhydrolyzable analogue of ATP. *Biochemistry* **2007**, *46* (48), 13787-99.
- [63] Siarheyeva, A.; Liu, R.; Sharom, F. J., Characterization of an asymmetric occluded state of P-glycoprotein with two bound nucleotides: implications for catalysis. *J Biol Chem* **2010**, *285* (10), 7575-86.
- [64] Al-Shawi, M. K.; Polar, M. K.; Omote, H.; Figler, R. A., Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein. *J Biol Chem* **2003**, *278* (52), 52629-40.
- [65] Callaghan, R.; Ford, R. C.; Kerr, I. D., The translocation mechanism of P-glycoprotein. *FEBS Lett* **2006**, *580* (4), 1056-63.
- [66] Crowley, E.; Callaghan, R., Multidrug efflux pumps: drug binding--gates or cavity? *FEBS J* **2010**, *277* (3), 530-9.
- [67] Pajeva, I. K.; Globisch, C.; Wiese, M., Structure-function relationships of multidrug resistance P-glycoprotein. *J Med Chem* **2004**, *47* (10), 2523-33.
- [68] Globisch, C.; Pajeva, I. K.; Wiese, M., Identification of putative binding sites of P-glycoprotein based on its homology model. *ChemMedChem* **2008**, *3* (2), 280-95.
- [69] Aller, S. G.; Yu, J.; Ward, A.; Weng, Y.; Chittaboina, S.; Zhuo, R.; Harrell, P. M.; Trinh, Y. T.; Zhang, Q.; Urbatsch, I. L.; Chang, G., Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* **2009**, *323* (5922), 1718-22.
- [70] Shapiro, A. B.; Ling, V., Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities. *Eur J Biochem* **1997**, *250* (1), 130-7.
- [71] Shapiro, A. B.; Ling, V., Extraction of Hoechst 33342 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by P-glycoprotein. *Eur J Biochem* **1997**, *250* (1), 122-9.
- [72] Shapiro, A. B.; Ling, V., Transport of LDS-751 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by the rhodamine-123-selective site of P-glycoprotein. *Eur J Biochem* **1998**, *254* (1), 181-8.
- [73] Shapiro, A. B.; Fox, K.; Lam, P.; Ling, V., Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *Eur J Biochem* **1999**, *259* (3), 841-50.
- [74] Loo, T. W.; Clarke, D. M., Location of the rhodamine-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein. *J Biol Chem* **2002**, *277* (46), 44332-8.
- [75] Lugo, M. R.; Sharom, F. J., Interaction of LDS-751 with P-glycoprotein and mapping of the location of the R drug binding site. *Biochemistry* **2005**, *44* (2), 643-55.
- [76] Qu, Q.; Sharom, F. J., Proximity of bound Hoechst 33342 to the ATPase catalytic sites places the drug binding site of P-glycoprotein within the cytoplasmic membrane leaflet. *Biochemistry* **2002**, *41* (14), 4744-52.

