

ANALYSE DER SUBSTRATBINDUNGSSTELLEN DES P-GLYKOPROTEINS

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von
Dipl. Biol. Bärbel Isenberg
geboren am 09. April 1972 in Lüneburg

2000

Referent:
Korreferent:
Tag der Promotion:

Prof. Dr. Dr. Burkhard Tümmler
Prof. Dr. Walter Müller
30. Oktober 2000

**In Gedenken an meinen Vater
Klaus Dieter Isenberg**

Nur wer nicht im Gedächtnis bleibt, ist wirklich gestorben.

Danksagungen

Diese Arbeit wurde in der Klinischen Forschergruppe „Molekularpathologie der Mukoviszidose“ unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Burkhard Tümmler an der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Ihm möchte ich für das interessante Thema, sein Interesse am Gelingen und seine Unterstützung besonders danken.

Für die finanzielle Förderung danke ich dem Graduiertenkolleg „Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums“ unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Reinhold E. Schmidt sowie Herrn Prof. Dr. Wilfried Bautsch und Herrn Prof. Dr. Michael Martin für die Kobetreuung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Annette Demmer, die mir aufgrund Ihres fachlichen Wissens Einblicke und Ideen für meine Arbeit gegeben hat – vielen, vielen Dank!!!

Für das gute Arbeitsklima und die entwaffnende Hilfsbereitschaft möchte ich den gesamten derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Klinischen Forschergruppe sowie der Abteilung „Pädiatrische Hämatologie und Onkologie“ unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Karl Welte danken.

Ganz besonders danke ich:

Frau Dr. Frauke Mekus, die mir nicht nur wissenschaftliche Hilfestellungen gegeben hat, sondern auch Doppelkopf beibrachte. Herrn Dipl. Biochem. Lutz Wiehlmann für die fachliche Beratung und Computerhilfe. Herrn Dr. Horst Flathmann für die Mitarbeit bei den hergestellten Antikörpern. Frau Silke Jansen, die aus Zeitmangel meinen letzten Western-Blot durchgeführt hat. Frau Dipl. Biochem. Anna Limpert, daß sie die Strukturformeln gezeichnet hat. Herrn Dr. Matthias Ballmaier, der die FACS-Untersuchungen mit mir durchführte. Frau Dr. Brigitte Kasper, die mit mir die 2D-Gelelektrophorese mittels Immobiline Dry Strips etablierte. Frau Dr. Carmela Beger für die nette Zusammenarbeit und die Übersetzung der Zusammenfassung. Herrn Dipl. Biol. Dirk Wehmhöner, der die Auswertungen mit MALDI-TOF an der GBF-Braunschweig übernommen hat. Herrn Priv. Doz. Heinrich-Hubert Thole danke ich für die Aminosäuresequenzanalysen.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller möchte ich für die Übernahme des Korreferats danken.

Ein besonderer Dank gilt auch Stephan Rehfeld, der sich mit dem Layout dieser Arbeit auseinandergesetzt hat, und nie die gute Laune dabei verlor sowie dem Steuerberaterverband Niedersachsen Sachsen-Anhalt e.V. für die Bereitstellung der Computer und Kaffee.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Mutter Lorita Isenberg danken, die neben aufbauenden Gesprächen und finanziellen Notspritzen auch die Katzenbetreuung während der Erstellung dieser Arbeit übernommen hat!!!

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 P-Glykoprotein	1
1.2 Topologie des P-Glykoproteins	3
1.3 ABC-Transporter	5
1.4 LmrA	6
1.5 Bindungsstellen im P-Glykoprotein	7
1.6 Ziele dieser Arbeit	9
2 Material und Methoden	12
2.1 Bindungsstellen von Iodoarylazidoprazosin in Hamster P-Glykoprotein	12
2.1.1 Zellkultur	12
2.1.2 Membranpräparation	14
2.1.3 Proteinbestimmung nach Peterson (1977).....	15
2.1.4 Photoaffinitätsmarkierung	17
2.1.5 Agarosegelaufreinigung	18
2.1.6 Spaltung des P-Glykoproteins	19
2.1.7 BNPS-Skatol-Spaltung (chemisch)	20
2.1.8 Lys C Spaltung (enzymatisch)	20
2.1.9 Trypsinverdau (enzymatisch).....	21
2.1.10 Trizingel	21
2.1.11 Aufreinigung über „ <i>reversed phase</i> “ Chromatographie (HPLC).....	23
2.1.12 Semi Dry Blot.....	25
2.2 Herstellung von polyklonalen Antikörpern	26
2.2.1 Herstellung von elektrokompetenten E. coli-Zellen	26
2.2.2 Expressionsvektor pGEX4T1	27
2.2.3 Transformation des Expressionsvektors.....	27
2.2.4 Plasmidpräparation	28
2.2.5 huMDR1-Teilsequenz	30

2.2.6	Agarosegelelektrophorese.....	31
2.2.7	Restriktionsverdau	32
2.2.8	Ligation	33
2.2.9	Überprüfung positiver Klone.....	33
2.2.10	Proteinaufreinigung	34
2.2.11	Thrombinverdau	34
2.2.12	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	34
2.2.13	Kupfer-Färbung [Lee <i>et al.</i> , 1987].....	36
2.2.14	Dialyse	37
2.2.15	Immunisierung	37
2.2.16	Aufarbeitung des Serums.....	38
2.2.17	Western-Blot.....	38
2.2.18	FACS (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)	40
2.3	Zwei Dimensionale (2D) Gelelektrophorese	41
2.3.1	Silberfärbung	43
2.3.2	Coomassie-Färbung (kolloidale Färbung).....	44
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Identifizierung der Substratbindungsstellen von Iodoarylazidoprazosins innerhalb des P-Glykoproteins aus CHO B30-Zellen.....	46
3.1.1	Photomarkierung.....	46
3.1.2	HPLC-Aufreinigung des BNPS-Skatol-Verdau.....	49
3.1.3	HPLC-Aufreinigung des Lys C-Verdau.....	51
3.1.4	Trypsinverdau	54
3.2	Herstellung und Charakterisierung von polyklonalen Antikörpern.....	55
3.2.1	PCR-Expressionsklonierung von α MDR-L4	56
3.2.2	Proteinexpression der positiven Klone	59
3.2.3	Aufarbeitung des Fusionsproteins und Thrombinspaltung.....	61
3.2.4	Überprüfung der Antikörperspezifität	62
3.2.5	Topologieüberprüfung im FACS	69
3.3	2D Gelelektrophorese	70
4	Diskussion.....	75
4.1	Photobindungsstellen innerhalb des P-Glykoproteins	75
4.1.1	Substratbindungsstellen und ihre Bedeutung.....	75
4.1.2	Überprüfung der Iodoarylazidoprazosinbindungsstellen.....	76

4.1.3	Bindungsstellen innerhalb des P-Glykoproteins	77
4.1.4	Der Substrattransport.....	79
4.2	Herstellung polyklonaler Antikörper.....	82
4.2.1	Zellkultur	83
4.2.2	Western-Blot- und FACS-Ergebnisse	85
4.3	Ergebnisse der 2D Gelelektrophorese	86
5	Zusammenfassung.....	88
6	Abstract	90
7	Literaturverzeichnis.....	92
Anhang	i

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1:	Strukturmodell des P-Glykoproteins nach Juranka <i>et al.</i> (1989).	2
Abbildung 1-2:	Topologiemodelle des P-Glykoproteins.....	4
Abbildung 1-3:	Hypothetisches Modell von Pxa1p mit der Lokalisation der Proteinmotive nach Shani <i>et al.</i> (1996)	6
Abbildung 1-4:	Substrate des P-Glykoproteins.	8
Abbildung 3-1:	Tryptophanspaltung (BNPS-Skatol-Verdau) der mit Iodoarylazidoprazosin gekoppelten Gesamtmembranfraktion aus CHO B30-Zellen.	48
Abbildung 3-2:	Elutionsprofil der Aufreinigung des ca. 8 kDa-Fragmentes über eine Phenylsäule.49	
Abbildung 3-3:	Aufreinigung der C-Bande über <i>Semi Dry Blot</i>	50
Abbildung 3-4:	Lys C-Spaltung der mit Iodoarylazidoprazosin gekoppelten Gesamtmembranfraktion aus CHO B30-Zellen.....	51
Abbildung 3-5:	Elutionsprofil der Auftrennung des ca. 6 kDa-Fragmentes über eine Phenylsäule.52	
Abbildung 3-6:	Aufreinigung der A- und B-Bande über <i>Semi Dry Blot</i>	53
Abbildung 3-7:	Trypsinverdau nach Georges <i>et al.</i> (1991) des mit Iodoarylazidoprazosin markierten P-Glykoproteins.	55
Abbildung 3-8:	Restriktionsverdau des pGEX4T1-Vektors mit <i>Bam</i> HI und <i>Xho</i> I.	57
Abbildung 3-9:	PCR-Produkt der <i>MDR1</i> -Teilsequenz (<i>Insert</i>).....	58
Abbildung 3-10:	Kolonie-PCR-Überprüfung.	59

Inhaltsverzeichnis

Abbildung 3-11: Induktion der Proteinexpression mit IPTG.....	60
Abbildung 3-12: Thrombinspaltung des P-Glykoprotein-Teilfragments (ca. 4 kDa) von dem spezifisch an Sepharose4B gekoppelten GST-Fusionsprotein (ca. 29 kDa).61	
Abbildung 3-13: Elutionsprofil des aufgereinigtem GST-Fusionsproteins von der Sepharose4B.	62
Abbildung 3-14: Verdrängungstitration des hergestellten Antikörpers (α MDR-L4) mit 100ng bzw. 1 μ g GST-Fusionsprotein.....	63
Abbildung 3-15: Überprüfung der Intensitätssteigerung der einzelnen Seren nach den <i>Boosterungen</i>	64
Abbildung 3-16: Immunowesternblot der human MDR1 transfizierten NIH3T3-Zelllinien mit dem hergestellten polyklonalen Antikörpern KDI 3541	65
Abbildung 3-17: Immunowesternblot der human MDR1 transfizierten NIH3T3-Zelllinien mit dem hergestellten polyklonalen Antikörpern α MDR-L4	66
Abbildung 3-18: Immunowesternblot der human MDR1 transfizierten NIH3T3-Zelllinien mit den hergestellten polyklonalen Antikörpern KDI 3541 und MDR-L4.....	67
Abbildung 3-19: Immunowesternblot der human MDR1 transfizierten NIH3T3-Zelllinien mit den hergestellten polyklonalen Antikörpern KDI 3541 und α MDR-L4	68
Abbildung 3-20: Überprüfung der human MDR1 transfizierten NIH3T3-Zelllinien im extrazellulären FACS mit dem hergestellten polyklonalen α MDR-L4 und den anti-human Antikörpern MRK16 sowie MM 4.17.	69
Abbildung 3-21: Human MDR1 transfizierte NIH3T3-Zelllinie von Loo und Clarke.....	71
Abbildung 3-22: 2D-Plasmamembranproteinmuster der wt250- und C3000-Zelllinie.	72
Abbildung 3-23: Computervergleich des wt250- und C3000-Proteinmusters.....	73
Abbildung 4-1: Theoretische P-Glykoproteinstruktur mit den ermittelten und aus der Literatur entnommenen Substratbindungsstellen.	78
Abbildung 4-2: RNA-Transkriptdaten	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Isoformen der P-Glykoproteingene aus Mensch, Hamster und Maus.....	1
Tabelle 3-1: Fragmente der primären Aminosäuresequenz des P-Glykoproteins	47
Tabelle 3-2: Zuordnung der über MALDI-TOF ermittelten Massen über Datenbanken..	74

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensionale Gel- elektrophorese	kbp	Kilobasenpaare
AA	Acrylamid	kDa	Kilodalton
ABC	<i>ATP-Binding-Cassette</i>	KDI	Klaus Dieter Isenberg
Ad	auffüllen auf	LB	Luria Bertani
APS	Ammoniumpersulfat	Lys C	Endoproteinase Lys C / Se- rinproteinase
AS	Aminosäure	MALDI-TOF	Matrix unterstützte Laser induzierte Desorption und Ionisationsflugzeitmas- senspektrometrie
ATP	Adenosintriphosphat	MDR	Multidrug Resistenz
BFM	Biofeuchtmasse	Min	Minute
Bis	Bisacrylamid	MMW	<i>mid range protein molecu- lar weight marker</i>
BNPS-Skatol	3-Bromo-3-methyl-2(2- nitrophenylmercapto)-3H- indol	NBD	nukleotidbindende Domäne
bp	Basenpaare	OD	optische Dichte
BSA	Rinderserumalbumin	PAGE	Polyacrylamidgel- elektrophorese
°C	Grad Celsius	PCR	Polymerasekettenreaktion
CHO	Chinese Hamster Ovary	pgp	P-Glykoprotein
cyt. Schl.	cytoplasmatische Schleife	PVDF	Polyvinylidindifluorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
DOC	Natriumdesoxycholatlösung	SDS	Natriumdodecylsulfat
DTT	Dithiothreitol	Sek	Sekunde
EDTA	Ethylendiamintetraes- sigsäure	Std	Stunde
EGTA	Ethylenglykol-bis (β -Ami- noethylether) N,N,N,N- tetraessigsäure	TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>	TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl- ethylendiamin
FCS	<i>Fetal calf serum</i>	TFA	Triflouressigsäure
GST	Glutathion-S-Transferase	TM	Transmembrandomäne
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	Tris	Tris (hydroxymethyl) ami- noethan
Ig	Immunglobulin	v/v	Volumenprozent
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalac- topyranosid	w/v	Gewichtsprozent

1 Einleitung

Zur Bekämpfung von malignen Tumoren bei Menschen werden drei Behandlungsarten angewandt: Die chirurgische Sanierung, die Strahlentherapie und die Gabe von Cytostatika. Die Lebenserwartung wird vermindert, wenn die Tumorzellen gegen die eingesetzten Cytostatika resistent werden. Diese Resistenzen beruhen häufig auf der Überexpression des membranständigen P-Glykoproteins, welches eine breite Kreuzresistenz („Multidrug Resistenz“) gegen klinisch wichtige Cytostatika auslöst. Ziel dieser Arbeit ist es, Substratbindungsstellen innerhalb des P-Glykoproteins zu identifizieren.

1.1 P-Glykoprotein

Die P-Glykoprotein-Gene sind von Mensch, Hamster, Maus und Ratte vollständig bekannt. Eine Unterteilung in verschiedene Klassen erfolgt nach der Fähigkeit einer Ausbildung der „Multidrug Resistenz“.

Spezies	Klasse I	Klasse II	Klasse III
Mensch	<i>MDR1</i>	-	<i>MDR2/MDR3</i>
Hamster	<i>pgp1</i>	<i>pgp2</i>	<i>pgp3</i>
Maus	<i>mdr1/mdr1b</i>	<i>mdr3/mdr1a</i>	<i>mdr2</i>

Tabelle 1-1: Isoformen der P-Glykoproteingene aus Mensch, Hamster und Maus nach Juranka *et al.* (1989). Die Isoformen der Klassen I und II übertragen den Phänotyp der Multidrug Resistenz, die der Klasse III dagegen nicht.

Während die Isoformen der Klassen I und II den Phänotyp der „Multidrug Resistenz“ ausbilden können, sind die der Klasse III hierzu nicht in der Lage [Juranka *et al.* 1989, Gottesman *et al.* 1993]. Obwohl humanes MDR3 zu 77 % in der Aminosäuresequenz identisch zu MDR1 ist, kann dennoch nicht der MDR-Phänotyp ausgeprägt werden.

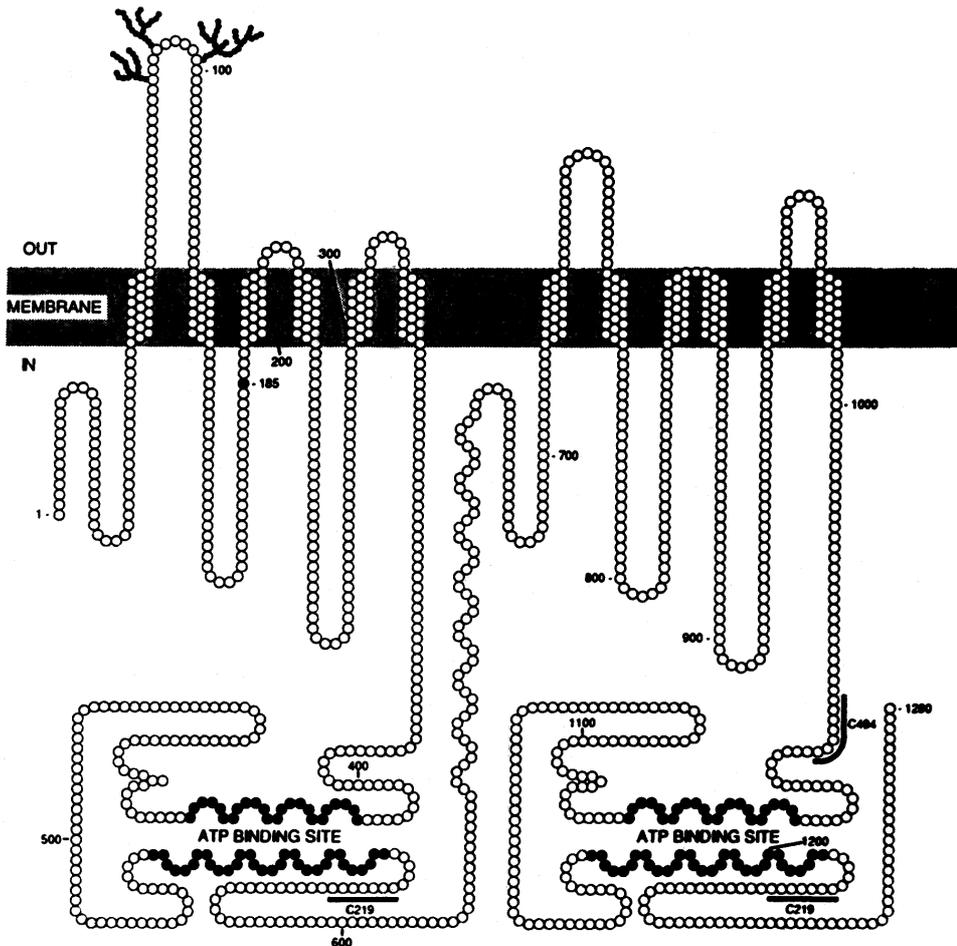


Abbildung 1-1: Strukturmodell des P-Glykoproteins nach Juranka *et al.* (1989).

P-Glykoprotein wurde 1976 von Juliano und Ling entdeckt und in Zelllinien überexprimiert [R.L. Juliano, V. Ling, 1976]. P-Glykoprotein ist ein stark hydrophobes, 170 kDa großes Membranprotein und umfaßt 1280 Aminosäuren. Dieses Protein ist in der Zellmembran für den Transport verschiedener Substrate mit unterschiedlicher chemischer Struktur aus dem Cytosol durch die Zellmembran nach außen zuständig (Effluxpumpe). Dieser Transport ist ATP-abhängig und wird durch die ATP-Hydrolyse an den nukleotidbindenden Domänen (NBD`s) ermöglicht. Durch den Transport cytotoxischer Substrate aus der Zelle erlangt diese eine Resistenz, die aufgrund der Substratvielfalt als *multidrug resistance* (MDR) bezeichnet wird. Es wird angenommen, daß beide NBD`s für die Funktion des MDR1 notwendig sind [A. E. Senior, 1995]. Das in P-Glykoprotein enthaltene Walker A-Motiv scheint hierfür eine zentrale Rolle zu spielen, da beim Austausch der Cysteine in diesem Bereich in beiden NBD`s (Aminosäure 431 und 1074) die ATPase Aktivität von MDR1 inhibiert werden kann [T. M. Loo, 1995]. Da schon die Mutation von einer NBD die Einstellung des Substrattransportes

und der ATP-Hydrolyse bewirkt, wird angenommen, daß beide NBD`s miteinander kooperieren.

P-Glykoprotein kommt in verschiedenen Geweben vor. Die Expression innerhalb der Blut-Hirn- und Blut-Hoden-Schranken sowie in epithelialen Zellen des Darms und den Nebennieren soll den Körper vor Toxinen schützen [J.H. Charuk *et al.*, 1998]. Ein Tumor kann sich diesen physiologisch sinnvollen Schutz allerdings zu Nutze machen und sich so vor Chemotherapeutika schützen. Daher wird in der Krebstherapie eine Kombination aus mehreren Cytostatika verabreicht, um den Tumor zu behandeln. In klinischen Studien wird zudem überprüft, ob durch zusätzliche Gabe von Modulatoren, welche eine höhere Affinität zu den Bindungsstellen besitzen (Cyclosporin A), P-Glykoprotein inhibiert werden kann, damit die Chemotherapeutika ihre Wirkung entfalten können [T. Saeki *et al.*, 1993].

Zellen, die einer einzelnen zytotoxischen Substanz ausgesetzt sind, können den MDR-Phänotyp ausprägen und eine Resistenz nicht nur gegenüber dem selektiven Substrat, sondern ebenfalls gegenüber einem breiten Spektrum strukturell und funktionell unterschiedlicher Substanzen erlangen [Seelig *et al.*, 1998]. Eine P-Glykoprotein-Überexpression wird ebenfalls durch Röntgenstrahlung [Mc Clean *et al.*, 1993], UV-Licht [Uchiumi *et al.*, 1993] und Hitzeschock [Chin *et al.*, 1990] induziert.

1.2 Topologie des P-Glykoproteins

P-Glykoprotein besteht aus zwei homologen Hälften mit je 610 Aminosäuren, welche jeweils sechs Transmembrandomänen (TM) und eine nukleotidbindenden Domäne enthalten, die durch Schleifen variabler Länge miteinander verbunden sind [M. M. Gottesman, 1993]. Beide Hälften sind durch eine „*Linker*“-Region verbunden, die 60 Aminosäuren beträgt.

Die Topologie von P-Glykoprotein ist noch nicht eindeutig geklärt. Anhand von Hydrophobizitätsanalysen wurde eine theoretische P-Glykoprotein-Topologie abgeleitet. Die experimentelle Überprüfung dieses Modells ergab jedoch eine abweichende Lokalisation von Transmembrandomänen. Von Zhang *et al.* [1993], Skach *et al.* [1993] und Bibi *et al.* [1995] wird angenommen, daß sich die zweite (TM 4-5) sowie die dritte cytoplasmatische Schleife (TM 8-9) extrazellulär befinden. Die zweite cytoplasmatische Schleife (TM 4–TM 5) wurde mit Antikörpern extrazellulär lokalisiert [Zhang *et al.*, 1996]. Diese Ergebnisse führten somit zu einem weiteren Topologiemodell. Für den Transport der Cytostatika wird in diesem Fall eine

Art Flip-Flop-Mechanismus durch die Zellmembran angenommen [Higgins *et al.*, 1994]. In der Literatur sind jedoch noch weitere Hypothesen über den P-Glykoproteintransport zu finden (Kapitel 4.1.4). Detaillierte Analysen der P-Glykoprotein-Topologie kann zur Aufklärung des Substrattransport-Mechanismus beitragen.

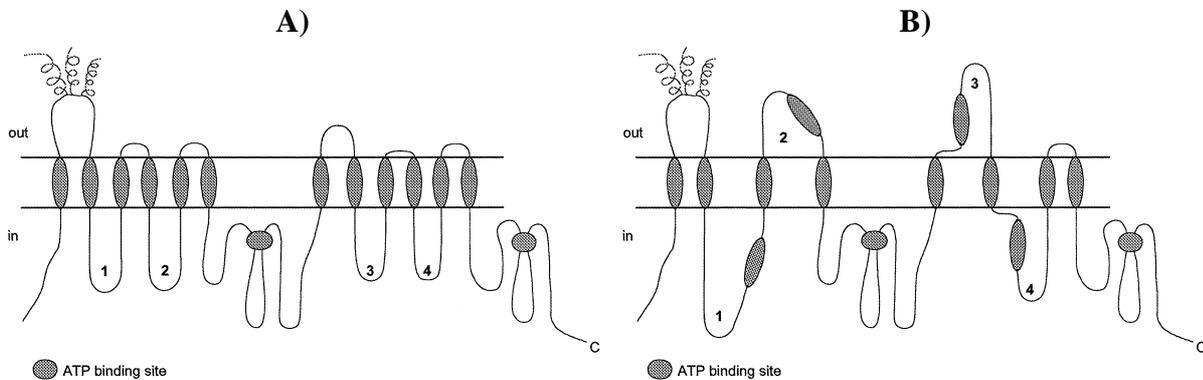


Abbildung 1-2: Topologiemodelle des P-Glykoproteins.
A) Modell erstellt durch Hydrophobizitätsanalysen.
B) Experimentell ermitteltes Modell nach Zhang *et al.* (1993).

Crosslinking-Versuche haben gezeigt, daß TM 6 und TM 12 nahe beieinander liegen und eine ATP-abhängige Konformationsänderung innerhalb des Reaktionszyklus durchmachen. Der Substrattransport wird von Senior *et al.* [1995] in vier Stufen beschrieben: Substraterkennung, ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse, Kopplung von ATP-Hydrolyse und Substrattransport. Hierauf baut auch die Annahme der Konformationsänderung in der substraterkennenden Domäne durch ATP-Hydrolyse auf.

Um ligandeninduzierte Konformationsänderungen im P-Glykoprotein zu identifizieren, wurden von fluoreszierenden Peptiden durch Proteasespaltung und HPLC-Aufreinigung Karten hergestellt. Die P-Glykoproteinstruktur wies signifikante Unterschiede in den Fluoreszenzsignalen auf, was auf unterschiedliche Zugänglichkeit der Peptide zurückgeführt werden mußte. Diese Peptide wurden aufgereinigt und mit MALDI (Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation) als die zweite cytoplasmatische Schleife identifiziert. Dieser Befund weist darauf hin, daß der zweiten cytoplasmatischen Schleife eine entscheidende Bedeutung bei der Energie-Transduktion zukommen muß, da sie unter verschiedenen Ligand-Bedingungen konformations-sensitiv ist [P. Lam, 1999].

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten eine große Pore innerhalb des Proteins, welche mit dem Phospholipidbilayer der Zellmembran kommuniziert [Rosenberg *et al.*,

1997]. Die umgebende Lipidphase scheint ein Schlüsselement in der P-Glykoprotein vermittelten „Multidrug Resistenz“ zu sein. Assoziierte Lipide sind Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin sowie Spuren von Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol, welches der inneren Plasmamembran ähnelt [Sharom *et al.*, 1995]. Ohne assoziierte Lipide ist ein kompletter Aktivitätsverlust, gemessen anhand der ATP-Hydrolyse Kapazität, die Folge [Doige *et al.*, 1993].

1.3 ABC-Transporter

P-Glykoprotein gehört zu der großen Familie der ABC-Transporter (*ATP-Binding-Cassette*) und ist aus zwei Transmembrandomänen mit jeweils sechs membranüberspannenden Segmenten und zwei nukleotidbindenden Domänen (NBD), die intrazellulär lokalisiert sind, aufgebaut. Die funktionelle Einheit kann wie bei P-Glykoprotein von einem Gen codiert werden [Chen *et al.*, 1986] oder durch Fusion einer Transmembrandomäne mit einer NBD entstehen. Die Bildung eines Homodimers als funktionelle Einheit wird im Kapitel 1.4 bei LmrA beschrieben. ABC-Transporter kommen sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten vor, sind aber für verschiedene Funktionen wie zum Beispiel den Transport von Ionen, Polysacchariden oder Cytostatika zuständig. Diese Proteinfamilie übernimmt auch regulatorische Aufgaben. In Bakterien kontrolliert sie unter anderem die Zellteilung und das Zellvolumen. Sie können aber auch Antibiotikaresistenzen in Bakterien erzeugen. Die Transportrichtung, Import oder Export, ist bei ABC-Transportern unidirektional.

Charakteristisch für alle ABC-Transporter ist die große Sequenzhomologie der NBD mit dem für diese Transporterklasse kennzeichnenden LSGGQ-Motiv. Dieses LSGGQ-Motiv verbindet als Linkerpeptid zwei weitere konservierte Regionen, das Walker A-(NBD1= GNSGCGKST; NBD2= GSSGCGKST) und Walker B-Motiv (NBD1 und NBD2= ILLLDE), miteinander. Die Walker-Motive sind an der ATP-Bindung und -Hydrolyse beteiligt. Hierdurch wird die Energie zur Verfügung gestellt, die für Transporte benötigt werden.

Neben der hier erwähnten NBD werden bei ABC-Transportern zwei weitere konservierte Regionen beschrieben. Eine befindet sich in der ersten extrazellulären Schleife zwischen Transmembrandomäne (TM) 1 und TM 2 und wird im Zusammenhang mit dem korrektem Einbau des P-Glykoproteins in die Zellmembran diskutiert.

Bei dem zweiten Bereich handelt es sich um das EAA- (bei vielen Prokaryonten) oder EAA-ähnliche Motiv (bei vielen Eukaryonten), welches sich in der zweiten cytoplasmatischen

Schleife zwischen TM 4 und TM 5 befindet. Bei Prokaryonten umfaßt dieses Motiv 20 – 30 Aminosäuren, während das EAA-ähnlichen Motiv 15 Aminosäuren beinhaltet.

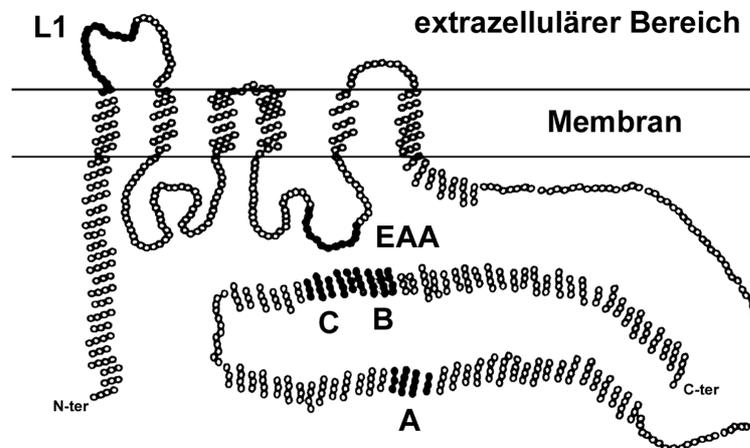


Abbildung 1-3: Hypothetisches Modell von Pxa1p mit der Lokalisation der Proteinmotive nach Shani *et al.* (1996)

L1= Motiv innerhalb der ersten extrazellulären Schleife; EAA= EAA-ähnliches Motiv; A= Walker A-Motiv; B= Walker B-Motiv; C= LSGGQ-Motiv.

Der Maltosetransporter von *E. coli* beinhaltet zwei EAA-Motive. Dieser Transporter ist aufgebaut aus MalF, MalG, die je ein EAA-Motiv besitzen und zwei Untereinheiten von MalK, die eine ATPase-Aktivität aufweisen. Mutationen in den EAA-Motiven von MalF und MalG haben gezeigt, daß die beiden EAA-Motive dieses Transporters kooperieren. Die EAA-Regionen müssen eine große Rolle in der Zusammensetzung der Substratbindungsstellen oder in der Übermittlung eines Signals an MalK spielen. Durch die Mutationen innerhalb des EAA-Motives wird eine Konformationsänderung in anderen Regionen des Proteins induziert [Mourez *et al.*, 1997].

In diesem Motiv befindet sich hinter den Aminosäuren EAA an vierter Position ein Glycin. Die Mutation dieses zentralen Glycins bewirkt den Verlust der kompletten Transporterfunktion bei Bakterien [Koster *et al.*, 1992]. Die Funktion des EAA-Motives ist allerdings noch nicht geklärt [Loo und Clarke, 1995].

1.4 LmrA

Die ausgeprägteste Homologie eines bakteriellen ABC-Transporters zu P-Glykoprotein besitzt LmrA aus *Lactococcus lactis*. LmrA besteht aus 590 Aminosäuren und ist aus sechs Transmembrandomänen und einer nukleotidbindenden Domäne aufgebaut. Es entspricht der N-terminalen Hälfte von P-Glykoprotein, wobei die Homologie zwischen diesen beiden

ABC-Transportern 50 % beträgt. LmrA nimmt die cytotoxischen amphiphilen Komponenten in der inneren Plasmamembranseite auf und schleust diese direkt in den extrazellulären Bereich (Medium). Dieser als „*Vacuum-cleaner*“ bezeichnete Mechanismus ermöglicht, daß die cytotoxischen Komponenten das Cytosol nicht erreichen und somit die Entfaltung ihrer toxischen Wirkung verhindert wird. Der Transport durch LmrA ist allerdings erst als Homodimer möglich [H.W.van Veen, 1999]. Bei diesem Dimer konnte ein Transport nachgewiesen werden. Dieses zeigen Ergebnisse aus Studien über LmrA-LmrA-Fusionsproteine, bei denen das 60 Aminosäure große *Linker*-Peptid von P-Glykoprotein eingefügt wurde. Nach Austausch des Lysins durch Methionin in der ersten und/oder der zweiten nukleotidbindenden Domäne verlor das Dimer seine Fähigkeit, Substrate zu transportieren und wies auch keine ATP-Hydrolyse mehr auf. Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß die ATP-Hydrolyse mit der Substratbindung gekoppelt sein muß.

LmrA vermittelt eine Resistenz gegenüber für P-Glykoprotein typischen Substraten wie dem Anthracyclin Daunomycin, dem Vinca-Alkaloid Vinblastin und cytotoxischen Substanzen wie Colchicin [J.A. Endicott, 1989]. Auch die eingesetzten Modulatoren, die bei einer Chemotherapie den Wirkungsgrad der Cytostatika erhöhen, wirken bei LmrA und P-Glykoprotein identisch, so zum Beispiel der Calcium-Kanal-Blocker Verapamil oder das Immunsuppressivum Cyclosporin A. Die ATPase Aktivität kann durch Verapamil stimuliert und durch Orthovanadat komplett inhibiert werden.

1.5 Bindungsstellen im P-Glykoprotein

Um Substratbindungsstellen innerhalb des P-Glykoproteins zu identifizieren, wurde bisher hauptsächlich mit den Methoden der zielgerichteten Mutagenese und Photoaffinitätsbindung gearbeitet. Mutageneseexperimente ergaben, daß die Substitution einer einzelnen Aminosäure in den Transmembrandomänen 6, 11 oder 12 die P-Glykoprotein-Aktivität und Substratspezifität verändern.

Mutagenese verschiedener Aminosäuren innerhalb der nukleotidbindenden Domänen beeinträchtigten den Substrattransport, woraus auf eine enge Kopplung zwischen ATP-Hydrolyse und Substrattransport geschlossen werden kann.

Bei verwendeten Substanzen für Photoaffinitätsbindungsstudien handelt es sich unter anderem um [125 I]Iodomycin, [125 I]Iodipin, [3 H]Azidopin, [125 I]Iodoarylazidoprazosin und 3'-p-benzoyldihydrocinnamoyl-taxol.

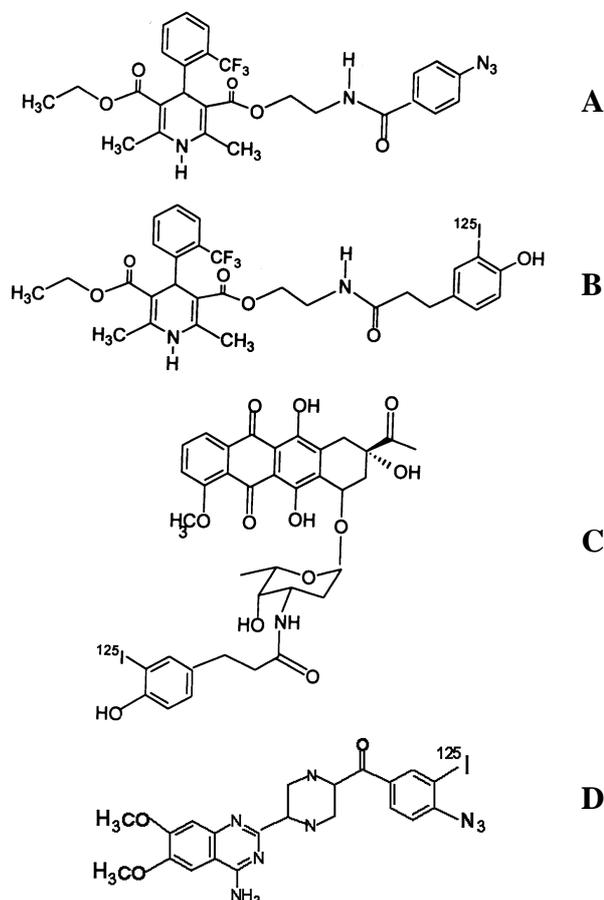


Abbildung 1-4: Substrate des P-Glykoproteins.
 A) Azidopin B) Iodipin C) Iodomycin D) Iodoarylazidoprazosin

Iodomycin, das photoreaktive Bolton-Hunter Derivat des Anthrazyclins Daunomycin, bindet innerhalb der Aminosäuresequenz 230 – 312 (TM 4 –5) der Hamster-Isoform pgp1 [Demmer *et al.*, 1997]. In diesem Bereich bindet ebenfalls Iodipin, ein 1,4-Dihydropyridinderivat, welches zu den MDR Modulatoren gezählt wird [Demmer *et al.*, 1999]. Die Bindungsstellen dieser beiden Substanzen wurden anhand von Sequenzierung belegt.

