

**Optimierung der Aufreinigung und  
Rekonstitution von humanem P-Glykoprotein in  
*S. cerevisiae* zur Charakterisierung neuer  
Modulatoren**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Jürgen Gerhard Sievers

aus

Kreuztal

Bonn 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2001 bis Dezember 2005 in der Pharmazeutischen Chemie des Pharmazeutischen Instituts der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Michael Wiese angefertigt.

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

Referent: Prof. Dr. Michael Wiese

Korreferent: Prof. Dr. Matthias Kassack

Erscheinungsjahr: 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Michael Wiese, danke ich ganz herzlich für das Überlassen des Themas und die wohlwollende fachliche Betreuung dieser Arbeit. Besonders möchte ich mich für bei Ihm für den Auslandsaufenthalt an der University of Virginia, Charlottesville, U.S.A, bedanken, der ohne seine Hilfe nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. Marwan K. Al-Shawi danke ich für die ausführliche Betreuung und freundschaftliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe in der Abteilung Molecular Physiology & Biophysics, University of Virginia, Charlottesville, U.S.A

Herrn Prof. Dr. Matthias Kassack danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. Werner Klinkhammer danke ich für die Synthese der Substanzen

Herrn Jens Meyer danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit im Labor und im Denkraum.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) danke ich für die Gewährung eines Auslandsstipendium für Doktoranden

Ein Dankeschön gilt ferner allen Freunden, Kollegen und meiner Familie die mir während der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite gestanden haben.

Ein weiteres Dankeschön gilt Herrn Dannon Mills Smith und Herrn Dieter Baumert für exzellente technische Unterstützung

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Krebstherapie und P-Glykoprotein</b>	<b>1</b>
1.1.1	Krebstherapie	1
1.1.2	Multidrug-Resistenz	2
1.1.3	ATP-Binding-Cassette-Transporter	3
1.1.4	Substrate und Modulatoren von P-Gp	4
1.1.5	Aufbau von P-Glykoprotein	8
1.1.6	Funktionen von P-Glykoprotein	9
1.1.7	Bindungsstellen	10
1.1.8	Postulierte Transportzyklen	11
1.2	<b>Fragestellung</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
2.1	<b>Verwendete Hefe-Stämme und Plasmide</b>	<b>18</b>
2.1.1	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.1.2	Fermentation von <i>S. cerevisiae</i>	21
2.1.2.1	Kontinuierliche Fermentation	22
2.1.2.2	Diskontinuierliche Fermentation	24
2.2	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>26</b>
2.2.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	26
2.2.2	Plasmid-DNA-Extraktion aus <i>E. coli</i>	27
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.2.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	28
2.2.5	DNA-Konzentrationsbestimmung	28
2.2.6	DNA-Verdau mit Typ II Endonukleasen	29
2.2.7	Ligation	30
2.2.8	Standard-Ligation	30
2.2.8.1	Ligation mit dem Rapid-Ligation-Kit	31
2.2.9	Transformation von <i>E. coli</i>	31
2.2.9.1	Transformation mit der Heat-Shock Methode	31
2.2.9.2	Transformation mittels Elektroporation	32
2.2.10	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	33
2.2.11	Oligonukleotide (Primer)	35
2.2.12	DNA-Sequenzierung	35
2.2.13	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35

2.2.14	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	37
<b>2.3</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>38</b>
2.3.1	Membranpräparation von Hefezellen .....	38
2.3.2	Herstellung von Liposomen.....	41
2.3.2.1	Herstellung der Lipidsuspension .....	41
2.3.2.2	Herstellung von kleinen unilamillaren Vesikeln (SUV) mit rekonstituiertem P-Gp mittels Dialyse .....	42
2.3.2.3	Herstellung von LUV durch Extrusion .....	43
2.3.3	Reinigung und Rekonstitution von P-Gp aus Hefe-Plasmamembranen.....	44
2.3.4	Proteinbestimmung .....	47
2.3.4.1	Amido-Schwarz-Protein-Assay.....	47
2.3.4.2	Peterson-Lowry-Protein-Assay.....	49
2.3.4.3	Bradford-Assay .....	50
2.3.5	Semi-Quantifizierung der Reinheit von P-Gp durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
2.3.5.1	SDS-PAGE .....	51
2.3.5.2	Reinheitsbestimmung.....	53
2.3.6	Immuno-Blot (Western-Blot).....	55
2.3.6.1	Proteinkonzentrations-Bestimmung durch Immuno-Blot.....	57
<b>2.4</b>	<b>Analytische Methoden .....</b>	<b>57</b>
2.4.1	ATPase-Assay.....	57
2.4.1.1	Herstellen von 400 mmol/L ATP-Stamm-Lösung .....	57
2.4.1.2	Bestimmung der ATPase Aktivität von P-Gp.....	58
2.4.1.3	Bestimmung der Expressionsrate von P-Gp in Hefemembranen .....	60
2.4.2	CHAPS-Latency-Assay .....	61
2.4.2.1	Bestimmung des freien Phosphats.....	64
2.4.3	Bestimmung der Dissoziationskonstanten .....	65
2.4.4	Bestimmung des Verteilungskoeffizienten .....	67
<b>2.5</b>	<b>Bestimmung der Zellteilungsrate.....</b>	<b>70</b>
2.5.1	Gompertz-Funktion.....	70
<b>2.6</b>	<b>Auswertung der ATPase Aktivitätsdaten .....</b>	<b>71</b>
2.6.1	Michaelis-Menten-Kinetik .....	71
2.6.2	P-Gp Steady-State .....	71
2.6.3	Hill-Gleichung .....	72
<b>2.7</b>	<b>Substanzen.....</b>	<b>73</b>

2.7.1	Zytostatika .....	73
2.7.2	MDR-Modulatoren .....	74
2.7.2.1	Standard-Modulatoren .....	74
2.7.2.2	WK-X-Derivate mit basischem Tetrahydroisochinolinrest .....	75
2.7.2.3	WK-X-Derivate mit 6,7-Dimethoxytetrahydroisochinolinrest.....	76
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>78</b>
<b>3.1</b>	<b>Expression von P-Glycoprotein in <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>78</b>
3.1.1	Konstruktion der Expressionsvektoren.....	80
3.1.1.1	Konstruktion von pYex-BJ-CX-MDR1 und pYex-BJ-CX-MDR1-6His .....	80
3.1.1.2	Konstruktion von Vektoren mit 12- und 15-fach Histidin markiertem P-Gp.	83
3.1.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	85
3.1.2.1	Übersicht über die klonierten Stämme.....	85
3.1.2.2	Kontrolle der Transformation durch Plasmid-Extraktion .....	86
3.1.2.3	Kontrolle der Expression durch RNA-Isolation .....	86
3.1.2.4	Kontrolle der Expression durch Immun-Blotting .....	88
3.1.2.5	Fermentation zur Gewinnung von P-Glykoprotein.....	89
3.1.3	Membran-Präparation aus <i>S. cerevisiae</i> Zellen .....	91
3.1.4	Aufreinigung und Rekonstitution von P-Glykoprotein.....	93
3.1.5	Lipide zur Rekonstitution .....	96
3.1.5.1	Aufreinigung und Rekonstitution in verschiedenen Lipid-Mischungen .....	96
3.1.6	Rekonstitution von P-Glykoprotein in extrudierten Liposomen .....	99
3.1.6.1	Aufreinigung von P-Gp mit 12- und 15-facher Histidin-Markierung.....	102
3.1.6.2	Aufreinigung und Rekonstitution des 15fach Histidin markierten P-Gp.....	104
3.1.7	Solubilisierung mit Taurodeoxycholsäure.....	105
3.1.8	Entwicklung eines neuen Expressionssystems.....	109
3.1.8.1	Test auf funktionelle Expression.....	109
3.1.8.2	Bestimmung des Expressionslevels in den Membranen.....	112
3.1.8.3	Aufreinigung und Rekonstitution.....	114
3.1.8.4	Charakterisierung des P-Gp aus den Ergosteroldefizienten Stämmen.....	118
<b>3.2</b>	<b>Diskussion zu den Ergebnissen der P-Glykoprotein Aufreinigung .....</b>	<b>120</b>
3.2.1	Aufreinigung des P-Glykoprotein.....	120
3.2.2	Überblick über P-Glykoprotein Expressionssysteme .....	121
3.2.3	Optimierung des etablierten BJ5457 RAF13 Expressionssystems.....	123
3.2.4	Entwicklung eines neuen Expressionssystems.....	126
<b>3.3</b>	<b>Charakterisierung verschiedener P-Gp Präparationen.....</b>	<b>132</b>

3.3.1	Bestimmung der dosis-abhängigen ATPase Aktivität bekannter Modulatoren und Substrate .....	135
3.3.2	Bestimmungen der Dosis-abhängigen Stimulation der ATPase Aktivität von P-Glykoprotein durch neue Modulatoren .....	143
3.3.2.1	Kurvenanpassung der stimulierten ATPase Aktivität .....	144
3.3.2.2	ATPase Aktivität der WK-X-Verbindungen mit Tetrahydroisochinolinrest..	145
3.3.3	Kombinationsversuche .....	155
<b>3.4</b>	<b>Diskussion der ATPase Affinitätsdaten .....</b>	<b>159</b>
<b>3.5</b>	<b>Diskussion der Dosis-abhängigen ATPase Aktivitätsdaten .....</b>	<b>164</b>
3.5.1.1	Konzentration von ATP in den Reaktionen .....	164
3.5.1.2	Einfluss der der WK-X Verbindungen auf die ATPase Aktivität .....	166
3.5.1.3	Auswertung der ATPase Aktivitätsdaten mit zwei Fit-Funktionen.....	169
3.5.1.4	Kombinationsversuche Rhodamin mit Hoechst.....	169
3.5.1.5	Imatinib .....	170
<b>3.6</b>	<b>log P-Wert Bestimmung .....</b>	<b>172</b>
3.6.1	Bestimmung des log P-Wertes ausgewählter Modulatoren .....	172
3.6.1.1	Validierung der potentiometrischen $pK_a$ und Log P Bestimmung .....	173
3.6.1.2	Bestimmung des $pK_a$ -Wertes ausgewählter WK-X-Verbindungen.....	176
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>186</b>
<b>5</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>190</b>
<b>5.1</b>	<b>Vektorkarten.....</b>	<b>190</b>
5.1.1	Plasmide ohne ABCB1 cDNA Insert .....	190
5.1.2	Plasmide mit ABCB1 cDNA Insert .....	191
<b>5.2</b>	<b>Elektronenmikroskopie .....</b>	<b>193</b>
<b>5.3</b>	<b>Immuno Blot.....</b>	<b>194</b>
<b>5.4</b>	<b>Primer .....</b>	<b>195</b>
<b>5.5</b>	<b><i>E. coli</i> Stämme .....</b>	<b>196</b>
<b>5.6</b>	<b>Chemikalien.....</b>	<b>196</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>199</b>

<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>201</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>213</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Krebstherapie und P-Glykoprotein

### 1.1.1 Krebstherapie

Unter Krebs versteht man das unkontrollierte Wachstum von Körperzellen, die dabei gesundes Gewebe verdrängen oder zerstören. Ein Tumor ist die Neubildung von Körpergewebe durch Fehlregulation des Zellwachstums, die gutartig oder bösartig ist.

Krebs ist in den Industrieländern, bedingt durch die erhöhte mittlere Lebenserwartung der Menschen, die zweithäufigste Todesursache. Zu den Behandlungsmöglichkeiten von Krebs gehören die operative Entfernung von Tumoren, Bestrahlung und Chemotherapie. Die bisher erfolgreichste Therapie ist eine frühzeitige Operation nach Entdeckung eines soliden Tumors. Meist schließt sich der Operation eine Chemotherapie als unterstützende Folge-Therapie an. Unter dem Begriff Chemotherapie versteht man in der Krebstherapie den Einsatz von Zytostatika und zusätzlich bei hormonsensitiven Tumoren die Behandlung mit „Hormon-Antagonisten“, wie z. B. Tamoxifen [77].

Zytostatika sind Substanzen die mit unterschiedlichen Wirkmechanismen unspezifisch das Wachstum von schnell proliferierendem Gewebe hemmen. Diese Pharmaka werden entsprechend ihrem Wirkmechanismus in folgende Gruppen unterteilt:

**Tabelle 1-1.** Einteilung nach Mutschler et al. 2001 [77].

<b>Zytostatika-Gruppe</b>	<b>Beispielsubstanzen</b>
Antimetabolite	5-Fluoruracil
Alkylantien	Cyclophosphamid
Topoisomerase-Hemmstoffe	Topotecan
Mitose-Hemmstoffe	Vinblastin
zytostatisch wirkende Antibiotika	Anthracycline

Bei der Chemotherapie werden in der Regel Kombinationen mehrerer Zytostatika in einem Therapieschema eingesetzt. Generell wird zwischen einer kurativen und einer palliativen Therapie unterschieden. Bei der kurativen Therapie ist die Heilung das Behandlungsziel, wogegen die Linderung der Beschwerden und eine Lebensverlängerung bei der palliativen Therapie im Vordergrund stehen.

### **1.1.2 Multidrug-Resistenz**

Ein Problem in der Krebstherapie ist die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Zytostatika. Diese wird durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt, die in zwei Gruppen eingeteilt werden: „intrazelluläre Verteilung des Zytostatikums“ und „zelluläre Reaktion“. Diese Mechanismen können erworben oder bereits in der Zelle vorhandenen sein [19].

Die intrazelluläre Konzentration einer Substanz kann durch Effluxpumpen vermindert werden (wie z.B. durch das P-Glykoprotein (P-Gp)), die den Wirkstoff aus der Zelle transportieren, oder durch Abnahme des aktiven Transports des Wirkstoffs in die Tumorzelle.

Die zelluläre Reaktionen umfasst unter anderem die Detoxifikation der eingedrungenen Substanzen durch Gluthation-S-Transferasen und gesteigerter DNA-Reparatur, wodurch die potentielle Toxizität von Zytostatika erniedrigt wird.

Erwirbt eine Krebszelle durch Exposition eines Zytostatikums Resistenz gegen dieses und ist sie somit auch resistent gegen strukturell und funktionell andere Zytostatika, dann spricht man von Multidrug-Resistenz (MDR).

### 1.1.3 ATP-Binding-Cassette-Transporter

Für den aktiven Transport von Wirkstoffen aus der Zelle sind Effluxpumpen verantwortlich, insbesondere die der Gruppe der ATP-Binding-Cassette (ABC) Proteine. In der humanen Transporter-Superfamilie befinden sich zurzeit 49 Transporter, die in sieben Unterfamilien (ABCA-ABCG) eingeteilt sind [23]. Die Funktionsform der Transporter in dieser Familie besitzt immer zwei Nukleotid-Bindungsstellen (NBD) für ATP. Die Nukleotid-Bindungsstellen der ABC-Transporter beinhalten die charakteristische Walker A und B Sequenzen. Diese sind konservierte Aminosäure-Sequenzen, die in jeder Sequenz einer ATP-Bindungsstelle vorhanden sind. Sie dienen unter anderen als diagnostisches Werkzeug zur Identifikation von Nukleotid-Bindungsstellen bei ABC-Transportern [114]. Die Walker A Sequenz für das humane P-Gp besteht aus der Aminosäuresequenz GNSGCGKS für den N-Terminalen Teil bzw. GSSGCGKS für den C-Terminalen Teil [4]. Die Sequenz der Walker B Region setzt sich bei den meisten ABC-Transportern aus den Aminosäuren DEATSALD zusammen [23]. Typischerweise bestehen die Proteine der ABC-Familie aus zwei Transmembran-Domänen und zwei NBDs.

Die Multidrug-Resistenz beruht häufig auf der Präsenz von ABC-Transportern, bei der insbesondere die Effluxpumpen P-Glykoprotein (P-Gp), das Multidrug-Resistance associated Protein (MRP1) und das Breast-Cancer-Resistance-Protein (BCRP) in der Lage sind, den Krebszellen Multidrug-Resistenz zu verleihen. Beruht die MDR einer Zelle auf der Überexpression dieser Transporter, dann spricht man auch von einer klassischen Multidrug-Resistenz.

Als erstes menschliches ABC-Transportprotein wurde das P-Gp beschrieben [16]. Es transportiert ein breites Spektrum von strukturell unterschiedlichen Substanzen.

Die cDNA des MRP1-Proteins wurde erstmals aus einer resistenten Lungenkrebszelllinie isoliert [21]. MRP1 hat eine überlappende Substrat-Spezifität mit P-Gp, wobei es aber vorwiegend Anionen transportiert. Auch

Konjugate mit Glutathion, Sulfat und Glucuronsäure sind Substrate dieser Pumpe und ein Co-Transport mit Glutathion ist auch möglich [52]. Im Gegensatz zu P-Gp wird MRP1 allerdings in den meisten Geweben des menschlichen Körpers gebildet. Eine klinische Relevanz für MRP1 in der Multidrug-Resistenz konnte ebenfalls gezeigt werden [84].

Ein weiterer ABC-Transporter von klinischer Bedeutung ist das Breast-Cancer-Resistance-Protein (BCRP) [26]. Es wurde erstmals in der Brustkrebs Zelllinie MCF-7 nachgewiesen [30]. Ejendal und Hrycyna zeigten, dass es nur in Form des Dimers als Transporter wirkt. Im Unterschied zu den vorher beschriebenen Transportern besteht es nur aus einer transmembranären Domäne und einer ATP Bindungsstelle. Es konnte gezeigt werden, dass BCRP Tumorzellen gegen unterschiedliche Zytostatika (z. B. Methotrexat, Topotecan und Flavopiridol) Resistenz verleiht [17;43].

Die oben vorgestellten Transportproteine werden aufgrund ihrer Fähigkeit Zellen Multidrug-Resistenz zu verleihen intensiv erforscht. Die Untersuchungen in dieser Arbeit fokussieren nur auf das P-Glykoprotein.

#### **1.1.4 Substrate und Modulatoren von P-Gp**

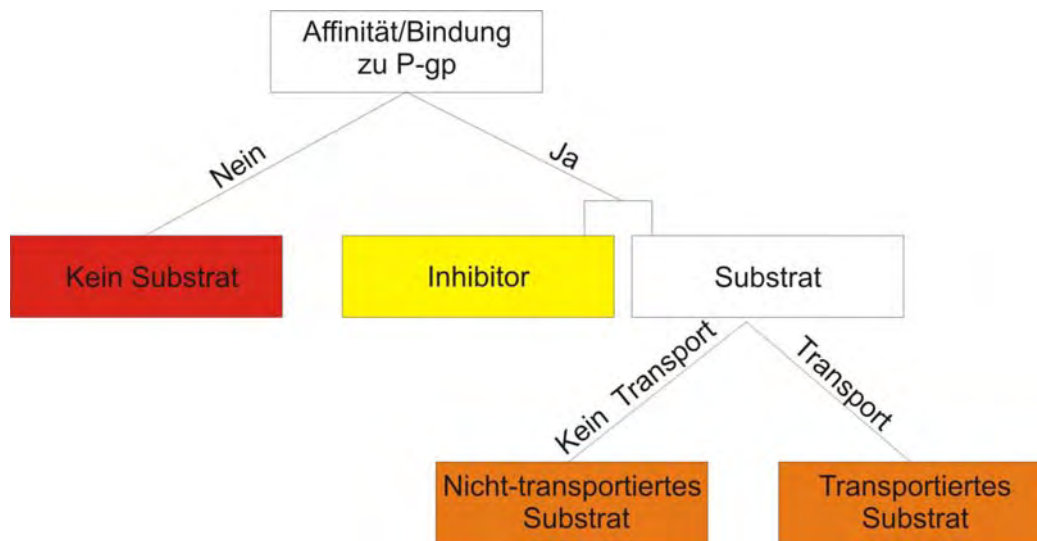
P-Gp bindet eine Vielzahl von chemisch unterschiedlichen Substanzen, die in der Literatur unterschiedlich eingeteilt sind. Die klassische Einteilung erfolgt nach deren Eigenschaft, ob sie die Multidrug-Resistenz vermindern können, oder nicht, in die Gruppe der Modulatoren und der Substrate [117]. Beide Substanzgruppen binden an P-Gp, wobei zumindest die Substrate von P-Gp transportiert werden. Zu den klassischen Substraten gehören die Zytostatika. Zum Teil findet man in der Literatur allerdings hinsichtlich der Einteilung von Substrat bzw. Modulator widersprüchliche Angaben. Diese widersprüchlichen Angaben können zum Teil auf die zur Einteilung verwendeten Assays zurückzuführen sein.

Die Arbeit von *Polli et al.* macht einen Versuch für die Einteilung der Substanzen, die mit P-Gp in Wechselwirkung treten. Generell wird

unterschieden, ob die Substanz eine Affinität zu P-Gp besitzt, oder nicht. Ist eine messbare Interaktion vorhanden, kann eine weitere Einteilung vorgenommen werden und zwar in Transport und Nicht-Transport-Substrate [88].

Demnach gibt es drei Klassen von Substanzen die mit P-Gp interagieren: transportierte Substrate, nicht transportierte Substrate und Inhibitoren. Der Unterschied der beiden letzten Gruppen ist, dass nicht-transportierte Substrate die ATPase Aktivität von P-Gp stimulieren, wogegen Inhibitoren die ATPase Aktivität erniedrigen und/oder nicht transportiert werden. Der Begriff Substrat bezieht sich in dieser Arbeit auf die Enzymaktivität von P-GP welche ATP zu ADP hydrolysiert.

Das in Abbildung 1-1 dargestellte Fließschema veranschaulicht die Einteilung. Die Affinität/ Bindung von Substanzen zu P-Gp kann durch unterschiedliche *in vitro* Assays bestimmt werden. Substanzen wie Elacridar und Tariquidar werden zur Gruppe der Inhibitoren gezählt. Sie verhindern den Transport eines Zytostatikums durch P-Gp durch einen bisher nicht aufgeklärten Mechanismus. Nicht-transportierte Substrate modulieren die P-Gp Aktivität über einen allosterischen Mechanismus. Hierzu gehört zum Beispiel das Progesteron [8]. Zu der Gruppe „Transportierte Substrate“ zählen unter anderem die Zytostatika, wie z.B. Vinblastin. Im Jahr 2006 konnte auch für Verapamil eindeutig gezeigt werden, dass es transportiert wird [47].



**Abbildung 1-1.** Einteilung von P-Gp Substraten. Die Interaktion wird durch *in vitro* Assays bestimmt. Der Transport wird unter anderem durch einen Monolayer Transport Assay ermittelt [88].

Der Begriff des Modulators ist in der Literatur sehr eng mit Zytostatika verknüpft. Modulatoren verhelfen dem Zytostatikum eine MDR zu überwinden, egal über welchen Wirkmechanismus sie dies erreichen, ob kompetitiv oder allosterisch. Weil es auch widersprüchliche Angaben darüber gibt ob bestimmte Modulatoren transportiert werden, oder nicht, kann man sie nicht nach Abbildung 1-1 einer einzigen Gruppe zuordnen. Die Bezeichnung Modulator ist also als Überbegriff für Substanzen, die mit dem P-Gp in Wechselwirkung treten können, zu verstehen.

Zwei bekannte Vertreter der Modulatoren sind der Calcium-Kanal-Blocker Verapamil und das Immunsuppressivum Cyclosporin A.

Die Tabelle 1-2 zeigt einen kleinen Ausschnitt mit repräsentativen Substanzen der verschiedenen Klassen aus diesen drei heterogenen Gruppen.

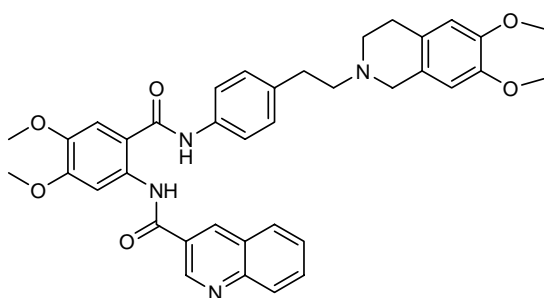
**Tabelle 1-2.** Einteilung ausgewählter Substanzen in verschiedene Interaktionsklassen mit P-Gp [88].

Nicht-transportierte Substrate	Transportierte Substrate	Inhibitoren
Ketoconazol	Chloroquin	Elacridar
Nicardipin	Colchicin	GW420867
Nifedipin	Daunorubicin	Tariquidar
Nitrendipin	Hoechst 33342	
Chlorpromazin	Vincristin	
	Indinavir	
	Taxol	
	Cyclosporin A	
	Etoposid	
	Rhodamin 123	
	Verapamil	

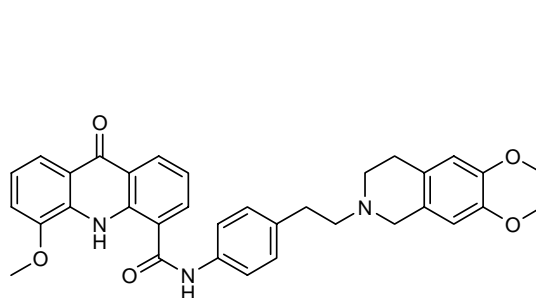
Zurzeit befinden sich mehrere P-Gp Inhibitoren in der klinischen Prüfung. Für die klinische Anwendung ist zu beachten, dass P-Gp eine wichtige Schutzfunktion in der Blut-Hirn-Schranke ausübt und dass bei einer Inhibition dieser Effluxpumpe die Gefahr besteht, dass sich Substanzen im Zentralnervensystem anreichern und toxische Konzentrationen erreichen. Dies konnte an MDR1-Knockout Mäusen gezeigt werden [99]. Für die klinische Anwendung der P-Gp Inhibitoren ist daher auch deren indirekte Toxizität zu beachten.

In klinischen Studien mit Substanzen bekannter Neurotoxizität, wie z. B. den Taxanen und den Vinca-Alkaloiden, konnte eine toxische Anreicherung durch P-Gp Inhibition jedoch nicht bestätigt werden [18].

Die Verbindung Tariquidar (XR-9576) ist ein hochaffiner P-Gp Inhibitor mit Anthranilsäure-Partialstruktur. Sie befindet sich momentan in Phase II der klinischen Prüfung.



Tariquidar (XR-9576)



Elacridar (GF 120918)

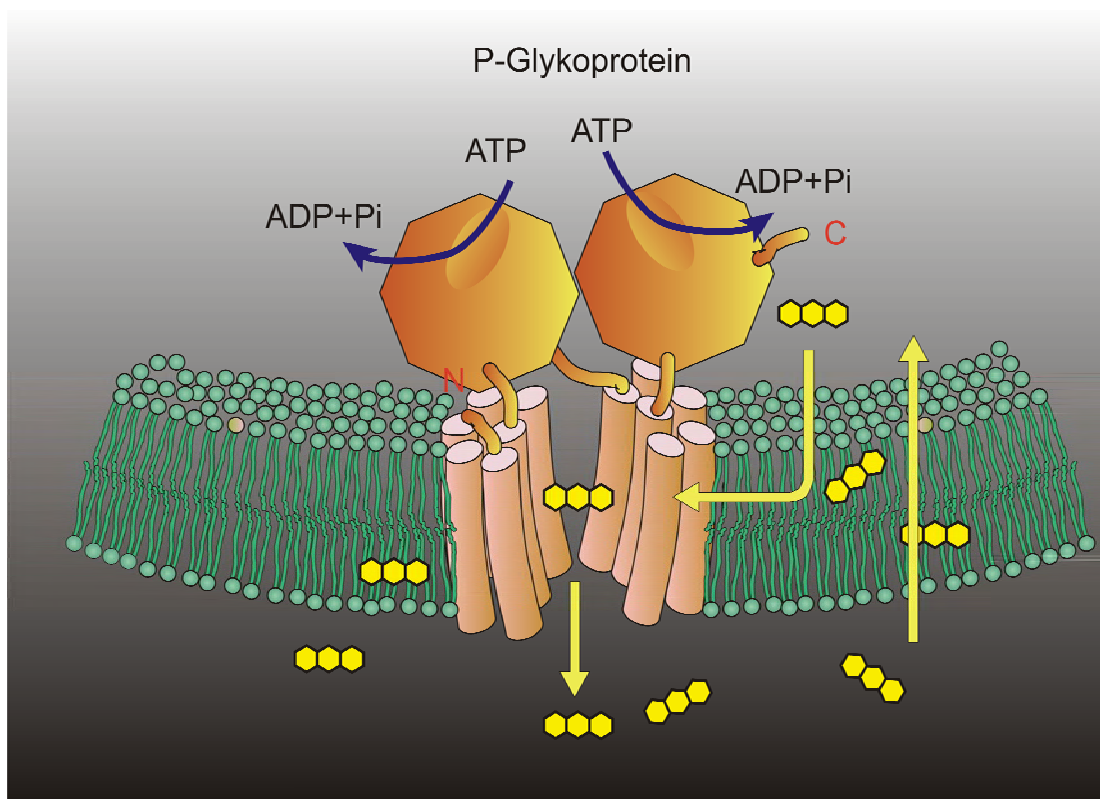
Ein weiterer Vertreter der Inhibitoren in klinischer Prüfung ist Elacridar. Es ist wie auch das Tariquidar, ein Tetrahydroisochinolin-Derivat. Elacridar befindet sich momentan in Kombination mit dem oralen Zytostatikum Topotecan in der klinischen Prüfung Phase I [24,97].

### **1.1.5 Aufbau von P-Glykoprotein**

P-Gp ist ein ca. 170 kDa großes Glykoprotein, das aus 1280 Aminosäuren besteht. Es ist aus zwei homologen Hälften aufgebaut, wobei jede Hälfte sechs transmembranäre Domänen (TMD1-6 bzw. TMD7-12) mit einer  $\alpha$ -Helix Struktur und eine Nukleotid-Bindungsstelle für ATP besitzt. Beide Hälften weisen eine hohe Homologie untereinander auf. Mutagenese- und Photoaffinitäts-Untersuchungen zeigten, dass TMD5, TMD6, TMD11 und TMD12 für die Wechselwirkungen zwischen Arzneistoff und P-Gp essenzielle Bedeutung haben. Die ATP-Bindungsstellen befinden sich auf der zytosolischen Seite der Zelle. Der Transport eines Substrates durch P-Gp ist mit der Hydrolyse von ATP assoziiert. Durch die Hydrolyse von ATP können Substrate entgegen dem Konzentrationsgradienten aus der Zelle transportiert werden.

P-Gp ist dreifach glykosyliert. Die Glykosylierungsstellen befinden sich an Asparagin (91, 94 und 99) in der ersten extrazellulären Schleife [98]. Sie spielen bei der Lokalisation des P-Gp in der Zellmembran eine Rolle. Es konnte aber gezeigt werden, dass die N-Glykosylierung für die Funktion von P-Gp unbedeutend ist. Die Abbildung 1-2 illustriert schematisch den Aufbau des P-Glykoproteins.





**Abbildung 1-2.** Schematischer Aufbau des P-Glykoproteins [80].

### 1.1.6 Funktionen von P-Glykoprotein

P-Glykoprotein findet man auch in benignem Gewebe. P-Gp kommt vorwiegend in Leber, Nieren, Plazenta und der Blut-Hirn-Schranke vor [42]. In der Leber stellt es neben CYP P450 einen wichtigen Bestandteil des Entgiftungssystems des Organismus dar. Bioverfügbarkeit und Plasmaspiegel unterschiedlicher Pharmaka werden durch dieses Efflux-Metabolisierungs-System beeinflusst. Dies dient dem Schutz des Körpers vor Xenobiotika. In der Bevölkerung existieren unterschiedliche P-Gp Polymorphismen. Da P-Gp eine große Rolle bei der Bioverfügbarkeit von Arzneistoffen spielt, kann die Pharmakokinetik bestimmter Substanzen in Abhängigkeit vom jeweiligen Polymorphismus variieren [29]. Im Hinblick auf manche Substanzgruppen, die P-Gp Substrate darstellen, wie z. B. HIV-Therapeutika oder Cardiotherapeutika, kann dies durch deren eventuelle

höhere oder niedrigere Bioverfügbarkeit zu kritischen Nebenwirkungen bzw. Wirkverlust führen.

### 1.1.7 Bindungsstellen

P-Gp weist keine hohe Substratspezifität auf. Um die niedrige Selektivität zu erklären, sind in der Literatur viele unterschiedliche Modelle für das P-Gp zu finden. In den letzten Jahren wurden durch Photoaffinitätsmarkierung und kinetische Studien unterschiedliche Bindungsstellen postuliert. Hier sollen kurz die wichtigsten Modelle vorgestellt werden.

Nach *Shapiro et al.* existieren für das P-Gp drei Bindungsstellen und zwar eine H-, R- und zusätzlich eine allosterische Bindungsstelle [103]. Die H- und R-Bindungsstellen verhalten sich positiv kooperativ. Dies bedeutet, dass sie die Bindung des jeweiligen anderen fördern. Die H-Seite ist spezifisch für die Substanz Hoechst 33342 und für Colchicin, die R-Seite ist selektiv für Rhodamin 123 und Anthracycline. Die allosterische Seite bindet Prazosin und Progesteron. Prazosin und Progesteron sind somit keine Transport-Substrate von P-Gp. Sie stimulieren die ATPase Aktivität und der Efflux von Rhodamin 123 aus der Zelle wird in Anwesenheit dieser Substanzen gesteigert. Dies zeigt, dass die Substanzen, die an die Progesteron-Bindungsstelle binden, eine regulatorische Funktion ausüben.

Das Modell von *Martin et al.* besitzt vier Bindungsstellen [68]. Eine Taxol-, eine Vinblastin-, eine Hoechst 33342- und eine Nicardipin-Bindungsstelle. Alle vier Bindungsstellen stehen miteinander in allosterischer Regulation. Die Nicardipin-Bindungsstelle besitzt eine rein regulatorische Funktion. Nur Modulatoren, aber keine Substrate treten mit ihr in Wechselwirkung. Gemäss *Martin et al.* ist nicht auszuschließen, dass noch weitere Bindungsstellen existieren [17].

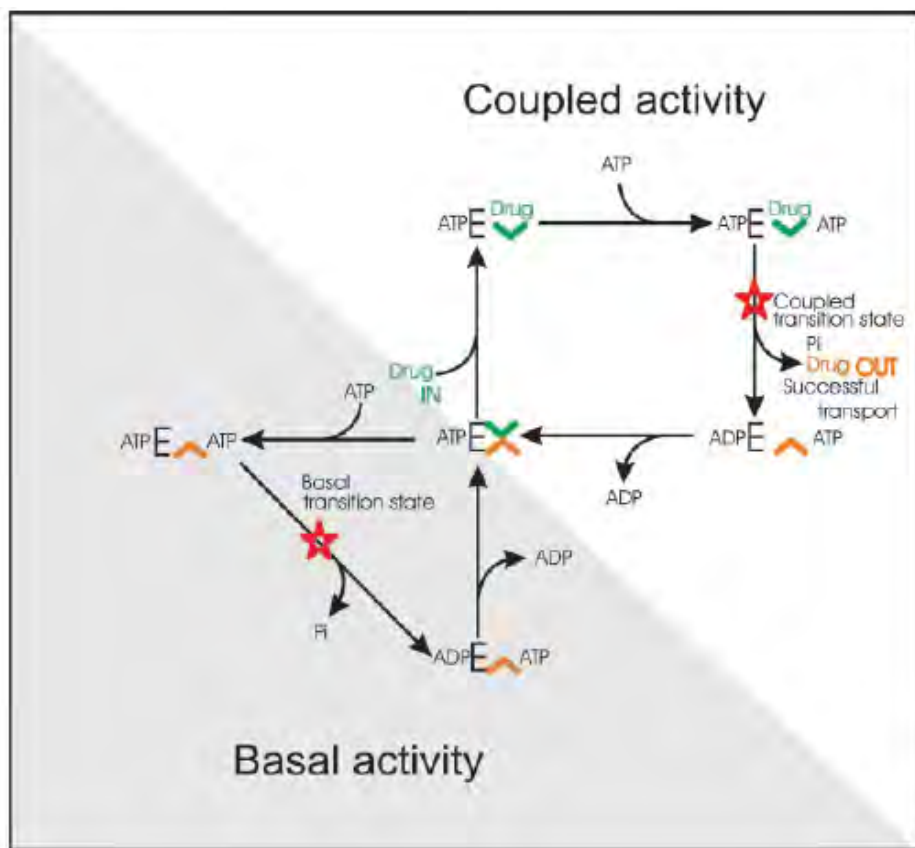
Das Modell von Safa geht basierend auf Photoaffinitäts- und Kinetikdaten sogar von sieben Bindungsstellen aus, die miteinander in positiver und negativer Kommunikation stehen [94].

Die beschriebenen Modelle von P-Gp können wie folgt zusammengefasst werden:

1. P-Gp besitzt mehrere verschiedene mit einander interagierende Bindungsstellen;
2. es gibt Transportbindungsstellen und Nicht-Transportbindungsstellen;
3. die Bindungsstellen von Modulatoren und Substraten können sowohl identisch als auch verschieden sein.

### **1.1.8 Postulierte Transportzyklen**

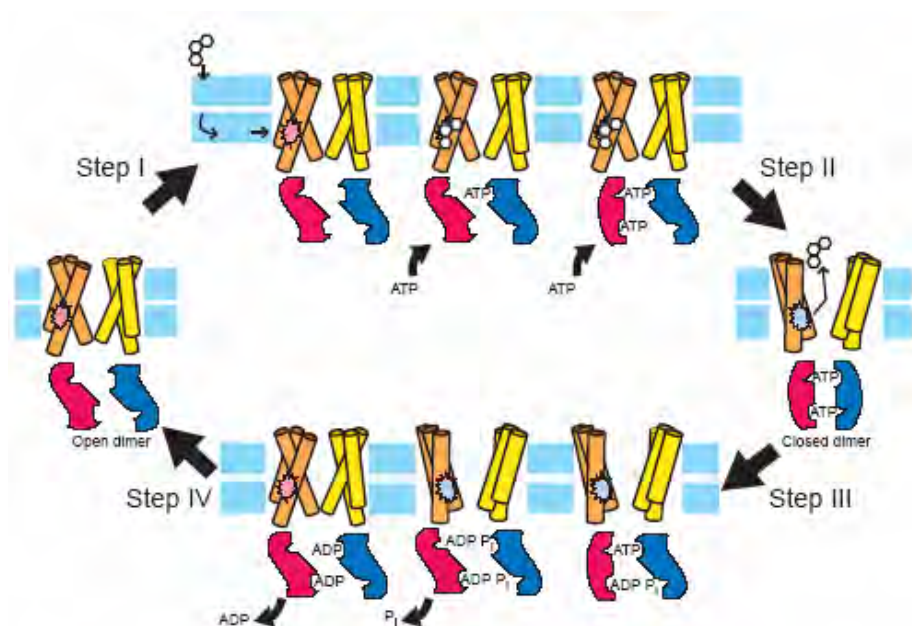
Ein bisher ungeklärtes Phänomen ist, dass P-Gp auch in Abwesenheit von Substraten ATP hydrolysiert. Das P-Gp verbraucht also ununterbrochen Energie, was als basale Aktivität bezeichnet wird. Bei zunehmender Substrat-Konzentration wird die ATPase Aktivität zunächst gesteigert. Hier liegen die Bindungsstellen intrazellulär mit hoher Affinität vor. Bei sehr hohen Konzentrationen wird die ATP Hydrolyse wiederum gehemmt. Dies ist auf die Sättigung der nach außen gerichteten Bindungsstellen mit niedriger Affinität zurückzuführen. *Al-Shawi et al.* postulieren den in der Abbildung 1-3 graphisch illustrierten ATPase-Zyklus um diese Beobachtungen zu erklären.



**Abbildung 1-3.** ATPase Zyklus von P-Gp nach Al-Shawi et al. [2].

Hiernach existieren zwei unterschiedliche kinetische Pfade. Der gekoppelte Pfad ist mit dem Transport eines Substrats assoziiert, dagegen erfolgt bei dem ungekoppelten Pfad kein Transport. Der gemeinsame Ausgangspunkt ist die Form  $ATP E^{\vee}_{\wedge}$ . Dieser Zustand zeigt, dass an einem Molekül P-Gp (E) ein Molekül ATP gebunden ist. Die Bindungsstellen mit hoher Affinität  $\vee$ , die ins Innere der Zelle gerichtet sind und die Bindungsstellen mit niedriger Affinität  $\wedge$  (nach außen gerichtet), sind unbesetzt. Abhängig davon, ob nun ein Substrat oder ein weiteres Molekül ATP bindet, schlägt das P-Gp den gekoppelten oder den ungekoppelten Pfad (grau unterlegte linke Seite) der ATP Hydrolyse ein. Bei dem nicht gekoppelten Pfad bindet ein zweites ATP Molekül anstelle eines Substrats (z. B. bei ungenügender Substratkonzentration). Dies katalysiert die Hydrolyse des ersten ATP-Moleküls, ohne das P-Gp ein Substrat transportiert hat. Für den gekoppelten Pfad bindet das Substrat zunächst an die Hochaffinitätsstelle im Inneren der Zelle. Ein weiteres Molekül ATP bindet an die zweite Nukleotid-Bindungsstelle und

fördert die Hydrolyse des ersten ATP Moleküls. Durch eine Konformationsänderung des Substrat-ATP(2x)-P-Gp-Komplexes gelangt das Substrat zur weniger affinen Bindungsstelle (nach außen gerichtet) und wird aus der Zelle geschleust. Das Substrat dissoziiert von der niedrig affinen Bindungsstelle leicht ab. Die beiden ATP-Bindungsstellen sind kinetisch gleich und der Zyklus der ATP-Hydrolyse ist wechselständig. Dies bedeutet, dass es mindestens zwei nicht-gekoppelte und zwei gekoppelte Pfade des Transportzyklus geben muss. Dieses Transport-Modell ist nicht das einzige postulierte Modell für den gekoppelten Pfad. Jedoch kann mit diesem Modell erstmalig die basale Aktivität erklärt werden. Higgins und Linton teilen den Transportzyklus der ABC-Transporter generell in vier Schritte ein [46]. Die Abbildung 1-4 zeigt schematisch den Ablauf des Transportvorgangs.



**Abbildung 1-4.** ATPase Zyklus nach Higgins et al. [46].

Im Ausgangszustand liegen die Nucleotid-Bindungsstellen von P-Gp in einem geöffneten dimeren Zustand vor und besitzen eine geringe Affinität für ATP. Durch die Bindung eines Transportsubstrates an die hochaffine Bindungsstelle der transmembranären Domänen wird eine

Konformationsänderung hervorgerufen. Dadurch wird die Affinität der NBD für ATP erhöht. Es folgt eine kooperative Bindung von zwei Molekülen ATP und anschließend folgt der entscheidende Schritt für den Transport. Durch die Bindung der beiden ATP Moleküle an die jeweiligen Nukleotid-Bindungsstellen wird der offene, dimere Zustand in einen geschlossenen dimeren Zustand umgewandelt. Dies ruft eine Konformationsänderung der transmembranären Domänen hervor. Hierdurch wird die Substrat-Bindungsstelle in den extrazellulären Bereich gerichtet und verliert an Affinität. Die Folge ist, dass das gebundene Substrat in den Extrazellulärraum dissoziieren kann. Im dritten Schritt (STEP III, Abbildung 3-1) findet die ATP-Hydrolyse statt. Die Hydrolyse leitet die Wiederherstellung des Grundzustandes des P-Gp ein, den offenen, dimeren Zustand.

Der basale Zustand wird letztendlich im Schritt IV erreicht. Durch elektrostatische Abstoßung des negativ geladenen ADP, das mit der Walker A-Region der 1. Nukleotid-Bindungsstelle assoziiert ist und dem negativ geladenen  $P_i$ , das mit der Walker A-Region der 2. NBD assoziiert ist, wird der geschlossene Dimerzustand destabilisiert.

$P_i$  und ADP können nun sequenziell abdissoziieren. Der Grundzustand (offenes Dimer) ist nun wieder erreicht und P-Gp ist für einen erneuten Transportzyklus bereit. Die zwei Kernaussagen dieses Modells sind zu beachten. Erstens, dass nicht die ATP-Hydrolyse die treibende Kraft für den P-Gp Transportzyklus ist, sondern dass dies die ATP-Bindung ist. Zweitens, dass der Transportzyklus durch die Bindung eines Substrates gestartet wird. Das ATP-Switch-Modell besitzt im Gegensatz zu dem Modell von Al-Shawi keinen ungekoppelten basalen Pfad [46].

*Eckford und Sharom* nehmen an, dass die basale Aktivität durch den Transport von Lipiden (insbesondere von Phosphatidylcholinen), oder anderen endogenen Substraten hervorgerufen wird [28]. *Al-Shawi et al.* konnte jedoch zeigen, dass der Übergangszustand der basalen Aktivität und der Substrat-aktivierten Aktivität kinetisch nicht übereinstimmen. Deshalb ist

es unwahrscheinlich, dass die basale Aktivität auf den Transport eines Substrates zurückzuführen ist.

## 1.2 Fragestellung

MDR-Modulatoren sind in der Lage, der P-Gp vermittelten Multidrug-Resistenz entgegenzuwirken und könnten daher den häufig in der Klinik beobachteten Wirkverlust von Chemotherapeutika abschwächen und auf diese Weise die Krebstherapie verbessern. Für das Verständnis der Wirkungsweise und Struktur-Wirkungsbeziehungen von bekannten und neuen P-Gp Modulatoren sind Untersuchungen an reinem P-Gp, unbeeinflusst von anderen Mechanismen der Zelle, hilfreich. Hierfür muss das P-Gp zunächst in Zellen exprimiert, aufgereinigt und anschließend in einer Phospholipid-Doppelschicht-Membran wieder rekonstituiert werden, um seine Funktion zu erhalten.

Verschiedene Expressionssysteme in unterschiedlichen eukaryontischen Organismen sind in der Literatur beschrieben und weisen jeweils Vor- und Nachteile auf. Ein Ziel dieser Arbeit war es, nach Evaluierung von den in der Literatur beschriebenen Systemen ein geeignetes Expressionssystem für P-Gp in der Arbeitsgruppe zu etablieren und weiter zu entwickeln. Des Weiteren sollte eine geeignete Aufreinigungsmethode und ein Verfahren zur Rekonstitution des Proteins in einer Phospholipid-Doppelschicht-Membran entwickelt werden. Ein Teil dieser methodischen Entwicklungsarbeit erfolgte im Labor von Prof. Al-Shawi (University of Virginia, Charlottesville, USA). Anschließend wurden die biochemischen Methoden im Bonner Labor etabliert.

Mit Hilfe des gewonnenen homogenen P-Gp sollten anschließend Untersuchungen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen von MDR-Modulatoren durchgeführt werden. Zu diesem Zweck sollte die modulorkonzentrationsabhängige ATPase Aktivität des homogenen P-Gps untersucht und hierfür ein entsprechender Assay im heimischen Labor etabliert werden. Um Struktur-Wirkungsbeziehungen systematisch erkennen zu können, wurden gezielt veränderte Modulatoren, die strukturell auf dem Tariquidar (siehe 1.1.4) basieren, untersucht. Im Zusammenhang mit Struktur-Wirkungsbeziehungen ist darüber hinaus eine Korrelation von log P-Werten



mit modulatorischer Aktivität an P-Gp beschrieben worden [102]. Daher wurde auch das Verteilungsverhalten ausgewählter Modulatoren im Octanol-Wasser-System untersucht.

Ziel der gesamten Untersuchungen war es, Leitstrukturen für hochpotente MDR-Modulatoren abzuleiten, um somit einen Einblick in die Wirkungsweise der Modulatoren zu gewinnen und deren Wirksamkeit zu optimieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Hefe-Stämme und Plasmide

Zur Etablierung der Aufreinigung des P-Glykoproteins wurden unterschiedliche Hefestämme und Plasmide zur Erzeugung eines Expressionsystems verwendet. Tabelle 2-1 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme. Tabelle 2-2 listet die verwendeten Plasmide auf. Der genetische Hintergrund der Stämme gibt Aufschluss über eventuelle Mutationen bzw. Eliminationen gegenüber dem Wild-Typ nach internationaler Nomenklatur.

**Tabelle 2-1.** Verwendete Stämme.

Bezeichnung	Genetischer Hintergrund	Referenz
BJ5457	Mat $\alpha$ ura3-52 trp1, lys2-801, leu2- $\Delta$ 1, his3 $\Delta$ 200, pep4::His, prb1- $\Delta$ 1.6R, can1, GAL	ATCC 208282
LPY11	Mat a erg6::LEU2, leu2, his3, ura3-52	ATCC 201842
LPY27	Mat a erg2-4::LEU2, leu2 his3, ura3-52	ATCC 201844
FYAK 26/8-10B1	Mat a, ura3-52, trp1 $\Delta$ 63, leu2 $\Delta$ 1, his3 $\Delta$ 200, GAL2+, pdr5- $\Delta$ 1::HisG, snq2::HisG, yor1::HisG	Kolaczkowski [55]

**Tabelle 2-2.** Verwendete Plasmide. Ura3 und leu2 bezeichnen die cDNA für die auxotrophen Marker Uracil und Leucin.

Bezeichnung	Marker	Promotor	Größe	Referenz
pGem3Zf(-)Xba-MDR1.1	Ampicillin	Phagemid	6851 bp	ATCC 65704
pBluSKM	Ampicillin	Phagemid	2951 bp	NCBI
pYex-BX-CJ	Ampicillin; URA3; LEU2	Kupfer	7294 bp	Clontech
YEpmDR1HIS	Ampicillin; LEU2	PMA1	11719 bp	Al-Shawi
pYEplac195	Ampicillin; URA3	PMA1	11219 bp	Al-Shawi

#### 2.1.1 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Tabelle 2-3 und die Tabelle 2-4 geben die Zusammensetzung des *S. cerevisiae* Nährmediums bzw. der einzelnen Bausteine an. Bei dem Synthetischen Dextrose-Medium (SD-Medium) handelt es sich um ein Minimal-Medium, es enthält nicht alle essentiellen Aminosäuren. Die

verwendeten Hefestämme sind auxotrophe Organismen. Auxotrophe Organismen haben zum Teil ihre Fähigkeit verloren, bestimmte Wachstumsfaktoren oder andere essentielle Substanzen (wie z.B. Aminosäuren) selbst zu synthetisieren. Durch das Einfügen eines Vektors mit der genetischen Information zur Herstellung der Aminosäure können die Hefestämme selektiert werden. Entsprechend des Hefestammes wurde das SD-Medium als Aminosäure-dropout-Medium hergestellt. Der genetische Hintergrund des Stammes bestimmt die tatsächliche Zusammensetzung. Deshalb wurden Aminosäuren, die der Hefestamm selbst synthetisieren kann, nicht zum Medium hinzugefügt. Je nach benötigter Menge an Zellmasse wurden Bioreaktoren von 7,5 L, 10 L oder 36 L Größe verwendet. Sämtliche Arbeiten in der Hefezellkultur sind unter aseptischen Bedingungen durchgeführt worden. Die Hefestammkultur wurde unter Zusatz von 15 % Glycerol (Glycerol-Stammkultur) bei -80°C gelagert. Aus einem Glycerol-Stamm wurde mit einer Impföse die Hefezellkultur auf SD-Agar ausplattiert. Die Agarplatte wurde bei 30°C bis zum Auftreten von sichtbaren Kolonien im Brutschrank inkubiert. Einzelne Kolonien wurden in 250 mL bzw. 2 L Erlenmeyerkolben bei 25°C bis 30°C und 250 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Für manche Anwendungen, wie zum Beispiel die Transformation von Hefezellen (siehe Kapitel 2.2.13), wird zur Aufzucht der Hefen sehr nährstoffreiches Medium, wie YPD (siehe Tabelle 2-3) benötigt.

**Tabelle 2-3.** Nährmedium für *S. cerevisiae* Teil I.

<b>YPD Flüssigmedium (Yeast extract, Peptone, Glukose)</b>	
Yeast extract	5,0 g
Pepton	10,0 g
Glukose	10,0 g
doppelt deionisiertes Wasser	500,0 mL
Substanzen abwiegen, in ddW lösen, autoklavieren	
<b>YPD-Agar</b>	
YPD + zusätzlich 2% Agar-Agar	

---

**Synthetisches Dextrose Medium = SD-Medium**

---

<b>10x Yeast Nitrogen Base = YNB</b>	100,0 mL
<b>10x Aminosäuren</b>	100,0 mL
<b>40x Dextrose (Final: 2 % Dextrose)</b>	50,0 mL
ddW (autoklaviert)	750,0 mL

---

**SD-Agar**

---

SD-Medium + zusätzlich 2% Agar-Agar

---

**Tabelle 2-4.** Nährmedium für *S. cerevisiae* Teil II. Alle Lösungen wurden mit doppelt deionisiertem Wasser hergestellt.