- [77] Martin, C.; Berridge, G.; Higgins, C. F.; Mistry, P.; Charlton, P.; Callaghan, R., Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* **2000**, *58* (3), 624-32.
- [78] Safa, A. R., Identification and characterization of the binding sites of P-glycoprotein for multidrug resistance-related drugs and modulators. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **2004**, *4* (1), 1-17.
- [79] Dey, S.; Hafkemeyer, P.; Pastan, I.; Gottesman, M. M., A single amino acid residue contributes to distinct mechanisms of inhibition of the human multidrug transporter by stereoisomers of the dopamine receptor antagonist flupentixol. *Biochemistry* **1999**, *38* (20), 6630-9.
- [80] Garrigues, A.; Loiseau, N.; Delaforge, M.; Ferte, J.; Garrigos, M.; Andre, F.; Orłowski, S., Characterization of two pharmacophores on the multidrug transporter P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* **2002**, *62* (6), 1288-98.
- [81] Gruol, D. J.; King, M. N.; Kuehne, M. E., Evidence for the locations of distinct steroid and Vinca alkaloid interaction domains within the murine mdr1b P-glycoprotein. *Mol Pharmacol* **2002**, *62* (5), 1238-48.
- [82] Loo, T. W.; Bartlett, M. C.; Clarke, D. M., Substrate-induced conformational changes in the transmembrane segments of human P-glycoprotein. Direct evidence for the substrate-induced fit mechanism for drug binding. *J Biol Chem* **2003**, *278* (16), 13603-6.
- [83] Lee, C. H., Reversing agents for ATP-binding cassette (ABC) transporters: application in modulating multidrug resistance (MDR). *Curr Med Chem Anticancer Agents* **2004**, *4* (1), 43-52.
- [84] Shukla, S.; Wu, C. P.; Ambudkar, S. V., Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **2008**, *4* (2), 205-23.
- [85] Tsuruo, T.; Iida, H.; Tsukagoshi, S.; Sakurai, Y., Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* **1981**, *41* (5), 1967-72.
- [86] Varma, M. V.; Ashokraj, Y.; Dey, C. S.; Panchagnula, R., P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. *Pharmacol Res* **2003**, *48* (4), 347-59.
- [87] List, A. F.; Kopecky, K. J.; Willman, C. L.; Head, D. R.; Persons, D. L.; Slovak, M. L.; Dorr, R.; Karanes, C.; Hynes, H. E.; Doroshow, J. H.; Shurafa, M.; Appelbaum, F. R., Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* **2001**, *98* (12), 3212-20.
- [88] Wattel, E.; Solary, E.; Hecquet, B.; Caillot, D.; Ifrah, N.; Brion, A.; Milpied, N.; Janvier, M.; Guerci, A.; Rochant, H.; Cordonnier, C.; Dreyfus, F.; Veil, A.; Hoang-Ngoc, L.; Stoppa, A. M.; Gratecos, N.; Sadoun, A.; Tilly, H.; Brice, P.; Lioure, B.; Desablens, B.; Pignon, B.; Abgrall, J. P.; Leporrier, M.; Fenaux, P.; et al., Quinine improves results of intensive chemotherapy (IC) in myelodysplastic syndromes (MDS) expressing P-glycoprotein (PGP). Updated results of a randomized study.

- Groupe Francais des Myelodysplasies (GFM) and Groupe GOELAMS. *Advances in experimental medicine and biology* **1999**, 457, 35-46.
- [89] Martin, C.; Berridge, G.; Mistry, P.; Higgins, C.; Charlton, P.; Callaghan, R., The molecular interaction of the high affinity reversal agent XR9576 with P-glycoprotein. *Br J Pharmacol* **1999**, 128 (2), 403-11.
- [90] Hyafil, F.; Vergely, C.; Du Vignaud, P.; Grand-Perret, T., In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Res* **1993**, 53 (19), 4595-602.
- [91] Coley, H. M., Overcoming multidrug resistance in cancer: clinical studies of p-glycoprotein inhibitors. *Methods in molecular biology* **2010**, 596, 341-58.
- [92] Colabufo, N. A.; Berardi, F.; Cantore, M.; Contino, M.; Inglese, C.; Niso, M.; Perrone, R., Perspectives of P-glycoprotein modulating agents in oncology and neurodegenerative diseases: pharmaceutical, biological, and diagnostic potentials. *J Med Chem* **2010**, 53 (5), 1883-97.
- [93] McDevitt, C. A.; Callaghan, R., How can we best use structural information on P-glycoprotein to design inhibitors? *Pharmacol Ther* **2007**, 113 (2), 429-41.
- [94] Baumert, C.; Hilgeroth, A., Recent advances in the development of P-gp inhibitors. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **2009**, 9 (4), 415-36.
- [95] Critchfield, J. W.; Welsh, C. J.; Phang, J. M.; Yeh, G. C., Modulation of adriamycin accumulation and efflux by flavonoids in HCT-15 colon cells. Activation of P-glycoprotein as a putative mechanism. *Biochem Pharmacol* **1994**, 48 (7), 1437-45.
- [96] Wang, E. J.; Barecki-Roach, M.; Johnson, W. W., Elevation of P-glycoprotein function by a catechin in green tea. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**, 297 (2), 412-8.
- [97] Sharom, F. J.; Yu, X.; DiDiodato, G.; Chu, J. W., Synthetic hydrophobic peptides are substrates for P-glycoprotein and stimulate drug transport. *Biochem J* **1996**, 320 (Pt 2), 421-8.
- [98] Noguchi, K.; Kawahara, H.; Kaji, A.; Katayama, K.; Mitsuhashi, J.; Sugimoto, Y., Substrate-dependent bidirectional modulation of P-glycoprotein-mediated drug resistance by erlotinib. *Cancer Sci* **2009**, 100 (9), 1701-7.
- [99] Palmeira, A.; Vasconcelos, M. H.; Paiva, A.; Fernandes, M. X.; Pinto, M.; Sousa, E., Dual inhibitors of P-glycoprotein and tumor cell growth: (re)discovering thioxanthenes. *Biochem Pharmacol* **2012**, 83 (1), 57-68.
- [100] Komarov, P. G.; Komarova, E. A.; Kondratov, R. V.; Christov-Tselkov, K.; Coon, J. S.; Chernov, M. V.; Gudkov, A. V., A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* **1999**, 285 (5434), 1733-7.
- [101] Pietrancosta, N.; Moumen, A.; Dono, R.; Lingor, P.; Planchamp, V.; Lamballe, F.; Bahr, M.; Kraus, J. L.; Maina, F., Imino-tetrahydro-benzothiazole derivatives as p53 inhibitors: discovery of a highly potent in vivo inhibitor and its action mechanism. *J Med Chem* **2006**, 49 (12), 3645-52.
- [102] Kondratov, R. V.; Komarov, P. G.; Becker, Y.; Ewenson, A.; Gudkov, A. V., Small molecules that dramatically alter multidrug resistance phenotype by modulating