Iodomycin und Iodipin besitzen beide eine Bolton-Hunter Gruppe, während Iodipin ansonsten eine Strukturähnlichkeit mit Azidopin besitzt. Azidopin bindet an zwei Stellen im P-Glykoprotein. Eine Bindungsstelle befindet sich im N-terminalen (zwischen Aminosäure 198 – 440) und eine im C-terminalen Bereich, die nicht weiter eingegrenzt wurden [Bruggemann *et al.*, 1992]. Es wird angenommen, daß Azidopin und Iodoarylazidoprazosin an dieselben Sub-

stratbindungsstellen im P-Glykoprotein binden [Greenberger *et al.*, 1990]. Die Bindungsstellen für Iodoarylazidoprazosin wurden von Greenberger [1993] anhand von Epitopmapping ermittelt. Nach Ergebnissen dieser Methode befinden sich die Hauptbindungsstellen im N-terminalen Bereich der Transmembrandomäne 6 sowie im C-terminalen Bereich der Transmembrandomäne 12. Eine Nebenbindungsstelle soll sich vor der Transmembrandomäne 6 befinden, die in der TM 4 beginnt und bis kurz vor der TM 6 reichen soll.

Eine Substratbindungsstudie von A. Shapiro *et al.* (1999) wies auf drei kooperative Substratbindungsstellen im P-Glykoprotein hin. Die Untersuchungen mit den fluoreszierenden Substraten Hoechst 33342 und Rhodamin 123 zeigten, daß jedes Substrat den Transport des anderen stimulierte. Aus diesem Ergebnis kann auf zwei kooperative Bindungsstellen geschlossen werden. Beide Substratbindungsstellen liegen im cytoplasmatischen Teil des P-Glykoproteins. Bei Zugabe von Prazosin oder Progesteron wird der Transport sowohl von Hoechst 33342 als auch von Rhodamin 123 stimuliert. Diese Ergebnisse weisen auf eine dritte Substratbindungsstelle innerhalb des P-Glykoproteins hin. Bei Progesteron handelt es sich um ein Steroid, welches durch seine Hydrophobizität von P-Glykoprotein nicht transportiert werden kann und sich daher als effizienter Modulator eignet.

1.6 Ziele dieser Arbeit

A)

Iodoarylazidoprazosin wird in der Literatur als P-Glykoprotein-Substrat beschrieben. Die Überprüfung der Substratbindungsstellen erfolgte mittels Antikörper-Epitopmapping und wies auf eine Hauptbindungsstelle im N-terminalen Bereich bei TM 6 und eine im C-terminalen Bereich bei TM 12 hin. Neben diesen Hauptbindungsstellen wird eine Nebenbindungsstelle beschrieben, die sich im N-terminalen Bereich zwischen TM 4 bis kurz vor TM 6 befinden soll. In der angegebenen Nebenbindungsstelle befindet sich die zweite cytoplasmatische Schleife. Innerhalb dieses AS-Bereiches sind die Substratbindungsstelle(n) für zwei strukturell unterschiedliche Substrate, dem Iodomycin und dem Iodipin, lokalisiert worden.

Ein Teil dieser Arbeit befaßt sich mit der Identifizierung der Substratbindungsstellen des Iodoarylazidoprazosins anhand der Sequenzierung photomarkierter Fragmente des P-Glykoproteins.

B)

Für das P-Glykoprotein ist die Topologie noch nicht eindeutig geklärt. Das durch Hydrophobizitätsanalysen aufgestellte Modell sagt für die zweite (TM 4- TM 5) und dritte (TM 8 – TM 9) cytoplasmatische Schleife eine intrazelluläre Lokalisation voraus. Experimentelle Untersuchungen ergaben jedoch eine abweichende Lokalisation von Transmembrandomänen.

Die zweite cytoplasmatische Schleife des humanem MDR1 beinhaltet eine konservierte Region, die als EAA-ähnliches Motiv beschrieben wird. Diese Region soll durch Interaktion mit dem in der NBD lokalisierten LSGGQ-Motiv am Substrattransport beteiligt sein. Bedingt durch diese Interaktion kann beim Cytostatikatransport eine Konformationsänderung der Transmembrandomänen diese in die Nähe der extrazellulären Seite bringen. Diese Konformationsänderung könnte der Grund für die Antikörpererkennung der zweiten und der dritten cytoplasmatischen Schleife im extrazellulären Bereich sein.

Für die Überprüfung der Zhang-Topologie stehen mit humanem MDR1 transfizierte Mausfibroblasten von Loo und Clarke zur Verfügung. Um eine Überexpression des P-Glykoproteins zu erreichen, wurden diese Zellen mit 100 ng/ml Vinblastin und 9 µg/ml Colchizin selektiert.

Ziel dieser Arbeit ist unter anderem die Herstellung von MDR1-Antikörpern, mit denen die durch die Selektion entstandenen unterschiedlichen Zelllinien (siehe C) auf die Topologie des P-Glykoproteins untersucht werden sollen.

C)

Nach der Selektion der mit *MDR1* transfizierten Mausfibroblasten entstanden zwei morphologisch unterschiedliche Zelllinien. Während die als wt250 bezeichnete Zelllinie unter 100 ng/ml Vinblastin epithelial wächst, weist die als C3000 beschriebene Zelllinie bei einer Kultivierung in Anwesenheit von 9 µg/ml Colchizin eine spindelförmige Morphologie auf. Bei der elektrophoretischen Auftrennung von Gesamtmembranfraktionen dieser beiden Zelllinien hat das enthaltene P-Glykoprotein unterschiedliche Molekulargewichte. Diese Ergebnisse deuten auf eine massive Veränderung durch den Cytostatikadruck innerhalb der Zelle hin.

Um einen Einblick in die unter Cytostatikadruck auftretende Differenzierung zu erhalten, sollen im Vergleich zur wt250-Zelllinie unterschiedlichen Proteine mittels MALDI-TOF analysiert und über eine Datenbank identifiziert werden.

2 Material und Methoden

Für diesen Teil der Arbeit wurde ein nach Themen geordneter, chronologischer Arbeitsablauf gewählt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders gekennzeichnet, von Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen. Die Lösungen wurden mit Reinstwasser H₂O E-Pure (Barnstead, Dubuque/Iowa) angesetzt.

2.1 Bindungsstellen von Iodoarylazidoprazosin in Hamster P-Glykoprotein

2.1.1 Zellkultur

Bei CHO B30 handelt es sich um eine zytostatikaresistente Zelllinie, deren Expression von P-Glykoprotein 10-20 % des Gesamtproteingehaltes der Plasmamembran beträgt. CHO B30 ist aus CHO B1-Zellen mittels Colchizin selektiert worden. Diese Zelllinie toleriert ein vielfaches der Colchizinkonzentration von CHO B1-Zellen. Dieser Unterschied ist ebenfalls morphologisch zu erkennen. Während CHO B1-Zellen abgerundet erschienen, waren CHO B30-Zellen durch spindelförmigen Wuchs charakterisiert.

Material:

Zelllinien: CHO B30, Hamsterzelllinie

NIH3T3, human MDR transfizierte Mauszelllinie

Medium: α -MEM mit Ribo- und Desoxyribonukleosiden (Gibco 11900-057)

DMEM *high Glucose* 500 ml/ 10 % FCS

+ 5 ml Streptomycin / Penicilin / L-Glutamin (100 x) (PAA P11-013)

+ 5 ml MEM (100x) nichtessentielle Aminosäuren (Gibco BRL 11140-035)

Zytostatika: Colchizin (Sigma C9754)

Vinblastinsulfat-GRY[®]10 (Apotheke)

<u>Citratpuffer:</u>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Natriumcitrat*2H ₂ O	3 mM
	Na ₂ HPO ₄	6,5 mM
	KH ₂ PO ₄	0,2 mM
<u>Trypsinlösung:</u>	2,5 g Trypsin/Liter Citratpuffer	
<u>Phosphatpuffer (PBS):</u>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	6,5 mM
	KH ₂ PO ₄	0,2 mM
	CaCl ₂ *2H ₂ O	0,7 mM
	MgCl ₂ *6H ₂ O	0,2 mM

Kultivierung:

Die CHO B30-Zellen wurden in α -MEM Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) unter einer Colchizindkonzentration von 30 μ g/ml bei 37 °C, 5 % CO₂ und ca. 60 % Luftfeuchtigkeit in Kultur gehalten. Unter diesen Bedingungen war diese Zelllinie innerhalb von 4 Tagen konfluent gewachsen.

NIH3T3-, wt250- und C3000-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 % FCS, Antibiotika und nichtessentiellen Aminosäuren kultiviert. Während NIH3T3 ohne Zytostatikazusatz wuchs, wurden wt250 mit 100 ng/ml Vinblastin und C3000 mit 9 μ g/ml Colchizin selektiert.

Das Medium wurde von den Zellen abgesaugt und die Zellen wurden mit 5 ml sterilem PBS gewaschen. Die Zellen konnten mit 1 ml Trypsinlösung vom Boden der Petrischale abgelöst und mit 5 ml Medium in ein 15 ml Röhrchen überführt werden. Das nach Zentrifugation für 4 Min bei 800 x g (Hettich Labofuge) gewonnene Sediment wurde mit 10 ml frischem Medium resuspendiert und auf 10 neue Kulturschalen mit je 9 ml vorgelegtem Medium verteilt.

2.1.2 Membranpräparation

Für die nachfolgenden Versuche wurde das von den Zellen exprimierte P-Glykoprotein durch Membranpräparation aufkonzentriert. Für eine Ausbeute von ca 2 mg Protein waren 50 konfluent gewachsene Zellkulturplatten nötig. Die Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C.

Material:

<u>Waschpuffer (PBS):</u>	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	6,5 mM
	KH ₂ PO ₄	0,2 mM
<u>Lysispuffer:</u>	Hepes pH 7,41	20 mM
	H ₂ O bidest	24 ml
	DTT	5 mM
	EGTA	1 mM
	EDTA	0,4 mM
<u>Antiproteasecocktail:</u>	KCl	10 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	Tris-HCl pH 7,4	10 mM
	Leupeptin (Sigma L8511)	2 mg/ml
	Tame (Sigma T4626)	9,9 mg/ml
<u>Pefabloc:</u>	1 mM Pefabloc (Merck 24839.0100) in H ₂ O E-Pure (24 mg/100 ml)	
<u>Saccharoselösung:</u>	35 % Saccharose (w/v) in 5 mM Tris-HCl pH 7,5	
<u>Membranpuffer A:</u>	8,6 % Saccharose (w/v) in 5 mM Tris-HCl pH 7,5	

Durchführung:

Nach Abgießen des Mediums wurden die Zellen zunächst zweimal mit 10 ml PBS auf der Platte gewaschen. Zu 25 ml Lysispuffer wurden 50 µl Antiproteasecocktail pipettiert. 500 µl des frisch angesetzten Lysispuffers wurden nun auf die Zellen gegeben, welche anschließend mit einem Teflonschaber abgekratzt und in einem Gefäß aufgefangen wurden. Auf das Endvolumen der Zellsuspension wurden vor Ultraschallaufschluß der Zellen 25 µl/ml Pefabloc (Serinproteaseinhibitor) gegeben. Das Entfernen der Mitochondrien, Zellbruchstücke und Kerne geschah durch Zentrifugation bei 4000 x g für 10 Min (Sorvall SS34). Eine weitere Zentrifugation des Überstandes bei 40.000 x g für 1 Std folgte. Das resultierende Mikrosomenpellet wurde in 5 mM Tris-HCl pH 7,5 resuspendiert und auf ein 2,5 ml Saccharosekissen (35 w/v) aufgeschichtet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt des Stufengradienten für 1,5 Std bei 35.000 x g (ohne Bremse) in einem Ausschwingrotor (Beckmann SW55Ti). Die sich abzeichnende Bande auf dem Saccharosekissen wurde nach Entnahme erneut in 5 mM Tris-HCl verdünnt und bei 100.000 x g für 1 Std mit Bremse zentrifugiert. Das Pellet wurde in Membranpuffer A aufgenommen und bei -80 °C für die folgenden Versuche aufbewahrt.

2.1.3 Proteinbestimmung nach Peterson (1977)

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Modifizierung nach Lowry *et al.* (1951).

Material:Stammlösungen für Reagenz A:

- 10 % SDS in H₂O E-Pure
- 0,8 M NaOH
- Kupfer-Tartrat-Carbonat-Lösung (KTC)

Lösung 1: 10 g Na₂CO₃
 in 50 ml H₂O E-Pure

Lösung 2: 0,2 g K₂-Tartrat * 0,5 H₂O
 0,1 g CuSO₄ * 5 H₂O
 in 40 ml H₂O E-Pure

Material und Methoden

Lösung 1 wird unter Rühren langsam in Lösung 2 gegeben und mit H₂O E-Pure auf 100 ml aufgefüllt. (Lichtgeschützt aufbewahren!)

Reagenz A: SDS, NaOH, KTC und H₂O zu gleichen Volumenanteilen vor Gebrauch frisch ansetzen.

Reagenz B: 1 Volumenanteil Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz
+ 5 Volumenanteile H₂O E-Pure
(Lichtgeschützt aufbewahren!)

72 % (v/v) Trichloressigsäure (TCA)

0,15 % (w/v) Natriumdesoxycholatlösung (DOC): frisch ansetzen

Berechnung:

Für die Berechnung der Proteinkonzentration wurden aus der mit BSA erstellten Eichreihe ein Wert im hohen (h) und einer im niedrigen (n) Konzentrationsbereich benötigt.

$$\mu\text{g Protein} = (A_{750} \times I)^s$$

A_{750} = Absorption bei 750 nm

s = $\log(h/n) \times \log(A_{750}^h / A_{750}^n)^{-1}$

I = $\text{antilog}(\log h/s - \log A_{750}^h)$

h = μg Protein der Probe mit hoher Proteinkonzentration

A_{750}^h = die Absorption der hohen Proteinkonzentration bei 750 nm

n = μg Protein der Probe mit niedriger Proteinkonzentration

A_{750}^n = die Absorption der niedrigen Proteinkonzentration bei 750 nm

Durchführung:

5 μl der Membranpräparation wurden mit H₂O E-Pure auf 1 ml aufgefüllt. Die Nullprobe bestand aus 1 ml H₂O E-Pure, und eine Eichreihe mit BSA wurde ebenfalls auf 1 ml mit H₂O E-Pure aufgefüllt und nach Zugabe von 100 μl Natriumdesoxycholatlösung (0,15 %) für 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteine wurden durch Zugabe von 100 μl eiskalter 72 % Trichloressigsäure bei 4 °C gefällt, bei 9000 x g (4 °C) für 15 Min abzentrifugiert und das

Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Die Proben können hiernach im Kühlschrank bis zum nächsten Tag aufbewahrt werden. Es folgte das Resuspendieren aller Pellets in je 500 µl H₂O E-Pure und die Zugabe von 500 µl Reagenz A mit anschließender Inkubationszeit von 10 Min bei Raumtemperatur. Bereits 35 Min (Raumtemperatur) nach Zugabe von 250 µl Reagenz B konnte die durch Blaufärbung sichtbare Komplexbildung bei 750 nm photometrisch bestimmt werden.

2.1.4 Photoaffinitätsmarkierung

Für die Photoaffinitätsmarkierung des P-Glykoproteins wurde [¹²⁵I] Iodoarylazidoprazosin verwendet. Hierbei handelt es sich um ein photoaktives Analogon des Prazosins, welches durch photochemische Kopplung an P-Glykoprotein gebunden werden kann.

Material:

<u>Lichtquelle:</u>	General Electric Sylvania Blacklight-Blue F 15W T8-BLB 366 nm (Richard Schahl GmbH & CO KG)
<u>Substrat:</u>	Iodoarylazidoprazosin (¹²⁵ I) NEN Life Technologies
<u>Membranpuffer B:</u>	10 mM Tris-HCl pH 7,5 250 mM Saccarose 5 mM mgCl ₂

Durchführung:

50 µg Membranprotein wurden nach Zugabe von 4 nM [¹²⁵I] Iodoarylazidoprazosin auf 100 µl mit Membranpuffer B aufgefüllt und zunächst abgedunkelt auf Eis gestellt. Anschließend wurden die radioaktiven Proben in Küvetten (Quarzküvette Hellma QS 282; 0,1 cm Volumentiefe, 0,9 cm Volumenbreite) pipettiert und bei 366 nm (4 °C) unter Ausschluß des Tageslichtes für 5 Min mit einem Abstand von ca 15 cm belichtet. Nach der photochemischen Kopplung des [¹²⁵I] Iodoarylazidoprazosins an das P-Glykoprotein wurden die Proben in ihre Reagenzgefäße zurück überführt. Die Küvette wurde mit 20 µl Membranpuffer B ausgespült und dieses zu den jeweiligen Proben hinzupipettiert. Die Fällung des substratgekoppelten P-Glykoproteins erfolgte durch Zugabe von 1ml je Probe 100 % eiskaltem Ethanol über Nacht bei -20 °C. Am folgenden Tag wurden die Proben 15 Min bei 15800 x g (Raumtemperatur)

abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet 30 Min getrocknet. Die Proben wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.1.5 Agarosegelaufreinigung

Um eine Aufreinigung von substratgebundenem P-Glykoprotein aus den Membranproteinen über ein Agarosegel zu erreichen, wurde ein vertikales 2-Stufen Gradientengel verwendet. Das Gel bestand zu 2/3 aus 7 % Agarose und wurde zu 1/3 mit 3,5 % Agarose überschichtet. Aufgrund der schnellen Erstarrung der Agarose bei Abkühlung wurde ein kleines Gelsystem bevorzugt ($12,5 \times 8,5 \times 0,2\text{ cm}^2$). Während die Agarose in Puffer L aufkochte, mußten die Gelplatten mindestens 10 Min bei $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgeheizt werden.

Material:

Gelmaterial: Metaphor Agarose (FMC 50182)

Puffer L: 500 mM Tris
160 mM Borsäure pH 8,5

Ficollprobenpuffer: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8
7,5 % FicollTM (Typ 400)
0,001 % Bromphenolblau
2 % SDS

In 500 μl Ficollprobenpuffer wurden vor Gebrauch 3,5 mg DTT frisch eingewogen.

Elutionspuffer: 50 mM Tris pH 10,4
3 mM EDTA
0,5 % N-Lauroylsarcosinat

Anodenpuffer: 90 mM Tris pH 8,5
90 mM Borsäure
0,1 % SDS

<u>Kathodenpuffer:</u>	9 mM Tris pH 8,5
	9 mM Borsäure
	0,1 % SDS
<u>Phosphoimager-Platte:</u>	Fuji, Imaging Plate, Type BAS-III

Durchführung:

Maximal 450 µg Gesamtprotein pro Agarosegel wurden in 20 µl Ficollprobenpuffer resuspendiert, bei 37 °C 30 Min denaturiert und anschließend auf das Agarosegel aufgetragen. Bei einer zu großen Proteinmenge kann eine Vernetzung das Eluieren des Proteins aus dem Gel behindern. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 80 V (4 °C) durchgeführt. Nach dem Gellauf wurde das Gel in Folie eingeschweißt und radioaktive Tintenflecke ober- und unterhalb des Gels fixiert, um ein späteres Ausschneiden der P-Glykoproteinbande zu ermöglichen. Eine Phosphoimager-Platte (Fuji Imaging Plate BSA-III) wurde für 3 Std auf das Gel gelegt und anschließend ausgewertet. In vorgewogene Reaktionsgefäße wurden von der ausgeschnittenen Bande je 100 mg des Gels gegeben. Nach Zugabe von je 1 ml Elutionspuffer wurde das Gel zunächst ca. 30 Min bei 80 °C vollständig geschmolzen, so daß die Lösung homogen war, anschließend wurde es auf Eis wieder erstarrt und bei –80 °C eingefroren. Die Proben wurden am folgenden Tag auf Eis aufgetaut, resuspendiert und 30 Min bei 13000 x g (4 °C) zentrifugiert. Das im Überstand befindliche Protein wurde in Centriconröhrchen (Amicon) mit einer Ausschlußgrenze von 100 kDa (max. 1000 x g) mit 5 mM Tris-HCl gewaschen, um die restliche Agarose, niedermolekulare Bruchstücke sowie überschüssiges Lauroylsarcosinat zu entfernen. Es folgte eine Fällung des Proteins mit eiskaltem 100 % Ethanol über Nacht bei –20 °C. Das Protein wurde nun 15 Min bei 9000 x g in einer Eppendorf Zentrifuge abzentrifugiert und anschließend getrocknet. Die Lagerung des Proteinpellets erfolgte bei –20 °C.

2.1.6 Spaltung des P-Glykoproteins

Die Spaltung des P-Glykoproteins mit unterschiedlichen Methoden wurde durchgeführt, um eine Eingrenzung der Substratbindungsstelle auf Aminosäureebene zu erreichen.

2.1.7 BNPS-Skatol-Spaltung (chemisch)

Hierbei handelt es sich um eine Methode nach Crimmins *et al.* [1990], bei der das Protein chemisch jeweils hinter der Aminosäure Tryptophan gespalten wurde.

Material:

Spaltmix: 1,3 mg BNPS-Skatol (3-Bromo-3-methyl-2(2-nitrophenylmercapto)-3H-indole) (Fluka 17 625)
in 1 ml 100 % Essigsäure

Durchführung:

Zu dem Proteinpellet wurden je 7,5 µl H₂O E-Pure und 22,5 µl Spaltmix gegeben. Nach Resuspension der Proben wurden diese für 18 Std bei 47 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Verdünnung mit 24 µl H₂O E-Pure abgestopt.

2.1.8 Lys C Spaltung (enzymatisch)

Bei Lys C handelt es sich um eine Endopeptidase, die ausschließlich C-terminal an Lysinresten spaltet.

Material:

Lys C-Probenpuffer: 39,6 mM Tris pH 9
10,8 % Glycerin
3,8 mg Bromphenolblau
1 % SDS

Durchführung:

Das Pellet wurde in max. 20 µl Lys C-Probenpuffer resuspendiert. Anschließend wurde die Lys C-Stammlösung in einer Verdünnung von 1:1000 hinzupipettiert und der Ansatz für 18 Std bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert. Um die Proben für die Elektrophorese vorzubereiten, wurden 30 mg DTT in 120 µl Lys C-Probenpuffer eingewogen und von dieser Lösung je 0,56 µl/20 µl Probe eingesetzt.

2.1.9 Trypsinverdau (enzymatisch)

Trypsin spaltet hinter Lysin und Arginin.

Material:

Enzym: Trypsin (Promega 5121)

Durchführung:

Für diese Spaltung mußten die Membranproteine zunächst wie in Kap. 2.1.4 beschrieben mit dem Substrat in einem max. Volumen von 100 µl frisch photochemisch gekoppelt und die Proben hiernach für 10 Min bei 37 °C vorgewärmt werden. Anschließend wurde in einem Verhältnis von 1:50 (Enzym/Protein) Trypsin zu den einzelnen Proben hinzugegeben und für genau 30 Min bei 37 °C inkubiert. Das Abstoppen des Verdaus wurde durch die Fällung der Proteine mit 100 % eiskaltem Ethanol vorgenommen.

2.1.10 Trizingel

Hierbei handelt es sich um ein diskontinuierliches Gelsystem, welches von Schrägger und Jagow [1987] für die differentielle Auftrennung niedermolekularer Proteine im Molekulargewichtsbereich von 1-70 kDa entwickelt wurde. Das Trizingel wurde daher für die analytischen sowie präparativen Auftrennungen der Spaltfragmente des P-Glykoproteins genutzt.

Material:

Gelpuffer: 3 M Tris-HCl pH 8,45

0,3 % SDS

Acrylamidlösung: 38 % Acrylamid, 2 % Bisacrylamid (Gel 40, Art 3030.1, Roth)

Probenpuffer: 4 ml H₂O E-Pur

1 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8

0,8 ml Glycerin

1,6 ml 10 % SDS

3,8 mg Bromphenolblau

Ammoniumpersulfat: 40 %

Material und Methoden

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris pH 8,15
0,1 M Trizin
0,1 % SDS (pH nicht einstellen!)

Anodenpuffer: 0,2 M Tris-HCl pH 8,9

Phosphoimager-Platte: Fuji, Imaging Plate, Type BAS-III

Durchführung:

Das gegossene Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Trenngelgrenze zu erhalten. Nach erfolgter Polymerisation wurde der Isopropanol abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel geschichtet. Die Pellets wurden in 15-20 µl Probenpuffer resuspendiert. Für ein analytisches Gel wurden 50 µg und für ein präparatives Gel 1500 µg Protein pro Geltasche aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte durch eine Vorelektrophorese für 1 Std bei 40 V und eine Elektrophorese für 16 Std bei 80 V. Hiernach wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt, getrocknet und über Nacht eine Phosphoimager-Platte aufgelegt.

	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12 %	15 %	4 %
Acrylamidlg 38 % AA, 2 % Bis	9,75 ml	11,7 ml	14,63 ml	1,5 ml
Gelpuffer	13 ml	13 ml	13 ml	3,72 ml
Glycerin	5,2 g	5,2 g	5,2 g	-
H ₂ O E-Pure	Trenngel auf 39 ml mit H ₂ O auffüllen			10,08 ml
APS	32,5 µl	32,5 µl	32,5 µl	30 µl
TEMED	13 µl	13 µl	13 µl	12 µl

2.1.11 Aufreinigung über „reversed phase“ Chromatographie (HPLC)

Eine Aufreinigung der Peptide wurde mittels „reversed phase“ Chromatographie vorgenommen. Bei dieser Methode binden die Peptide an das hydrophobe Säulenmaterial, die sogenannte stationäre Phase, und werden durch einen ansteigenden hydrophoben Lösungsmittelgradienten von der Säule eluiert.

Material:

HPLC-Säule: Phenylsäule (Applied Biosystems, Brownlee™ Columns)

Laufmittel A: TFA 0,1 %

Laufmittel B: Acetonitril 60 %

Isopropanol 20 %

TFA 0,085 %

Nachdem die radioaktiv markierten Banden aus dem Gel ausgeschnitten wurden, wurde das Protein über Nacht aus den Gelstreifen direkt in Centriconröhrchen (Ausschlußgrenze: 100 kDa) eluiert. Da die Elution in einem Laemmlipuffersystem vorgenommen wurde, mußte das Protein anschließend ausreichend mit 5 mM Tris-HCl gewaschen werden, um das im Laemmlipuffer enthaltene SDS zu entfernen. Zu der gewaschenen eingeeengten Probe wurde 1:1 (w/v) Guanidin HCl (Roth 0035.1) eingewogen. Bis zur HPLC-Analyse wurden die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

Vor Auftrag der Proben wurden diese mit 99,8 % TFA zu einer Endkonzentration von 0,1 % versetzt und vor Injektion kurz anzentrifugiert. In die einzelnen Reaktionsgefäße, in denen die HPLC-Fractionen gesammelt wurden, wurden je 20 µl unverdünnter Isopropanol vorgelegt. Die Aktivität der einzelnen Fractionen wurden mit dem Compu Gamma Zähler ermittelt und nach Einengen der Fractionen die Spaltprodukte sequenziert.

BNPS-Gradient

	Zeit/Min	% Laufmittel A	% Laufmittel B	Durchfluß ml/Min
1	0	95	5	0,1
2	1	90	10	0,1
3	5	75	25	0,1
4	50	50	50	0,1
5	65	35	65	0,1
6	70	30	70	0,1
7	85	1	99	0,1
8	90	95	5	0,1
9	99	99	1	0,1
10	105	99	1	0,1

Lys C-Gradient

Stufe	Zeit/Min	% Laufmittel A	% Laufmittel B	Durchfluß ml/Min
1	0	95	5	0,1
2	30	30	70	0,1
3	35	20	80	0,1
4	50	10	90	0,1
5	65	1	99	0,1
6	70	1	99	0,1
7	75	95	5	0,1

2.1.12 Semi Dry Blot

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, HPLC-Fractionen einer weiteren Aufreinigung zu unterziehen. Die in der Flüssigphase der einzelnen Fractionen enthaltenen Verunreinigungen wurden durch eine weitere elektrophoretische Auftrennung von der radioaktiv markierten Proteinbande abgetrennt und auf eine PVDF-Membran durch Semi Dry Blot transferiert.

Material:

<u>Coomassie-Färbung:</u>	Coomassie R250/1 L	1 g
	Essigsäure	1 %
	Methanol	40 %

Diese Stammlösung wurde über Nacht gerührt und am nächsten Tag mit Wasser bis zur angegebenen Prozentigkeit der Lösungen verdünnt und anschließend filtriert. Die Gebrauchslösung wurde 1:4 mit 40 % Methanol in Wasser verdünnt.

<u>Puffer A:</u>	Tris (pH nicht einstellen!)	0,3 M
	Methanol	20 %

<u>Puffer B:</u>	Tris (pH nicht einstellen!)	25 mM
	Methanol	20 %

<u>Puffer C:</u>	Tris pH-Wert mit Borsäure auf 9 einstellen	25 mM
	Methanol	20 %

<u>Membran:</u>	Fluorotrans Transfer Membrane, Biosupport, PVMO20C3R
-----------------	--

Um proteingebundene Radioaktivität zu überprüfen, wurden die Fractionen getrocknet und auf ein 12 % Trizingel gegeben. Nach dem elektrophoretischen Lauf wurde das Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierfür wurden in die Blotkammer, von der Anode (+) zur Kathode (-) (Semiphor TE 70, Hoefer Scientifics), folgende Schichten luftblasenfrei übereinandergelegt:

- zwei Lagen Whatmanpapier in Puffer A getränkt
- zwei Lagen Whatmanpapier in Puffer B getränkt

- die zunächst für 10 Min in 100 % Ethanol und dann für 10 Min in Puffer B vorinkubierte PVDF-Membran
- das vor dem Auflegen 15 Min in Puffer C inkubiert Trizingel
- zwei mit Puffer C getränkte Lagen Whatmanpapier

Der Transfer erfolgte für 30 Min bei 2,5 mA/cm². Die Membran wurde nach dem Transfer für 2-5 Min in einer im Verhältnis 1:4 verdünnten Coomassielösung gefärbt und anschließend mit 50 % Methanol entfärbt. Bei dieser Färbung lag die Nachweisgrenze im Bereich von 0,1-2 µg Protein. Die luftgetrocknete Membran wurde über Nacht auf einer Phosphoimager-Platte exponiert. Durch einen Vergleich der Expositionssignale und der Coomassie-Signale wurde ermittelt, ob die Proteinbanden radioaktiv markiert waren. Diese Proteinbanden wurden ausgeschnitten und sequenziert.

2.2 Herstellung von polyklonalen Antikörpern

2.2.1 Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen

Für Transformationen durch Elektroporation wurde der *E. coli*-Stamm DH5α gewählt. Frisch präparierte Zellen besaßen eine Transformationskompetenz von 10⁸-10⁹ gewachsenen Kolonien/µg pUC (Referenz-Pasmid). Die Zellen können bei -80 °C gelagert werden, wobei die Kompetenz sank 10⁵-10⁶ Kolonien/µg Plasmid innerhalb von vier Wochen sank.

Material:

<u>LB-Medium:</u>	Caseinhydrolysat (Gibco BRL)	10 g
	Hefeextrakt (Gibco BRL)	10 g
	NaCl	5 g
	ad 1 l H ₂ O E-Pur, pH 7,5,	
	autoklavieren	

Der *E. coli*-Stamm DH5α wurde zunächst in 25 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Diese Vorkultur konnte nun in 500 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C/200 upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 (4-5 Std) inkubiert werden. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit dem GS3-Rotor (RC 5B Plus, Sorvall) für 20 Min bei 4000 x g (4 °C). Die Zellen wurden anschließend zweimal mit je 500 ml eiskaltem, sterilem H₂O E-Pure gewa-

schen und dann in 20 ml eiskaltem, sterilem 10 % Glycerin resuspendiert. Nach einer erneuten Zentrifugation im SS34-Rotor (RC 5B Plus, Sorvall) für 10 Min bei 4000 x g (4 °C) wurden die Zellen in 1,5 ml 10 % Glycerin resuspendiert und in 50 µl aliquotiert. Diese Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und konnten anschließend bei -80 °C gelagert werden.

2.2.2 Expressionsvektor pGEX4T1

Hierbei handelt es sich um einen Expressionsvektor für *E.coli*, der über Pharmacia bezogen wurde. Die DNA-Sequenz von huMDR1 (AS 241-289) wurde an den Schnittstellen von *Eco*RI und *Xho* I am 3'-Ende in den Vektor ligiert. In dem pGEX4T1-Vektor sind sowohl der lacI^q-Repressor als auch eine Ampicillinresistenz codiert. Die Proteinexpression der MDR1-Teilsequenz wurde durch Zugabe von IPTG, welches an den p_{tac}-Promotor bindet, induziert [Smith und Johnson, 1989]. Für die spätere Proteinaufreinigung war eine Thrombinschnittstelle vorgesehen.

2.2.3 Transformation des Expressionsvektors

Die Transformation, also die Plasmidaufnahme in das Cytosol von *E.coli*, wurde mittels Elektroporation durchgeführt.

Material:

<u>SOC-Medium:</u>	Bacto-Trypton (Gibco BRL)	20 g
	Bacto-Hefeextrakt (Gibco BRL)	5 g
	NaCl	0,5 g
	MgCl ₂ *6H ₂ O	2,5 g
	D-(+)-Glukose	3,6 g
	ad 1 l H ₂ O E-Pure, pH 7,0, autoklavieren	

Material und Methoden

<u>LB-Agarplatten:</u>	LB-Medium	0,5 l
	bakteriologischer Agar (Gibco BRL)	7,5 g
	autoklavieren, nach Abkühlung auf etwa 40 °C Zugabe von Ampicillin und Gießen der Agarplatten; ca. 2 Monate bei 4 °C lagerfähig.	

Auf 50 µl elektrokompetente, gefrorene *E.coli*-Zellen wurden in einem Eisbad 1-2 µl Plasmid oder Ligationsansatz gegeben. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und sofort in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation fand bei 1800 V, 150 Ω (Widerstand) und 50 µF (Kapazität) statt (Elektroporator II, Invitrogen, San Diego). Der Stromversorger (2197 power supply, LKB Bromma) wurde auf eine max Voreinstellung von 1500 V, 25 mA und 25 W reguliert. Nach der Transformation wurden die Zellen in die jeweiligen Reaktionsgefäße zurückpipettiert, in 800 µl SOC-Medium resuspendiert und für 1 Std bei 37 °C in einem Thermomixer auf Stufe 11 (5436 Eppendorf) inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 8000 g für 1 Min (Raumtemperatur). Hiernach wurden die Zellen in 100-200 µl LB-Medium resuspendiert, auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Für eine Kontaminationskontrolle wurde das Protokoll ohne Plasmid beziehungsweise ohne Ligationsansatz durchgeführt.

2.2.4 Plasmidpräparation

Bei der Maxipräparation wurden zwischen 1-3 mg Plasmid-DNA aufgearbeitet. Diese Plasmidmenge war für den folgenden Ligationsansatz notwendig.

Material:

<u>Puffer1:</u>	Tris-HCl	50 mM
	EDTA, pH 8,0	10 mM
<u>Puffer2:</u>	NaOH	0,2 M
	SDS	1 %

<u>Puffer3:</u>	KaC; pH 5,5	3 M
<u>TE-Puffer:</u>	Tris-HCl, pH 8,0	10 mM
	Na ₂ EDTA	1 mM

QBT-, QC- und QF-Puffer sind bei der Bestellung der Qiagensäulen enthalten.

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden entsprechende Säulen von Qiagen verwendet. Der Reinheitsgrad und die Konzentration wurden durch Agarosegelelektrophorese und anhand eines UV-Spektrums (220-320 nm) bestimmt. Hierbei sollte der Reinheitsgrad (260/280) bei 1,6-1,8 liegen. Die Konzentration wurde durch die Angabe $1 \text{ OD}_{260}=50 \mu\text{g/ml}$ berechnet.

Für die Plasmidmaxipräparation wurde eine Kolonie vom LB/Amp-Nährboden mit einem sterilen Zahnstocher in 20 ml LB-Medium/100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin überführt und für 6 Std bei 37 °C unter Schütteln (200 upm) inkubiert. Hiernach wurden je 10 ml der Vorkultur in 500 ml LB/Amp-Medium gegeben und über Nacht bei 37 °C/200 upm inkubiert. Die Zellen wurden am nächsten Tag in zwei GS3-Bechern bei 15 °C, 6100 x g für 10 Min abzentrifugiert, in je 50 ml Puffer1 durch Umschwenken (Raumtemperatur) resuspendiert und in einen GSA-Becher überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 15 °C, 6420 x g (Sorvall RC 5B Plus) für 10 Min. Das Pellet wurde in 18 ml Puffer1 mit 100 $\mu\text{g/ml}$ DNase-freie RNase resuspendiert und mit 10 mg/ml Lysozym unter leichtem Schwenken 5 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 40 ml frischer Puffer2 dazugegeben und alles vorsichtig für 5 Min bei Raumtemperatur gemischt. Es folgte eine Zugabe von 20 ml eiskaltem Puffer3. Dieses wurde vorsichtig vermischt und 10 Min auf Eis inkubiert, bevor im GSA-Becher bei 15 °C, 6420 x g für 15 Min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde über einen Filter in einen neuen GSA-Becher gegeben und mit 50 ml 100 % Isopropanol versetzt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 15 °C, 12800 x g für 30 Min. Das erhaltene DNA-Pellet wurde in 1 ml TE-Puffer resuspendiert und mit QBT-Puffer auf 12 ml aufgefüllt. Der Qiagen-tip 500 wurde mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert und die resuspendierte DNA auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit 2 x 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die DNA konnte nun mit 15 ml QF-Puffer von der Säule in einen SS34-Becher eluiert werden. Das Präzipitieren der DNA erfolgte durch Zugabe von 0,7 Volumenanteilen 100 % Isopropanol. Nach vorsichtigem Mischen wurde für 30 Min bei 15000 x g/15 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das DNA-Pellet mit 2-10 ml 70 % Ethanol bei 15000 x g für 10 Min gewaschen. Nach erneuter Abnahme des Überstandes wurde das Pellet zunächst 5-10 Min getrocknet und an-

schließlich in max 500 µl TE-Puffer aufgenommen. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei – 20 °C gelagert.