---

10x Yeast Nitrogen Base (YNB)

---

1000x	Spurenelemente	10,0 mL
1000x	Calciumchlorid	10,0 mL
1000x	Eisen(III)chlorid	10,0 mL
100x	Vitamine	100,0 mL
100x	Salze	100,0 mL
100x	Stickstoff Basis	100,0 mL
	Ddw	670,0 mL

mit 10N NaOH auf pH 5,4 einstellen.

---



---

1000x Spurenelemente

---

Borsäure	500,0 mg/L
Kupfersulfat	20,0 mg/L
Kaliumiodid	100,0 mg/L
Mangansulfat	448,0 mg/L
Natriummolybdat	235,0 mg/L
Zinksulfat	712,0 mg/L

---



---

1000x Calciumchlorid

---

Calciumchlorid	100,0 g/L
----------------	-----------

---



---

1000x Eisen(III)chlorid

---

Eisen(III)chlorid	200,0 mg/L
-------------------	------------

---

**100x Vitamine**

Biotin	0,2 mg/L
Calciumpanthothenat	40,0 mg/L
Folsäure	0,2 mg/L
Inositol	200,0 mg/L
Niacin	40,0 mg/L
p-Aminobenzoessäure	20,0 mg/L
Pyridoxin HCl	40,0 mg/L
Riboflavin	20,0 mg/L
Thiamin HCl	40,0 mg/L

**100x Salze**

Kaliumdihydrogenphosphat	100,0 g/L
Magnesiumsulfat	50,0 g/L
Natriumchlorid	10,0 g/L

**100x Stickstoff Basis**

Ammoniumsulfat	500,0 mg/L
----------------	------------

**10x Aminosäuren**

L-Isoleucin	300,0 mg/L
L-Valin	1500,0 mg/L
L-Adeninhemisulfat	200,0 mg/L
L-Arginin HCl	200,0 mg/L
L-Lysin HCL	300,0 mg/L
L-Methionin HCl	500,0 mg/L
L-Phenylalanin	500,0 mg/L
L-Threonin	2000,0 mg/L
L-Tryptophan	200,0 mg/L
L-Tyrosin	300,0 mg/L
L-Uracil	200,0 mg/L
L-Histidin HCl Monohydrat	200,0 mg/L
L-Leucin	1000,0 mg/L

**40x Dextrose**

Glukose wasserfrei	400,0 g/L
--------------------	-----------

**2.1.2 Fermentation von *S. cerevisiae***

Alle Stämme wurden bei 25°C-30°C im selektiven Medium in einem Bioreaktor unter Zufuhr von steril filtrierter Luft kultiviert. Die Rührgeschwindigkeit des Fermenters betrug mind. 100 rpm. Zu Beginn der Arbeiten wurde nur die Standard-Fermentation durchgeführt. Hierunter ist

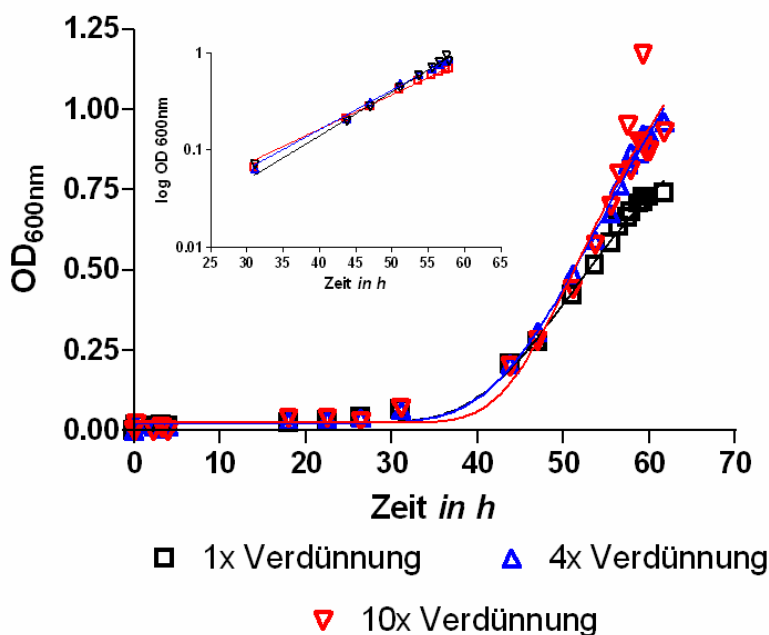
eine kontinuierliche Kultivierung der Zellen zu verstehen, bei der alle benötigten Nährstoffe zu Beginn der Fermentation hinzugegeben werden. Vor jeder Fermentation wurden die Hefe-Stämme auf einer SD-Medium Agarplatte (auxotrophe Marker entsprechend dem jeweiligen Stamm) frisch ausplattiert. Eine Vorkultur, die aus einer einzelnen Kolonie gezüchtet wurde, wurde in 100 mL des entsprechenden selektiven SD-Mediums in 250 mL Erlenmeyerkolben bis zu einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von etwa 1,0 kultiviert. Dann wurde die 100 mL Zellsuspension in 2 L-Fernbach-Flaschen übergeimpft, die selektives SD-Medium mit 10 % Glycerol enthielten. Diese Vorkultur wurde im Schüttelinkubator bei 25°C und 250 rpm bis zu einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von ~1,0 inkubiert. Der Fermenter wurde mit einem entsprechenden Volumen der Vorkultur angeimpft, so dass eine  $OD_{600\text{ nm}}$  von max. 0,2 im Fermenter resultierte. Das Ansatzvolumen des Fermenters schwankte zwischen 10 L und 36 L, abhängig von der gewünschten Biomasse.

Das Zellwachstum der Hefezellen gliedert sich in drei Phasen: am Anfang befinden sich die Zellen in der Lag-Phase, in der die Zellteilung nur sehr langsam stattfindet. Die zweite Phase ist die exponentielle Wachstumsphase. Bei einer  $OD_{600\text{ nm}}$  zwischen 1,0 - 1,5 (abhängig vom verwendeten Stamm) gehen die Zellen in die Plateauphase über. In der Plateauphase vermindert sich die Expressionsrate von P-Gp auf ein Minimum. Daher muss das Wachstum der Zellen im Bioreaktor durch Messung der optischen Dichte der Zellsuspension kontrolliert werden.

#### 2.1.2.1 Kontinuierliche Fermentation

*Figler et al.* zeigten für den *BJ5457 RAF13* Stamm, dass die prozentuale Expression von P-Gp bezogen auf die Gesamtmembranproteinmenge mit der Zellzahl zunimmt. Der maximale Expressionslevel ist bei einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von 1,2 erreicht, danach sinkt der Expressionslevel von P-Gp wieder. Deshalb wurde die Fermentation der Zellen bei einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von maximal 1,2 gestoppt.

Die Abbildung 2-1 zeigt die Wachstumskurve einer kontinuierlichen Fermentation am Beispiel des *BJ5457 RAF13* Stamms. Die drei verschiedenen Wachstumskurven wurden durch Bestimmung der  $OD_{600\text{ nm}}$  bestimmt. Die OD der Zellsuspension wurde unverdünnt, vier- und zehnfach verdünnt (1x, 4x, 10x) vermessen. Die Bestimmung wurde bei unterschiedlichen Verdünnungen durchgeführt, da ab einer Absorption von  $\sim 0,5$  die Zellzahl nicht exakt bestimmt werden kann, da der Messbereich ab diesem Wert, bedingt durch die Trübung, nicht mehr linear ist. Deshalb wurde jede Bestimmung für den jeweiligen Zeitpunkt mit drei Verdünnungen durchgeführt (siehe Abbildung 2-1).

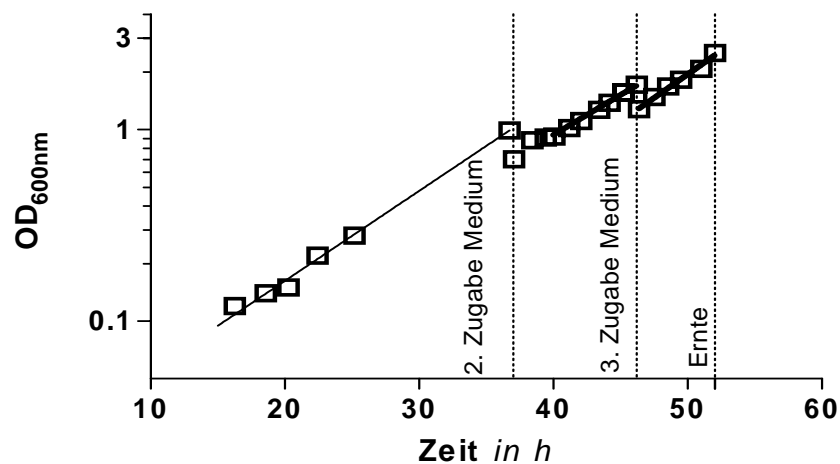


**Abbildung 2-1.** Kontinuierliche Fermentation des *BJ5457 RAF13* Stamms in 36 L SD-Medium  $\Delta His$ ;  $\Delta Leu$ , mit 10% Glycerol, 25°-30°C, 750 rpm. Der äußere Graph wurde nach der Gompertz-Gleichung gefittet (siehe Gleichung 2-12). Der innere Graph mit einer Exponential-Funktion (siehe Gleichung 2-13). Die Lag-Phase betrug nach Gompertz 42,70 Stunden. Die Verdopplungszeit betrug 6,65 Stunden. Nach 59,25 Stunden wurde bei einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von 1,17 geerntet. Die Biomasse betrug ca. 185 g.

### 2.1.2.2 Diskontinuierliche Fermentation

Bei dieser Kultivierungstechnik liegt der Füllstand anfangs unterhalb der maximalen Kapazität des Reaktors und wird dann langsam bis zur maximalen Auslastung mit Nährmedium erhöht. Dann wird der Reaktor wieder komplett entleert. Es handelt sich also um eine diskontinuierliche Fermentation (fed-batch Verfahren). Hierdurch resultiert mehr Biomasse in einem Ansatz desselben Volumens, als bei der kontinuierlichen Fermentation erhalten werden kann. Das Wachstumsverhalten der Hefen im Fermenter wurde ebenfalls durch Messung der optischen Dichte beobachtet. Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 2-2 nur die Messwerte der zehnfachen Verdünnung dargestellt. Die Zellen wurden max. bis zu einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von drei im Reaktor kultiviert. Damit die Zellen nicht in die Plateau-Phase übergehen und dadurch bedingt die Expression von P-Gp abnimmt, wird bei einer OD zwischen 0,8 - 1,2 zusätzlich Nährmedium hinzugegeben. Wird festgestellt, dass das Zellwachstum sich nicht mehr exponentiell verhält, dann wird die nächste Nährstoffzugabe eingeleitet. Dies geschieht erfahrungsgemäß erneut bei einer OD zwischen 1,6 - 1,8. Durch die erneute Nährstoffzugabe ändert sich die Teilungsrate (TR) der Zellen. Daher werden bei der diskontinuierlichen Fermentation drei Teilungsraten bestimmt. Der Erntezeitpunkt der Fermentation ist dann erreicht, wenn die Zunahme der optischen Dichte zum Messzeitpunkt signifikant geringer ist als bei der vorherigen Bestimmungen.





**Abbildung 2-2.** Diskontinuierliche Fermentation des BJ5457 RAF13 Stamms in 10 L SD-Medium  $\Delta$ His;  $\Delta$ Leu, mit 10 % Glycerol, bei R.T. (21°-24°C), 100 rpm. Die zweite Zugabe von Nährmedium erfolgte nach 37 Stunden (1 L 10x YNB und 0,125 L 86% Glycerol). Bei 46,2 Stunden erfolgte die dritte Zugabe von Nährmedium (0,5 L 40%- Glukose, 1,4 L 10xYNB und 0,25 L 86% Glycerol). Nach 52 Stunden wurden die Zellen bei einer OD<sub>600nm</sub> von 2,5 geerntet. Die geerntete Biomasse betrug 57 g. Verdopplungszeit (VZ) der Zellen wurde exponentiell zwischen den einzelnen Zugaben bestimmt: 0 - 30 Stunden VZ 6,41 h; 37-46,2 Stunden VZ 7,2 h; 46,2-52 Stunden VZ 6,10 h.

Die diskontinuierliche Fermentation lieferte durchschnittlich eine zweifach höhere Ausbeute als die kontinuierliche Fermentation (vergleiche Ergebnisse und Diskussion). Die beiden hier aufgeführten Beispiele kann man hinsichtlich ihrer Ausbeuten nicht untereinander vergleichen, da sie in zwei vollkommen unterschiedlichen Fermentern durchgeführt worden sind. Die Drehzahl des Rotors im 36 L Fermenter ist um das 7,5-fache höher als im 10 L Fermenter. Dies bedeutet auch eine bessere Versorgung der Zellen mit Sauerstoff. Bei den höheren Drehzahlen im 36 L Fermenter kam es auch zu vermehrter Schaumbildung, die durch Zugabe von 10  $\mu$ L Antifoam unterbunden worden ist.

Die Konzentration der Nährstoffe ist, bedingt durch die diskontinuierliche Kultivierung und der damit verbundenen Nährstoffzugaben, unterschiedlich hoch. Entsprechend der nachfolgenden Tabelle 2-5 werden die Nährstoffe in den Bioreaktor gegeben.

**Tabelle 2-5.** Die Tabelle gibt die Nährmedienzugabe bei der diskontinuierlichen Fermentation eines 36 L Ansatzes an. Die Nährstoffe werden nach Tabelle 2-3 im Kapitel 2.2 hergestellt. Die Kultivierung findet mit SD-Medium minus den entsprechenden auxotrophen Markern statt. Die 20x Aminosäuren beinhalten die Aminosäuren in der doppelten Konzentration wie die 10x Aminosäurelösung in Tabelle 2-3.

Nährstoff-Lösung	Initial (1. Zugabe)	2. Zugabe	3. Zugabe
	Zugabevolumen in L		
ddW	12,6	0,4	0,5
Glycerol	2,4	0,4	0,8
20x Aminosäuren	5,4	0,0	0,0
10x YNB	2,4	3,3	5,0
20x Dextrose	1,2	0	1,8
Gesamtvolumen	24,0	28,1	36,2

Das Gesamtvolumen des Bioreaktors kann auch geringer sein. Dann werden alle Volumina der Tabelle 2-5 um den gleichen Faktor reduziert. Da die Aminosäure-Lösung nicht der Wachstumslimitierende Faktor ist, wird bei der 2. Zugabe keine frische Aminosäure-Lösung hinzugefügt. Auf das Wachstum limitierend wirkt sich das YNB aus und wird deshalb bei jeder Zugabe frisch hinzugefügt.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

Einführung: Die nachfolgend aufgeführten Methoden dienen zur Herstellung neuer Expressionsplasmide für P-Gp und deren anschließender Transformation in *S. cerevisiae*. Die hierfür verwendeten Materialien und Geräte sind im Anhang zu finden.

### 2.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die 15%-igen Glycerolkulturen von *E. coli* (gelagert bei  $-80^{\circ}\text{C}$ ) oder transformierte *E. colis* (Kapitel 2.2.9) wurden auf Ampicillin-haltigem LB-Agar-Medium (Tabelle 2-6) in einem Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht angezüchtet. Eine Kolonie wurde mit einer Impföse in 5 mL Ampicillin-haltigem LB-Medium (Tabelle 2-6) übergeimpft und im Schüttelinkubator bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 250 rpm 16-18 Stunden angezogen.

**Tabelle 2-6.** Nährmedium für *E. coli*.

<b>LB-Flüssigmedium (Luria Bertoni)</b>	
Trypton	10,0 g
Yeast extracts	5,0 g
NaCl	10,0 g
ddW	1000,0 mL
Substanzen abwiegen, in ddW lösen, autoklavieren, Ampicillin (Endkonzentration 100µg/mL) nach dem abkühlen hinzugeben.	
<b>LB-Agar</b>	
LB + zusätzlich 2% Agar-Agar	

### 2.2.2 Plasmid-DNA-Extraktion aus *E. coli*

Die Plasmid-Extraktion aus den gezüchteten *E. coli* Bakterien mit dem gewünschten Plasmid wurde mit den „Mini-Prep.“-Kits der Firma Qiagen oder Eppendorf gemäß beigefügtem Protokoll durchgeführt [33;89]. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde in 50 µL Tris/EDTA-Puffer (TE-Puffer, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8, 0,1 mmol/L EDTA) eluiert und bei –20°C gelagert.

### 2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Plasmid-DNA-Extraktion oder zur Aufarbeitung von Plasmid-DNA, die mit Restriktionsenzymen behandelt worden war, wurden die DNA-Fragmente anhand ihrer Größe gelelektrophoretisch getrennt [70]. Hierdurch ist eine Analyse von DNA-Fragmenten möglich, da zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts der DNA-Fragmente und ihrer relativen Wanderungsdistanz eine lineare Abhängigkeit besteht. Entsprechend der Größe der erwarteten DNA-Fragmente musste die Agarosekonzentration des Gels zwischen 0,5 % und 1,0 % eingestellt werden. Die Agarose wurde entweder in TBE (89 mmol/L Tris Base, 89 mmol/L Borsäure, 2 mmol/L EDTA) oder in TAE (40 mmol/L Trisacetat, 2 mmol/L EDTA) Puffer unter kurzem Aufkochen gelöst. Das Gel wurde nach dem Aufkochen in eine Elektrophorese-Kammer mit Probenkamm gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Probenkamm entfernt und die Taschen mit den Plasmid-

DNA-Proben (10  $\mu\text{L}$  DNA-Lösung, versetzt mit 2  $\mu\text{L}$  Ladepuffer (Invitrogen Nr. 10816-015) im R-Gefäß) beladen. Ein Größenstandard diente der Kontrolle. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Moleküle wurde bei einer Spannung von 80-120 V für ca. 45 Minuten durchgeführt.

Die Visualisierung der DNA-Moleküle erfolgte durch Baden des Gels in Ethidiumbromid-Färbelösung (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , in Wasser gelöst) für 45 Minuten. Durch Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA konnte sie durch Fluoreszenz bei Anregung mit UV-Licht (312 nm) detektiert werden [6].

#### **2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden anhand ihrer Größe identifiziert und mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte durch das „QIAquick-Gel Extraktions Kit“ der Firma Qiagen (Nr. 28704) gemäß beiliegendem Protokoll [89]. Das erhaltene DNA-Pellet wurde in 10 – 50  $\mu\text{L}$  TE-Puffer gelöst.

#### **2.2.5 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch bestimmt. Bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm wurde die Absorption vermessen. Das Verhältnis von  $A_{260\text{ nm}}$  zu  $A_{280\text{ nm}}$  ist ein Maß für die Reinheit. Dieses sollte einen Wert von ca. 1,8 haben. Verunreinigungen durch Proteine senken dieses Verhältnis.

Bei einer Schichtdicken der Lösung von 1 cm entspricht eine Absorption von 1 bei  $\lambda_{260\text{ nm}}$  50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DNA. Die Probe wurde mit ddW so verdünnt, dass die Absorption bei 260 nm bei ca. 0,1 lag [64].

### 2.2.6 DNA-Verdau mit Typ II Endonukleasen

Restriktionsendonukleasen des Typs II erkennen eine bestimmte (meist palindromische) Sequenz und spalten die DNA an dieser Stelle. *Roberts und Macelis* stellten eine umfassende Liste aller bekannten Restriktionsendonucleasen und ihrer Erkennungssequenzen auf [91]. Die zu schneidende DNA, der optimale Puffer (nach Herstellerangaben) und die entsprechende Endonuklease wurden bei ihrem Temperaturoptimum im Wasserbad für 2 – 4 Stunden inkubiert. Zudem können zur Restriktion einer DNA auch zwei verschiedene Restriktionsenzyme verwendet werden. Dies bietet den Vorteil, dass das einzufügende Fragment nur in einer Orientierung in ein Plasmid eingebaut werden kann. Anhand von Herstellerangaben wurden Puffer und Temperatur für beide Enzyme ausgewählt und die DNA gleichzeitig mit beiden Enzymen inkubiert. Falls kein gemeinsamer Puffer bzw. Temperatur gefunden werden konnte, wurde die DNA nacheinander mit Restriktionsenzymen unter jeweils optimalen Bedingungen geschnitten. Ein typischer DNA-Restriktionsansatz ist in der folgenden Tabelle 2-7 dargestellt.

**Tabelle 2-7.** Restriktionsansatz. Die Konzentration von Restriktionsenzymen wird in Einheiten (U/μL) angegeben. Die eingesetzte Menge an Restriktionsenzym wurde wie nachfolgend berechnet. Jedes Restriktionsenzym wird vom Hersteller an Standard-DNA, wie z. B. Lambda DNA, getestet.

#### Restriktionsansatz

DNA, 1 μg/mL	x μL
Reaktionspuffer (wird mit dem Enzym geliefert) 10-fach konz.	1 μL
Restriktionsenzyme (U = Units)	

$$U = \frac{(\text{Länge des Standard - Template})}{(\text{Länge des Test - Template})} \cdot \frac{\text{Anzahl der Schnittstellen im Test Template}}{\text{Anzahl der Schnittstellen im Standard Template}}$$

steriles ddW	ad 10 μL
--------------	----------

Es wurden ausschließlich Endonukleasen eingesetzt, die klebrige Enden („sticky ends“) erzeugen. Klebrige Enden sind ungleiche, überhängende Enden eines DNA-Moleküls. Zur Separation der DNA-Fragmente und Entfernung der Endonukleasen wurden die erhaltenen DNA-Fragmente nach dem Verdau elektrophoretisch in einem Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.2.3) aufgetrennt und anschließend durch Gelextraktion (siehe Kapitel 2.2.4) gereinigt.

Eine weitere Möglichkeit den Restriktionsansatz aufzubereiten war es, direkt nach der Inkubation mit den Endonukleasen durch Inkubation mit alkalischer Shrimp-Phosphatase (Fermentas) bei 65°C für 15 Minuten (Thermoblock) die Phosphatreste am 5' und 3' Ende der DNA zu entfernen. Hierdurch unterbindet man eine ungewollte Ligation der nun getrennten DNA-Fragmente. Die überschüssigen Nukleotid und Restriktionsendonukleasen wurden dann mit dem „Nukleotid-Entfernungskit“ der Firma Qiagen aus dem Ansatz entfernt [89].

### 2.2.7 Ligation

Eine Ligation verknüpft zwei DNA-Fragmente miteinander. Bei der Ligation wird die Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3'-Hydroxy-Gruppe an dem anderen DNA-Ende geschlossen. Die Verknüpfung wird durch das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert [61]. Um die Effizienz der Ligation möglichst hoch zu halten, wurden in dieser Arbeit nur Ligationen mit klebrigen Enden durchgeführt. Durch H-Brückenbindungen der Basenpaarungen, blieben die jeweiligen passenden Enden über einen längeren Zeitraum in Kontakt. Die Ligationsprodukte wurden wieder in *E. coli* transformiert (siehe Kapitel 2.2.9), das neue Plasmid extrahiert (siehe Kapitel 2.2.2), und durch Verdau mit Endonukleasen (siehe Kapitel 2.2.6) und anschließender Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.3) analysiert.

### 2.2.8 Standard-Ligation

Ein Standard-Ligationsansatz war wie folgt zusammengesetzt (siehe Tabelle 2-8):

**Tabelle 2-8.** Standard-Ligation.

#### Ansatz für Standard-Ligation

Plasmid-DNA (10-50 ng/μL)	1,0 μL
Ligationspuffer 10-fach	2,0 μL
DNA-Fragment (Insert) (30 – 150 ng/μL)	4,0 – 16,0 μL
T4-DNA-Ligase (5 – 10 U/μL)	0,5 – 1,0 μL
MilliQ® -Wasser	ad 20,00 μL

Nachdem der Reaktionsansatz durch Pipettieren gemischt und die Mischung im Reaktionsgefäß durch Zentrifugation (6000 x g für 1 Minute) gesammelt worden war, wurden 10 µL aliquotiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur (20 - 25°C) inkubiert. Dieser Ansatz wurde in einen *E. coli DH5 α* (Invitrogen, Stratagen) Stamm transformiert (siehe Kapitel 2.2.9). Der Rest des Ligationsansatzes wurde für eine eventuell erneute Transformation bei 4°C aufbewahrt.

Die eingesetzten Mengen des Plasmids und des Inserts (= DNA-Fragment) richten sich nach der Konzentration und Größe des Letzteren. Das molare Verhältnis zwischen Insert und Vektor sollte 3:1 betragen. Bei kleineren Fragmenten sollte das Verhältnis 10:1 gewählt werden.

#### 2.2.8.1 Ligation mit dem Rapid-Ligation-Kit

Es wurde das Kit der Firma Roche Diagnostics verwendet [92]. Der Ansatz war entsprechend des Standard-Ligations-Protokolls zusammengesetzt, allerdings betrug die Inkubationszeit für die Ligation nur 5 Minuten.

### **2.2.9 Transformation von *E. coli***

Unter Transformation versteht man die Einführung von DNA in Bakterien. Durch die Transformation konnte die Plasmid-DNA in *E. coli* vermehrt werden. Die für die Transformation benötigten kompetenten *E. coli* Stämme wurden von verschiedenen Firmen (Invitrogen, Stratagen) erworben oder eigenständig nach der Methode von Hanahan et al. erzeugt [44].

#### 2.2.9.1 Transformation mit der Heat-Shock Methode

Der Ligationsansatz von 10 µL wurde auf Eis gekühlt. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 50 – 100 µL kompetente Zellsuspension wurde auf den Ligationsansatz pipettiert und gemischt. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubationsphase auf Eis. Dann wurde die Zellsuspension für genau 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad (Heat-Shock) erhitzt und sofort wieder für 5 Minuten auf Eis gestellt.

Um die Plasmid-DNA in die *E. coli* Zellen einzubringen, wurde zwischen 1,0 – 50,0 ng des betreffenden Plasmids zur Transformation verwendet.

Da es sich bei dem Selektionsmarker der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide um Ampicillin handelte, konnte ein verkürztes Protokoll angewendet werden. Der Marker Ampicillin, der im Plasmid enthalten ist, verleiht dem Bakterium  $\beta$ -Lactamase-Aktivität. Die Penicillinase wird sofort von dem *E. coli*-Bakterium, das das Plasmid aufgenommen hat, synthetisiert. Es muss also keine Inkubation in einem nährstoffreichen Medium erfolgen. Der Ligationsansatz konnte anschließend sofort auf eine auf 37°C vorgewärmte LB-Agarplatte mit Ampicillin (100  $\mu$ g/mL) ausplattiert werden. Diese wurde 16 Stunden bei 37°C inkubiert

Zur Erhöhung der Transformationseffizienz können die Zellen nach dem Heat-Shock auch in 250  $\mu$ L SOC-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Yeast-Extrakt, 10 mmol/L NaCl, 2,5 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 10 mmol/L Glucose) für 30 Minuten auf einem Inkubationschüttler bei 37°C und 200 rpm regeneriert werden. 200  $\mu$ L der Zellsuspension wurden dann auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen und wie oben beschrieben inkubiert.

#### 2.2.9.2 Transformation mittels Elektroporation

Diese Methode bietet eine sehr hohe Transformationseffizienz. Durch einen kurzen elektrischen Impuls entstehen Poren, durch die die Plasmid-DNA in die Zellen gelangt [15]. 50  $\mu$ L kompetente Zellsuspension für die Elektroporation (Invitrogen) wurden auf Eis aufgetaut. Auch SOC-Medium wurde auf Eis gekühlt. 2  $\mu$ L Ligationsansatz bzw. reine Plasmid-DNA (0,1 - 50 ng) wurden in eine Elektroporationsküvette pipettiert. 50  $\mu$ L der aufgetauten kompetenten Zellsuspension wurden zum Ligationsansatz hinzugegeben und ein Impuls von 2,5 kV mit dem Bio-Rad *E. coli* Pulser gegeben. Dann erfolgte eine schnelle Zugabe von 500  $\mu$ L SOC-Medium, gefolgt von einer Inkubation für 1 Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator.



Anschließend wurden 200 µL der Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausgestrichen und 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

### 2.2.10 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR bewirkt die selektive Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes. Diese Vervielfältigung verläuft enzymatisch katalysiert und exponentiell. Der DNA-Abschnitt, der vervielfältigt werden soll, wird durch Oligonukleotide (= Primer), die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden, definiert. Als Template für die PCR-Reaktion können sowohl genomische DNA als auch Plasmid-DNA dienen. Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert ist die DNA-Polymerase. Ausgehend von den Primern, fügt dieses Enzym an deren 3'-Hydroxy-Gruppe Nukleotide gemäß dem komplementären DNA-Strang an [95].

Die PCR wurde in dieser Arbeit zur Manipulation der Plasmid-DNA eingesetzt, um an die Gensequenz von P-Gp mehrere Histidin-Markierungen anzufügen und um neue Restriktionsschnittstellen in Plasmide als Klonierungshilfe einzufügen.

Ein typischer PCR Ansatz ist in der Tabelle 2-9 dargestellt.

**Tabelle 2-9.** PCR-Reaktionsansatz.

<b>PCR-Reaktionsansatz</b>	
Reaktionspuffer 10-fach konz. (Invitrogen)	5,00 µL
dNTP-Mix (10 mmol/L pro dNTP)	1,00 µL
Primer A 10 µmol/L	0,20 µL
Primer B 10 µmol/L	0,20 µL
Template-DNA	weniger als 1µg pro Ansatz
steriles ddW	ad 50,00 µL
Taq DNA Polymerase (5 U/µL)	0,25 µL

Für Standard-Reaktionen wurde die rekombinante *Taq*-Polymerase von *Thermophilus aquaticus* (Invitrogen) eingesetzt, da diese thermostabil ist. Sollten längere DNA-Fragmente amplifiziert werden, dann wurden so genannte proofreading Polymerasen eingesetzt. Sie besitzen eine

zusätzliche 3'→5' Exonuclease-Aktivität. Hierdurch können diese Polymerasen falsch eingebaute Basen korrigieren und besitzen damit eine geringere Fehlerrate.

Die Vervielfältigung der DNA erfolgte mit Hilfe eines Thermocyclers in drei sich wiederholenden Schritten. Standardmäßig wurde die Hot-Start PCR durchgeführt. Dies bedeutet, dass am Anfang eine initiale Denaturierung des DNA-Templates erfolgte.

1. Denaturierung: Die DNA wird bei 94°C für 30 bis 60 Sekunden in zwei Einzelstränge überführt, damit sich die Primer an die DNA anlagern können.
2. Annealing: In Abhängigkeit von den Primer-Schmelzpunkten wird die Temperatur auf 50 - 68°C abgesenkt. Die Primer lagern sich an den komplementären DNA-Einzelstrang.
3. Extension: Die Temperatur wird für 1 Minute auf 72°C angehoben. Dies ist der optimale Arbeitsbereich der *Taq*-Polymerase. 1 Minute Arbeitszeit ist ausreichend zur Amplifizierung von 1000 Basenpaaren. Wird ein größeres Stück amplifiziert, dann verlängert sich entsprechend die Dauer des Extensionsschritts.

Diese drei Zyklen wurden in der Regel 30-mal wiederholt. Am Ende der Reaktion erfolgte eine finale Extension für 10 Minuten bei 72°C, um die Amplifikation von nicht kompletten DNA-Bruchstücken zu beenden. Zur Kontrolle wurden 2 µL des PCR-Reaktionsproduktes auf einem Agarose-Gel getrennt.

Die PCR-Reaktionsprodukte wurden anschließend mit dem PCR-Aufreinigungs-Kit der Firma Qiagen behandelt und die erhaltene DNA in 20 – 50 µL TE-Puffer resuspendiert.

### 2.2.11 Oligonukleotide (Primer)

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von den Firmen Qiagen-Operon und Integrated DNA Technologies synthetisiert. Bei dem Design der Primer wurde darauf geachtet, dass die Schmelztemperatur zweier Primerpaare zwischen 55°C und 80°C lag. Die Schmelztemperatur wurde nach der Formel  $T_m = (4x[G+C]) + (2x [A+T])^\circ\text{C}$  berechnet. Der GC-Gehalt der Primer sollte zwischen 40-60% liegen. Die Primer sollten an den Enden auch keine komplementären Sequenzen aufweisen, da es sonst zu einer dimeren Primer-Bildung kommen könnte.

### 2.2.12 DNA-Sequenzierung

Zur Kontrolle wurden die klonierten Vektoren zur DNA-Sequenzierung eingeschickt. Dies wurde kommerziell von der Firma PHARMISS DNA Sequencing Service oder im DNA-Sequencing Core der Biomedical Research Facility der Universität Virginia durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Bioedit 7.0 ausgewertet.

### 2.2.13 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation von kompetenten *S. cerevisiae* wurde mit der Lithium-Acetat-Methode nach *Gietz et al.* durchgeführt [39]. Kompetente Hefe-Zellen wurden immer unmittelbar vor der Transformation hergestellt, da die Transformationseffizienz bei eingefrorenen kompetenten Zellen stark abnimmt. Die nachfolgende Schritte 1 und 2 beschreiben den Prozess der Gewinnung von kompetenten Hefezellen.

Die Transformation gliedert sich in drei Arbeitsschritte:

1. Kultivierung der Hefe-Stämme: Der zu transformierende Stamm wurde zuvor auf einer SD-Agarplatte (siehe Kapitel 2.2) mit dem entsprechenden auxotrophen Marker kultiviert. Eine Kolonie wurde in 5 mL YPD-Medium übergeimpft und über Nacht im Schüttel-Inkubator bei 30°C und 250 rpm kultiviert. Diese Vorkultur sollte ausgewachsen

sein. Dies zeigte sich durch Messung der Absorption (optische Dichte) bei 600 nm durch Werte von 2,0 oder höher. Die Vorkultur wurde in 50 mL YPD-Medium in einem 250 mL Erlenmeyerkolben auf eine optische Dichte ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) von 0,2 verdünnt und bis zu einer  $OD_{600\text{ nm}}$  zwischen 0,4 - 0,8 unter gleichen Bedingungen wie die Vorkultur kultiviert. Unter diesen Bedingungen befanden sich die Zellen beim Ernten in der exponentiellen Wachstumsphase.

2. Waschen mit Lithiumacetat: Die Hefezellsuspension wurde in ein steriles Röhrchen (50 mL) überführt und bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. 1,2 mL Lithiumacetat-Puffer (0,1 mol/L Lithiumacetat, 10 mmol/L Tris pH 7,5, 1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) wurde hinzu pipettiert und das Zellpellet resuspendiert. Die Hefe-Lithiumacetat-Suspension wurde in ein steriles 1,5 mL Mikroliterreaktionsgefäß (R-Gefäß) überführt. Das R-Gefäß wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Bodensatz in 500  $\mu\text{L}$  Lithiumacetat Puffer resuspendiert.
3. Transformation:

**Tabelle 2-10.** Transformations-Ansatz

<b>Transformations-Ansatz</b>	
PEG/Li-Ac Lösung	120 $\mu\text{L}$
Li-Ac behandelte Hefezellen	20 $\mu\text{L}$
Einzelstrang-DNA (Heringssperma)	2 $\mu\text{L}$
Plasmid-DNA Lösung	1 $\mu\text{L}$

Vor jeder Verwendung wurde die Carrier-DNA (Heringssperma) (10 mg/mL) durch kurzes Erhitzen auf 90°C denaturiert, um das Vorliegen als Einzelstrang-DNA zu gewährleisten. Nach obigem Schema (siehe Tabelle 2-10) wurden entsprechend der Anzahl an Transformationen R-Gefäße vorbereitet. Die Reaktion wurde für 1 Stunde bei 30°C inkubiert. Dann erfolgte eine Zugabe von je 14  $\mu\text{L}$  DMSO zur Effizienz-Steigerung. Der Ansatz wurde vorsichtig per Hand gemischt, um die Zellen nicht zu sehr durch Scherkräfte zu stressen. Dann erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C im

Wasserbad für 15 Minuten. Nach diesem Schritt wurde das R-Gefäß zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µL sterilem Aqua dest. resuspendiert. 200 µL der Zellsuspension wurden auf SD-dropout-Agarplatten mit entsprechendem auxotrophen Marker bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Die Inkubationsdauer bis zum Erscheinen der ersten Kolonie ist abhängig von dem verwendeten Stamm. Sie betrug zwischen drei und sieben Tagen.

### 2.2.14 Präparation von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe-Zellen zwecks Kontrolle der Transformation wurde der nachfolgend aufgeführte Aufbrech-Puffer verwendet (Tabelle 2-11).

**Tabelle 2-11.** Hefe-Aufbrech-Puffer.

<b>Aufbrech-Puffer (in ddW)</b>	
Tris-HCl pH 8,0	50,00 mmol/L
EDTA	1,00 mmol/L
EGTA	1,00 mmol/L
DTT	6,48 mmol/L
Paraaminobenzamidin	0,20% (m/V)
6-Aminohexansäure	1,00% (m/V)
Leupeptin	1,00 µmol/L
Pepstatin A	2,00 µmol/L
Benzamidin	1,00 µmol/L
DFP	1,00 µmol/L

50 bis 100 mL SD-Medium (Aminosäure-defizient) wurde mit einer Kolonie angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer optischen Dichte von 1,0 bei 600 nm angezüchtet. 2 mL der Zellkultur wurde in ein R-Gefäß überführt und zentrifugiert (500 g, R.T.). Das Pellet wurde in 50 µL Aufbrech-Puffer resuspendiert. Hefezellen sind zusätzlich zur Phospholipidmembran von einer stabilen Zellwand umhüllt, die sich aus Schichten verschiedener Polysaccharide zusammensetzt. 10 Einheiten Zymolase wurden zugegeben. Damit das Enzym Zymolase diese Polysaccharide verdauen konnte, wurde das R-Gefäß für 20 Minuten auf 37°C erwärmt. Anschließend wurden 100 µL Puffer P1 des Mini-Prep-Kits (Qiagen) und 100 µL säurebehandelte

Glasskugeln (Biospec) hinzugegeben, damit die Zellwände mechanisch aufgebrochen wurden. Die Mischung wurde stark gevortext (mind. dreimal für 1 Minute). Danach wurden weitere 150 µL Puffer P1 Qiagen hinzu pipettiert. Der Überstand wurde in ein neues R-Gefäß überführt. Dann folgte die Zugabe von 250 µL Lysis-Puffer P2 (Qiagen). Alle weiteren Schritte folgten dem QIAprep Spin Miniprep Kit-Protokoll für Plasmid-Extraktion mit einer Zentrifuge. Die erhaltene DNA wurde in 20 - 50 µL TE-Puffer resuspendiert.

## 2.3 Biochemische Methoden

Einführung: Die nachfolgenden Kapitel beschreiben die Techniken und Methoden die in dieser Arbeit zur Gewinnung (Membranpräparation, Aufreinigung und Rekonstitution) und Analyse von Proteinen verwendet worden sind, nachdem eine erfolgreiche Transformation eines P-Gp-Expressionsplasmids in Hefezellen stattgefunden hatte.

### 2.3.1 Membranpräparation von Hefezellen

Materialien und Geräte:

- |   |  |                 |
|---|--|-----------------|
| • | Glashomogenisatoren 20mL                     | Whatman         |
| • | Zentrifuge Avanti JA-20                      | Beckman Coulter |
| • | Optima LE-80K Ultrazentrifuge                | Beckman Coulter |
| • | 0,5 mm Zirconia/Silicia Beads #11079105z     | Biospec         |
| • | Bead-Beater Model 1107906                    | Hamilton Beach  |
| • | Stahlkammer 350 mL für Bead-Beater Nr. 60801 | Biospec         |

Lösungen:**Tabelle 2-12.** Lösungen für die Membranpräparation von Hefezellen.

<b>Homogenat-Puffer (gelöst in ddW)</b>		
Tris-HCl pH 7,5		50,00 mmol/L
EGTA		1,00 mmol/L
EDTA		5,00 mmol/L
β-Mercaptoethanol		25,00 mmol/L
BSA, Fraktion V		5,00 mmol/L
Sacharose		300,00 mmol/L
PMSF		1,00 mmol/L
Pepstatin A		2,00 µmol/L
Leupeptin		1,00 µmol/L
Benzamidin		1,00 µmol/L
DFP		1,00 µmol/L
<b>Wasch-Puffer (gelöst in ddW)</b>		
Tris-HCl pH 7,5		10,00 mmol/L
EGTA		1,00 mmol/L
Glycerol		10,00% (V/V)
β-Mercaptoethanol		2,00 mmol/L
PMSF		1,00 mmol/L
Pepstatin A		2,00 µmol/L
Leupeptin		1,00 µmol/L
Benzamidin		1,00 mmol/L
DFP		1,00 mmol/L
<b>Aufbewahrungs-Puffer (gelöst in ddW)</b>		
Tris-HCl pH 7,5		10,00 mmol/L
EGTA		1,00 mmol/L
Glycerol		25,00% (V/V)
β-Mercaptoethanol		2,00 mmol/L
PMSF		1,00 mmol/L

Prinzip: Da es sich bei P-Gp um ein Membranprotein handelt und Hefezellen im Gegensatz zu Säugerzellen eine stabile Zellwand besitzen, muss die unter der Zellwand liegende Plasmamembran der Hefezellen isoliert werden. Die Isolierung aus den Hefe-Stämmen geschieht in Anlehnung an die Methode von *Perlin et al* [86].

Durchführung: Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Tiefgefrorene Zellen (ca. 20 g - 60 g) werden in 800 mL Wasser mit 8 mL 0,1 mol/L PMSF

aufgetaut und mit einem Pinsel resuspendiert und bei 9400 g 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Nassgewicht des Zellpellets bestimmt (Zentrifugengefäß wurde zuvor tariert). Das Zellpellet resuspendierte man in 70 mL Homogenat-Puffer. Der pH-Wert von 7,5 des Homogenats wurde überprüft und gegebenenfalls mit 1 mol/L Tris-Base eingestellt. Das Homogenat wurde in eine Bead-Beater Stahlkammer überführt, die mit 180 mL zirkonisierten Glaskugeln gefüllt war. Die Kammer wurde mit Homogenat-Puffer bis zur Luftblasenfreiheit aufgefüllt und die Zellen vier Minuten durch die Glaskugeln im Bead-Beater mechanisch aufgebrochen. Durch das Aufbrechen erwärmte sich das Homogenat in der Stahlkammer bis auf Raumtemperatur. Deshalb folgte eine 4-minütige Kühlphase (Eiswasser). Dieser Zyklus wurde zweimal wiederholt. Vor jedem Zyklus wurde 31 µL DFP zum Homogenat in die Stahlkammer gegeben, um Serin-Proteasen irreversibel zu deaktivieren.

Nach drei Zyklen wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet, ob der Grossteil der Hefezellen aufgebrochen war, ansonsten wurde ein weiterer Aufbrech-Zyklus angeschlossen. Der pH-Wert des Homogenats wurde erneut überprüft (pH = 7,5) und bei Bedarf neu eingestellt. Das Homogenat wurde in Zentrifugengläser überführt und 5 Minuten bei 3500 x g zentrifugiert, um die gröberen Zellbestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde in neue Zentrifugengläser überführt und 20 Minuten bei 13.800 x g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde in sechs Zentrifugenröhrchen (Typ 45Ti Fa. Beckman) überführt und bei 138.000 x g 80 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Membranpellet in Waschpuffer resuspendiert und mit einem Glashomogenisierer homogenisiert.

Die homogenisierten Membranen wurden gleichmäßig in sechs 45Ti Zentrifugenröhrchen verteilt und erneut bei 138.000 x g für 80 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, wobei das Membranpellet in Aufbewahrung-Puffer resuspendiert wurde. Schließlich wurden die Membranen erneut mit einem Glashomogenisierer homogenisiert und dann bei -80°C in 15 mL Falcon-Röhrchen aliquotiert gelagert.



### 2.3.2 Herstellung von Liposomen

#### Materialien und Geräte:

- |   |                            |
|---|----------------------------|
| • Lipide (PC, PS, E. coli mixed Lipids) | Sigma, Avanti Polar Lipids |
| • Mini-Extruder                         | Avanti Polar Lipids        |
| • Ultraschallstab, cell disruptor       | Heat Systems Ultrasonics   |
| • SpeedVac                              | Beckman                    |
| • Dialyse Schläuche                     | Spektrum                   |
| • Dickwandiges Reagenzglas 20 mL        | Corex tubes                |

Einführung: Damit P-Gp als Membranprotein seine Funktionsfähigkeit auch nach der Aufreinigung behält, muss es in Liposomen rekonstituiert werden. Der Arbeitsschritt der Rekonstitution erfolgt direkt im Anschluss an die Aufreinigung des Proteins (siehe Kapitel 2.4.3). Es gibt verschiedene Möglichkeiten Liposomen herzustellen. Die in dieser Arbeit angewandten Methoden zur Herstellung der Lipidsuspension und der Vesikel werden nachfolgend dargestellt.

#### 2.3.2.1 Herstellung der Lipidsuspension

##### Lösungen:

**Tabelle 2-13.** Puffer zur Rehydrierung von Lipiden.

<b>Rehydrierungspuffer (gelöst in ddW)</b>	
Tris-HCl pH 7.4 bei 4°C	50,00 mmol/L
Saccharose	250,00 mmol/L
Glycerol	20,00% (V/V)
n-Aminocaprinsäure	5,00 mmol/L
n-Octyl-β-D-glucopyranosid (OG)	2,00% (m/V)*
Natriumazid	1,00 μmol/L
*Konzentration richtet sich nach der weiteren Verwendung	

Prinzip: Liposomen entstehen durch die Hydratisierung eines dünnen Lipidfilms. Die einzelnen Lipide werden in einem schnell flüchtigen organischen Lösungsmittel gelöst. Durch Verdampfen des Lösungsmittels

bleibt ein Lipidfilm zurück. Nach Resuspension in wässrigem Medium entsteht durch Beschallung eine Lipidsuspension. Wird die gemischte Lipidsuspension zur Herstellung von Proteoliposomen durch Dialyse verwendet, so werden dem Rehydrierungspuffer 2 % OG zugesetzt. Werden die Liposomen durch andere Techniken hergestellt, enthält der Puffer kein Detergenz. Die Lipidsuspension ist allerdings ein Edukt für alle verwendeten Techniken.

Durchführung: Die Lipide wurden in Chloroform gelöst und gemischt. Das Chloroform wurde unter Argon im Abzug abgedampft. Um sicherzustellen, dass das gesamte Lösungsmittel verdampft war, folgte eine weitere Trocknung unter Vakuum in der Speed-Vac (60 Minuten). Zur Kontrolle der ursprünglichen Einwaage wurde das Gewicht des Lipidfilms durch Differenzwägung bestimmt. Danach wurde eine Konzentration von 50 mg/mL Lipid mit Hilfe des Rehydrierungspuffers eingestellt. Die Suspension wurde mit einem Ultraschallstab dreimal 3 Minuten (75 Watt, 50 % Arbeitszyklus) unter Argon bis zur Opaleszenz beschallt. Dies ergab eine mizellare Lipidsuspension in Gegenwart des Detergenzes. In Abwesenheit des Detergenzes lagen große unilamellare Vesikel vor (LUV). Die Lipidsuspension wurde unter Argon bei -80°C gelagert.

#### 2.3.2.2 Herstellung von kleinen unilamillaren Vesikeln (SUV) mit rekonstituiertem P-Gp mittels Dialyse

Prinzip: Der Lipidsuspension wird mit homogenem solubilisiertem P-Gp versetzt. Das Detergenz der Lipid-Protein-Suspension wird durch eine semipermeable Membran osmotisch entfernt. Hierdurch bilden sich kleine unilamillare proteinhaltige Vesikel (SUV bzw. Proteoliposomen).

Durchführung: Die solubilierte Protein-Lösung wurde mit Lipid-Suspension in einen Dialyse-Schlauch gefüllt. Die Länge des Dialyse-Schlauches richtete sich nach dem verwendeten Volumen der Protein/Lipid-Mischung. Das Volumen des Dialyse-Puffers (siehe Tabelle 2-13) sollte mindestens das 100-fache des Volumens der Dialyse-Lösung betragen. Nach drei Stunden wurde

der Dialyse-Puffer durch frischen Puffer ersetzt. Die Dialyse war nach ca. 16 Stunden abgeschlossen.

### 2.3.2.3 Herstellung von LUV durch Extrusion

#### Lösungen:

**Tabelle 2-14.** Lösungen für die Extrusion von Liposomen.

---

<b>Dialysepuffer</b>	
Tris-HCl pH 7.4 bei 4°C	50,00 mmol/L
EGTA	1,00 mmol/L
6-AA (n-Aminocapronsäure)	5,00 mmol/L
DTT	1,00 mmol/L

---

Prinzip: Bei der Extrusion werden große unilamellare Vesikel (LUV) gewonnen. Die bei der Hydratation entstandenen großen multilamellaren Vesikel (LMV) werden durch mechanische Energie in LUV umgewandelt. Dies geschieht durch die Extrusion der Lipidsuspension durch Filter. Die Filtergröße richtet sich nach der gewünschten Liposomengröße. Proteine werden im Gegensatz zur Dialyse erst nach erfolgter Extrusion in die Liposomen eingeführt.

Durchführung: Die Lipidsuspension wurde entsprechend der Vorschrift aus Kapitel 2.3.2.1 frisch hergestellt. Der Rehydrierungspuffer wurde nach Tabelle 2-14 hergestellt. Nach mindestens 30-minütiger Rehydrierung erfolgte drei bis fünfmal ein Einfrier/Auftau-Zyklus. Zum Einfrieren wurde die Suspension bis zu Erstarren mit Trockeneis gekühlt und dann bei Raumtemperatur wieder aufgetaut. Anschließend folgte die Extrusion der Lipidsuspension mit dem Avanti Mini Extruder™ mit mindestens vier Hüben. Die erhaltenen LUV wurden bei 4°C gelagert. Sie waren maximal über 72 Stunden verwendbar.



**Elutionspuffer (gelöst in ddW)**

Tris-HCl pH 7,4	25,00 mmol/L
Glycerol	0,20 mmol/L
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	50,00 mmol/L
Adenosintriphosphat (ATP)	2,00 mmol/L
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	2,00 mmol/L
β-Mercaptoethanol	2,00 mmol/L
Imidazol-HCl pH 7,4	250,00 mmol/L
n-Octyl-β-D-glucopyranosid (OG)	1,40% (V/V)
Lipidsuspension 50 mg/mL (siehe Kapitel 2.3.2.1)	0,10% (V/V)
PMSF	1,00 mmol/L

**Prinzip:** Das rekombinante humane P-Glykoprotein besitzt am C-terminalen Ende eine 10-fache Histidin-Markierung. Das P-Gp wird durch ein Detergenz aus der Plasmamembran gelöst. In der Nickel-Affinitätschromatographie wird die Histidin-Markierung genutzt, um das P-Gp von den anderen Proteinen, die sich in der Hefemembran befinden, abzutrennen. Die Rekonstitution erfolgte durch Dialyse (siehe Kapitel 2.4.2).

**Durchführung:** Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die obigen Pufferlösungen wurden entgast und unter Argon gelagert. Der pH-Wert der Lösungen wurde in Gegenwart von Glycerol mit HCl eingestellt. Pro 20 mL Solubilisierungspuffer wurde 1 mL Ni<sup>2+</sup>-Superflow verwendet. Das Ni<sup>2+</sup>-Affinitätsgel wurde mit dem 20-fachen Volumen an Tris-HCl pH 8,0 (25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0 20 %-Glycerol-Lösung) präequilibriert. Die Hefepiasmamembran-Präparationen wurden im Solubilisierungspuffer bei einer Konzentration von 2 mg/mL 20 Minuten unter Rühren solubilisiert. Die Suspension wurde dann bei 100.000 x g für 60 Minuten zentrifugiert, um die gelösten Bestandteile von den ungelösten Membranbestandteilen zu trennen.

Dem Überstand wurde 2 mol/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung zugegeben, so dass die Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Konzentration 200 mmol/L betrug. Das Ni<sup>2+</sup>-Superflow wurde mit dem Überstand beladen. Dann wurde die Mischung aus Nickel-Beads und solubilierten Membranen für vier Stunden unter leichten kontinuierlichen Schwenkbewegungen inkubiert und dann auf eine Bio-Rad Econo Säule

geladen. Danach wurde die Säule mit dem 20-fachen Säulenvolumen an Waschpuffer gewaschen. Das gereinigte auf der Säule verbliebene P-Gp wurde mit dem fünffachen Säulenvolumen an Elutionspuffer eluiert. Es wurden entsprechend des Volumens an Eluat Dialyse-Schläuche zur Herstellung von Proteoliposomen zurechtgeschnitten. Die Berechnung für die Schlauchlänge erfolgte nach folgender Faustformel, da für den Dialyseschlauch eine bestimmte Durchflussrate pro Längeneinheit angegeben wurde.

$$\text{Länge des Dialyseschlauchs} = 2 \times (\text{Eluatvolumen}) / \text{Durchflussrate.}$$

Der Dialyseschlauch wurde vor der Verwendung ca. 1 Stunde in Aqua dest. gelagert und mit Aqua dest. ausgewaschen. Dem Eluat wurde DTT hinzugefügt (Endkonzentration 1 mmol/L). Das Eluat wurde in den Dialyseschlauch gegeben und der Dialyseschlauch im Dialysepuffer für 16 Stunden inkubiert. Der Dialysepuffer wurde dabei mit einem Rührfisch über die gesamte Inkubationszeit gerührt. Zuvor wurden ca. 50 mL bis 100 mL frischer Dialyse-Puffer für die später folgende Resuspendierung der Proteoliposomen entnommen. Nach drei Stunden wurde alter Dialyse-Puffer durch neuen Dialyse-Puffer ersetzt. Das Volumen des Dialysepuffers betrug mind. das 100-fache des Eluats. Die entstandenen Proteoliposomen zentrifugierte man bei 125.200 x g für 3 Stunden, anschließend wurde das Pellet in Dialysepuffer resuspendiert und in einem Mini-Glashomogenisierer homogenisiert. Das Volumen zum Resuspendieren variierte zwischen 100 µL bis 1500 µL, abhängig von dem eingesetzten Membranvolumen.