- the substrate specificity of P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98* (24), 14078-83.
- [103] Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680-5.
- [104] Jacobs, A., Expression, Aufreinigung und funktionelle Untersuchungen der ABC-Transporter ABCB1 und ABCG2. *Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn* **2010**.
- [105] Kang, D., Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc* **2002**, *23*(11), 1511-12.
- [106] Roberts, E. S.; Hopkins, N. E.; Alworth, W. L.; Hollenberg, P. F., Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 2B1 by 2-ethynyl-naphthalene: identification of an active-site peptide. *Chem Res Toxicol* **1993**, *6* (4), 470-9.
- [107] Dong, M.; Oda, R. P.; Strausbauch, M. A.; Wettstein, P. J.; Landers, J. P.; Miller, L. J., Hydrophobic peptide mapping of clinically relevant heptathelical membrane proteins by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **1997**, *18* (10), 1767-74.
- [108] Rietschel, B.; Bornemann, S.; Arrey, T. N.; Baeumlisberger, D.; Karas, M.; Meyer, B., Membrane protein analysis using an improved peptic in-solution digestion protocol. *Proteomics* **2009**, *9* (24), 5553-7.
- [109] http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p6887pis.pdf
- [110] <https://proteabio.com/products/PE-103>
- [111] <http://www.promega.de/~media/Files/Resources/Protocols/Product%20Information%20Sheets/N/Elastase%20Protocol.pdf>
- [112] http://www.roche-applied-science.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/05192692001_06.10.pdf
- [113] <http://www.promega.de/~media/Files/Resources/Protocols/Product%20Information%20Sheets/N/Thermolysin%20Protocol.pdf>
- [114] http://www.dichrom.com/downloads/Protea/AALS_web.pdf
- [115] http://www.dichrom.com/pics/products/Protea/Katalog2010/Acid_Labile_Surfactants.pdf
- [116] https://proteabio.com/.../CQA_ALS-410.pdf
- [117] <http://www.promega.de/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/101/ProteaseMAX%20Surfactant%20Trypsin%20Enhancer.pdf>
- [118] Singh, A.; Thornton, E. R.; Westheimer, F. H., The photolysis of diazoacetylchymotrypsin. *J Biol Chem* **1962**, *237*, 3006-8.
- [119] Vaughan, R. J.; Westheimer, F. H., A method for marking the hydrophobic binding sites of enzymes. An insertion into the methyl group of an alanine residue of trypsin. *J Am Chem Soc* **1969**, *91* (1), 217-8.
- [120] Bayley, H., 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.*
- [121] Dorman, G.; Prestwich, G. D., Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry* **1994**, *33* (19), 5661-73.
- [122] Hrycina, C. A.; Ramachandra, M.; Germann, U. A.; Cheng, P. W.; Pastan, I.; Gottesman, M. M., Both ATP sites of human P-glycoprotein are essential but not symmetric. *Biochemistry* **1999**, *38* (42), 13887-99.
- [123] Sauna, Z. E.; Ambudkar, S. V., Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**, *97* (6), 2515-20.
- [124] Sauna, Z. E.; Smith, M. M.; Muller, M.; Ambudkar, S. V., Functionally similar vanadate-induced 8-azidoadenosine 5'-[alpha-(32)P]Diphosphate-trapped transition state intermediates of human P-glycoprotein are generated in the absence and presence of ATP hydrolysis. *J Biol Chem* **2001**, *276* (24), 21199-208.
- [125] Meyer, J. U., Untersuchung der Protein/Substrat-Interaktion an rekombinantem P-Glykoprotein. *Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2008.*
- [126] Zhou, H.; Tian, R.; Ye, M.; Xu, S.; Feng, S.; Pan, C.; Jiang, X.; Li, X.; Zou, H., Highly specific enrichment of phosphopeptides by zirconium dioxide nanoparticles for phosphoproteome analysis. *Electrophoresis* **2007**, *28* (13), 2201-15.
- [127] Rancon, S.; Chaboud, A.; Darbour, N.; Comte, G.; Bayet, C.; Simon, P. N.; Raynaud, J.; Di Pietro, A.; Cabalion, P.; Barron, D., Natural and synthetic benzophenones: interaction with the cytosolic binding domain of P-glycoprotein. *Phytochemistry* **2001**, *57* (4), 553-7.
- [128] Klinkhammer, W., Design, Synthese und 3D-QSAR neuartiger P-gp-Modulatoren. *Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2006.*
- [129] Lottspeich, F.; Engels, J. W., *Bioanalytik. 3. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012.*
- [130] http://gpmaw.com/html/lighthouse_data.html
- [131] Bairoch, A.; Apweiler, R.; Wu, C. H.; Barker, W. C.; Boeckmann, B.; Ferro, S.; Gasteiger, E.; Huang, H.; Lopez, R.; Magrane, M.; Martin, M. J.; Natale, D. A.; O'Donovan, C.; Redaschi, N.; Yeh, L.-S. L., The Universal Protein Resource (UniProt), *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, D154-D159.
- [132] <http://www.uniprot.org/uniprot/P08183>
- [133] van Montfort, B. A.; Doeven, M. K.; Canas, B.; Veenhoff, L. M.; Poolman, B.; Robillard, G. T., 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* (1-3), 111-5.
- [134] Loo, T. W.; Clarke, D. M., Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. *J Biol Chem* **2001**, *276* (18), 14972-9.
- [135] Demmer, A.; Andreae, S.; Thole, H.; Tummler, B., Iodomycin and iodipine, a