2.2.5 huMDR1-Teilsequenz

Basierend auf der Veröffentlichung von Zhang *et al.* [1996] wurde der Bereich der zweiten cytoplasmatischen Schleife (AS 241-289) der huMDR1-cDNA-Sequenz für die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers ausgewählt. Hierbei handelt es sich um einen Größenbereich von 167 bp, der in den pGEX4T1-Vektor ligiert wurde. Um eine am Leseraster ausgerichtete Ligation in die *multiple cloning site* des Vektor zu ermöglichen, wurden Oligonukleotide (Gibco BRL) synthetisiert, an deren Enden der jeweils amplifizierten DNA-Sequenzen Schnittstellen für die spezifischen Restriktionsendonukleasen eingeführt wurden (siehe Anhang).

PCR-Standardprotokoll für 50 µl Reaktionsansatz:

- | | |
|--|-----------------|
| - 50 pmol Oligonukleotid (5'-Ende) | 10 µl (5µM) |
| - 50 pmol Oligonukleotid (3'-Ende) | 10 µl (5µM) |
| - 0,8 mM dNTP | 5 µl (8mM) |
| - DAP-Goldpolymerase-Puffer (Eurogentec) | 5µl (10 fach) |
| - 2 mM mgCl ₂ (Eurogentec) | 2 µl (50 mM) |
| - 1 unit DAP-Goldpolymerase (Eurogentec) | 0,2 µl (5 U/µl) |
| - 1-5 ng Matrize (Plasmidpräparation) | 0,5 µl |
| - ad 50 µl H ₂ O E-Pure, autoklaviert | |
| - mit Paraffinöl überschichten; pro Ligation 4 x 50 µl | |

1. Zyklus (1x) 300 Sek bei 95 °C

2. Zyklus (20x) 5 Sek bei 50 °C, dann 60 Sek bei 50 °C

5 Sek bei 72 °C, dann 120 Sek bei 72 °C

5 Sek bei 92 °C, dann 60 Sek bei 92 °C

3. Zyklus (1x) 5 Sek bei 50 °C, dann 60 Sek bei 50 °C

5 Sek bei 72 °C, dann 240 Sek bei 72 °C

Bis zur Aufarbeitung bei 4 °C

2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Für die Überprüfung von Plasmiden, PCR-Produkten und Restriktionsverdaufragmenten wurde ein TBE-Agarosegel (Tris-Borat- EDTA) gewählt. Es wurden in Abhängigkeit der DNA-Fragmentgröße 0,8-2 % TBE-Agarosegele hergestellt.

Material:

<u>10 x TBE-Puffer:</u>	Tris	0,89 M
	Borat (H ₃ BO ₃)	0,89 M
	EDTA; pH 8,0	20 mM
	ad 1 l H ₂ O E-Pure, autoklavieren	
<u>6 x DNA-Auftragspuffer:</u>	Bromphenolblau	0,001 % (w/v)
	Xylencyanol	0,002 % (w/v)
	Saccharose	50 % (w/v)
	EDTA, pH 8,0	1 mM
ad 50 ml H ₂ O E-Pure, in 2 ml Ali- quots Lagerung bei -20 °C		

Dementsprechend wurden 0,4-1 g Agarose (Gibco BRL, *elektrophoretical grade*) in 50 ml TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst, in die Elektrophoresekammer gegossen und bei 4 °C ausgekühlt. Das Gel wurde anschließend mit 1 x TBE-Puffer überschichtet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit 6 V/cm bei 4 °C und die anschließende Detektion nach Anfärbung der DNA-Banden mit Ethidiumbromid im UV-Licht. Bei den Größenstandards handelte es sich um einen 1 kbp-Standard (New England Biolabs) und λ -*BstE* II. Den λ -*BstE* II-Standard erhält man durch den Verdau der DNA des Phagen λ mit dem Restriktionsenzym *BstE* II. (Fragmentgrößen siehe Anhang). Die Gele wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung für 10 Min in einer 1 µg/ml wäßrigen Ethidiumbromidlösung gefärbt und an-

schließlich 20-30 Min in H₂O bei Raumtemperatur entfärbt. Die Dokumentation der DNA-Agarosegele erfolgte nach Entfärbung bei UV-Licht über eine digitale Kamera (Gel Print 2000i, MWG-Biotech) mit anschließender Abspeicherung als TIFF-Datei auf Diskette.

2.2.7 Restriktionsverdau

Für den Ligationsansatz mußten zunächst das *Insert* sowie der Rahmen mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut werden.

Insert-Präparation:

Zu den aufgereinigten 200 µl PCR-Produkte (4x50 µl) wurden 40 µl 10 x Restriktionspuffer, 4 µl 100 x BSA, 2 µl Restriktionsendonuklease (20 U/µl) hinzupipettiert und alles auf 400 µl H₂O E-Pure aufgefüllt. Der Verdau wurde 3 Std bei 37 °C durchgeführt. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Verdau für 20 Min bei 65 °C erhitzt, um die Restriktionsendonukleasen zu inaktivieren, dann 2 Min auf Eis gestellt, bevor kurz anzentrifugiert wurde. Die Aufreinigung des *Insert* erfolgte über eine QIAquick spin-Säule (Qiagen).

Rahmen-Präparation:

Für die Rahmen-Präparation wurden 7-10 µg Plasmid aus der Plasmidmaxipräparation eingesetzt. Zu dem Plasmid wurden 8 µl Restriktionspuffer, 0,8 µl 100 fach BSA und 2 µl Restriktionsendonuklease (20 U/µl) hinzupipettiert und auf 80 µl mit H₂O E-Pure aufgefüllt. Es folgte ein 2 Std Verdau bei 37 °C. Hiernach wurde der Ansatz für 20 Min bei 65 °C erhitzt und anschließend für 2 Min auf Eis gestellt, bevor der Verdau kurz anzentrifugiert wurde. Eine Dephosphorylierung der geschnittenen Enden der DNA wurde durch Zugabe von 10 U alkalischer Phosphatase (Kalb, CIP Boehringer Mannheim) für 60 Min bei 37 °C erreicht. Bei dieser enzymatischen Behandlung wurde der 5'-Phosphatrest am linearisierten DNA-Strang hydrolysiert, wodurch die Religation des Vektors unterdrückt werden konnte. Es folgte eine Inkubation von 20 Min bei 65 °C zur Hitzeinaktivierung der Phosphatase, 2 Min auf Eis, dann wurde kurz anzentrifugiert.

Der Verdau konnte nun zur Gewinnung der DNA-Restriktionsverdaufragmente über eine elektrophoretische Auftrennung in einem präparativen TBE-Agarosegel erfolgen. Die der Fragmentgröße entsprechende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und über QIAquick spin-Säulen nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.8 Ligation

Über Inkubation mit T4-DNA-Ligase erfolgte die Ligation von den präparierten *Insert* und Rahmen. Zur Kontrolle wurden ebenfalls Ansätze ohne *Insert* oder Rahmen vorgenommen. Durchführung wie folgt:

- 3 µl dephosphorylierter Rahmen; 200-500 ng
- 6 µl *Insert*; 200-500 ng
- 2 µl Ligase-Puffer (5 fach, Gibco BRL)
- 2 µl T4-DNA-Ligase (Gibco BRL, 1 Weiss-Unit/µl)
- 2 µl H₂O E-Pure, autoklaviert

Es wurde 1 Std bei Raumtemperatur, anschließend 20 Min bei 65 °C inkubiert und bis zur Transformation (siehe 2.2.3) auf Eis aufbewahrt.

2.2.9 Überprüfung positiver Klone

Die über Nacht auf den LB-Agarplatten gewachsenen Kolonien, nach Elektroporation der Ligation der huMDR1 in den Vektor, wurden mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte in 5 ml LB/Amp-Medium überführt und bei 37 °C/200 upm (Certomat[®]MO+HK) über Nacht inkubiert. 0,5 ml dieser Vorkulturen wurden auf 5 ml LB/Amp- Medium überimpft und für 2 Std bei 37 °C/200 upm wachsen gelassen. Nach diesen 2 Std wurde je 1 ml entnommen und die OD₆₀₀ bestimmt, bevor die Induzierung der Proteinexpression mit 1 mM IPTG erfolgte. Hiernach wurden die Zellen erneut 2 Std bei 37 °C/200 upm inkubiert, bevor eine weitere OD₆₀₀-Bestimmung erfolgte. Die Proteinexpression wurde anhand eines Polyacrylamidgeles überprüft.

Ein geeigneter Klon wurde in 200 ml LB/Amp-Medium bei 37 °C/200 upm über Nacht inkubiert. Je 50 ml wurden in 500 ml LB/Amp-Medium überführt und 2 Std bei 37 °C/200 upm inkubiert, bevor ein 1 ml Aliquot bei OD₆₀₀ gemessen wurde. Ab einer OD₆₀₀=1 wurde mit 1 mM IPTG induziert und weiter inkubiert. Nach ca. 3 Std war eine OD₆₀₀ von 2,0-3,0 erreicht. Die Zellen wurden nun in einem GS3-Becher bei 15 °C, 6100 x g für 10 Min zentrifugiert und anschließend in insgesamt 120 ml PBS auf Eis resuspendiert. Je 30 ml wurden in einen vorgewogenen SS34-Becher überführt und bei 15 °C, 9700 x g für 10 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet abgewogen und bei -80 °C gelagert.

2.2.10 Proteinaufreinigung

Das Zellpellet von ca. 6 g Biofeuchtmasse wurde auf Eis mit 30 ml eiskaltem PBS resuspendiert und anschließend mit Ultraschall aufgeschlossen. Nach Zugabe von Triton X-100 (1 %/Vol) wurde bei 12000 x g 4 °C für 10 Min zentrifugiert. Zu dem klaren Überstand, der in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt wurde, wurden 2 ml äquilibrierte Glutathion Sepharose 4B pipettiert und für min 30 Min bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 500 x g, 4 °C für 30 Sek. Das Bettvolumen wurde nun dreimal mit 15 ml PBS bei 4 °C gewaschen und anschließend auf eine Elutionssäule überführt. Auf der Säule wurde zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, bevor das Fusionsprotein mit 10 ml SDS-haltigem Auftragspuffer ohne Bromphenolblau eluiert wurde. Die Fraktionen wurden je zu 1 ml aufgefangen und konnten bis zur Proteinbestimmung über ein analytisches SDS-Polyacrylamidgel bei 4 °C aufbewahrt werden. Die einzelnen Fraktionen wurden hierfür 1:1 mit Auftragspuffer (+ Bromphenolblau) verdünnt.

2.2.11 Thrombinverdau

Mittels Thrombinverdau sollte das Peptid vom GST-Fusionsprotein abgetrennt und für die Immunisierung verwendet werden.

Nachdem das GST-Fusionsprotein an die Sepharose4B gebunden hatte und mit 3 x 15 ml PBS bei 4 °C gewaschen wurde, wurde das Gemisch in 2,5 ml PBS resuspendiert. Es wurden 50 U Thrombin hinzugegeben und dieser Ansatz für 4 Std bei Raumtemperatur auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurde bei 500 x g für 30 Sek zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Sepharose nochmals mit PBS gewaschen. In dem Überstand befand sich das abgespaltene P-Glykoprotein-Fragment, welches bei -80 °C aufbewahrt wurde.

2.2.12 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Hierbei handelt es sich um ein diskontinuierliches Gelsystem, in dem Proteine anhand ihres Molekulargewichtes elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Proteine mußten mit einem SDS-haltigen Probenpuffer vorbehandelt werden, um eine negative Ladung anzunehmen.

Material:

<u>Acrylamidlösung:</u>	30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid (Gel 30, Art 3029.1, Roth)	
<u>Auftragspuffer:</u>	Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
	SDS	10 % (w/v)
	Glycerin	100 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,0025 g
	DTT	0,1 M
<u>Tris-Puffer 1:</u>	Tris-HCl pH 8,8	1,5 M
<u>Tris-Puffer 2:</u>	Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
<u>10 x Lämmli-puffer:</u>	Tris	0,25 M
	Glycin	1,9 M
	SDS	1 %
<u>Fixier- und Färbelösung:</u>	Methanol	120 ml
	Coomassie G250 (Serva)	0,3 g
	H ₂ O E-Pure	120 ml
	96 % Essigsäure	24 ml
	Filtration über 0,22 µm Filter	

Die vorbereiteten und bei 4 °C gelagerten Proben (siehe 2.2.10) wurden auf ein analytisches SDS-Polyacrylamidgel mit der unten angegebenen Zusammensetzung aufgetragen. Für die Auftrennung wurde eine MiniProtean II Kammer (BioRad) gewählt, die bei konstanter Stromstärke (35 mA/Gel) betrieben wurde.

Die Gele wurden nach der Auftrennung für 10 Min auf einem Schüttler (Raumtemperatur) in einer Kombinationslösung gleichzeitig fixiert und gefärbt. Die Entfärbung erfolgte zunächst durch Aufkochen der Gele für 2-3 Min in H₂O E-Pure und anschließend durch 7 % Essigsäure. Die Gele konnten in H₂O E-Pure gelagert werden.

	Trenngel		Sammelgel
	12 %	15 %	4 %
H ₂ O E-Pur	3,3 ml	2,37 ml	2,43 ml
Tris-Puffer 1	2,5 ml	2,5 ml	-
Tris-Puffer 2	-	-	1 ml
30 % AA/ 0,8 % Bis	4,02 ml	5,03 ml	530 µl
10 % SDS	100 µl	100 µl	40 µl
40 % APS	20 µl	20 µl	15 µl
TEMED	10 µl	10 µl	7,5 µl

2.2.13 Kupfer-Färbung [Lee et al., 1987]

Es handelte sich bei dieser Methode um eine Negativ-Färbung. Der Gelhintergrund wurde durch die Entstehung eines Tris-Cu²⁺-SDS Präzipitats angefärbt, während die Proteinbanden farblos erschienen.

Material:

Färbelösung: 0,3 M CuCl₂

Nachdem über das analytische SDS-Polyacrylamidgel die Elutionsfraktionen mit dem GST-Fusionsprotein identifiziert wurden, konnten diese mittels eines präparativen SDS-Gels aufgetrennt werden. Nach dem Lauf wurden die Gele kurz mit H₂O E-Pure gewaschen, für 5 Min in die Färbelösung auf einem Schüttler (Raumtemperatur) gegeben und anschließend erneut in H₂O E-Pure gewaschen. Die das Fusionsprotein enthaltene Bande konnte nun aus dem Gel ausgeschnitten und das Protein aus dem Gelstreifen in einen Dialyseschlauch eluiert werden.

2.2.14 Dialyse

Material:

<u>Lagerpuffer:</u>	EDTA pH 8,0	1 mM
	NaN ₃	10 mM
	Ethanol	20 %

Dialyseschlauch: Ø 16 mm, Serva No.
44145

Der ausgeschnittene Gelstreifen wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit Löchern im Boden gegeben und in Agarose eingegossen. Ein Dialyseschlauch (Serva) wurde an dem unteren Ende des Reaktionsgefäßes befestigt und nach dem Prinzip des Centricon-Eluters (Millipore) konnte so das Protein aus dem Gel direkt in den Dialyseschlauch eluiert werden. Das Protein im Dialyseschlauch wurde über 3 Tage bei 4 °C in PBS, welches mehrfach gewechselt wurde, schonend umgepuffert. Dieses umgepufferte und konzentrierte GST-Fusionsprotein wurde in 500 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

Die Dialyseschläuche mußten vor Gebrauch vorbehandelt werden. Zunächst wurden sie für 2 x 1 Std in einer 2 % NaHCO₃ / 1 mM EDTA-Lösung (pH 8,0) gekocht und anschließend mehrmals in 1 mM EDTA (pH 8,0) gewaschen, bis der pH von 8,0 erreicht wurde. Hiernach wurden die Schläuche 1 x mit Lagerpuffer gewaschen, bevor sie in diesem bei 4 °C aufbewahrt werden konnten.

2.2.15 Immunisierung

Bei der Immunisierung wird der Kontakt mit dem produzierten Antigen hergestellt, wodurch in dem immunisierten Organismus die Produktion von spezifischen Antikörpern induziert wird. Für die Immunisierung wurden Kaninchen (Chinchilla Bastard) verwendet.

Material:

Freunds Adjuvant: Adjuvant Complete Freund, Difco Laboratories, No 0638-60-7
Adjuvant Incomplete, Sigma, No F-5506

Material und Methoden

Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte subkutan mit ca 500 µg GST-Fusionsprotein in PBS. Zu den 500 µl Proteinsuspension wurden 500 µl complete Freund's Adjuvant hinzugegeben und in zwei Spritzen mit einem Aufsatz homogenisiert. 14 Tage nach der Immunisierung der Kaninchen wurde Blut entnommen. Die drei folgenden *Boosterungen* erfolgten je in ca 14 -Tages-Rhythmus mit den Blutentnahmen. Hierbei wurde für die Injektion lediglich noch ca 150 µg GST-Fusionsprotein (500 µl) verwendet und mit incomplete Freund's Adjuvant (500 µl) homogenisiert.

2.2.16 Aufarbeitung des Serums

Das entnommene Blut wurde zunächst für 1 Std bei 37 °C geronnen und über Nacht bei 4 °C stehengelassen. Nun konnte bei 2000 x g für 15 Min (4 °C) zentrifugiert und das Serum dann vorsichtig abgenommen werden. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen, wurde nochmals für 15 Min bei 13000 x g (4 °C) zentrifugiert und das Serum in frische Reagenzgefäße überführt, zu je 100 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.17 Western-Blot

Bei dieser Methode handelt es sich um den elektrophoretischen Transfer aufgetrennter Proteinbanden aus einem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Die Proteine können auf diese Weise mittels Antikörpern identifiziert werden.

Material:

PBS-Tween: 100 ml PBS + 50 µl Tween 20

(Polyoxyethylenesorbitan
Monolaurate; Sigma P-7949)

Tintenfärbung: PBS-Tween 30 ml

CH₃COOH 300 µl

Tinte 30 µl

filtrieren

Die Proteinproben wurden zunächst über ein Gelsystem (SDS-, Trizingel) aufgetrennt. Hier-nach konnte der Blot wie folgt zusammengebaut werden: 6 Lagen in Blot-Puffer getränktes

Whatmanpapier, Gel, zwei Nitrocellulosemembranen (luftblasenfrei) und weitere 6 Lagen getränktes Whatmanpapier. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembranen erfolgte bei 300 mA für 18 Std. Die erste Membran nach dem Gel wurde für den Western-Blot, die zweite Membran für eine Tintenfärbung genutzt.

Für die Tintenfärbung wurde die Membran zunächst für 5 Min in 0,2 M NaOH geschwenkt und dann 4 x 10 Min in PBS-Tween gewaschen. Die Membran wurde nun in die vorbereitete Färbelösung gelegt. Nach Färbung der Banden wurde die Membran luftgetrocknet. Auf diese Weise sollte der Transfer der Proteine aus dem Gel überprüft werden.

Material:

<u>Blot-Puffer:</u>	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,02 %
<u>Waschpuffer:</u>	Na ₂ HPO ₄	58 mM
	NaCl	68 mM
	NaH ₂ PO ₄	17 mM
	1 ml PBS + 1 µl Tween 20	
<u>I-Blocklösung:</u>	I-Block (Tropix I-Block™ AB100)	0,1 g
	In 50 ml Waschpuffer	
<u>Assay Puffer:</u>	autoklaviertes H ₂ O E-Pure auffüllen	100 ml
	DEA (Diethanolamin; Tropix AD120)	960 µl
	MgCl ₂	100 µl
	Mit HCl auf pH 10 einstellen	
<u>Nitroblock II:</u>	100 µl Nitroblock II (Tropix Nitro-Block II™ LNX200)	
	In 2 ml Assay Puffer	
<u>Substratlösung:</u>	10 µl (25 mM) CDP-Star	
	In 2 ml Assay Puffer	
<u>Film:</u>	Kodak	

Die Membran für den Immunoblot wurde für mindestens 1 Std in I-Blocklösung zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in einer 1:5000 Verdünnung in 1:2 I-Blocklösung/ Waschpuffer für 1 Std zur Inkubation auf die Membran gegeben. Das Serum wurde in einer 1:400 Verdünnung eingesetzt. Hiernach wurde dreimal für je 10 Min mit Waschpuffer gewaschen, bevor der sekundäre Antikörper (1:10000) in Waschpuffer auf die Membran gegeben werden konnte. Es folgten erneut dreimal für je 10 Min Waschschriffe mit Waschpuffer. Anschließend wurde zum Umpuffern zweimal 5 Min mit Assay Puffer gewaschen. Nach einer 5 Min Inkubation in Nitroblock II folgten zwei weitere Waschschriffe mit Assay Puffer für je 5 Min. Die Membran wurde nun für 5 Min in Substratlösung geschwenkt, abtropfen gelassen und in eine Folie gelegt. Die Zeitspanne bis zur Entwicklung des aufgelegten Films variierte zwischen 30 Sek und 2 Std.

2.2.18 FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)

Bei dieser Methode wird zur Analyse eine Sortierung der Zellen anhand ihres Gehaltes an Fluoreszenzmarkern vorgenommen. Die eingesetzten Antikörper binden an ihr spezifisches Epitop und werden von einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper nochmals gebunden. Diese Fluoreszenz ermöglicht eine Sortierung der Zellen mit diesem gesuchten spezifischen Epitop.

Der Unterschied zwischen dem intra- und extrazellulären FACS bestand lediglich in dem Fixierungsschritt mit 2 % Paraformaldehyd und der anschließenden Zugabe von 0,05 % Triton, welches bis nach der Zugabe des sek. Antikörpers in den Waschschriffen beibehalten wurde.

Für jeden Ansatz wurden 5×10^5 Zellen/Ansatz benötigt. Hierfür mußten zunächst die Zellen mit Accutase von den Kulturschalen gelöst werden. Mit Medium wurde die Reaktion abgestoppt, die Zellen abgespült und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nun konnten sie abzentrifugiert und in 5-10 ml PBS/FCS resuspendiert werden. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer Kammer ($c = n \times 10^4$) bestimmt. Die benötigte Zellzahl wurde in Mikrotiterplatten gegeben und diese für 4 Min zentrifugiert (400 x g).

Durch die Zugabe von 2 % Paraformaldehyd in PBS/FCS wurden die Zellen für 10 Min bei 4 °C fixiert. Die anschließende Inkubation mit 0,05 % Triton in PBS/FCS für 10 Min bei 4 °C ermöglichte eine Perforation der Zellmembran, so daß intrazelluläre Messungen ermöglicht wurden.

Hiernach wurden die Zellen 2 x mit PBS/FCS gewaschen (400 x g) und durch Schütteln resuspendiert, bevor mit 20 µl Pentaglobin (10 mg/ml) (1-2 Min schütteln) geblockt wurde. Die entsprechende Menge primärer Antikörper oder IgG2a (Tabelle) wurde direkt zu dem Pentaglobin pipettiert und für 30 Min bei 4 °C inkubiert. Es folgten erneut zwei Waschschrirte mit 200µl PBS/FCS (400 x g), bevor zu den Zellen der sekundäre Antikörper (1:21 Verdünnung) hinzugegeben wurde. Die Inkubationszeit betrug 10 Min im Dunkeln. Nachdem die Zellen erneut zweimal mit 200 µl PBS/FCS (400 x g) gewaschen und anschließend in 250 µl PBS/FCS resuspendiert wurden, mußten die Proben bis zur Messung auf Eis gelagert werden.

Antikörper	µl/Ansatz	Hersteller
MM 4.17	10 µl	Prof. Cianfriglia
C219	5 µl	Calbiochem 517310
MRK 16	4 µl	Kamiya Biomedical MC-012
Vimentin	20 µl	Oncogene IF 01
IgG2a (Isotypkontrolle)	10 µl	DAKO X0943
KDI 3541	7 µl	Bioscience Göttingen
αMDR-L4	7 µl	Dipl.-Biol. Isenberg
Anti Kaninchen Ig	1 µl	DAKO F0054
Anti Maus Ig	1 µl	DAKO F0313

2.3 Zwei Dimensionale (2D) Gelelektrophorese

Bei dieser Methode wurden die vorliegenden Protein-Zellextrakte zunächst anhand ihres isoelektrischen Punktes mittels immobilisiertem pH-Gradienten und anschließend anhand ihres Molekulargewichtes in einem 10 % Trizingel aufgetrennt. Für die Versuche wurde das 2D-System von Pharmacia Biotech gewählt.

Material:

<u>pH-Gradient:</u>	Immobiline TM Dry Strip 13 cm pH 3-10 (17-6001-14)	
<u>SBIV-Puffer:</u>	Harnstoff	9 M
	Chaps (Merk 11662)	2 %
	Pharmalyte 3-10 (Esa 80-0159)	0,8 %
	DTT	15 mM
<u>IPG-Puffer:</u>	(17-6000-87)	3-10 pH
<u>Equilibrierung</u>		
<u>Stammlösung (EP):</u>	Harnstoff	6 M
	Glycerin	30 %
	SDS	2 %
	Tris-HCl pH 8,8	0,05 M
	Bromphenolblau	0,25 %
<u>EP1:</u>	+ 100 mg DTT/10 ml Stammlösung = 1 immobilisierter pH-Gradient	
<u>EP2:</u>	+ 480 mg Iodoacetamid/10ml Stammlösung = 1 immobilisierter pH-Gradient (Sigma I-6125)	
<u>Öl:</u>	Dry Strip Cover Fluid (17-1335-01)	

Durchführung:

Die Proben, die je 100 µg Protein enthalten, wurden auf 245 µl mit SBIV-Puffer aufgefüllt und anschließend mit 5 µl IPG-Puffer (pH 3-10) versetzt. Diese wurden in die vorgesehenen Kammern gegeben und der immobilisierte pH-Gradient (13 cm) in Form eines Gelstreifens luftblasenfrei zur Rehydratation aufgelegt. Der Gelstreifen wurde mit Öl (Cover Fluid) überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Vor der isoelektrischen Fokussierung wurden die Gelstreifen mit H₂O E-Pure abgespült und mit einem Filterpapier abgetupft. Die Kontakte der Gelstreifen zur Anode und Kathode wurden mit H₂O-getränktem Fil-

terpapier hergestellt. Der restliche Gelstreifen wurde mit Kerosin unterlegt und mit Öl (*Cover Fluid*) überschichtet. Die isoelektrische Fokussierung fand stufenweise statt.

Phase	Volt	MilliAmper	Watt	Stunde	Voltstunden
1	500	20	40	1	= 500
2	1000	4	10	1	= 1500
3	1500	4	10	1	= 3000
4	3500	4	10	3	= 13500

Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Gelstreifen zunächst für 15 Min mit EP1 und dann für 15 Min mit EP2 equilibriert, bevor sie auf die zweite Dimension, ein 10 % Tri-zingel, gelegt werden konnten. Ein hochmolekularer Standard wurde am basischen Ende als Gelblock hinzugeführt und beides zum besseren Transfer in die zweite Dimension mit Agarse überschichtet. Der Gellauf erfolgte über Nacht bei 40 V. Die Gele wurden anschließend mit Silber oder Coomassie gefärbt.

2.3.1 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine sehr empfindliche Färbemethode, mit der sogar noch 5 ng Protein nachgewiesen werden können. Innerhalb des Polyacrylamidgels entsteht hierbei ein Protein-Silber-Komplex, der durch eine bräunliche Färbung sichtbar wird.

Material:

Fixierlösung: Methanol 50 %
 Eisessig 12 %
 Formalin (37 %) 0,4 ml
 mit H₂O E-Pure auf 400 ml auffüllen.

Di-Natriumthiosulfat: 0,1 g in 500 ml H₂O dest (!) lösen.

Material und Methoden

<u>Färbelösung:</u>	Silbernitrat	0,8 g
	Formalin (37 %)	0,3 ml
	mit H ₂ O dest (!) auf 400 ml auffüllen.	
<u>Entwicklerlösung:</u>	Di-Natriumthiosulfat	1,6 mg
	Formalin (37 %)	0,2 ml
	Natriumcarbonat	24 g
	mit H ₂ O dest (!) auf 400 ml auffüllen.	
<u>Stopplösung:</u>	Methanol	50 %
	Eisessig	12 %
	mit H ₂ O E-Pure auf 400 ml auffüllen.	

Nach der Auftrennung wurden die Gele zunächst für mindestens 2 Std fixiert, dann für dreimal 20 Min mit 40 % Methanol und anschließend einmal 20 Min mit 25 % Methanol gewaschen. Bevor die Gele max 1 Std gefärbt wurden, wurden sie für 1 Min in Di-Natriumthiosulfat und dreimal 20 Sek in H₂O E-Pure geschwenkt. Nach der Färbung wurde für zweimal 1 Min mit H₂O E-Pure gewaschen und anschließend entwickelt. Um die Entwicklung abzustoppen, wurde erneut mit H₂O E-Pure (zweimal 20 Sek) gewaschen und die Gele anschließend für 10 Min in die Stopplösung gelegt. Damit die Gele beim Trocknen nicht so schnell reißen oder falls sie nicht sofort getrocknet werden konnten, wurden sie in einer 10 % Methanol / 7 % Glycerin-Lösung aufbewahrt.

2.3.2 Coomassie-Färbung (kolloidale Färbung)

Um die erhaltenen Spots des 2D-Gels weiter zu untersuchen (HPLC, MALDI-TOF), wurde eine Coomassie-Färbung gewählt, die bei den folgenden Methoden keine störenden Effekte aufweist.

Material:

<u>Färbung:</u> Coomassie G-250 (Serva)	0,1 %
Methanol	20 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	10 %
H ₃ PO ₄	2 %

Nach dem Lauf der zweiten Dimension wurde das Gel zunächst für 6 Std in 50 % Methanol/10 % Eisessig fixiert. Danach wurde jedes Gel einzeln für 16 Std mit Coomassie gefärbt und anschließend erst mit 25 % Methanol in H₂O, dann mit H₂O E-Pure gewaschen. Die Coomassie-gefärbten Spots konnten nun ausgeschnitten und bei -80 °C eingefroren werden.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung der Substratbindungsstellen von Iodoarylazidoprazosin innerhalb des P-Glykoproteins aus CHO B30-Zellen

3.1.1 Photomarkierung

Eine anerkannte Technik zur Identifizierung von Substratbindungsstellen in P-Glykoprotein ist die Photoaffinitätsmarkierung, durch die die zweite cytoplasmatische Schleife zwischen TM 4 und TM 5 bereits als wichtige Region identifiziert wurde. Mit dieser Methode wurde gezeigt, daß die strukturell unterschiedlichen Substrate Iodomycin und Iodipin in diesem Bereich der Hamster-Isoform pgp1 binden. Hierfür wurde aus der cytostatikasensitiven Zelllinie CHO B1 die cytostatikaresistente CHO B30-Zelllinie selektiert, die hiernach durch eine Überexpression von P-Glykoprotein charakterisiert ist. Erst eine ausreichende Menge an P-Glykoprotein ermöglicht die Photomarkierbarkeit von Substraten.

Photoreaktive Untersuchungen mit Iodoarylazidoprazosin wiesen auf je eine Hauptbindungsstelle im N-terminalen Bereich in der TM 6 und im C-terminalen Bereich in der TM 12 hin. Zusätzlich wurde für dieses Substrat eine Nebenbindungsstelle in dem Bereich TM 4 bis kurz vor TM 6 beschrieben [Greenberger *et al.*, 1993]. Zwischen Iodipin und Azidopin besteht eine Strukturähnlichkeit. Es wird angenommen, daß Azidopin und Iodoarylazidoprazosin an dieselben Substratbindungsstellen im P-Glykoprotein binden [Greenberger *et al.*, 1990].

Mit dem chemischen BNPS-Skatol-Verdau, der hinter Tryptophan in der Aminosäure-Sequenz spaltet, sollte das Spaltmuster des mit Iodoarylazidoprazosin photomarkierten P-Glykoprotein mit dem des Iodomycins und Iodipins verglichen werden. P-Glykoprotein enthält 11 Tryptophane in der Aminosäuresequenz. Bei einem Verdau mit BNPS-Skatol resultieren daraus 12 Spaltfragmente in unterschiedlichen Größen.

Fragment	Molekulargewicht/ kDa	Abschnitt innerhalb der primären Amino- säuresequenz	Transmembranbereich
1	5,343	1 – 44	N-terminale Schleife vor TM 1
2	9,635	45 – 133	TM 1 – TM 2
3	3,092	134 – 159	TM 2 – cyt. Schl. 1
4	5,566	160 – 209	cyt. Schl. 1 – TM 3
5	2,062	210 – 229	TM 3 – TM 4
6	9,045	230 – 312	TM 4 – TM 5
7	42,213	313 – 695	TM 5 – NBD 1 hinter Walker B
8	1,244	696 – 705	NBD 1
9	10,823	706 – 800	TM 7 – TM 8 – cyt. Schl. 3
10	5,366	801 – 852	cyt. Schl. 3 – TM 9
11	27,795	853 – 1105	TM 9 – NBD 2
12	18,810	1106 - 1276	NBD 2 hinter Walker A

Tabelle 3-1: Fragmente der primären Aminosäuresequenz des P-Glykoproteins
 TM= Transmembrandomäne; cyt. Schl.= cytoplasmatische Schleife; NBD= nukleotidbindende Domäne.

Iodomycin und Iodipin wiesen bei diesem chemischen Verdau ein photomarkiertes Spaltfragment in der Größe von ca. 8 – 10 kDa auf, welches durch Edman-Sequenzierung als Aminosäureabschnitt 230-312 identifiziert wurde. In der Tabelle 3-1 handelt es sich hierbei um das Fragment 6 mit der Größe von 9,045 kDa.

Um das Iodoarylazidoprazosin-Spaltmuster zu erhalten, wurde zunächst radioaktiv markiertes Prazosin, [¹²⁵I]Iodoarylazidoprazosin, durch photochemische Kopplung bei 366 nm an Gesamtmembranfraktionen von CHO B30-Zellen gebunden und anschließend mit BNPS-Skatol chemisch gespalten. Nach der Spaltung wurden die Proben über ein 15 % Trizingel elektrophoretisch aufgetrennt. Dieses Gelsystem ermöglicht ein höheres Auflösungsvermögen der niedermolekularen Spaltfragmente. Die aufgetrennten photomarkierten Fragmente wurden mit einer Phospho-Imager-Platte erkannt und anschließend identifiziert.

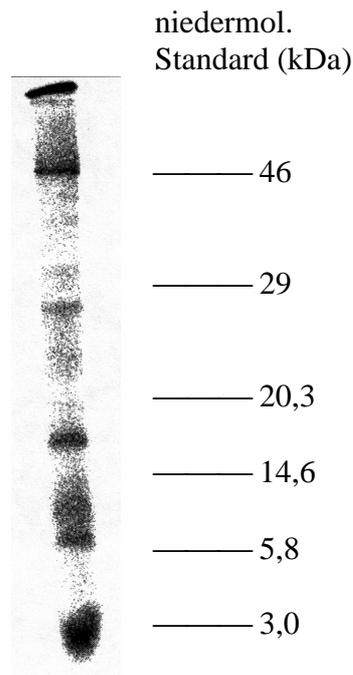


Abbildung 3-1: Tryptophanspaltung (BNPS-Skatol-Verdau) der mit Iodoarylazidoprazosin gekoppelten Gesamtmembranfraktion aus CHO B30-Zellen. 15 % Trizingel; Autoradiographie.

Zu erkennen war ein reproduzierbares Spaltnmuster von drei hochmarkierten Fragmenten, die nach eigengewählter Nomenklatur als A-(ca. 16 kDa), B- (ca. 12 kDa) und C-Bande (ca. 8 kDa) bezeichnet wurden, und zwei geringmarkierte Fragmente, mit einem Molekulargewicht von ca. 26 und 45 kDa.

Iodoarylazidoprazosin wies, verglichen mit dem Spaltnmuster von Iodomycin und Iodipin, ebenfalls eine hochmarkierte ca. 8 kDa (C-) Bande auf, aber auch eine bei ca. 12 kDa (B-Bande), bei denen es sich um die Fragmente 2, 6 oder 9 (Tabelle 3-1) handeln könnte.