### 2.3.4 Proteinbestimmung

#### 2.3.4.1 Amido-Schwarz-Protein-Assay

##### Materialen und Geräte:

- 96-Vakuum Block                      Schleicher und Schüll oder Roth
- Protein Standard BSA 200 mg/mL      SIGMA P-5369
- Wasserstrahlpumpe
- PVDF-Membran                      Roth
- Amidoschwarz 10B                      Applichem oder Bio-Rad
- Photometer                              Ultraspec 4000 Amersham Biosciences

##### Lösungen:

**Tabelle 2-16.** Lösungen für Amido-Schwarz-Protein-Assay.

<b>Amido-Schwarz-Färbelösung</b>		
Methanol	45,00	Volumenanteile
Eisessig	10,00	Volumenanteile
ddW	45,00	Volumenanteile
AmidoBlack 10B	0,25	%
<b>Tris/SDS-Lösung (in ddW)</b>		
Tris pH 7,5	1,00	mol/L
SDS	2,00	% (m/V)
pH 7,5 mit HCl einstellen		
<b>TCA-Lösung (100%)</b>		
Trichloressigsäure (TCA)	100,00	g
ddW	ad 100,00 mL	
<b>Entfärbelösung</b>		
Methanol	45,00	Volumenanteile
Essigsäure	1,00	Volumenanteile
ddW	4,00	Volumenanteile
<b>Elutions-Lösung</b>		
NaOH	0,50	g
EDTA	0,05	mol/L
Ethanol	250,00	mL

Prinzip: Der Amido-Schwarz-Protein-Assay ermöglicht die Bestimmung der Proteinkonzentration in Anwesenheit von hohen Lipidkonzentrationen (im mg/ml-Bereich) [51]. Die Proteine werden durch Bindung an eine Membran von störenden Bestandteilen (Lipide, Mercaptoethanol) abgetrennt. Nur die zu bestimmenden Proteine werden an die Membran gebunden, angefärbt und die Intensität dieses Farbkomplexes wird photometrisch bestimmt. Der Assay wurde zur Proteinbestimmung von Plasmamembranen und Proteoliposomen eingesetzt.

Durchführung: Die Proteinstandardkurve im Bereich von 0 – 30 µg Gesamtprotein wurde mit einer BSA-Lösung (0,2 mg/mL) hergestellt. 10 µl der Proteinprobelösung wurde zur Konzentrationsbestimmung vorgelegt. Die Proben mussten bei Bedarf zuvor verdünnt werden. Das Gesamtvolumen in den 1,5 mL R-Gefäßen betrug 225,0 µL, welches mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurde. In jedes R-Gefäß wurden bei Raumtemperatur 30 µL Tris/SDS-Lösung hinzupipettiert. Anschließend wurden 50 µL kalte 100 %-ige TCA-Lösung hinzugegeben. Die R-Gefäße wurden gevortext und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mit Hilfe der Vakuumfiltriereinrichtung (Schleicher und Schüll) wurden die ausgefällten Proteine auf eine PVDF-Membran gebunden. Es folgten zwei Waschschrte mit je 200 µL 6 %-iger TCA. Die PVDF-Membran wurde in einem Amido-Schwarz-Färbebad überführt und für 20 Minuten gefärbt. Anschließend wurde die Membran eine Minute mit dest. Wasser gewaschen. Es folgten drei dreiminütige Behandlungen mit Entfärbelösung. Zum Entfernen der restlichen Entfärbelösung wurde drei Minuten mit Wasser gewaschen. Mit einem Locher wurden die einzelnen Protein-Dots ausgestanzt und für 15 Minuten in 1 mL Elutionslösung im Reagenzglas inkubiert. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 630 nm gegen Wasser als Referenz vermessen.



## 2.3.4.2 Peterson-Lowry-Protein-Assay

Materialien und Geräte:

- Folin-Ciocalteu-Reagenz Merck
- Photometer Ultraspec 4000 Amersham Biosciences

Lösungen:**Tabelle 2-17.** Lösungen für den Peterson-Lowry-Protein-Assay.

<b>Lösung A</b>	
NaOH	4,0 g
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	20,0 g
Natriumtartrat	0,2 g
SDS	10,0 g
ddW	ad 1,0 L
bei Raumtemperatur max. 2 Wochen haltbar.	
<b>Lösung B</b>	
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	0,5 g
ddW	100,0 mL
<b>Lösung C</b>	
Lösung A	49 Volumenteile
Lösung B	1 Volumenteile
frisch zubereitet	

Prinzip: Der Lowry-Assay beruht auf zwei verschiedenen Reaktionen. In der ersten Reaktion komplexiert die alkalische Kupfertartrat-Lösung die Peptid-Bindungen des Proteins. Es folgt eine Reduktion der phenolischen Hydroxyl-Gruppen des Folin-Ciocalteu-Reagenz [65]. Da Lipide den Lowry-Assay stören, modifizierte Peterson den Assay, um Proteine in Gegenwart von geringen Lipidmengen zu bestimmen [87]. Dazu werden die Proteine zuvor mit einer TCA-Fällung von den störenden Bestandteilen abgetrennt. Dieser Assay wurde in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Plasmamembranen eingesetzt.

Durchführung: Die Proteinstandardgerade von 0 – 30 µg BSA wurde in 1 mL H<sub>2</sub>O in Duplikaten angefertigt. Die Proben wurden entsprechend der zu erwartenden Konzentration in 1 mL H<sub>2</sub>O gelöst. Zur Solubilisierung der Membranen wurde 50 µL 0,3%-ige Natriumdeoxycholat-Lösung zugefügt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 100 µL 70%-iger (m/V) TCA-Lösung. Die Proben wurden 20 Minuten mit 10000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 mL Lösung C versetzt (Lösung C wurde frisch aus Lösung A und B hergestellt). Nach 10-minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 50 µL Folin-Ciocalteau-Reagenz. Der Farbkomplex wurde für 30 Minuten im Dunkeln entwickelt und anschließend bei 750 nm im Photometer gegen Wasser als Referenz vermessen.

#### 2.3.4.3 Bradford-Assay

Prinzip: Der Bradford-Assay beruht auf der quantitativen Färbung von Proteinen mit dem Farbstoff Coomassie Blau G-250 [11]. Dieser Assay ist recht störanfällig, da das Reagenz direkt zur Proteinlösung gegeben wird. Dieser Assay wurde daher nur zur qualitativen Proteindetektion eingesetzt.

Durchführung: Der Assay wurde entsprechend dem Protokoll des Anbieters (Biorad) durchgeführt. Die Absorption des Farbkomplexes wurde bei 595 nm photometrisch gegen Wasser vermessen.

### 2.3.5 Semi-Quantifizierung der Reinheit von P-Gp durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### 2.3.5.1 SDS-PAGE

##### Materialien und Geräte:

- Elektrophorese- und Blottingkammer Mini Protean II™ Bio-Rad
- Elektrophorese- und Blottingkammer EC250-90 E-C Apparatus Corporation
- Red Rotor Invitrogen
- Durchlichtscanner UMAX

##### Lösungen:

**Tabelle 2-18.** Lösungen für SDS-PAGE.

<b>10x Lösung B (Laufpuffer)</b>	
Tris	121,10 g
Glycin	576,54 g
ddW	ad 4000 mL
<b>4x Lösung C (Sammelgel)</b>	
Tris	30,28 g
10% SDS	20,00 mL
ddW	ad 500 mL
mit konz. HCl bei R.T. auf pH 6,8 einstellen	
<b>4x Lösung D (Trenngel)</b>	
Tris	90,83 g
10% SDS	20,00 mL
ddW	ad 500 mL
mit konz. HCl bei R.T. auf pH 8,8 einstellen	
<b>STOP-Puffer*</b>	
SDS	4,00% (g/V)
Glycerol	10,00%(m/V)
Lösung C	20,00 mL
DTT	250,00 mg
ddW	ad 50,00 mL
Zugabe von 1-2mg Brom-phenolblau	

---

**Färbe-Lösung**

---

Methanol	500 mL
Essigsäure	100 mL
Coomassie-Brilliant-Blue R250	1,25 g
ddW	ad 1000 mL

---

---

**Entfärbe-Lösung**

---

Methanol	200,00 mL
Essigsäure	100,00 mL
ddW	ad 1000 mL

---

\*Der STOP-Puffer visualisiert durch den Farbstoff die Lauffront des Gels. Dadurch ist es möglich eine Elektrophorese vorzeitig zu „stoppen“, um ein eventuelles überlaufen der Lauffront zu verhindern.

---

**Trenngel SDS-PAGE 7,5%**

---

ddW	14,10 mL
50% Glycerol	0,80 mL
4x Lösung D	7,50 mL
10 % APS	0,01mL
30 % Acrylamid-1% Bisacrylamid	7,50 mL
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	0,01 mL

---

---

**Sammelgel SDS-PAGE 7,5%**

---

ddW	6,44 mL
4x Lösung C	2,50 mL
10% APS	0,03 mL
30% Acrylamid-1% Bisacrylamid	1,00 mL
TEMED	0,035 mL

---

---

**Laufpuffer**

---

10x Lösung B	100,00 mL
10% SDS-Lsg.	10,00 mL
ddW	ad 1000,00 mL

---

Prinzip: Zur Analyse der isolierten Hefeplasmamembranen und der Aufreinigungen werden die Proteine gelelektrophoretisch getrennt. Die SDS-Page kann sowohl qualitativ als auch quantitativ eingesetzt werden. Das anionische Detergenz Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS) denaturiert

Proteine und verdeckt deren Eigenladung durch Mizellbildung. Die Proteine liegen in negativ geladenen Mischmizellen vor. Durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) werden die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen aufgespalten. Für die Trennung wird ein diskontinuierliches Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem nach Lämmli [57] eingesetzt.

Durchführung: Zuerst wurden Trenngel und Sammelgel entsprechend der obigen Tabelle gegossen. Hierbei ist eine Polymerisationszeit sowohl des Sammel- als auch des Trenngels von ca. 45 Minuten zu beachten. Die Proben werden mit STOP-Puffer versetzt. Bis zu einem Probenvolumen von 10 µL wurde 10 µL STOP-Puffer hinzugegeben. War das Probenvolumen größer als 10 µL, wurde der STOP-Puffer zu gleichen Teilen hinzugegeben. Die Proben wurden bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubiert. Darauf wurden die Proben in die Geltaschen des Sammelgels pipettiert. Zur Größenmarkierung lief ein Protein-Standard mit. Es wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Hatte die Probenfront das Trenngel erreicht, wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die Probenfront das Ende des Trenngels erreicht hatte. Das Gel wurde 16 Stunden mit Coomassie Blau unter langsamen Schwenkenbewegungen gefärbt. Anschließend wurde unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung das Gel bis zum gewünschten Grad entfärbt. Das Gel wurde zwecks Archivierung 24 Stunden in 10%-iger ethanolischer Glycerol-Lösung dehydriert.

### 2.3.5.2 Reinheitsbestimmung

#### Materialien und Geräte:

- Programm NIH Image 1.61 <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>
- Programm Image J 1.33 <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Graustufen Step-Tablet ST-34 Kodak
- Graustufen Calibration Target Coloraid
- Programm Corel Photo Paint 10.0 Corel

Durchführung: Es wurden 2,5 µg, 5 µg und 7,5 µg auf Reinheit zu untersuchendes Protein (P-Gp) auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Zur Ermittlung des Grundrauschens der Coomassie Blau-Färbung wurde rechts und links neben P-Gp jeweils die gleiche Menge an BSA aufgetragen.

Das zu quantifizierende Gel wurde in einem Scanner mit einem Graustufenkeil mit 150 dpi als 256-Graustufen-Bild eingescannt. Mit den gleichen Parametern (Helligkeit, Schatten und Mitteltöne) wurde der Graustufenkeil eingescannt. Die eingescannten Bilder wurden in das Tiff 5.0 (uncompressed) Format übertragen. Im NIH-Image-Programm wurde das „Gel Plot“-Makro geladen. Die Kalibrierung des Programms erfolgte mit Hilfe des eingescannten Bildes des Graustufenkeils. Es wurden mindestens 10 Graustufenboxen des Graustufenkeils mit dem Messwerkzeug von NIH-Image vermessen. Anschließend wurden die gemessenen Graustufen mit der Rodbard-Funktion gegen die Graustufenkeil-Kalibrierung angepasst. Als Einheit wurde die optische Dichte (OD) gewählt.

Die Auswertung der einzelnen Laufspuren des Gels erfolgte mit der implementierten Gel-Makro-Funktion 2 von NIH-Image. Dieses Makro bestimmte die Intensität der Färbung der einzelnen aufgetrennten Proteinbanden innerhalb einer Laufspur durch Messung der optischen Dichte. Die Intensität der Proteinfärbung der Laufspuren wurde als Peak-Plot wiedergegeben und die Fläche unter der Kurve (AUC) jedes Peaks bestimmt. Hierzu wurde die Basislinie zuvor mit Hilfe der flankierenden BSA-Laufspuren manuell angepasst, um das Grundrauschen der Coomassie Färbung zu eliminieren. Die Färbung des Gels ist nämlich nicht über den gesamten Bereich einheitlich. BSA wird als Referenzprotein verwendet, weil es zu 100 % rein ist. Diese korrigierten AUCs der einzelnen Proteinbanden einer Laufspur wurden bestimmt. Die Reinheit des P-Gp wird durch Gleichung 2.1 angegeben.

*Gleichung 2-1. Reinheit des P-Gp in %.*

$$\text{Reinheit} = \frac{\text{AUC (P-gp)}}{\text{AUC (Summe aller Peaks)}} \cdot 100$$

### 2.3.6 Immuno-Blot (Western-Blot)

Materialen und Geräte:

- |   |  |                               |
|---|--|-------------------------------|
| • | TE42 Protein Transfer Tank                     | Hofer                         |
| • | Nitrocellulose Membran                         | Schleicher und Schüll         |
| • | Mini Protean II                                | BioRad                        |
| • | BioMax Light Film, Light 1                     | Kodak Sigma Z370398-50EA      |
| • | Processing chemicals for autoradiography films | Kodak Sigma Z354147           |
| • | ECL plus Western Blotting Detection system     | Amersham Biosciences RPN 2132 |

Lösungen:

**Tabelle 2-19. Lösungen für Western-Blot.**

Transfer-Puffer	
Glycin	86,40 g
Tris	18,00 g
ddW	ad 6000 mL
TBS-Puffer	
Tris	12,00 g
KCl	0,80 g
NaCl	32,00 g
Chloracetamid	0,40 g
ddW	ad 4000 mL
TBS-T-Puffer	
wie TBS Puffer	
Tween 20	8,00 mL
ddW	ad 4000 mL

---

**1. Antikörper-Lösung**

---

1x TBS-Puffer	100,00 mL
NaN <sub>3</sub>	0,10 g
BSA	1,00 g
Anti-P-Gp (0,1 mg/mL) Signet C219	0,50 mL

---

**2. Antikörper-Lösung**

---

1x TBS-T Puffer	100,00 mL
BSA	1,00 g
Anti-Mouse Peroxidase Konjugat IgG H+L	0,05 mL

---

Prinzip: Die durch die SDS-PAGE elektrophoretisch getrennten Proteine werden mittels Elektroblothing nach der Methode von *Towbin et al.* auf eine geeignete Matrix überführt [110]. Als Matrices dienten in dieser Arbeit Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen. Die Detektion von P-Gp erfolgte über die klassische Antigen-Antikörper Reaktion. Der erste Antikörper reagiert mit einem speziellen Epitop im P-Gp. Der zweite Antikörper reagiert mit einem speziellen Epitop (hier Maus-Antigen) am ersten Antikörper. Die Detektion erfolgt durch Chemilumineszenz.

Durchführung: Der Transfer der Proteine auf die Matrix (Nitrocellulose- oder PVDF-Membran) erfolgte für 16 Stunden bei 4°C. Bei einem großen Gel wurde mit 160 mA, bei einem kleinen Gel mit 70 mA geblottet. Alle weiteren Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Es folgte die Absättigung der unspezifischen Protein-Bindungsstellen der Membran mit 5%-igem fettfreiem in TBS-Puffer gelöstem Milchpulver. Die Membran wurde 1 Stunde in der Milchpulver-Lösung inkubiert. Es folgte eine 1-stündige Waschphase mit TBS-T Puffer. Hierbei wurde der TBS-T-Puffer alle 20 Minuten erneuert (dreimal). Dann wurde die Membran mit dem ersten Antikörper für 1 Stunde inkubiert. Es folgte eine erneute einstündige Waschphase mit TBS-T-Puffer. Anschließend wurde mit dem zweiten Antikörper für 1 Stunde inkubiert. Es folgte eine letzte einstündige Waschphase mit TBS-T-Puffer. Die Detektion wurde mit dem ECL™ Western Blotting Kit von Amersham Biosciences durchgeführt. Die Chemilumineszenz wurde auf einen Kodak Biomax Film festgehalten.



### 2.3.6.1 Proteinkonzentrations-Bestimmung durch Immuno-Blot

Prinzip. Um in einem Proteingemisch (z. B. Hefeplasmamembranen) die Konzentration von P-Gp zu quantifizieren, wurde das zu bestimmende Protein selektiv durch Immuno-Blot detektiert.

Durchführung. Als Standard diente aufgereinigtes, homogenes P-Gp bekannter Konzentration (50 ng bis 1000 ng). Die zu analysierenden Plasmamembranen wurden mindestens als Duplikate in zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Die Gesamtproteinkonzentration wurde mit dem Amido-Black- oder Peterson-Lowry-Assay bestimmt. Durch SDS-Page Gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.3.5.1) und Immuno-Blot (siehe Kapitel 2.3.6) wurde das Proteingemisch getrennt und P-Gp selektiv detektiert. Die Intensität der Chemilumineszenz, wurde wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben ausgewertet. Die erhaltenen AUC-Werte (willkürliche Einheiten) des Standards wurden gegen die Konzentration geplottet. Die somit standardisierten AUC-Einheiten wurden für die Probe in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

## 2.4 Analytische Methoden

### 2.4.1 ATPase-Assay

Einführung: P-Gp hydrolysiert ATP, hierbei wird das ATP in ADP und  $P_i$  umgewandelt. Wenn man einen Überschuss an ATP zum Reaktionspuffer zusetzt, kann durch die Bestimmung des freigesetzten  $P_i$  die ATP-Hydrolyse Geschwindigkeit einer bekannten P-Gp Menge bestimmt werden.

#### 2.4.1.1 Herstellen von 400 mmol/L ATP-Stamm-Lösung

Durchführung: 10 – 15 mL dest. Wasser wurden mit Eiswasser auf 4°C gekühlt. 5,5 g  $Na_2ATP$  wurden unter Rühren in Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 10 N NaOH auf >7,0 eingestellt. Die Absorption einer 15.000 - fachen Verdünnung wurde bei  $\lambda = 259$  nm gegen dest. Wasser als Referenz

vermessen. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz wird die ATP-Konzentration wie folgt bestimmt:

**Gleichung 2-2.** Lambert-Beersches-Gesetz

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot b$$

*A*: Absorption

*ε*: molarer Absorptionskoeffizient [ $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

*c*: molare Konzentration

*b*: Schichtdicke [cm]

Der molare Absorptionskoeffizient  $\varepsilon$  für ATP ist  $15,4 \text{ l mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Die ATP-Konzentration wurde mit dest. Wasser auf 400 mmol/L eingestellt. Anschließend erfolgte eine erneute Bestimmung der ATP Konzentration.

#### 2.4.1.2 Bestimmung der ATPase Aktivität von P-Gp

##### Materialien und Geräte:

- |   |  |           |
|---|--|-----------|
| • | Thermostat                                   | Eppendorf |
| • | Multistepper                                 | Brand     |
| • | φ720 pH Meter                                | Beckman   |
| • | pH Elektrode, Glass/Calomel, 8mm E6009-1EAPW | Aldrich   |
| • | Wasserbad MP-5                               | Julabo    |

##### Lösungen:

**Tabelle 2-20.** Reaktionspuffer für ATPase Assay.

Reaktionspuffer pH 7,4 (gelöst in ddW)	
Na <sub>2</sub> ATP	10,0 mmol/L
MgSO <sub>4</sub>	15,0 mmol/L
EGTA	0,1 mmol/L
Tris	40,0 mmol/L
NaN <sub>3</sub>	2,0 mmol/L
DMSO	1,0% (V/V)
mit 1,2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> auf pH 7,4 bei 37°C einstellen	

---

**Reaktionspuffer pH 8,5 (gelöst in ddW)**

---

Na <sub>2</sub> ATP	10,0 mmol/L
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30,0 mmol/L
EGTA	0,1 mmol/L
Tris	40,0 mmol/L
Verapamil	80,0 µmol/L
NaN <sub>3</sub>	2,0 mmol/L
DMSO	1,0% (V/V)
mit 1,2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> auf pH 7,4 bei 37°C einstellen	

---

Um die Ergebnisse, die mit verschiedenen Chargen von Reaktionspuffer gewonnen wurden, vergleichen zu können, musste der pH-Wert der Puffer exakt eingestellt werden, da die ATP-Hydrolyse Geschwindigkeit von P-Gp pH-Wert und Ionenstärke abhängig ist.

Der pH-Wert des verwendeten Puffersystems Tris ist extrem temperaturabhängig. Als Elektrode wurde eine Tris-kompatible Calomel-Elektrode verwendet. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit wurde das pH-Meter exakt nach folgendem Prinzip kalibriert:

Für die Kalibrierung des pH-Meters wurden Eichpuffer pH 7,0 und pH 9,0 verwendet. Die Eichpuffer und der Reaktionspuffer wurden im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Der pH-Wert für den jeweiligen Eichpuffer bei 37°C laut Datenblatt der Firma wurde dem pH-Meter als Referenzwert vorgegeben. Nach der Kalibrierung des pH-Meters wurde der pH-Wert des Reaktionspuffers mit 1,2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingestellt. Die Zugabe von MgSO<sub>4</sub> erfolgte erst, nachdem der pH-Wert auf 8,0 gesenkt worden war, da sonst Mg(OH)<sub>2</sub> ausfallen würde.

Prinzip: P-Gp hydrolysiert ATP zu ADP und P<sub>i</sub>. Zur Bestimmung der Hydrolyse-Aktivität des P-Gp wird eine definierte Menge ATP hinzugegeben, die Reaktion für eine gewisse Zeit inkubiert und dann in eisgekühlte 8 mmol/L EDTA-Lsg. gegeben, wodurch sie beendet wird. Das freigesetzte P<sub>i</sub> und die daraus resultierende ATP-Hydrolyse-Geschwindigkeit von P-Gp wird durch den Malachit-Grün-Assay (siehe Kapitel 2.4.2.1) bestimmt. Es handelt sich hierbei um eine diskontinuierliche Methodik.

**Durchführung:** Aufgereinigtes P-Gp (0,5 µg - 1,0 µg) wurde im Reaktionspuffer suspendiert hergestellt. Zur Bestimmung der ATPase Aktivität von aufgereinigtem P-Gp wurde der Reaktionspuffer pH 7,4 verwendet. Der Reaktionspuffer wurde aus Stammlösungen frisch angesetzt. Da die Volumen der eingesetzten P-Gp-Proben und der zu vermessenden Modulator-Lösung variierte, wurden die Volumina der eingesetzten Einzelkomponenten (siehe Tabelle 2-19) um den Faktor der Reaktionspufferstärke (siehe Gleichung 2-3) korrigiert. Der Faktor wird wie folgt berechnet:

**Gleichung 2-3.** Korrekturfaktor für die Reaktionspufferstärke.

$$\text{Reaktionspufferstärke} = \frac{\text{Gesamtvolumen des Reaktionspuffers}}{\text{Gesamtvolumen des Reaktionspuffers} - \text{Volumen des zugegebenen Arzneistoffes/Protein}}$$

Der Reaktionspuffer (Tabelle 2-20) wurde aus Stamm-Lösungen vor der Durchführung des Assays zusammenpipettiert. Die zu pipettierenden Volumina der Stammlösungen wurden mit diesem Faktor multipliziert, um in jedem Experiment die gleiche finale Konzentration der einzelnen Pufferbestandteile sicherzustellen.

Der gesamte Reaktionsansatz hatte ein Volumen von 250 µL. Das Reaktionsgemisch wurde bei 37°C inkubiert. 15 Sekunden vor  $t = 0$  wurde das P-Gp mit einer Hamilton-Spritze hinzugegeben und die Reaktion gestartet. Bei  $t = 0, 20, 40$  und 60 Minuten wurden je 50 µL entnommen und in 1 mL eiskalte 8 mmol/L EDTA-Lösung hineinpipettiert (siehe Kapitel 2.4.2.1).

#### 2.4.1.3 Bestimmung der Expressionsrate von P-Gp in Hefemembranen

**Prinzip und Durchführung:** Die ATPase Aktivität von Hefe-Plasmamembranen wurde in zwei unterschiedlichen Puffern vermessen. Im Reaktionspuffer pH 7,4 (5 mmol/L freie Magnesium-Ionen) wurde die Gesamt-ATPase Aktivität von P-Gp und PMA1 ( $H^+$ -ATPase, die ein Hauptbestandteil der Hefepasmamembranen ist) bestimmt. Die ATPase Aktivität, die im Reaktionspuffer pH 8,5 (20 mmol/L freie Magnesium-Ionen)

bestimmt wurde, resultierte aus inhibierter PMA1 und stimulierter P-Gp Aktivität. Die gemessenen ATPase Aktivitäten wurden in die Gleichung 2-4 eingesetzt.

**Gleichung 2-4.** Berechnung der relativen P-Gp-Expression in BJ5457-Membranen [35].

$$\text{Aktivität im Reaktionspuffer pH 7,4} = H + B$$

$$\text{Aktivität im Reaktionpuffer pH 8,5} = (0,038 \cdot H) + (4,6 \cdot B)$$

H : ATPase-Aktivität von PMA1 bei pH 7,4

B : basale ATPase-Aktivität von P-gp bei pH 7,4

Die beiden oben aufgeführten Gleichungen repräsentieren zwei Gleichungen mit zwei Unbekannten. Die ATPase Aktivität der Membranen bei pH 7,4 und pH 8,5 wurde in den Membranen bestimmt. Hierdurch konnte der Faktor *B* errechnet werden. Die theoretische basale ATPase Aktivität von humanen homogenen P-Gp ist in der natürlichen Plasmamembran Umgebung  $0,7 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  (0,7 U/mg). Diese Standard-ATPase Aktivität würden Hefemembranen aufweisen, wenn Sie zu 100 % P-Gp exprimieren würden. Hieraus ergibt sich der relative Expressionslevel in % durch die einfache Gleichung:  $(B/0,7 \text{ U/mg}) \cdot 100$ .

## 2.4.2 CHAPS-Latency-Assay

Lösungen:

**Tabelle 2-21.** Reaktions-Cocktail für den CHAPS-Latency-Assay.

Reaktionspuffer I (gelöst in ddW)	
Reaktionpuffer pH 7,4	1,0 x
+ Glycerol	20,0% (V/V)
+ Verapamil	130,0 $\mu\text{mol/L}$

**Reaktionspuffer II (gelöst in ddW)**

Reaktionspuffer pH 7,4	1,0 x
+ Glycerol	20,0% (V/V)
+ Verapamil	130,0 $\mu\text{mol/L}$
+ CHAPS	25,0 $\text{mmol/L}$

Prinzip: Die Ausrichtung des P-Gp in den Proteoliposomen ist zufällig. Das P-Gp kann sowohl mit der Nukleotid-Bindungsstelle nach innen (so liegt es nativ in der Zelle vor) als auch nach außen ausgerichtet sein. Die Ausrichtung des rekonstituierten P-Gp in Liposomen wird mit dem CHAPS-Latency-Assay bestimmt. Dabei wird das rekonstituierte P-Gp mit aufsteigenden CHAPS-Konzentrationen inkubiert. Das Detergenz CHAPS wirkt inhibierend auf die ATPase Aktivität des P-Gp. Ist die Konzentration des CHAPS oberhalb seiner kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC) ( $\sim 9 \text{ mM}$ ) [85], dann werden die Liposomen zerstört, die bisher nach innen gewandten Nukleotid-Bindungsstellen für ATP werden zugänglich und es kommt somit zu einer Aktivitätssteigerung, die mit zunehmender CHAPS-Konzentration wieder abnimmt. Die Abbildung 2-4 zeigt diese Vorgänge beim CHAPS-Assay schematisch.

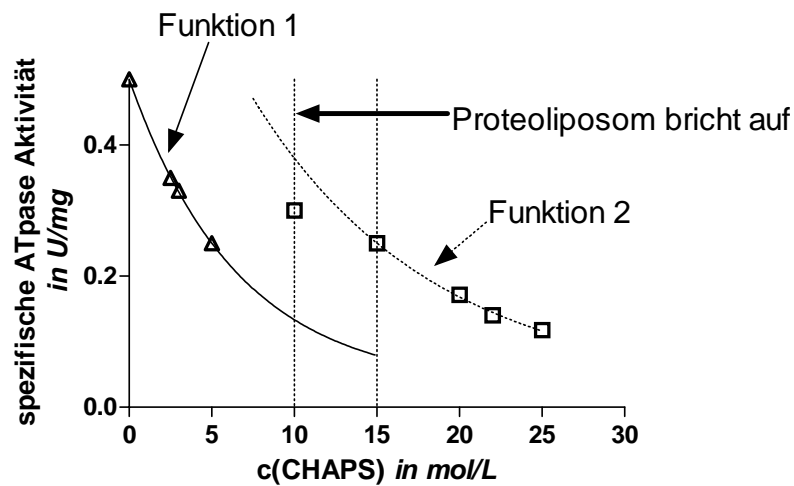
Durchführung: Die ATPase Aktivität von rekonstituiertem P-Gp wurde mit 0; 2,5; 5; 10; 15; 20 und 25  $\text{mmol/L}$  CHAPS im Reaktionspuffer pH 7,4 in Gegenwart von 130  $\mu\text{mol/L}$  Verapamil bestimmt. Die freigesetzte Menge an  $\text{P}_i$  wurde nach Kapitel 2.4.2.1 bestimmt.

Auswertung: Der Graph (Abbildung 2-3) gliedert sich mit steigender CHAPS-Konzentration in zwei Abschnitte:

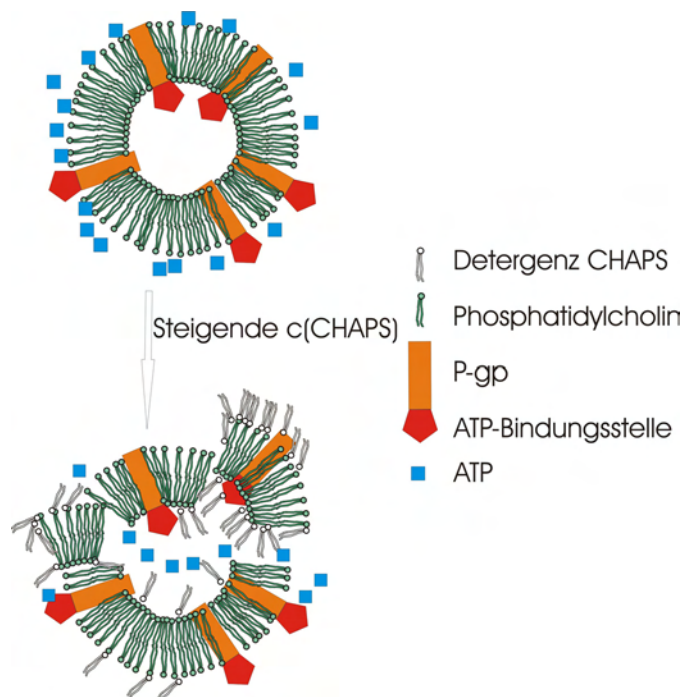
1. mit steigender CHAPS-Konzentration nimmt die ATPase Aktivität ab (Funktion 1; siehe 1. Abschnitt des Graphen von Abbildung 2-3)
2. die Protein-Aktivität steigt plötzlich an, nimmt aber mit zunehmender CHAPS-Konzentration wieder ab (Funktion 2).

Diese beiden Kurvenabschnitte werden durch eine Exponential-Funktion angepasst. Es resultierten zwei exponentielle Funktionen die versetzt verlaufen. Bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen von CHAPS wurde

jeweils der Abstand der Ordinate zu beiden extrapolierten Exponential-Funktionen bestimmt. Das Verhältnis dieser Abstände ergibt den Anteil des P-Gp mit nach außen gerichteten Nukleotid-Bindungsstellen (Abstand Ordinate zur Funktion 2/Abstand Ordinate zur Funktion 1).



**Abbildung 2-3.** Simulierte Kurve für den CHAPS-Latency-Assay.



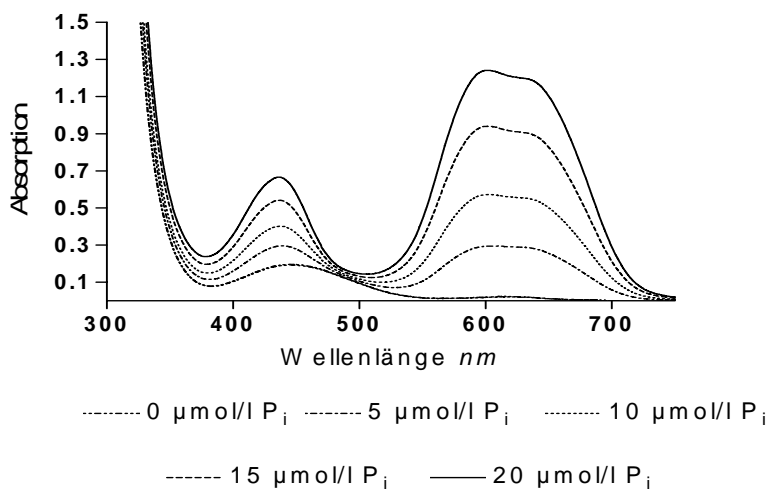
**Abbildung 2-4.** Illustration des CHAPS-Assay. Überschreitet CHAPS die kritische Mizellbildungskonzentration, dann werden die Proteoliposomen solubilisiert und alle ATP-Bindungsstellen sind für die ATP-Bindung zugänglich. Dies resultiert in einer gesteigerten ATPase Aktivität.

## 2.4.2.1 Bestimmung des freien Phosphats

Materialien und Geräte:

- Malachite Green 4 CI 42000 Sigma M9636
- PVA, hydrolyzed Aldrich CAS [9002-89-5]
- Ammoniummolybdat 4·H<sub>2</sub>O Sigma A1343
- 13x100mm Pyrex Disposable culture tube Brand
- Ultrospec 4000 UV/Vis Sepktrometer Pharmacia Biotec
- Microliter Syringes Hamilton

Prinzip: Freies anorganisches Phosphat (P<sub>i</sub>) bildet mit Molybdat einen Komplex (NH<sub>4</sub>)PO<sub>4</sub>·12MoO<sub>3</sub>. Bei niedrigen pH-Werten formt das gebildete Phosphomolybdat einen Komplex mit Malachitgrün. Dies ruft eine Verschiebung des Absorptionsmaximums hervor. In der Abbildung 2-1 ist das Absorptionsspektrum des Komplexes für unterschiedliche P<sub>i</sub> Konzentrationen abgebildet.



**Abbildung 2-5.** Absorption des Malachitgrün-Phosphomolybdatkomplexes.

Der relativ stabile farbige Komplex wird bei dem Absorptionsmaximum von 610 nm vermessen. Der molare Absorptionskoeffizient des vermessenen Farbstoffkomplexes beträgt 110620 L/mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> [113].



**Durchführung:** Zu 1 mL eiskalter 8 mmol/L-EDTA-Lösung wurden 50 µL Reaktionspuffer (siehe Kapitel 2.4.1.2) gegeben. In diese Lösung wurden 50 µL Probe in definierten Zeitabständen unter Vortexen pipettiert und auf Eis gestellt. Die kolorimetrische Entwicklung des  $P_i$  erfolgte nach folgendem Schema:

1. Zugabe von 200 µL Reagenz A (1,75% Ammoniumheptamolybdat x 4  $H_2O$  in 6,3 N  $H_2SO_4$ ).
2. Nach 10 Minuten Inkubation erfolgte die Zugabe von Reagenz C (0,035% (w/V) Malachitgrün, 0,35% PVA in  $H_2O$ ). Die Farbentwicklung war nach 20 Minuten beendet.
3. Der Komplex wurde durch Zugabe von 200 µL 8 N  $H_2SO_4$  stabilisiert [1].
4. Die Farbintensität wurde bei 610 nm in Semimikroküvetten vermessen. Parallel wurde ein Standard mit Natriumdihydrogenphosphat (0–25 µmol/L) vermessen. Im Bereich von 0–25 µmol/L  $P_i$  ist die Zunahme der Absorption linear.

### 2.4.3 Bestimmung der Dissoziationskonstanten

**Prinzip:** Zur potentiometrischen Bestimmung der Dissoziationskonstanten ( $K_a$ -Wert) wurde der Mikrotitrator PCA 200 von Sirius Analytical Instruments verwendet. Die Dissoziationskonstante einer Base ist nach dem Massenwirkungsgesetz in wässrigem Medium wie folgt definiert:

**Gleichung 2-5. Massenwirkungsgesetz.**

$$K_a = \frac{c(B) \cdot c(H_3O^+)}{c(H_2O) \cdot c(BH^+)}$$

$K_a$  Dissoziationskonstante

$c(BH^+)$  Aktivität der protonierten Base

$c(B)$  Aktivität der Base

Der  $pK_a$ -Wert ist der negative dekadische Logarithmus des  $K_a$ -Wertes. Gemäß der Henderson-Hasselbalch'schen Gleichung entspricht der  $pK_a$ -Wert dem pH-Wert, bei dem B und  $BH^+$  zu gleichen Teilen vorliegen.

**Gleichung 2-6.** Henderson-Hasselbalch Gleichung.

$$pK_a = pH + \log \frac{c(BH^+)}{c(B)}$$

Bei der potentiometrischen Bestimmung des  $pK_a$ -Wertes wird die zu bestimmende Verbindung über einen pH-Bereich titriert. In diesem Bereich muss die Verbindung sowohl in protonierter als auch in deprotonierter Form vorliegen. Die Verbindung sollte zumindest nahe dem  $pK_a$ -Wert gelöst sein. Das Detektionslimit des PCA200 liegt bei  $10^{-5}$  mol/L [20]. Die Titration wurde in 0,15 mol/L KCl-Lösung durchgeführt. Die Durchführung in einem wässrigen Medium mit konstanter Ionenstärke bietet den Vorteil, dass eine Änderung des Aktivitätskoeffizienten während der Titration der Probe vermieden wird. Ist die Verbindung nicht in wässrigem Medium löslich, können zur Erhöhung der Löslichkeit Kosolventien als Lösungsvermittler zugesetzt werden. Durch den Zusatz von Kosolventien wird die Dielektrizitätskonstante der Lösung verringert. Der ermittelte  $pK$ -Wert in diesem Lösungsmittelgemisch entspricht nicht dem wahren Wert. Es besteht aber eine lineare Abhängigkeit zwischen dem scheinbaren  $p_s K_a$ -Wert in einem Kosolvenz/Wasser-Gemisch und der Dielektrizitätskonstanten des Lösungsmittelgemisches. Diese Abhängigkeit beschreibt die Gleichung von Yasuda-Shedlovsky [119].

**Gleichung 2-7.** Yasuda-Shedlovsky-Gleichung.

$$p_s K_a + \log c(H_2O) = a + b/\varepsilon$$

$\varepsilon$  Dielektrizitätskonstante

$p_s K_a$  scheinbarer  $pK_a$

$a$  Koeffizient

Um in Gegenwart von Kosolventien den  $pK_a$ -Wert einer Substanz zu bestimmen, muss bei unterschiedlichen Kosolvenz/Wasser-Gemischen der scheinbare  $pK_a$ -Wert bestimmt werden. Anschließend wird mit der Yasuda-Shedlovsky-Gleichung auf den  $pK_a$ -Wert in reinem Wasser extrapoliert.

Durchführung: Jeweils nach Inbetriebnahme des PCA 200 wurde eine Kalibrierungstiteration (Blank-Titeration) mit 20 mL ISA-(ionic strength adjusted; 0,15 mol/L KCl) Wasser über den pH-Bereich von 1,8 bis 12,2 durchgeführt. Mit dieser Kalibrierungstiteration wurden die pH-Elektrode (nach der Sirius Four-Plus™ Prozedur) und der Faktor des Säure-Titranten standardisiert. Des Weiteren wird der Kohlendioxid-Gehalt im ISA-Wasser ermittelt. Die Elektrodenparameter für Kosolvenz/Wasser-Gemische entstammen dem Datensatz von Sirius Analytical Instruments.

Die untersuchten WK-X-Verbindungen sind in Wasser nicht über den gesamten Titrationsbereich ausreichend löslich. Daher wurde THF als Kosolvenz verwendet. Es wurde eine Lösung der Substanz mit einer Konzentration im Bereich  $10^{-4}$  -  $10^{-3}$  mol/L in ISA-Wasser/Kosolvenz-Gemisch hergestellt. Die Bestimmung wurde als Multi-Titeration durchgeführt, d.h. nach Aufnahme der Titrationskurve konnte in demselben Gefäß durch eine erneute Titeration der  $p_sK_a$ -Wert bei einer anderen Konzentration an Kosolvenz/Wasser-Gemisch bestimmt werden. Die Titerationen wurden bei 25°C unter Argon-Schutzgas durchgeführt. Die Probe wurde ausgehend von einem niedrigen pH-Wert (eingestellt mit 0,5 mol/L HCl) mit 0,5 mol/L KOH titriert. Der Titrationsbereich umfasste mindestens zwei pH-Einheiten unter und zwei über dem zu erwartenden  $pK_a$ -Wert. Für jede Substanz wurden mindestens sechs Titerationen mit unterschiedlichen Volumenanteilen Kosolvenz durchgeführt.

#### **2.4.4 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten**

Prinzip: Der Verteilungskoeffizient (meist logarithmiert als  $\log P$  dargestellt) ist ein Maß für die Lipophilie einer Substanz. Er wird durch Verteilung der Substanz zwischen einer mit Wasser nicht mischbaren organischen Phase

und einer wässrigen Phase bestimmt. Es handelt sich um eine stoffspezifische Konstante, die wie folgt definiert ist [45]:

**Gleichung 2-8.** Verteilungskoeffizient.

$$P = \frac{c(B)_{\text{organische Phase}}}{c(B)_{\text{wässrige Phase}}}$$

B Neutralform der Substanz B

Außer der Neutralform kann sich auch die ionisierte Form  $BH^+$  als Ionenpaar in die organische Phase verteilen. Der Verteilungskoeffizient des Ionenpaares  $\log P_{\text{ion}}$  ist deutlich geringer als der  $\log P$  der Neutralform.

Da sich die Substanz B zwischen den beiden Phasen verteilt, ändert sich scheinbar ihre Dissoziationskonstante. Die scheinbare Dissoziationskonstante, die in Gegenwart einer organischen Phase gemessen wird, wird als  $p_oK_a$ -Wert (Scherrer  $pK_a$ ) bezeichnet. Der  $p_oK_a$ -Wert ist mit dem  $pK_a$ -Wert und  $\log P$  über folgende Gleichung verknüpft. Hierdurch ist der  $\log P$ -Wert über eine potentiometrische Bestimmung zugänglich.

**Gleichung 2-9.** Verteilungskoeffizient.

$$\log P = \log \left[ 10^{pK_a - p_oK_a} - 1 \right] - \log \left[ \frac{V_{\text{organische Phase}}}{V_{\text{wässrige Phase}}} \right]$$

Bei sehr lipophilen Substanzen ( $\log P > 3$ ) spielt auch die Ionenpaarverteilung eine wichtige Rolle. Wenn außer dem  $\log P$  der Neutralform auch der  $\log P_{\text{ion}}$  bestimmt wird, dann sind mindestens zwei Titrations mit unterschiedlichen Volumenverhältnissen organische Phase/wässrige Phase erforderlich [7]. Dann gelten zur Berechnung Gleichung 2-10 und Gleichung 2-11.

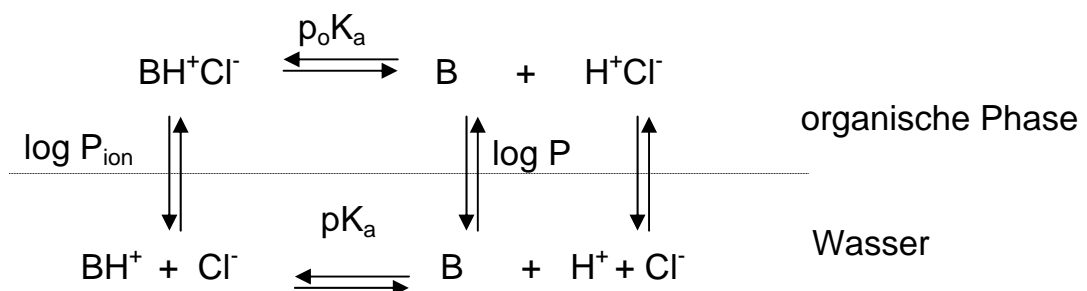
**Gleichung 2-10.** Verteilungskoeffizient.

$$\log P = \log \frac{r_{v1} \cdot 10^{pO_{K_a}(2)-pK_a} - r_{v2} \cdot 10^{pO_{K_a}(1)-pK_a} + r_{v2} - r_{v1}}{r_{v1}r_{v2} \cdot (10^{pO_{K_a}(1)-pK_a} - 10^{pO_{K_a}(2)-pK_a})}$$

**Gleichung 2-11.** Ionenpaar-Verteilungskoeffizient.

$$\log P_{\text{ion}} = \log \frac{r_{v2} \cdot 10^{pO_{K_a}(2)-pK_a} - r_{v1} 10^{pO_{K_a}(1)-pK_a} - (r_{v2} - r_{v1}) \cdot 10^{pO_{K_a}(1)+pO_{K_a}(2)-2pK_a}}{r_{v1}r_{v2} \cdot (10^{pO_{K_a}(1)-pK_a} - 10^{pO_{K_a}(2)-pK_a})}$$

Die Abbildung 2-6 illustriert die Verteilungsvorgänge zwischen einer homogen organischen Phase und ISA-Wasser.



**Abbildung 2-6.** Verteilung einer Base.

Ist der  $pK_a$ -Wert einer Substanz bekannt, können mit Hilfe von  $pK_a$ -Werten in Gegenwart einer organischen Phase die Verteilungskoeffizienten  $\log P$  und  $\log P_{\text{ion}}$  bestimmt werden.

Durchführung: Für einige ausgewählte Substanzen wurde der Verteilungskoeffizient in Octanol bestimmt. Es wurden mindestens drei Messungen mit unterschiedlichen Volumenverhältnissen durchgeführt. Die Substanz wurde in einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol/L eingesetzt. Die

Titration startete im Basischen bei pH 10,5, da hier die Substanzen von Beginn an in der Neutralform vorlagen und sich gut in Octanol verteilen konnten.

## 2.5 Bestimmung der Zellteilungsrate

### 2.5.1 Gompertz-Funktion

Zur Bestimmung der Lag-Zeit und der Verdopplungszeit wurde die optische Diche (OD) der Zellen gegen die Zeit aufgetragen und nach der folgenden Gleichung angepasst.

**Gleichung 2-12.** Gompertz-Funktion.

$$y = N_0 + C \cdot e^{\left( -e^{\left( \left( \frac{2,718 \cdot \mu}{C} \right) \cdot (Lag - x) + 1 \right)} \right)}$$

<i>y</i>	<i>log OD<sub>600nm</sub></i>
<i>x</i>	<i>Zeit</i>
<i>N<sub>0</sub></i>	<i>Log der Anfangszellzahl</i>
<i>C</i>	<i>Unterschied zwischen Anfangs- und Endzellzahl</i>
<i>Lag</i>	<i>Verzögerung bis zum Einsetzen des Wachstums</i>
<i>μ</i>	<i>maximale spezifische Wachstumsrate</i>

Alternativ wurden die Wachstumskurven der Hefen zur Bestimmung der Verdopplungszeit nach der aufgeführten Exponentialfunktion angepasst.

**Gleichung 2-13.** Exponentielles Wachstum.

$$y = Start \cdot e^{(K \cdot x)}$$

<i>y</i>	<i>Zellzahl</i>
<i>x</i>	<i>Zeit</i>
<i>K</i>	<i>Geschwindigkeitskonstante</i>
<i>Start</i>	<i>Beginn des exponentiellen Wachstums</i>

## 2.6 Auswertung der ATPase Aktivitätsdaten

### 2.6.1 Michaelis-Menten-Kinetik

Bei P-Gp handelt es sich um einen Transporter. Dieser hat aber neben seiner Transportfunktion auch eine Enzymfunktion: Er katalysiert die Umsetzung von ATP zu ADP. Die Kinetik dieser enzymatischen Reaktion lässt sich durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschreiben.

*Gleichung 2-14. Michaelis-Menten-Gleichung.*

$$v = V_{\max} \frac{c(S)}{c(S) + K_m}$$

Der Parameter  $V_{\max}$  ist die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion bei sättigender Substratkonzentration  $c(S)$ . Der  $K_m$ -Wert beschreibt die Affinität eines Enzyms für sein Substrat. Er entspricht der Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit.

### 2.6.2 P-Gp Steady-State

*Al-Shawi et al.* entwickelten eine Gleichung, die die postulierten drei Phasen der P-Gp Aktivität genau beschreibt. Voraussetzung für die Gültigkeit der Gleichung ist, dass das Substrat ATP im Überschuss vorhanden ist.

*Gleichung 2-15. Kinetik-Gleichung für P-Gp nach Al-Shawi et al. [2].*

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

Hier ist  $v$  die Enzym-Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion.  $B$  ist die basale Aktivität ohne Substanz und  $D$  ist die maximal Substanz-stimulierte

Aktivität. Der  $K_{m(D)}$ -Wert entspricht der Konzentration einer Substanz X bei der halbmaximale Stimulation der Enzymtätigkeit vorliegt. Der  $K_i$  ist die Konzentration der Substanz X bei der halbmaximale Inhibition der Enzymaktivität vorliegt.

### 2.6.3 Hill-Gleichung

Die ATPase Aktivität von P-Gp in Abhängigkeit von der Konzentration eines Modulators bzw. Inhibitors bei gesättigter ATP-Konzentration wurde auch nach der Hill-Gleichung mit variablem Hill-Koeffizienten ausgewertet.

**Gleichung 2-16.** Hill-Gleichung.

$$Y = B + \frac{D - B}{1 + 10^{(\log EC_{50} - X) \cdot Hillslope}}$$

Die basale Aktivität  $B$  ist das Minimum der Ordinate  $Y$ . Der Parameter  $D$  bezeichnet die maximale Aktivität. Der  $\log EC_{50}$ -Wert ist der logarithmierte Wert der Substanzkonzentration  $X$ , die ein halbmaximales  $D$  zeigt. Der *Hillslope* ist die Steigung der Dosis-Wirkungskurve am Wendepunkt bei halblogarithmischer Auftragung.

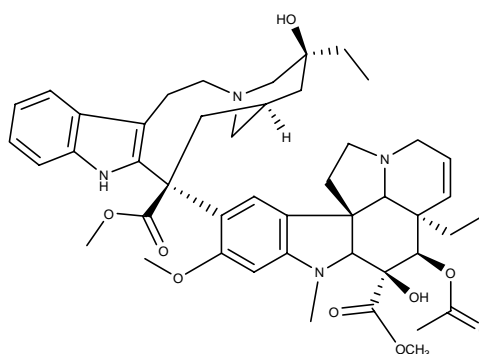


## 2.7 Substanzen

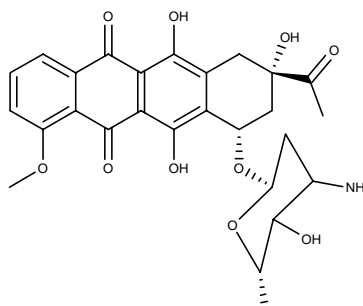
### 2.7.1 Zytostatika

Die verwendeten Zytostatika dieser Arbeit stammen aus Fertigpräparaten verschiedener pharmazeutischer Unternehmer. Die Präparate wurden dankenswerterweise zum Teil auch von der Merlin-Apotheke, Bonn, zur Verfügung gestellt.