- structural analogue of azidopine, bind to a common domain in hamster P-glycoprotein. *Eur J Biochem* **1999**, *264* (3), 800-5.
- [136] Bruggemann, E. P.; Currier, S. J.; Gottesman, M. M.; Pastan, I., Characterization of the azidopine and vinblastine binding site of P-glycoprotein. *J Biol Chem* **1992**, *267* (29), 21020-6.
- [137] Greenberger, L. M., 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* (15), 11417-25.
- [138] Isenberg, B.; Thole, H.; Tummler, B.; Demmer, A., Identification and localization of three photobinding sites of iodoarylazidoprazosin in hamster P-glycoprotein. *Eur J Biochem* **2001**, *268* (9), 2629-34.
- [139] Borchers, C.; Boer, R.; Klemm, K.; Figala, V.; Denzinger, T.; Ulrich, W. R.; Haas, S.; Ise, W.; Gekeler, V.; Przybylski, M., Characterization of the dexniguldipine binding site in the multidrug resistance-related transport protein P-glycoprotein by photoaffinity labeling and mass spectrometry. *Mol Pharmacol* **2002**, *61* (6), 1366-76.
- [140] Wu, Q.; Bounaud, P. Y.; Kuduk, S. D.; Yang, C. P.; Ojima, I.; Horwitz, S. B.; Orr, G. A., 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* (32), 11272-9.

Publikationen

Wissenschaftliche Originalarbeiten

Jacobs, A.; Emmert, D.; Wieschrath, S.; Hrycyna, C. A.; Wiese, M., Recombinant synthesis of human ABCG2 expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: an experimental methodological study. *The protein journal* **2011**, *30* (3), 201-11.

Poster und Kongressbeiträge

Wieschrath, S.; Metzger, S.; Wiese, M., Evaluation of different digestion methods with the objective of achieving complete sequence coverage of the ABC transporter P-glycoprotein for photoaffinity labeling experiments. *Third FEBS Special Meeting*, Innsbruck, **2010**. (Poster)

Wieschrath, S.; Metzger, S.; Wiese, M., Increasing transmembrane sequence coverage of P-glycoprotein in mass spectrometric analysis. *Fourth SFB35-Symposium*, Wien, **2011**. (Poster)

Wieschrath, S.; Metzger, S.; Wiese, M., Increasing transmembrane sequence coverage of P-glycoprotein for photoaffinity labeling experiments. *Fourth FEBS Special Meeting*, Innsbruck, **2012**. (Poster)

Verfassererklärung

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

Bonn, den 30.03.2015

Svenja Wieschrath