Bei den Bandengrößen, die auf der Abbildung 3-1 zu sehen sind, könnte es sich um die Spaltfragmentgrößen 9,635 kDa (2), 9,045 kDa (6) und 10,823 kDa (9) für die Banden B und C handeln. Für die Bande A käme das Molekulargewicht von 18,810 kDa des Fragmentes 12 in Betracht. Bei diesen Größenordnungen sind Partialverdaufragmente, wie z.B. eine unvollständige Spaltung von Fragment 3 (3,092 kDa) und 4 (5,566 kDa), welches eine Größe von 8,658 kDa entsprechen würde, nicht berücksichtigt worden. Für eine eindeutige Identifizierung war die Sequenzierung der Banden unabdingbar. Da mehrere Spaltfragmente mit ähnlicher Größe innerhalb der photomarkierten Banden komigrieren, mußte eine Auftrennung über HPLC erfolgen.

3.1.2 HPLC-Aufreinigung des BNPS-Skatol-Verdaus

Mittels eines präparativen 15 % Trizingels wurden je 1500 µg BNPS-Skatol-verdaute [¹²⁵I]Iodoarylazidoprazosin-gekoppelte Gesamtmembranfraktionen elektrophoretisch aufgetrennt, die jeweilige Bande mit einem Skalpell aus dem feuchten Gel herausgeschnitten und in vorgesehene Einsätze für die Centricon-Röhrchen (Millipore) überführt. In einem Centricon-Eluter (Millipore) wurde das Protein aus dem Gel in die Röhrchen eluiert und mußte von dem in Laemmliepuffer enthaltenen SDS durch Waschschrte mit Tris-HCl befreit werden. Das eingeeigte und SDS-freie Proteinkonzentrat wurde 1:1 (w/v) mit Guanidin-HCl versetzt und vor dem Auftrag auf die HPLC mit TFA auf eine Endkonzentration von 0,1 % eingestellt, die dem Laufmittel A (0,1 % TFA) entsprach. Die HPLC-Aufreinigung wurde über eine Phenylsäule nach dem unter Kapitel 2.1.11 angegebenen BNPS-Gradienten vorgenommen.

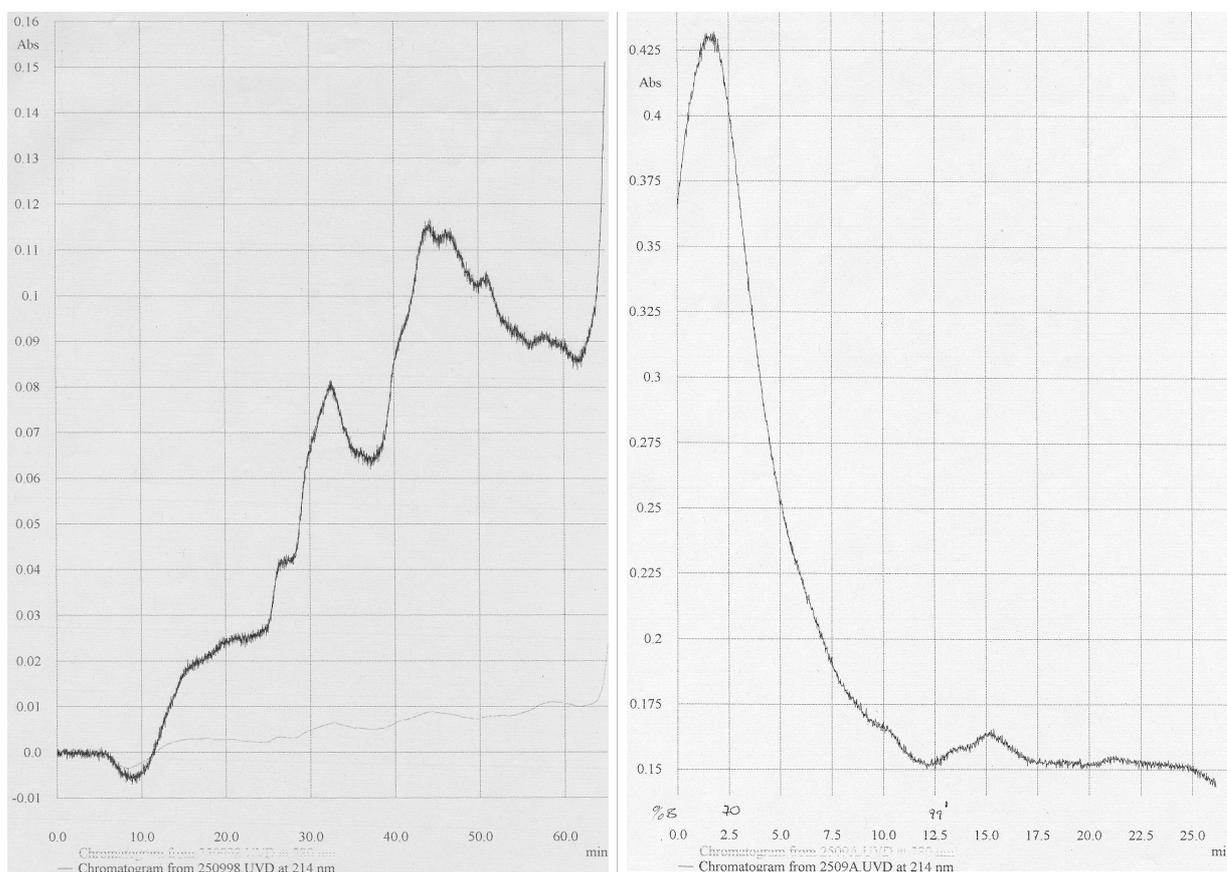


Abbildung 3-2: Elutionsprofil der Aufreinigung des ca. 8 kDa-Fragmentes über eine Phenylsäule.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Tryptophanspaltprodukte in einem 15 % Trizingel wurde die ca. 8 kDa große Bande mittels einer Phosphoimager-Platte detektiert, aus dem Gel eluiert und auf die Phenylsäule aufgetragen.

Die über die HPLC erhaltenen Fraktionen wurden zunächst anhand eines Compu Gamma Zähler auf die spezifische Aktivität überprüft. In den einzelnen Fraktionen befanden sich wie

erwartet mehrere Spaltfragmente. Durch die Komigration mußte daher eine weitere Aufreinigung vorgenommen werden. Die Proben wurden hierfür konzentriert, in Probenpuffer aufgenommen und auf ein 12 % Trizingel für eine weitere elektrophoretische Auftrennung aufgetragen. Das Protein wurde durch einen *Semi Dry Blot* auf eine PVDF-Membran übertragen, Coomassie-Blue gefärbt, mit einer Phosphoimagerauswertung überprüft und für einen eindeutigen Nachweis sequenziert.

Für die Edman-Sequenzierung ist eine freie N-terminale Aminogruppe notwendig, an die das Phenylisothiocyanat (PITC) gekoppelt werden kann. Erst nach dieser Kupplung kann die Sequenzierung erfolgen.

Nach den Sequenziersuchen der aufgereinigten HPLC-Fractionen stellte sich heraus, daß sowohl die A- als auch die B-Bande N-terminal blockiert waren. Lediglich von der ca. 8 kDa C-Bande konnte eine N-terminale Teilsequenz ermittelt werden.

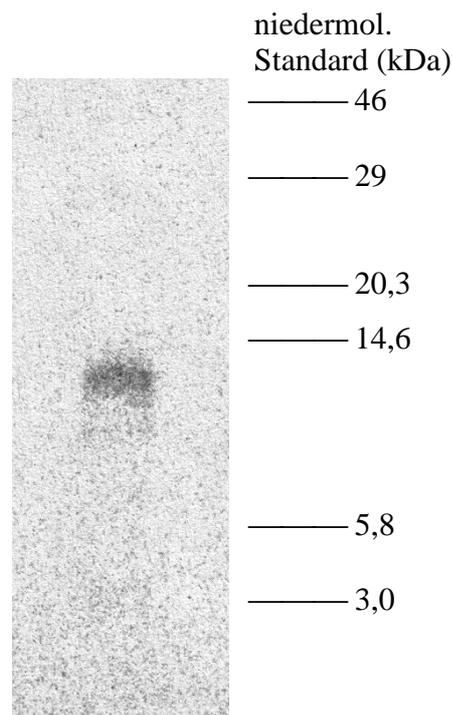


Abbildung 3-3: Aufreinigung der C-Bande über *Semi Dry Blot*. PVDF-Membran; Autoradiografie. Die über die HPLC erhaltene Fraktion mit spezifischer Aktivität wurde nach Aufkonzentration über ein 12 % Trizingel elektrophoretisch aufgetrennt und mit *Semi Dry Blot* auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde nach dem Transfer mit Coomassie Blue gefärbt und die aufgereinigte Probe anschließend von der Membran mittels Edman-Sequenzierung analysiert.

Sequenzierung der C-Bande :

A K I L S S F T D K E L Q A Y A K A

Anhand der vorliegenden Teilsequenz wird die spezifische chemische Spaltung des BNPS-Skatols bestätigt, da sich in der Primärsequenz vor dem Alanin ein Tryptophan befindet (Sequenz siehe Anhang). Bei dieser Sequenz handelt es sich um das Fragment 6 (Tabelle 3-1), das den AS-Bereich 230-312 umfaßt und eine Größe von 9,045 kDa besitzt. Dieses herausragende Ergebnis beweist, daß die zweite cytoplasmatische Schleife neben Iodomycin und Iodipin ebenfalls für Iodoarylazidoprazosin einen Substratbindungsbereich darstellt.

3.1.3 HPLC-Aufreinigung des Lys C-Verdaus

Die Endonuklease Lys C spaltet hinter Lysin und Glycin. Für die zum BNPS-Skatol-Verdau korrespondierenden Lys C-Fragmente, welche an identischer Position die Photobindung aufweisen, wurde die Nomenklatur der A- und B-Bande beibehalten.

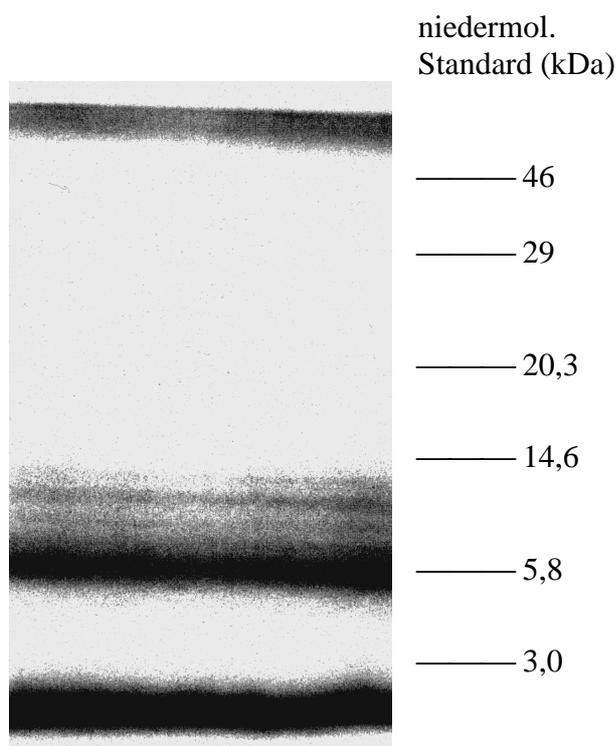


Abbildung 3-4: Lys C-Spaltung der mit Iodoarylazidoprazosin gekoppelten Gesamtmembranfraktion aus CHO B30-Zellen.

15 %Trizingel; Autoradiografie. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Spaltprodukte in einem 15 % Trizingel wurde die ca. 6 kDa große Bande mittels einer Phosphoimager-Platte detektiert, aus dem Gel eluiert und auf die Phenylsäule aufgetragen.

Ergebnisse

Anhand des enzymatischen Lys C-Spaltmusters sind zwei radioaktiv markierte Banden zu erkennen, die im Molekulargewichtsbereich von ca. 12 kDa und 6 kDa liegen. Eine Sequenzierung konnte auch nach diesem Verdau nicht direkt aus der Flüssigphase der Fraktionen durchgeführt werden, da wie beim BNPS-Skatol-Verdau die Komigration eine eindeutige Identifizierung der gesuchten substratgekoppelten AS-Sequenzen verhinderte. Die Lys C-verdauten Proben wurden wie beschrieben aufgereinigt und mittels eines HPLC-Laufes in ihre Peptide aufgetrennt. Um eine optimale Auftrennung der aus dem Verdau entstandenen Fragmente über eine Phenylsäule zu erhalten, mußte ein veränderter Gradient benutzt werden, der als Lys C-Gradient bezeichnet wurde.

Der HPLC-Gradient ergab nach Messung der Fraktionen zwei hochmarkierte Bereiche im Elutionsspektrum, die sich bei ca. 50 und ca. 85 % Laufmittel B (60 % Acetonitril, 20 % Isopropanol, 0,085 % TFA) befanden. Diese Fraktionen wurden ebenfalls über einen *Semi Dry Blot* aufgereinigt und sequenziert.

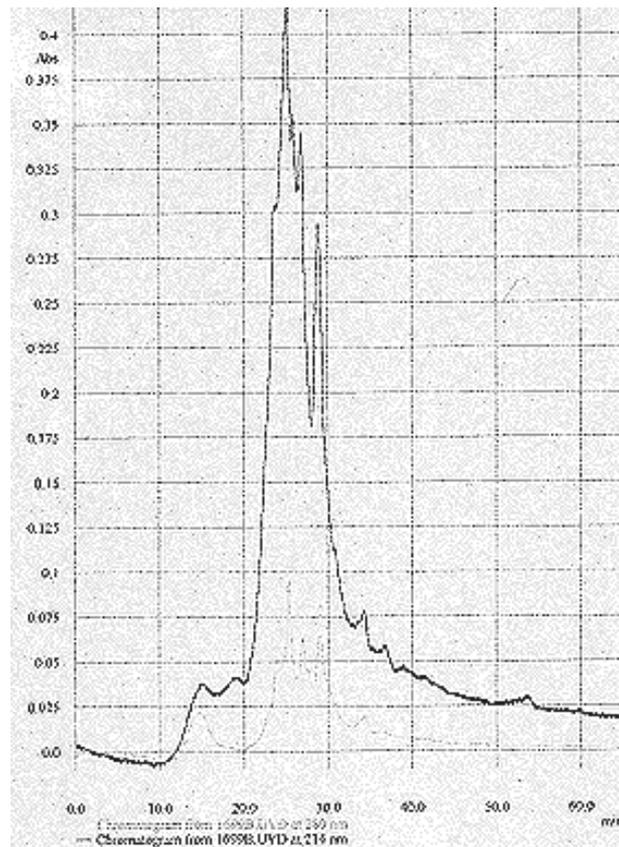


Abbildung 3-5: Elutionsprofil der Auftrennung des ca. 6 kDa-Fragmentes über eine Phenylsäule.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Spaltprodukte in einem 15 % Trizingel wurde die ca. 6 kDa große Bande mittels einer Phosphoimager-Platte detektiert, aus dem Gel eluiert und auf die Phenylsäule aufgetragen.

Aus dem Elutionsspektrum des HPLC-Verlaufes kann abgeleitet werden, daß es sich sowohl bei ca. 50 %, als auch bei ca. 85 % Laufmittel B um den ansteigenden und absteigenden Hauptpeak handelt. Anhand der nachfolgenden Sequenzierung wird ersichtlich, daß durch die HPLC-Aufreinigung die A- und B-Bande voneinander getrennt wurden.

Die Fraktion, die bei ca. 50 % Laufmittel B eine hohe Markierung zeigte, erwies sich laut BNPS-Skatol-Verdau als die gesuchte A-Bande.

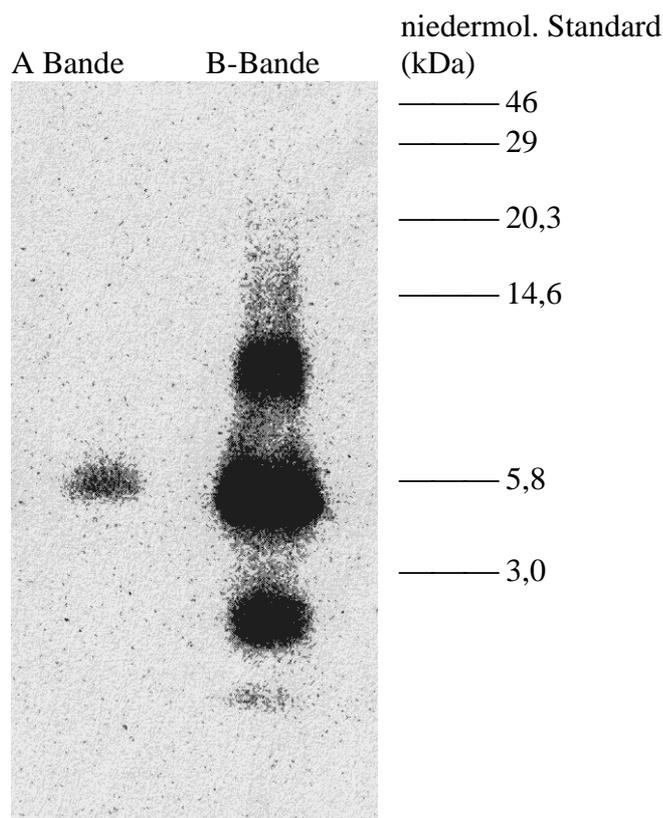


Abbildung 3-6: Aufreinigung der A- und B-Bande über *Semi Dry Blot*. PVDF-Membran; Autoradiografie. Die über die HPLC erhaltene Fraktion mit spezifischer Aktivität wurde nach Aufkonzentration über ein 12 % Trizingel elektrophoretisch aufgetrennt und mit *Semi Dry Blot* auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde nach dem Transfer mit Coomassie Blue gefärbt und die aufgereinigte Probe anschließend von der Membran mittels Edman-Sequenzierung analysiert.

Sequenzierung der A-Bande:

E A N I H Q F I E S L P

Die erhaltene AS-Teilsequenz befindet sich innerhalb des BNPS-Fragments 12 (Tabelle 3-1) und ist 18,810 kDa groß. Ausgehend von diesem BNPS-Skatol-Fragment konnte durch die

Spaltung mit Lys C der korrespondierende AS-Bereich, an dem das photoreaktive Iodoarylazidoprazosin bindet, weiter eingegrenzt werden. Die Spaltung erfolgte hinter Lysin innerhalb des AS-Bereiches 1106-1276 (Tabelle 3-1). Der Substratbindungsbereich muß daher innerhalb der AS 1148-1276 und somit hinter dem Walker A-Motiv der zweiten nukleotidbindenden Domäne liegen.

Bei der ca. 85 % Laufmittel B-Fraktion handelte es sich um die gesuchte B-Bande.

Sequenzierung der B-Bande:

R H D S N L F S L L F L

Die N-terminale Teilsequenz entspricht dem BNPS-Fragment 9 (Tabelle 3-1) mit einer Größe von 10,823 kDa. Auch hier konnte durch den Lys C-Verdau der zum BNPS-Skatol-Verdau korrespondierende AS-Bindungsbereich 706-800 weiter eingegrenzt werden. Die Lys C-Spaltung erfolgte ebenfalls hinter Lysin und grenzt daher die Substratbindung in dem AS-Bereich 746-800 ein. Dieser liegt in der dritten extrazellulären Schleife hinter TM 7 und reicht über TM 8 in die dritte cytoplasmatische Schleife hinein.

3.1.4 Trypsinverdau

Der milde Trypsinverdau nach Georges *et al.* [1991] ermöglicht durch die vorgegebenen Reaktionsbedingungen die selektive Zugänglichkeit des singulären Epitops innerhalb der Linkerregion des P-Glykoproteins. Hierdurch kann das P-Glykoprotein in N- und C-terminale Hälften gespalten werden. Die N-terminale Hälfte weist durch die Glykosilierung ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa auf, während die C-terminale Hälfte ca. 65 kDa groß ist.

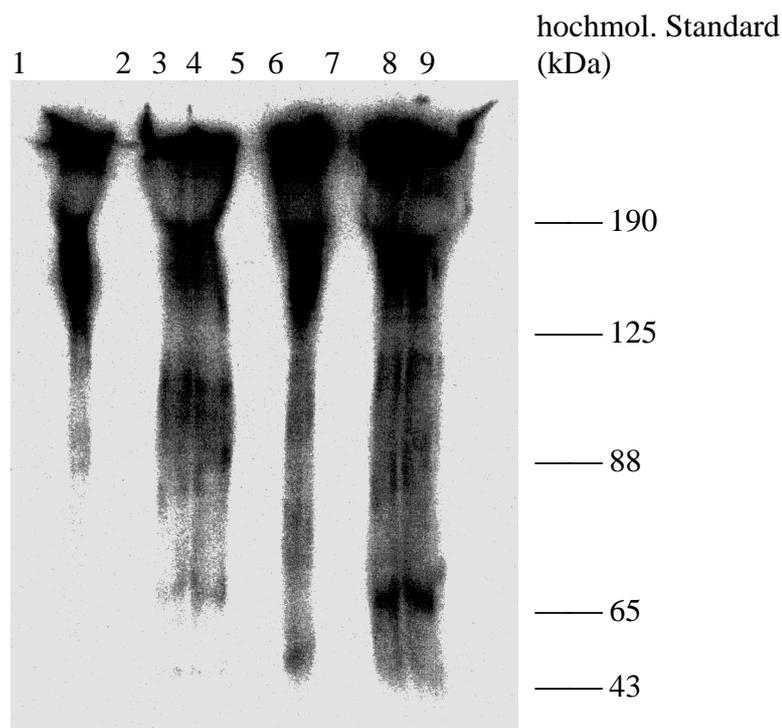


Abbildung 3-7: Trypsinverdau nach Georges *et al.* (1991) des mit Iodoarylazidoprazosin markierten P-Glykoproteins.

6 M Harnstoffgel; Autoradiografie

Spur 1: 50 µg Gesamtmembranfraktion mit Iodomycin gekoppelt

Spur 3 +4: 50 µg Gesamtmembranfraktion mit Iodomycin gekoppelt und anschließend mit Trypsin verdaut.

Spur 6: 75 µg Gesamtmembranfraktion mit Iodoarylazidoprazosin gekoppelt

Spur 8+9: 75 µg Gesamtmembranfraktion mit Iodoarylazidoprazosin gekoppelt und anschließend mit Trypsin verdaut.

Mit diesem Verdau kann eine grobe Lokalisierung der Substratbindungsstellen vorgenommen werden. Die Kontrolle mit Iodomycin-markierter Gesamtmembranfraktion zeigt nach Trypsinverdau einen Hauptbindungsbereich in der N-terminalen Hälfte und einen gering markierten Nebenbindungsbereich in der C-terminalen Hälfte [Demmer *et al.*, 1997].

Für mit Iodoarylazidoprazosin-markierter Gesamtmembranfraktion konnte jedoch keine definierte Aussage getroffen werden. Dieses Ergebnis deutet auf eine Unzugänglichkeit des singulären Epitops im photomarkierten P-Glykoprotein hin.

3.2 Herstellung und Charakterisierung von polyklonalen Antikörpern

Die zweite cytoplasmatische Schleife zwischen TM 4 und TM 5 hat eine große Bedeutung für die Aktivität des ABC-Transporters P-Glykoprotein. In diesem Bereich (AS 230-312) binden die drei strukturell unterschiedlichen Substrate Iodomycin, Iodipin [Demmer *et al.*, 1997,

1999] und Iodoarylazidoprazosin. Zusätzlich befindet sich in diesem Bereich eine für ABC-Transporter konservierte Region, die als EAA- oder EAA-ähnliches Motiv bezeichnet wird. Bei bakteriellen Transportern wurde eine Interaktion des 20 AS umfassenden EAA-Motives mit der nahegelegenen nukleotidbindenden Domäne gezeigt [Mourez *et al.*, 1997]. Der Austausch des zentralen Glycins innerhalb dieses EAA-Motives bewirkte einen kompletten Verlust der Transporterfunktion [Koster *et al.*, 1992]. Die Funktion des eukaryontischen EAA-ähnlichen Motives ist jedoch noch nicht geklärt [Loo und Clarke, 1995].

Dieser Bereich sollte mittels eines dafür hergestellten polyklonalen Antikörpers untersucht werden, der im weiteren die Bezeichnung **KDI 3541** erhalten hat. Hierbei handelt es sich um einen huMDR1-Peptidantikörper (Bioscience, Göttingen), der aus 15 Aminosäuren der zweiten cytoplasmatischen Schleife im Bereich des EAA-ähnlichen Motives besteht.

In der Literatur herrscht keine Einigkeit über die Lokalisation der zweiten cytoplasmatischen Schleife. Es wurden zwei unterschiedliche Topologiemodelle beschrieben, von denen eines von einer intrazellulären Lage ausgeht, das zweite jedoch von einer extrazellulären.

Da es für den Bereich der zweiten cytoplasmatischen Schleife keinen huMDR1-Antikörper gibt, wurde für die Herstellung dieses polyklonalen Antikörpers der identische Aminosäurebereich 241-289 (=144 bp) nach einer Veröffentlichung von Zhang *et al.* [1996] gewählt, der für die Herstellung von Hamster pgp1-Antikörper verwendet wurde. Mit diesem humanem MDR1 polyklonalen Antikörper sollte die vorliegende Zellkultur und das umstrittene Topologiemodell überprüft werden. Aufgrund der vorliegenden Nomenklatur von Zhang wurde dieser Antikörper als **α MDR-L4** bezeichnet. Da Peptide in der Größenordnung des EAA-ähnlichen Motives (15 AS) über Fusionsproteine schwer aufzureinigen sind, wurden zwei polyklonale Antikörper gegen die zweite cytoplasmatische Schleife hergestellt. Synthetisch hergestellte Peptide in dieser Größe könnten in der Tertiärstruktur jedoch Unterschiede zu Peptiden mit längerer Aminosäuresequenz aufweisen.

3.2.1 PCR-Expressionsklonierung von **α MDR-L4**

Die huMDR1-Teilsequenz wurde durch spezifisch synthetisierte Oligonukleotide in die *multiple cloning site* des pGEX4T1-Vektors ligiert. Diese Oligonukleotide ermöglichten die Einführung von Schnittstellen für bestimmte Restriktionsendonukleasen, die durch überhängende Enden an der huMDR1-Teilsequenz und dem Vektor eine am Leseraster ausgerichtete Ligation ermöglichten.

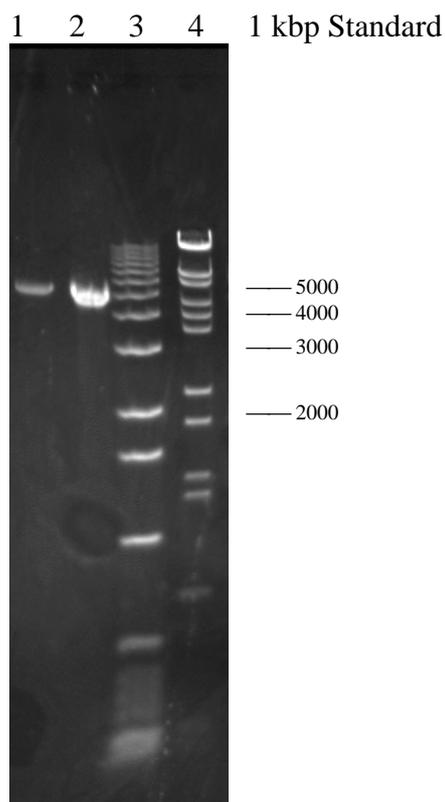


Abbildung 3-8: Restriktionsverdau des pGEX4T1-Vektors mit *Bam*HI und *Xho*I.
1 % Agarosegel
Spur 1: pGEX4T1 mit *Bam*HI und *Xho*I verdaut.
Spur 2: pGEX4T1 mit *Bam*HI und *Xho*I verdaut.
Spur 3: 1 kbp Standard
Spur 4: λ *BstE* II

Die Abbildung 3-8 zeigt das Foto eines Agarosegels, auf dem ein Restriktionsverdau des pGEX4T1-Vektors (Rahmen) mit *Bam*HI und *Xho*I aufgetragen und somit einer Qualitätskontrolle unterzogen wurde. Das Originalplasmid pGEX4T1 ist 4969 bp groß. Nach Verdau mit *Bam*HI und *Xho*I wurden 20 bp herausgeschnitten, die durch elektrophoretische Auftrennung über ein Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht werden konnten.

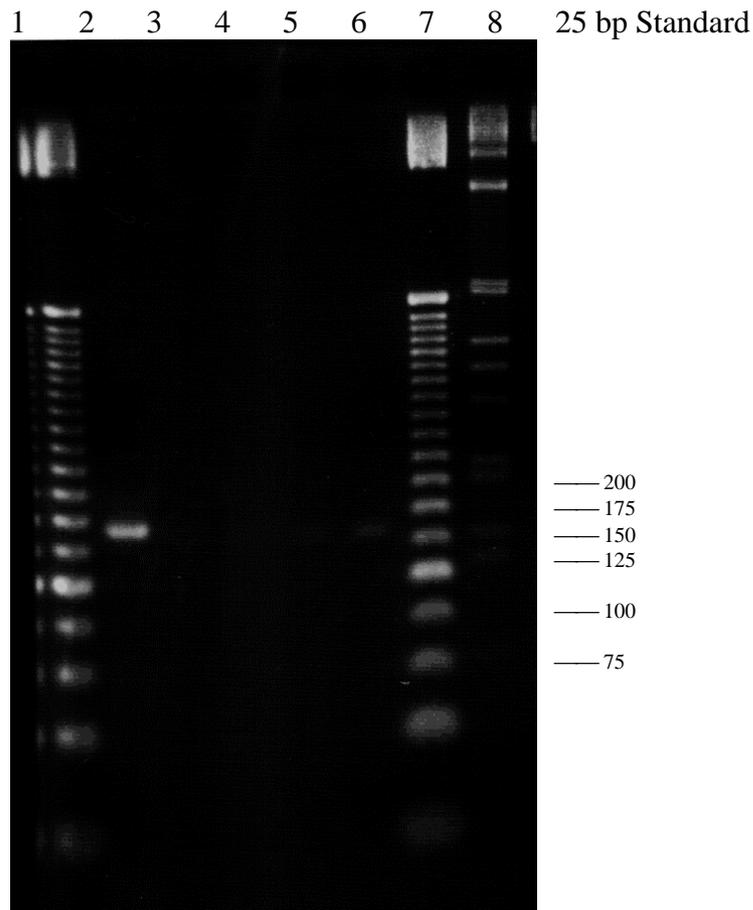


Abbildung 3-9: PCR-Produkt der *MDR1*-Teilsequenz (Insert)
3 % Agarosegel.
Spur 1: 25 bp Standard
Spur 2: Insert vor Verdau mit *Bam*HI / *Xho*I
Spur 3: Insert verdaut mit *Bam*HI / *Xho*I 0,5 μ l
Spur 4: Insert verdaut mit *Bam*HI / *Xho*I 1 μ l
Spur 5: Insert verdaut mit *Bam*HI / *Xho*I 2 μ l
Spur 6: Insert verdaut mit *Bam*HI / *Xho*I 4 μ l
Spur 7: 25 bp Standard
Spur 8: 1 kbp Standard

Die mit PCR aus der huMDR1-Sequenz amplifizierte Teilsequenz wurde vor dem Ligationsansatz ebenfalls mittels Agarosegelelektrophorese auf seine Größe von 167 bp überprüft.

Anschließend wurde dieser Ligationsansatz über Elektroporation in den *E.coli*-Stamm DH5 α transformiert. Die Identifizierung der positiven Klone erfolgte über Kolonie-PCR.

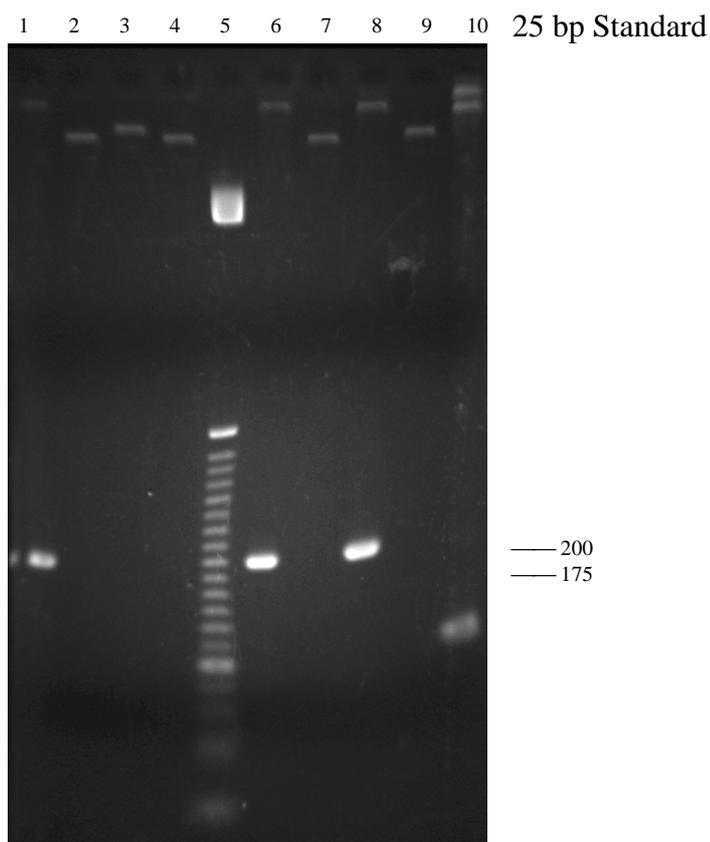


Abbildung 3-10: Kolonie-PCR-Überprüfung.

Spur 1: Klon 1
 Spur 2: Klon 2
 Spur 3: Klon 3
 Spur 4: 25 bp Standard
 Spur 5: Klon 4;
 Spur 6: Klon 5
 Spur 7: Klon 6
 Spur 8: Klon 7
 Spur 9: Klon 8
 Spur 10: pGEX4T1-Vektor

In Abbildung 3-10 erkennt man in den Spuren 1,6 und 8 Banden, woraus geschlossen werden konnte, daß lediglich drei Klone die Fremd-DNA (positive Klone) aufgenommen hatten.

3.2.2 Proteinexpression der positiven Klone

Die heterologe Überexpression des GST-Fusionsproteins wurde in *E. coli* (DH5 α) durchgeführt. Durch Zugabe von IPTG während der logarithmischen Wachstumsphase erfolgte - durch Anlagerung an den p_{tac} -Promotor - die Induktion der Proteinexpression. Zur Induktionsüberprüfung wurden von den einzelnen positiven Klonen vor und nach Zugabe von IPTG ein Aliquot mittels eines 15 % Acrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Blue gefärbt.

Ergebnisse

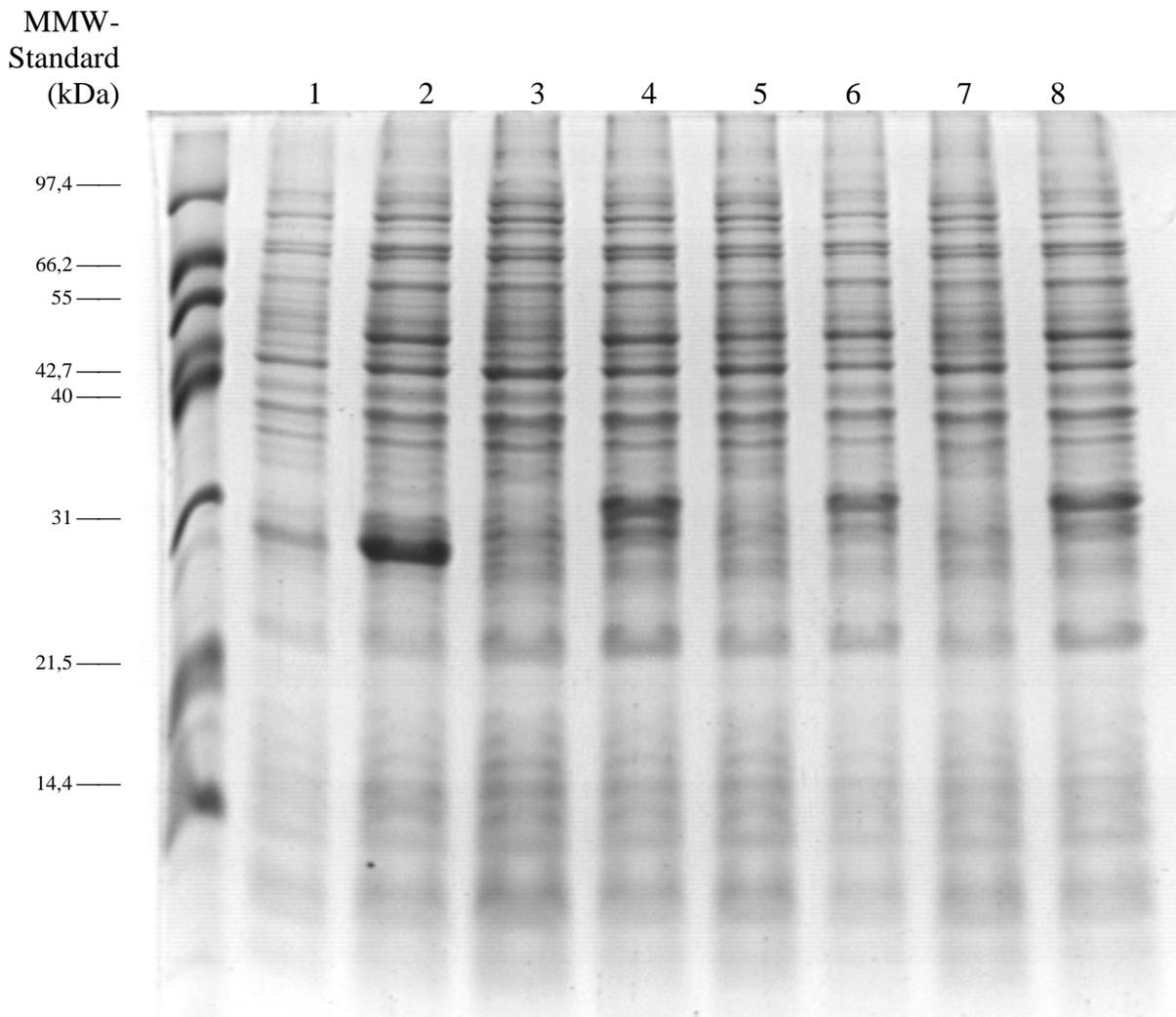


Abbildung 3-11: Induktion der Proteinexpression mit IPTG.
15 % Acrylamidgel; Coomassie Blue gefärbt.