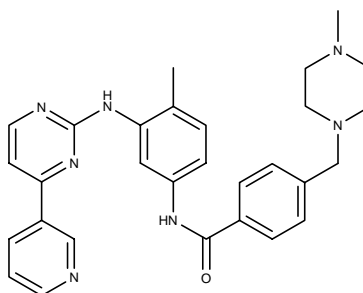
Vinblastin



Daunorubicin



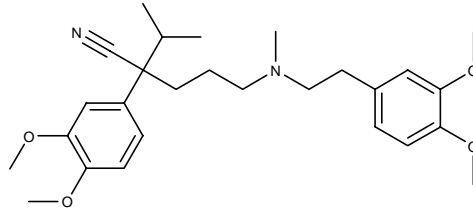
Imatinib



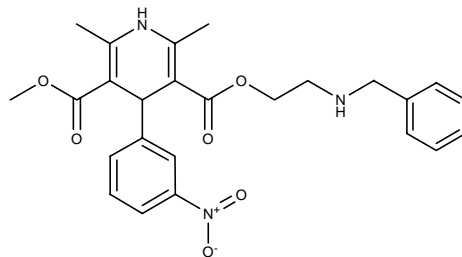
## 2.7.2 MDR-Modulatoren

### 2.7.2.1 Standard-Modulatoren

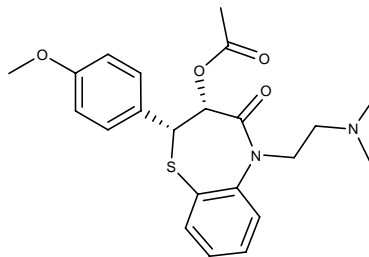
Verapamil



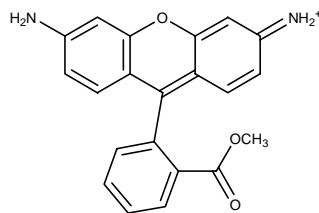
Nicardipin



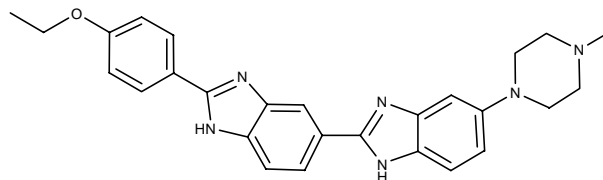
Diltiazem



Rhodamin  
123

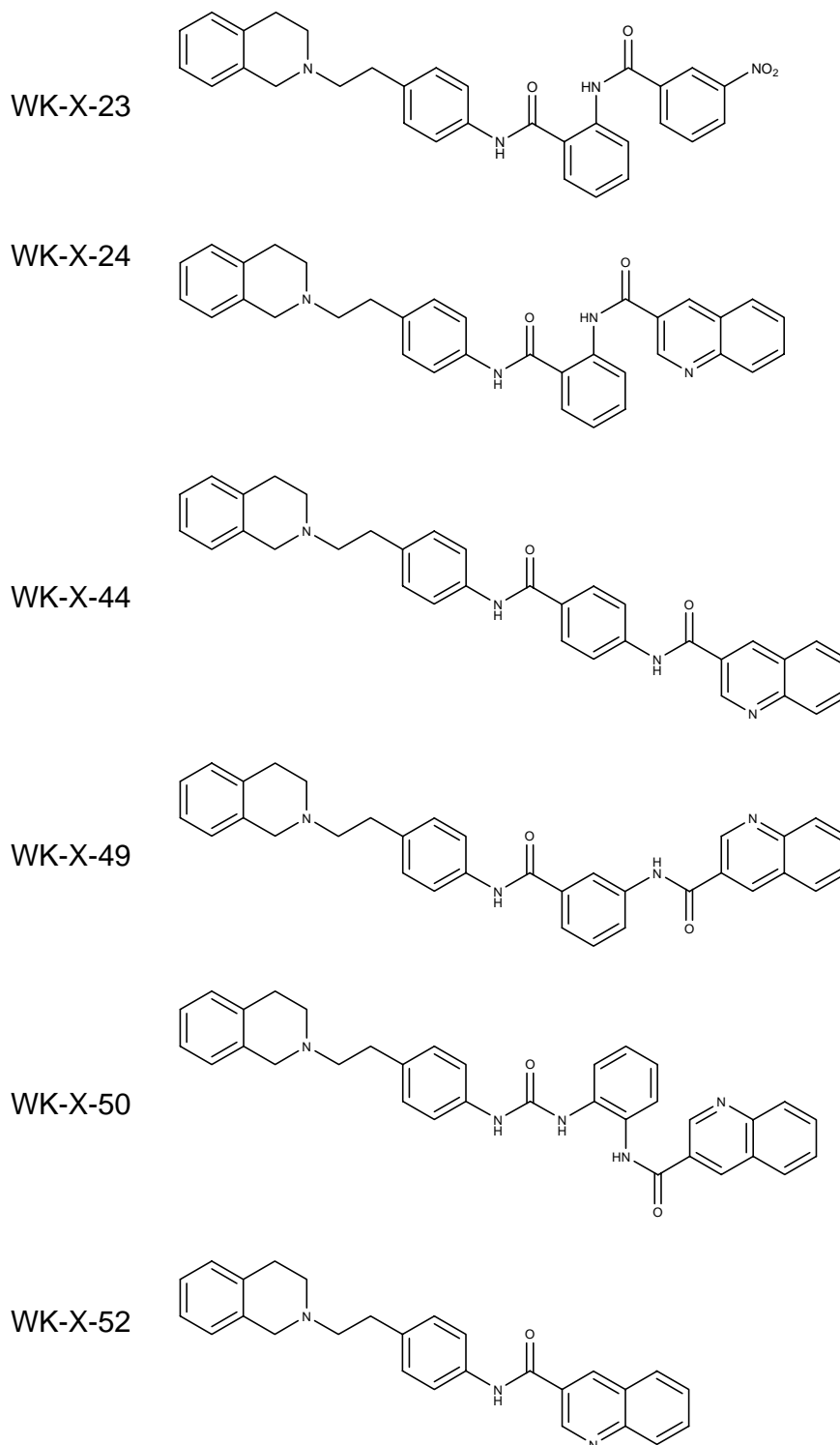


Hoechst  
33342



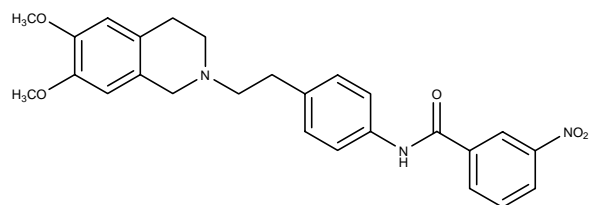
## 2.7.2.2 WK-X-Derivate mit basischem Tetrahydroisochinolinrest

Die folgenden Substanzen wurden im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Wiese von Werner Klinkhammer synthetisiert. Es handelt sich hierbei um Derivate, die auf den P-Gp-Modulatoren Tariquidar und Elacridar basieren.

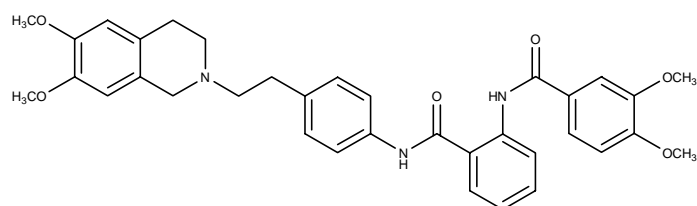


## 2.7.2.3 WK-X-Derivate mit 6,7-Dimethoxytetrahydroisochinolinrest

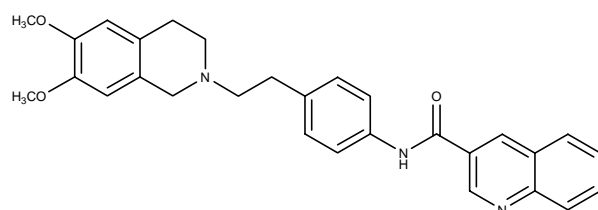
WK-X-14



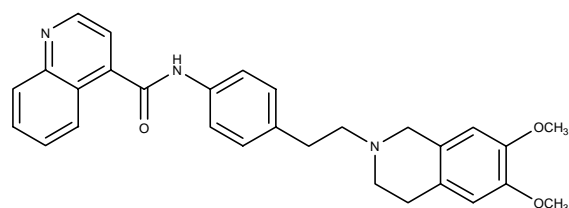
WK-X-34



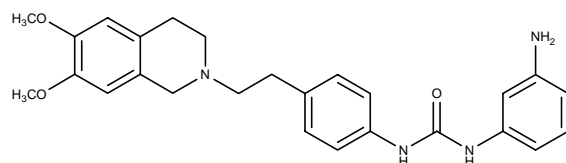
WK-X-51



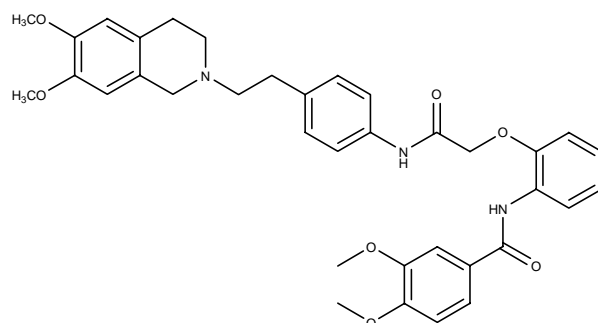
WK-X-58



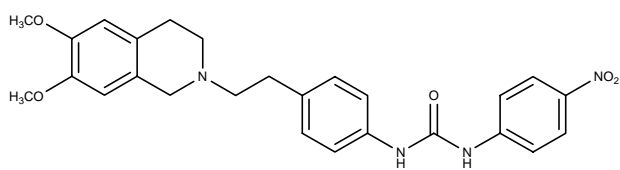
WK-X-82



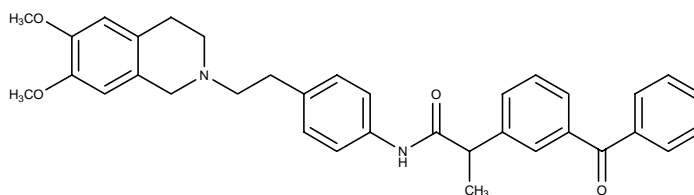
WK-X-84



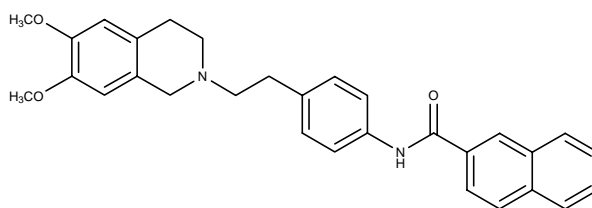
WK-X-85



WK-X-87



WK-Y-26



## 3 Ergebnisse und Diskussion

Die Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil wird die Etablierung und Optimierung eines Expressionssystems von P-Gp in *S. cerevisiae* beschrieben. Hierzu wurde humanes P-Gp in einem geeigneten Hefe-Stamm überexprimiert, aufgereinigt und anschließend in Liposomen rekonstituiert. Das aufgereinigte P-Gp wurde durch SDS-Gelelektrophorese, CHAPS- und ATPase-Assays charakterisiert.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung neuer Modulatoren mit dem zuvor etablierten ATPase-Assay am homogenen P-Gp und deren Verteilungsverteilen in n-Octanol. Hierzu wurde das in dem ersten Teil dieser Arbeit gewonnene P-Gp genutzt.

### 3.1 Expression von P-Glycoprotein in *S. cerevisiae*

Verschiedene Stämme von *S. cerevisiae* wurden zwecks ihrer Eignung zur Überexpression von humanen P-Gp untersucht. Hierfür musste die cDNA von P-Gp zuerst in Hefe-Expressionsvektoren kloniert werden. Zur Markierung des Proteins wurde am C-Terminus des P-Gp eine Histidin Markierung eingeführt. Diese mutierten Vektoren sind anschließend in verschiedene Hefe-Stämme transformiert worden. Im Anhang sind von den in dieser Arbeit verwendeten Vektoren die Restriktionskarten abgebildet.

Nach Selektion der positiv transformierten Klone wurden die Zellen im Bioreaktor zur Gewinnung von ausreichender Zellmasse fermentiert. Die Zellmasse wurde mechanisch aufgebrochen und die Zellmembran der Hefen isoliert. Die isolierte Membran wurde durch Detergenzien solubilisiert und das P-Gp nativ mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Im Anschluss wurde das aufgereinigte P-Gp in Liposomen rekonstituiert. In Abbildung 3-1 sind schematisch die oben aufgeführten Arbeitsschritte zur Gewinnung von reinem P-Gp dargestellt, die dann in den nachfolgenden Kapiteln näher behandelt werden.

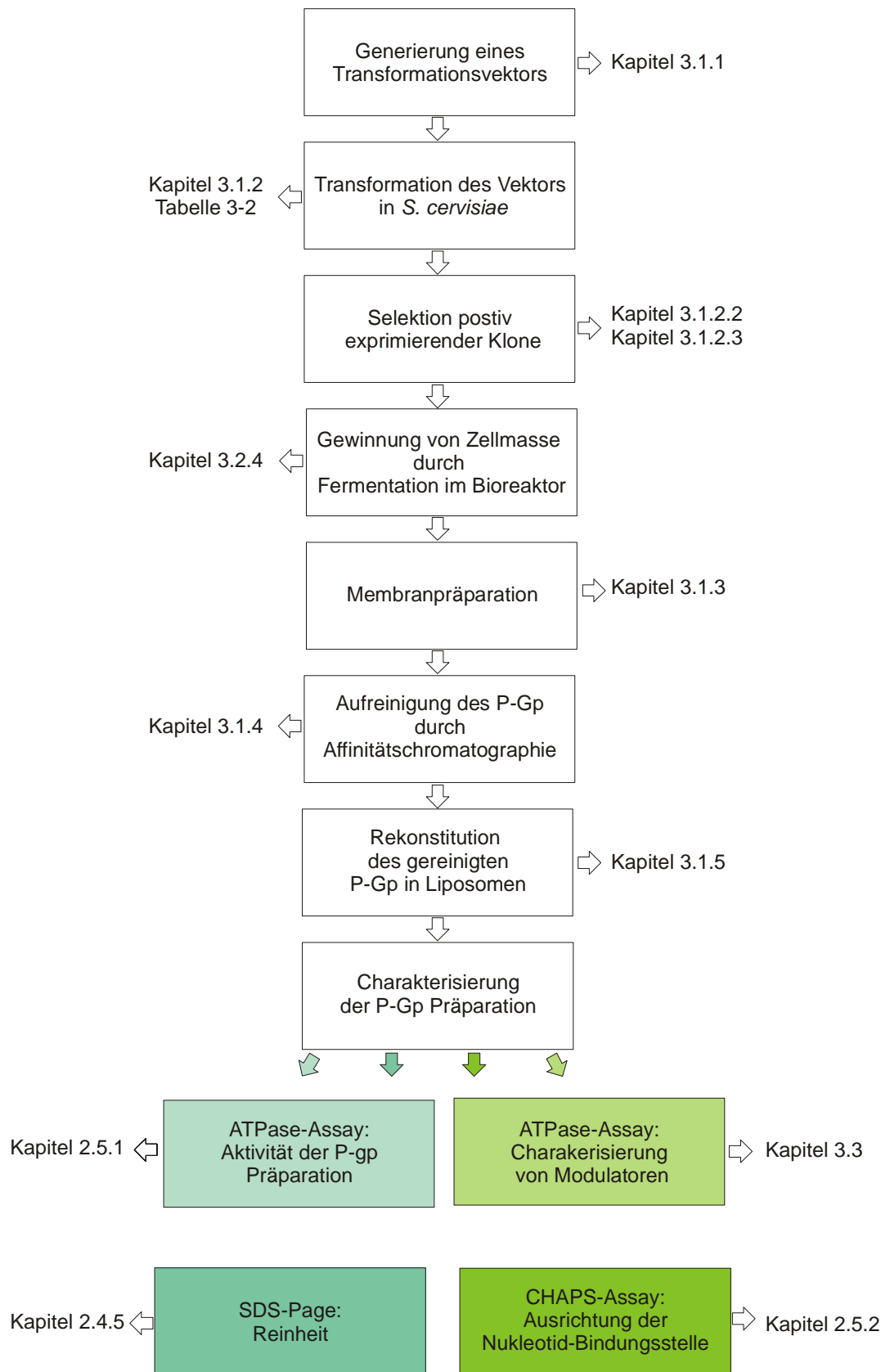


Abbildung 3-1. Fließdiagramm zur Gewinnung von homogenem P-Gp.

### 3.1.1 Konstruktion der Expressionsvektoren

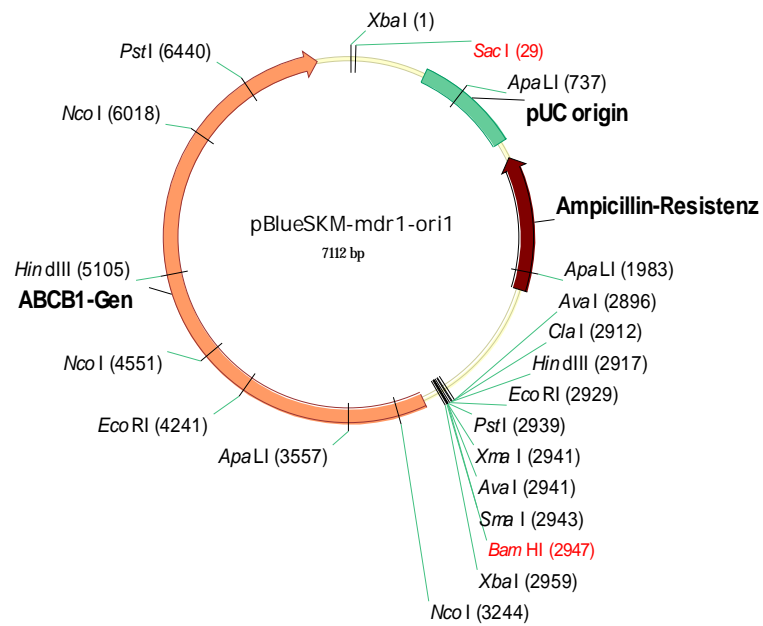
Einführung. Um P-Gp in Hefe-Zellen zu exprimieren, musste das Gen des Proteins in Expressionsplasmide unter der Kontrolle eines Hefepromotors eingebaut werden. Die Sequenz am C-Terminus des Proteins wurde durch Einführung von Histidin-Markierungen mutiert, um es dann mit der Nickel-Affinitätschromatographie aufzureinigen zu können. Die Protokolle zu den einzelnen Arbeitsschritten sind in dem molekularbiologischen Teil des Kapitels Material und Methoden dieser Arbeit erläutert.

#### 3.1.1.1 Konstruktion von pYex-BJ-CX-MDR1 und pYex-BJ-CX-MDR1-6His

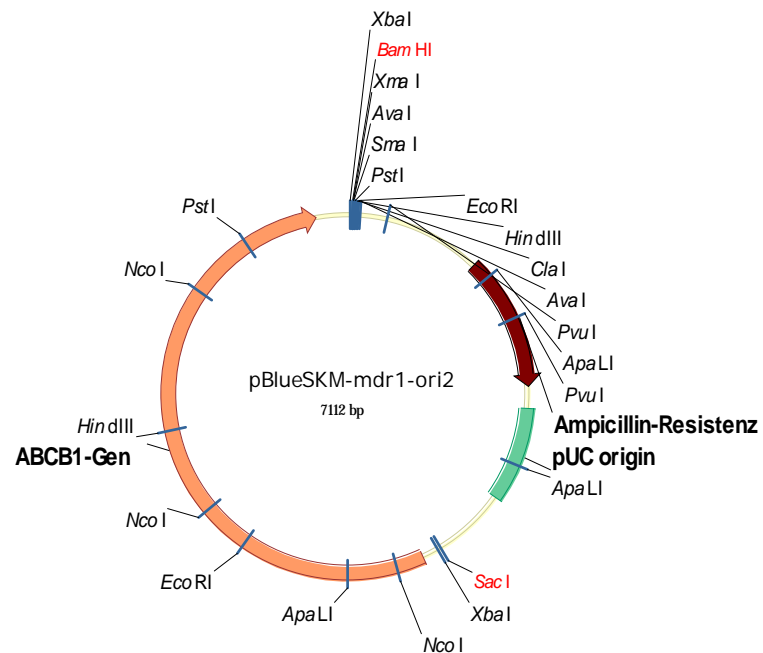
Der Vektor pGem3Zf(-)Xba-MDR1.1 (Vektorkarte siehe Anhang) diente als Spendervektor für die cDNA von P-Gp. Da dieser Vektor in der Multiple Cloning Site (MCS) keine geeigneten Restriktionsschnittstellen aufwies, wurde die P-Gp cDNA in den Klonierungsvektor pBlueSKM (siehe Kapitel 2.1) kloniert. Durch Verdau mit dem Restriktionsenzym XbaI wurde die cDNA von ABCB1 herausgeschnitten und in den ebenfalls mit XbaI linearisierten Vektor pBlueSKM eingebaut. Dieser Ligationsansatz wurde in kompetente Zellen transformiert (*E. coli* DH5 $\alpha$ ) und die Plasmid-DNA durch Plasmidextraktion nach Kapitel 2.3.2 gewonnen.

Da nur mit einem Restriktionsenzym verdaut worden war, konnte die cDNA in zwei Orientierungen in pBlueSKM ligiert werden. Die beiden so erhaltenen Vektoren sind durch Kontrollverdau mit dem Enzym EcoRI und durch Gelelektrophorese anhand der erhaltenen Fragmentgrößen bestätigt worden. Die Klonierung ergab zwei Vektoren (Vektorkarten siehe Abbildung 3-2 und Abbildung 3-3), in denen das ABCB1 Gen in zwei unterschiedlichen Orientierungen (ori 1 und ori 2) vorliegt. Die Orientierung 2 (ori 2) ist die gewünschte Orientierung, da sich hier der open-reading Frame des ABCB1-Gens zwischen den beiden Restriktionsenzymen BamHI und SacI in der 5'→3' Ausrichtung befindet und somit von den Hefezellen korrekt transkribiert werden kann. In der anderen Orientierung (ori 1) ist das ABCB1-Gen in umgekehrter Richtung eingebaut und kann daher nicht korrekt abgelesen werden.





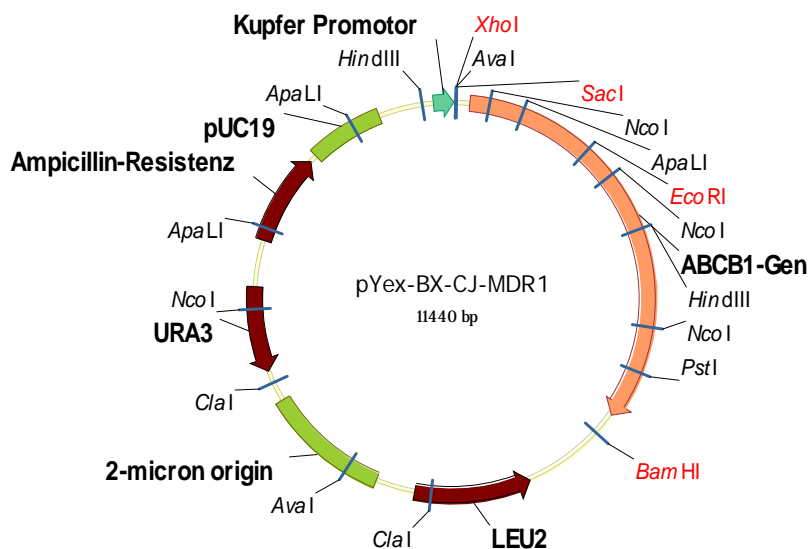
**Abbildung 3-2.** Vektorkarte von pBlueSKM-mdr1-ori1. Falsche Orientierung für die weiteren Klonierungsschritte.



**Abbildung 3-3.** Vektorkarte von pBlueSKM-mdr1-ori2. Richtige Orientierung für die weiteren Klonierungsschritte.

Die cDNA von ABCB1 wurde mit den Enzymen BamHI und SacI aus dem Vektor pBlueSKM-mdr1-ori2 geschnitten und in dem ebenfalls mit den gleichen Enzymen geschnittenen Hefeexpressionsvektor pYex-BX-CJ

eingebaut. Das Ergebnis dieser Ligation ist der Vektor pYex-BX-CJ-MDR1 (siehe Abbildung 3-4).



**Abbildung 3-4.** Vektorkarte von pYex-BX-CJ-MDR1.

Der Kontrollverdau von pYex-BX-CJ-MDR1 mit XhoI und EcoRI ergab Fragmente mit einer Basenpaargröße von 10131 und 1309. Die Sequenzierung erfolgte mit dem „sense“-Primer 242 und dem „antisense“-Primer 243 (siehe Anhang). Am C-Terminus von ABCB1 wurde das Stop-Codon entfernt und eine 6-fache Histidin-Markierung mit Stop-Codon angefügt. Zuerst wurde die DNA mit dem „sense“-Primer MDR1-pre-pstI-s und dem „antisense“-Primer bam-6His-pgp-as (siehe Tabelle 3-1) amplifiziert. Als Matrize diente der Vektor pYex-BX-CJ-MDR1. Die Annealing-Temperatur wurde auf 59°C (5°C höher, als die berechnete Schmelztemperatur des Primerpaares, damit sichergestellt war, dass die Primer als Einzelstänge vorliegen) gesetzt. Das PCR-Produkt mit einer Länge von ca. 500 bp wurde gelelektrophoretisch isoliert und aufgereinigt.

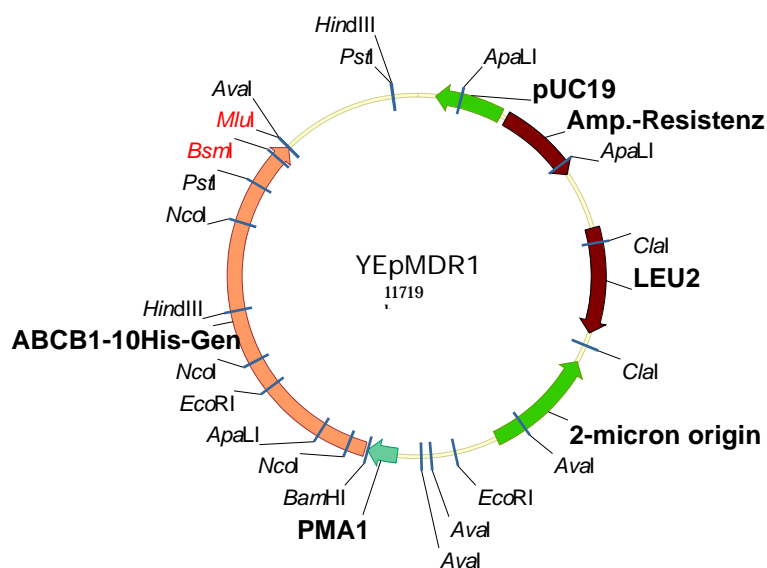
Das PCR-Produkt und der Vektor pYex-BX-CJ-MDR1 wurden mit den Enzymen BamHI und PstI verdaut. Das 10755 bp große Fragment aus dem Vektor pYex-BX-CJ-MDR1 wurde auch durch Gelelektrophorese aufgetrennt

und isoliert. Das ebenfalls geschnittene und aufgereinigte PCR-Fragment aus dem vorherigen Textabsatz wurde dann in den 10755 bp großen, linearisierten Vektor ligiert.

Dieser neue Vektor wurde pYex-BX-CJ-MDR1-6His benannt. Durch Sequenzierung und Kontrollverdau wurde das neue Insert des Vektors auf eventuelle Lesefehler der Taq-Polymerase analysiert (siehe Kapitel 2.3.11). Das Ergebnis dieser Untersuchung ergab keine Fehler in der neuen Sequenz des C-Terminus von P-Gp.

### 3.1.1.2 Konstruktion von Vektoren mit 12- und 15-fach Histidin markiertem P-Gp

Der Vektor pYepMDR1His (siehe Kapitel 2.1, Tabelle 2.2) diente bei den folgenden Versuchen als Matrize. Die bereits am C-Terminus enthaltene 10-fache Histidin-Markierung sollte jeweils auf 12 und 15 Histidine erweitert werden. Die Abbildung 3-5 zeigt die Restriktionskarte des 11,7 kb großen Ursprungsvektors pYepMDR1His.



**Abbildung 3-5.** Vektorkarte von YEpmDR1His (Synonym RAF13). Der Vektor enthält die Basensequenz von ABCB1 erweitert um eine 10-fache Histidin-Markierung. Das ABCB1 Gen steht unter Kontrolle des PMA1 Promotors.

Durch PCR mit dem Primerpaar pYep-BsmI/pYepHisNheI (siehe Tabelle 3-1) wurde die Sequenz zwischen der BsmI und der MluI Schnittstelle modifiziert und amplifiziert. Der Primer pYepHisNheI enthält die Histidinerweiterung und zusätzlich eine diagnostische NheI Schnittstelle zur leichteren Identifizierung der Klone. Die PCR wurde nach dem Protokoll im Kapitel 2.3.8 durchgeführt (Annealing Temperatur 55°C, 30 Zyklen). Der Vektor YEpMDR1His diente als Template. Das 189 bp große erhaltene PCR-Fragment wurde elektrophoretisch isoliert, gereinigt und mit BsmI und MluI verdaut. Aus dem Vektor pYepMDR1His wurde ein 177 bp großes Fragment ebenfalls mit BsmI und MluI herausgeschnitten. Diese beiden Restriktionsstellen sind in der Abbildung 3-5 in rot markiert. Das 189 bp große PCR-Produkt wurde Anstelle von diesem Fragment in den Vektor kloniert und der resultierende Vektor wurde pYep-MDR1-12His benannt.

Analog erfolgte die Einführung des 15-fachen Histidin-Restes am C-terminalen Ende der ABCB1 cDNA, allerdings mit dem Primer pYep15HisNheI. In Tabelle 3-1 werden die Nukleotid Sequenzen der verwendeten Mutagenese-Primer für die durchgeführten Klonierungen gezeigt.

**Tabelle 3-1.** Primer zur Mutagenese der Expressionsvektoren.

Name	Sequenz	Besonderheiten
pYepBsmI	TCCACCATCCAGAATGCAGAC	Sense
pYepHisNheI	ATGACGCGTGCTAGCCTAATGGTGATGG TGATGGTGATGGTGATGGTGATGGTG	antisense, 12-fach Histidin, NheI Schnittstelle
pYep15HisNheI	ATGACGCGTGCTAGCCTAGTGATGGTGA TGGTGATGGTGATGGTGATGGTGATGGT GATGGTG	antisense, 15-fach Histidin, NheI Schnittstelle
MDR1-pre-psti-s	CAGCTCCTGGAGCGGTTCTAC	Sense
bam-6his-pgp-as	CTCGGATCCTCAATGGTGATGGTGATGG TGCTGGCGCTTTGTTCCAGCC	antisense, 6-Histidin

### 3.1.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Einführung. Die in Kapitel 3.1.1 hergestellten Plasmide zur P-Gp Expression wurden in unterschiedliche Hefe-Stämme transformiert. Die nachfolgenden Kapitel beschreiben die Herstellung und Charakteristika der einzelnen P-Gp exprimierenden Hefe-Stämme. Die Membranen der erzeugten Hefe-Stämme wurden anschließend quantitativ auf Expression von humanem P-Gp untersucht. Aus den Stämmen, die eine relativ hohe Expressionsrate aufwiesen, wurde versucht P-Gp aufzureinigen und mit Hilfe unterschiedlicher Techniken wieder in einer künstlichen Phospholipiddoppelschicht zu rekonstituieren.

#### 3.1.2.1 Übersicht über die klonierten Stämme

In dieser Arbeit wurden zur Etablierung des Expressionssystems verschiedene Stämme von *S. cerevisiae* verwendet. Die genetischen Charakteristika der Hefestämme sind der Tabelle 2-1 zu entnehmen. In die Stämme wurde mit der Lithium-Acetat-Methode (siehe Kapitel 2.3.11) ein Hefeexpressions-Plasmid, welches das ABCB1 kodiert, eingeführt. Die Tabelle 3-2 enthält die hierdurch erzeugten und verwendeten Hefestämme zur P-Gp Expression. Die Spalte „Besonderheiten“ listet unter anderem das für den jeweiligen Stamm zu verwendende Nährmedium auf und bezeichnet die Anzahl der angefügten Histidin-Markierungen am C-terminus des P-Gp kodierenden Gens.

**Tabelle 3-2.** In dieser Arbeit etablierten Stämme von *S. cerevisiae*.  $\Delta his$ ,  $\Delta ura$  und  $\Delta leu$  bezeichnen die auxotrophen Marker Histidin, Uracil und Leucin. Die genetischen Informationen zu den Stämmen sind in der Tabelle 2-1 zu finden.

Name	Stamm	Plasmid	Besonderheiten
BJ5457 RAF13	BJ5457	YepMDR1His	SD-Medium $\Delta his$ , $\Delta leu$ , 10-fache Histidin Markierung
BJ5457 12His	BJ5457	pYepMDR1-12His	SD-Medium $\Delta his$ , $\Delta leu$ , 12-fache Histidin Markierung
BJ5457 15His	BJ5457	pYepMDR1-15His	SD-Medium $\Delta his$ , $\Delta leu$ , 15-fache Histidin Markierung
JS6 ERG6	LPY 11	pYeplac195MDR1His	SD-Medium $\Delta ura$ , $\Delta leu$ , 10-fache Histidin Markierung; Ergosterol defizient
JS3 ERG2-4	LPY 27	pYeplac195MDR1His	SD-Medium $\Delta ura$ , $\Delta leu$ , 10-fache Histidin Markierung; Ergosterol defizient
JS3 Blank	LPY 11	pYeplac195	SD-Medium $\Delta ura$ , $\Delta leu$ , Kontrollstamm ohne P-Gp
JS6 Blank	LPY 27	pYeplac195	SD-Medium $\Delta ura$ , $\Delta leu$ , Kontrollstamm ohne P-Gp
FYAK MDR	FYAK	pYep-BX-CJ-MDR1	SD-Medium $\Delta his$ , $\Delta leu$ , 6-fache Histidin Markierung ABC-Hefe-Transporter deletiert

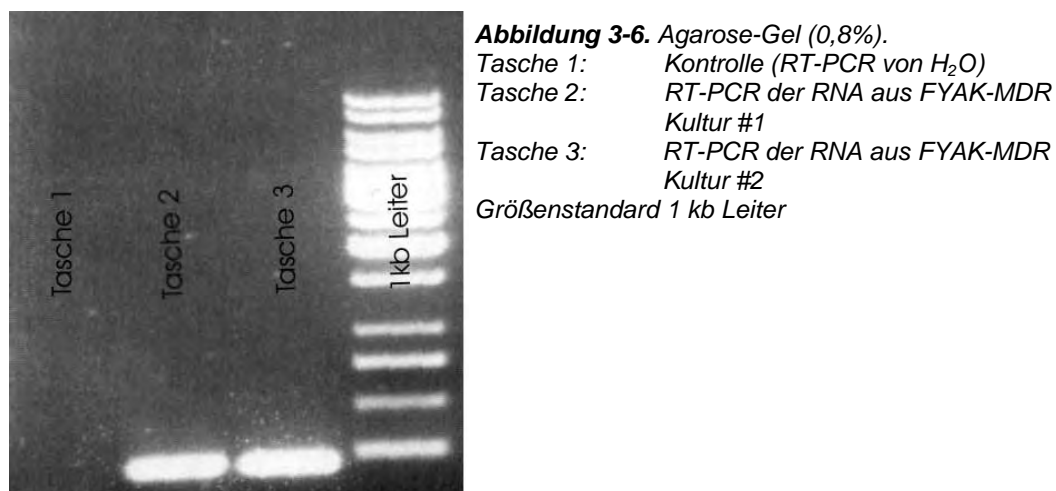
### 3.1.2.2 Kontrolle der Transformation durch Plasmid-Extraktion

Die Kontrolle der Transformation der in Tabelle 3-2 aufgeführten Stämme wurde durch Plasmid-Extraktion nach dem Protokoll im Kapitel 2.3.12 durchgeführt. Aus ausgewählten Klonen der verschiedenen Stämme wurde das eingeführte Plasmid wieder extrahiert und dessen Identität durch einen Kontrollverdau bzw. Sequenzierung nachgewiesen, damit falsch positive Klone direkt nach der Transformation ausgeschlossen werden können.

### 3.1.2.3 Kontrolle der Expression durch RNA-Isolation

Die RNA wurde isoliert und durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, anschließend die DNA mit dem „sense“ Primer MDRleftJS und dem „antisense“ Primer MDRRightJS in einer Polymerasekettenreaktion amplifiziert (siehe Tabelle 3-3). Die Primer flankieren eine 202 bp große

Sequenz, die spezifisch für die cDNA von ABCB1 ist. Das humane ABCB1 Gen wurde hierdurch in dem FYAK MDR Stamm nachgewiesen.



**Tabelle 3-3.** Sequenz der verwendeten Primer zum Nachweis von ABCB1 RNA in den transformierten Hefestämmen.

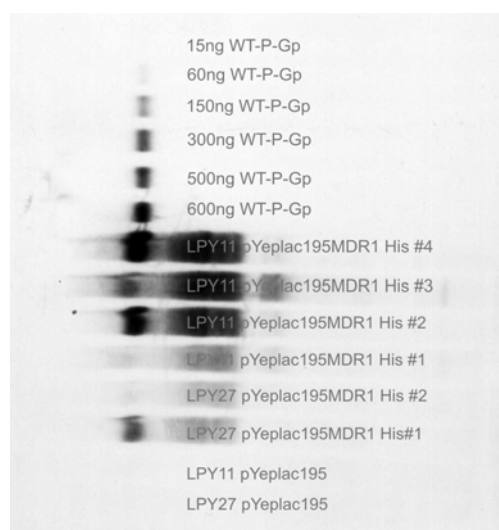
Name	Sequenz	Besonderheiten
MDR1-LeftJS	GCTCCTGACTATGCCAAAGC	Sense
MDR1-RightJS	TCTTCACCTCCAGGCTCAGT	Antisense

Die Abbildung 3-6 zeigt die Gelelektrophorese der 202 bp großen DNA-Fragmente, die spezifisch für P-Gp sind und durch die PCR Reaktion amplifiziert worden sind. Der *FYAK MDR* Stamm exprimiert somit humanes P-Gp. Der Stamm ist zur Aufreinigung von Proteinen weniger geeignet, da er alle Proteasen besitzt. Da bereits der Protease defiziente Stamm *BJ5457 RAF13* als Expressionsorganismus vorhanden war, wurden keinerlei Aufreinigungsansätze mit dem *FYAK MDR* Stamm verfolgt. Da allerdings in dem *FYAK* Stamm die drei Hefe-ABC-Transporter SNQ2, PDR5 und YOR1 deletiert sind, könnte der P-Gp exprimierende *FYAK MDR* Stamm zu funktionellen Untersuchungen des menschlichen P-Gp in weiteren Arbeiten eingesetzt werden.

## 3.1.2.4 Kontrolle der Expression durch Immun-Blotting

Da beide Stämme *LPY 11* und *LPY 27* bisher in der Literatur nicht für die Expression von P-Gp verwendet worden sind, wurden die einzelnen Klone durch Immuno-Blot auf Expression von humanen P-Gp direkt nach der Transformation mit dem Vektor pYep195MDR1His untersucht, um eventuelle falsch positive Klone auszuschließen. Um in dem Immuno-Blot immer die gleiche Zellzahl zu verwenden, damit die Blots untereinander quantitativ vergleichbar sind, wurde die Zellzahl über die optische Dichte standardisiert.

Die Zellen wurden für den Immuno-Blot in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet ( $OD < 1,0$ ). Das Volumen der Zellsuspension, dass einer Gesamt-OD von 15 entsprach (Eine  $OD_{600\text{ nm}}$  von 1 entspricht einer Zellzahl von ca.  $5 \cdot 10^6$  Zellen/mL), wurde für den Blot eingesetzt und die hier drin enthaltenen Zellen mit 0,5 mm Glasskugeln aufgebrochen. Danach wurden 30  $\mu\text{L}$  der aufgebrochenen Zellen auf ein SDS-PAGE Gel geladen und ein Immuno-Blot auf Nitrocellulose Membranen durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde der anti-Pgp C219 von Signet verwendet. Dieser wurde mit einem sekundären Anti-Maus Antikörper detektiert.



**Abbildung 3-7.** Western-Blot der *LPY 11* und *LPY 27* Klone. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Kit von Amersham Biosciences. Als quantitativer Marker diente aufgereinigtes P-Gp aus dem BJ5457 RAF13-Stamm.

Die aufgetragene Zellzahl der Klone ist in allen Taschen gleich (siehe Text).

*LPY11 pYeplac195* und *LPY27 pYeplac195* sind Kontrollen, die kein ABCB1 exprimieren, da hier nur der Leervektor transformiert worden ist. Sie wachsen allerdings auf dem Minimal Medium, da sie durch die Transformation mit dem *pYeplac195* Uracil selbst produzieren können.

Die Abbildung 3-7 zeigt, dass alle mit dem P-Gp Gen transformierten Klone humanes P-Gp mit unterschiedlichem Ausmaß exprimieren. Die Klone *LPY27 #1* und *LPY11 #2* und *#4* zeigten die höchsten Expressionsraten und wurden deshalb zur weiteren Verwendung ausgewählt.



## 3.1.2.5 Fermentation zur Gewinnung von P-Glykoprotein

Zur Gewinnung von homogenem P-Glykoprotein musste eine große Menge an Hefezellmasse produziert werden. Die Hefezellen wurden in einem Bioreaktor nach dem kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Verfahren kultiviert (siehe Material und Methoden). Geerntet wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 10000 g und das Pellet wurde sofort in flüssigem Stickstoff bis zur Starre schockgefroren. Die Zellen wurden bis zur Aufarbeitung bei -80°C im Tiefkühlschrank gelagert. In Tabelle 3-4 sind die Daten und Charakteristika aller in dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen zusammengefasst.

**Tabelle 3-4.** Die Tabelle enthält die Wachstumscharakteristika der etablierten Stämme. Die Spalte „Volumen“ gibt das Endvolumen der Kultur im Bioreaktor wieder. Die Biomasse ist das Trockengewicht der Schock-Gefrorenen Hefe-Zellen. (n.b.= nicht bestimmt)

Stamm	Art	Ver- dopplungs- zeit in h	Lag-Zeit in h	Biomasse in g	Volumen in L	Code
BJ5457 RAF13	1x	6,00	24,3±1,2	180	36	BJC#1
BJ5457 RAF13	1x	6,70	42,1±1,6	185	36	BJC#2
BJ5457 RAF13	1x	9,90	18,4±2,9	28	9	BJB#1
BJ5457 RAF13	1x	11,40	n.b.	n.b.	10	BJB#2 <sup>c</sup>
BJ5457 RAF13	1x	13,90	17,0±3,9	25	10	BJB#3
JS3 ERG2-4	1x	4,60	n.b.	30	10	JSB#1
JS3 ERG2-4	1x	4,70	9,4±1,1	25	10	JSB#2
BJ5457 RAF13	3x	6,40 7,20 6,10	30,0±5,9	57	10	BJB#5
BJ5457 RAF13	3x	7,70 9,80 6,10	15,5±2,0	65	10	BJB#6
BJ5457 RAF13	3x	5,10 8,20 10,50	18,2±2,1	47	10	BJB#7
JS6 ERG6	1x	13,00	13,0±2,7	25	10	JSB#3 <sup>b</sup>
JS3 ERG2-4	1x	4,30	7,1±1,6	25	10	JSB#4
JS3 ERG2-4	1x	2,70	6,6±0,05	30	10	JSB#5

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Stamm	Art	Verdopplungszeit in h	Lag-Zeit in h	Biomasse in g	Volumen in L	Code
JS3 ERG2-4	3x	3,0 3,3 3,3	4,1±4,1	58	10	JSB#6
JS6 ERG6	3x	4,7 5,4 4,2	11,9±2,0	53	10	JSB#7
BJ5457 12His	1x	5,7	n.b.	ca. 2	1 <sup>a</sup>	BJC#3
BJ5457 15His	1x	8,0	3,3±0,1	ca. 2	1 <sup>a</sup>	BJC#4
BJ5457 12His	1x	5,3	17,5±1,4	33	5	BJC#5
BJ5457 15His	1x	6,1	10,9±0,7	30	5	BJC#6
BJ5457 12His	1x	7,9	6,6±0,7	22	5	BJC#7 <sup>b</sup>
BJ5457 15His	1x	7,9	7,0±0,4	24	5	BJC#8 <sup>b</sup>
JS6 ERG6	1x	3,0	4,9±0,2		5	JSC#1
JS6 ERG6	1x	2,8	5,2±0,4	Gesamt 60*	5	JSC#2
JS6 ERG6	1x	2,8	5,7±0,5		5	JSC#3
JS3 ERG2-4	1x	2,8	n.b.	Gesamt 50*	5	JSC#4
JS3 ERG2-4	1x	2,7	n.b.		5	JSC#5

\* Die Ausbeute der Wachstümer wurde zusammengefasst.

<sup>a</sup> Diese Wachstümer erfolgten nicht im Bioreaktor, sondern in einer 4 L Fernbach-Flasche im Schüttelinkubator (250 rpm, 30°C) ohne zusätzliche Sauerstoffzufuhr.

<sup>b</sup> Dieses Wachstümer wurden nicht zu einer Membranpräparation verarbeitet. Sie geben aber Information über ihr Wachstumsverhalten wieder.

<sup>c</sup> Das Wachstum wurde verworfen, da in der Endphase eine Kontamination mit Bakterien vorhanden war.

Die Verdopplungszeit wurde mittels Exponential-Funktion bestimmt. Die Lag-Zeit (Zeit vom Start des Wachstums bis zum Übergang in die exponentielle Wachstumsphase) wurde mit der Gompertz-Funktion bestimmt. In der Tabelle bezeichnet 1x hierbei die kontinuierliche Kultivierung gemäß Kapitel 2.2.2.1 und 3x die diskontinuierliche Kultivierung gemäß Kapitel 2.2.2.2.

Die Wachstümer JSC#1-#3 wurden gleichzeitig in unterschiedlichen Fermentern kultiviert, aber zusammen geerntet. Dies gilt auch ebenfalls für JSC#4-#5. Deshalb ist die Biomasse der Wachstümer zusammengefasst. Aus der obigen Tabelle geht hervor, dass das „3x Wachstum“ bzw. die diskontinuierliche Fermentation unter den gleichen Bedingungen mindestens die zweifache Ausbeute an Hefezellen liefert wie die kontinuierliche Fermentation. Dies ist von Vorteil, da die Vorarbeiten, wie zum Beispiel das

Anzüchten der Klone und das Herstellen des Nährmediums, mehrere Wochen in Anspruch nehmen. Da der Aufwand der Vorarbeiten bei dem kontinuierlichen und diskontinuierlichen Verfahren gleich ist, erhält man somit mindestens die doppelte Zellmasse in annähernd demselben Zeitraum.

### 3.1.3 Membran-Präparation aus *S. cerevisiae* Zellen

Nach dem in Kapitel 2.4.6 beschriebenen Protokoll wurde eine Membranpräparation aus den geernteten Zellen angefertigt (siehe Tabelle 3-4). Die Gesamtproteinkonzentration der Membranen wurde mit dem Petersen-Lowry-Assay oder dem Amido-Black-Protein-Assay ermittelt. Die Membranen der Hefestämme wurden durch quantitativen Western-Blot oder ATPase-Assay (2.4.8) auf ihren P-Gp Gehalt überprüft. Die Tabelle 3-5 zeigt alle verwendeten Membranpräparationen und ihre Charakteristika.

**Tabelle 3-5.** Die Proteinkonzentration wurde in Triplikaten, bei zwei unterschiedlichen Verdünnungen, bestimmt. Der P-Gp Anteil am Gesamtprotein wurde mit dem ATPase-Assay (2.4.8) in Triplikaten bestimmt. \* Der Gehalt an P-Gp dieser Präparationen wurde nur durch einen semi-quantitativen Western-Blot ermittelt. <sup>a</sup> Der Gehalt wurde auch durch Western Blot bestimmt. (n.b.= nicht bestimmt)

Hefestamm	Gesamt-protein-konz. in mg/mL	Vol. in mL	Einsatz Zell-masse in g	Membran/ Zellmasse in mg/g	P-Gp Anteil in %	P-Gp/ Zell-masse in mg/g	Code siehe Tabelle 3-4
BJ5457 RAF13	23,12±1,15	31,0	180	4,0	4,11±0,11	0,16	BJC#1
BJ5457 RAF13	16,73±1,38	43,0	185	3,9	3,32±0,37	0,13	BJC#2
BJ5457 12His	2,94±0,17	5,0	2	7,4	1,68±0,22	0,12	BJC#3
BJ5457 15His	5,75±0,39	5,0	2	14,4	0,72±0,05	0,10	BJC#4
BJ5457 12His	15,37±0,72	16,0	33	7,5	9,75±0,69*	0,73	BJC#5
BJ5457 15His	10,99±0,08	16,0	30	5,9	8,09±0,02*	0,47	BJC#6
JS3 ERG2-4	7,11±0,18	43,6	60	5,2	7,99±0,53 <sup>a</sup>	0,41	JSC#1 bis JSC#3

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Hefestamm	Gesamtprotein-konz. in mg/mL	Vol. in mL	Einsatz Zell-masse in g	Membran/ Zellmasse in mg/g	P-Gp Anteil in %	P-Gp/ Zell-masse in mg/g	Code siehe Tabelle 3-4
JS6 ERG6	10,59±1,02	36,0	50	7,6	9,42±0,29 <sup>a</sup>	0,72	JSC#4+ JSC#5
BJ5457 10His	17,13±1,29	20,0	53	6,5	4,10±0,29	0,27	BJB#1+ BJB#3
BJ5457 10His	24,23±1,31	21,0	57	8,9	4,01±0,13	0,36	BJB#5
BJ5457 10His	22,71±2,12	28,7	65	10,0	4,17±0,22	0,42	BJB#6
JS3 ERG2-4	8,97±1,41	34,5	55	5,6	n.b.		JSB#1+ JSB#2
BJ5457 10His	19,46±1,14	31,0	47	12,8	n.b.		BJB#7
JS3 ERG2-4	13,18±1,21	32,7	55	7,8	n.b.		JSB#4+ JSB#5
JS3 ERG2-4	13,47±1,01	34,0	58	7,9	n.b.		JSB#6
JS6 ERG6	14,24±0,48	34,0	53	9,1	n.b.		JSB#7

Der P-Gp Gehalt der Membranen der Ergosterol defizienten Stämme wurde mit dem ATPase-Assay und zusätzlich durch quantitativen Immuno-Blot bestimmt, da die Zusammensetzung der Membran anders als bei dem *BJ5457* Hefestamm ist. Der Western-Blot ergab für den *JS3 ERG2-4* Stamm eine Expressionsrate von  $8,16 \pm 2,09\%$  bzw.  $14,7 \pm 1,23\%$  für den *JS6 ERG6* Stamm (siehe Kapitel 3.1.8.2.). Obwohl die membranspezifischen Faktoren der Gleichung 2-4 streng genommen nur für den *BJ5457* Stamm gelten, ist bei beiden Verfahren dieselbe Tendenz für die Quantifizierung der Expressionsrate vorhanden. Die Ausbeute einer Membran-Präparation ist unter anderem abhängig von der eingesetzten Zellmasse und somit auch vom Erntezeitpunkt. Da die Wachstumsansätze unterschiedliche Volumina hatten, ist hierdurch die unterschiedliche Ausbeute an Gesamtmembranprotein zu erklären. Der Anteil von P-Gp am Gesamtprotein lag bei dem *BJ5457 RAF13* Stamm in dieser Arbeit zwischen 3,32% und 4,17%. Dies ist mit den Literaturwerten vergleichbar [35]. Die Expressionsrate der neuen Stämme *BJ5457 12His* bzw. *BJ5457 15His* wurde durch quantitativen Western Blot bestimmt und ergab eine sehr hohe

Expressionsrate von ca.10% bzw. 8% für die beiden Stämme. Der quantitative Western Blot ist im Anhang abgebildet. Die Expressionsrate ist etwa zweifach höher als normal. Ein Grund hierfür kann sein, dass diese Membranen von einem frisch transformierten Klon stammen oder dass die Erweiterung der Histidine das P-Gp in der Membran stabilisiert.