Spur	Probe	IPTG-Zugabe	Wachstum/Stunden
1	pGEX4T	-	2
2	PGEX4T	+	4
3	Klon 1	-	2
4	Klon 1	+	4
5	Klon 5	-	2
6	Klon 5	+	4
7	Klon 7	-	2
8	Klon 7	+	4

Es ist zu erkennen, daß alle drei Klone nach IPTG-Zugabe (Spur 4, 6, 8) das gewünschte Protein exprimieren. Klon 7 wurde für die weitere Aufarbeitung des GST-Fusionsproteins ausgewählt.

3.2.3 Aufarbeitung des Fusionsproteins und Thrombinspaltung

Von Klon 7 wurde eine 1000 ml Übernachtskultur angelegt und die Proteinexpression mit IPTG induziert. Hiernach betrug die Ausbeute an Biofeuchtmasse ca. 2-3 g, wovon ca. 500 µg das GST-Fusionsprotein darstellten. Der Versuch, das P-Glykoprotein-Teilfragment über Thrombinspaltung von dem an der Sepharose4B spezifisch gekoppelten GST-Fusionsproteins abzutrennen, erwies sich als unzureichend.

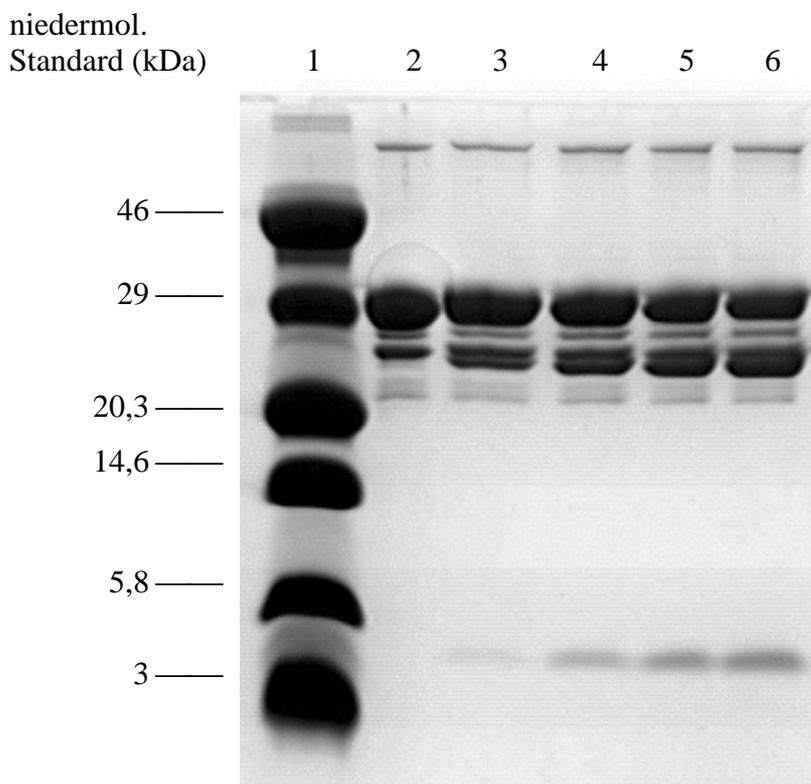


Abbildung 3-12: Thrombinspaltung des P-Glykoprotein-Teilfragments (ca. 4 kDa) von dem spezifisch an Sepharose4B gekoppelten GST-Fusionsprotein (ca. 29 kDa).

Spur 1: niedermolekulare Standard
 Spur 2: GST-Fusionsprotein
 Spur 3: Thrombinspaltung 1 Stunde
 Spur 4: Thrombinspaltung 2 Stunden
 Spur 5: Thrombinspaltung 3 Stunden
 Spur 6: Thrombinspaltung 4 Stunden

Da die Teilfragment-Ausbeute für eine Immunisierung nicht ausreichend war, wie auf der Abbildung 3-12 zu erkennen ist, wurde das gesamte GST-Fusionsprotein verwendet.

Ergebnisse

Hierfür wurde zunächst das GST-Fusionsprotein durch Affinitätschromatographie an einer mit Gluthation konjugierten Sepharose4B-Säule aufgereinigt. Nach der Elution des GST-Fusionsproteins von der Sepharose4B wurden die Fraktionen mit dem höchsten Proteinanteil (Fraktion 2, 3, 4) mittels eines präparativen SDS-Gels elektrophoretisch aufgetrennt, mit 0,3 M CuCl₂ negativ gefärbt und die aufgereinigte Proteinbande mittels Elution und Dialyse für die Immunisierung aufbereitet.

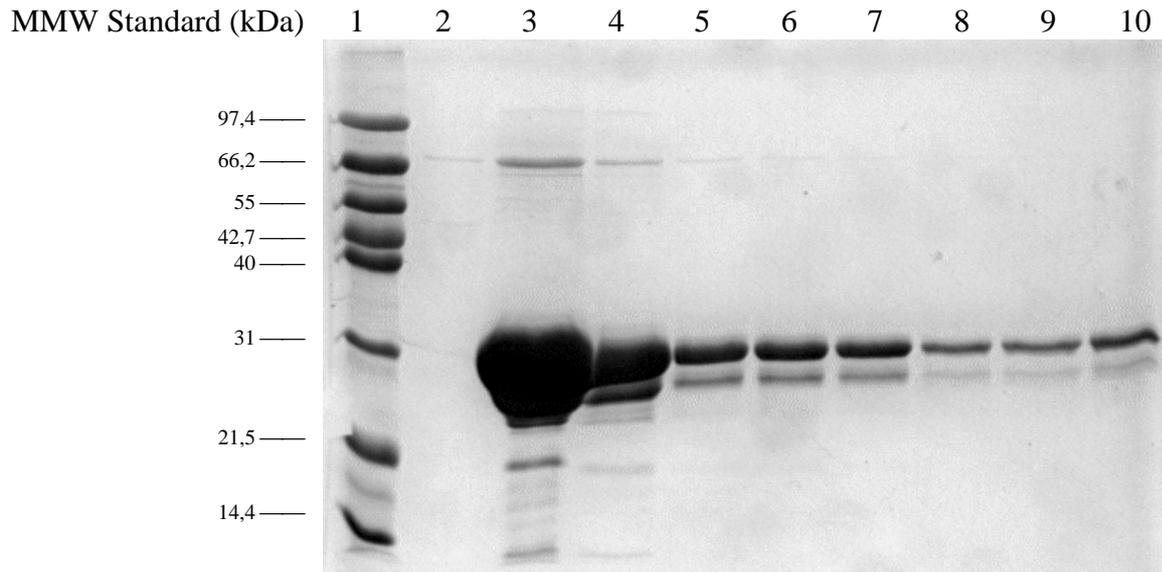


Abbildung 3-13: Elutionsprofil des aufgereinigtem GST-Fusionsproteins von der Sepharose4B.

Spur 1: MMW Standard

Spur 3-10: Elution des GST-Fusionsproteins.

Somit wurden aufgetrennte Nebenbanden entfernt und damit lediglich das gewünschte Fusionsprotein injiziert. Dieses war notwendig, da bei verunreinigtem Antigen mehr unspezifische Antikörper gebildet werden, die die Immunpräzipitierung des Substrates erschweren oder unmöglich machen.

3.2.4 Überprüfung der Antikörperspezifität

Durch Verdrängungsexperimente wurde der Antikörper α MDR-L4 auf seine Spezifität überprüft. Hierfür wurden zunächst beide Seren mit 100 ng und 1 μ g aufgereinigtem GST-Fusionsprotein für 1 Std. vorinkubiert, bevor der Immunoblot durchgeführt wurde. Auf die Nitrocellulosemembran wurde 100 ng GST-Fusionsprotein in 1:10 Verdünnungen aufgetragen.

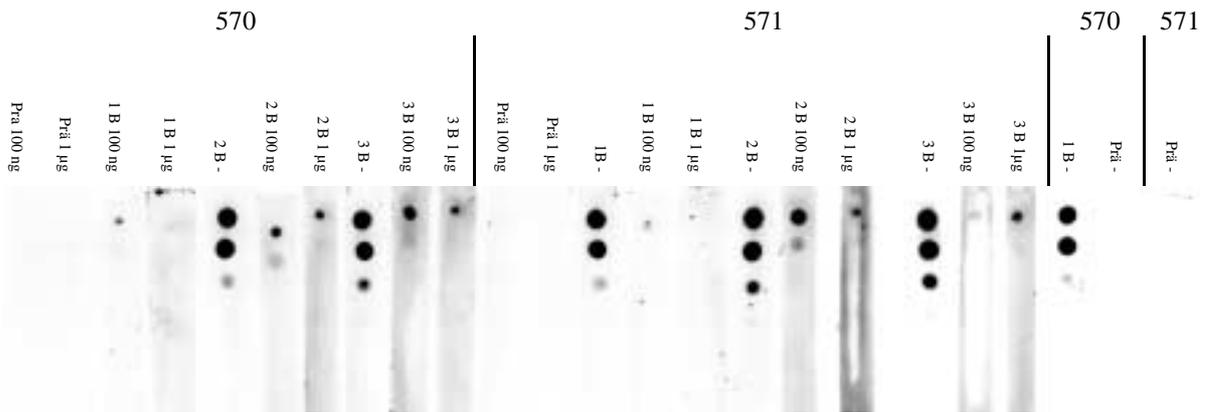


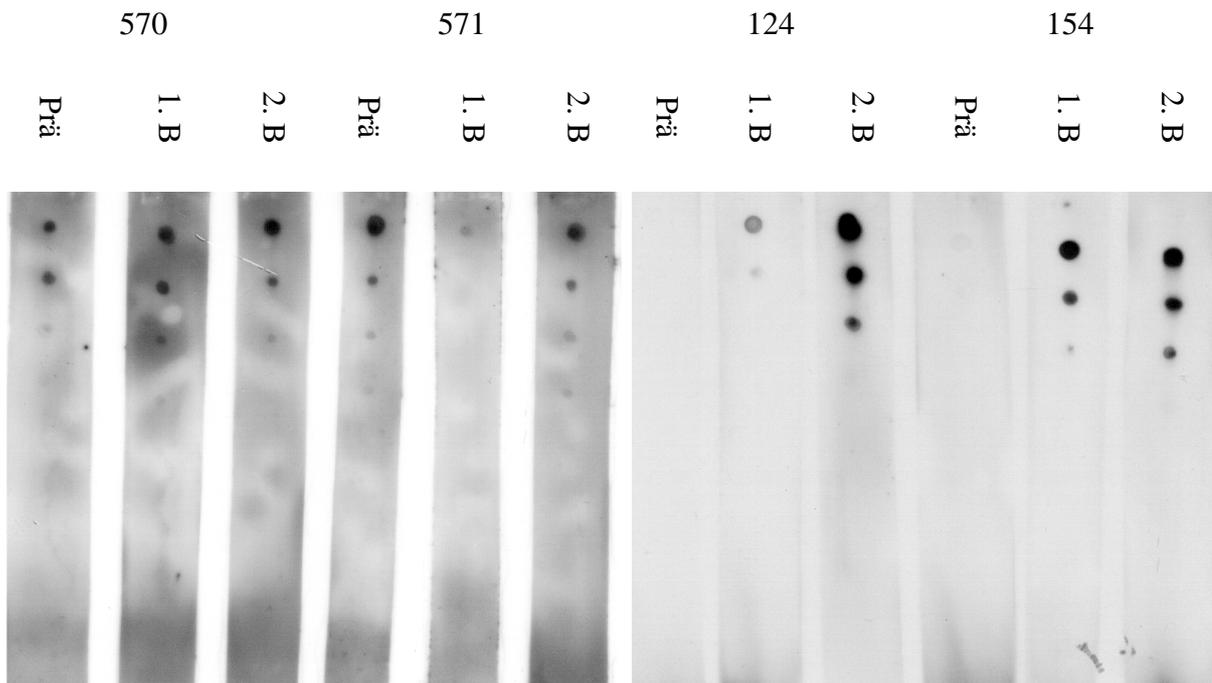
Abbildung 3-14: Verdrängungstitration des hergestellten Antikörpers (α MDR-L4) mit 100ng bzw. 1 μ g GST-Fusionsprotein.

Prä= Präimmunserum; 1 B= erste *Boosterung*; 2 B= zweite *Boosterung*; 3 B= dritte *Boosterung*;

570 und 571= Seren des Antikörpers α MDR-L4 aus zwei Kaninchen

Das GST-Fusionsprotein wurde in abfallenden Zehnerpotenzen, beginnend mit 100 ng von oben nach unten, auf die Nitrocellulosemembran aufgetragen.

Die hergestellten Antikörper (3. *Boosterung*) wiesen ohne Vorinkubation eine Spezifität von bis zu 1 ng, mit Vorinkubation von 1 μ g Protein eine Spezifität von 100 ng auf.



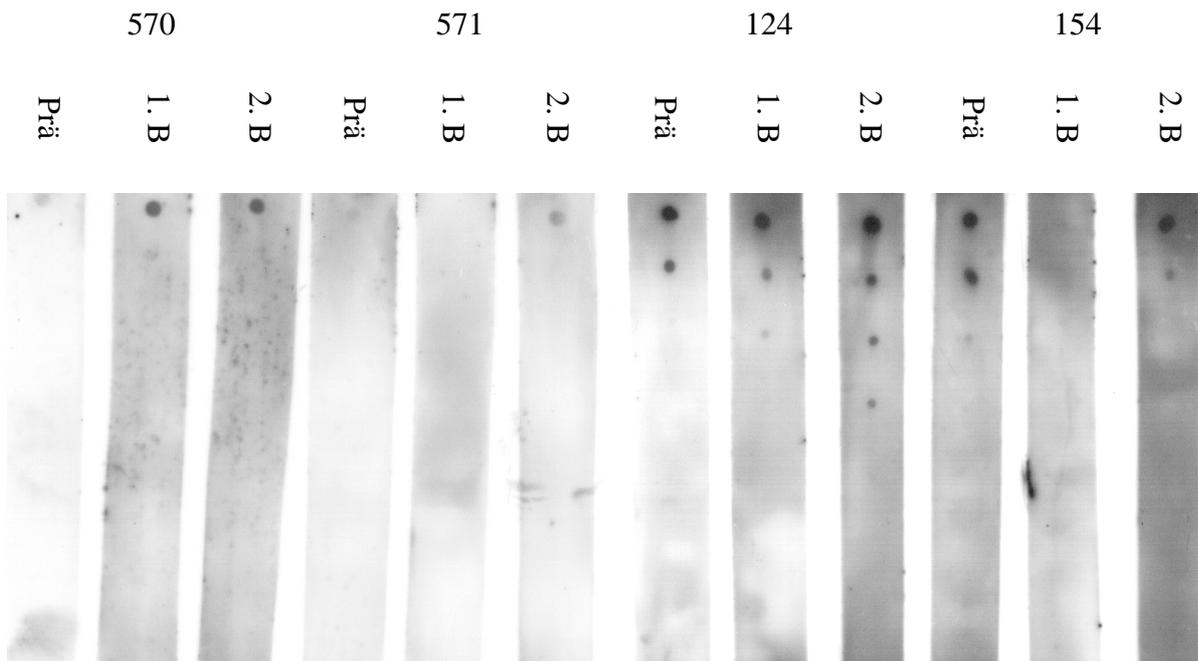


Abbildung 3-15: Überprüfung der Intensitätssteigerung der einzelnen Seren nach den Boosterungen.

Prä= Präimmunserum; 1 B= erste *Boosterung*; 2 B= zweite *Boosterung*;
570 und 571= Seren des Antikörpers α MDR-L4 aus zwei Kaninchen.
124 und 154= Seren des Antikörpers KDI 3541 aus zwei Kaninchen.
Das GST-Fusionsprotein wurde in abfallenden Zehnerpotenzen, beginnend mit 100 ng von oben nach unten, auf die Nitrocellulosemembran aufgetragen.

Auch eine Intensitätssteigerung nach den einzelnen *Boosterungen* ist zu verzeichnen (Abbildung 3-15). Von einer Antikörperspezifität kann durch die vorgenommene Verdrängungstitration ausgegangen werden.

Die Spezifität, ob die Antikörper das gesuchte P-Glykoprotein erkennen, oder unspezifisch innerhalb der Zelle binden, wurde mittels Western-Blot überprüft. Hierfür wurden neben den Membranpräparationen auch Zellysate der zu untersuchenden Zelllinien wt250 und C3000 (Kap. 3.6) hergestellt und über ein 6 M Harnstoffgel elektrophoretisch aufgetrennt. Zu den auf eine Nitrocellulosemembran geblotteten Proteinen wurden die Antikörperseren in einer 1:400 Konzentration inkubiert.

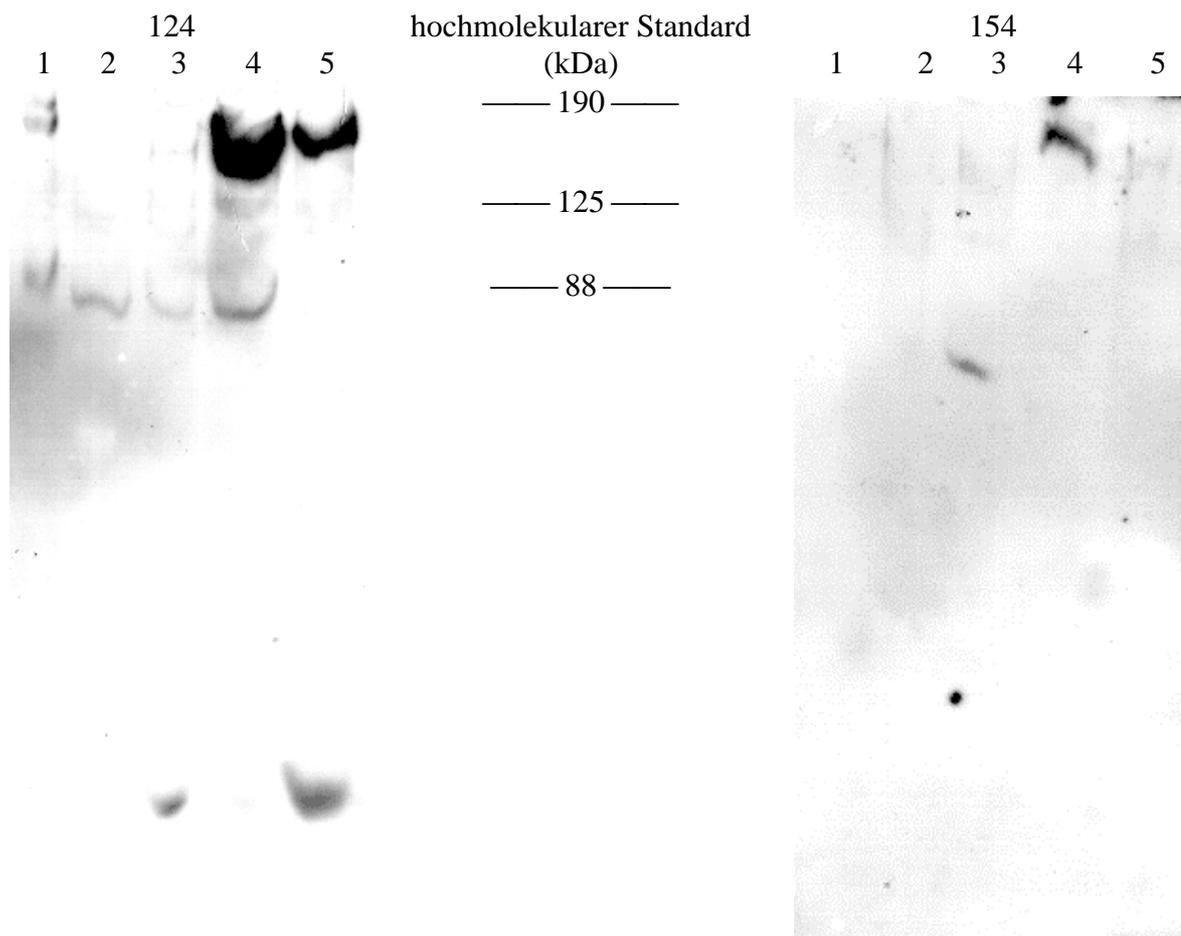


Abbildung 3-16: Immunowesternblot der human MDR1 transfizierten NIH3T3-Zelllinien mit dem hergestellten polyklonalen Antikörpern KDI 3541

- Spur 1: NIH3T3 Negativkontrolle.
- Spur 2: Zellysat wt250.
- Spur 3: Zellysat C3000.
- Spur 4: wt250-Gesamtmembranfraktion.
- Spur 5: C3000-Gesamtmembranfraktion.

In den Zellysaten der wt250, C3000 Zelllinie sowie in der NIH3T3-Membranpräparation weist der hergestellte Peptidantikörper KDI 3541 (Abbildung 3-16) leichte Kreuzreaktivität auf. Die höhere Sensitivität zeigt dieser Antikörper jedoch bei dem in den Membranpräparationen enthaltenen P-Glykoprotein der wt250- und C3000-Zelllinie. Auffallend ist die Signalstärke, die bei wt250 wesentlich höher ist als bei der resistenteren C3000-Zelllinie. Im Gegensatz zu dem Serum 154 hat das Serum 124 die stärkere Sensitivität – die Befunde sind jedoch vergleichbar.

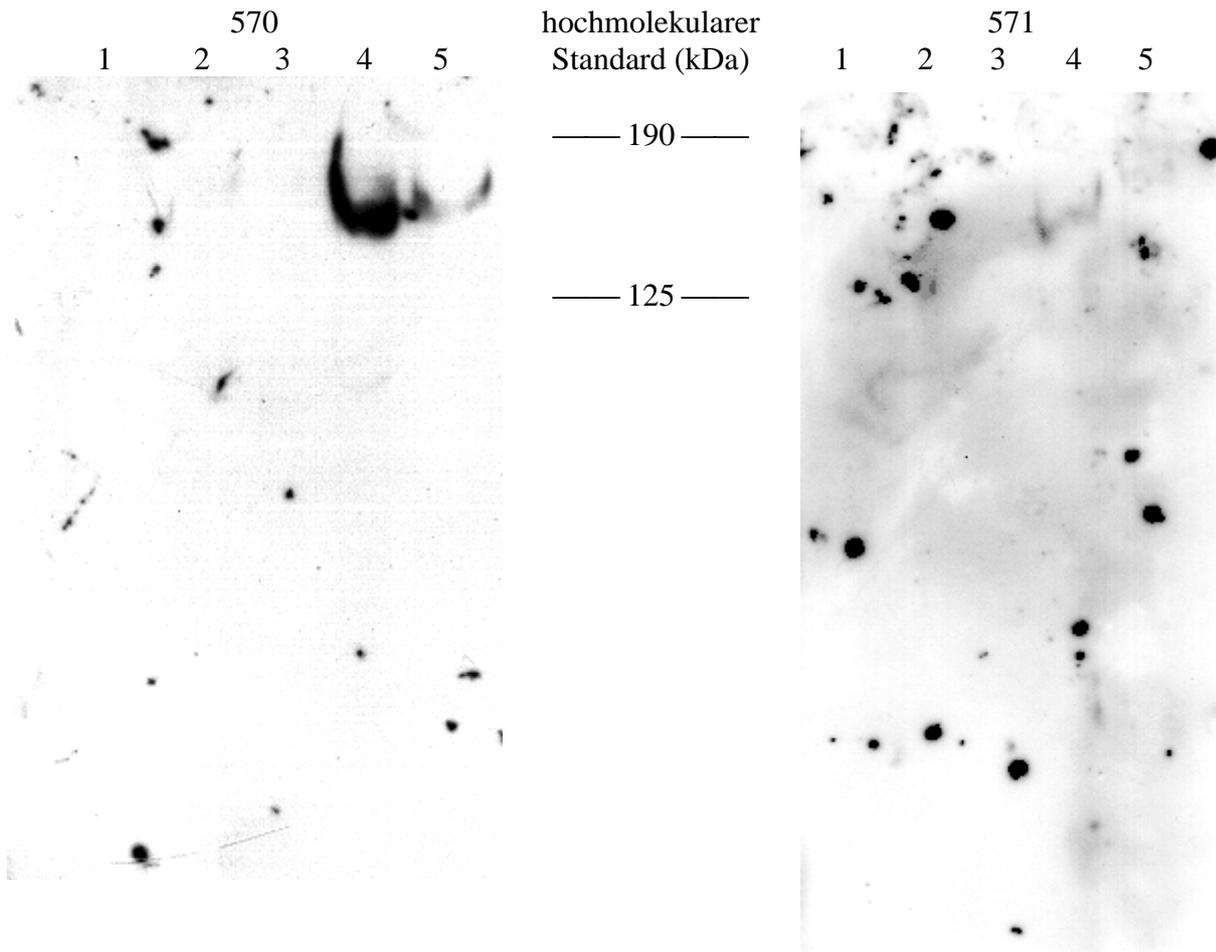


Abbildung 3-17: Immunowesternblot der human MDR1 transfizierten NIH3T3-Zelllinien mit dem hergestellten polyklonalen Antikörpern α MDR-L4

- Spur 1: NIH3T3 Negativkontrolle.
- Spur 2: Zellysat wt250.
- Spur 3: Zellysat C3000.
- Spur 4: wt250-Gesamtmembranfraktion.
- Spur 5: C3000-Gesamtmembranfraktion.

Der auf Abbildung 3-17 dargestellte α MDR-L4 Fusionsproteinantikörper erkennt wie gewünscht lediglich in den Membranpräparationen von wt250 und C3000 das gesuchte P-Glykoprotein. Wie schon bei dem KDI 3541 ist auch hier ein stärkeres Signal bei der wt250-Zelllinie zu verzeichnen. Das Serum 570 zeigt gegenüber dem Serum 571 die eindeutigeren Signale.

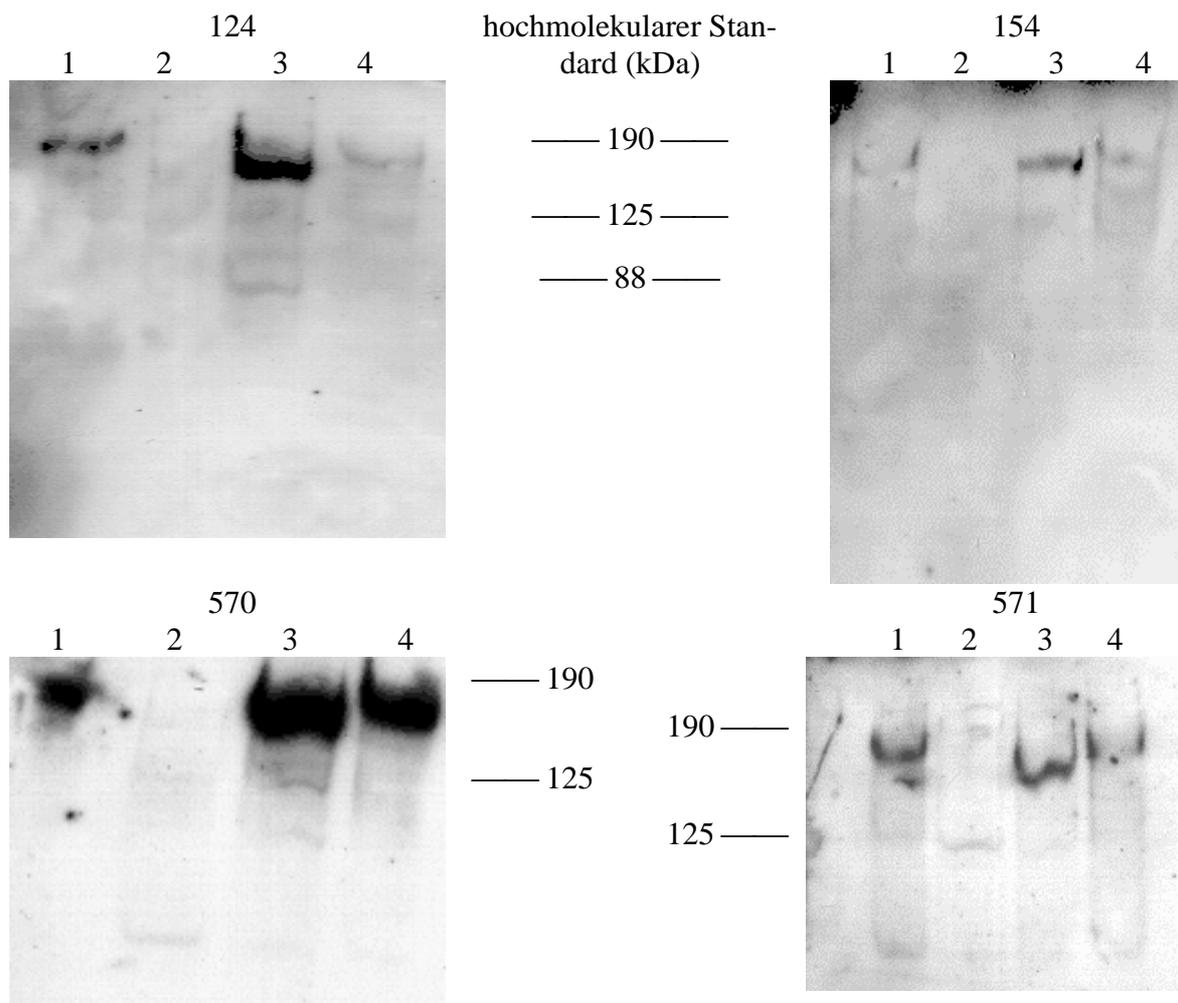


Abbildung 3-18: Immunowesternblot der human MDR1 transfizierten NIH3T3-Zelllinien mit den hergestellten polyklonalen Antikörpern KDI 3541 und MDR-L4

Spur 1: B30-Gesamtzellmembranfraktion
 Spur 2: NIH3T3-Gesamtzellmembranfraktion
 Spur 3: wt250-Gesamtzellmembranfraktion
 Spur 4: C3000-Gesamtzellmembranfraktion

Die Überprüfung auf Humanspezifität deutet darauf hin, daß die beiden Antikörper KDI 3541 und α MDR-L4 ebenfalls das in CHO B30-Zellen enthaltene Hamster pgp1 erkennen. Das Serum 124 des Antikörpers KDI 3541 erkennt das humane MDR1 der wt250-Zellen stärker als das der C3000-Zelllinie oder das Hamster pgp1 (Abbildung 3-18). Auch wenn die Sensitivität des Serums 154 nicht so hoch ist, handelt es sich um vergleichbare Befunde.

Bei den Seren 570 und 571 des Antikörpers α MDR-L4 ist kein Unterschied zwischen dem humanen MDR1 der wt250- und dem Hamster pgp1 der CHO B30-Zelllinie vorhanden (Abbildung 3-18). Jedoch ist eine Signalabstufung bei dem Serum 571 zwischen dem Hamster pgp1 und dem humanem MDR1 der wt250-Zelllinie im Gegensatz zu der C3000-Zelllinie zu erkennen. Die C3000-Zelllinie wird schwächer erkannt.

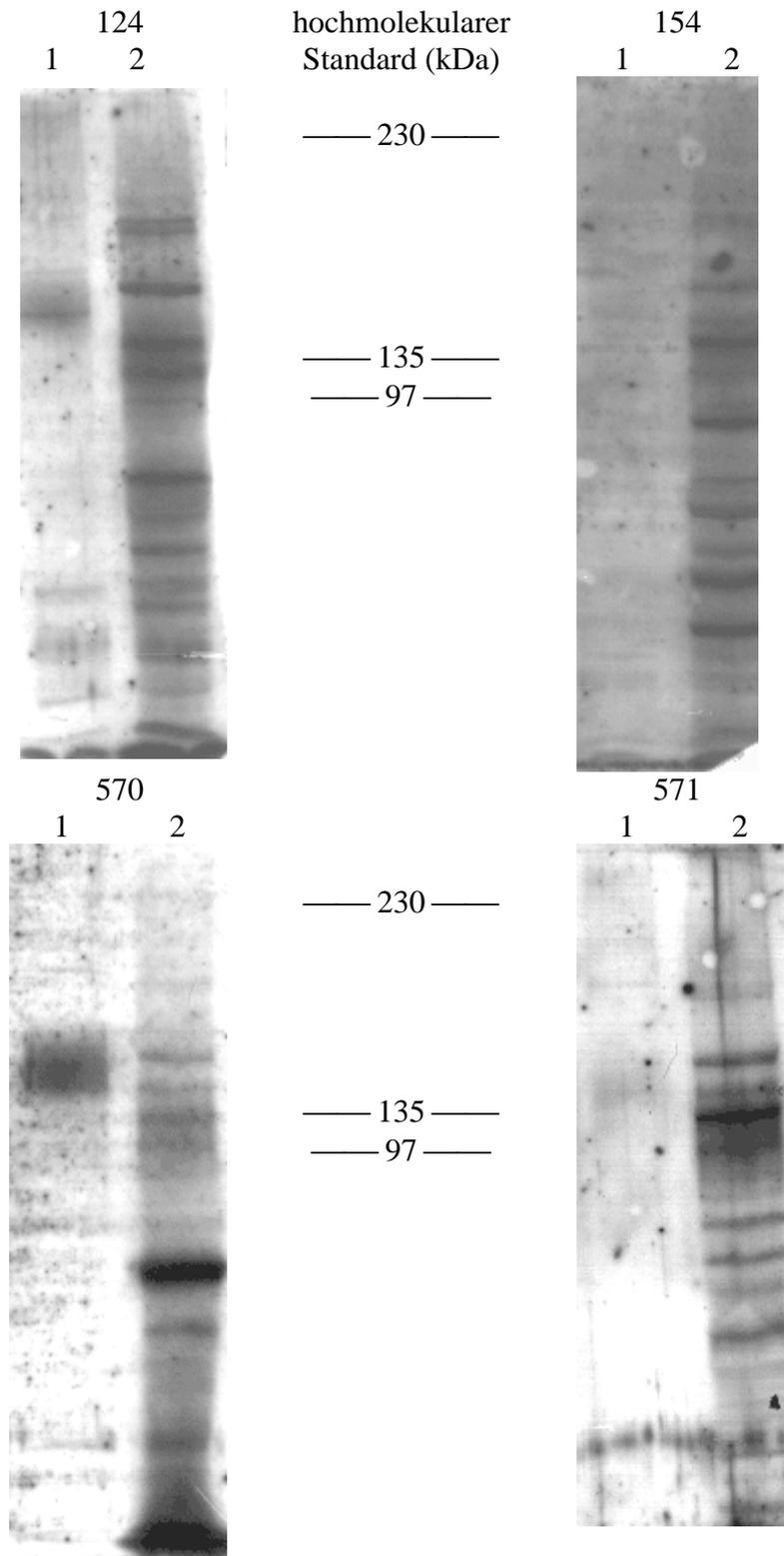


Abbildung 3-19: Immunowesternblot der human MDR1 transfizierten NIH3T3-Zelllinien mit den hergestellten polyklonalen Antikörpern KDI 3541 und α MDR-L4
Spur 1: CHO B30-Gesamtzellmembranfraktion
Spur 2: Maudarm-Gesamtmembranfraktion

Auf der Abbildung 3-19 wird die Überprüfung der Antikörper gegen Maus mdr1 gezeigt. Beide Antikörper erkennen ebenfalls das mdr1 aus Maudarm. Da es sich hierbei um keine

Zellkultur, sondern um Gewebeaufarbeitung handelt, sind mehrere Nebenbanden zu erkennen. Diese Nebenbanden werden von den Antikörpern unterschiedlich erkannt.

3.2.5 Topologieüberprüfung im FACS

In dem von Zhang aufgestellten Topologiemodell wurde mit Antikörpern die zweite cytoplasmatische Schleife extrazellulär lokalisiert. Mittels der hergestellten Antikörper gegen humanes MDR1 sollte die vorliegende Zellkultur (Kap. 3.6) auf dieses Modell überprüft werden. Die nicht transfizierten Mausfibroblasten wurden bei dieser Analyse als Negativkontrolle genutzt.

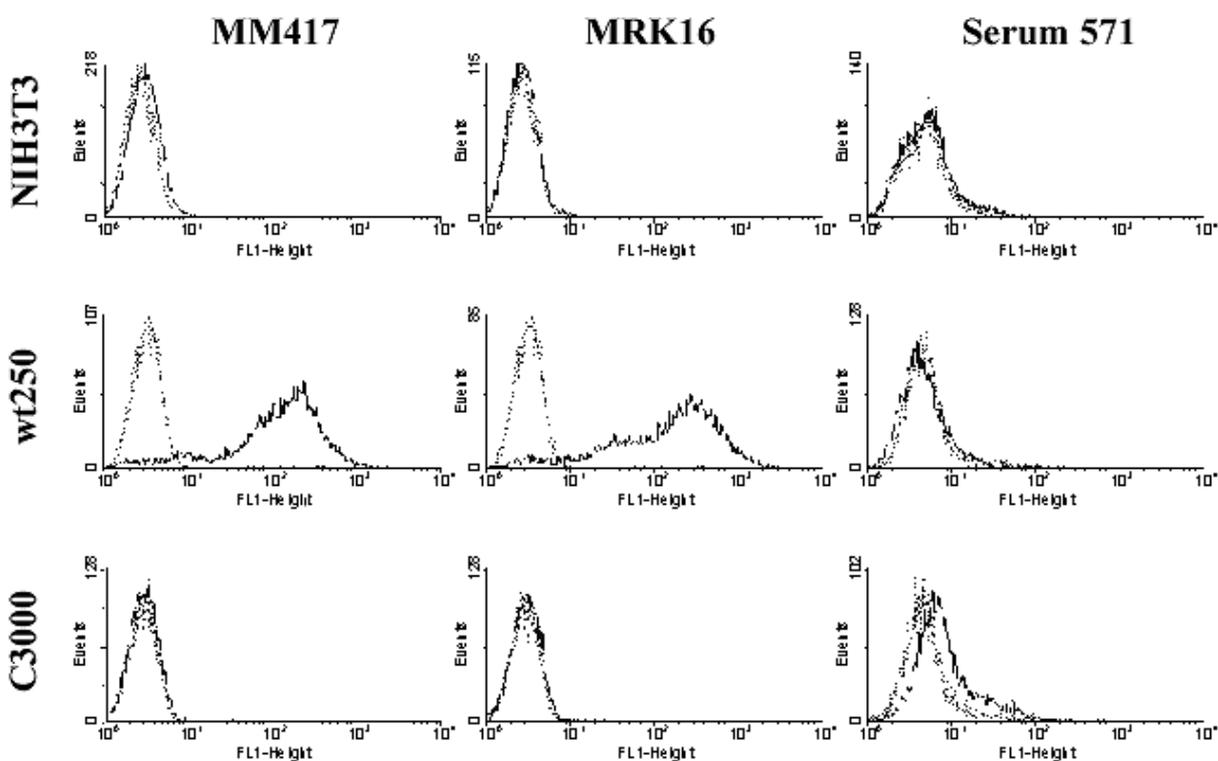


Abbildung 3-20: Überprüfung der human MDR1 transfizierten NIH3T3-Zelllinien im extrazellulären FACS mit dem hergestellten polyklonalen α MDR-L4 und den anti-human Antikörpern MRK16 sowie MM 4.17.

..... = Isotypkontrolle IgG2a / Prämunisum
 — = Antikörpersignale

Als Kontrolle wurden die anti-human MDR1 Antikörper MM4.17 und MRK16 gewählt und mit der Isotypkontrolle IgG2a verglichen. Der MRK16 besitzt ein zusammengesetztes Epitop, welches die extrazellulären Schleifen 1 (TM 1-2) und 4 (TM 7-8) beinhaltet. Das lineare Epitop des MM4.17 weist zu dem MRK16 Homologien in der Aminosäuresequenz der vierten extrazellulären Schleife auf. Während beide Antikörper im extrazellulären FACS ein spezifi-

ches Signal bei der wt250-Zelllinie aufweisen, ist das Epitop bei der C3000-Zelllinie nicht mehr zugänglich oder wie bei der NIH3T3-Zelllinie nicht vorhanden.

Von den hergestellten Antikörpern wies nur das Serum 571 von α MDR-L4 bei der C3000-Zelllinie ein marginales Signal auf. Ausgehend von den Transkriptionsdaten der zu untersuchenden Zelllinien handelt es sich hier um die Erkennung der anomalen murinen *mdr*-Isoform. Die zweite cytoplasmatische Schleife wurde von allen Antikörpern extrazellulär nicht erkannt.

Als Positivkontrolle für das intrazelluläre FACS (Daten nicht gezeigt) wurde der Antikörper C219 benutzt, der als Epitope beide NBD`s erkennt. Die Epitoperkennung der zweiten cytoplasmatischen Schleife war mit dieser Methode nicht nachzuweisen.

Mit den vorliegenden FACS-Daten kann das von Zhang ermittelte Topologiemodell des P-Glykoproteins nicht bestätigt werden. Es gibt keinen Hinweis auf eine extrazelluläre Lokalisation der zweiten cytoplasmatischen Schleife.

3.3 2D Gelelektrophorese

Cytostatika bewirken unter anderem eine Überexpression von P-Glykoprotein innerhalb von Zellen. Eine niedrige Cytostatikakonzentration ermöglicht der resistenten Zelllinie jedoch nicht sofort, auch bei einer hohen Konzentration zu überleben. Das Erlangen einer höheren Resistenz wird durch Selektionsschritte ermöglicht. Bei der wt250- und C3000-Zelllinie handelt es sich um mit humanem *MDR1* transfizierte NIH3T3-Zellen, die von Loo und Clarke [1993] hergestellt und unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt wurden. Da die P-Glykoprotein-Expression sehr gering war und für eine photochemische Koppelung mit Substraten nicht ausreichte, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine langsame stufenweise Nach-Selektion mit Vinblastin vorgenommen. Hiernach wuchs die wt250-Zelllinie bei 100 ng Vinblastin/ml Medium. Die C3000-Zelllinie wuchs nach Selektion bei einer hohen Cytostatikakonzentration von 9 μ g Colchizin/ml Medium. Beide Zelllinien zeigten hiernach eine hohe P-Glykoprotein-Expression.

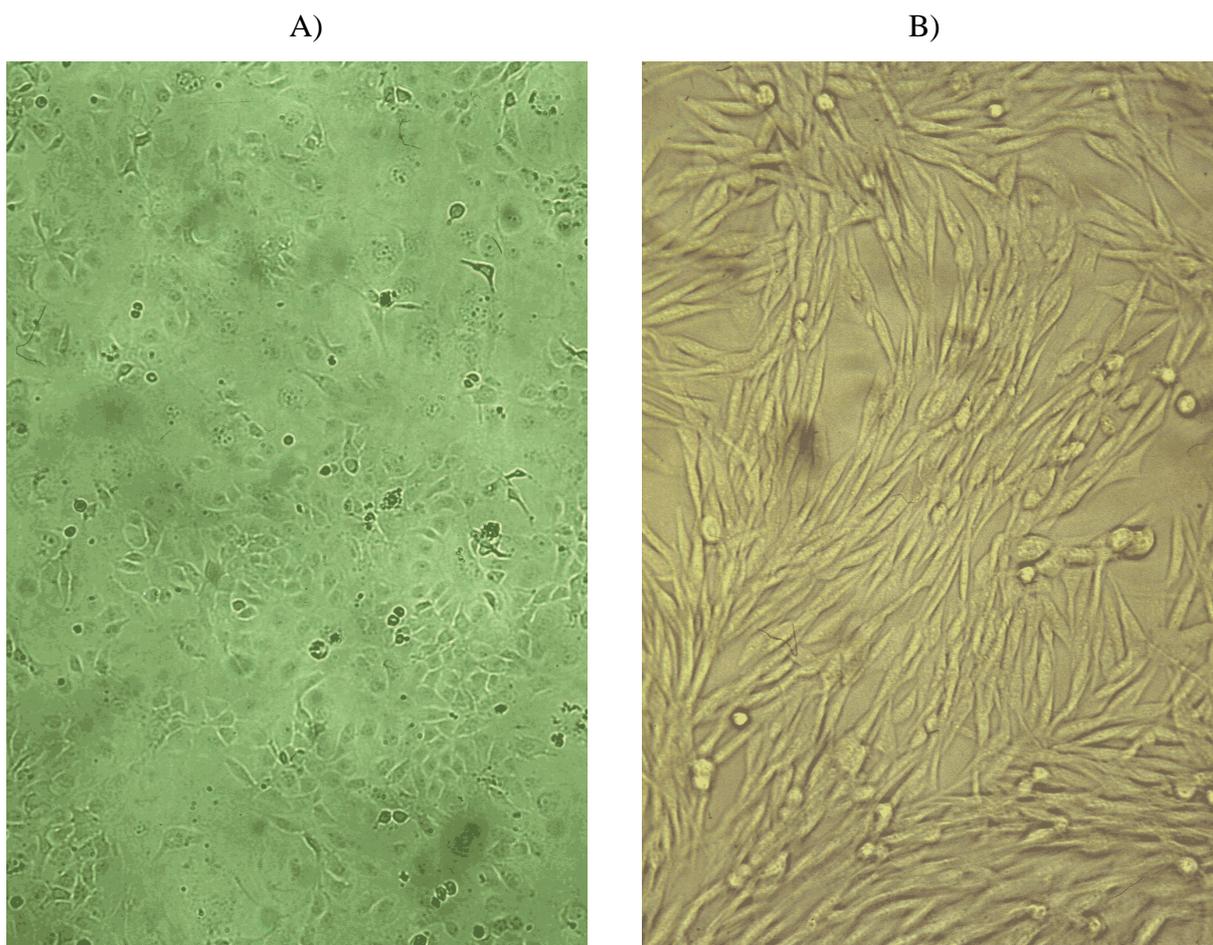


Abbildung 3-21: Human MDR1 transfizierte NIH3T3-Zelllinie von Loo und Clarke.

- A) Selektiert mit 100 ng/ml Vinblastin weist die wt250-Zelllinie einen epithelialen Wuchs auf.
 B) Die C3000-Zelllinie zeigt mit 9 µg/ml Colchizin einen spindelförmigen Wuchs.

Auf der Abbildung 3-21 A ist die wt250-Zelllinie zu sehen. Sie zeigt einen epithelialen Wuchs und entspricht vom äußeren Erscheinungsbild der Ursprungszelllinie NIH3T3. Der morphologischen Unterschied der C3000-Zelllinie (Abbildung 3-21 B) ist deutlich zu erkennen. Sie wächst spindelförmig, lang ausgezogen. Aufbauend auf diese Beobachtungen wurden diese Zelllinien anhand der 2D-Gelelektrophorese überprüft.

Ein unterschiedliches Proteinmuster war schon im eindimensionalen Gel zu erkennen. Im Gegensatz zu der wt250-Zelllinie wies die P-Glykoproteinbande von C3000 ein höheres Molekulargewicht auf. Außerdem zeichnete sich die C3000-Zelllinie durch eine extrem hohe Cytostatikatoleranz aus. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, daß innerhalb der C3000-Zelllinie mehr als nur die Hochregulation der P-Glykoprotein-Expression geschehen sein mußte. Über die 2D-Gelelektrophorese sollten die unter Cytostatikadruk aufgetretenen Änderungen im Proteinmuster innerhalb der Plasmamembran ermittelt werden.

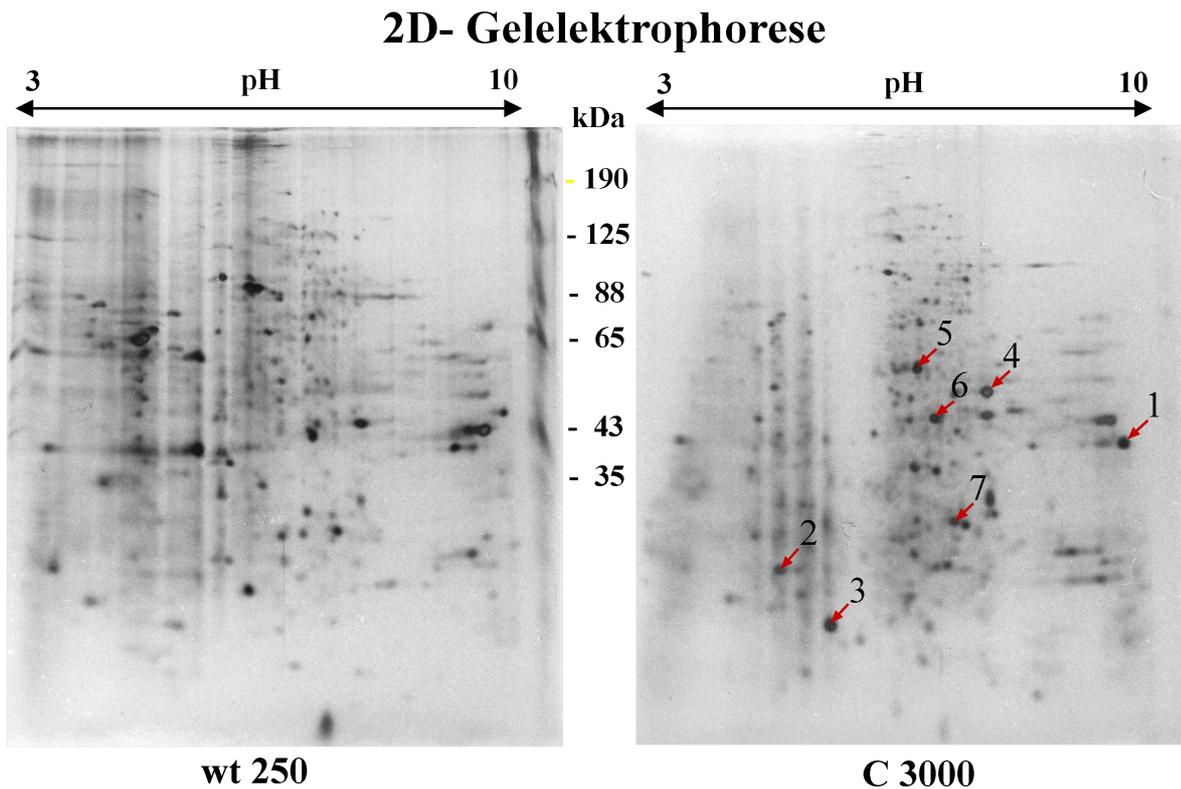


Abbildung 3-22: 2D-Plasmamembranproteinmuster der wt250- und C3000-Zelllinie.

Die Auftrennung erfolgte über den pH-Bereich von 3 bis 10 für die erste Dimension mit anschließender Auftrennung der Molekulargewichte über ein 10 % Laemmliigel. Von den sieben markierten Spots innerhalb des Proteinmusters der C3000-Zelllinie konnten für die massenspektrometrische Untersuchung vier mit Coomassie Blue angefärbt werden.

Das Proteinmuster der beiden Zelllinien ist deutlich zu unterscheiden. Um die Proteinmuster analysieren zu können, war ein Computerprogramm nötig. Die Auswertung wurde mit freundlicher Unterstützung der GBF Braunschweig vorgenommen. Die vorhandenen Spots konnten nach Markierung übereinandergelegt und verglichen werden (Abbildung 3-23). Die Reproduzierbarkeit der Gele innerhalb einer Zelllinie liegt bei ca. 95 %, welches jedoch schon durch unterschiedliche Silberanfärbung mitbedingt wird. Das gewählte Referenzgel stellt hier die wt250-Zelllinie dar, da der Unterschied zwischen geringem und hohem Cytostatikadruck ermittelt werden sollte. Zwischen den Proteinmustern der wt250- und C3000-Zelllinie besteht lediglich noch eine Identität von ca. 25 %.

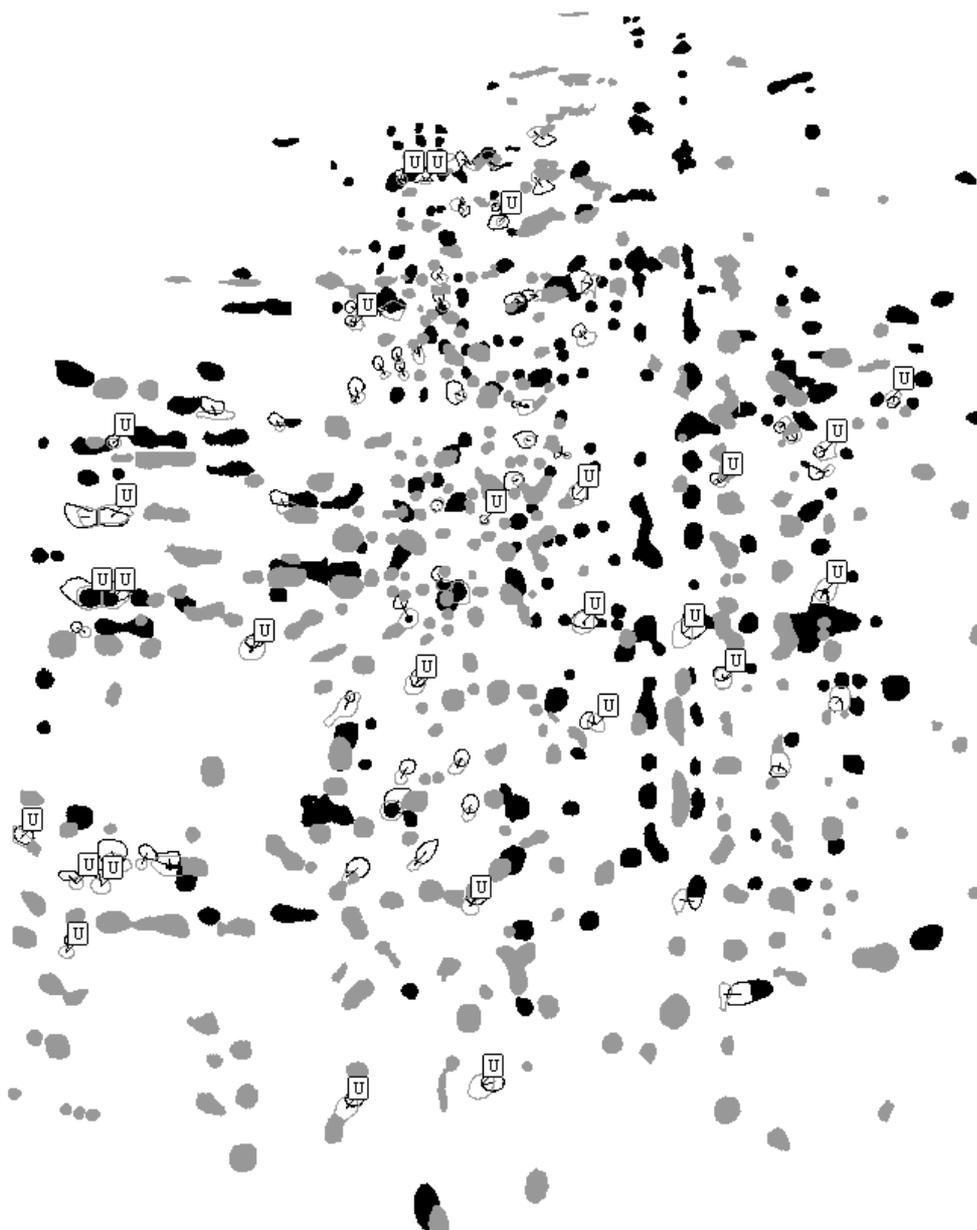


Abbildung 3-23: Computervergleich des wt250- und C3000-Proteinmusters.
Grau= C3000-Zelllinie
Schwarz= wt250-Zelllinie
U= manuell eingegebene Vermerke für den Vergleich der Proteinmuster
Es besteht eine Identität der Proteinmuster von ca. 25 %

Für die Untersuchung einzelner Spots mittels MALDI-TOF wurde eine Proteinmenge benötigt, die mit Coomassie anfärbbar war. Hierbei wurde sich auf die C3000-Zelllinie konzentriert, da diese extreme Konzentrationen an Cytostatika toleriert.

Die mit Coomassie sichtbaren Spots der C3000-Zelllinie wurden mit denen der wt250-Zelllinie verglichen. In ausreichender Menge wurden vier Proteinspots different exprimiert, die zur

Ergebnisse

weiteren Analyse mit MALDI-TOF geeignet waren. Hierbei handelt es sich um vier Spots, die sich im pH-Bereich 7-9,5 befinden.

Die ausgeschnittenen Spots wurden mit freundlicher Unterstützung der GBF Braunschweig ausgewertet.

Spot	PH-Bereich	Zuordnung über Datenbank	Zuordnung über Datenbank
1	Ca. 9,5	Metalloprotease	Zink Finger Protein
4	Ca. 7,9	Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase	Zink Finger Protein
5	Ca. 7	T-Cadherin	
6	Ca. 7,5	Annexin II (Lipocortin II)	

Tabelle 3-2: Zuordnung der über MALDI-TOF ermittelten Massen über Datenbanken.

Die ermittelten Peptid-Spektren sind im Anhang zu finden.

4 Diskussion

Die Behandlung mit Chemotherapeutika ist ein wichtiger Aspekt in der Krebsbehandlung. Ein Therapieversagen wird im Zusammenhang mit der Überexpression von P-Glykoprotein gesehen, das in der Lage ist eine Multidrug Resistenz (MDR) auszubilden. Bei diesem Protein handelt es sich um einen ABC-Transporter, *ATP-Binding-Cassette*, der mittels ATP-Hydrolyse in der Lage ist, Chemotherapeutika aus der Zelle herauszutransportieren.

4.1 Photobindungsstellen innerhalb des P-Glykoproteins

4.1.1 Substratbindungsstellen und ihre Bedeutung

P-Glykoprotein ist im direkten Zusammenhang mit dem Phänotyp der Multidrug Resistenz zu sehen. Dieses Protein erkennt und transportiert ein breites Spektrum an Substraten und erschwert damit die Tumorbehandlung mittels Chemotherapie beträchtlich. Lediglich die Gabe von mehreren Cytostatika oder von sogenannten Modulatoren läßt Chemotherapeutika ihre Wirkung innerhalb des Tumors entfalten. Bei Modulatoren handelt es sich um Substanzen unterschiedlicher Struktur, die von P-Glykoprotein erkannt, gebunden, aber nicht transportiert werden. Bei der Gabe von Modulatoren binden diese an P-Glykoprotein und verhindern so die Bindung und den Transport der Chemoterapeutika, so daß diese ihre Wirkung entfalten können. Für die Herstellung effizienter Chemotherapeutika ist eine ausreichende Aufklärung von Bindungsstellen innerhalb des P-Glykoproteins notwendig. Durch die Aufklärung der Bindungsstellen und des Erkennungsmechanismus könnten synthetisch hergestellte Substanzen eine Optimierung der Chemotherapie erreichen Die Identifizierung von Bindungsstellen kann auch hinsichtlich der Topologie und der Transportfunktion weiterhelfen, da vermutet wird, daß die Bindungsstellen im N- und C-terminalen Bereich des P-Glykoproteins eine gemeinsame Bindungstasche darstellen. Des weiteren ist noch nicht viel über die 3D-Struktur des P-Glykoproteins innerhalb der Membran bekannt. Die Kristallstruktur eines ABC-Transporters konnte bisher lediglich für HisP, die ATP-Bindungsuntereinheit der Histidinpermease aus *Salmonella typhimurium* gezeigt werden. Die Struktur weist eine L-Form auf, die in zwei Arme unterteilt wird. Arm 1 besteht aus zwei α -Helices- sowie sechs β -Faltblatt-Untereinheiten und wird mit Arm 2 durch sechs β -Untereinheiten verbunden. Die ATP-Bindungstasche soll sich in Arm 1 befinden und ähnelt eher einer Bindungsschleife. Der Arm 2 beinhaltet lediglich α -Helices-Untereinheiten (sechs). Diese vorliegende Kristallstruktur

wurde mit NBD's von dem CFTR-Protein verglichen und es wurde festgestellt, daß eine Mutation in dem Arm 2 die Interaktion zwischen NBD und TM unterbinden kann. Weitere Mutationen betreffen die ATP-Bindungstasche [Hung, 1998]. Hieraus resultiert, daß die Kristallstruktur von HisP ein gutes Modell für die NBD's der ABC-Transporter darstellt.

4.1.2 Überprüfung der Iodoarylazidoprazosinbindungsstellen

Die Bindungsstellen des Iodoarylazidoprazosins wurden 1993 anhand von Epitopmapping von Greenberger ermittelt. Hierbei wurden zwei Haupt- und eine Nebenbindungsstelle festgestellt, von denen sich eine der Hauptbindungsstellen im N-terminalen Bereich bei TM 6 und die zweite im C-terminalen Bereich bei TM 12 befindet. Die Nebenbindungsstelle wird im N-terminalen Teil von TM 4 bis kurz vor TM 6 beschrieben. Dieser Bereich beinhaltet die zweite cytoplasmatische Schleife, die als Photobindungsstelle bereits für Iodomycin und Iodipin [Demmer *et al.*, 1997, 1999] bekannt ist. Die Vermutung lag daher nahe, daß es sich bei der beschriebenen Nebenbindungsstelle von Iodoarylazidoprazosin ebenfalls um die zweite cytoplasmatische Schleife handeln könnte. Die Photobindungsstellen des Iodoarylazidoprazosins sollten in der vorliegenden Arbeit mit der in unserer Arbeitsgruppe etablierten Methode zur Aufreinigung und anschließender Sequenzierung der Aminosäureteilstrecken identifiziert werden.

Das nach chemischer Spaltung (BNPS-Skatol-Verdau) erhaltene, reproduzierbare Spaltmuster wies wie erwartet drei radioaktivmarkierte Banden bei ca. 16, 12 und 8 kDa auf. Diese wurden anhand eines etablierten Protokolls aufgereinigt. Bedingt durch die Hydrophobizität der Spaltfragmente erwies sich die Aufreinigung über HPLC als nicht problemlos. Während das ca. 8 kDa-Fragment mittels Edman-Sequenzierung als zweite cytoplasmatische Schleife (AS 230 – 312) mit der Größe von 9,045 kDa identifiziert wurde, mußte für die beiden anderen Fragmente ein anderer Weg gefunden werden, da sie auf diese Weise N-terminal blockiert waren. Daher wurde der Lys C-Verdau gewählt und die korrespondierenden Photobindungsstellen der Fragmente mit denen des BNPS-Skatol-Verdaus verglichen. Mit diesem Verdau konnten die ca. 16 und 12 kDa-Fragmente über Edman-Sequenzierung identifiziert werden und der AS-Bereich, an dem das photoreaktive Iodoarylazidoprazosin bindet, weiter eingegrenzt werden. Bei dem ca. 16 kDa-Fragment handelt es sich um das 18,810 kDa Fragment, das sich in der zweiten nukleotidbindenden Domäne befindet und den Aminosäurebereich 1148 – 1276 umfaßt. Das als B-Bande bezeichnete ca. 12 kDa-Fragment

wurde als 10,823 kDa-Fragment identifiziert. Hierbei handelt es sich um den Aminosäurebereich 746 – 800 und reicht von TM 7 bis TM 8.

Eine grobe Zuordnung des Hauptbindungsbereiches von photoreaktiven Substanzen innerhalb des P-Glykoproteins kann mit dem sanften Trypsinverdau nach Georges [1991] erfolgen. Bei diesem Verdau wird durch die Zugänglichkeit einer einzelnen Schnittstelle das P-Glykoprotein in die N- und C-terminale Hälfte gespalten. Kontrollversuche mit Gesamtmembranfraktionen an die Iodomycin photochemisch gekoppelt wurde, zeigten nach dem Trypsinverdau den Hauptbindungsbereich in der N-terminalen Hälfte. Bei dem Trypsinverdau von Iodoarylazidoprazosin gekoppelten P-Glykoprotein aus CHO B30-Membranpräparationen konnte keine deutliche Spaltung in diese zwei Hälften gezeigt werden. Dey *et al* beschrieben 1998, daß für eine eindeutige Spaltung zunächst der Trypsinverdau mit anschließender photochemischen Kopplung notwendig ist. Hieraus läßt sich eine Blockierung der Trypsinschnittstelle vermuten, die durch die sequenzierten Bindungsstellen für Iodoarylazidoprazosin ermittelt wurden. Die Bindungsstellen TM 4-5 und TM 7-8 liegen, 3-dimensional vorgestellt, so dicht nebeneinander, daß durch Kopplung des Iodoarylazidoprazosins eine Trypsinspaltung in der Linkerregion hinter der 1 NBD erschwert wird. Es könnte jedoch auch sein, daß lediglich die Bindung im Bereich TM 7-8 hierfür ausschlaggebend ist. Dieses könnte bedeuten, daß die Trypsinspaltstelle überlagert wird.

4.1.3 Bindungsstellen innerhalb des P-Glykoproteins

Während für das Bolton-Hunter-Derivat Iodomycin [Demmer *et al*, 1997], das zu dem Anthrazyclin Daunomycin gezählt wird, und dem 1,4-Dihydropyridinderivat Iodipin [Demmer *et al*, 1999] lediglich eine Bindungsstelle innerhalb des P-Glykoproteins identifiziert wurden (AS 230 – 312), sind für andere Substrate mehrere Bindungsstellen gezeigt worden, die sich jeweils N- und C-terminal befinden.

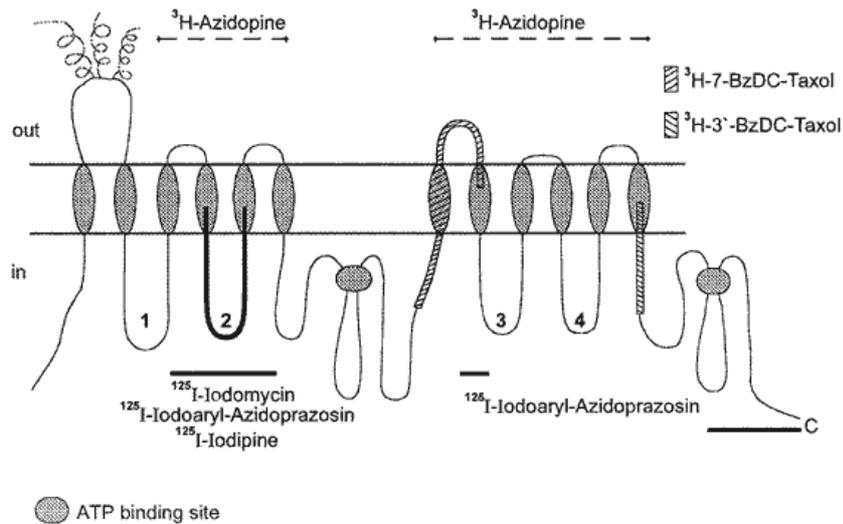


Abbildung 4-1: Theoretische P-Glykoproteinstruktur mit den ermittelten und aus der Literatur entnommenen Substratbindungsstellen.

Azidopin [Bruggemann *et al.*, 1992] bindet N-terminal in dem Aminosäurebereich 198 – 440 und C-terminal. Diese Bindungsstellen sind nicht weiter eingegrenzt worden, aber es wird diskutiert, daß Azidopin und Iodoarylazidoprazosin identische Bindungsstellen besitzen [Greenberger *et al.*, 1990]. Für Iodoarylazidoprazosin wurden von Greenberger [1993] drei Bindungsstellen beschrieben, die sich in den Bereichen TM 4 bis kurz vor TM 6, TM 6 und TM 12 befinden sollen. Durch die vorliegenden Ergebnisse müssen diese Angaben auf TM 4 – 5 (AS 230 – 312), TM 7 – TM 8 (AS 746 – 800) und 2 NBD (AS 1148 – 1276) für das photoreaktive [^{125}I]Iodoarylazidoprazosin korrigiert werden. Sollten Azidopin und Iodoarylazidoprazosin wirklich Bindungsstellen teilen, dann müßte es sich N-terminal ebenfalls um die zweite cytoplasmatische Schleife und im C-terminalen Bereich um die zweite nukleotidbindende Domäne handeln. Die Überprüfung und somit Eingrenzung der Azidopinbindungsstellen könnte eventuell ebenfalls die Wichtigkeit der zweiten cytoplasmatischen Schleife bestätigen. Die ermittelten Bereiche für Iodoarylazidoprazosin zeigen eine Übereinstimmung mit den Bereichen für die hergestellten Taxol-Analoga 3'-*p*-benzoyldihydrocinnamoyl (BzDC) und dem korrespondierenden C-7-Analogon [Wu *et al.*, 1998]. Für 7-BzDC wurde der Aminosäurebereich 683 – 760 gefunden. Hierbei könnte es sich um den Bindungsbereich AS 746 – 800 von Iodoarylazidoprazosin handeln. Die Sequenzen für 3'-BzDC sind zwar nicht identisch, aber auch hier wird die Bedeutung der zweiten nukleotidbindenden Domäne gezeigt. Der Bereich TM 7 – TM 8 wurde erst mit dem Taxol-Analogon 7-BzDC als Bindungsstelle für photoreaktive Substrate innerhalb des P-Glykoproteins beschrieben. Laut Mutagenesestudien wird dieser Bereich jedoch schon seit 1991 [Buschman *et al*] als relevant

angesehen, da ein Austausch dieser Region (MDR1) gegen den identischen aus MDR2 den Verlust der Transporterfunktion zur Folge hatte. Ein identisches Resultat wurde nach einzelnen Mutationen an spezifischen Positionen innerhalb TM 7 erzielt [Loo und Clarke, 1993, 1996].

Für Substratbindung und Transport wurden auch kooperative Bindungsstellen innerhalb des P-Glykoproteins beschrieben [Shapiro *et al.*, 1999]. Colchizin inhibiert zum Beispiel den Hoechst 33342-Transport, während der von Rhodamin 123 stimuliert wird. Colchizin muß demnach von der Hoechst 33342-Bindungsstelle erkannt und mit höherer Affinität gebunden werden. Anthracycline wirken hierzu gegensätzlich und Vinblastin inhibiert beide Bindungsstellen. Die Hoechst 33342- und Rhodamin 123-Bindungsstellen befinden sich im cytoplasmatischen Teil des P-Glykoproteins. Die Stimulierung beider Substrate wird durch Prazosin und Progesteron erreicht. Durch diesen Versuch wurde ebenfalls das Vorhandensein von drei Bindungsstellen innerhalb des P-Glykoproteins bestätigt.

Bei Untersuchungen welche Voraussetzungen Substrate haben müssen, die an P-Glykoprotein binden wurde herausgefunden, daß alle Substrate eine hohe Anzahl an Elektronendonatorgruppen besitzen. Als solche werden Gruppen mit einem freien Elektronenpaar an einem elektronegativen Atom (O, N, S, F, Cl) bezeichnet oder die π -Elektronen innerhalb eines ungesättigtem Systems besitzen [Vinogradov *et al.*, 1971]. Die Erkennungselemente sind aus 2 (Typ I) oder 3 Elektronendonatorgruppen (Typ II) in einem festen räumlichen Abstand aufgebaut. Interaktionen zwischen P-Glykoprotein und seinen Substraten basiert auf Wasserstoffbrückenbindungen die bei Typ I einen Abstand von $2,5 \pm 0,3 \text{ \AA}$, und bei Typ II einen Abstand von $4,6 \pm 0,6 \text{ \AA}$ haben [Seelig, 1998].

4.1.4 Der Substrattransport

Eine umfassende Aufklärung der P-Glykoproteintopologie kann helfen, den Substrattransport-Mechanismus und somit die Multidrug Resistenz zu verstehen. Da die Art und Weise des Transports noch nicht bekannt ist, stehen lediglich Hypothesen als Erklärung zur Verfügung. Wie auf den Abbildungen 1-2 in der Einleitung zu erkennen ist, werden die zweite (TM 4-5) und dritte (TM 8-9) cytoplasmatische Schleife auch extrazellulär diskutiert. Da es sich bei der zweiten cytoplasmatischen Schleife um die Substratbindungsstelle von Iodomycin, Iodipin [Demmer *et al.*, 1997, 1999] und Iodoarylazidoprazosin handelt, ist die Lokalisation dieses Abschnittes von großer Bedeutung, die weitergehend in dem Abschnitt über die polyklonalen

Antikörper behandelt wird. Die bisherige Vorstellung der Substratbindung und dem anschließenden Transport wurde 1989 zunächst von Endicott und Ling beschrieben. Sie nehmen an, daß P-Glykoprotein als ATP-Effluxpumpe die vorliegenden Cytostatika aus dem Cytosol direkt herauszutransportieren vermag. Raviv *et al* haben 1990 die Hypothese aufgestellt, daß P-Glykoprotein wie ein hydrophober Staubsauger arbeitet, der Substrate aus dem Lipidbilayer zunächst in eine wassergefüllte Pore saugt und von dort aus exportiert. Eine weitere Vorstellung für den Transport, in der P-Glykoprotein als Flippase die hydrophoben Substrate direkt aus dem Lipidbilayer abfängt und wieder nach außen transportiert, wird ebenfalls diskutiert [Higgins und Gottesman, 1992]. Dieses Modell wird auch für den zu P-Glykoprotein sehr homologen bakteriellen ABC-Transporter LmrA aus *Lactococcus lactis* angenommen. Die Annahme, daß die umliegenden Lipide der Plasmamembran eine Rolle für den Substrattransport spielen, wurde weiter untersucht und auch bestätigt. Es wird in Betracht gezogen, daß Substrate durch passive Diffusion in die Zelle gelangen. Eine Protonierung der MDR-Substrate aufgrund des pH-Wertes [Ferguson *et al.*, 1984, Berleur *et al.*, 1985] und die Lipidzusammensetzung [Walter *et al.*, 1979, Dupou-Cezanne *et al.*, 1989] läßt den Effekt des Substratinflusses vermuten. Zusammen mit Cholesterol und Sphingomyelin können Fettsäurezusammensetzungen ebenfalls einen Effekt auf den Substratinflux haben. Eine Reduktion des Substratinflusses bei MDR kann mit dem Lipidwechsel innerhalb der Plasmamembran in Verbindung stehen. Es wurde eine direkte Korrelation zwischen der Fähigkeit von Steroid-Hormonen beobachtet, MDR und die Cholesterol-Biosynthese zu inhibieren [Metherall *et al.*, 1996]. Die Auswirkungen der Lipidzusammensetzung für P-Glykoprotein wurde von Saeki *et al* [1992] beschrieben. Sie benutzten aufgereinigtes P-Glykoprotein rekonstituiert in Liposomen mit unterschiedlichen Cholesterolgehalten und konnten zeigen, das eine maximale P-Glykoprotein – Azidopin Bindung mit 20 % Cholesterol erreicht wird. Hohe Cholesterolgehalte können die P-Glykoprotein Transporteraktivität inhibieren. Dieses bedeutet, daß mit der Überexpression von P-Glykoprotein ein Umbau der Plasmamembran erfolgen muß. Dieser Umbau ist nicht wie hier beschrieben auf die Lipidzusammensetzung beschränkt sondern umfaßt auch die Plasmamembranproteine, die im Kapitel 4.3 weiter erläutert werden.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen [Rosenberg, 1997] zeigen eine große Pore innerhalb des Proteins. Hier wird eine Kommunikation zwischen Protein und Phospholipidbilayer angenommen. Für den Substrattransport wird auch eine ATP-abhängige Konformationsänderung diskutiert. Außerdem ist der ATPase Zyklus substratabhängig. Dieses wurde anhand von Mutagenesestudien belegt [Azzaria *et al.*, 1989, Loo und Clarke, 1995]. Mutationen einer

NBF bewirken die Einstellung des Substrattransportes und der ATPase Aktivität. Aus diesen Ergebnissen wird ebenfalls geschlossen, daß die beiden NBF's miteinander kooperieren.