### **3.1.4 Aufreinigung und Rekonstitution von P-Glykoprotein**

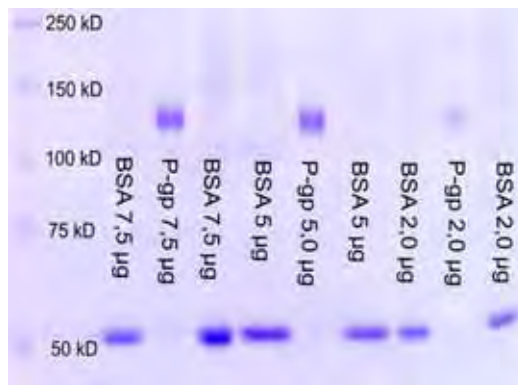
Die Membranen wurden in einer Konzentration von 2 mg/mL in Puffer resuspendiert und mit 1,0 % - 1,5 % Lysophosphatidylcholin (LPC) (Gewicht/Volumen) solubilisiert (siehe Kapitel 2.4.3). Dieses Lipid/Detergenz-Verhältnis ist einzuhalten, um aktives homogenes P-Gp zu erhalten. Das P-Gp verbleibt über die gesamte Aufreinigung und der erneuten Rekonstitution im nativen Zustand. Die Membranlipide, die P-Gp umgeben, üben eine Schutzfunktion aus und dürfen durch das verwendete Detergenz nicht ganz entfernt werden, da das P-Gp sonst irreversibel denaturieren würde [14]. Der Aufreinigungsprozess von homogenen P-Gp ist detailliert in Kapitel 2.4.3 beschrieben.

P-Gp kann in unterschiedlichen Lipiden verschiedener Zusammensetzung im aktiven Zustand rekonstituiert werden (näheres siehe Kapitel 3.1.5). Die Tabelle 3-6 gibt die Charakteristika der durchgeführten Aufreinigungen von P-Gp aus dem *BJ5457 RAF13* Hefestamm wieder. Die Aufreinigung wurde hinsichtlich Gehalt, Reinheit, Aktivität und Ausrichtung der ATP-Bindungsstelle in den Liposomen charakterisiert. Die Aktivität von P-Gp ist in  $\mu\text{mol P}_i/\text{min}/\text{mg}$  (U/mg) angegeben und beschreibt die Hydrolysegeschwindigkeit des Enzyms von ATP in Abwesenheit von Substrat (basale) und in Anwesenheit von 130  $\mu\text{mol/L}$  Verapamil. Das Verhältnis zwischen stimulierter und basaler Aktivität wird als Ratio (Tabelle 3-6) bezeichnet und kann als Maß für das Messfenster der Proteinpräparation herangezogen werden. Die prozentuale Ausrichtung der Proteoliposomen ist der Anteil der Liposomen mit nach außen gerichteter ATP Bindungsstelle (zur Bestimmung der Ausrichtung siehe Kapitel 2.5.2).

**Tabelle 3-6.** Die Proteinkonzentration wurde mit dem Amido-Black-Protein-Assay bestimmt. Die Lipidkonzentration bezieht sich auf das Volumen des Elutionspuffers. Die Reinheit wurde durch SDS-Page Gelelektrophorese bestimmt.

Aufreinigung Gesamtprotein in mg	Lipidkonz. in % (g/V)	Ausbeute reines P-Gp in mg	basale und stimulierte Aktivität in U/mg	Auswärts- ausrichtung von P-Gp Liposomen in %	Reinheit in %
Präp. #1 720	0,4 <i>E. coli</i> gemischte Lipide	1,970	0,50±0,06 1,42±0,05 Ratio 2,82	50,3	93,2
Präp. #2 200	0,1 <i>E. coli</i> gemischte Lipide	0,208	1,07±0,22 2,50±0,11 Ratio 2,33	90,2	> 90
Präp. #3 240	0,4 PC/PA/Ch Lipide	0,321	0,310±0,1 0,958±0,09 Ratio 3,09	50,5	> 90

Grundsätzlich bestehen zwei Möglichkeiten für die Ausrichtung von P-Gp in den Liposomen. Das P-Gp kann sich mit der ATP-Bindungsstelle nach innen in die Liposomen einlagern, oder wie gewünscht, damit die ATP-Bindungsstelle zugänglich ist, nach außen. Die Ausrichtung von P-Gp in den Liposomen ist unter anderem abhängig von der eingesetzten Lipidkonzentration und der Art der Rekonstitution. Bei ca. 0,4% Lipiden ist die Verteilung der Ausrichtung der ATP-Bindungsstellen zufällig (also 50%). Erniedrigt man die Lipidkonzentration auf 0,1%, dann sind mindestens 70% nach außen gerichtet. Die Präparation #1 dient als Beispiel für die Charakterisierung der übrigen P-Gp Präparationen. Von jeder Präparation wurde ein SDS-Gel nach 2.4.2 angefertigt und die Reinheit bestimmt. Die Abbildung 3-5 zeigt repräsentativ das SDS-Gel der Präparation #1 aus Tabelle 3-6.



**Abbildung 3-8.** Die Abbildung zeigt ein 7,5% SDS-Page-Gel von homogenen, rekonstituiertem P-Gp (Präp. #1). Das BSA dient als Hintergrund-Standard für die Coomassie-Blue Färbung. Der Reinheitsgrad von P-Gp wurde in drei Konzentrationen mit NIH Image 1.62 ausgewertet. Die gezeigte Präparation hatte einen Reinheitsgrad von ca. 93 %.

Das Molekulargewicht von P-Gp beträgt aufgrund der fehlenden N-Glykosylierung ca. 130 kD anstatt der erwarteten 170 kD wie in Säugerzellen (siehe Abbildung 3.8) Bei einem 360 mL Aufreinigungsansatz (720 mg Membranen) beträgt die Ausbeute bis zu 2 mg an reinem P-Gp. Leider verhält sich die Ausbeute und das Ansatzvolumen, wie die obige Tabelle zeigt nicht linear. Drittelt man den Ansatz, dann sinkt die Ausbeute auf 321 µg. Dieses nicht-lineare Verhalten zwischen Ansatzvolumen und Ausbeute ist auch in anderen Laboren nach persönlicher Mitteilung von Al-Shawi bekannt.

Die basale und auch die stimulierte Aktivität schwankt mit den zur Rekonstitution verwendeten Lipiden. Die Lipidzusammensetzung der Präparation #3 zeigt die niedrigste basale und stimulierte Aktivität, dadurch hat sie allerdings das größte Messfenster. Da alle Präparationen mit dem in der Literatur verwendeten Detergenz LPC aufgereinigt worden sind, wurde die Aktivität dieser Aufreinigungen als Standard gleich 100% gesetzt, um Modifikationen bezüglich der Aufreinigungsmethodik vergleichen zu können. Die basale und die stimulierte Aktivität der Präparation #2 ist verglichen mit der Präparation #1 um den Faktor 2,14 bzw. 1,74 höher. Wird die basale und stimulierte Aktivität der Präparation #1 durch die prozentuale Ausrichtung (CHAPS-Assay 50,3%) korrigiert, dann erhält man für die basale bzw. stimulierte Aktivität 1,0 U/mg und 2,88 U/mg. Dies entspricht den Aktivitäten der Präparation #2, in der die ATP-Bindungsstellen zu 90% nach außen

gerichtet sind. Dies bedeutet, um die Präparationen bezüglich Ihrer spezifischen Aktivität vergleichen zu können, muss die Ausrichtung des Proteins in den Liposomen miteinbezogen werden. Da allerdings in dieser Arbeit für die weiteren Untersuchungen an Modulatoren nur die relative ATPase Aktivität herangezogen wurde, ist die Korrektur durch diesen Faktor nicht notwendig.

Wie die Tabelle 3-6 und Abbildung 3-8 zeigen liefert die angewendete Aufreinigungsmethode aktives humanes P-Gp und die angewendeten Techniken zur Aufreinigung funktionieren. Sie sollte unter anderem durch Variation der Lipid-Zusammensetzung und Anwendung anderer Rekonstitutionstechniken optimiert werden.

### 3.1.5 Lipide zur Rekonstitution

Die Eigenschaften von rekonstituiertem P-Gp sind abhängig von der Zusammensetzung der Lipid-Membran, wie die Tabelle 3-6 zeigt. Daher wurde in dieser Arbeit die bereits etablierte Zusammensetzung mit zwei neuen Lipid-Zusammensetzungen für die P-Gp-Rekonstitution verglichen. Die Tabelle 3-7 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Lipid-Mischungen.

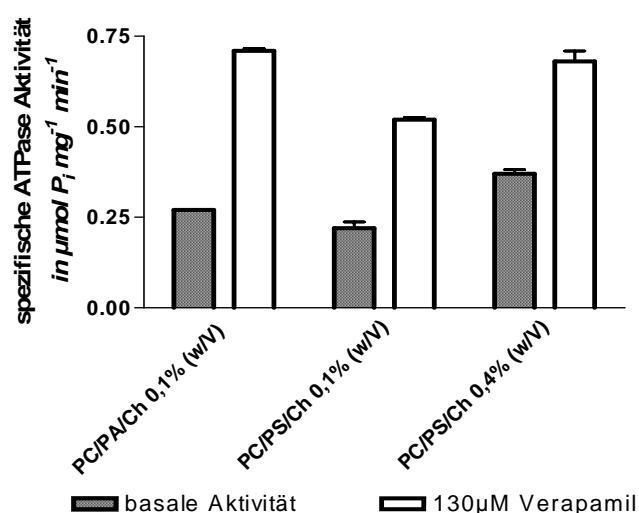
**Tabelle 3-7.** Zusammensetzung der verwendeten Lipid-Mischungen. Die Lipide wurden als eine 5%-ige Lipidsuspension bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur Verwendung gelagert. Die finale Konzentration der Lipide betrug 0,1% oder 0,4%, bezogen auf das Volumen des Elutionspuffers. Die genaue Herstellung der Liposomen ist in Kapitel 2.4.5 beschrieben.

Lipid-Mischung	Zusammensetzung
E. coli mixed Lipids	E. coli Lipide Ether/Acetat Frak. 61,54%, Ei-PC aus Eigelb 16,82%, Rinderhirn PS Type III 9,62%, Cholesterin 12,03%
PC/PA/Ch	Ei-PC aus Eigelb 67%, Phosphatidylsäure 10%, Cholesterin 23%
PC/PS/Ch	Ei-PC aus Eigelb 67,58%, Phosphatidylserin 13,47%, Cholesterin 18,95%

3.1.5.1 Aufreinigung und Rekonstitution in verschiedenen Lipid-Mischungen  
Für Untersuchungen der ATPase Aktivität von Modulatoren stellt das Messfenster, also das Verhältnis von basaler und stimulierter Aktivität, ein



weiteres Qualitätskriterium für eine Präparation dar. Dies bedeutet, dass eine ideale P-Gp Präparation eine geringe basale Aktivität und eine möglichst hohe stimulierte Aktivität zeigen sollte. Daher sollte der Einfluss von Lipidzusammensetzungen auf die spezifische Aktivität von P-Gp untersucht werden. Hierzu wurde das P-Gp in Liposomen mit der Zusammensetzung PC/PS/Ch und PC/PA/Ch rekonstituiert. Die Membranen wurden, um 100%ige Aktivität zu gewährleisten mit 1,5% Lysophosphatidylcholin solubilisiert und die Proteoliposomen durch Dialyse hergestellt. Die Solubilisierung der Aufreinigungen erfolgte mit 240 mg Membransuspension. Dieser Ansatz wurde in drei gleiche Teile aufgeteilt und die nun geteilten Ansätze nach etabliertem Protokoll aufgereinigt. Zur Rekonstitution wurden allerdings unterschiedliche Lipidmischungen (PC/PA/Ch und PC/PS/Ch), wie in Tabelle 3-7 beschrieben, verwendet.



**Abbildung 3-9.** Der Graph zeigt die basale und stimulierte Aktivität von Proteoliposomen, gemessen im Reaktionspuffer pH 7,4. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Die Ordinate zeigt die spezifische P-Gp Aktivität in Gegenwart von 10 mmol/L ATP (U/mg).

**Tabelle 3-8.** Die Tabelle zeigt die numerischen Werte der Abbildung 3-9

	PC/PA/Ch 0,1%	PC/PS/Ch 0,1%	PC/PS/Ch 0,4%
Basal	0,27±0,00 U/mg	0,22±0,03 U/mg	0,37±0,02 U/mg
Stimuliert	0,71±0,01 U/mg	0,52±0,01 U/mg	0,68±0,05 U/mg
Ratio	3,13	2,36	1,86

Die Abbildung 3-9 und Tabelle 3-8 zeigen die ATPase Aktivität von rekonstituiertem P-Gp in unterschiedlichen Lipidzusammensetzungen und -konzentrationen. Das Verhältnis zwischen der basalen und stimulierten Aktivität ist für PC/PA/Ch 0,1% 3,13; für PC/PS/Ch 0,1 % 2,36 und für PC/PS/Ch 0,4% 1,86. Alle Präparationen mit den neuen Lipidmischungen weisen eine geringere basale Aktivität auf als die Präparationen mit *E. coli* gemischten Lipiden aus der Tabelle 3-6. Die Aufreinigung mit der Zusammensetzung PC/PA/Ch ist hinsichtlich des Messfensters am besten, da bei dieser Lipidmischung die stimulierte spezifische ATPase Aktivität am höchsten ist. Diese Eigenschaft der Lipide ist hinsichtlich der später durchgeführten systematischen ATPase Assays von Vorteil, da die Empfindlichkeit des Messsystem durch das breitere Messfenster auch zunimmt.

Die in dieser Versuchsreihe verwendeten Lipide stellen im Gegensatz zu den standardmäßig verwendeten *E. coli* gemischten Lipiden eine chemisch besser definierte Quelle dar. Bei Verwendung von chemisch definierten Lipiden ist eine bessere Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Zusammensetzung möglich. Die spezifischen Aktivitätswerte der Präparationen können untereinander nicht verglichen werden, da die Lipidzusammensetzung auch die kinetischen Eigenschaften von P-Gp ändert. Daher kann als Vergleichsparameter nur das Messfenster (Ratio) herangezogen werden. Dies ist bei der Präparation mit PC/PA/Ch vergleichbar mit der aus der Präparation #1 und #2 (siehe Tabelle 3-6). Die Tabelle 3-9 gibt weitere untersuchte Parameter der Aufreinigungen aus Abbildung 3-9 wieder. Hier fällt besonders auf, dass bei der Präparation mit 0,1 % PC/PS/Ch nur 47% der ATP-Bindungsstellen nach außen gerichtet sind. Dies kann ein zufälliges Phänomen sein oder im Zusammenhang mit der Lipidmischung stehen. Da diese Lipidmischung keine besonders hohe Aktivität zeigt, wurde dies nicht weiter untersucht. Für weitere Aufreinigungen wurde die Lipidmischung mit der Zusammensetzung PC/PA/Ch verwendet.

**Tabelle 3-9.** Die Proteinkonzentration wurde mit dem Amido-Black-Assay in Triplikaten bestimmt. Angegeben sind der Mittelwert und die Standardabweichung. Die Ausrichtung der Proteoliposomen wurde mit dem Chaps-Latency-Assay in Duplikaten bestimmt.

Aufreinigung 80 mg Membran (~4 % P-Gp)	P-Gp Konzentration in mg/mL	Ausbeute P-Gp in µg	auswärtsgerichtete ATP- Bindungsstelle in %
PC/PA/Ch 0,1%	0,89±0,05	267,3	72,7
PC/PS/Ch 0,1%	0,94±0,05	280,5	47,0
PC/PS/Ch 0,4%	0,49±0,01	196,4	50,0

### 3.1.6 Rekonstitution von P-Glykoprotein in extrudierten Liposomen

Der ABC-Transporter TAP konnte in extrudierte Vesikel der Zusammensetzung PC/PA/Ch funktionsfähig rekonstituiert werden [111]. In den Untersuchungen wurde festgestellt, dass die ATP-Bindungsstelle des TAP-Transporters zu 100% auswärts gerichtet war. Daher wurde untersucht, ob sich P-Glykoprotein auch in durch Extrusion hergestellte Liposomen rekonstituieren lässt. Hierzu wurde die Methodik der TAP Rekonstitution auf das P-Gp übertragen.

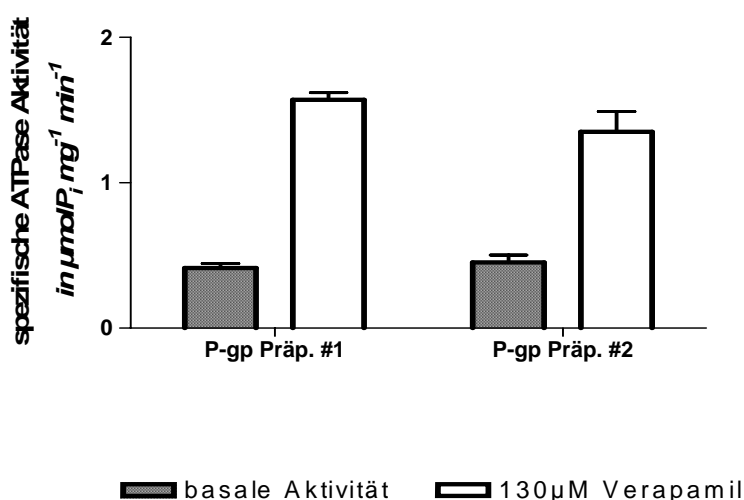
Das optimale Verhältnis Detergenz zu Lipid ( $p$ ) zur Solubilisation und Rekonstitution wurde bei diesem Ansatz nicht empirisch ermittelt, sondern nach der Gleichung von Rivnay und Metzger (Gleichung 3-1) berechnet [90].

**Gleichung 3-1.** Berechnung des Detergenz zu Lipid Verhältnisses.

$$p = \frac{c(\text{Detergenz}) - \text{CMC}}{c(\text{Lipid})}$$

Da als Ausgangsmaterial für diese Versuche bereits rekonstituiertes homogenes P-Gp in *E. coli* gemischten Lipiden (Tabelle 3-6, Präp. #1) diente, sollte der  $p$ -Wert analog zu den Untersuchungen des TAP-Transporters bei der Rekonstitution möglichst gering sein ( $<0,2$ ), damit sich das Protein in die extrudierten Liposomen einlagern kann. Das mittlere Molekulargewicht der *E. coli* mixed Lipidmischung, aus dem das P-Gp herausgelöst werden soll, beträgt 883 g/mol. Die Lipidkonzentration der hierfür ausgewählten Präparation # 1 aus dem Kapitel 3.1.4 wurde mit einem

Lipid-Assay bestimmt und beträgt  $11,92 \text{ mg/ml} \pm 0,10$  [5]. Um das P-Gp aus den bisherigen Liposomen herauszulösen wurde als Detergenz n-Decyl- $\beta$ -D-maltopyranosid (DM) verwendet. Das Verhältnis Detergenz zu Lipid wurde gemäß der Gleichung 3-1 so gewählt, dass ein p-Wert von ca. 1,7 erreicht wurde. Die kritische Mizellbildungskonzentration (CMC) von DM beträgt nach Literatur  $1,6 \text{ mmol/L}$ . Es wurde  $2,4 \text{ mmol/L}$  DM zur Solubilisierung eingesetzt. Die extrudierten Liposomen bestanden aus PC/PA/Ch (siehe Tabelle 3-7) und haben ein mittleres Molekulargewicht von  $673 \text{ g/mol}$ . Die Konzentration der  $200 \text{ nm}$  großen extrudierten Liposomen wurde dann so gewählt, dass die Rekonstitution des solubilisierten P-Gp bei einem p-Wert von kleiner als  $0,2$  erfolgte, also bei einem Verhältnis mit einem relativ niedrigen Detergenzanteil. Das überschüssige Detergenz wurde über einer Sephadex-G-50 fein Säule von den Liposomen abgetrennt.



**Abbildung 3-10.** Der Graph zeigt die basale und stimulierte ATPase Aktivität von P-Gp in extrudierten  $200 \text{ nm}$  Liposomen. Die beiden Präparationen wurde bei exakt gleichen Bedingungen solubilisiert und rekonstituiert. Die basale und stimulierte Aktivität ist in Abwesenheit bzw. Gegenwart von  $130 \mu\text{M}$  Verapamil bestimmt worden ( $n=2$ ). Die Ordinate zeigt die spezifische ATPase Aktivität ( $\text{U/mg}$ ). Die basale Aktivität der Präp. #1 ist nicht signifikant unterschiedlich zu der Präp. #2 ( $p=0,454$ ). Die stimulierte Aktivität der Präp. #1 ist nicht signifikant unterschiedlich zu der Präp. #2 ( $p=0,171$ ).

**Tabelle 3-10.** ATPase Aktivität der extrudierten Proteoliposomen der Präparation #1 und #2.

	P-Gp Präp #1	P-Gp Präp #2
Basal	0,41±0,03 U/mg	0,45±0,05 U/mg
Stimuliert	1,57±0,05 U/mg	1,35±0,14 U/mg
Ratio	3,82	3,0

Wie die Tabelle 3-10 zeigt, unterscheiden sich die extrudierten Proteoliposomen der oben dargestellten Präparationen nicht signifikant in ihren ATPase-Eigenschaften voneinander. Die Verhältnisse sind in der Abbildung 3-10 graphisch dargestellt. Die ursprünglichen Proteoliposomen aus denen das P-gp herausgelöst worden ist wurden durch Dialyse einer Lipid-Proteinmischung hergestellt und hatten ein Messfenster von 2,84. Das Messfenster der extrudierten Proteoliposomen ist somit bei beiden Präparationen höher als bei der Ursprungspräparation. Bei der Rekonstitution von P-Gp in extrudierte Liposomen behält das P-Gp also zu 100% seine Ursprungsaktivität. Die stimulierte und basale spezifische Aktivität der beiden Präparationen ist allerdings verglichen mit der Ursprungspräparation um den Faktor zwei geringer, obwohl mehr als 90 % der ATP Bindungsstellen der Präp. #1 und Präp #2 nach außen ausgerichtet sind (bestimmt durch CHAPS Assay). Bei der Ursprungspräparation (Präparation #1 aus Tabelle 3-6) sind allerdings nur 50,2% der ATP-Bindungsstellen nach außen gerichtet und haben eine Aktivität von 1,42 U/mg. Eine mögliche Erklärung für die Differenz der spezifischen Aktivität ist, dass die Proteoliposomen aus zwei unterschiedlichen Lipidmischungen bestehen. Wie in Kapitel 3.1.5.1 gezeigt werden konnte ist die spezifische Aktivität von rekonstituierten P-Gp auch stark von der Lipidzusammensetzung abhängig. Eine Vergleichbarkeit der spezifischen Aktivität der Ursprungspräparation und der beiden Präparation mit extrudierten Liposomen ist deshalb auf der Basis der spezifischen Aktivitäten nicht möglich. Das Verhältnis zwischen basaler und stimulierter Aktivität, das Ratio, ermöglicht eine Vergleichbarkeit zwischen zwei Präparationen mit unterschiedlichen Liposomenzusammensetzungen. Bei der extrudierten Präparation ist das Ratio mit 3,0 bzw. 3,82 höher als das der Ursprungspräparation mit 2,82.

Dies zeigt, dass das erhaltene P-Gp in den extrudierten Proteoliposomen zu 100 % aktiv ist.

Die Elektronenmikroskopie mit 17000-facher Vergrößerung zeigt, dass es sich bei den extrudierten Liposomen tatsächlich um Unilamellare handelt (Abbildung siehe Anhang).

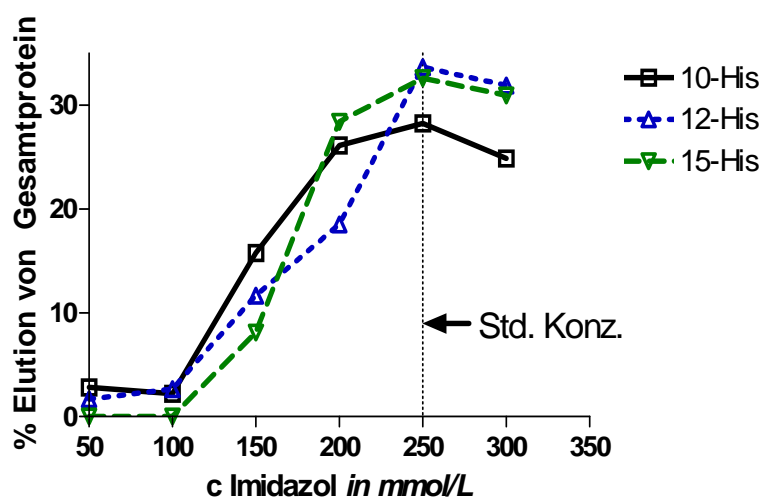
Die Untersuchungen in diesem Kapitel konnten zeigen, dass das P-Gp auch in extrudierten Liposomen der Zusammensetzung PC/PA/Ch unter Beibehaltung seiner Aktivität, rekonstituiert werden kann. Die extrudierten Proteoliposomen sind von Vorteil, wenn Untersuchungen mit reproduzierbaren Liposomeneigenschaften vorgenommen werden sollen.

#### 3.1.6.1 Aufreinigung von P-Gp mit 12- und 15-facher Histidin-Markierung

Die Ausbeute von P-Gp aus den Membranen mit dem etablierten Aufreinigungssystem ist, gemessen an der theoretisch erzielbaren Ausbeute, gering. In den *BJ5457 RAF13*-Membranen befindet sich durchschnittlich 4% P-Gp. Die theoretisch erzielbare Ausbeute bei einem Aufreinigungsansatz mit 720 mg Membranen wäre somit 28,8 mg, allerdings werden in der Praxis maximal 2 mg homogenes P-Gp erhalten, wie die vorherigen Kapitel zeigen. Das folgende Kapitel beschäftigt sich mit der Optimierung der Aufreinigung mit dem Ziel der Verminderung der Differenz zwischen praktischer und theoretischer Ausbeute.

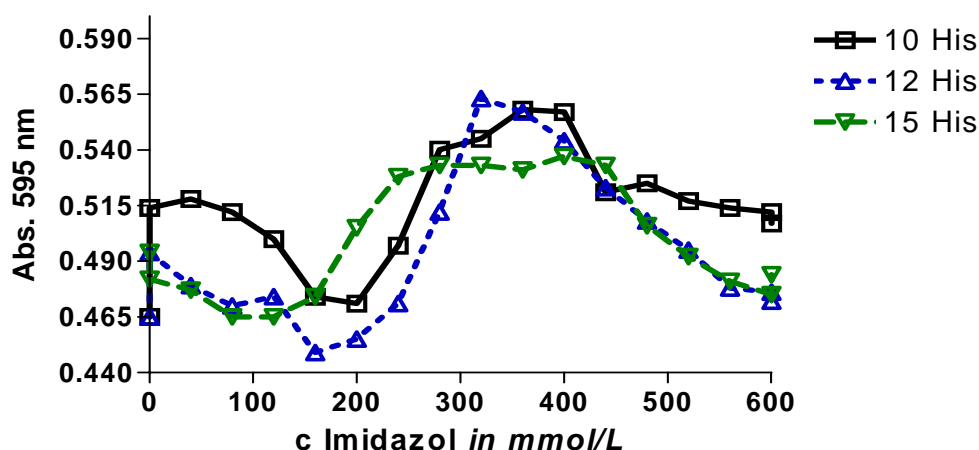
Das Protein wird durch Metall-Affinitätschromatographie (Nickel) aufgereinigt. Das immobilisierte Nickel bildet einen Komplex mit den am C-Terminus angefügten Histidin-Markierungen von P-Gp. Zur Bindung müssen mindestens zwei Histidine zur Verfügung stehen. Allgemein gilt: Je weniger Histidine zur Bindung zur Verfügung stehen (z.B. aufgrund der Tertiärstruktur), desto schwächer ist die Bindung an die Nickel-Beads. Es wurde deshalb versucht durch verlängerte Histidin-Markierungen dem P-Gp eine höhere Affinität zu Nickel zu verleihen.

Die Membran-Präparationen *BJMC* #3 und #4 (siehe Kapitel 3.1.4) dienen dem Nachweis der erfolgreichen Expression von P-Gp mit 12- und 15-facher Histidin-Markierung. Die Expression des Proteins wurde durch Western-Blot nachgewiesen (siehe Anhang). Die Membranen zeigten sogar eine höhere Expressionsrate als die Membranen mit zehnfach Histidin markiertem P-Gp. Um auf eine eventuelle Affinitätserhöhung zu testen wurden Membranpräparationen die 10-, 12- und 15-fach Histidin markiertes P-Gp enthielten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Imidazol eluiert.



**Abbildung 3-11.** Schritt-Gradienten Elution von P-Gp mit 10-, 12- und 15-His mit 50 mmol/L Imidazol bis 300 mmol/L Imidazol. 8 mg Membranen wurden mit 1,5 % LPC bei 4°C 20 Minuten solubilisiert und an 0,5 mL Nickel-Beads-Säulenmaterial gebunden. Das Protein wurde schrittweise mit 0,5 mL Elutions-Puffer mit aufsteigender Imidazol-Konzentration eluiert. Der P-Gp Gehalt der Fraktionen wurde durch semi-quantitativem Western-Blot bestimmt.

Die Abbildung 3-11 zeigt die Schritt-Gradienten Elution von unterschiedlich markiertem P-Gp. Das Maximum der Elution der drei P-Gp Varianten lag bei allen Präparationen bei 250 mmol/L Imidazol. Die Elution von P-Gp beginnt bei allen mit 150 mol/L Imidazol. Hervorzuheben ist, dass bei dem 15-fach Histidin markierten P-Gp bei 150 mol/L Imidazol im Verhältnis weniger P-Gp eluiert wird, als bei dem mit 10- und 12-Histidinen markierten P-Gp. Dies deutet auf eine erhöhte Kooperativität zwischen Nickel und den 15 Histidinen hin. Der Versuchsansatz wurde zu Stärkung der These mit einer linearen Gradientenelution wiederholt.



**Abbildung 3-12.** Lineare Gradientenelution 0-600 mmol/L Imidazol mit 0,4mL/min Flussrate. 72 mg Membranen wurden mit 1,5 % LPC bei 4°C, 20 Minuten solubilisiert und an 2 mL Nickel-Beads-Säulenmaterial gebunden. Nach dem Waschen der Säule mit 50 mmol/L Imidazol pH 8,0 (Flussrate 0,4mL/min) für 90 Minuten wurde mit einer Flussrate von 0,4 mL/min für 37,5 Minuten über 0-600 mmol/L Imidazol pH 7,4 eluiert. Fraktionen wurden alle 2,5 min gesammelt. Zur Proteinbestimmung wurde zu 50 µL Probe 1 mL Bradford Reagenz gegeben. Der Wasch und Elutionspuffer enthielt keine Lipide.

Die Abbildung 3-12 zeigt, dass auch in diesem Versuchsaufbau das 15fach markierte P-Gp über einen größeren Bereich (150 – 500 mmol/L Imidazol) als die beiden anderen eluiert. In der obigen Abbildung beginnt die Elution des 15-fach Histidin markierten P-Gp zwar früher, sie zeigt aber bei ca. 400 mmol/L auch das späteste Maximum. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Nickel-Beads durch die erhöhte Affinität bereits mit P-Gp überladen sind und es hierdurch zu einer vorzeitigen Elution von P-Gp kommt.

Da das 15fach markierte P-Gp in diesen Versuchen die stärkste Affinität zu Nickel zeigte, wurde versucht es zu rekonstituieren.

**3.1.6.2 Aufreinigung und Rekonstitution des 15fach Histidin markierten P-Gp**  
Die Aufreinigung von 80 mg Membranen mit 15-Histidin markiertem P-Gp erfolgte mit 1,5 % LPC. Eluiert wurde mit 300 mmol/L Imidazol in Tris-Puffer; pH 7,4, da nach Abbildung 3-12 bei dieser Konzentration die Elution von P-Gp am höchsten war. Die Rekonstitution erfolgte in 0,1% *E. coli* gemischten



Lipiden (Zusammensetzung siehe Tabelle 3-7). In Tabelle 3-11 sind die Eigenschaften dieser Präparation zusammengefasst.

**Tabelle 3-11.** Die Proteinkonzentration wurde durch Amido-Black-Assay ermittelt. Die Reinheit wurde auf einem 4-12% Bis-Tris Fertiggel bestimmt. Die Aktivität ( $\mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) beschreibt die Hydrolyse von ATP in Abwesenheit von Modulatoren (basale) und in Anwesenheit von  $130 \mu\text{mol/L}$  Verapamil (stimuliert). Das Ratio ist das Verhältnis zwischen stimulierter und basaler Aktivität.

eingesetzte Membranmenge in mg	P-Gp-Konz. in mg/mL	Ausbeute in mg	Lipide in % (g/V)	Basal und stim. Aktivität in U/mg	Reinheit in %
Präp. 15His #1 80 mg (mit ~6% P-Gp)	0,45±0,03	0,12	0,1 gemischte Lipide aus <i>E. coli</i>	0,26±0,05 0,36±0,03 Ratio 1,37	96,1

Das aufgereinigte P-Gp zeigte nur eine geringe stimulierte spezifische Aktivität. Deswegen wurde der Ansatz zur Optimierung der Aufreinigung durch Erweiterung der Histidin- Markierung nicht weiter verfolgt.

### 3.1.7 Solubilisierung mit Taurodeoxycholsäure

Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der Ausbeute besteht in einer Veränderung des Solubilisationsprozesses. Vorversuche haben gezeigt, dass neben dem standardmäßig verwendeten LPC auch Taurodeoxycholsäure (TDOC) in der Lage ist, Hefemembranen zu solubilisieren. Die stimulierte spezifische ATPase Aktivität von TDOC solubiliertem P-Gp beträgt nur 60-70% verglichen mit einer LPC Aufreinigung (siehe Tabelle 3-12). In der Literatur ist angegeben, dass P-Gp nur seine Aktivität behält, wenn es während des gesamten Aufreinigungsprozesses von einer bestehenden Lipid-Schutzschicht umgeben ist [14]. Das Detergenz Lysophosphatidylcholin gehört ebenfalls zur Gruppe der Phosphatidylcholine und könnte deshalb eine zusätzliche Funktion als Schutzlipid ausüben, welches die hohe Aktivität von LPC solubiliertem P-Gp erklären würde. Hieraus entstand die Idee einen mizelläreren Komplex aus TDOC und PC, als Detergenz einzusetzen. Phosphatidylcholin bildet physiologisch einen Komplex mit Gallensäuren und

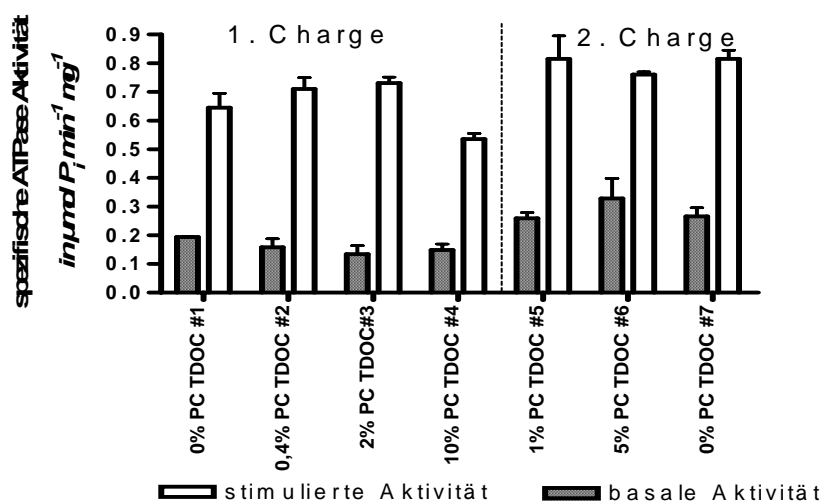
TDOC gehört zur Gruppe der Gallensäuren [105]. Die an P-Gp gebundenen Membranlipide tragen unter anderem zur Beibehaltung der Aktivität von P-Gp über den gesamten Aufreinigungsprozess bei. Die CMC (kritische Mizellkonzentration) von TDOC liegt laut Fa. Sigma bei 1- 4 mmol/L. Daher wurde, um das P-Gp aus der Membran zu lösen, TDOC mit einer Konzentration von 38 mmol/L (entspricht einer Konzentration von 2,0 % g/V) im Solubilisationspuffer verwendet. Diese Konzentration zeigte sich in Vorversuchen (durchgeführt von Hiroshi Omote, Charlottesville) als sehr effektiv um Hefemembranen zu solubilisieren. Nur litt wie oben schon beschrieben die Aktivität des P-Gp. Die Rekonstitution erfolgte durch Dialyse mit 0,1% gemischten Lipiden aus *E. coli* (g/V) im Elutionspuffer. Ohne PC Zusatz sind die stimulierten spezifischen ATPase Aktivitäten der TDOC Aufreinigungen signifikant ( $p < 0,001$ ) niedriger als die der Aufreinigungen mit LPC als Detergenz (siehe Tabelle 3-6 Präp #1).

Es wurde versucht die Hefemembranen mit einem TDOC-PC Komplex zu solubilisieren, um die Aktivität zu erhalten und um das optimale Verhältnis zwischen TDOC und PC zu bestimmen. Da die Experimente mit zwei Chargen durchgeführt wurden, diente als Kontrolle jeweils eine Aufreinigung ohne Zusatz von PC. Bei jeder Aufreinigung wurde 72 mg Hefemembran aus derselben Membranpräparation eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 3-12 und in der Abbildung 3-13 aufgeführt.

**Tabelle 3-12.** Charakteristika der Präparationen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Phosphatidylcholin (PC) zur Bildung des TDOC-PC Komplexes. Die Aufreinigung erfolgte in zwei Chargen (0,4%, 2%, 10% PC und 0%, 1% und 10% PC). Als Kontrollprobe diente in beiden Chargen eine Aufreinigung ohne PC. Es wurden 72 mg Hefemembranen aus dem Stamm BJ5457 als Ausgangsmaterial eingesetzt. Die Hefemembranpräparation stammt aus einem Wachstum von Dannon M. Smith mit dem Code 2/4/03. Die Proteinkonzentration wurde mit dem Amido-Black-Assay in Triplikaten bestimmt. Die Aktivität wurde in drei unabhängigen Experimenten ermittelt. Die Ausrichtung der ATP-Bindungsstelle in den Liposomen wurde mit dem CHAPS-Assay bestimmt. Die Ausrichtung der Nukleotid-Bindungsstellen der Präp. #1, 2 und 3 sind Daten aus Versuchen durchgeführt von Dannon Mills Smith, Charlottesville.

Aufreinigung PC-Anteil in %	Menge P-Gp / Menge Membran in µg/mg	P-Gp Konzentration in mg/mL	Ausbeute Protein in µg	Basal und stim. Aktivität In (U/mg)	Ausrichtung ATP- Bindungsstelle in % nach außen
TDOC#1 0% PC	1,69	0,58±0,03	122,0	0,19±0,00 0,65±0,05 Ratio 3,32	60,4 <sup>a</sup>
TDOC #3 0,4% PC	0,99	0,40±0,05	71,28	0,16±0,02 0,71±0,04 Ratio 4,49	75,3 <sup>a</sup>
TDOC #2 2% PC	1,54	0,41±0,01	110,7	0,13±0,03 0,73±0,02 Ratio 5,5	72,4 <sup>a</sup>
TDOC #4 10,0% PC	1,60	0,41±0,01	115,0	0,15±0,02 0,54±0,02 Ratio 3,59	70,2
TDOC #5 1% PC	4,05	0,39±0,03	291,9	0,26±0,02 0,82±0,08 Ratio 3,14	72,7
TDOC #6 5% PC	3,06	0,63±0,01	220,0	0,33±0,07 0,76±0,01 Ratio 2,32	80,1
TDOC #7 0% PC	2,18	0,36±0,01	156,9	0,27±0,03 0,82±0,03 Ratio 3,1	62,7

<sup>a</sup>Die Spalte 2 ist ein Maß für die Ausbeute von P-Gp pro eingesetzte Menge an Hefemembran



**Abbildung 3-13.** Die in Tabelle 3-12 dargestellten Ergebnisse der Aktivität von P-Gp sind hier graphisch dargestellt. Der ungepaarte t-Test (95% Konfidenzintervall) der stimulierten Aktivität der jeweiligen Kontrollaufreinigung (#1 und #7) mit den Proben ergab nur für die 5% und 10% PC einen signifikanten Unterschied.

Der TDOC-PC Komplex ist zwar in der Lage die Hefemembranen zu solubilisieren, er lieferte aber leider kein 100%iges aktives P-Gp. Der Zusatz von PC zum Solubilisierungspuffer zeigt entgegen den Erwartungen keinen positiven Einfluss auf die Aktivität des Produktes. Für die Präparation mit 2% TDOC-5% PC und 2% TDOC-10% PC war die stimulierte Aktivität sogar signifikant geringer, als bei der jeweiligen Kontrollaufreinigung. Das mit TDOC bzw. TDOC-PC solubilierte P-Gp besitzt ein Messfenster von Faktor 3,1 bis Faktor 5,5 (siehe Tabelle 3-12). Die Präparationen mit 0,4% und 2% Phosphatidylcholin-Anteil besitzen mit dem Faktor 4,49 bzw. 5,5 das größte Messfenster. Allerdings haben alle Präparationen ein akzeptables Messfensters und könnten somit zur Bestimmung des  $K_m$ -Wertes von Modulatoren sehr gut verwendet werden. Die stimulierte spezifische Aktivität der TDOC-PC erreichte aber in keiner Kombination die Höhe einer LPC-Aufreinigung und die Ausbeute war auch nicht höher als bei der bereits etablierten Standard-Prozedur. Der Zusatz von PC zum Detergenz scheint allerdings einen positiven Einfluss auf die Rekonstitutionseffizienz der Aufreinigung zu haben, denn bei der TDOC Präparation #3 ist die Ausbeute am geringsten und die Konzentration von PC am niedrigsten.

### 3.1.8 Entwicklung eines neuen Expressionssystems

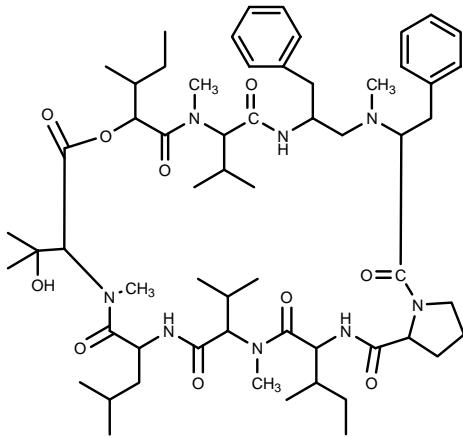
Die vorangegangenen Versuche zur Optimierung des bestehenden Expressionssystems *BJ5457 RAF13* lieferten hinsichtlich der Ausbeute leider nicht die gewünschten Ergebnisse. Es konnte aber ein kostengünstiges Detergenz, eine neue chemisch definierte Lipidzusammensetzung und die Rekonstitution in vorgefertigte Liposomen für dieses Expressionssystem erfolgreich umgesetzt werden.

Für weiterführende Studien die neue Erkenntnisgewinne bezüglich der Funktionsweise von P-Gp liefern sollten, wie z. B. Photolabeling oder Kristallisation, wurde versucht einen neuen Hefestamm der P-Gp überexprimiert mit dem Ziel einer höheren Ausbeute pro Präparation bei minimalen Kosten zu etablieren. Die Auswahl des neuen Stammes als P-Gp Expressionsorganismus beruht auf der grundlegenden Idee, dass ein Hauptbestandteil der Hefemembran Ergosterol ist. Ergosterol verleiht den Membranen eine gewisse Resistenz gegenüber Detergenzien, welche auf der erhöhten molekularen Ordnung der Membran beruht. Die ausgewählten Stämme LPY11 und LPY27 sind Ergosterol defizient und könnten daher eventuell leichter solubilisiert werden. In die beiden Stämme wurde das Expressionsplasmid pYEplac195MDR1His und als Kontrolle das Leer-Plasmid pYEplac195 (siehe Tabelle 3-2) eingefügt.

#### 3.1.8.1 Test auf funktionelle Expression

Die eigenen Untersuchungen haben einen Einfluss der Liposomen-Membranzusammensetzung auf die ATPase-Funktion von P-Gp gezeigt. Da die Membranzusammensetzung der verwendeten Hefen entartet ist, musste zuerst gezeigt werden, dass das humane P-Gp in den Ergosterol defizienten Stämmen funktionell exprimiert und korrekt in die Membran der mutierten Stämme eingebaut wird. Hierzu wurden Hefezellen auf Agar-SD-Medium mit Aureobasidin A zur Selektion gezüchtet. *Kino et al.* zeigten, dass Aureobasidin A ein sehr potentes Fungizid und auch ein hochaffines Substrat von P-Gp ist [53]. Die Abbildung 3-14 zeigt die zyklische Peptid-Struktur von Aureobasidin. In Gegenwart von Aureobasidin im Nährmedium

könnten somit nur Hefezellen wachsen die P-Gp exprimieren. Deshalb wurden die Ergosterol-Mutanten mit dem Plasmid für humanes P-Gp in Gegenwart von 0,2 µg/mL und 0,5 µg/mL Aureobasidin A enthaltenden SD-Agar gezüchtet.



**Abbildung 3-14.** Struktur des zyklischen Depsipeptids Aureobasidin A.

Das Wachstum der Stämme wurde über einen Zeitraum von acht Tagen im Brutschrank bei 30°C beobachtet. Als Kontrolle dienten die nicht-transformierten Stämme und die Stämme mit dem Leer-Plasmid YEplac195.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 3-13.** Tabellarische Übersicht des Wachstums in Anwesenheit von 0; 0,2; 0,5 µg/ml Aureobasidin A. Zufällig wurden mehrere Kolonien aus jeder Transformation zur Kultivierung ausgewählt. Die Klone wurden zuvor im entsprechenden SD-Medium im 200 mL Erlenmeyerkolben bis zu einer  $OD_{600nm}$  1,0 kultiviert. 10 µL der Zellsuspension wurden mit einer Impföse auf Agarplatten ausgestrichen. Die Kolonien wurden gezählt: - kein Wachstum; -/+ 1 Kolonie; + 2-4 Kolonien; ++ ≥ 5 Kolonien; +++ ≥ 10 Kolonien.

<b>0 µg/mL Aureobasidin SD-Agar-Platte; SD-Ura; -His</b>													
Stamm	Tag→	1	2	3	4	8	Stamm↓	Tag→	1	2	3	4	8
LPY 27 nicht transformiert		-	-	-	-	-	LPY 11 Leervektor		+	++	+++	+++	+++
LPY 11 nicht transformiert		-	-	-	-	-/+	LPY 11 nicht transformiert		-	-	-	-	-
JS 6 Leervektor		+	++	++	+++	+++	JS 6 ERG6 46 Klon 3	RAF	+	++	+++	+++	+++
JS 3 Leervektor		+	++	++	+++	+++	JS 6 ERG6 46 Klon 4	RAF	+	++	+++	+++	+++
JS 3 ERG2-4 RAF46 Klon 1		-/+	++	++	+++	+++	JS 6 ERG6 46 Klon 5	RAF	+	++	+++	+++	+++
JS 3 ERG2-4 RAF46 Klon 2		-/+	+	+	++	+++	JS 6 ERG6 46 Klon 6	RAF	+	++	+++	+++	+++
JS 6 ERG6 RAF46 Klon 1		+	++	+++	+++	+++	JS 6 ERG6 46 Klon 7	RAF	+	++	+++	+++	+++
JS 6 ERG6 RAF46 Klon 2		+	++	+++	+++	+++	JS 6 ERG6 46 Klon 8	RAF	+	++	+++	+++	+++

<b>0,2 µg/mL Aureobasidin SD-Agar-Platte; SD-Ura; -His</b>													
Stamm↓	Tag→	1	2	3	4	8	Stamm↓	Tag→	1	2	3	4	8
LPY 27 nicht transformiert		-	-	-	-	-	LPY 11 Leervektor		-	-	-	-	-
LPY 11 nicht transformiert		-	-	-	-	-	LPY 11 nicht transformiert		-	-	-	-	-
JS 6 Leervektor		-	-	-	-	-	JS 6 ERG6 RAF 46 Klon 3		+	++	+++	+++	+++
JS 3 Leervektor		-	-	-/+	+	+	JS 6 ERG6 RAF 46 Klon 4		+	++	+++	+++	+++
JS 3 ERG2-4 RAF46 Klon 1		-/+	+	++	+++	+++	JS 6 ERG6 RAF 46 Klon 5		+	++	+++	+++	+++
JS 3 ERG2-4 RAF46 Klon 2		-/+	+	++	+++	+++	JS 6 ERG6 RAF 46 Klon 6		-/+	+	++	+++	+++
JS 6 ERG6 RAF46 Klon 1		-	-	+	+	++	JS 6 ERG6 RAF 46 Klon 7		+	++	+++	+++	+++
JS 6 ERG6 RAF46 Klon 2		+	++	++	+++	+++	JS 6 ERG6 RAF 46 Klon 8		-/+	+	++	+++	+++

0,5 µg/mL Aureobasidin SD-Agar-Platte; SD-Ura; -His													
Stamm↓	Tag→	1	2	3	4	8	Stamm↓	Tag→	1	2	3	4	8
LPY 27 nicht transformiert		-	-	-	-	-	LPY 11 Leervektor		-	-	-	-	-
LPY 11 nicht transformiert		-	-	-	-	-	LPY 11 nicht transformiert		-	-	-	-	-
JS 6 Leervektor		-	-	-	-	-	JS 6 ERG6 46 Klon 3	RAF	-/+	++	++	++	+++
JS 3 Leervektor		-	-	-	-	-	JS 6 ERG6 46 Klon 4	RAF	-/+	+	+	+	++
JS 3 ERG2-4 RAF46 Klon 1		-	-	-/+	+	++	JS 6 ERG6 46 Klon 5	RAF	+	++	++	++	+++
JS 3 ERG2-4 RAF46 Klon 2		-	-	-	-	+	JS 6 ERG6 46 Klon 6	RAF	-/+	+	+	++	+++
JS 6 ERG6 RAF46 Klon 1		-	-	-	-	-	JS 6 ERG6 46 Klon 7	RAF	-	-/+	+	++	++
JS 6 ERG6 RAF46 Klon 2		-	-/+	+	++	+++	JS 6 ERG6 46 Klon 8	RAF	-	-/+	+	++	+++

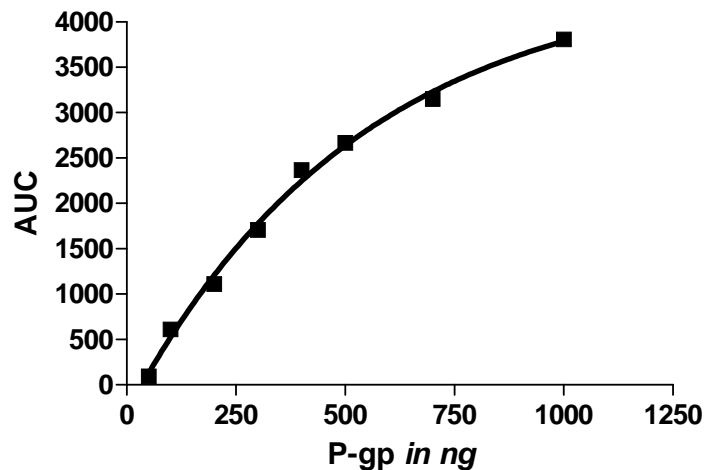
Die jeweiligen nicht transformierten Kontrollstämme konnten wie erwartet auf keiner der Agar-Platten wachsen, da ihnen der notwendige auxotrophe Marker Uracil fehlt. Die beiden Kontrollen mit dem Leerplasmid YEplac 195, die kein P-Gp codieren, konnten nur in Abwesenheit von Aureobasidin A auf dem Minimalmedium wachsen. Die Tabelle 3-13 zeigt, dass die mit dem P-Gp kodierenden Plasmid RAF46 transformierten Stämme in Gegenwart von 0,2 bzw. 0,5 µg/mL Aureobasidin A wachsen. Es konnte aber zwischen den P-Gp exprimierenden Klonen Unterschiede im Wachstumsverhalten beobachtet werden. Dies deutet auf einen individuellen Expressionslevel von P-Gp der Klone hin. Dieser Versuch zeigte, dass das humane P-Gp in den Ergosterol defizienten Stämmen funktionsfähig exprimiert wird.