P-Glykoprotein wird von einigen seiner Substrate reguliert. Der *mdr*-Promotor wird zum Beispiel durch Vincristin, Anthracyclin und Colchizin aktiviert [Kohno *et al.*, 1989]. In dieser Arbeit wurde die P-Glykoprotein-Expression der Zellkultur durch Colchizin und Vinblastin induziert. Ebenso vermögen Steroid-Hormone, wie bereits beschrieben, MDR und die Cholesteroll-Biosynthese zu inhibieren und auf diese Weise über die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran einen Einfluß auf die Regulation zu nehmen [Metherall *et al.*, 1996].

Loo und Clarke haben durch Crosslinking Versuche gezeigt, daß TM 6 und TM 12 nahebeieinander liegen und sich während des Reaktionszyklus einer ATP-abhängigen Konformationsänderung unterziehen. Senior *et al* [1995] erklären die Konformationsänderung in einem vier-Stufen-Modell des Substrattransportes, wo zunächst die Substraterkennung von der ATP-Bindung gefolgt wird. Die ATP-Hydrolyse ist wiederum mit dem Substrattransport gekoppelt.

Auch TM 3 und TM 10, die cytoplasmatisch lokalisiert sind, und deren flankierende Sequenzen scheinen in der Substratbindung involviert zu sein. Bei der Konformationsänderung wird angenommen, daß TM 3 und TM 10 die Substrate vom Cytoplasma zur extrazellulären Seite transportieren, während die extrazellulär liegenden TM 5, TM 8 und umliegende Sequenzen die Substrate freilassen [Zhang, J.-T., 1998].

Die Annahme einer Pore läßt dreidimensional einen engen Kontakt und damit auch Interaktionen zwischen der N- und C-terminalen Seite zu. Auch die NBD's, die wie bei dem CFTR-Modell in der Pore liegen müssen, können durch die nahe Lage miteinander kooperieren. Es ist daher auch nicht verwunderlich, daß viele Substrate mindestens eine Bindungsstelle im N- und C-terminalen Bereich des P-Glykoproteins aufweisen. Auch Iodomycin zeigt eine leichte, im C-terminalen Teil liegende, Bindungsstelle, die mittels der heutigen Methoden jedoch nicht lokalisiert werden konnte. Auffällig ist jedoch die Häufung der Bindungsstellen im Bereich TM 4-5, TM 7-8 und TM 12-zweite NBD, was die Überlegung einer Bindungstasche für Substrate und anschließender gemeinsamen Ausschleusung zuläßt. Mit Iodoarylazidoprazosin konnte zum ersten Mal gezeigt werden, daß diese drei beschriebenen Bindungsbereiche von einem Substrat genutzt werden können. Für den Transport muß auch eine Konformationsänderung ausschlaggebend sein. Diese Konformationsänderung und das daraus resultierende Topologiemodell von Zhang *et al* sollten durch Antikörper [Kapitel 3.5] überprüft werden.

Ein Transport ist eine Aktivität, die ein starres Modell nicht zu vollbringen vermag. Interessant ist hierfür die Vorstellung des beschriebenen hydrophoben Staubsaugers [Raviv *et al.*, 1990], der die Substrate aus der Lipidschicht übernimmt und durch die innere Pore [Rosenberg, 1997] des P-Glykoproteins nach außen transportiert, jedoch durch Abgabe der Substrate an weitere Bindungsstellen innerhalb des P-Glykoproteins, welches den Transport durch Konformationsänderung [Loo und Clarke, 1999], abschließt. Da P-Glykoprotein lediglich ca. 20 % der Membranproteine ausmacht, ist der Aufbau der Plasmamembran (Lipidzusammensetzung) ebenfalls ein wichtiger Aspekt für die Multidrug Resistenz.

4.2 Herstellung polyklonaler Antikörper

Das konventionelle Modell der Topologie des P-Glykoproteins zeigt die zweite Schleife zwischen TM 4 und TM 5 im intrazellulären Bereich (Abbildung 1-2). 1996 stellten Zhang *et al* polyklonale Antikörper gegen die zweite Schleife der Hamster Isoform *pgp1* her. Mit diesen Antikörpern wurde diese Region im extrazellulären Bereich lokalisiert. Die Topologie des P-Glykoprotein ist trotz dieser Ergebnisse nicht vollständig geklärt. Mit der Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen das humane MDR1, der die identische Aminosäuresequenz des Zhang-Antikörpers besitzt, sollte die Lokalisation der zweiten cytoplasmatischen Schleife erneut untersucht werden. Für diese Überprüfung wurden außerdem Antikörper gegen die konservierte Region dieses Bereiches produziert.

Innerhalb der zweiten cytoplasmatischen Schleife befindet sich eine von fünf konservierten Regionen des P-Glykoproteins. Das sogenannte EAA- Motiv besteht bei Prokaryonten aus 20-30 Aminosäuren und bei dem EAA-ähnlichen Motiv der Eukaryonten aus 15 Aminosäuren. Hinter den Aminosäuren EAA steht an vierter Stelle ein zentrales Glycin. Bei Bakterien bewirkt die Mutation dieses Glycins den kompletten Verlust der Transporterfunktion [Koster *et al*, 1992]. Interaktionen, die zwischen den Transmembrandomänen und der NBD stattfinden, [Mourez *et al*, 1997] sind bereits für Bakterien-Transporter gezeigt worden, jedoch noch nicht für die eukaryontischen Transporter [Loo und Clarke, 1995]. Die Walker A- und Walker B-Motive sind kennzeichnend, aber das LSGGQ-Motiv, welches die Walker-Motive verbindet, ist charakteristisch für ABC-Transporter. Diese Motive sind in der nukleotidbindenden Domäne lokalisiert. Für den Maltosetransporter aus *E.coli* konnte eine Interaktion zwischen dem EAA- und dem LSGGQ-Motiv gezeigt werden. Das EAA-Motiv soll auch an der Zusammensetzung der Substratbindungsstellen beteiligt sein. Mutationen in der EAA-Region induzieren Konformationsänderungen in anderen Teilen des Proteins [Mourez *et al*, 1997]. Dieses Motiv

sowie die NBD sind für die Transportfunktion des P-Glykoproteins notwendig. Die ATP-Bindung erfolgt durch elektrostatische Wechselwirkungen der Phosphatreste mit dem Walker A-Motiv. Durch die ATP-induzierte Konformationsänderung findet eine Interaktion zwischen dem LSGGQ-Motive und den Transmembrandomänen statt. Die Walker A- und B-Motive liegen bei HisP in der Region, die denen der G-Proteine und „Motor-Proteine“ sehr ähnlich ist.

Die Wichtigkeit der zweiten cytoplasmatischen Schleife wird durch die Substratbindungsstelle(n) für Iodomycin, Iodipin und Iodoarylazidoprazosin deutlich. Es wäre denkbar, daß Substrate in dieser Region binden und durch Interaktionen mit der NBD transportiert werden. Hierfür wäre ebenfalls eine Konformationsänderung in dem Bereich der elektronenmikroskopisch sichtbaren Pore vorstellbar. Durch die Konformationsänderung könnte eine Verlagerung der zweiten cytoplasmatischen Schleife so nahe an den extrazellulären Bereich zur Substratabgabe ermöglicht werden, daß eine extrazelluläre Lokalisation anhand von Antikörpern vorstellbar wird. Dieses würde die Möglichkeit erklären, warum die zweite cytoplasmatische Schleife in der Zhang-Topologie extrazellulär lokalisiert ist.

4.2.1 Zellkultur

Bei der Ausgangszelllinie handelt es sich um eine mit humanem MDR1-transfizierte NIH3T3-Zelllinie, die unserer Arbeitsgruppe von Loo und Clarke zur Verfügung gestellt wurde. Für Photoaffinitätsstudien mußte diese Zelllinie zunächst unter Cytostatikadruck selektiert werden, um einen höheren P-Glykoproteinanteil in der Plasmamembran zu erhalten. Hierfür wurde ein Teil dieser Ausgangszellen unter 100 µg/ml Vinblastin kultiviert. Die hieraus resultierende Zelllinie wurde wt250 genannt. Der zweite Teil wurde als C3000-Zelllinie bei 9 µg/ml Colchizin kultiviert. Nach diesen Kultivierungen entstanden zwei völlig unterschiedliche Zelllinien. Bei wt250 handelt es sich um eine gegen 100 ng/ml Vinblastin resistente Zelllinie. Sie stirbt jedoch unter dem hohen Cytostatikadruck der resistenten C3000-Zelllinie ab. Der P-Glykoproteinanteil in der Plasmamembran dieser beiden Zelllinien war für photochemische Kopplung von Substraten ausreichend exprimiert worden. Jedoch unterschieden sich diese beiden Zelllinien im Laufverhalten des P-Glykoproteins bei elektrophoretischen Auftrennung. Die apparenten Molekulargewichte der komplexen glykosylierten und deglykosylierten Form des P-Glykoproteins waren unterschiedlich. Aus diesem Befund ist abzuleiten, daß die beiden Zelllinien unterschiedliche MDR Proteine exprimieren.

Diskussion

Auch morphologische Unterschiede sind eindeutig sichtbar [Abbildung 3-21]. Die wt250-Zelllinie wächst epithelial unter dem geringen Cytostatikadruck, während eine höhere Konzentration an Cytostatika einen spindelförmigen Wuchs der Zelle bewirkt. Dieser Übergang des Wachstumsverhaltens wurde bei der wt250 in Anwesenheit von 100 ng/ml Vinblastin beobachtet.

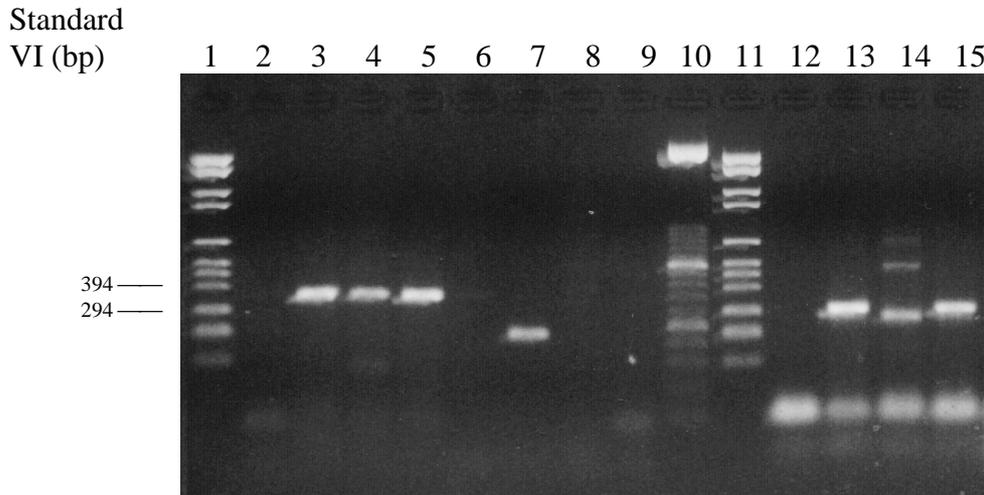


Abbildung 4-2: RNA-Transkriptdaten
Ergebnisse von Frau Dr. Demmer (nicht veröffentlicht)
Spur 2, 6, 12: Negativkontrolle ohne RNA
Spur 3, 7, 13: wt250-RNA
Spur 4, 8, 14: C3000-RNA
Spur 5, 9, 15: RNA aus Mausniere
Spur 2-5: PCR-Kontrolle auf Glycerin-Aldrhyd-Dehydrogenase
Spur 6-9: Überprüfung auf humanes *MDR1*
Spur 12-15: Überprüfung auf murines *mdr1*

RNA-Untersuchungen dieser beiden Zelllinien ergab, daß die wt250-Zelllinie wie erwartet humanes *MDR1* exprimiert. Bei der C3000-Zelllinie war dieses jedoch nicht exprimiert worden, obwohl es sich hier um eine human *MDR1*-transfizierte Mausfibroblastenzelllinie handelt. Die Überprüfung dieser Zelllinien auf Maus *mdr1* zeigte bei der wt250 keine Transkription, während die C3000-Zelllinie Maus-Splicevarianten aufwies. Dieses Resultat läßt die Vermutung zu, daß der C3000-Zelllinie die human *MDR1*-Transfektion für das Erlangen der Resistenz unter dem hohen Cytostatikadruck nicht ausgereicht hat. Die Zelle hat durch Maus-Splicevarianten eine Möglichkeit gefunden, sich vor der hohen Cytostatikakonzentrationen zu schützen.

Widersprüchlich für die C3000-Zelllinie ist, daß sie kein humanes Transkript mehr besitzt, im Western-Blot aber von dem humanspezifischen Antikörper C494 erkannt wird. Außerdem

zeigt sie im Gegensatz zu der wt250-Zelllinie kein immunreaktives FACS-Signal mit anti-MDR Antikörpern auf.

4.2.2 Western-Blot- und FACS-Ergebnisse

Die Ergebnisse der zwei polyklonalen Antikörper, KDI 3541 und α MDR-L4, lassen sich mit den beschriebenen Transkriptionsdaten der zwei Zelllinien erklären. Die beiden hergestellten Antikörpern weisen ein sensitiveres Signal bei der wt250-Zelllinie auf als bei der C3000-Zelllinie. Laut Transkriptionsdaten [Demmer, nicht veröffentlicht] wird innerhalb der wt250-Zelllinie das humane MDR1 exprimiert und daher im Western-Blot von den Antikörpern erkannt. In der C3000-Zelllinie wird kein humanes MDR1 mehr exprimiert, aber eine Maus *mdr1*-Spliceform. Dieses P-Glykoprotein wird von den Antikörpern KDI 3541 und α MDR-L4 nicht so stark erkannt wie das humane. Eine Spezifitätsüberprüfung hat gezeigt, daß es sich nicht um humanspezifische Antikörper handelt. Sie erkennen neben humanem P-Glykoprotein auch die Hamster-Isoform *pgp1* aus CHO B30-Zellen sowie Maus *mdr1*.

Die Zelllinien wurden mittels der hergestellten polyklonalen Antikörper ebenfalls im FACS überprüft. Mit dieser Methode sollte die zuvor beschriebene Topologiefrage der zweiten cytoplasmatischen Schleife geklärt werden.

Die extrazellulären FACS-Daten konnten keinen Hinweis auf die Lokalisation der zweiten cytoplasmatischen Schleife im extrazellulären Bereich geben. Dieses Ergebnis bestätigt das über Hydrophobitätsanalysen ermittelte Topologiemodell. Daß die hergestellten Antikörper im intrazellulären FACS keine Signale aufweisen, bedeutet nicht, daß die zweite cytoplasmatische Schleife dort nicht lokalisiert ist. Die für das intrazelluläre FACS benötigten Fixierungen und das beigefügte Triton X-100 zur Perforation der Zellen zerstören oder verändern für viele Antikörper die Epitope. Diese Ergebnisse weisen lediglich darauf hin, daß diese polyklonalen Antikörper nicht für intrazelluläres FACS geeignet sind.

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, daß die zweite cytoplasmatische Schleife durch die Interaktion mit der NBD und die hieraus resultierende Konformationsänderung nur für den Substrattransport in die Nähe der extrazellulären Seite kommen kann.

4.3 Ergebnisse der 2D Gelelektrophorese

Die morphologischen Unterschiede der Zelllinien wt250 und C3000 wurden über 2D-Gelelektrophorese der P-Glykoprotein enthaltenen Plasmamembranen untersucht und konnten auch mit dieser Methode bestätigt werden. Mit Hilfe eines Computerprogramms wurden die Proteinmuster der Zelllinien miteinander verglichen und nur noch eine Übereinstimmung von ca. 25 % der Muster festgestellt. Dieses Resultat zeigt, daß die C3000-Zelllinie, um unter dem höheren Cytostatikadruck wachsen zu können, den Großteil der Plasmamembran umgebaut hat.

Um einen Einblick in die Tumorentwicklung zu erhalten, wurden für die Überprüfung über MALDI-TOF von der resistenten C3000-Zelllinie zur wt250-Zelllinie differentiell Coomassie angefärbte „Spots“ in dem pH-Bereiche von ca. 7-9,5 ausgewählt. Diese Spots enthalten nicht unbedingt nur ein einzelnes Protein. Es muß davon ausgegangen werden, daß es sich hierbei um mehrere Proteine desselben pH-Wertes und Molekulargewichtes handelt.

Um weitere Aussagen über den Umbau der Plasmamembran von der C3000-Zelllinie zu erhalten, wurden 2D-Gele mit Coomassie-Blue angefärbt. Hiermit wurde eine ausreichende Proteinmenge garantiert, da im Gegensatz zu der Silberfärbung die Coomassie-Färbung nicht so sensitiv ist.

Die vier Protein-Proben wurden hierfür zunächst mit Trypsin gespalten, bevor über MALDI-TOF die Proteinmassen ermittelt und über Datenbanken ausgewertet wurden.

Die **Probe 1** mit einem pH-Wert von ca. 9,5 wurde über zwei unterschiedliche Datenbanken mit der ermittelten Masse überprüft. Hierdurch wurden zwei mögliche Proteine herausgefunden: eine Metalloprotease und/oder ein Zink Finger Protein.

Bei Metalloproteasen handelt es sich um Enzyme, die in Verbindung mit der „Malignität“ stehen. Sie werden im Zusammenhang mit der Tumorentstehung und der Metastasierung beschrieben [Nelson *et al.*, 2000]. In der Umbildung der Zelloberflächenproteine, Proliferation und Differenzierung spielen sie ebenfalls eine Rolle [Bergers *et al.*, 2000]. Bei der C3000-Zelllinie würden Metalloproteasen die morphologische Veränderung von einem epithelialen in einen spindelförmigen Wuchs erklären.

Das über die Datenbanken erhaltene Zink-Finger-Protein wurde auch für die **Probe 4** bei einem pH von ca. 7,9 gefunden. Eine Vielzahl der Zink-Finger-Proteine steht in Verbindung

mit der zellulären Signaltransduktion. Zu diesen Proteinen wird beispielsweise Protein-Kinase C gezählt. Sie besitzt eine „Finger-ähnliche“ Sequenz und kann mit dieser Domäne Phorbolster binden. Durch den ähnlichen Aufbau dieser Domäne wird auch eine Protein-Protein Interaktion angenommen. Zink-Finger sind als DNA-bindende Motive bekannt. Es wurden jedoch auch DNA-RNA-Hybride und Protein-Protein Interaktionen beobachtet. Da Zink-Finger Proteine bis zu sechs dieser Bindungsmotive besitzen können, wären unterschiedliche Interaktionspartner sehr wahrscheinlich.

Für **Probe 4** wurde neben dem Zink-Finger-Protein die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase über die Datenbank ermittelt. Dieses Protein spielt nicht nur in der Glykolyse für den Energiebedarf der Zelle eine Rolle, sondern auch in der DNA-Replikation und dem Kern-RNA-Export. Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase wird in Verbindung mit Prostatakrebs beschrieben und muß in diesem Zusammenhang ebenfalls in der Malignität von Zellen involviert sein [Sirover *et al.*, 1999]. Bei höherem Cytostatikadruck müssen mehr Chemotherapeutika aus der Zelle heraustransportiert werden. Es wird angenommen, daß für den Transport von einem Substratmolekül ein ATP notwendig ist. Hiermit wird ein höherer Energiebedarf für die C3000-Zelllinie erklärt.

Bei der **Probe 5** mit einem pH-Wert von ca. 7 handelt es sich um das T-Cadherin. Die Klasse der Cadherine wird als integrale Membranglykoproteine beschrieben, bei denen überlegt wird, ob sie mit der Calcium-abhängigen Zell-Zell-Adhäsion in Verbindung stehen und mit der Kontrolle der Gewebemorphogenese in Zusammenhang gebracht werden können. Sicher ist, daß sie als Signaltransduktionsprotein eine Rolle spielen [Philippova *et al.*, 1998]. Die direkte Funktion dieses Proteins ist noch nicht geklärt.

Mit einem pH-Wert von ca. 7,5 wurde für die Probe 6 in der Datenbank Annexin II ermittelt. Annexin II (oder Lipocortin II) gehört zu der Familie der Calcium- und Phospholipidbindenden Proteinen, die eine Rolle in der Zelldifferenzierung und Metastasierung spielen. Bei dem Lewis Lungenkarzinom inhibiert Annexin II signifikant die Wanderung der metastasierenden Zellen [Balch *et al.*, 1997].

Alle ermittelten Proteine der C3000-Zelllinie sind in der Tumorentwicklung notwendig, wie zum Beispiel eine gesteigerte Glykolyse für den Substrattransport, aber auch eine morphologische Veränderung zur Metastasierung.

5 Zusammenfassung

SCHLAGWÖRTER: P-Glykoprotein, ABC-Transporter, Multidrug Resistenz (MDR), Iodoarylazidoprazosin, Photobindungsstellen

Die Chemotherapie ist eine von drei Behandlungsmethoden bei der Bekämpfung maligner Tumore. Durch die Gabe von Cytostatika können Tumorzellen eine Resistenz gegen ein breites Spektrum strukturell unterschiedlicher Substanzen erlangen. Das Auftreten dieser Resistenzen während der Chemotherapie wird als Multidrug Resistenz (MDR) bezeichnet, die hauptsächlich durch die Überexpression von P-Glykoprotein, einem ABC-Transporter (*ATP binding cassette*), verursacht wird. P-Glykoprotein ist in der Lage, mit einem ATP-abhängigen Mechanismus Cytostatika aus der Tumorzelle zu transportieren. Photoaffinitätsbindungs-liganden wie Prazosin und Iodomycin werden genutzt, um Bindungsstellen für Pharmazeutika innerhalb des P-Glykoproteins zu überprüfen.

Ein Ziel dieser Arbeit war die Photobindungsstellen des [¹²⁵I]Iodoarylazidoprazosins in dem P-Glykoprotein aus Hamster CHO B30-Zellen zu charakterisieren und auf Aminosäureebene einzugrenzen.

In der Literatur wurden über Epitopmapping zwei Haupt- (TM 6, TM 12) und eine Nebenbindungsstelle (TM 4 bis kurz vor TM 6) für Iodoarylazidoprazosin beschrieben. Die chemische Tryptophan- (BNPS-Skatol) und enzymatische Lys C-Spaltung des photochemisch gekoppelten P-Glykoproteins führte in dieser Arbeit zu einem reproduzierbaren Spaltnmuster. Die durch Edman-Sequenzierung erhaltenen Aminosäure-Teilsequenzen des P-Glykoproteins identifizierten die Photobindungsstellen des Iodoarylazidoprazosins in den Aminosäure-Bereichen 230-312 (TM 4 bis TM 5), 746-800 (hinter TM 7 bis hinter TM 8) und 1148-1276 (hinter dem Walker A-Motiv der zweiten NBD). Durch diese Ergebnisse muß eine Korrektur der Iodoarylazidoprazosin-Bindungsstellen vorgenommen werden. Zudem konnte mit den vorliegenden Aminosäure-Teilsequenzen hier zum ersten Mal ein Substrat gezeigt werden, das alle drei wichtigen Bindungsstellen, die für den Substrattransport in der Literatur beschrieben werden, benutzt.

Der Substratbindungsbereich der zweiten cytoplasmatischen Schleife wird auch in Topologiemodellen diskutiert. In der Literatur wird ein theoretisches Modell beschrieben, welches diesen Bereich intrazellulär zeigt, während durch Experimente mit Antikörpern die zweite

cytoplasmatische Schleife extrazellulär ermittelt werden konnte. Die Lokalisation der zweiten cytoplasmatischen Schleife konnte mittels der hergestellten anti-human MDR1-Antikörper KDI 3541 und α MDR-L4 extrazellulär nicht bestätigt werden. Die vorliegenden FACS-Daten unterstützen die Hypothese des über Hydrophobizitätsanalysen ermittelten Topologiemodells.

In Anwesenheit von Cytostatika wird in Zellen nicht nur P-Glykoprotein überexprimiert, sondern es kommt zu globalen Änderungen in Stoffwechsel und Genexpression. Die mit 9 μ g/ml Colchizin selektierte, mit *MDR1* transfizierte NIH3T3-Zelllinie (C3000) zeigt unter diesem Cytostatikadruck eine gegenüber der mit 100 ng/ml Vinblastin kultivierten wt250-Zelllinie veränderte Morphologie. Eine unterschiedliche Expression des MDR Proteins dieser beiden Zelllinien kann sowohl aus den Transkriptionsdaten als auch aus den apparenten Molekulargewichten des P-Glykoproteins abgeleitet werden.

Um die unter Cytostatikaselektion auftretende Veränderung im Proteinmuster der Plasmamembranen zu erfassen, wurde eine Auftrennung der Membranproteine über zweidimensionale Gelelektrophorese vorgenommen.

Die Ergebnisse der 2D-Gelelektrophorese können lediglich eine ca. 25 % Identität der Plasmamembranproteinmuster der beiden Zelllinien wt250 und C3000 aufweisen. Die vier quantitativ abweichenden Proteine mit spezifischer Überexpression in der C3000-Zelllinie wurden massenspektrometrisch (MALDI-TOF) identifiziert. Diese Proteine stehen im Zusammenhang mit dem durch Substrattransport erhöhtem Energiebedarf der Zelle und der Metastasierung.

6 Abstract

KEY WORDS: p-glycoprotein, ABC-transporter, multidrug resistance (MDR), iodoarylazidoprazosin, photo-binding sites

To treat cancer with chemotherapy is one out of three major therapeutic options. However, following the initial treatment with cytostatic drugs, tumor cells can become resistant to a broad range of structurally different chemotherapeutic drugs. Such resistances during chemotherapy are known as multidrug resistance (MDR). MDR is mainly based on overexpression of P-glycoprotein, an ABC-transporter (*ATP binding cassette*). P-glycoprotein actively transports particular cytostatic drugs out of cancer cells (causing resistance against these drugs). Photo-affinity labeled ligands, i.e. Prazosin and Iodomycin, are used to test binding sites of pharmaceutical agents to P-glycoprotein.

This study aimed to characterize the photo-affinity labeled ligands of [¹²⁵I]iodoarylazidoprazosin to p-glycoprotein in hamster CHO B30-cells and to restrict to specific amino acid-regions.

Using epitope mapping, Greenberger *et al.* identified two major (TM 6, TM 12) and one minor (TM 4 – TM 6) binding sites for iodoarylazidoprazosin. In the present study both chemical cleavage of tryptophan (BNPS-Skatol) and enzymatic cleavage of Lys C of photochemically labeled P-glycoprotein revealed a reproducible pattern. Photo-binding sites of iodoarylazidoprazosin at amino acid 230-312 (TM 4 – TM 5), 746-800 (from fourth extracellular loop to third intracellular loop including TM 8) and 1148-1276 (behind Walker A motif of the second NBD) were identified by Edman-sequencing. Based on these results, the iodoarylazidoprazosin-binding sites need to be corrected. Furthermore, using the present amino acid sequences, a substrate was identified, that used all three major binding sites, as described in the literature for substrate transport.

The substrate binding region of the second cytoplasmic loop has been discussed controversially in topology models. As documented in the literature, a theoretical model has been described, which suggests this domain to be intracellular. In contrast, antibody studies revealed this domain to be extracellular. Utilizing antibody KDI 3541 and α MDR-L4, our studies did not confirm this domain to be extracellular. The presented FACS-data support the hypothesis of the topology model based on hydrophobic analyses.

Due to the application of cytostatic drugs in cells, not only P-glycoprotein is overexpressed but furthermore general metabolism and gene expression are changed. NIH3T3-cells transfected with *MDR1* and selected with 9 µg/ml colchicine (C3000) reveal a difference in morphology in comparison to wt250-cells, that are grown under continuous selection of 100 ng/ml vinblastine. A change in expression of MDR protein of both cells can be observed on transcriptional level and based on molecular weight of p-glycoprotein.

To identify differences in protein pattern of plasma membranes, we separated membrane proteins by two-dimensional gel electrophoresis. The results of 2 D-gelelectrophoresis reveal only 25 % identity in the pattern of plasma membrane proteins between wt250 and C3000 cells. Using mass spectrometry (MALDI-TOF), four quantitatively different proteins have been identified to be specifically overexpressed in C3000 cells. These proteins can be related to increased energy requirements of cells due to substrate transport and metastasis.

7 Literaturverzeichnis

- Azzaria, M., Schurr, E., Gros, P. (1989)** Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish instability to confer multidrug resistance. *Mol. Cell. Biol.* **9** (12), 5289-5297
- Balch, C., Dedman, J. R. (1997)** Annexins II and V inhibit cell migration. *Exp. Cell. Res.* **237**(2), 259-263
- Béja, O., Bibi, E. (1995)** Multidrug resistance protein (Mdr)-alkaline phosphatase hybrids in *Escherichia coli* suggest a major revision in the topology of the C-terminal half of *mdr*. *J. Biol. Chem.* **270**, 12351-12354
- Bergers, G., Coussens, L. M. (2000)** Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**(1), 120-127
- Berleur, F., Roman, V., Jaskierowicz, D., Daveloose, D., Leterrier, F., Ter-Minassian-Saraga, L., Madelmont, G. (1985)** Interaction of vinblastine sulfate with artificial phospholipid membranes. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 3081-3086
- Bruggemann, E. P., Currier, S. J., Gottesman, M. M., Pastan, I. (1992)** Characterization of the azidopine and vinblastine binding site of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **267** (29), 21020-21026
- Bruggemann, E. P., Germann, U. A., Gottesman, M. M., Pastan, I. (1989)** Two different regions of phosphoglycoprotein are photoaffinity-labeled by azidopine. *J. Biol. Chem.* **264**, 15483-15488
- Buschman, E., Gros, P. (1991)** Functional analysis of chimeric genes obtained by exchanging homologous domains of the mouse *mdr1* and *mdr2* genes. *Mol. Cell. Biol.* **11** (2), 595-603
- Charuk, J. H., Grey, A. A., Reithmeier, R. A. (1998)** *Am. J. Physiol.* **274**, 1127-1139
- Chen, C.-J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., Roninson, I. B. (1986)** Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **47**, 381-389
- Chin, K. V., Tanaka, S., Darlington, G., Pastan, I., Gottesman, M. M. (1990)** Heat shock and arsenite increase expression of multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 221-226
- Crimmins, D. L., Mc Court, D. W., Thoma, R. S., Scott, M. G., Macke, K., Schwartz, B. D. (1990)** In situ chemical cleavage of proteins immobilized to glass-fiber and polyvinylidene difluoride membranes: Cleavage at Tryptophan residues with 2-(2'-Nitrophenylsulfenyl)-3-methyl-3-bromoindolenine to obtain internal amino acid sequence. *Anal. Biochem.* **187**, 27-38
- Demmer, A., Andreae, S., Thole, H., Tümmler, B. (1999)** Iodomycin and Iodipine, a structural analogue of azidopine, bind to a common domain in hamster P-glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* **264**, 800-805
- Demmer, A., Thole, H., Kubesch, P., Brandt, T., Raida, M., Fislage, R., Tümmler, B. (1997)** Localization of the Iodomycin Binding Site in Hamster P-Glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **272** (33), 20913-20919

- Dey, S., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M. M., Ambudkar, S. V. (1998)** Photoaffinity Labeling of Human P-Glycoprotein: Effect of Modulator Interaction and ATP Hydrolysis on Substrate Binding. *Meth Enz.*, 318-328
- Doige, C. A., Yu, X., Sharom, F. J. (1993)** The effects of lipids and detergents on ATPase active P-glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* **1146**, 65-72
- Dupou-Ceanne, L., Sautereau, A. M., Tocanne, J. F. (1989)** Localization of adriamycin in model and natural membranes. Influence of lipid molecular packing. *Eur. J. Biochem.* **181**, 695-702
- Endicott, J. A., Ling, V. (1989)** The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 137-171
- Endicott, J. A., Ling, V. (1989)** The biochemistry of P-Glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Biochem.* **58**, 137-171
- Ferguson, P. J., Phillips, J. R., Selner, M., Cass, C. E. (1984)** Differential activity of vincristine and vinblastine against cultured cells. *Cancer Res.* **44**, 3307-3312
- Georges, E., Zhang, J.-T., Ling, V. (1991)** Modulation of ATP and drug binding by monoclonal antibodies against P-glycoprotein. *J. Cell. Physiol.* **148**, 479-484
- Gottesman, M. M., Pastan, I. (1993)** Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 385-427
- Greenberger, L. M. (1993)** 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.* **268** (15), 11417-11425
- Greenberger, L. M., Yang, C. P., Gindin, E., Horwitz, S. B. (1990)** Photoaffinity probes for the alpha 1-adrenergic receptor and the calcium channel bind to a common domain in P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **265** (8), 4394-4401
- Higgins, C. F. (1994)** To flip or not to flip. *Current Biology* **4**, 259-260
- Higgins, C. F., Gottesman, M. M. (1992)** Is the multidrug transporter a flippase ? *TIBS* **17**, 18-21
- Hung, L.-W., Wang, I. X., Nikaido, K., Liu, P.-Q., Ames, G. F.-L., Kim, S.-H. (1998)** Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter *Nature* **396**, 703-707
- Juliano, R. L., Ling, V. (1976)** A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* **455** (1), 152-162
- Juranka, P. F., Zastawny, R. L., Ling, V. (1989)** P-Glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane-associated transport proteins. *FASEB J* **3**, 2583-2592
- Kohno, K., Sato, S., Takano, H., Matsuo, K., Kuwano, M. (1989)** The direct activation of human multidrug resistance gene (MDR1) by anticancer agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 1415-1421
- Lam, P., Ling, V. (1999)** Gosau Identification of peptides sensitive to ligand-induced conformational changes in P-glycoprotein. Poster auf dem ABC-Transporter Kongreß in Gosau 20.-27.2.1999
- Lee, C., Lewin, A., Branton, D. (1987)** Copper staining: A five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **166**, 308-312

- Loo, T. W., Clarke, D. M. (1993)** Functional consequences of proline mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **268**, 3143-3149
- Loo, T. W., Clarke, D. M. (1995)** Membrane topology of a cysteine-less mutant of human P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **270**, 843-848
- Loo, T. W., Clarke, D. M. (1995)** Rapid purification of human P-glycoprotein mutants expressed transiently 293 cells by nickel-chelate chromatography and characterization of their drug-stimulated ATPase activities. *J. Biol. Chem.* **270** (37), 21449-21452
- Loo, T. W., Clarke, D. M. (1996)** Mutational analysis of the predicted first transmembrane segment of each homologous half of human P-glycoprotein suggests that they are symmetric arranged in the membrane. *J. Biol. Chem.* **271** (26), 15414-15419
- Loo, T. W., Clarke, D. M. (1999)** The glycosylation and orientation in the membrane of the third cytoplasmic loop of the human P-glycoprotein is affected by mutations and substrates. *Biochem.* **38**, 5124-5129
- Loo, T., and Clarke, D. (1994)** Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides. *J. Biol. Chem.* **269** (10), 7750-7755
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951)** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Matherall, J. E., Li, H., Waugh, K. (1996)** Role of multidrug resistance P-glycoprotein in cholesterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **271**, 2634-2640
- Mc Clean, S., Whelan, R. D. H., Hosking, L. K., Hodges, G. M., Thompson, F. H., Meyers, M. B., Schuurhuis, J. G., Hill, B. T. (1993)** Characterization of the P-glycoprotein overexpressing drug resistance phenotype exhibited by Chinese hamster ovary cells following their in vitro exposure to fractionated X-irradiation. *Biochem. Biophys. Acta* **1177**, 117-126
- Nelson, A. R., Fingleton, B., Rothenberg, M. L., Matrisian, L. M. (2000)** Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol.* **18**(5), 1135-1149
- Peterson, G. L. (1977)** A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**, 346-356
- Philippova, M. P., Bochkov, V. N., Stambolsky, D. V., Tkachuk, V. A., Resink, T. J. (1998)** T-cadherin and signal-transducing molecules co-localize in caveolin-rich membrane domains of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **429**(2), 207-210
- Raviv, Y., Pollard, H. B., Bruggemann, E. P., Pastan, I., Gottesman, M. M. (1990)** Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells. *J. Biol. Chem.* **265**, 3975-3980
- Rosenberg, M. F., Callaghan, R., Ford, R. C., Higgins, C. F. (1997)** Structure of multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. *J. Biol. Chem.* **272**, 10685-10694
- Saeki, T., Shimabuku, A. M., Ueda, K., Komano, T. (1992)** Specific drug binding by purified lipid-reconstituted P-glycoprotein: dependence on the lipid composition. *Biochem. Biophys. Acta.* **1107**, 105-110
- Saeki, T., Ueda, K., Tanigawara, Y., Hori, R., Komano, T. (1993)** Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J. Biol. Chem.* **268**, 6077-6080

- Saeki, T., Ueda, K., Tanigawara, Y., Hori, R., Komano, T. (1993)** Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J. Biol. Chem.* **268**, 6077-6080
- Schräger, H., von Jagow, G. (1987)** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-379
- Seelig, A. (1998)** How does P-glycoprotein recognize its substrates? *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* **36 (1)**, 50-54
- Seelig, A. (1998)** How does P-Glycoprotein recognize its substrates? *Intern. J. Clin. Pharm. Thera.* **36 (1)**, 50-54
- Senior, A. E., al-Shawi, M. K., Urbatsch, I. L. (1995)** The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett.* **377 (3)**, 285-289
- Shapiro, A. B., Fox, K., Lam, P., Ling, V. (1999)** Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site. *Eur. J. Biochem.* **259(3)**, 841-850
- Sharom, F. J., Yu, X., Chu, J. W., Doige, C. A. (1995)** Characterization of the ATPase activity of P-glycoprotein from multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Biochem. J.* **308**, 381-390
- Sirover, M. A. (1999)** New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1432(2)**, 159-184
- Skach, W. R., Calayag, M. C., Lingappa, V. R. (1993)** Evidence for an alternate model of human P-glycoprotein structure and biogenesis. *J. Biol. Chem.* **268**, 6903-6908
- Smith, D. B., Johnson, K. S. (1989)** Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31
- Uchiumi, T., Kohno, K., Tanimura, H., Matsuo, K., Sato, S., Uchida, Y., Kuwano, M. (1993)** Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Differ* **4**, 147-157
- Van Veen, H. W., Putman, M., Margolles, A., Sakamoto, K., Konings, W. N. (1999)** Structure-function analysis of multidrug transporters in *Lactococcus lactis*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1461**, 201-206
- Vinogradov, S. N., Linnell, R. H. (1971)** *Hydrogen Bonding*. Van Nostrand Reinhold, New York
- Walter, H., Krob, E. J., Webber, T. J., Ascher, G. S., Morin, R. J. (1979)** Effect of membrane cholesterol enrichment or depletion on the partition behavior of human erythrocytes in dextran-poly (ethylene glycol) aqueous phases. *Biochem. Biophys. Acta.* **550**, 138-144
- Wu, Q., Bounaud, P.-Y., Kuduk, S. D., Yang, C.-P. H., Ojima, I., Horwitz, S. B., Orr, G. A. (1998)** 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* **37**, 11272-11279
- Zhang, J.-T. (1998)** Use of Cell-Free Systems to Determine P-Glycoprotein Transmembrane Topology. *Methods in Enzymology Volume 292: Biochemical, Cellular, and Molecular Aspects* 279-289

- Zhang, J.-T., Duthie, M., Ling, V. (1993)** Membrane topology of the N-terminal half of the hamster P-glycoprotein molecule. *J. Biol. Chem.* **268**, 15101-15110
- Zhang, M., Wang, G., Shapiro, A., Zhang, J. T. (1996)** Topological Folding and Proteolysis Profile of P-glycoprotein in Membranes of Multidrug-Resistant Cells: Implications for the Drug-Transport Mechanism. *Biochem.* **35**, 9728-9736
- Zhang, X., Collins, K. I., Greenberger, L. M. (1995)** Funktional Evidence That Transmembrane 12 and the Loop between Transmembrane 11 and 12 Form Part of the Drug-binding Domain in P-glycoprotein Encoded by *MDR1*. *J. Biol. Chem.* **270 (10)**, 5441-5448

Anhang

Ein-Buchstaben-Code der Aminosäure

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

Aminosäuresequenz des P-Glykoproteins aus Hamster (Isoform pgp1)

MEFEEDFSGR 70	KDKNFLKMGR	KSKKEKKEKK	PVVSVFTMFR	YAGWLDRLYM	LVGTLAAIIH	GVALPLMLLV
FGDMTDSFAS 140	VGNIPTNATN	NATQVNASDI	FGKLEEMTT	YAYYYTGIGA	GV LIVAYIQV	SFWCLAAGRQ
IHKIRQKFFH 210	AIMNQEIGWF	DVHDV GELNT	RLTDDVSKIN	EGIGDKIGMF	FQAMATFFGG	FIIGFTRGWK
LTLVILAI SP 280	VLGLSAGIWA	KILSSFTDKE	LQAYAKAGAV	AAEVLAAIRT	VIAFGGQKKE	LERYNNNLEE
AKRLGIKKAI 350	TANISMGA AF	LLIYASYALA	FWYGTSLVIS	KEYSIGQVLT	VFFAVLIAPF	SIGQASP NIE
AFANARGAAY 420	EIFNIIDNKP	SIDSF SKNGY	KPDNIKGNLE	FKNIHFSYPS	RKDVQILKGL	NLKVQSGQTV
ALVGN SGC GK 490	STTVQLQRL	YDPTEGVVSI	DGQDIRTINV	RYLREIIGVV	SQEPVLFATT	IAENIRYGRE
NVTMDEIEKA 560	VKEANAYDFI	MKLPHKFDTL	VGERGAQ LSG	GQKQRIAIAR	ALVRNPK ILL	LDEATSALDT
ESEAVVQAAL 630	DKAREGR TTI	VIAHRLSTVR	NADIIAGFDG	GVIVEQGNHE	ELMREKGIYF	KLVMTQTAGN
EIELGNEVGE 700	SKNEIDNLDM	SSKDSASSLI	RRRSTRRSIR	GPHDQDRKLS	TKEALDEDVP	PISFWRILKL
NSSEWPYFV V 770	GIFCAIVNGA	LQPAFSII FS	KVVGVFTRNT	DDETKRHDSN	LFSLLFLILG	VISFITFFLQ
GFTFGKAGEI 840	LTKRLRYMVF	KSM LRQDVSW	FDNPKNTTGA	LTTRLANDAG	QVKGATGARL	AVITQNIANL
GTGIIISLIY 910	GWQLTLLLLL	IVPIIAIAGV	VEKM LSGQA	LKDKKELEGS	GKIATEAIEN	FRTVVS LTR E
QKFENMYAQS 980	LQIPYRNALK	KAHVFGITFS	FTQAMMYFSY	AACFRFGAYL	VARELMTFEN	VLLVFS AIVF
GAMAVGQVSS 1050	FAPDYAKAKV	SASHIIMIE	KVPSIDSYST	GGLKPNTLEG	NVKFNEVVFN	YPTRPDIPVL
QGLNLEVKKG 1120	QTLALVGSSG	CGKSTVVQLL	ERFYDPMAGT	VFLDGKEVNQ	LNQWLRAHL	GIVSQEPILF
DCSIAENIAY 1190	GDNSRVVSQD	EIERAAKEAN	IHQFIESLPD	KYNTRVGDKG	TQLSGGQKQR	IAIARALVRQ
PHILLLDEAT 1260	SALDTESEKV	VQEALDKARE	GRTCIVIAHR	LSTIQNADLI	VVIQNGKVKE	HGTHQQLLAQ
KGIYFSMVS V 1276	QAGAKR					

Größenstandards

λ -*BstE* II (New England Biolabs)

8454 / 7242 / 6369 / 5686 / 4822 / 4324 / 3675 / 2323 / 1929 / 1371 / 1264 / 702 bp

1 kbp-Standard (New England Biolabs)

10002 / 8001 / 6001 / 5001 / 4001 / 3001 / 200 / 1500 / 1000 / 500 bp

25 bp-Standard (Gibco BRL)

500 / 475 / 450 / 425 / 400 / 375 / 350 / 325 / 300 / 275 / 250 / 225 / 200 / 175 / 250 / 225 / 200 / 175 / 150 / 125 / 100 / 75 / 50 / 25 bp

Niedermolekularer Standard (Gibco BRL)

46 / 29 / 20,3 / 14,6 / 5,8 / 3 kDa

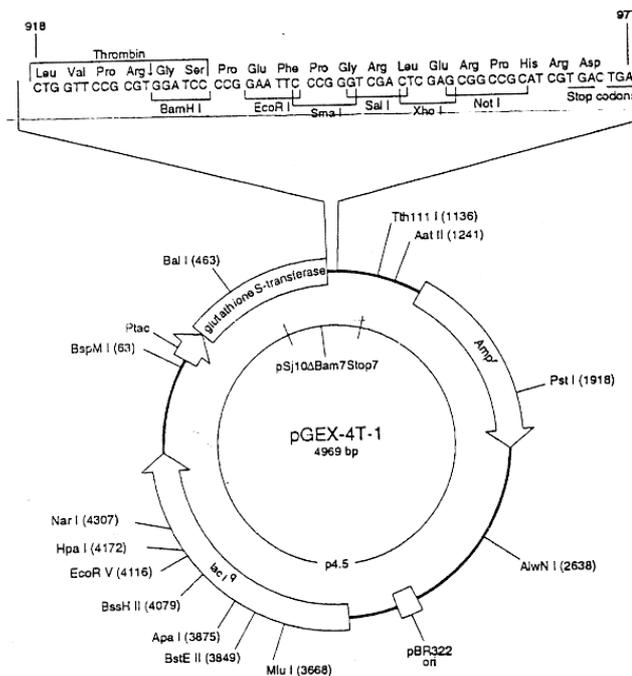
Hochmolekularer Standard (Gibco BRL)

190 / 125 / 88 / 65 / 43 / 35 / 33 kDa

Standard VI (Boehringer)

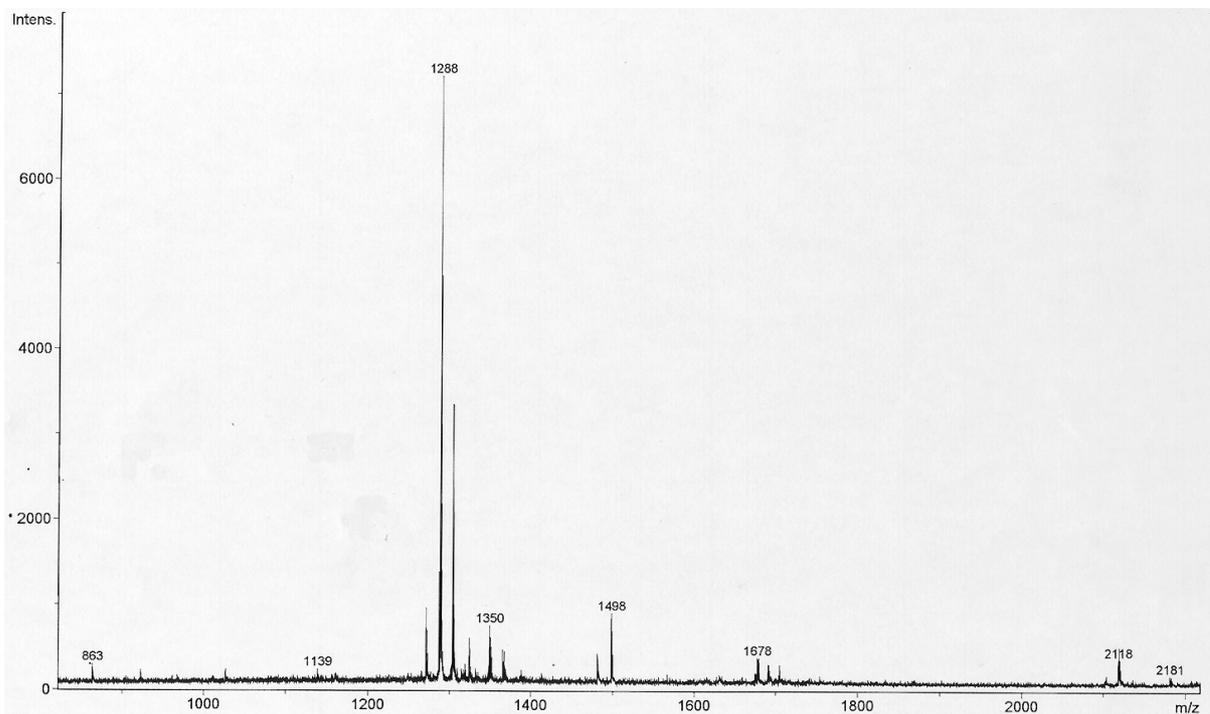
2176 / 1766 / 1230 / 1033 / 653 / 517 / 453 / 394 / 298 / 234 / 220 / 154 bp

Plasmidkarte pGEX-4T(1) (Pharmacia Biotech)

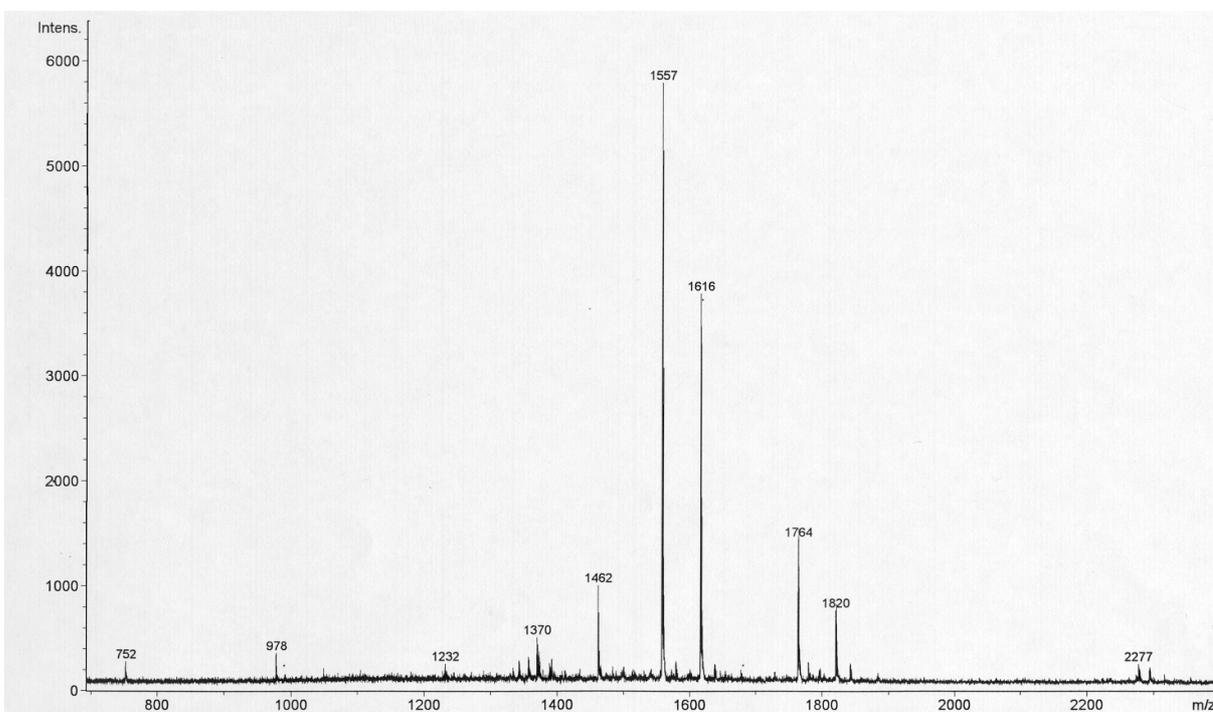


Über MALDI-TOF ermittelte Spektren:

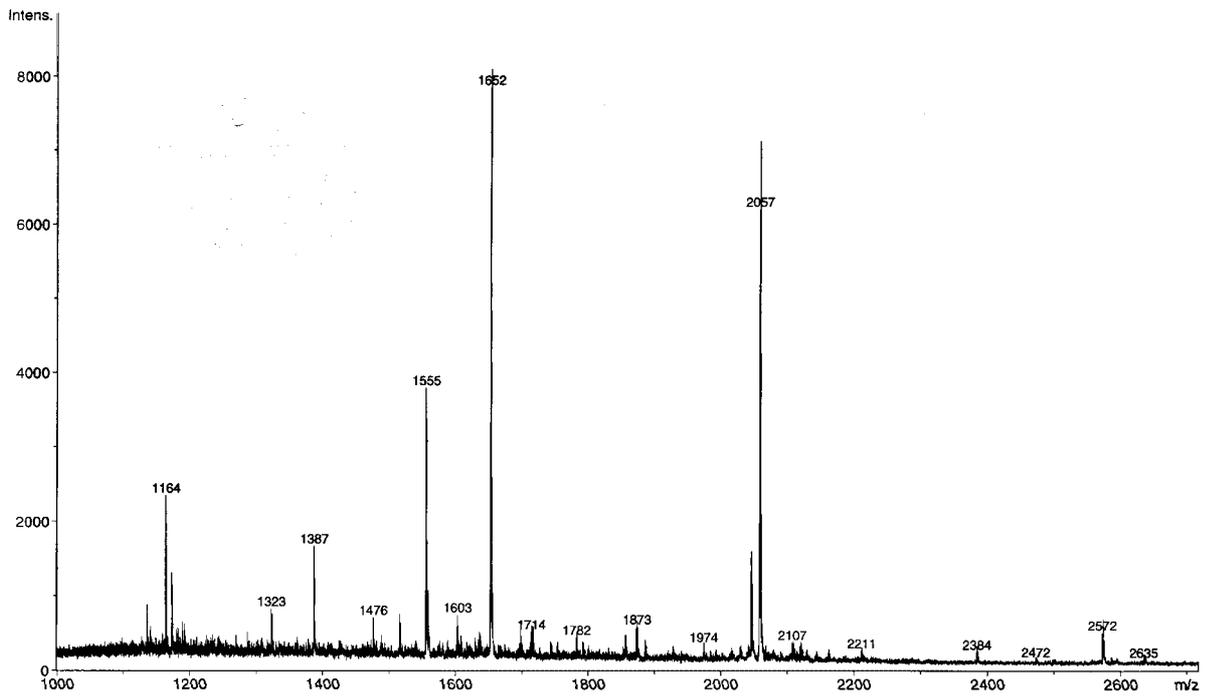
Probe 1:



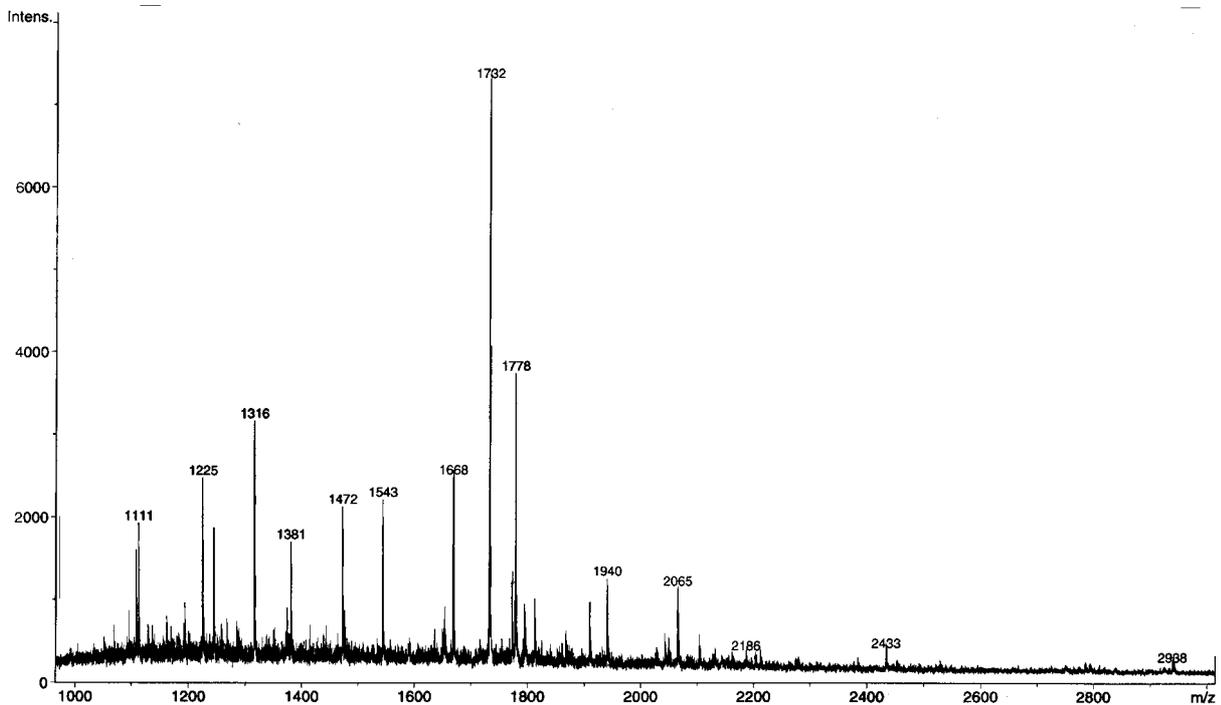
Probe 4:



Probe 5:



Probe 6:



Vollständige cDNA-und Aminosäuresequenz von humanem P-Glykoprotein

DNA:	ATGGATCTTGAAGGGGACCGCAATGGAGGAGCAAAGAAGAAGAACTTTTTT	51
+1:	M D L E G D R N G G A K K K N F F	17
DNA:	AAACTGAACAATAAAAAGTGAAAAAGATAAGAAGGAAAAGAAACCAACTGTC	102
+1:	K L N N K S E K D K K E K K P T V	34
DNA:	AGTGTATTTTCAATGTTTCGCTATTCAAATTGGCTTGACAAGTTGTATATG	153
+1:	S V F S M F R Y S N W L D K L Y M	51
DNA:	GTGGTGGGAACTTTGGCTGCCATCCATGGGGCTGGACTTCCTCTCATG	204
+1:	V V G T L A A I I H G A G L P L M	68
DNA:	ATGCTGGTGTTTGGAGAAATGACAGATATCTTTGCAAATGCAGGAAATTTA	255
+1:	M L V F G E M T D I F A N A G N L	85
DNA:	GAAGATCTGATGTCAAACATCACTAATAGAAGTGATATCAATGATACAGGG	306
+1:	E D L M S N I T N R S D I N D T G	102
DNA:	TTCTTCATGAATCTGGAGGAAGACATGACCAGGTATGCCTATTATTACAGT	357
+1:	F F M N L E E D M T R Y A Y Y Y S	119
DNA:	GGAATTGGTGCTGGGGTGCTGGTTGCTGCTTACATTTCAGGTTTCATTTTGG	408
+1:	G I G A G V L V A A Y I Q V S F W	136
DNA:	TGCCTGGCAGCTGGAAGACAAATACAAAAATTAGAAAACAGTTTTTTTCAT	459
+1:	C L A A G R Q I H K I R K Q F F H	153
DNA:	GCTATAATGCGACAGGAGATAGGCTGGTTTGATGTGCACGATGTTGGGGAG	510
+1:	A I M R Q E I G W F D V H D V G E	170
DNA:	CTTAACACCCGACTTACAGATGATGTCTCCAAGATTAATGAAGGAATTGGT	561
+1:	L N T R L T D D V S K I N E G I G	187
DNA:	GACAAAATTGGAATGTTCTTTTCAGTCAATGGCAACATTTTTTCACTGGGTTT	612
+1:	D K I G M F F Q S M A T F F T G F	204
DNA:	ATAGTAGGATTTACACGTGGTTGGAAGCTAACCCCTTGTGATTTTGGCCATC	663
+1:	I V G F T R G W K L T L V I L A I	221
DNA:	AGTCTGTCTTGGACTGTCTGCTGTCTGGGCAAAGATACTATCTTCA	714
+1:	S P V L G L S A A V W A K I L S S	238
DNA:	TTTACTGATAAAGAAGCTTTAGCGTATGCAAAAGCTGGAGCAGTAGCTGAA	765
+1:	F T D K E L L A Y A K A G A V A E	255
DNA:	GAGGTCTTGGCAGCAATTAGAAGCTGTGATTGCATTTGGAGGACAAAAGAAA	816
+1:	E V L A A I R T V I A F G G Q K K	272
DNA:	GAACCTGAAAGGTACAACAAAATTTAGAAGAAGCTAAAAGAATTGGGATA	867
+1:	E L E R Y N K N L E E A K R I G I	289
DNA:	AAGAAAGCTATTACAGCCAATATTTCTATAGGTGCTGCTTTCCTGCTGATC	918
+1:	K K A I T A N I S I G A A F L L I	306
DNA:	TATGCATCTTATGCTCTGGCCTTCTGGTATGGGACCACCTTGGTCTCTCA	969
+1:	Y A S Y A L A F W Y G T T L V L S	323
DNA:	GGGGAATATTCTATTGGACAAGTACTCACTGTATTTTCTGTATTAATTGGG	1020
+1:	G E Y S I G Q V L T V F S V L I G	340
DNA:	GCTTTTAGTGTGGACAGGCATCTCCAAGCATTGAAGCATTGCAAATGCA	1071
+1:	A F S V G Q A S P S I E A F A N A	357
DNA:	AGAGGAGCAGCTTATGAAATCTTCAAGATAATTGATAATAAGCCAAGTATT	1122
+1:	R G A A Y E I F K I I D N K P S I	374
DNA:	GACAGCTATTCGAAGAGTGGGCACAAACCAGATAATATTAAGGGAAATTTG	1173
+1:	D S Y S K S G H K P D N I K G N L	391
DNA:	GAATTCAGAAATGTTCACTTTCAGTTACCCATCTCGAAAAGAAGTTAAGATC	1224
+1:	E F R N V H F S Y P S R K E V K I	408
DNA:	TTGAAGGGTCTGAACCTGAAGGTGCAGAGTGGGCAGACGGTGGCCCTGGTT	1275
+1:	L K G L N L K V Q S G Q T V A L V	425
DNA:	GGAAACAGTGGCTGTGGGAAGAGCACAAACAGTCCAGCTGATGCAGAGGCTC	1326
+1:	G N S G C G K S T T V Q L M Q R L	442
DNA:	TATGACCCACAGAGGGGATGGTCACTGTTGATGGACAGGATATTAGGACC	1377
+1:	Y D P T E G M V S V D G Q D I R T	459

Anhang

DNA: ATAAATGTAAGGTTTCTACGGGAAATCATTTGGTGTGGTGAGTCAGGAACCT 1428
+1: I N V R F L R E I I G V V S Q E P 476
DNA: GTATTGTTTGCCACCACGATAGCTGAAAACATTCGCTATGGCCGTGAAAAT 1479
+1: V L F A T T I A E N I R Y G R E N 493
DNA: GTCACCATGGATTGAGATTGAGAAAGCTGTCAAGGAAGCCAATGCCTATGAC 1530
+1: V T M D E I E K A V K E A N A Y D 510
DNA: TTTATCATGAAACTGCCTCATAAATTTGACACCCCTGGTTGGAGAGAGAGGG 1581
+1: F I M K L P H K F D T L V G E R G 527
DNA: GCCCAGTTGAGTGGTGGGCAGAAGCAGAGGATCGCCATTGCACGTGCCCTG 1632
+1: A Q L S G G Q K Q R I A I A R A L 544
DNA: GTTCGCAACCCCAAGATCCTCCTGCTGGATGAGGCCACGTGAGCCTTGGAC 1683
+1: V R N P K I L L L D E A T S A L D 561
DNA: ACAGAAAGCGAAGCAGTGGTTTCAAGTGGCTCTGGATAAGGCCAGAAAAGGT 1734
+1: T E S E A V V Q V A L D K A R K G 578
DNA: CGGACCACATTGTGATAGCTCATCGTTTGTCTACAGTTCGTAATGCTGAC 1785
+1: R T T I V I A H R L S T V R N A D 595
DNA: GTCATCGCTGGTTTTCGATGATGGAGTCATTTGTGGAGAAAGGAAATCATGAT 1836
+1: V I A G F D D G V I V E K G N H D 612
DNA: GAACTCATGAAAGAGAAAGGCATTTACTTCAAACCTTGTCAATGCAGACA 1887
+1: E L M K E K G I Y F K L V T M Q T 629
DNA: GCAGGAAATGAAGTTGAATTAGAAAATGCAGCTGATGAATCCAAAAGTGAA 1938
+1: A G N E V E L E N A A D E S K S E 646
DNA: ATTGATGCCTTGGAAATGTCTTCAAATGATTCAAGATCCAGTCTAATAAGA 1989
+1: I D A L E M S S N D S R S S L I R 663
DNA: AAAAGATCAACTCGTAGGAGTGTCCGTGGATCACAAGCCCAAGACAGAAAG 2040
+1: K R S T R R S V R G S Q A Q D R K 680
DNA: CTTAGTACCAAAGAGGCTCTGGATGAAAGTATACCTCCAGTTTCCTTTTGG 2091
+1: L S T K E A L D E S I P P V S F W 697
DNA: AGGATTATGAAGCTAAATTTAACTGAATGGCCTTATTTTGTGTTGGTGTA 2142
+1: R I M K L N L T E W P Y F V V G V 714
DNA: TTTTGTGCCATTATAAATGGAGGCCTGCAACCAGCATTGTGCAATAATATTT 2193
+1: F C A I I N G G L Q P A F A I I F 731
DNA: TCAAAGATTATAGGGGTTTTTACAAGAATTGATGATCCTGAAACAAAACGA 2244
+1: S K I I G V F T R I D D P E T K R 748
DNA: CAGAATAGTAACCTGTTTTCTACTATTGTTTCTAGCCCTTGGAAATTATTTCT 2295
+1: Q N S N L F S L L F L A L G I I S 765
DNA: TTTATTACATTTTTTCTTCAGGGTTTTACATTTGGCAAAGCTGGAGAGATC 2346
+1: F I T F F L Q G F T F G K A G E I 782
DNA: CTCACCAAGCGGCTCCGATACATGGTTTTTCCGATCCATGCTCAGACAGGAT 2397
+1: L T K R L R Y M V F R S M L R Q D 799
DNA: GTGAGTTGGTTTTGATGACCCTAAAAACACCACTGGAGCATTGACTACCAGG 2448
+1: V S W F D D P K N T T G A L T T R 816
DNA: CTCGCCAATGATGCTGCTCAAGTTAAAGGGGCTATAGGTTCCAGGCTTGCT 2499
+1: L A N D A A Q V K G A I G S R L A 833
DNA: GTAATTACCAGAATATAGCAAATCTTGGGACAGGAATAATTATATCCTTC 2550
+1: V I T Q N I A N L G T G I I I S F 850
DNA: ATCTATGGTTGGCAACTAACACTGTTACTCTTAGCAATTGTACCCATCATT 2601
+1: I Y G W Q L T L L L L A I V P I I 867
DNA: GCAATAGCAGGAGTTGTTGAAATGAAAATGTTGTCTGGACAAGCACTGAAA 2652
+1: A I A G V V E M K M L S G Q A L K 884
DNA: GATAAGAAAGAACTAGAAGGTGCTGGGAAGATCGCTACTGAAGCAATAGAA 2703
+1: D K K E L E G A G K I A T E A I E 901
DNA: AACTTCCGAACCGTTGTTTCTTTGACTCAGGAGCAGAAGTTTGAACATATG 2754
+1: N F R T V V S L L T Q E Q K F E H M 918
DNA: TATGCTCAGAGTTTGCAGGTACCATACAGAAACTCTTTGAGGAAAGCACAC 2805
+1: Y A Q S L Q V P Y R N S L R K A H 935

DNA: ATCTTTGGAATTACATTTTCCTTCACCCAGGCAATGATGTATTTTTCCTAT 2856
+1: I F G I T F S F T Q A M M Y F S Y 952
DNA: GCTGGATGTTTCCGGTTTGGAGCCTACTTGGTGGCACATAAACTCATGAGC 2907
+1: A G C F R F G A Y L V A H K L M S 969
DNA: TTTGAGGATGTTCTGTTAGTATTTTCAGTGTGTCTTTGGTGCCATGGCC 2958
+1: F E D V L L V F S A V V F G A M A 986
DNA: GTGGGGCAAGTCAGTTCATTTGCTCCTGACTATGCCAAAGCCAAAATATCA 3009
+1: V G Q V S S F A P D Y A K A K I S 1003
DNA: GCAGCCCACATCATCATGATCATTGAAAAAACCCCTTTGATTGACAGCTAC 3060
+1: A A H I I M I I E K T P L I D S Y 1020
DNA: AGCACGGAAGGCCTAATGCCGAACACATTGGAAGGAAATGTCACATTTGGT 3111
+1: S T E G L M P N T L E G N V T F G 1037
DNA: GAAGTTGTATTCAACTATCCCACCCGACCGGACATCCCAGTGCTTCAGGGA 3162
+1: E V V F N Y P T R P D I P V L Q G 1054
DNA: CTGAGCCTGGAGGTGAAGAAGGCCAGACGCTGGCTCTGGTGGGCGAGCAGT 3213
+1: L S L E V K K G Q T L A L V G S S 1071
DNA: GGCTGTGGGAAGAGCACAGTGGTCCAGCTCCTGGAGCGGTTCTACGACCCC 3264
+1: G C G K S T V V Q L L E R F Y D P 1088
DNA: TTGGCAGGGAAAGTGCTGCTTGATGGCAAAGAAATAAAGCGACTGAATGTT 3315
+1: L A G K V L L D G K E I K R L N V 1105
DNA: CAGTGGCTCCGAGCACACCTGGGCATCGTGTCCAGGAGCCCATCCTGTTT 3366
+1: Q W L R A H L G I V S Q E P I L F 1122
DNA: GACTGCAGCATTGCTGAGAACATTGCCTATGGAGACAACAGCCGGGTGGTG 3417
+1: D C S I A E N I A Y G D N S R V V 1139
DNA: TCACAGGAAGAGATTGTGAGGGCAGCAAAGGAGCCAAACATACATGCCTTC 3468
+1: S Q E E I V R A A K E A N I H A F 1156
DNA: ATCGAGTCACTGCCTAATAAATATAGCACTAAAGTAGGAGACAAAGGAACT 3519
+1: I E S L P N K Y S T K V G D K G T 1173
DNA: CAGCTCTCTGGTGGCCAGAAACAACGCATTGCCATAGCTCGTGCCCTTGTT 3570
+1: Q L S G G Q K Q R I A I A R A L V 1190
DNA: AGACAGCCTCATATTTTGGCTTTTGGATGAAGCCACGTCAGCTCTGGATACA 3621
+1: R Q P H I L L L D E A T S A L D T 1207
DNA: GAAAGTGAAAAGGTTGTCCAAGAAGCCCTGGACAAAGCCAGAGAAGGCCGC 3672
+1: E S E K V V Q E A L D K A R E G R 1224
DNA: ACCTGCATTGTGATTGCTCACCGCCTGTCCACCATCCAGAATGCAGACTTA 3723
+1: T C I V I A H R L S T I Q N A D L 1241
DNA: ATAGTGGTGTTCAGAATGGCAGAGTCAAGGAGCATGGCACGCATCAGCAG 3774
+1: I V V F Q N G R V K E H G T H Q Q 1258
DNA: CTGCTGGCACAGAAAGGCATCTATTTTCAATGGTCAGTGTCCAGGCTGGA 3825
+1: L L A Q K G I Y F S M V S V Q A G 1275
DNA: ACAAAGCGCCAGTGA
+1: T K R Q *

Lebenslauf

Name: Isenberg, Bärbel Inka

Anschrift: Bronsartstraße 24
30161 Hannover

Geburtsdatum: 09. April 1972

Geburtsort: Lüneburg

Familienstand: ledig

Vater: Isenberg, Klaus Dieter; Maschinenbauer; geboren am 03. Mai 1941, verstorben am 14. Juli 1982

Mutter: Isenberg, Lorita, geborene Lauter; Einzelhandelskauffrau; geboren am 06. August 1945

Geschwister: Isenberg, Torsten; Diplomingenieur der technischen Informatik; geboren am 16. Dezember 1965

Isenberg, Kay; Bierbrauer und Mälzer; geboren am 06. Januar 1969

Schulbildung: Mitte 1978 bis Mitte 1982 Grundschule Bardowick
Mitte 1982 bis Mitte 1984 Orientierungsstufe Bardowick
Mitte 1984 bis Mitte 1988 Realschule Scharnebeck
Mitte 1988 bis Mitte 1991 Fachgymnasium Hauswirtschaft
Berufsbildende Schule III Lüneburg

Universitätsbesuch: Aufnahme des Studiengangs Biologie (Diplom) im Oktober 1991 an der Justus-Liebig Universität Giessen

Wechsel zum Sommersemester 1993 an die Universität Hannover

Diplom: bestanden am 15. Juli 1997

Promotion: Aufnahme der Promotion zum 01. November 1997 an der Medizinischen Hochschule Hannover in die Gruppe von Prof. Dr. Dr. Tümmler mit dem Thema: „Analyse der Substratbindungsstellen des P-Glykoproteins“