### 3.1.8.2 Bestimmung des Expressionslevels in den Membranen

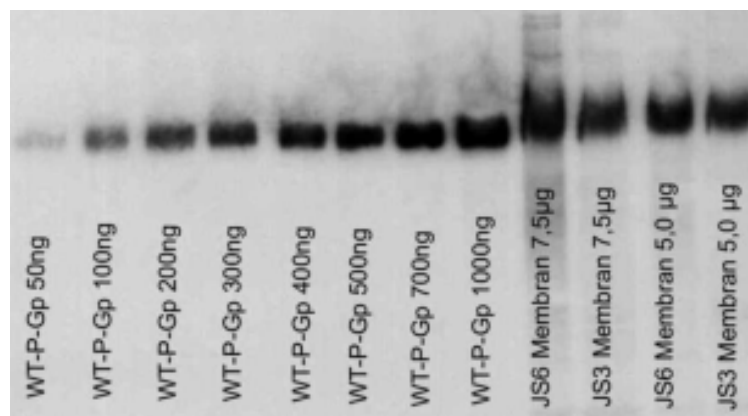
Die Membranen der Ergosteroldefizienten Stämme wurden gemäß dem in Kapitel 2.4.6 beschriebenen Protokoll aus Hefezellen gewonnen. Hierdurch sollte die Expressionsrate in den Membranen bestimmt werden und indirekt nachgewiesen werden, dass das P-Gp vom Endoplasmatischen Retikulum in



die Zellmembran transportiert und eingebaut wird. Als Standard diente homogenes P-Gp aus dem Stamm *BJ5457 RAF13*. Die Kalibrierung erfolgte durch Bestimmung der AUC der Banden der P-Gp Standards. Die Abbildung 3-15 zeigt die Kalibrierkurve des Western Blots.



**Abbildung 3-15.** Kalibrierkurve des semiquantitativen Western-Blots. Die Ordinate zeigt die Fläche unter der Kurve der P-Gp Peaks. Die Abszisse zeigt die Menge von homogenen P-Gp.



**Abbildung 3-16.** Western-Blot mit Standard-P-Gp aus *BJ5457 RAF13* und Hefemembranen der Ergosterol defizienten Stämme *JS6 ERG6 RAF46* und *JS3ERG2-4 RAF46*. 1. Antikörper: Signet C219 anti-P-Gp 2. Antikörper: anti Maus Peroxidase Konjugat.

Die Membranen haben einen sehr hohen P-Gp Gehalt. Die Expressionsrate für *JS3 ERG2-4 RAF46* und *JS6 ERG6 RAF46* beträgt  $8,16 \pm 2,09\%$  bzw.  $14,70 \pm 1,23\%$ . Dies ist für heterolog exprimiertes P-Gp bisher der höchste Wert. Wie die Abbildung 3-16 zeigt, ist das Molekulargewicht des P-Gp in

den Ergosterol defizienten Stämmen etwas höher ist als das des Referenz P-Gp aus dem *BJ5457 RAF13* Stamm. Dies kann auf einem anderen Glykosilierungsprofil der defizienten Stämme beruhen oder aufgrund des sehr hohen Expressionslevel könnte das P-Gp bereits ubiquitinyliert sein. Deshalb mussten die Membranen auf Ubiquitinylierung überprüft werden. Die Nitrocellulose Membran aus Abbildung 3-16, die zur Bestimmung des P-Gp Expressionslevels diente, wurde auf das Protein Ubiquitin untersucht.

Mit dem Anti-Ubiquitin U5379 Antikörper (Fa. Sigma) konnte keine Ubiquitinierung des exprimierten P-Gp entdeckt werden. Daher wird das höhere Molekulargewicht auf ein etwas anderes Glykosilierungsprofil, als es das P-Gp aus dem *BJ5457 RAF13* Stamm besitzt, beruhen.

#### 3.1.8.3 Aufreinigung und Rekonstitution

Die am besten solubilisierenden Detergenzien für die Membranen der *JS3* und *JS6* Stämme wurden empirisch ermittelt. Es wurden die Detergenzien TDOC, OG, DM und DDM verwendet, da diese bereits in der Literatur zur Solubilisierung von P-Gp eingesetzt wurden.

Sie wurden in Abhängigkeit von ihrer kritischen Mizellbildungskonzentration in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Das Standard Detergenz LPC solubilisierete die *JS6 ERG 6* Membran zu  $60,5 \pm 7,6\%$  ( $n = 4$ ), die *JS3 ERG2-4* Membranen zu  $67,7 \pm 5,1\%$  ( $n = 4$ ).

**Tabelle 3-14.** Solubilisierung von Hefepiasmamembranen. Die Tabelle zeigt die Solubilisierung von P-Gp aus Plasmamembranen in %. Die Detergenzien wurden in den oben aufgeführten Konzentrationen zu 2 mg Membran in 1,00 mL Solubilisierungspuffer gegeben. Nach 20 Minuten wurden die nicht solubilisierten Membranbestandteile durch Zentrifugation (100000g, 1 Stunde) sedimentiert. Das Pellet wurde in 1,00 mL STOP-Puffer gelöst. Die Bestimmung der Solubilisierungsrate von P-Gp erfolgte durch quantitativen Western-Blot. Als Kontrolle diente Hefemembran ohne Detergenz.

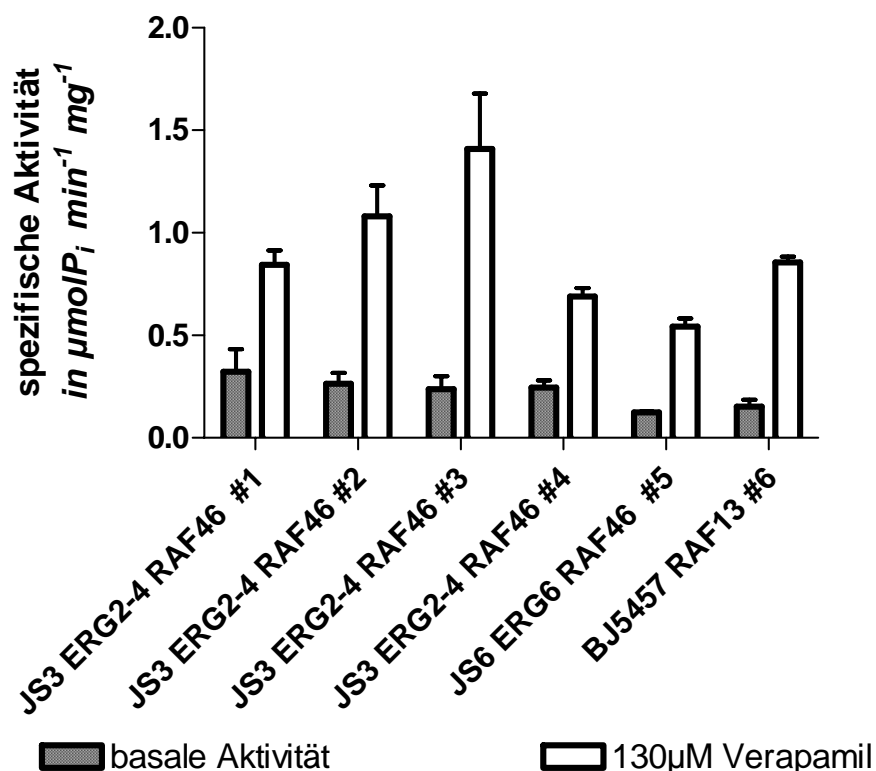
	OG (%(w/v) )					DDM (%(w/v) )				
	1,00	1,50	2,00	2,50	3,00	0,50	1,00	1,50	2,00	2,50
<b>JS6 ERG6</b>	30,6	55,2	50,2	52,3	65,3	63,3	67,1	64,0	68,6	65,2
<b>JS3 ERG2-4</b>	36,2	43,8	37,8	40,9	52,6	45,2	48,3	59,2	71,2	36,7

	DM (%(w/v) )					TDOC (%(w/v) )				
	0,50	1,00	1,50	2,00	2,50	0,50	1,00	1,50	2,00	2,50
<b>JS6 ERG6</b>	44,8	72,1	50,0	44,6	65,0	42,6	52,7	48,7	67,5	79,7
<b>JS3 ERG2-4</b>	55,4	36,2	39,7	38,5	41,3	36,2	50,6	53,2	43,9	53,5

Die Tabelle 3-14 zeigt, dass alle Detergenzien in der Lage waren P-Gp aus den Membranen in Lösung zu bringen. Das Detergenz Octylglucosid (OG) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Konzentrationen 1,5% und 2,5%. Für die weiteren Aufreinigungsversuche wurde daher der Mittelwert von 2,0% OG verwendet, da eventuell eine zu hohe Konzentration an OG die Aktivität von P-Gp durch eventuelle Denaturierung mindern könnte. Das Detergenz TDOC wurde auch zur Solubilisierung in einer Konzentration von 2,0% eingesetzt, da es bereits in den vorhergehenden Versuchen mit dem *BJ5457 RAF13* verwendet worden war. Die Aufreinigung erfolgte nach Standardprotokoll. Betrachtet man die Tabelle 3-14 dann ist zu erkennen, dass das Detergenz DDM die Hefemembranen der beiden Stämme am effektivsten Solubilisiert. Leider ist das Detergenz DDM wie das bisher verwendete LPC sehr teuer und es gibt keine Berichte, dass dieses Detergenz zur Aufreinigung von P-Gp eingesetzt worden ist. Da aber OG bereits zur Solubilisierung von CHO-P-Gp erfolgreich eingesetzt worden ist, wurde es zur Solubilisierung der Membranen verwendet [3]. Es ist im Vergleich zu DDM auch wesentlich kostengünstiger. Alle Aufreinigungen resultierten in aktivem P-Gp, wie der Tabelle 3-15 zu entnehmen ist. Da das P-Gp rekonstituiert in die Lipidkomposition aus PC/PA/Ch eine niedrigere basale Aktivität und somit ein hohes Messsfenster aufweist, wurde diese

Lipidzusammensetzung gewählt. Um die spezifischen Aktivitäten der Präparationen aus diesen neuen Stämmen mit denen die aus dem *BJ5457 RAF13* Stamm gewonnen vergleichen zu können wurde eine Präparation aus *BJ5457 RAF13* Membranen mit 1,5% LPC solubilisiert und in der gleichen Lipidzusammensetzung rekonstituiert.



**Abbildung 3-17.** *P-Gp* Aufreinigungen aus den Ergosterol defizienten Stämmen. Gegenübergestellt ist die basale und Verapamil stimulierte ATPase Aktivität (U/mg). Die ATPase Aktivitäten wurden in Triplikaten bestimmt. Die Ordinate zeigt die spezifische Aktivität ( $\mu\text{mol P}_i \text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ).

Die Abbildung 3-17 zeigt die Aktivität von P-Gp aus den Ergosteroldefizienten Stämmen. Das Messfenster (Ratio) der Präparationen untereinander schwankt zwischen 2,62 und 5,92. Das höchste Messfenster mit 5,92 hat die Präparation #3 aus dem Stamm *JS3 ERG2-4* und ist somit höher als die Kontrollaufreinigung aus dem *BJ5457 RAF13* Stamm. Alle weiteren Charakteristika der Präparationen sind der Tabelle 3-15 zu entnehmen.

**Tabelle 3-15.** Charakteristika der P-Gp-Präparationen aus den Ergosteroldefizienten Stämmen und als Vergleich aus dem BJ5457 RAF13 Stamm. Die Identität von P-Gp wurde durch Western-Blot mit dem Antikörper Anti-P-Gp nachgewiesen. Die Konzentration wurde mit dem Amido-Black Protein Assay in Triplikaten bestimmt. Bei den Präparationen #3 und #4 wurde zum Solubilisierungspuffer 0,1% PC als Schutzlipid zugesetzt. Die basale und stimulierte ATPase Aktivität wurde in Abwesenheit bzw. Gegenwart von 130 µmol/L Verapamil in Triplikaten bestimmt.

Stamm eingesetzte Membran in mg	Ausbeute in µg	Protein- konz. in mg/mL	Detergenz und Lipid- konz. in %	ATP- Bindungs- stelle nach außen in %	Basal und stim. Aktivität in (U/mg)	Reinheit in %
JS3 ERG2-4#1 100,0	308	0,44±0,03	2,0 TDOC 0,1	66	0,32±0,19 0,84±0,07 Ratio 2,62	>90,0
JS3 ERG2-4#2 80,0	238	0,28±0,01	2,0 OG 0,1	n.b.	0,27±0,09 1,08±0,15 Ratio 4,08	89,6
JS3 ERG2-4#3 80,0	221	0,28±0,01	2,0 OG 0,1	52	0,24±0,11 1,41±0,27 Ratio 5,92	>90,0
JS3 ERG2-4#4 240,0	505	0,50±0,02	2,0 OG 0,1	n.b.	0,25±0,06 0,69±0,04 Ratio 2,81	>95,0
JS6 ERG6#5 380,0	~1000	0,53±0,01	2,0 OG 0,4	55	0,12±0,01 0,54±0,04 Ratio 4,39	>90%
BJ5457 RAF13#6 240,0	334	0,23±0,02	1,5 LPC 0,4	49	0,15±0,06 0,86±0,03 Ratio 5,62	>95,0

Die Aktivitätsdaten der BJ5457 RAF13 Aufreinigung dienen als Referenzwerte. Die Präparation #3 und #2 zeigen die höchste spezifische ATPase Aktivität. Sie weisen auch im Vergleich mit der Kontroll-Präparation #6 kein signifikant unterschiedliches Messfenster auf. Die Präparationen liefern also zu 100% aktives P-Gp. Auch hinsichtlich der Ausbeute liefern die Ergosterol defizienten Stämme höhere Ausbeuten als die Präparation aus dem BJ5457 Stamm. Auffällig ist, dass die stimulierte Aktivität des Proteins aus dem BJ5457 Stamm nur halb so hoch ist wie in den vorherigen Aufreinigungen dieses Stammes (siehe Tabelle 3-6). Dies ist durch die verwendete neue Lipidmischung bei dieser Aufreinigung zu erklären. Der Einfluss der Lipidmischung auf die Aktivität ist bereits in Kapitel 3.1.5 untersucht worden.

Dies ist also ein weiterer Beweis für die Abhängigkeit der P-Gp Aktivität von den umgebenden Lipiden.

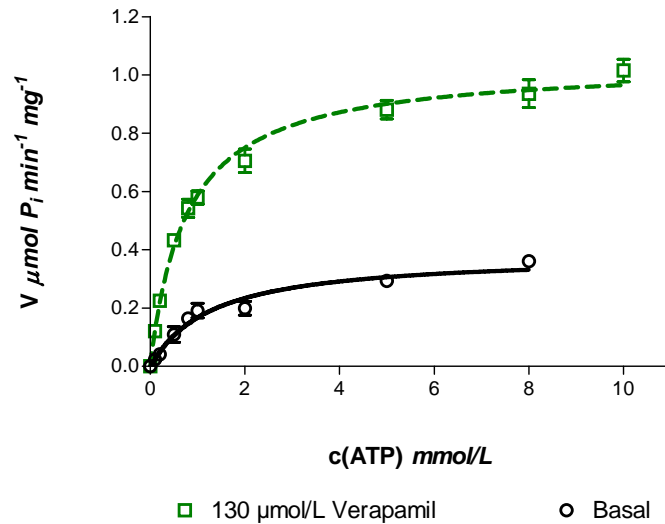
3.1.8.4 Charakterisierung des P-Gp aus den Ergosteroldefizienten Stämmen  
Der  $K_m$ -Wert von ATP wurde in Abwesenheit und Gegenwart von 130  $\mu\text{mol/L}$  Verapamil bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels nicht-linearer Regression und mittels der Lineweaver-Burk- und Eadie Hofstee-Transformation. In Tabelle 3-16 sind die  $K_m$ - und  $V_{\text{max}}$ -Werte in Gegenwart von 130  $\mu\text{mol/L}$  Verapamil für die beiden Ergosteroldefizienten Stämme zusammengefasst.

**Tabelle 3-16.**  $K_m$  und  $V_{\text{max}}$  Werte von ATP. Die in der Literatur angegebenen  $K_m$  Werte schwanken in Abhängigkeit von der Liposomenzusammensetzung. Der  $t$ -Test ergab keinen signifikanten Unterschied ( $P < 0,05$ ) zwischen den  $K_m$ -Werten der beiden Stämme.

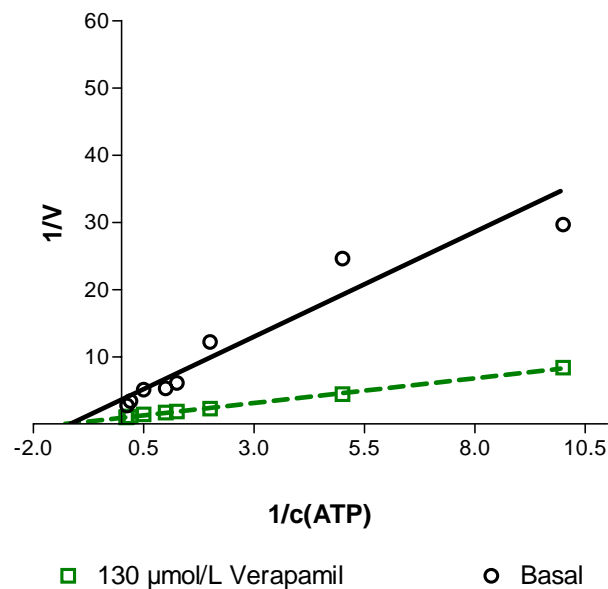
Gleichung	Parameter	JS3 ERG2-4 RAF46 (n=2)	JS6 ERG6 RAF46 (n=2)	Literatur $K_m$
Michaelis-Menten	$K_m$ mmol/L	0,771 $\pm$ 0,062	0,802 $\pm$ 0,147	0,5-1,0 [35]
	$V_{\text{max}}$ U/mg	1,039 $\pm$ 0,023	0,337 $\pm$ 0,018	
Lineweaver-Burk	$K_m$ mmol/L	0,772	0,835	
	$V_{\text{max}}$ U/mg	1,050	0,335	
Eadie-Hofstee	$K_m$ mmol/L	0,706	0,631	
	$V_{\text{max}}$ U/mg	1,058	0,357	

In Abwesenheit von Verapamil beträgt der  $K_m$ -Wert  $1,28 \pm 0,25$  mmol/L und  $V_{\text{max}}$  ist  $0,38 \pm 0,03$   $\mu\text{mol P}_i\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  für den JS3 ERG2-4 Stamm. Das P-Gp aus JS6 ERG6 weist im Gegensatz zu dem JS3 Stamm einen niedrigeren  $V_{\text{max}}$ -Wert auf. Da das P-Gp aus dem JS3 Stamm eine höhere spezifische Aktivität hat, wird dieser Stamm, der zu 100% aktives P-Gp liefert, für künftige Aufreinigungen verwendet. Die stimulierte ATPase Aktivität von P-Gp aus den beiden Stämmen ist gegenüber den sonstigen Aktivitätsdaten sehr niedrig, da diese Präparationen schon über mehrere Monate bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert worden sind. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen den Michaelis-

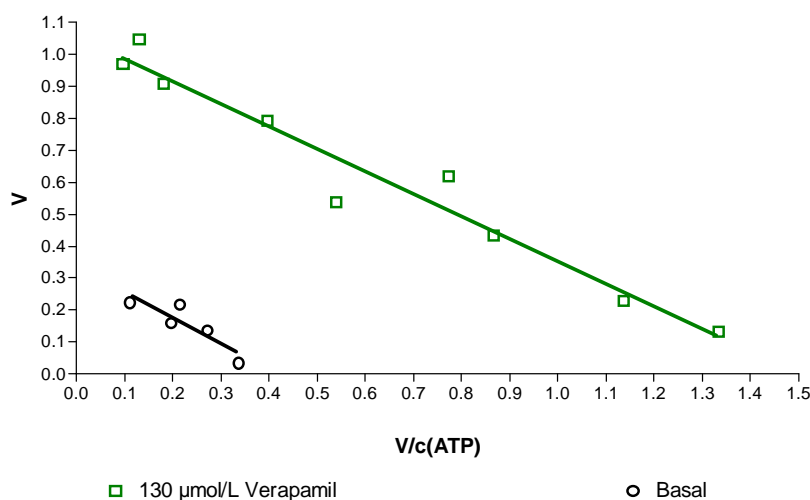
Menten-, Lineweaver-Burk- und Eadie-Hofstee-Plot der basalen und stimulierten ATPase Aktivität des JS3 ERG2-4 RAF46 Stamms.



**Abbildung 3-18.** Michaelis-Menten Plot von JS3 ERG2-4 RAF46 P-Gp. Der  $K_m$ -Wert für ATP ermittelt durch nicht-lineare Regression beträgt  $0,771 \pm 0,062$  mmol/L.  $V_{max}$  ist  $1,039 \pm 0,023$   $\mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  ( $n = 2$ ). In Abwesenheit von Verapamil beträgt der  $K_m$ -Wert  $1,28 \pm 0,25$  mmol/L und  $V_{max}$  ist  $0,38 \pm 0,03$   $\mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ .



**Abbildung 3-19.** Lineweaver-Burk Plot der ATPase Aktivität von JS3 ERG2-4 RAF46 P-Gp.  $K_m$  und  $V_{max}$  der stimulierten ATPase Aktivität sind der Tabelle 3-16 zu entnehmen. Der  $K_m$  und  $V_{max}$  der basalen ATPase Aktivität betragen  $0,861$  mmol/L bzw.  $0,320$   $\mu\text{mol Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . Die Punkte sind gemittelt aus zwei unabhängigen Experimenten mit Duplikaten.



**Abbildung 3-20.** Eadie-Hofstee Plot der ATPase Aktivität von JS3 ERG2-4 RAF46 P-Gp. Der  $K_m$  und  $V_{max}$  der stimulierten ATPase Aktivität sind der Tabelle 3-16 zu entnehmen.  $K_m$  und  $V_{max}$  der basalen ATPase Aktivität betragen 0,802 mmol/L bzw. 0,335  $\mu\text{mol P}_i \text{ mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ .

Die Kinetik-Konstanten stimmen mit den Literaturwerten überein. Damit ist das homogene P-Gp, das aus dem in dieser Arbeit entwickelten Expressionssystem stammt, mit dem aus dem BJ5457 RAF13 Stamm gewonnen P-Gp auch kinetisch identisch.

## 3.2 Diskussion zu den Ergebnissen der P-Glykoprotein Aufreinigung

### 3.2.1 Aufreinigung des P-Glykoprotein

Für das Verständnis der Struktur-Wirkungsbeziehungen von P-Gp Modulatoren und Inhibitoren ist die Untersuchung ihrer Interaktion mit reinem P-Gp, unbeeinflusst von anderen Mechanismen der Zelle, wichtig. Hierfür muss das P-Gp in Zellen überexprimiert, aufgereinigt und anschließend in einer Phospholipidmembran wieder rekonstituiert werden, um seine Funktion zu erhalten.

Ein Hauptteil dieser Arbeit bestand daher in der Etablierung, Optimierung und Entwicklung eines Aufreinigungssystems. Zu Beginn dieser Arbeit gab es keine Erfahrungen im Labor des Arbeitskreises Wiese mit der



Aufreinigung von Membranproteinen. Daher mussten auch die Basistechniken aus dem Material und Methoden Teil etabliert werden.

In der Literatur wurden bis dato unterschiedliche Expressionssysteme beschrieben und erfolgreich angewendet. Im folgenden Kapitel werden kurz die bekannten Systeme mit ihren Vor- und Nachteilen dargestellt, um zu verdeutlichen warum *S. cerevisiae* als Expressionsorganismus ausgewählt wurde.

### **3.2.2 Überblick über P-Glykoprotein Expressionssysteme**

P-Gp wurde aus Ovarial-Zellen vom chinesischen Hamster, die das Protein zu einem hohen Anteil nativ exprimieren, funktionell aufgereinigt [3;59]. Durch stressen dieser Zellen mit einem Zytostatikum wurde die Expressionsrate von P-Gp gesteigert. Diese Zelllinien sind zwar ein sehr gutes Expressionssystem für Wild-Typ-P-Gp, aber leider eignet es sich nicht zur Erzeugung von Mutanten, da sich die chromosomale DNA nur unter erheblichem Aufwand gezielt verändern lässt. Auch unterscheidet sich das Hamster-Pgp von menschlichem P-Gp in einzelnen Aminosäuren und in seiner relativen Affinität zu Zytostatika. Weiterhin existieren zwei Isoformen, wogegen das humane P-Gp nur in einer Isoform existent ist [31].

Durch transiente Transfektion von HEK 293 Zellen mit einem Plasmid ist man in der Lage Mutanten zu erzeugen, aber dieses System überzeugt nicht, da die Expressionsraten sehr niedrig sind und die Kultivierung von Säugerzellen sehr kostenintensiv und aufwendig ist [63]. Dies trifft auch auf das CHO-System zu.

Ein sehr weit verbreitetes Expressionssystem ist die Infektion von Sf9 Insekten Zellen mit dem Baculovirus, der die cDNA des humanen ABCB1 Gens trägt. Hier werden hohe Expressionsraten von bis zu 3% des Gesamtmembranproteins erzielt [34;76;96]. Mit diesem System ist es relativ einfach das P-Gp durch Mutationen gezielt zu verändern. Die Kultivierung

dieser Zellen ist allerdings sehr aufwendig und bei Gewinnung von P-Gp im Milligramm Maßstab sehr kostenintensiv.

Eine weitere Möglichkeit stellt die heterologe Genexpression in der Hefe *Pichia pastoris* dar. Dies zeigten *Beaudet et al.* durch die Expression der Maus-Isoform ABCB4 (MDR3), welche eine hohe Homologie zu ABCB1 besitzt [9]. Dieses System wurde von *Julien et al.* zur Aufreinigung von ABCB4 erfolgreich eingesetzt [50]. Das P-Gp konnte allerdings bisher noch nicht aus diesem Organismus aufgereinigt werden. Des Weiteren ist die Kultivierung dieser Hefe sehr aufwendig, denn das Wachstum kann nur unter ständiger Kontrolle des Sauerstoffgehalts und dem pH-Wert erfolgen

Als sehr nützliches Werkzeug für die heterologe Genexpression hat sich die *Saccharomyces cerevisiae* erwiesen. Es handelt sich um einen eukaryontischen Organismus, der allerdings im Gegensatz zu Säugerzellen einfach zu kultivieren ist. *Kuchler et al.* konnten das humane P-Gp funktionell in *S. cerevisiae* exprimieren [56]. Allerdings nur mit einer sehr geringen Expressionsrate. Verbesserungen führten zu einer Expressionsrate von 0,4% des Gesamtmembranproteins [67]. Die funktionellen Expressionssysteme von P-Gp in *S. cerevisiae* liefern ein 130 kDa, nicht N-glykosiliertes, voll funktionsfähiges P-Gp. Das Expressionssystem von *Figler et al.* war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit das viel versprechenste [35]. Die Expressionsrate konnte durch das Chaperon Glycerol auf 8% des Gesamtmembranproteins gesteigert werden. *S. cerevisiae* Zellen besitzen zwei Wege durch die sie Glycerol aufnehmen können: 1. passive Diffusion und 2. aktiver Transport durch das Glycerol Transport Protein *FPS1* [106]. In der Zelle stabilisiert das Glycerol die native Konformation des P-Gp [116]. Daher wurden alle Kultivierungen in dieser Arbeit in Gegenwart von 10% Glycerol durchgeführt.

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die im Text behandelten Expressionssysteme.

**Tabelle 3-17.** Übersicht über P-Gp Expressionssysteme.

Organismus	System	Expressionsrate	Literatur	Aufreinigung
Chinesische Hamster Ovarial Zellen (CHO)	Überexpression durch Inkubation mit Colchicin	21% des Gesamtproteins in der 16/3%-igen Sucroseschicht	Ling (1997)[62] Al-Shawi (1993)[63]	Affinitäts-Chromatographie Detergenz: Octylglycosid
Human Embryo Kidney Zellen HEK 293	Transiente Transfektion	0,1-0,3% des Gesamtproteins	Loo (1995)[64]	Ni <sup>2+</sup> -Affinitäts-chromatographie Detergenz: DM
<i>P. pastoris</i> (GS115)	Transformation des ABCB4 Gens in Spheroplasten von <i>P. pastoris</i>	nicht angegeben	Julien (2000)[69]	Avidin-Affinitäts-Chromatographie Detergenz: LPC
<i>S. frugiperda</i> (SF9)	Baculovirus infizierte SF9 Zellen	3% des Gesamtproteins	Sarkadi (1992)[65] Evans (1995)[66] Muller (1996)[67]	es wurden nur Membranen verwendet
<i>S. cerevisiae</i> BJ 1991	Transformation des ABCB1 Gens unter Kontrolle des Hefe Plasma Membran H <sup>+</sup> -ATPase Promoters	0,4% des Gesamtproteins	Mao (1997) [67]	Ni <sup>2+</sup> -Affinitäts-chromatographie Detergenz: LPC
<i>S. cerevisiae</i> BJ 5457	Transformation des ABCB1 Gens unter Kontrolle des PMA1 Promotors	8% des Gesamtproteins	Figler (2000)	Ni <sup>2+</sup> -Affinitäts-chromatographie Detergenz: LPC

### 3.2.3 Optimierung des etablierten BJ5457 RAF13 Expressionssystems

Nach der erfolgreichen Etablierung des Expressionssystems wurde versucht dieses System weiterzuentwickeln (siehe Kapitel 3.1.5). Ein Ansatz war es die in dem YepMDR1His Vektor vorhandene 10-fach Histidin Markierung um zwei bzw. fünf Histidine zu erweitern. Dies sollte eine Affinitäts-Erhöhung zu immobilisiertem Nickel bewirken. Das 12fach markierte P-Gp zeigte eine gering höhere Affinität zu Nickel. Das Ziel dieser Versuche war die

Maximierung der Ausbeute. Deshalb wurde auch nur die 15fache Histidin Markierung weiter untersucht, in der Hoffnung eine höhere Ausbeute an P-Gp zu erzielen. Wie die Tabelle 3-11 zeigt, ist die Ausbeute aber nicht signifikant höher als bei der zehnfachen Histidin Markierung. Wie Kapitel 3.1.8 zeigt, besitzt das 15-fach markierte P-Gp zwar eine erhöhte Affinität zu Nickel, nach der Aufreinigung und Rekonstitution stellte sich allerdings heraus, dass das 15-fach markierte P-Gp nicht mehr aktiv ist. Möglicherweise beeinflusst die Histidin Markierung die tertiäre Faltung und damit auch die Funktion des Proteins. Daher wurde dieser Ansatz der Aufreinigung nicht weiter verfolgt.

Zuvor wurde versucht für eventuelle Studien am intakten Organismus *S. cerevisiae* das P-Gp in dem ABC-Transporter deletierten FYAK Stamm zu exprimieren. Wie Kapitel 3.1.2 zeigt war dies erfolgreich, allerdings wurde dieser Stamm nicht zur Aufreinigung genutzt, da die 6-fache Histidin Markierung für die Nickel-Affinitätschromatographie von P-Gp zu kurz ist (persönliche Mitteilung von Al-Shawi), da möglicherweise, durch die Tertiärstruktur von P-Gp bedingt, nicht alle sechs Histidine zur Komplexbildung mit Nickel zur Verfügung stehen. Dies würde einen Verlust der Affinität zu Nickel bedeuten und damit verbunden eine niedrige Ausbeute an gereinigtem Protein. Deshalb wurde der Ansatz der Aufreinigung mit dem sechsfachen Histidin markierten P-Gp nicht weiter verfolgt.

In dem verwendeten System wird eine 10-fache Histidin-Markierung genutzt. Der Hefestamm *BJ5457* bietet den Vorteil, dass er Protease defizient ist [49]. Die vacuolären Aspartyl-Proteasen (*pep4*) und Serin Proteasen (*prb1*) sind in diesem Stamm deletiert worden. Während des Aufreinigungsprozesses werden die überexprimierten Proteine somit nicht so schnell von den restlichen Proteasen verdaut.

Da P-Gp während eines Transports oder seines katalytischen Zyklus mehrere Konformationsänderungen durchläuft, ist die Zusammensetzung der Lipide in der Lage die Funktion des Proteins zu beeinflussen. Das System von *Figler et al.* rekonstituiert das P-Gp in einem Lipidgemisch in dem unter

anderem „polar“ *E. coli* Lipid-Extrakt verwendet wurde. Dieser Extrakt ist nicht standardisiert. Es ist ein Chloroform/Methanol Extrakt aus *E. coli* Zellen. Dieser wurde mit Aceton gefällt und anschließend wurden die Lipide mit Diethylether extrahiert (siehe Avanti Polar Lipids Webseite [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com)). Da die Lipidzusammensetzung bedingt durch die verwendeten *E. coli* Schwankungen unterworfen ist, wurde die Eignung neuer Lipidmischungen mit definierter chemischer Zusammensetzung zur Rekonstitution untersucht.

Für Phosphatidylserin und -cholin ist ein Schutzeffekt für die ATPase Aktivität publiziert worden [25]. Daher wurden diese beiden Lipide als Bestandteil einer neuen Lipidmischung ausgewählt. *Uebel et al.* reinigten den ABC-Transporter TAP erfolgreich in Liposomen, die PC, PA und Cholesterol als Lipide enthalten, auf. Deshalb wurde die prozentuale Zusammensetzung dieser Lipide aus dem TAP Aufreinigungsprotokoll zur Rekonstitution von P-Gp verwendet. Die Proteoliposomen aus dieser neuen Liposomenmischung zeigen eine niedrigere basale ATPase Aktivität als die Proteoliposomen mit Lipiden aus *E. coli* Extrakt. Dadurch bedingt besitzen die PC/PA/Ch-Liposomen ein sehr breites Messfenster. Der Quotient aus stimulierter und basaler Aktivität betrug bei den Aufreinigungen mit der neuen Lipidmischung mindestens 3,13. Daher wurde diese Lipidzusammensetzung für weitere Aufreinigungen als Standardzusammensetzung verwendet.

Für die Untersuchungen mit Hilfe des ATPase Assays ist die Ausrichtung des P-Gps in den Liposomen wichtig. In den Zellen ist die ATP-Bindungsstelle zur zellulären Seite ausgerichtet, in den Liposomen benötigt man allerdings die Ausrichtung der Bindungsstelle nach außen, da die Hydrolysegeschwindigkeit von ATP durch diese Bindungsstelle gemessen wird. In dem etablierten System wird das P-Gp in Liposomen rekonstituiert, die durch Dialyse hergestellt werden. Dies liefert kleine inhomogene Vesikel mit einer Größe zwischen 50 nm und 100 nm. In Kapitel 3.1.6 wurde die Rekonstitution von P-Gp in extruierten Liposomen beschrieben. Die Nukleotid-Bindungsstellen der Präparation waren bedingt durch diese Technik hauptsächlich nach außen gerichtet. Dies ist unter anderem darauf

zurückzuführen, dass die Liposomen, die durch Extrusion gewonnen werden, bereits geschlossen vorliegen und das Protein wird erst später eingebaut. Die beiden ATP-Bindungsstellen von P-Gp sind sehr voluminös und hydrophil, daher richtet sich das P-Gp mit den lipophilen transmembranären Domänen zuerst auf die Lipidmembran aus und wird dann mit den Nukleotid-Bindungsstellen, die mit dem wässrigen Medium in Kontakt stehen, nach außen gerichtet in das Liposom eingebaut.

Bei der Dialysetechnik wiederum ist das P-Gp aktiv bei der Bildung der Proteoliposomen durch Entzug des Detergenz beteiligt. Die Verteilung der Ausrichtung der ATP-Bindungsstellen ist damit zufällig, da das P-Gp nicht bevorzugt mit der Lipiddoppelschicht der Liposomen oder dem umgebenen wässrigen Medium in Wechselwirkung treten kann. Sollen also Proteoliposomen definierten Größe und hauptsächlichlicher Ausrichtung der Nukleotid Bindungsstellen nach außen hergestellt werden, dann sollte die Technik der Extrusion angewendet werden.

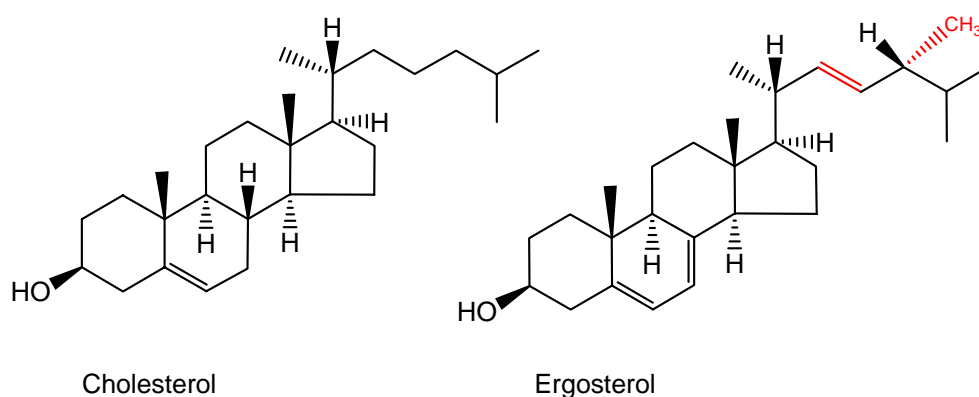
### **3.2.4 Entwicklung eines neuen Expressionssystems**

Da das etablierte Expressionssystem mit dem Hefestamm *BJ5457 RAF13* und dessen Optimierungen nicht die gewünschten Ergebnisse im Hinblick auf eine erhöhte Ausbeute lieferten, wurde in dieser Arbeit ein neues Hefeexpressionssystem entwickelt.

Zur Solubilisierung von Membranen werden unterschiedliche Detergenzien verwendet. Diese Detergenzien lassen sich in die drei Gruppen ionische, nicht-ionische und zwitter-ionische einteilen. Eine generelle Anforderung an die Detergenzien zur Solubilisierung von integralen Membranproteinen ist, dass sie relativ mild sein sollen, um die natürliche Aktivität des zu solubilisierenden Proteins zu erhalten. Bei der Verwendung von Hefeplastmamembranen sind die milden Detergenzien die für Säugerzellen verwendet werden, wie z.B. OG, erst in relativ hohen Konzentrationen überhaupt wirksam [78]. Die Verwendung von einer zu hohen Konzentration an Detergenz kann zur irreversiblen Denaturierung des gewünschten

Membranproteins führen. In dem in dieser Arbeit etablierten BJ547-System wurde dieses Problem durch den Einsatz des potenten zwitterionischen Detergenz LPC mit einer geringen kritischen Mizellbildungskonzentration von 20  $\mu\text{mol/L}$  gelöst [107]. In Säuger-Zellen werden dagegen zur Solubilisation von P-Gp aus den Membranen häufig die Detergenzien DM und OG eingesetzt (siehe Tabelle 3-17). Diese Detergenzien solubilisieren allerdings die Membranen des *BJ5457 RAF 13* Hefestamms nur unzulänglich (persönliche Mitteilung von Marwan Al-Shawi).

Cholesterol und Ergosterol sind beides Steroide die essentiell für die Stabilität und Funktionalität von eukaryontischen Zellmembranen sind. Cholesterol kommt in den meisten tierischen Zellmembranen in einer Konzentration von ca. 30-50 mmol/L vor. Es hat die Fähigkeit die mechanische Festigkeit der Membranen zu steigern und die Durchlässigkeit der Membrandoppelschicht zu senken. Der Einfluss von Cholesterol wurde bereits in der Literatur sehr gut dokumentiert [79]. Im Gegensatz hierzu ist der Einfluss von Ergosterol auf die Zellmembran von Pilzen, insbesondere auf *S. cerevisiae* noch nicht so intensiv untersucht worden. Es konnte bisher gezeigt werden, das Ergosterol eine höhere Fähigkeit als Cholesterol besitzt geordnete Lipiddoppelschichten zu bilden [10;32;112]. *In silico* Studien zeigten, dass das Vorhandensein der Doppelbindung und der zusätzlichen Methylgruppe die Flexibilität der Seitenkette von Ergosterol im Vergleich zu Cholesterol stark einschränkt (siehe Abbildung 3-21a).



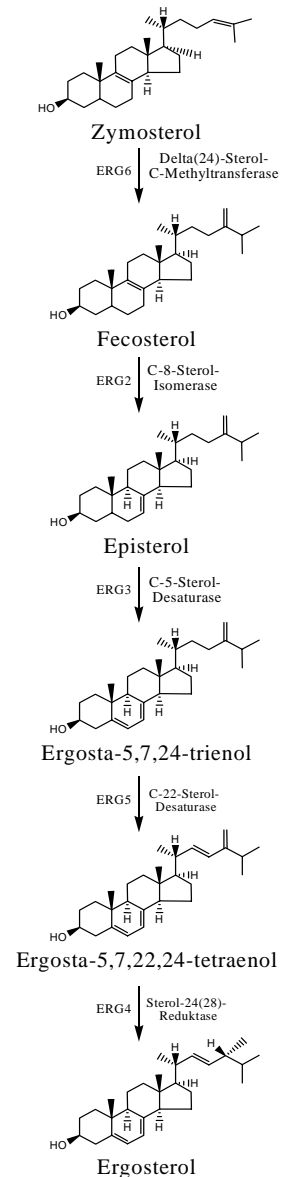
**Abbildung 3-21a.** Strukturen der beiden Steroidlipide Cholesterol und Ergosterol

Computergestützte Analysen mit einer Phosphatidylcholin/Cholesterol bzw. Ergosterol Membran ergaben, dass die Lipide in Kombination mit Ergosterol eine dickere Phospholipiddoppelschicht ergaben als in Kombination mit Cholesterol [22]. Diese Befunde führen zu der Überlegung, dass bei der literaturbekannten erschwerten Solubilisierbarkeit von Hefemembranen, das Hauptlipid Ergosterol eine besondere Rolle spielen könnte, denn es ist auch an der der Bildung von Detergenzien unlöslichen Mikrodomänen, so genannten „Rafts“, beteiligt. Diese Mikrodomänen sind aufgrund ihrer höheren Ordnung von nicht-ionischen Detergenzien nicht solubilisierbar [13]. Würde man nun die Konzentration von Cholesterol bzw. Ergosterol in der Zellmembran senken oder sogar ganz eliminieren, dann würde diese Lipiddoppelschicht eine erhöhte Fluidität und Unordnung aufweisen. Nicht solubilisierbare Mikrodomänen wären eventuell weniger vorhanden, die Dicke der Lipiddoppelschicht würde abnehmen und dadurch könnte man auch nicht-ionische Detergenzien wirkungsvoller einsetzen. Da Steroidsterole allerdings ein essentieller Bestandteil der Zellmembran sind könnten die biologischen Vorstufen von Ergosterol in der *S. cerevisiae* Zellmembran die gewünschten Veränderungen der Zellmembraneigenschaften hervorrufen, aber dabei die Vitalität der Zellen im Hinblick auf Ihre Wachstumseigenschaften und Expressionseigenschaften unverändert lassen.



In den eingesetzten Ergosteroldefizienten Stämmen ist jeweils ein Gen, das in der Ergosterol-Biosynthese involviert ist, deletiert und durch einen auxotrophen Marker ersetzt worden. Die nebenstehende Abbildung 3-21b zeigt den Ergosterol-Biosyntheseweg in *S. cerevisiae*. Dem Stamm *LPY11* fehlt die Delta(24)-Sterol-C-Methyltransferase. Die Zellmembran enthält also kein Ergosterol, sondern Zymosterol als Hauptsteroid.

Dem Zymosterol fehlt im Gegensatz zu Ergosterol die zusätzliche Methylgruppe an Position 24 und die Doppelbindung in der Alkyl-Seitenkette ist um eine Position verschoben. Dem Stamm *LPY27* fehlen die C-8-Sterol-Isomerase, die C-5-Sterol-Desaturase und die Sterol-24(28)-Reduktase. Seine Zellmembran enthält also hauptsächlich das Fecosterol als Steroid. Dem Fecosterol fehlt im Vergleich zu Ergosterol die Methylgruppe, auch hier ist die Position der Doppelbindung verschoben. Zur Transformation wurde der Vektor pYEplac195MDR1His (Vektorkarte siehe Anhang) genutzt. Er kodiert humanes P-Gp mit einer 10-fachen Histidin Markierung und ist bis auf das Gen für den auxotrophen Marker (Uracil anstelle von Histidin) mit dem Vektor YepMDR1His (RAF13) identisch. Die Eigenschaften der Hauptsteroiden der Ergosteroldefizienten Stämme verleihen den Membranen eine höhere Fluidität ohne deren Wachstumsverhalten und Vitalität negativ zu beeinflussen [75]. Dieses neue Expressionssystem liefert deutlich höhere Expressionsraten als bisher in der Literatur beschrieben. Obwohl die Funktion des humanen P-Gp stark von der Membrenumgebung abhängt, vermittelt es auch in dieser fluideren, ungeordneteren Hefemembran eine Resistenz gegenüber Aureobasidin A, einem potenten Fungizid, welches auch gleichzeitig ein Substrat von P-Gp



**Abbildung 3-21b.**  
Ergosterolsynthese

ist. Es konnte also erstmals humanes P-Gp funktionell in Ergosteroldefizienten Stämmen exprimiert werden.

Der Hefestamm *JS6 ERG6* (*LPY11* mit pYeplac195MDR1His) hat eine höhere Expressionsrate aber auch eine längere Verdopplungszeit als der *JS3 ERG2-4* Stamm (*LPY27* mit pYeplac195MDR1His). Beide Hefestämme haben eine höhere Expressionsrate und eine niedrigere Verdopplungszeit als der *BJ5457 RAF13* Stamm (Tabelle 3-4). Das überexprimierte P-Gp muss aus dem endoplasmatischen Retikulum in die Zellmembran eingebaut werden. Durch diese unnatürliche Überexpression wird zum Teil nicht alles P-Gp aus dem ER in die Zellmembran transportiert. Durch die erhöhte Fluidität der Membran kann das P-Gp eventuell leichter funktionell in die Zellmembran eingebaut werden.

Vergleicht man die beiden Ergosteroldefizienten Stämme im Hinblick auf ihr Wachstumsverhalten untereinander, dann erkennt man das der *JS6 ERG6*-Stamm durch die längere Verdopplungszeit mehr Zeit als der *JS3 ERG2-4* in der logarithmischen Wachstumsphase verbringt. Hierdurch wird auch die Zeit verlängert in der das humane P-Gp im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert wird und in der es in die Membran eingebaut werden kann. Des Weiteren trägt auch das verwendete Glycerol als chemisches Chaperon zur Verbesserung der Expressionsrate bei. Durch die höhere Teilungsrate der neuen *S. cerevisiae* Stämme im Vergleich zu dem *BJ5457* Stamm, ist auch die komplette Wachstumszeit einer diskontinuierliche Fermentation von 3-4 Tagen im Fermenter auf zwei Tage verkürzt.

Der Stamm *JS6 ERG6* müsste nach den obigen Überlegungen eine höhere Fluidität aufweisen und somit auch leichter zu solubilisieren sein, da er nur Zymosterol als Steroid besitzt. Dies kann man tendenziell bei den Solubilisierungsexperimenten erkennen, da der *JS6 ERG6*-Stamm von allen Detergenzien stärker solubilisiert wird als der *JS3 ERG2-4*-Stamm. Ein deutlicher Unterschied ist bei der jeweils höchsten Detergenz-Konzentration zu sehen. Da bereits für das Hamster-Pgp mit dem Detergenz OG Erfahrungen vorlagen, ist dieses nicht-ionische Detergenz für das System

ausgewählt worden, da es gegenüber P-Gp selbst sehr mild ist, aber in der Lage ist in niedriger Konzentration die Membranen ausreichend zu solubilisieren.

Ein Nachteil der Ergosteroldefizienten-Stämme ist, dass sie nicht wie der *BJ5457 RAF13*-Stamm, Proteasedefizient sind. Da die zur Membranpräparation und Aufreinigung verwendeten Puffer allerdings viele reversible und irreversible Proteaseinhibitoren enthalten, spielt dieser Nachteil theoretisch keine Rolle. Für weiterführende Untersuchungen könnten deshalb zur Verbesserung dieses Systems die Proteasen in den Ergosterol defizienten Stämmen deletiert werden, um den Verdau von P-Gp während der Aufreinigung völlig auszuschließen.

Die Ergebnisse zeigen, dass beide Ergosterol-Stämme aktives humanes P-Gp liefern. Das aufgereinigte homogene P-Gp aus dem *JS3 ERG2-4* Stamm ist zu 100% aktiv (siehe Tabelle 3-15). Als Vergleich diente eine Aufreinigung von *BJ5457 RAF13*-Membranen solubilisiert mit 1,5% LPC. Das *JS3 ERG2-4* P-Gp hatte in allen Fällen mindestens die gleiche spezifische Aktivität. Die Michaelis-Menten-Konstante in Gegenwart und in Abwesenheit von Verapamil entsprach den Literaturwerten. Die Aufreinigungen aus dem *JS6 ERG6* lieferten leider weniger aktives P-Gp. Die spezifische Aktivität war nicht so hoch wie bei dem *JS3 ERG2-4* Stamm. Sie reichte aber aus, um den Einfluss von MDR-Modulatoren auf die ATPase Aktivität von P-Gp zu untersuchen.

Das neu entwickelte System liefert also 100% aktives homogenes P-Gp. Da für dieses System OG als Detergenz genutzt werden kann, ist die Produktion von aufgereinigtem P-Gp kostengünstig im Milligramm Maßstab möglich.

### 3.3 Charakterisierung verschiedener P-Gp Präparationen

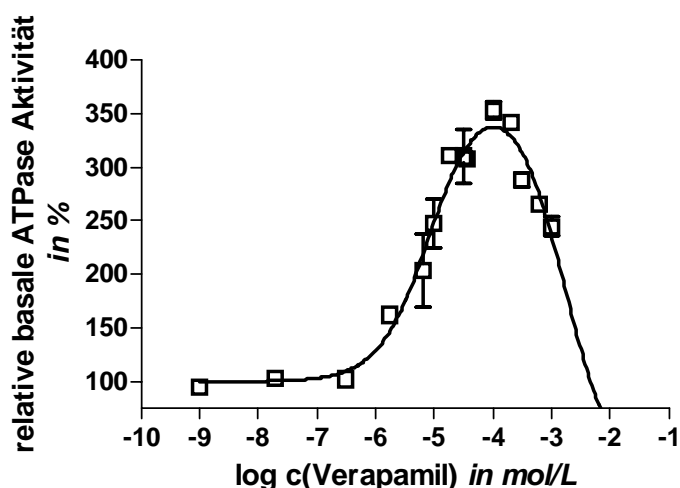
Zur Charakterisierung des Verhaltens der spezifischen Aktivität von P-Gp in Gegenwart von Modulatoren wurde ein ATPase-Assay im Rahmen dieser Arbeit etabliert. Wie im Kapitel 2.4.8 beschrieben wurde eine vier Punkt Kinetik der ATP Hydrolyse in Gegenwart von 10 mmol/L ATP mit einem Modulator titriert. Die Reaktionen wurden alle bei pH 7,4 und 37 °C durchgeführt. Aus der Steigung der Geraden wurde die ATP-Hydrolysegeschwindigkeit, bezogen auf Zeit und eingesetzte Proteinmenge, berechnet. Diese spezifische ATPase Aktivität ist dann auf die basale ATPase Aktivität (also in Abwesenheit eines Substrates) bezogen worden. Diese prozentuale ATPase Aktivität ist die relative basale ATPase Aktivität, die gegen den Logarithmus der Substanzkonzentration graphisch aufgetragen wird. Betrachtet man nur niedrige Substratkonzentrationen, dann verlaufen diese Dosis-Wirkungskurven sigmoidal und können durch die Hill-Funktion beschrieben werden. Betrachtet man aber den ganzen Konzentrationsbereich, ist die exakte Beschreibung der Dosis-Wirkungskurve durch die Hill-Funktion nicht mehr möglich. Hierfür wird die Gleichung nach Al-Shawi angewendet, die den glockenförmigen Verlauf der Dosis-Wirkungskurve genau beschreiben kann. Daher wurden alle ermittelten Dosis-Wirkungskurven dieser Arbeit soweit möglich mit beiden Gleichungen ausgewertet.

Das untersuchte aufgereinigte P-Gp stammt aus unterschiedlichen Präparationen. Wie die vorherigen Kapitel beschreiben, unterscheiden sich diese auch in ihren charakteristischen Kenngrößen, wie zum Beispiel durch die Zusammensetzung und Konzentration der Liposomen. Um die Vergleichbarkeit dieser unterschiedlichen P-Gp Präparationen sicherzustellen, diente Verapamil als Referenz-Substanz. Durch den ATPase-Assay wird die relative Affinität ( $EC_{50}$ ) eines Substrats bestimmt. Daher dürfte der Unterschied der Präparationen in ihrer spezifischen ATPase Aktivität keinen Unterschied für den  $EC_{50}$ -Wert eines Substrats bedeuten. Zum Beweis wurde der  $EC_{50}$ -Wert des Standardmodulators Verapamil für alle

Präparation bestimmt, um zu zeigen dass die unterschiedlichen spezifischen ATPase Aktivitäten keinen Einfluss auf den  $EC_{50}$ -Wert haben.

In der Tabelle 3-18 sind die charakteristischen Konstanten der ATPase Aktivität von vier unterschiedlichen P-Gp-Präparationen in Abhängigkeit von der Verapamil Konzentration zusammengefasst. Die Aufreinigungen erfolgten mit unterschiedlichen Detergenzien (OG, TDOC und LPC) und aus unterschiedlichen Hefestämmen. Diese Aufreinigungen wurden mit dem Standard Modulator Verapamil durch Aufnahme einer kompletten Dosiswirkungskurve charakterisiert (siehe Tabelle 3-18).

Stellvertretend für alle Präparationen ist in der Abbildung 3-22 die Dosiswirkungskurve von P-Gp, gewonnen aus dem JS6 ERG6 Stamm, mit Verapamil dargestellt.



**Abbildung 3-22.** Dosis-Wirkungskurve von Verapamil auf die ATPase Aktivität von P-Gp, aufgereinigt aus dem JS6 ERG6 RAF 46 Stamm ( $n = 3$ ). Die Ordinate beschreibt die Steigerung der basalen ATPase Aktivität in %. Auf der Abszisse ist der Logarithmus der molaren Konzentration von Verapamil aufgetragen.

**Tabelle 3-18.** Berechnete  $pK_m$ - und  $pK_i$ -Werte von Verapamil für unterschiedliche P-Gp Aufreinigungschargen. Die Daten wurden durch nichtlineare Regression mit der Al-Shawi Gleichung angepasst. Die basale Aktivität B wurde auf 100% fixiert. Alle Reaktionen wurden bei pH 7,4 und 37°C durchgeführt. JS 3 und JS 6 stehen jeweils für die Ergosteroldefizienten Stämme. BJ steht für P-Gp das aus dem Stamm BJ5457 RAF 13 isoliert worden ist.

P-Gp	JS6-P-Gp 2,0% OG	JS3-P-Gp 2,0% OG	BJ-P-Gp 2,0% TDOC	BJ-P-Gp 1,5% LPC	Mittelwert $pK_m \pm SD$ $pK_i \pm SD$	Lit.[35] Figler 2000
$pK_m$	5,06±0,09	4,82±0,20	4,92±0,19	4,91±0,22	4,93±0,05	4,3 – 5,05
$pK_i$	2,78±0,09	3,05±0,15	2,63±0,37	3,11±0,20	2,89±0,21	
D	380,4±18,70	730,8±104,7	383,7±43,57	821,5±12,7		
N	3	2	3	2		

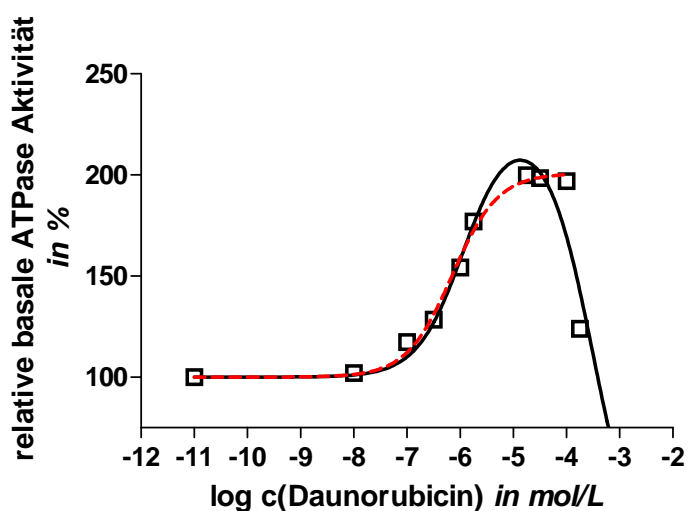
Eine einseitige ANOVA Analyse der  $pK_m$ -Werte ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den P-Gp Präparationen der JS3, JS6 und BJ-Stämme ( $p = 0,80$ ). Die oben untersuchten Präparationen stammten aus vollkommen unterschiedlichen Aufreinigungen, die sich auch hinsichtlich des verwendeten Hefestamms und des Detergenz zur Solubilisierung unterschieden. Auch das hatte keinen Einfluss auf den  $K_m$ -Wert. Damit konnte gezeigt werden, dass die Affinitäten von Substraten unabhängig von der Präparation vergleichbar sind.

Die D-Werte der Präparationen unterscheiden sich allerdings. Dies beruht darauf, dass einige Präparationen (insbesondere die mit dem Detergenz TDOC) verglichen mit den LPC Aufreinigungen nicht zu 100% aktives P-Gp liefern. Dadurch ist das Messfenster geringer. Ein weiterer Faktor ist die basale ATPase Aktivität der Präparation, denn sie ist von Präparation zu Präparation unterschiedlich und wird auch stark von der Lipidzusammensetzung beeinflusst. Somit ist auch indirekt der Faktor D von der basalen Aktivität abhängig. Für die systematischen Untersuchungen der Modulatoren wurde allerdings immer die gleiche prozentuale Lipidzusammensetzung gewählt. Nur die Stämme und Detergenzien und die Lipidkonzentration waren während der Untersuchungen Variationen ausgesetzt. Dies hat allerdings, wie Tabelle 3-18 und die ANOVA Analyse zeigen, keinen Einfluss auf die Affinitätsdaten  $pK_m$  und  $pK_i$ . Die ermittelten Affinitätsdaten für P-Gp Substrate können deshalb unabhängig von dem zur Aufreinigung verwendeten Stamm und Detergenz verglichen werden.

Es existieren in der Literatur unterschiedliche  $pK_m$ -Werte für Verapamil, da der  $pK_m$  unter anderem abhängig von der Lipidzusammensetzung und dem pH-Wert ist. Der mittlere  $K_m$ -Wert für Verapamil beträgt in dieser Arbeit  $12,04 \mu\text{mol/L} \pm 2,63 \mu\text{mol/L}$ . Der Literatur-Wert für  $K_m$  ist zwischen  $8,91 \mu\text{mol/l}$  und  $50,12 \mu\text{mol/l}$  angegeben. Je nach Zusammensetzung der Phospholipidmembran und dem pH-Wert. Der mittlere  $K_i$ -Wert beträgt  $1,41 \text{ mmol/L} \pm 0,73 \text{ mmol/L}$ . Der Literatur-Wert für  $K_i$  ist mit  $0,64 \text{ mmol/L}$  angegeben [2]. Das P-Gp mit dem der  $K_i$ -Wert bestimmt worden ist, wurde aber in einer anderen Lipid-Mischung rekonstituiert. Er ist aber trotzdem nicht signifikant unterschiedlich zu dem in dieser Arbeit ermittelten Wert.

### **3.3.1 Bestimmung der dosis-abhängigen ATPase Aktivität bekannter Modulatoren und Substrate**

In dieser Arbeit wurden unter anderem Vertreter der Zytostatika wie Daunorubicin, Vinblastin und Imatinib (siehe 3.5.1.5) auf ihren dosis-abhängigen Einfluss auf die ATPase Aktivität von P-Gp untersucht. Des Weiteren wurden auch literaturbekannte P-Gp Modulatoren, wie Nicardipin, Diltiazem, Quercetin und Verapamil vermessen. Die spezifische ATPase Aktivität ist auf die basale ATPase Aktivität (in Abwesenheit von Substrat) normalisiert. Daher ist der B-Wert bei der Al-Shawi-Gleichung und der Bottom-Wert bei der Hill-Gleichung auf 100% fixiert worden. Die Graphen zeigen die Werte aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Der Nachteil bei der Al-Shawi-Gleichung ist, dass D von der Differenz ( $pK_i - pK_m$ ) abhängig ist und somit auch indirekt von  $pK_m$  (u.  $pK_i$ ). Außerdem ist die Steigung bei der Al-Shawi Gleichung auf eins fixiert. Daher wurden die Daten zum Vergleich mit der Hill-Gleichung angepasst. Die Steigung der Hill-Gleichung kann auch Werte ungleich von eins annehmen, womit zum Teil bessere Kurvenanpassungen erreicht werden können. Der Top-Wert (korrespondierend zum D-Wert) der Hill-Gleichung ist eine von dem  $K_i$ -Wert unabhängige Variable und gibt daher die tatsächliche maximale Stimulation der ATPase Aktivität wieder.



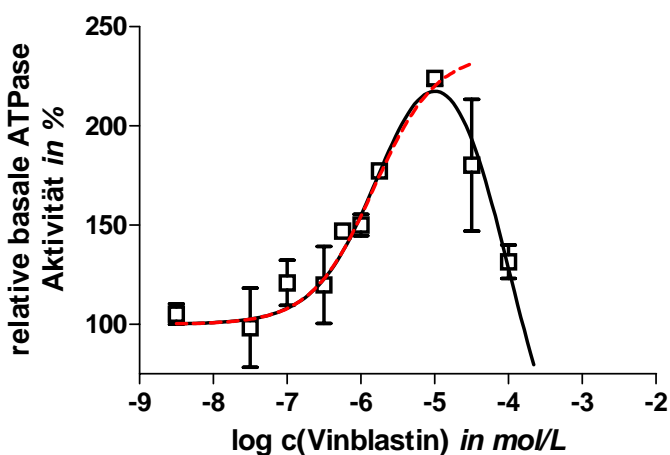
**Abbildung 3-23.** Einfluss von Daunorubicin auf die ATPase Aktivität von P-Gp ( $n = 2$ ).

Die Ordinate zeigt die ATPase Aktivität bezogen auf die basale Aktivität in %.

Die Abszisse zeigt den Logarithmus der molaren Konzentration.

**Tabelle 3-19.** Parameter der DWK von Daunorubicin ( $n = 2$ ). Die Mittelwerte der  $pK_m$ -Werte der Kurven-Anpassung sind nicht signifikant unterschiedlich ( $p = 0,32$ ).

Kurven-Anpassung	$pK_m \pm SE$	$pK_i \pm SE$	Hill-Koeffizient	$D_{max}$
Hill-Gleichung	$6,15 \pm 0,05$	---	$1,01 \pm 0,12$	$200,8 \pm 2,7$
Al-Shawi-Gleichung	$5,93 \pm 0,16$	$3,51 \pm 0,14$	---	$226,4 \pm 15,0$



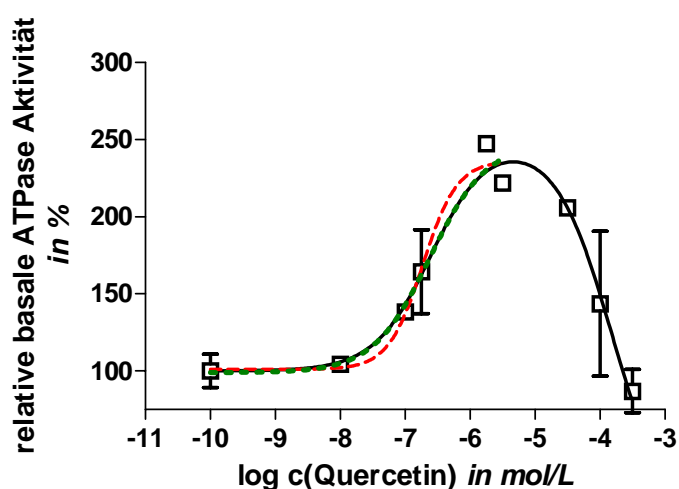
**Abbildung 3-24.** Einfluss von Vinblastin auf die ATPase Aktivität von P-Gp ( $n = 2$ ).



**Tabelle 3-20.** Parameter der DWK von Vinblastin ( $n = 2$ ). Die Mittelwerte der  $pK_m$ -Werte der Kurven-Anpassung sind nicht signifikant unterschiedlich ( $p = 0,75$ ).

Kurven-Anpassung	$pK_m \pm SE$	$pK_i \pm SE$	Hill-Koeffizient	$D_{max}$
Hill-Gleichung	$5,83 \pm 0,21$	---	$1,03 \pm 0,36$	$236,7 \pm 18,5$
Al-Shawi-Gleichung	$5,70 \pm 0,17$	$4,03 \pm 0,13$	---	$268,7 \pm 28,7$

Die beiden Zytostatika Vinblastin und Daunorubicin haben einen Hill-Koeffizienten von 1. Die Affinitätswerte der Zytostatika unterscheiden sich nicht signifikant und befinden sich im mikromolaren Bereich.



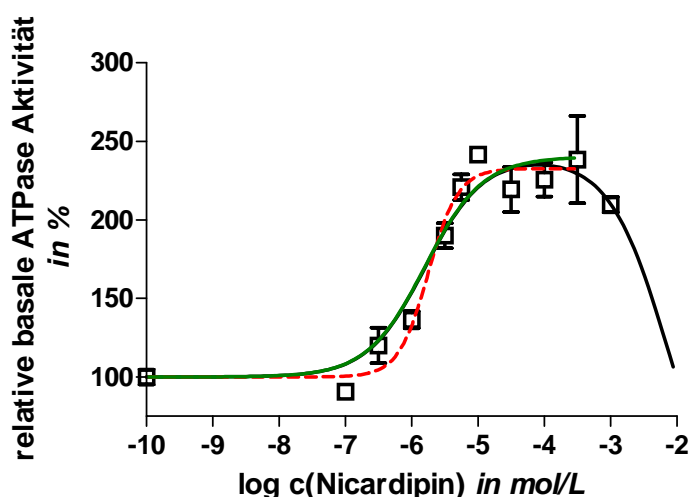
**Abbildung 3-25.** Einfluss von Quercetin auf die ATPase Aktivität von P-Gp ( $n = 2$ ).

**Tabelle 3-21.** Parameter der DWK von Quercetin ( $n = 2$ ). Die Mittelwerte der  $pK_m$ -Werte der Kurven-Anpassung sind nicht signifikant unterschiedlich ( $p = 0,66$ ).

Kurven-Anpassung	$pK_m \pm SE$	$pK_i \pm SE$	Hill-Koeffizient	$D_{max}$
Hill-Gleichung	$6,73 \pm 0,16$	---	$1,64 \pm 1,30$	$236,4 \pm 17,8$
Al-Shawi-Gleichung	$6,60 \pm 0,20$	$3,83 \pm 0,13$	---	$214,3 \pm 15,7$

In Grün ist die Kurvenanpassung mit der Hill-Gleichung, Hill-Koeffizient gleich 1 gesetzt, dargestellt. Die Dosis-Wirkungskurve von Quercetin zeigt bei der Auswertung mit der Hill Gleichung einen sehr hohen Standardfehler bei dem Hill-Koeffizienten. Die Steigung unterscheidet sich bedingt durch den hohen Fehler nicht signifikant von 1. Dieser hohe Standard-Fehler ergibt sich aus der Funktion und den geringen Freiheitsgeraden. Wenn der Hill-Slope auf 1

fixiert wird, dann erhält man für den  $pK_m$   $6,62 \pm 0,20$ . Die Kurve (in Grün gestrichelt dargestellt) verläuft deckungsgleich mit dem aufsteigenden Ast der Al-Shawi-Gleichung.

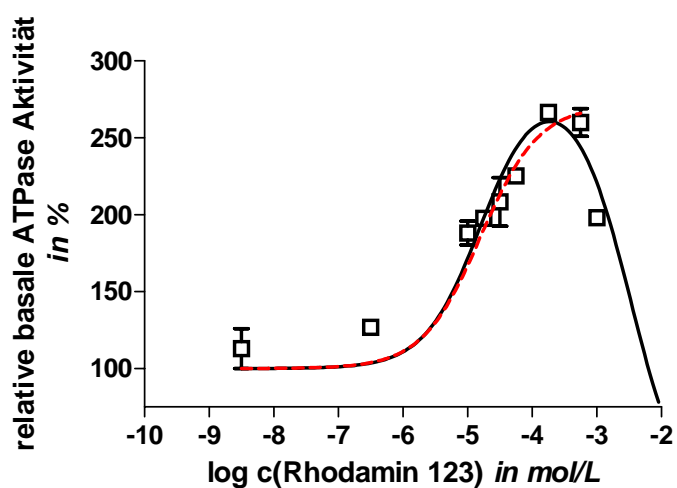


**Abbildung 3-26.** Einfluss von Nicardipin auf die ATPase Aktivität von P-Gp ( $n = 2$ ).

**Tabelle 3-22.** Parameter der DWK von Nicardipin ( $n = 2$ ). Die Mittelwerte der  $pK_m$ -Werte der Kurven-Anpassung sind nicht signifikant unterschiedlich ( $p = 0,91$ ).

Kurven-Anpassung	$pK_m \pm SE$	$pK_i \pm SE$	Hill-Koeffizient	$D_{max}/Top$
Hill-Gleichung	$5,75 \pm 0,09$	---	$1,93 \pm 0,55$	$232,7 \pm 6,20$
Al-Shawi-Gleichung	$5,77 \pm 0,14$	$2,23 \pm 0,27$	---	$244,5 \pm 2,23$

Wird der Hill-Koeffizient auf 1 fixiert, dann erhält man für den  $pK_m$   $5,80 \pm 0,14$  (grüne Kurve). Der absteigende Ast der Kurve konnte aufgrund von Löslichkeitsproblemen nicht exakt bestimmt werden. Auffällig ist der breite Bauch der Al-Shawi Kurve.

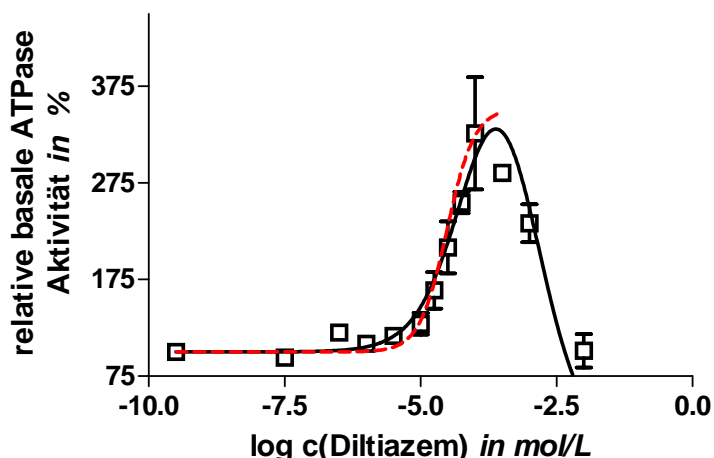


**Abbildung 3-27.** Einfluss von Rhodamin 123 auf die ATPase Aktivität von P-Gp ( $n = 2$ ).

**Tabelle 3-23.** Parameter der DWK von Rhodamin 123 ( $n = 2$ ). Die Mittelwerte der  $pK_m$ -Werte der Kurven-Anpassung sind nicht signifikant unterschiedlich ( $p = 0,94$ ).

Kurven-Anpassung	$pK_m \pm SE$	$pK_i \pm SE$	Hill-Koeffizient	$D_{max}/Top$
Hill-Gleichung	$4,80 \pm 0,14$	---	$0,96 \pm 0,62$	$271,4 \pm 19,9$
Al-Shawi-Gleichung	$4,78 \pm 0,17$	$2,48 \pm 0,25$	---	$290,7 \pm 25,4$

Leider fehlen bei der Dosis-Wirkungskurve von Rhodamin 123 im unteren Konzentrationsbereich die Datenpunkte. Der Fit ist aber trotzdem aussagekräftig, da die anderen Punkte die Kurve gut beschreiben.



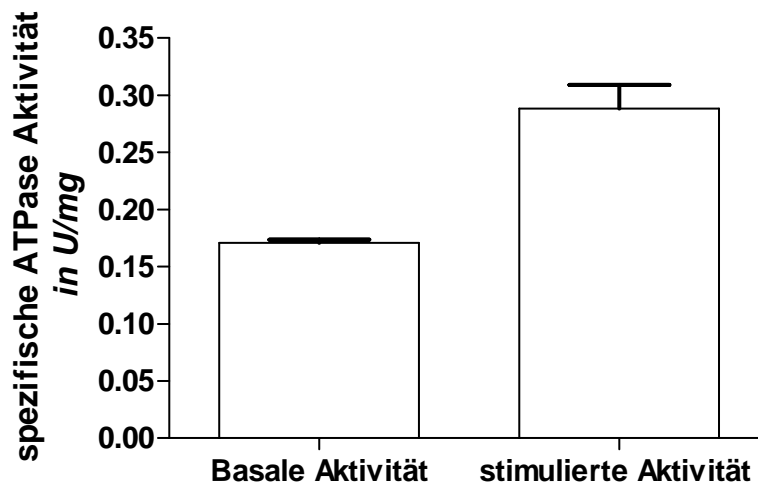
**Abbildung 3-28.** Dosis-Wirkungskurve von Diltiazem auf die ATPase Aktivität von P-Gp ( $n = 2$ ).

**Tabelle 3-24.** Parameter der DWK von Diltiazem ( $n = 2$ ). Die Mittelwerte der  $pK_m$ -Werte sind nicht signifikant unterschiedlich ( $P > 0,99$ ).

Kurven-Anpassung	$pK_m \pm SE$	$pK_i \pm SE$	Hill-Koeffizient	$D_{max}/Top$
Hill-Gleichung	$4,51 \pm 0,12$	---	$1,72 \pm 0,63$	$352,9 \pm 40,4$
Al-Shawi-Gleichung	$4,15 \pm 0,26$	$2,93 \pm 0,28$	---	$485,5 \pm 140,3$

Der D-Wert von Diltiazem bestimmt durch die Al-Shawi Gleichung ist relativ hoch und bei höheren Konzentrationen von Diltiazem sinkt die Aktivität deutlich auf basales Niveau ab.

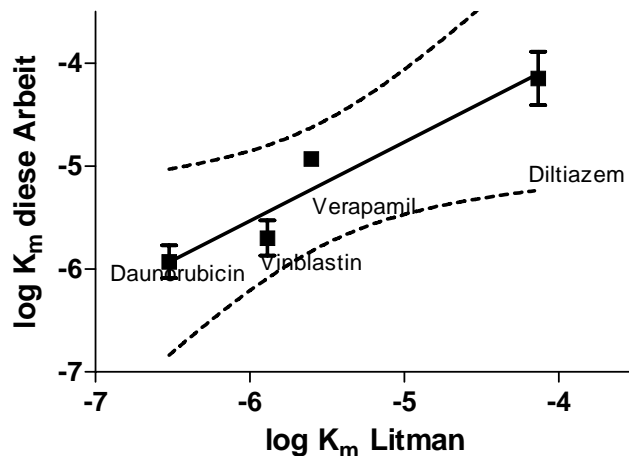
Neben den oben aufgeführten Verbindungen wurde unter anderem versucht die Stimulation der ATPase Aktivität durch Hoechst 33342 zu bestimmen. In der Literatur ist beschrieben, dass Hoechst die ATPase Aktivität inhibiert. Eine Stimulation der ATPase Aktivität durch Hoechst konnte im Gegensatz zur Literatur zwar gezeigt werden (siehe Abbildung 3-29), allerdings konnte aufgrund des geringen Messfensters keine dosis-abhängige Aktivitätssteigerung aufgenommen werden.



**Abbildung 3-29.** Basale und stimulierte ( $63 \mu\text{mol/L}$  Hoechst 33342) ATPase Aktivität von homogenem P-Gp aus dem BJ5457 Stamm, rekonstituiert in *E. coli* Lipiden ( $n=2$ ).

Die Frage wird aufgeworfen warum in dieser Arbeit eine Stimulation der ATPase Aktivität von P-Gp durch Hoechst beobachtet werden konnte, wenn in der Literatur gegenteilige Beobachtungen vorliegen [62]? Eine Erklärung hierfür ist, dass die Bedingungen unter denen die ATPase Aktivität gemessen wird ausschlaggebend dafür sind, ob eine Substanz als Inhibitor oder Stimulator der ATPase Aktivität von P-Gp eingestuft wird [82]. Insbesondere die Zusammensetzung der Lipidmischung und die Temperatur sind entscheidene Faktoren.

Um den ATPase-Assays zu validieren wurden die bestimmten  $pK_m$ -Werte von Verapamil, Vinblastin, Daunorubicin und Diltiazem, mit den aus der Literatur bekannten Daten von *Litman et al.* korreliert [60]. *Litman et al.* untersuchten die ATPase Aktivität von P-Gp in Membranpräparationen von chinesischen Hamster-Ovarial Zellen (CR1R12). Die Abbildung 3-30 zeigt die Korrelation der Literatur-Daten mit den Daten dieser Arbeit.

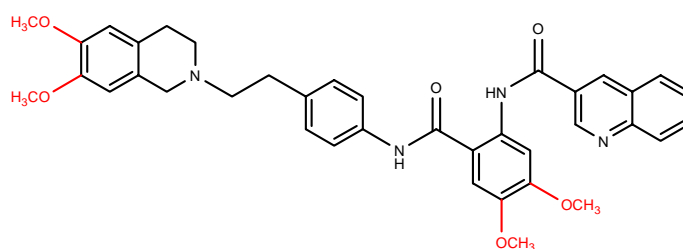


**Abbildung 3-30.** Korrelation ( $R^2 = 0,92$ ) der logarithmierten  $K_m$ -Werte von P-Gp Modulatoren. Die gestrichelten Linien zeigen das 95-%ige Konfidenzintervall. Der Pearson  $r$  Wert der Korrelation ist 0,96. Die Korrelation ist mit einem 95-%igen Konfidenzintervall signifikant ( $p = 0,041$ ).

Der Vergleich dieser beiden Datensätze ist, obwohl eine signifikante Korrelation zwischen den in dieser Arbeit bestimmten  $K_m$ -Werten und den Literatur-Werten besteht, problematisch. In dem Litman-Testsystem wurde die ATPase Aktivität von Membranen einer anderen Spezies bestimmt. Das in den Membranen enthaltene P-Gp ist im Gegensatz zu dieser Arbeit kein humanes P-Gp, sondern Hamster-P-Gp. Ein großer Unterschied besteht darin, dass Hamster P-Gp in zwei Isoformen vorkommt, dagegen ist bei humanen P-Gp nur eine Isoform bekannt. Dies führt auch dazu, dass das CHO-P-Gp eine andere Substratspezifität hat. Dies kann erklären warum die beiden verglichenen Untersuchungen, die in zwei unterschiedlichen Spezies durchgeführt worden sind, einen Unterschied von einer logarithmischen Einheit in den bestimmten Affinitätswerten aufweisen. Auch die ATPase Aktivität anderer in der Membran enthaltener ABC-Transporter, die eine ähnliche Substratspezifität wie P-Gp aufweisen, könnte bei dem Datensatz von *Litman et al.* miteingefasst worden sein. Die mittlere Steigung der Regressionsgeraden ist  $0,77 \pm 0,16$ . Schaut man sich den Graphen an, kann man erkennen, dass die Steigung stark von Diltiazem abhängig ist. Wird Diltiazem bei der Berechnung der Steigung nicht mit eingeschlossen, ergibt

sich eine mittlere Steigung von  $0,96 \pm 0,55$ . Dieser Wert hatte eine sehr hohe Standardabweichung, da die verglichenen Messwerte nur noch über eine logarithmische Einheit variieren. Die Abweichung der Steigung von eins ist aber grundsätzlich durch die Verwendung unterschiedlicher Spezies zu erklären. Ein Wert von kleiner als eins für die Steigung war auch zu erwarten, weil das Hamster-PGp kinetisch schneller arbeitet als das humane P-Gp. Die Reihenfolge der Affinitätswerte von dem Hamster und humanen P-Gp sollten allerdings gleich sein. Deshalb kann man an diesem Graphen verdeutlichen, dass das eingesetzte ATPase-Messsystem etabliert ist.

### 3.3.2 Bestimmungen der Dosis-abhängigen Stimulation der ATPase Aktivität von P-Glykoprotein durch neue Modulatoren



**Abbildung 3-31.** Chemische Struktur von Tariquidar.

Die Modulatoren mit der Bezeichnung WK basieren auf der partiellen Grundstruktur des potenten Modulators Tariquidar [93]. Die Grundstruktur wurde so derivatisiert, dass die von Klinkhammer neu synthetisierten Modulatoren strukturell in zwei Klassen eingeteilt werden können [54].

1. am Isochinolin in Position 6 und 7 mit einer Methoxy-Gruppe substituiert (6,7-Dimethoxytetrahydroisochinolin) und
2. an dieser Position nicht substituierte Derivate (Tetrahydroisochinolin).

Weiterhin sind die Substanzen beider Gruppen an der Säureamid Gruppe des Anilids derivatisiert, wobei diese strukturellen Veränderungen sehr heterogen sind. Die Strukturen der einzelnen Verbindungen sind im Kapitel 2.8 aufgeführt. In Untersuchungen von Müller und Breitbach mit funktionellen

Assays (Calcein-AM Assay bzw. diverse Influx-Assays) an intakten Zellen erwiesen sich die WK-Verbindungen als potente Inhibitoren von P-Gp. Die P-Gp Aufreinigung und ein Testsystem zur Charakterisierung der Dosis-abhängigen Stimulation der ATPase Aktivität von reinem P-Gp durch Substrate wurde in den vorherigen Kapiteln etabliert. Eine Auswahl der WK-Verbindungen ist nun auch auf ihren Einfluss auf die ATPase Aktivität von P-Gp untersucht worden.

Die Substanz WK-X-24 entspricht strukturell dem Tariquidar bis auf das Fehlen von vier Methoxygruppen. Bei einer Konzentration von  $9,51 \mu\text{mol/L} \pm 6,99 \mu\text{mol/L}$  ( $n=3$ ) wird die ATPase Aktivität halbmaximal stimuliert. Die maximale Stimulation ist bei einem  $D_{\text{max}}$  von  $191,7 \% \pm 21,9 \%$  erreicht. Die Konzentration der halbmaximalen Inhibition ( $pK_i$ ) konnte aufgrund der schlechten Löslichkeit der lipophilen Substanz nicht exakt bestimmt werden. Diese wurden durch Extrapolation der Kurven-Anpassung mit der Al-Shawi Gleichung geschätzt. Die Substanz WK-X-24 zeigte in den funktionellen Zellassays eine hohe Inhibition von P-Gp. und die Dosiswirkungskurve dieser Substanz ist daher als Referenzkurve in den folgenden Graphen abgebildet, um Affinitätsunterschiede zu den anderen WK-X-Verbindungen aufzuzeigen.

### 3.3.2.1 Kurvenanpassung der stimulierten ATPase Aktivität

Die Dosis-abhängigen stimulierten ATPase Aktivitäten von P-Gp durch die neuen Modulatoren wurden mit zwei unterschiedlichen Fit-Funktionen (Al-Shawi und Hill) ausgewertet (Gleichungen siehe Kapitel 2.6.2 und 2.6.3). Der Unterschied zwischen den beiden Gleichungen besteht in den folgenden zwei Punkten.

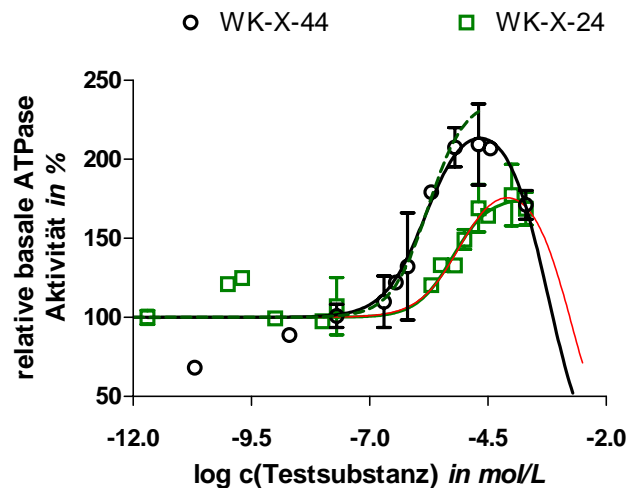
Bei Verwendung der Hill-Gleichung wird nur der aufsteigende Schenkel der Dosis-Wirkungskurve angepasst, dagegen beschreibt die Al-Shawi-Gleichung zusätzlich den absteigenden Schenkel und ermöglicht eine Anpassung der Kurve über den gesamten Dosis-Effektbereich.



Die Hill-Gleichung wurde mit einem variablen Hill-Koeffizienten zur Kurvenanpassung angewendet. In der Al-Shawi Gleichung ist der Hill-Koeffizient des aufsteigenden und absteigenden Schenkels auf eins fixiert.

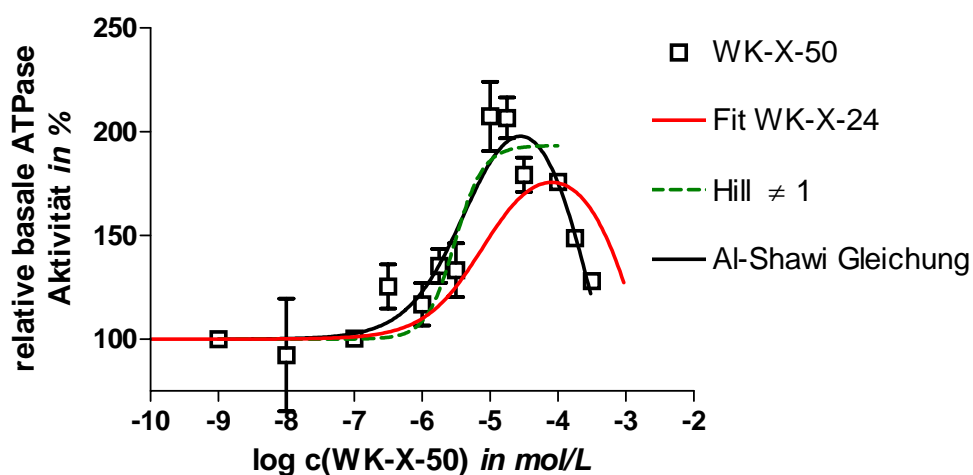
### 3.3.2.2 ATPase Aktivität der WK-X-Verbindungen mit Tetrahydroisochinolinrest

Die nachfolgenden Abbildungen 3-30 bis 3-42 zeigen die Dosis-abhängige Stimulation der ATPase Aktivität von P-Gp durch die WK-X-Modulatoren. Die Kurvenanpassung der Referenzsubstanz WK-X-24 ist in rot in jedem Graphen dargestellt.



**Abbildung 3-32.** Einfluss auf die stimulierte ATPase Aktivität von P-Gp durch WK-X-24 und WK-X-44.

Beide Verbindungen WK-X-24 und WK-X-44 zeigen eine Stimulation der ATPase Aktivität von P-Gp. WK-X-24 ist bei Konzentrationen über  $10^{-3}$  mol/L in dem wässrigen Reaktionspuffer nicht mehr löslich und daher kann der absteigende Teil der Dosiswirkungskurve nicht erfasst werden. Die Fit-Funktion von Al-Shawi kann aber trotzdem für WK-X-24 verwendet werden, da der Endpunkt der Funktion definiert ist. Der Modulator WK-X-44 zeigt gegenüber WK-X-24 eine höhere Affinität zu P-Gp. Auch die maximale Stimulation durch WK-X-44 ist signifikant höher ( $p=0,03$ ).



**Abbildung 3-33.** Einfluss auf die stimulierte ATPase Aktivität von P-Gp durch WK-X-50.

Die Substanz WK-X-50 kann aufgrund ihrer besseren Löslichkeit über den gesamten Dosisbereich untersucht werden. Sie zeigt eine deutliche Abnahme der stimulierten ATP-Hydrolyse bei höheren Konzentrationen und kann deshalb sehr gut mit der Al-Shawi Gleichung gefittet werden. Die maximale spezifische Stimulation von Wk-X-50 und WK-X-24 ist aber nicht wie bei WK-X-44 signifikant unterschiedlich. Für eine bessere Vergleichbarkeit ist deshalb in rot die gefittete Funktion von WK-X-24 über den gesamten Dosisbereich dargestellt. Die gestrichelte grüne Linie beschreibt die gefittete sigmoidal Funktion mit variablen Hill Koeffizienten. Diese Farbkodierung ist auch für die folgenden Graphen gültig.

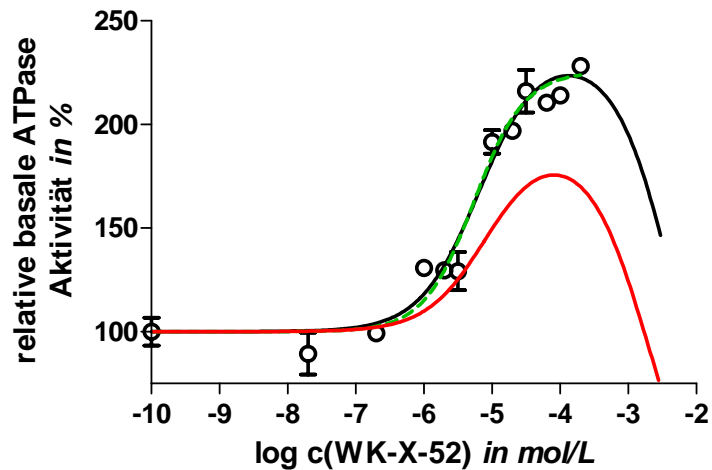


Abbildung 3-34. Einfluss auf die stimulierte ATPase Aktivität von P-Gp durch WK-X-52

Bei der Substanz WK-X-52 konnte der absteigende Ast der Dosiswirkungskurve aufgrund von schlechter Löslichkeit nicht aufgenommen werden. Die Kurvenanpassung erfolgte aber auch in dem hohen Konzentrationsbereich, da der absteigende Ast in der Al-Shawi Gleichung definiert ist. Die maximale relative Stimulation der ATPase Aktivität ist bei WK-X-52 signifikant höher als bei der Referenzsubstanz ( $p=0,042$ )

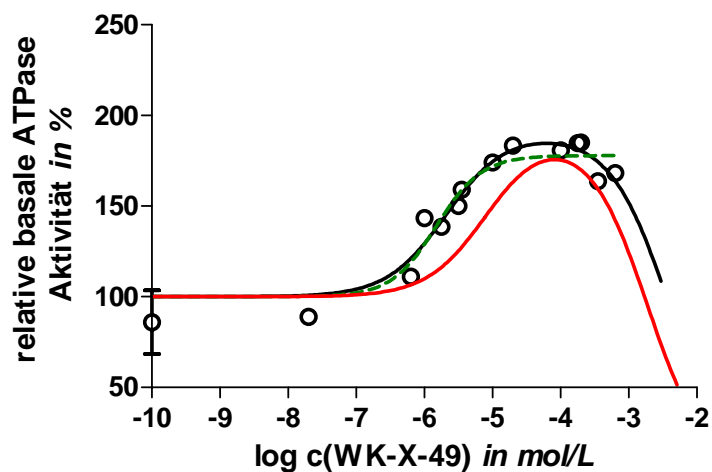


Abbildung 3-35. Einfluss auf die stimulierte ATPase Aktivität von P-Gp durch WK-X-49.

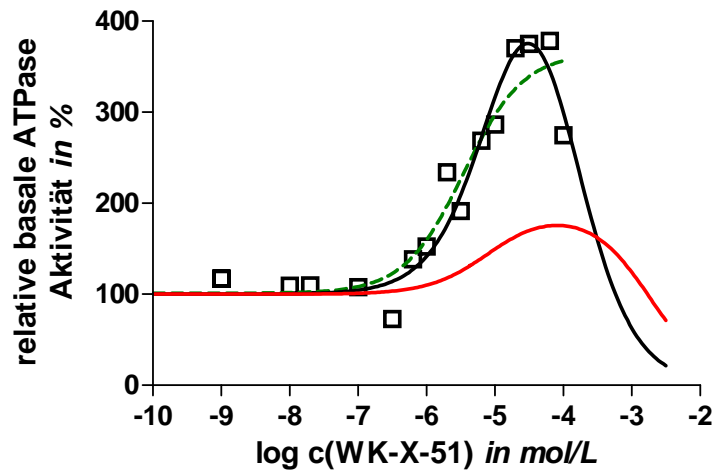
Das Derivat WK-X-49 zeigt ein sehr ähnliches Verhalten wie die Referenz, ist aber affiner und die Differenz zwischen  $K_m$  und  $K_i$  ist größer. Die maximale Stimulation zeigt auch keinen signifikanten Unterschied.

**Tabelle 3-25.** Zusammenfassung der charakteristischen Parameter der DWK der WK-Derivate ohne  $OCH_3$ -Gruppe. Angegeben sind die Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Die Spalte „p“ gibt den p-Wert des t-Tests auf Prüfung eines signifikanten Unterschieds der  $pK_m$ -Werte der beiden Fit-Funktionen wieder.

Verbindung	Kurven-Anpassung	$pK_m \pm SE$	$pK_i \pm SE$	Hill-Koeffizient	$D_{max}/Top$	p
WK-X-24 n = 3	Sigmoidal	5,25 $\pm$ 0,18	---	1,15 $\pm$ 0,54	176,0 $\pm$ 9,5	0,63
	Al-Shawi	5,09 $\pm$ 0,25	2,73 $\pm$ 0,63	1,0	191,7 $\pm$ 21,9	
WK-X-44 n = 2	Sigmoidal	5,77 $\pm$ 0,22	---	0,95 $\pm$ 0,35	238,6 $\pm$ 25,5	0,87
	Al-Shawi	5,82 $\pm$ 0,17	3,24 $\pm$ 0,18	1,0	229,9 $\pm$ 14,6	
WK-X-49 n = 2	Sigmoidal	5,74 $\pm$ 0,18	---	1,08 $\pm$ 0,55	185,3 $\pm$ 9,6	0,87
	Al-Shawi	5,80 $\pm$ 0,27	1,98 $\pm$ 1,04	1,0	178,8 $\pm$ 11,0	
WK-X-50 n = 2	Sigmoidal	5,52 $\pm$ 0,11	---	2,07 $\pm$ 1,13	193,3 $\pm$ 8,9	0,46
	Al-Shawi	5,32 $\pm$ 0,19	3,47 $\pm$ 0,16	1,0	233,9 $\pm$ 22,1	
WK-X-52 n = 2	Sigmoidal	5,26 $\pm$ 0,12	---	1,18 $\pm$ 0,29	225,6 $\pm$ 10,4	0,75
	Al-Shawi	5,19 $\pm$ 0,15	2,31 $\pm$ 1,14	1,0	235,9 $\pm$ 16,3	

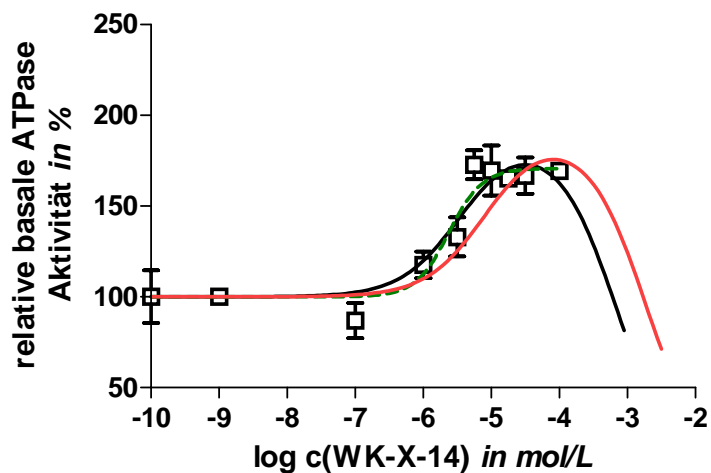
Die Tabelle 3-25 gibt eine Übersicht über die Parameter der Dosiswirkungskurven der Modulatoren. Die Substanzen WK-X-44, WK-X-49 und WK-X-50 zeigen tendenziell eine höhere Affinität als die Referenzsubstanz WK-X-24. In keinem Fall ist ein signifikanter Unterschied zwischen den  $pK_m$ -Werten, die durch die beiden Fit-Funktionen ermittelt wurden, festgestellt worden. Der gemittelte Affinitätswert  $pK_m$  von WK-X-52 ist dem Wert von WK-X-24 sehr ähnlich. Der Assay zeigt eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Daher wurden die Substanzen zum Teil mit  $n=2$  untersucht.

In den nun folgenden Abbildungen sind die Graphen der Dosiswirkungskurven der WK-X-Derivate mit 6,7-Dimethoxytetrahydroisochinolinrest aufgeführt. Auch hier ist in rot die Fit-Funktion für WK-X-24 als Referenz dargestellt.



**Abbildung 3-36.** Einfluss auf die stimulierte ATPase Aktivität durch WK-X-51

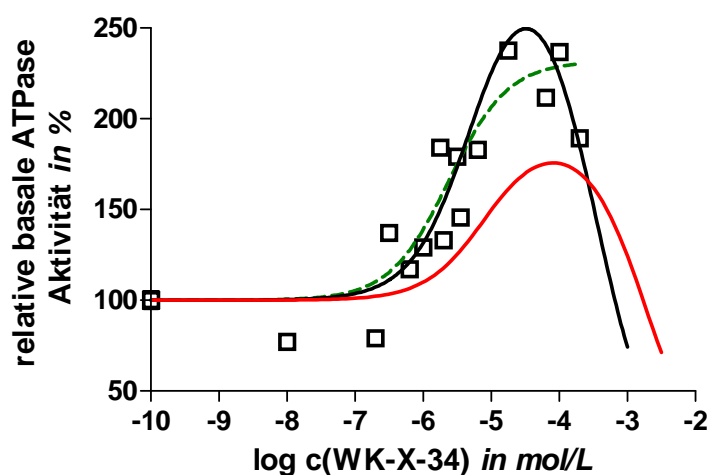
Die maximale Stimulation durch WK-X-51 ist deutlich höher als die der Substanz WK-X-24. Dieser Unterschied ist mit einem p-Wert von 0,002 auch sehr signifikant. Die Affinitäten der beiden Substanzen unterscheiden sich allerdings nicht signifikant.



**Abbildung 3-37.** Einfluss auf die stimulierte ATPase Aktivität durch WK-X-14.

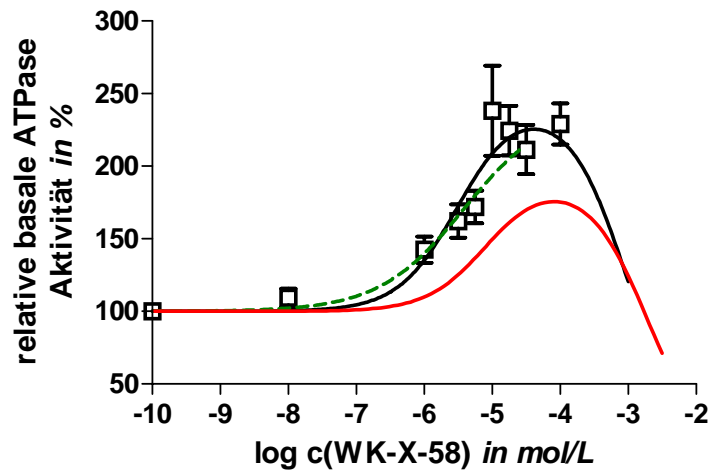
Der abfallende Ast der DWK von WK-X-14 konnte aufgrund der schlechten Löslichkeit nicht bestimmt werden. Der aufsteigende Schenkel der Al-Shawi-Funktion und die Hill Funktion verlaufen fast deckungsgleich. Die Affinitäten

der beiden Substanzen sind auch nicht signifikant voneinander unterschiedlich. Auffallend ist das die ATPase Aktivität bei Konzentration von  $10^{-7}$  mol/L unter die basale Aktivität sinkt.



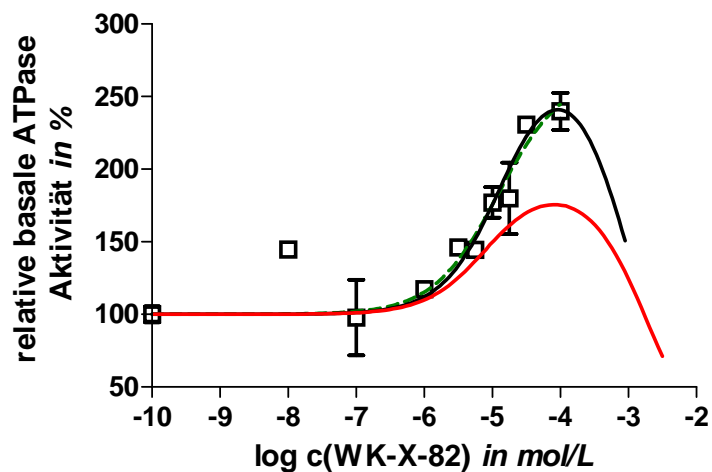
**Abbildung 3-38.** Einfluss auf die stimulierte ATPase Aktivität durch WK-X-34.

WK-X-34 zeigt eine erhöhte maximal stimulierte ATPase Aktivität als bei der der Referenz. Dieser Unterschied ist aber nicht signifikant. Bei niedrigen Konzentrationen von WK-X-34 sinkt die basale Aktivität unter dem basalen Niveau. Die Messpunkte stammen aus zwei unabhängigen Versuchen. Pro Konzentration wurde allerdings immer nur eine Bestimmung durchgeführt, deshalb sind keine Fehlerbalken bei den Messpunkten abgebildet.



**Abbildung 3-39:** Einfluss auf die stimulierte ATPase Aktivität durch WK-X-58.

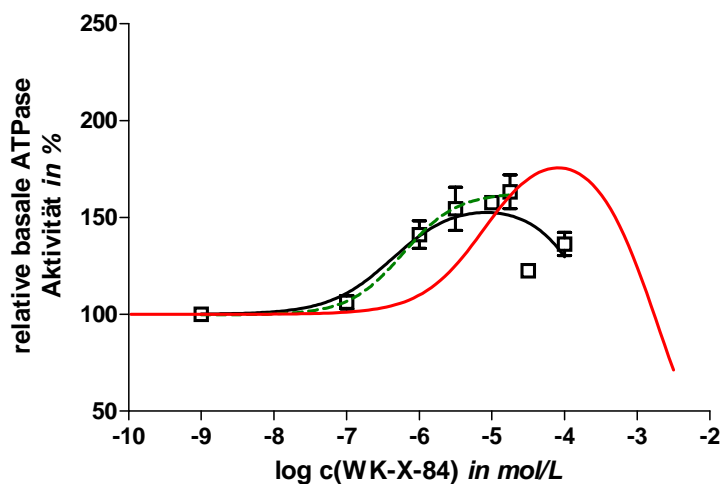
Wie die obige Abbildung zeigt WK-X-58 eine höhere Affinität zu P-Gp als WK-X-24. Die Abnahme der ATPase Aktivität bei steigenden Substratkonzentrationen konnte hier, bedingt durch die Schwerlöslichkeit der Verbindung, nicht exakt bestimmt werden.



**Abbildung 3-40:** Dosisabhängige ATPase Aktivität von WK-X-24 und WK-X-82.

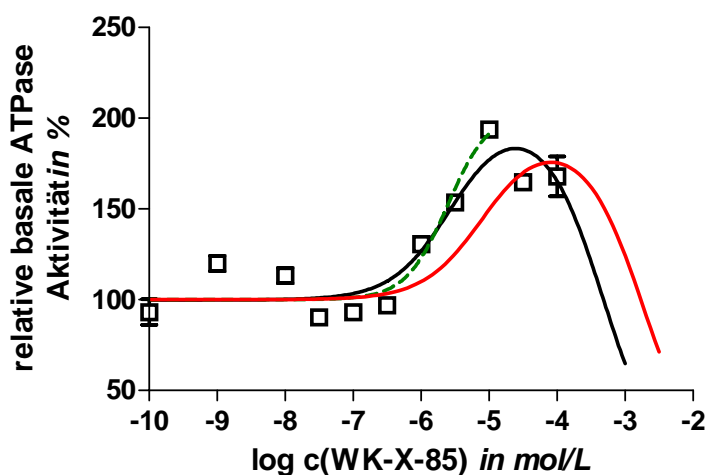
Sowohl der aufsteigende Schenkel der Al-Shawi- und der Hill-Gleichung verlaufen bei der Kurvenanpassung von WK-X-82 fast deckungsgleich. Dies bedeutet, dass ein Hill-Koeffizient von 1 die Stimulation der ATPase exakt

beschreibt. Die maximale Stimulation der ATPase Aktivität durch WK-X-82 ist auch signifikant höher als bei WK-X-24 ( $p=0,03$ ). Die Affinitäten weisen keinen signifikanten Unterschied auf.



**Abbildung 3-41.** Einfluss auf die stimulierte ATPase Aktivität durch WK-X-84.

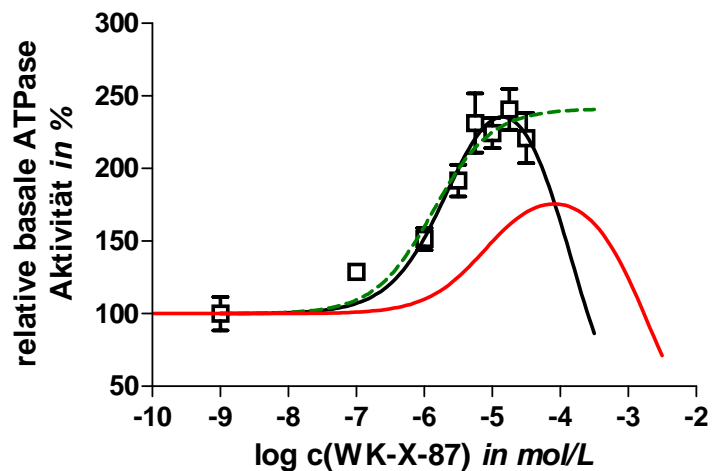
Die Verbindung WK-X-84 zeigt die deutlichste Affinitätserhöhung im Vergleich zu WK-X-24. Sie ist mit einem p-Wert von 0,04 auch signifikant. Die maximale Stimulation ist allerdings sehr niedrig.



**Abbildung 3-42.** Einfluss auf die ATPase Aktivität durch WK-X-82.

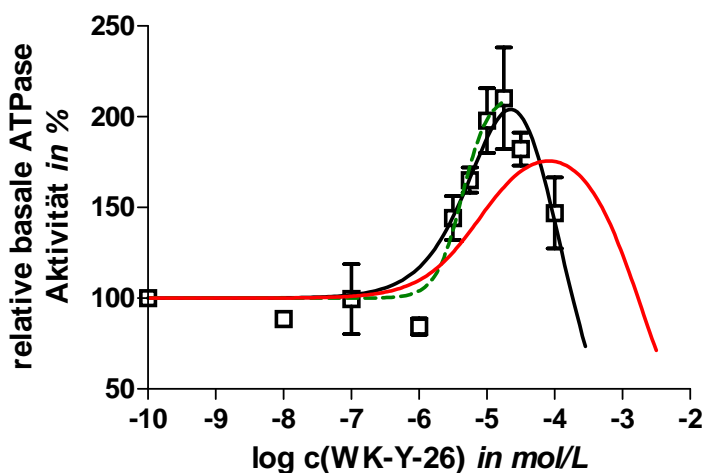


Die Affinität von WK-X-85 ist höher als die von WK-X-24. Die  $D_{\max}$  bzw. Top Werte der beiden Substanzen sind allerdings sehr ähnlich. Auffällig ist das bei niedrigen Konzentrationen eine leichte Stimulation der ATPase Aktivität stattfindet, die bei einer Konzentration von  $10^{-7,5}$  mol/L erst inhibiert wird, bevor sie dann wieder ansteigt.



**Abbildung 3-43.** Einfluss auf die ATPase Aktivität durch WK-X-87.

Der Graph der Substanz WK-X-87 zeigt zwar eine höhere Affinität zu P-Gp als die Referenz, diese ist aber mit  $p=0,057$  nicht signifikant. Die höhere relative Stimulation von WK-X-87 ist allerdings mit einem  $p$ -Wert von 0,027 signifikant.



**Abbildung 3-44.** Einfluss auf die stimulierte ATPase Aktivität durch WK-Y-26.

WK-Y-26 zeigt bei niedrigen Konzentrationen auch eine Inhibition der basalen Aktivität. Die maximale ATPase Aktivität von WK-Y-26 ist aber nicht signifikant höher als bei WK-X-24. Bedingt durch das Absinken der Aktivität unter basalem Niveau bei  $10^{-6}$  mol/L, ist der Hill-Koeffizient größer als 1. Der hohe Standardfehler bei dem Hill-Koeffizienten ist durch die Fixierung des basalen Niveaus auf 100% zu erklären.

Die Mittelwerte der  $pK_m$ -Werte für jeweils eine Substanz, ermittelt durch die Al-Shawi und die Sigmoidal Funktion, sind bei allen Verbindungen nicht signifikant unterschiedlich. Dies kann man bereits daran erkennen, dass sich die Standardabweichungen überlappen. Der p-Wert eines t-Tests auf Prüfung eines signifikanten Unterschiedes bestätigt diese Aussage.

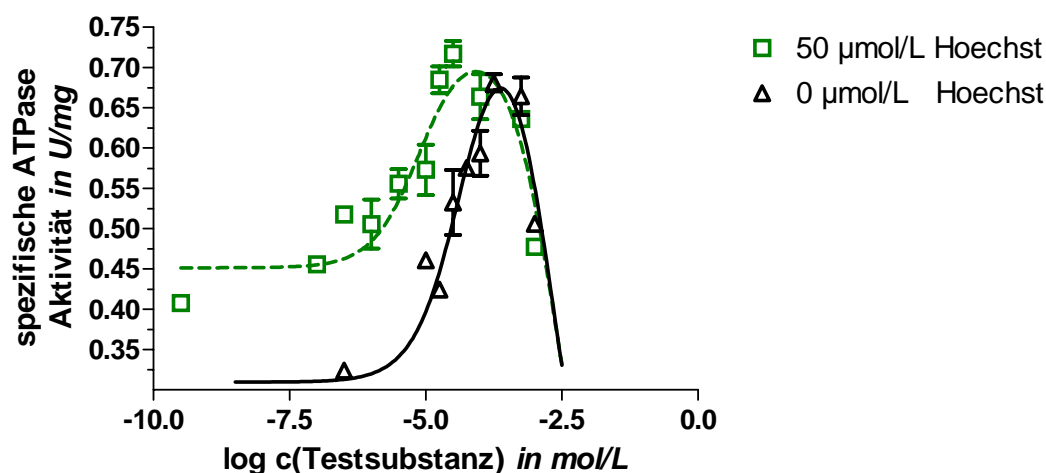
**Tabelle 3-26.** Charakteristika der DWK der WK-Verbindungen mit 6,7-Dimethoxytetrahydroisochinolin Rest. Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die Spalte „p“ gibt den p-Wert des t-Tests auf Prüfung eines signifikanten Unterschieds der  $pK_m$ -Werte der beiden Fit-Funktionen wieder.

Verbindung	Kurven-Anpassung	$pK_m \pm SE$	$pK_i \pm SE$	Hill-Koeffizient	$D_{max}/Top$	p
WK-X-14 (n = 2)	Sigmoidal	5,62 $\pm$ 0,13	---	1,78 $\pm$ 0,76	170,7 $\pm$ 7,42	0,63
	Al-Shawi	5,46 $\pm$ 0,25	3,17 $\pm$ 0,61	1,0	189,8 $\pm$ 20,9	
WK-X-34 (n = 2)	Sigmoidal	5,55 $\pm$ 0,23	---	1,07 $\pm$ 0,47	225,5 $\pm$ 25,1	0,47
	Al-Shawi	5,27 $\pm$ 0,22	3,49 $\pm$ 0,28	1,0	303,5 $\pm$ 51,3	
WK-X-51 (n = 4)	Sigmoidal	5,29 $\pm$ 0,13	---	1,01 $\pm$ 0,21	411,5 $\pm$ 32,3	0,21
	Al-Shawi	4,96 $\pm$ 0,19	3,93 $\pm$ 0,23	1,0	606,7 $\pm$ 146,1	
WK-X-58 (n = 3)	Sigmoidal	5,60 $\pm$ 0,19	---	1,15 $\pm$ 0,57	230,4 $\pm$ 18,8	0,79
	Al-Shawi	5,51 $\pm$ 0,25	3,01 $\pm$ 0,94	1,0	245,3 $\pm$ 29,4	
WK-X-82 (n = 2)	Sigmoidal	4,91 $\pm$ 0,21	---	0,91 $\pm$ 0,25	265,8 $\pm$ 27,5	0,84
	Al-Shawi	4,84 $\pm$ 0,23	3,0 $\pm$ 0,83	1,0	288,7 $\pm$ 59,7	
WK-X-84 (n = 2)	Sigmoidal	6,23 $\pm$ 0,20	---	1,17 $\pm$ 0,55	162,8 $\pm$ 6,5	0,88
	Al-Shawi	6,15 $\pm$ 0,40	3,67 $\pm$ 0,23	1,0	180,2 $\pm$ 16,2	
WK-X-85 (n = 3)	Sigmoidal	5,61 $\pm$ 0,34	---	1,41 $\pm$ 0,75	204,0 $\pm$ 37,1	0,90
	Al-Shawi	5,55 $\pm$ 0,27	3,33 $\pm$ 0,36	1,0	203,6 $\pm$ 26,1	
WK-X-87 (n = 4)	Sigmoidal	5,87 $\pm$ 0,17	---	1,02 $\pm$ 0,40	241,2 $\pm$ 16,4	0,38
	Al-Shawi	5,59 $\pm$ 0,24	3,87 $\pm$ 0,39	1,0	289,0 $\pm$ 47,2	
WK-Y-26 (n = 2)	Sigmoidal	5,36 $\pm$ 0,12	---	2,26 $\pm$ 1,15	212,7 $\pm$ 21,5	0,95
	Al-Shawi	4,89 $\pm$ 0,38	4,12 $\pm$ 0,34	1,0	359,3 $\pm$ 172,9	

### 3.3.3 Kombinationsversuche

P-Gp besitzt mindestens zwei unterschiedliche Bindungsstellen, die innerhalb der Membran lokalisiert sind. Der klassische Ligand für die R-Seite ist das Rhodamin 123 und für die H-Seite das Hoechst 33342. Loo *et al.* zeigten, dass Hoechst die ATPase Aktivität von P-Gp inhibiert [62]. Die Untersuchungen dieser Arbeit in Kapitel 3.3.1 und die von Jens Meyer (AK Wiese, bisher nicht veröffentlicht) zeigten allerdings, dass Hoechst sehr wohl auch die ATPase Aktivität von P-Gp stimuliert. Die maximale Stimulation der Aktivität durch Hoechst 33342 ist jedoch gering.

Durch die Bestimmung der ATPase Aktivität von Rhodamin 123 in Kombination mit Hoechst 33342 sollte der Effekt auf die R-Seite untersucht werden. Hierzu wurde eine DWK von Rhodamin 123 in Gegenwart einer fixen Konzentration von Hoechst 33342 aufgenommen.



**Abbildung 3-45.** DWK von Rhodamin 123 bei pH 7,4, 37°C. Die Auswertung erfolgte durch nichtlineare Regression mit der Gleichung 2-10. Die Ordinate zeigt die spezifische ATPase Aktivität in  $\mu\text{mol P/min/mg}$ . Die Abszisse ist die logarithmische molare Konzentration.

Die Abbildung 3-45 zeigt die ATPase Aktivität von Rhodamin 123 alleine und in Gegenwart von 50  $\mu\text{mol/L}$  Hoechst 33342. Die ATPase Aktivität von Rhodamin 123 wurde ebenfalls in Gegenwart von 30  $\mu\text{mol/L}$  Hoechst 33342 bestimmt. (siehe Tabelle 3-27).

**Tabelle 3-27.** DWK von Rhodamin 123 in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Hoechst 33342. Die Auswertung erfolgte nach der Al-Shawi-Gleichung. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt.

Versuch	$pK_m \pm SE$	$pK_i \pm SE$	B	$D_{\max}$
Rhodamin + 0 $\mu\text{mol/L}$ Hoechst (n = 2)	4,40 $\pm$ 0,21	2,60 $\pm$ 0,24	0,32 $\pm$ 0,03	0,80 $\pm$ 0,10
Rhodamin + 30 $\mu\text{mol/L}$ Hoechst <sup>a</sup> (n = 1)	4,77 $\pm$ 0,19	n.b.	0,33 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,04*
Rhodamin + 50 $\mu\text{mol/L}$ Hoechst <sup>b</sup> (n = 2)	5,10 $\pm$ 0,23	2,59 $\pm$ 0,16	0,45 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,04

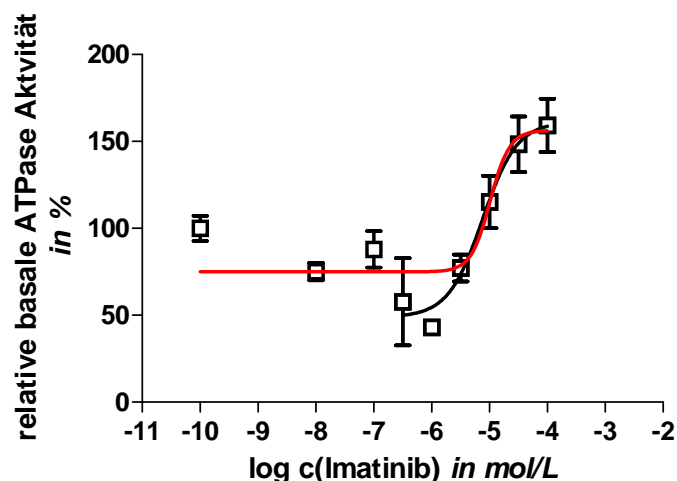
\* Die Versuche wurden mit der Sigmoidal-Funktion Hill-Koeffizient = 1 ausgewertet. Dies entspricht dem aufsteigenden Schenkel der Gleichung von Al-Shawi.

<sup>a</sup> Kein signifikanter Unterschied zu dem  $pK_m$ -Wert ohne Hoechst ( $p = 0,23$ )

<sup>b</sup> Signifikanter Unterschied zu dem  $pK_m$ -Wert ohne Hoechst ( $p = 0,04$ ). Extrem signifikanter Unterschied der Bottom-Werte ( $p < 0,01$ ).

Die Versuche zeigen, dass bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{mol/L}$  Hoechst 33342 die Affinität von Rhodamin zu P-Gp signifikant erhöht ist. Allerdings

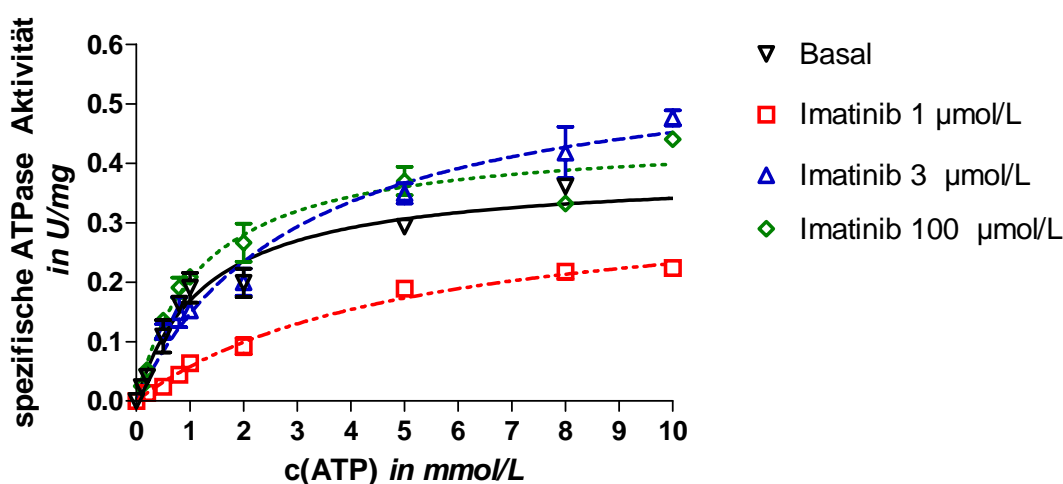
hat Hoechst 33342 keinen Einfluss auf den  $pK_i$ -Wert von Rhodamin 123. Auffallend ist, dass auch die basale ATPase Aktivität in Gegenwart von 50  $\mu\text{mol/L}$  Hoechst 33342 signifikant erhöht ist. Dies bedeutet unter anderem, dass Hoechst 33342 die basale ATPase Aktivität von P-Gp stimuliert. Dies konnte in Kapitel 3.3.1 gezeigt werden. Dieses Ergebnis wird durch die Untersuchungen von Jens Meyer (nicht publizierte Ergebnisse) unterstützt. Die Untersuchungen zeigten, dass die beiden Bindungsstellen in gegenseitiger Wechselwirkung stehen. Die maximale Stimulation wird allerdings nicht um den Wert von Hoechst erhöht, denn die maximale Stimulation ist nicht signifikant unterschiedlich zu dem Versuch ohne Hoechst Zusatz wie die Tabelle 3-27 zeigt. Die Affinität von Rhodamin verschiebt sich aber durch den Einfluss von Hoechst. Dies bedeutet, dass die beiden Bindungsstellen in gegenseitiger Wechselwirkung stehen.



**Abbildung 3-46.** DWK von Imatinib bei pH 7,4, 37°C ( $n = 2$ ). Die Auswertung erfolgte durch nichtlineare Regression mit der Hill-Gleichung. Die Kurvenanpassung ergab folgende Parameter für die schwarze Linie:  $pK_m = 5,12 \pm 0,19$ ; Hill-Slope =  $1,46 \pm 0,89$ ; Top =  $161,3 \pm 17,0\%$  Bottom =  $48,9 \pm 15,4\%$ . Die Kurvenanpassung ergab folgende Parameter für die rote Linie:  $pK_m = 4,99 \pm 0,13$ ; Hill-Slope =  $2,60 \pm 3,13$ ; Top =  $156,0 \pm 13,0\%$ ; Bottom =  $75,0 \pm 6,4\%$ .

Bei der Aufnahme der Dosiswirkungskurve von Imatinib (Abbildung 3-46) konnte im submikromolarem Bereich eine deutliche Senkung der ATPase Aktivität bis unterhalb der basalen Aktivität gezeigt werden. Um die maximale Absenkung der ATPase Aktivität zu erfassen, wurde der Datensatz zweimal

gefittet. Die rote Linie passt die Kurve über den gesamten Datenbereich an. Hierbei ergab sich ein Bottom Wert von 75%. Die maximale Absenkung ergibt sich aus dem Bottom Wert der schwarzen Kurve mit 48,9%. Der Datensatz wurde hierbei ohne die Werte von  $10^{-7}$  mol/L bis  $10^{-10}$  mol/L Imatinib gefittet. Die somit ermittelten Affinitätswerte für Imatinib von 5,12 und 4,99 zeigen keinen signifikanten Unterschied zueinander auf. Bei höheren Konzentrationen stieg die ATPase Aktivität allerdings wieder an. Bei Imatinib handelt es sich um einen Tyrosin-Kinase Inhibitor, daher liegt die Vermutung nahe, dass es mit der ATP-Bindungsstelle von P-Gp interagieren könnte und hierdurch die Inhibition der ATPase Aktivität erklärt werden kann. Um die Interaktion der Substanz mit der ATP-Bindungsstelle aufzuzeigen wurde der  $K_m$ -Wert von ATP an P-Gp in Gegenwart fixer Konzentrationen von Imatinib bestimmt.



**Abbildung 3-47.** Michaelis-Menten Kinetik von ATP in Gegenwart verschiedener Konzentrationen Imatinib. Da unterschiedliche Aufreinigungschargen für die Versuche verwendet wurden, sind die spezifischen Aktivitätswerte entsprechend der Ausrichtung des P-Gp (ermittelt durch den CHAPS Assay) korrigiert worden.

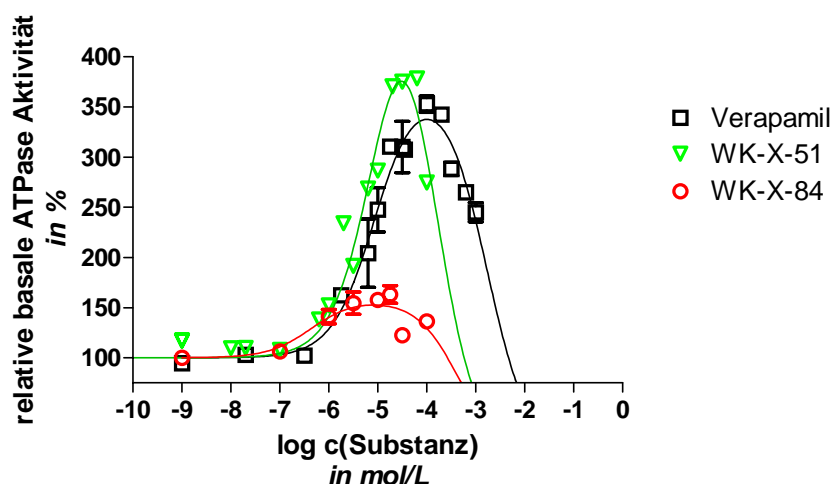
**Tabelle 3-28.** Die Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  wurden mit der Michaelis-Menten-Gleichung berechnet. Die Versuche wurden als Duplikate durchgeführt.

Versuch	$K_m$ (mmol/L)	$V_{max}$ (U/mg)
0 µmol/L Imatinib basal	1,28±0,25	0,38±0,03
1 µmol/L Imatinib	5,03±0,71	0,35±0,02
3 µmol/L Imatinib	3,03±0,61	0,58±0,04
100 µmol/L Imatinib	1,84±0,48	0,56±0,05

Imatinib scheint auch die ATP-Bindungsstelle von P-Gp zu beeinflussen. Im Gegensatz zu dem Modulator Verapamil erniedrigt Imatinib die Affinität von P-Gp für ATP. Es findet aber ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{mol/L}$  eine erhöhte ATPase Aktivität statt. Dies könnte auf einen eventuellen Transport von Imatinib bei höheren Konzentrationen hindeuten oder auf eine Interaktion mit einer regulatorischen Bindungsstelle.

### 3.4 Diskussion der ATPase Affinitätsdaten

In der folgenden Abbildung werden die durch den ATPase Assay ermittelten Affinitätskurven der Substanzen WK-X-51, WK-X-84 und Verapamil zum besseren Vergleich in einem Graphen dargestellt.



**Abbildung 3-48.** Dosisabhängige ATPase Aktivität von Verapamil, WK-X-51 und WK-X-84. Die Kurvenanpassung erfolgte mit der Al-Shawi-Gleichung.

Der obige Graph verdeutlicht den Unterschied in der maximalen relativen Stimulation der ATPase Aktivität zwischen WK-X-84 und WK-X-51. WK-X-84 vertritt hierbei stellvertretend alle anderen untersuchten WK-X-Modulatoren bei denen die maximale Stimulation der ATPase Aktivität sehr niedrig ist. Eine ähnlich niedrige Stimulation zeigt auch die Substanz Hoechst (nicht veröffentlichte Daten von Jens Meyer). WK-X-51 verhält sich allerdings sehr

atypisch für einen Vertreter dieser Modulatorengruppe. Es stimuliert nämlich die ATPase Aktivität bezogen auf die basale Aktivität mit dem Faktor  $\sim 3,75$ , ähnlich wie Verapamil oder Rhodamin 123. Würde man nur die Stimulation der ATPase Aktivität durch den Modulator zur Charakterisierung heranziehen, könnte man mutmaßen, dass der Grossteil der Substanzen sich wie Hoechst verhält und somit mit dessen Bindungsstelle in Wechselwirkung tritt und dagegen die Substanz WK-X-51 vermehrt mit der Rhodamin 123 Bindungsstelle. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, dass WK-X-51 in dem Hoechst Assay (persönliche Mitteilung von Henrik Müller) die höchste Affinität im Vergleich mit den anderen WK-X-Modulatoren zeigt. Dieser Assay bestimmt mit Hilfe der Eigenfluoreszenz von Hoechst *in vitro* den Einfluss von Modulatoren auf den Transport von Hoechst und somit auf dessen Bindungsstelle. Die Schlussfolgerung ist, dass unter alleiniger Heranziehung der ATPase Affinitätsdaten keine Aussagen zu eventuellen Bindungsstellen der untersuchten Substanzen gemacht werden können.

Für eine komplette Charakterisierung der Substanzen im Hinblick auf ihre Affinität zu P-Gp existieren in der Literatur noch andere funktionelle Assay Systeme. Hierunter fällt zum Beispiel der Calcein-AM-Assay und Assays die auf der Durchflusszytometrie basieren. Die P-Gp Aktivität wird in diesen Systemen an intakten Säugerzellen bestimmt, die P-Gp überexprimieren [38;60].

Im folgendem wird kurz das Prinzip der beiden Assay-Systeme beschrieben:

1. Calcein-acetoxymethyl-ester (Calcein-AM) ist ein Substrat von P-Gp, das nicht fluoresziert. In der Zelle wird es durch unspezifische Esterasen zu fluoreszierendem Calcein gespalten. Das Calcein-Anion stellt kein Substrat von P-Gp dar. Modulatoren hemmen den Efflux von Calcium-AM durch P-Gp, dadurch kommt es zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration, die wiederum zu einer Zunahme der Calcein-Konzentration und damit der Fluoreszenz führt. Die Zunahme der intrazellulären Calcein Konzentration wird fluorimetrisch bestimmt [73;109]. Die Abbildung 3-49 zeigt schematisch die Funktionsweise des Calcein Assays.



2. Mit einem Durchflusszytometer wird der Einfluss von Modulatoren auf die Kinetik des Transports von Daunorubicin in Zellen bestimmt, die P-Gp überexprimieren [12].

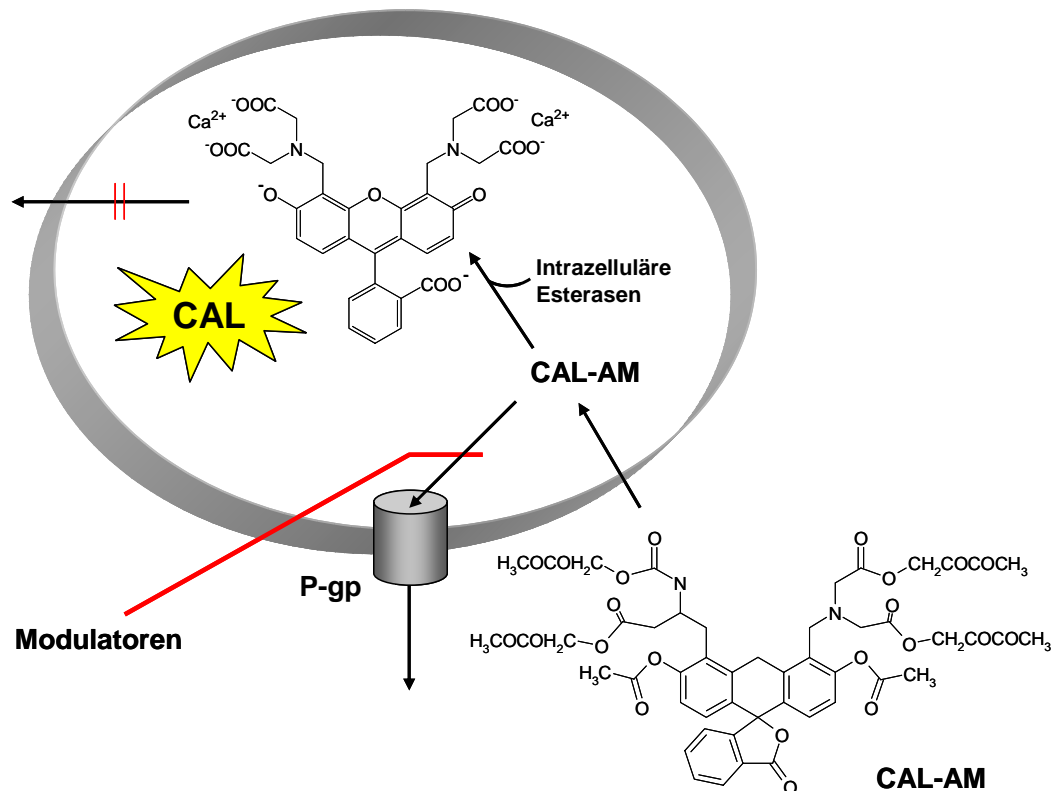


Abbildung 3-49. Calcein-AM Assay [48].

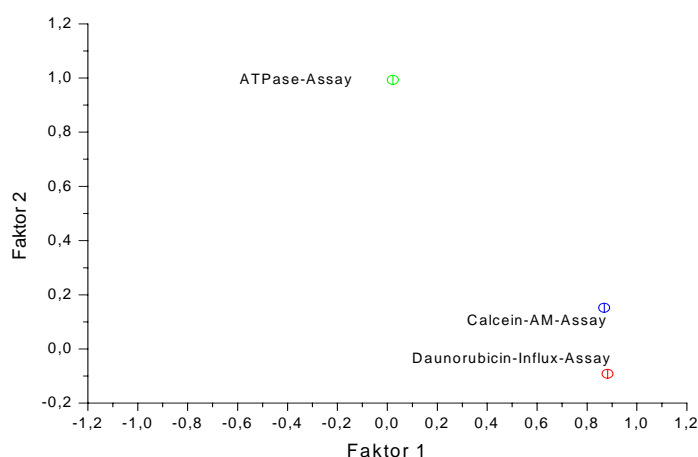
Die bisherigen Untersuchungen der neuen Modulatoren konnten zwar zeigen, dass sie Affinität zu P-Gp besitzen und dessen ATPase Aktivität steigern, aber die Modulatoren verhielten sich im Bezug auf ihre Affinität zu P-Gp sehr ähnlich. Deswegen wurde die Affinität der Substanzen ebenfalls in den oben beschriebenen Zell-Assays bestimmt. Aus der Tabelle 3-1 können die Mittelwerte der Affinitätsdaten die einer Hauptkomponentenanalyse unterzogen worden sind, entnommen werden. Insgesamt sind 16 Substanzen, unterschiedlicher Klassen, in diese Analyse mit einbezogen worden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 3-29.** Mittelwerte der Affinitätsdaten ausgewählter Modulatoren bestimmt durch unterschiedliche Assays. <sup>1</sup>bestimmt durch Kerstin Breitbach <sup>2</sup> bestimmt durch Henrik Müller

Modulator	Daunorubicin-Influx <sup>1</sup>	ATPase-Assay	Calcein-AM-Assay <sup>2</sup>
Verapamil	5,32	4,92	5,32
Imatinib	5,76	4,74	5,29
Nicardipin	5,41	5,77	5,28
WK-X-14	5,41	5,46	5,05
WK-X-24	6,86	5,09	6,31
WK-X-34	7,09	5,27	6,39
WK-X-44	6,51	5,82	5,98
WK-X-49	5,38	5,8	5,77
WK-X-50	5,81	5,32	6,09
WK-X-51	5,79	4,96	6,25
WK-X-52	5,13	5,19	6,25
WK-X-58	5,4	5,51	5,15
WK-X-82	6,17	4,84	5,41
WK-X-84	5,98	6,15	6,31
WK-X-87	6,17	5,59	6,2
WK-Y-26	5,73	4,89	6,03

Der Faktor-Plot dieser Analyse ist in Abbildung 3-50 abgebildet. Die beiden zellbasierten Assays können fast vollständig durch den Faktor 1 beschrieben werden, dagegen ist der ATPase-Assay nahezu orthogonal zu dem Calcein-AM und Daunorubicin-Influx Assay angeordnet.



**Abbildung 3-50.** Faktorplot der Hauptkomponentenanalyse. (Die Hauptkomponentenanalyse wurde mit dem Programm SPSS Version 11 durchgeführt.)

Die Hauptkomponentenanalyse zeigt somit keinerlei Korrelation zwischen dem ATPase-Assay und den zellbasierten Assays. Der Effekt der durch den ATPase Assay gemessen wird, ist also ein vollkommen anderer als der durch die Zellassays bestimmt wird.

Wie ist dies zu erklären? Hierzu folgende Überlegung: allen Assays gemeinsam ist, dass die Funktion von P-Gp in Gegenwart von Modulatoren vermessen wird. Der Zustand in dem sich das P-Gp in den Messsystemen vor der Zugabe des zu bestimmenden Modulators befindet, ist aber ein anderer. Es fällt ein Unterschied auf:

In den beiden zellbasierten Assay-Systemen befindet sich das P-Gp zu Beginn in einem aktiven Zustand. Es pumpt nämlich die Substrate Calcein-AM bzw. Daunorubicin aus der Zelle, durch die Zugabe eines Modulators in aufsteigenden Konzentrationen wird die Pumpfunktion des stimulierten P-Gp allosterisch oder kompetitiv beeinflusst. Die gemessenen Affinitätsdaten sind also abhängig von dem P-Gp aktivierenden Substrat und beziehen sich auf ein zuvor aktives Protein.

Bei dem ATPase Assay wird der direkte Einfluss eines Substrats auf die Hydrolysegeschwindigkeit von reinem P-Gp bestimmt. Hieraus lässt sich eine mögliche Erklärung für die Divergenz zu den anderen Affinitätsdaten ableiten, da bei dem ATPase-Assay keine Konkurrenzsituation gemessen wird, sondern die direkte Affinität. Da es bei der Hydrolyse von ATP durch das Protein einen Substanztransport gekoppelten und einen nicht gekoppelten Weg (siehe Einleitung) gibt, kann die gemessene ATPase Aktivität nicht unbedingt immer für eine Transportfunktion stehen. Einige Modulatoren wie z.B. das Progesteron steigern zwar die ATPase Aktivität, werden aber nicht transportiert. Bei den beiden Zellassays wird aber die Inhibition eines Transports beobachtet. Für weiterführende Untersuchungen in nachfolgenden Arbeiten müsste der Einfluss von P-Gp-Modulatoren auf die ATPase Aktivität von Calcein-AM bzw. Daunorubicin aktiviertem P-Gp bestimmt werden. Diese ATPase Daten würden die Inhibition durch die Modulatoren aufzeigen und nicht wie in dieser Arbeit die direkte Affinität. Die

zellbasierten Assays sind im Gegensatz zu den ATPase System ein sehr komplexes System welches aus mehreren Kompartimenten besteht. Bei dem zellbasierten System wird nämlich angenommen das der Transport des Substrats der geschwindigkeitslimitierende Schritt ist. Bedingt durch die unterschiedlichen Kompartimente kann aber auch zum Beispiel die Spaltung des Esters der geschwindigkeitslimitierende Schritt sein. Dies macht das Testsystem sehr komplex und die hierdurch ermittelten Affinitätsdaten können durch die anderen Prozesse beeinflusst werden. Dagegen ist der ATPase Assay ein sehr simples System in dem ein P-Gp abhängiger Prozess definitiv den geschwindigkeitslimitierenden Schritt bildet. Daher ist das Ergebnis, das der ATPase Assay nicht korrelierende Werte zu den zellbasierten Assays liefert nicht ganz unerwartet.

### **3.5 Diskussion der Dosis-abhängigen ATPase Aktivitätsdaten**

#### 3.5.1.1 Konzentration von ATP in den Reaktionen

In Kapitel 3.3.2 wurde die Stimulation der ATPase Aktivität von P-Gp durch Inhibitoren, basierend auf der Grundstruktur von Tariquidar, untersucht. Diese Methodik ist in der Literatur bereits beschrieben [35;37;88;102]. Jedoch benutzen alle dem Autor bekannten systematischen Screening Untersuchungen heterogenes P-Gp aus Zellmembranen von transfizierten SF9-Zellen oder diversen Säugerzellen. Andere ATPasen in der Membran werden dabei durch Pufferzusätze inhibiert. Generell findet man in der Literatur EGTA zur Komplexbildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, um die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und  $\text{NaN}_3$ , um die Protonenpumpe ( $\text{H}^+$ -ATPase) zu hemmen, als Pufferbestandteile. Natriumazid verringert die katalytische Kooperativität der drei ATP-Bindungsstellen der Protonenpumpe untereinander. Die Assays werden in der Literatur auch bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt (pH 6,8-pH 7,4). Diese Abweichung über mehr als eine halbe logarithmische Einheit hat einen sehr großen Einfluss auf den Protonierungsgrad der Modulatoren und damit auf ihre Lipophilie und

eventuell auf ihre Affinität zu P-Gp. Ein weiteres Problem stellen andere ABC-Transporter, die in den Zellen und somit in den Membranen vorhanden sind, dar. Die Transporter MRP und BCRP besitzen ebenfalls eine breite Substratspezifität, die sich zum Teil mit der von P-Gp überlappt. Sie sollten zwar in den verwendeten Membranen unterrepräsentiert sein, wenn das P-Gp überexprimiert ist. Manche Methoden zur Erzeugung von Zellen die P-Gp überexprimieren, steigern nicht nur die Expression von P-Gp, sondern auch die von anderen Transporten. Dies kann zum Beispiel der Fall sein, bei dem die Zellen mit einem Zytostatikum gestresst werden.

Um nur die reine Stimulation der ATPase zu messen wurde in dieser Arbeit nur homogenes P-Gp verwendet. Die Reinheit der Präparationen, die zur ATPase Aktivitäts-Bestimmung herangezogen wurden, lag bei über 90%. Zusätzlich wurden auch ATPase maskierende Pufferbestandteile (EGTA,  $\text{NaN}_3$ ) dem Reaktionspuffer zugesetzt, um zu gewährleisten dass nur der Effekt der Substrate an P-Gp gemessen wurde. Viele Literaturstellen machen im Hinblick auf die ATPase Aktivität nur qualitative Aussagen. Sie messen nur eine bis maximal vier Konzentrationen des Modulators und treffen eine Ja/Nein Aussage im Bezug auf die basale ATPase Aktivität [37;88]. Zudem werden nur Endpunkt-Bestimmungen der ATPase Reaktion vorgenommen. In dieser Arbeit ist die Kinetik der ATPase-Reaktion immer über vier Zeitpunkte bestimmt worden. Bei einer Zweipunktbestimmung würden Fehler unentdeckt bleiben. Würde man bei einer Dreipunktbestimmung einen Ausreisser haben, dann wäre unklar welcher der drei Messpunkte abweicht. Deshalb wurden vier Messpunkte bestimmt. Dies erklärt auch die sehr gute Reproduzierbarkeit der Messungen und daher konnten die Versuche zum Teil auch nur mit  $n=2$  durchgeführt werden. Ein weiterer Unterschied bei P-Gp ATPase Messungen in der Literatur ist die eingesetzte Konzentration von ATP. Viele Untersuchungen in der Literatur verwenden eine Konzentration von 2 mmol/L ATP. Al-Shawi et al. verwenden dagegen 10 mmol/L ATP [2]. Um zu entscheiden, welche Konzentration an ATP eingesetzt werden sollte, wurde die basale und durch 130  $\mu\text{mol/L}$  Verapamil stimulierte Michaelis-Menten Konstante von ATP bestimmt. In Gegenwart von Verapamil

( $K_m = 0,771 \pm 0,062$  mmol/L) ist die Affinität für ATP im Vergleich zur basalen Aktivität ( $K_m = 1,28 \pm 0,25$  mmol/L) erhöht (Tabelle 3-13). Der  $K_m$ -Wert ist durch die Anwesenheit des Modulators verändert. Wie Tabelle 4-11 darstellt, gibt es Substanzen (z.B. Imatinib), die zum Teil mit der ATP-Bindungsstelle konkurrieren und damit in der Lage sind die Affinität von ATP zu P-Gp zu erniedrigen. Um sicherzustellen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit immer maximal und somit unabhängig von der ATP-Konzentration ist, wurde eine ATP mit einer Konzentration von 10 mmol/L in den ATPase Assays eingesetzt, um zu gewährleisten, dass man immer in Gegenwart eines Überschusses an ATP arbeitet. Die Versuche mit dem Tyrosinkinase Inhibitor Imatinib zeigten eindrucksvoll, dass bei niedrigen Konzentrationen des Modulators der  $K_m$ -Wert für ATP bis auf 5 mmol/L ansteigt.

#### 3.5.1.2 Einfluss der der WK-X Verbindungen auf die ATPase Aktivität

Wie die Untersuchungen der WK-X-Verbindungen zeigen, stimulieren alle Derivate die P-Gp ATPase Aktivität. Diese Erkenntnis ist besonders interessant, da die WK-X-Verbindungen Strukturanaloga des Inhibitors Tariquidar sind. Dieser wurde im Hinblick auf seine *in vitro* und *in vivo* Inhibition von P-Gp bereits in der Literatur untersucht. In Gegenwart von 25 - 80 nmol/L Tariquidar wurde die Wirkung von Zytostatika in unterschiedlichen menschlichen und Nager-Zelllinien potenziert und die MDR der Zellen hierdurch überwunden [71]. Efflux-Studien und Akkumulationsassays von Rhodamin 123 und [<sup>3</sup>H]Daunorubicin *in vitro* eine Inhibition der P-Gp Aktivität. Der Effekt hielt *in vitro* für mehr als 22 Stunden an. Der Effekt von Verapamil war dagegen bereits nach 60 Minuten aufgehoben. Dies impliziert, dass Tariquidar nicht transportiert wird. Tariquidar inhibiert auch die ATPase Aktivität von durch Nicardipin aktiviertem P-Gp [72].

Untersuchungen von Tariquidar-Analogen hinsichtlich ihres direkten Einflusses auf die basale ATPase Aktivität sind bisher nicht durchgeführt worden. Daher wurde für eine repräsentative Auswahl von Tariquidar-

Strukturanaloga der Einfluss auf die basale ATPase Aktivität von P-Gp gemessen.

Die Versuche wurden analog für alle untersuchten WK-X-Verbindungen durchgeführt. Alle Substanzen zeigen eine konzentrationsabhängige Steigerung der basalen ATPase, die im unteren mikromolaren Bereich beginnt. Die  $D_{\max}$ -Werte der Substanzen schwanken um die 200 - 300%. Nur der  $D_{\max}$ -Wert von WK-X-51 lag bei mehr als 600%. Dies ist ein signifikanter Unterschied zu den ATPase Hydrolyse Stimulationen durch die übrigen WK-X-Verbindungen.

Die Substanz WK-X-58 unterscheidet sich strukturell von WK-X-51 nur dadurch, dass der Chinolin-Rest an der Position 2 anstatt an Position 3 ankondensiert ist. Der  $K_m$ -Wert von WK-X-58 zeigt mit 3,09  $\mu\text{mol/L}$  eine höhere Affinität als WK-X-51 mit 10,96  $\mu\text{mol/L}$ . Der Unterschied ist zwar nicht signifikant, zeigt aber eine Tendenz auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass die sterische Ausrichtung des Wasserstoffakzeptors Stickstoffs im Chinolin-Ring einen Einfluss auf die Affinität zu P-Gp hat. Die Steigerung der basalen ATPase Aktivität ( $D_{\max}$ -Wert) könnte somit auch hierdurch beeinflusst werden, da WK-X-51 einen  $D_{\max}$  von 606,7 % und WK-X-58 einen von 245,3 % besitzt. Wie der Vergleich von WK-X-51 mit WK-X-52 zeigt, scheinen somit die Methoxy-Gruppen am Isochinolin-Ring einen Einfluss auf die maximale ATPase Aktivität zu besitzen. Die Substanz WK-X-52 ist nämlich bis auf die Substitution der zwei Methoxygruppen am Isochinolin Ring mit WK-X-51 identisch. Der  $D_{\max}$ -Wert von WK-X-52 ist mit einem  $D_{\max}$  von 236 % hingegen nicht signifikant verschieden von den übrigen WK-X-Verbindungen, wie es bei WK-X-51 der Fall ist.

Die Substanz WK-X-51 zeigt zunächst bei niedrigen Konzentrationen eine deutliche Steigerung der ATPase Aktivität, die nach Erreichen eines Maximums bei ca. 32  $\mu\text{mol/L}$  in eine deutliche Abnahme der ATPase Aktivität bei höheren Konzentrationen ( $pK_i$ -Wert) übergeht. Die halbmaximale Inhibition tritt um den Faktor 9,6 früher auf als im Vergleich mit Verapamil. In der Literatur wird die Abnahme der ATPase Aktivität von P-Gp in Gegenwart

hoher Konzentrationen an Substrat damit erklärt, dass die extrazytosolische, abgebende Bindungsstelle ebenfalls besetzt ist und es hierdurch zu einer Blockade der Transportfunktion bzw. der ATPase Aktivität kommt [81]. Alle untersuchten WK-X Verbindungen zeigen tendenziell das Verhalten, dass sie die ATPase Aktivität bei hoher Substanzkonzentration hemmen. Diese Effekte könnten so interpretiert werden, dass die WK-X Verbindungen die aufnehmende und die abgebende Bindungsstelle von P-Gp besetzen können.

Durch Radioligand-Bindungsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Konformationsänderung des P-Gp während des Transports von Vinblastin auftritt. Hierbei geht die Vinblastin-Bindungsstelle aus einen hochaffinen Zustand in einen niedrigaffinen Zustand über [69]. Da auch die WK-Verbindungen in hoher extrazellulärer Konzentration wie das Transportsubstrat Vinblastin die niedrigaffine Bindungsstelle des P-Gp blockieren, kann vermutet werden, dass auch sie transportiert werden. Gegen diese Interpretation spricht allerdings, dass auch nicht transportierte Substrate wie z. B. das Progesteron die ATPase Aktivität stimulieren und in höheren Konzentrationen hemmen (Jens Meyer, nicht publizierte Ergebnisse).

Die Affinitäten der WK-X-Inhibitoren befinden sich alle im mikromolaren Bereich. Die Substanz WK-X-84 zeigt mit 0,71  $\mu\text{mol/L}$  die höchste Affinität für P-Gp. 3D-QSAR Untersuchungen von *Globisch et al.* zeigten, dass die Stellung der H-Akzeptor Funktion (Stickstoff) am Chinolinring und die Ausrichtung des aromatisches Ringes wichtig für die inhibitorische Wirkung von Tariquidar-Analoga sind [41]. Auch die Methoxygruppen leisten nach dem Pharmakophor-Modell einen positiven Beitrag. Die WK-Verbindungen X-14, X-34, X-85 und Y-26 besitzen die Eigenschaft bei niedriger Konzentration die ATPase Aktivität unter das basale Niveau zu inhibieren. Dieses Verhalten weist Parallelen zu Imatinib auf (siehe Kapitel 3.5.1.5). Dies könnte auf eine mögliche Interaktion dieser Substanzen mit der ATP-Bindungsstelle hindeuten.



3.5.1.3 Auswertung der ATPase Aktivitätsdaten mit zwei Fit-Funktionen  
*Müller et al.* zeigten für die Verbindung WK-X-24 bei der Inhibition des Calcein AM Einstroms einen Hill-Koeffizienten von 2,38 [74]. Dies weist auf eine Interaktion der Substanzen mit mehreren Bindungsstellen hin. Daher sollte untersucht werden, ob der Hill-Koeffizient der gefitteten Daten der stimulierten P-Gp ATPase Aktivität durch die WK-X-Verbindungen auch signifikant von 1 verschieden ist. In den ATPase Assays konnte dies nicht bestätigt werden. Keine Substanz zeigte einen Hill-Koeffizienten signifikant verschieden von 1. Daher stellt sich die Frage, ob durch den ATPase Assay überhaupt der direkte Einfluss eines Modulators auf die Bindungsstelle gemessen werden kann. Eventuell ist auch hier das Fehlen eines transportierten Konkurrenzpartners um die Bindungsstelle, wie er in den Calcein-AM und Efflux-Assay vorhanden ist, Grund für den konstanten Hill-Koeffizienten von 1.

In den zellbasierten Assays konnten abweichend von dieser Arbeit Hill-Koeffizienten von 2 und mehr gefunden werden. Dies würde auf eine eventuelle Kooperativität der Modulatoren hinweisen. In dieser Arbeit konnte für keinen Modulator ein Hinweis auf Kooperativität entdeckt werden.

Von den in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren, Substraten und Modulatoren aktivieren alle die ATP-Hydrolyse-Aktivität von P-Gp. Durch diese Ergebnisse können allerdings keine Aussagen darüber gemacht werden, ob eine Substanz transportiert wird oder nicht. Substanzen können nämlich auch Bindungsstellen besetzen die eine rein regulatorische Funktion ausüben (z. B. wie Nicardipin) und somit die ATPase Aktivität stimulieren.

#### 3.5.1.4 Kombinationsversuche Rhodamin mit Hoechst

Wie in Kapitel 1.1.7 beschrieben gibt es für das P-Gp mehrere Modelle für dessen Bindungsstellen. Nach dem Modell von Shapiro und Ling existieren eine Hoechst (H) und eine Rhodamin (R) Bindungsstelle. Diese stehen miteinander in einer allosterischen Regulation. Ob diese Interaktion positiv [104] oder negativ [115] ist, darüber stehen sich in der Literatur

gegensätzliche Meinungen gegenüber. Durch die Aufnahme der Dosis-Wirkungskurve von Rhodamin 123 in Gegenwart verschiedener Hoechst-Konzentration konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Hoechst eine Erhöhung der Affinität von P-Gp für Rhodamin vermittelt, dagegen blieb die maximale Pumpgeschwindigkeit aber gleich. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Loo und Clark konnte für Hoechst 33342 ein stimulierender Effekt auf die Hydrolyse-Aktivität gezeigt werden (siehe Kapitel 3.5.1.4) [62]. Bemerkenswert ist auch, dass durch Zugabe von Hoechst die basale ATPase Aktivität signifikant höher lag, als bei Abwesenheit von Hoechst. Hiermit kann gezeigt werden, dass die R-Seite positiv durch die Bindung von Hoechst beeinflusst wird.

#### 3.5.1.5 Imatinib

Der Tyrosinkinase Inhibitor Imatinib verhält sich im ATPase-Assay besonders auffällig. In niedrigen Konzentrationen inhibiert er die ATPase Aktivität signifikant unter das basale Niveau (Abbildung 3-46). Bei höheren Konzentrationen steigert er signifikant die ATPase Aktivität. Untersuchungen an intakten Zellen ergaben, dass Imatinib allerdings von P-Gp transportiert wird [108].

Da der Wirkmechanismus von Imatinib gegenüber spezifischen Tyrosinkinasen auf eine kompetitive Hemmung der ATP-Bindungsstelle dieser Kinasen beruht, kann aufgrund des Verhaltens im ATPase Assay vermutet werden, dass Imatinib auch mit der ATP-Bindungsstelle von P-Gp in Wechselwirkung tritt. Um dieses näher zu untersuchen wurde der  $K_m$ -Wert für ATP von P-Gp in Gegenwart von Imatinib bestimmt (Abbildung 3-48). Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist, dass Imatinib einen dualen Einfluss auf das P-Gp hat. Zu einem wird die ATP- und die Substrat-Bindungsstelle von P-Gp durch Imatinib beeinflusst. Bei niedrigen Konzentrationen an Imatinib (1  $\mu\text{mol/L}$ ) ist die Affinität von ATP für P-Gp (5,03 mmol/L) um den Faktor 4 niedriger als bei Abwesenheit eines Substrats (1,28 mmol/L). Interessanterweise wird der ATP- $K_m$ -Wert also in Gegenwart von niedrigen

Konzentrationen Imatinib erhöht, was einen kompetitiven inhibitorischen Effekt von Imatinib auf die ATP-Bindungsstelle von P-Gp beweist. Obwohl Imatinib die Affinität der ATP Bindungsstelle moduliert, wird in Gegenwart von höheren Konzentrationen die ATPase Aktivität stimuliert. Dies deutet, in Kombination mit der aufgenommenen Dosiswirkungskurve von Imatinib und den Literaturdaten mit intakten Zellen daraufhin, dass Imatinib trotzdem von P-Gp transportiert wird. Eine These für die Erklärung dieses „Phänomens“ soll nun hier aufgestellt werden. Die Versuche und die Literatur zeigen, dass Imatinib mit der ATP-Bindungsstelle in Wechselwirkung tritt und ein Substrat von P-Gp darstellt. Allerdings wirft diese Erkenntnis die Frage auf: wieso wird Imatinib von P-Gp, trotz der Wechselwirkung mit der Nukleotid-Bindungsstelle von P-Gp als Inhibitor, trotzdem transportiert? Die Ursache könnte mit dem atypischen log P-Wert für ein P-Gp Substrat zusammenhängen. Der berechnete log P-Wert von Imatinib ist  $1,86 \pm 0,66$  (berechnet mit *ACD Log D Suite*). Es ist also verglichen mit anderen P-Gp Substraten ein sehr hydrophiles Molekül. Wie die Versuche zeigten, konkurriert Imatinib in niedrigen Konzentrationen ( $<10^{-6}$ ) mit ATP um die Nukleotid-Bindungsstelle. Die Nukleotid-Bindungsstellen sind sehr hydrophil und liegen im Gegensatz zu den Transportbindungsstellen außerhalb der Liposomenmembran. Bei niedrigen Konzentrationen an Imatinib ist aufgrund des niedrigen log P-Wertes im Verhältnis viel weniger Imatinib in der Phospholipidmembran als in der wässrigen Umgebung. Es hat sich noch keine ausreichend hohe Konzentration an Imatinib innerhalb der Membran eingestellt, damit es als Substrat erkannt wird. Hierher rührt der Effekt, dass die ATPase Aktivität von P-Gp deutlich unter die der basalen Aktivität abnimmt. Das Verhältnis an Imatinib, welches in die Membran diffundiert ist zwar gleich, aber aufgrund der höheren Konzentration an Substanz ausserhalb der Zelle, ist die Konzentration von Imatinib in der Membran höher. Erst bei diesen Konzentrationen an Imatinib hat sich aufgrund des niedrigen log P und der damit verbundenen langsamen Diffusion durch die Membran genug Substanz in der Membran eingelagert, um den P-Gp Transportprozess auszulösen. Die Bindung von Imatinib an

eine Transportbindungsstelle löst in Anlehnung an die in der Literatur postulierten Prozesse eine Konformationsänderung des Proteins aus, die sich in der Affinitätserhöhung der Nukleotid-Bindungsstelle für ATP und damit in einer gesteigerten Hydrolyse von ATP widerspiegelt. Das in der Einleitung von *Al-Shawi et al.* postulierte Model zum gekoppelten und ungekoppelten Pfad kann das Verhalten dieser Substanz exakt beschreiben. Bei niedrigen Konzentrationen an Imatinib befindet sich das Protein durch die allosterische Modulation der ATP Bindungsstelle in dem ungekoppelten Pfad. Da der  $K_m$ -Wert für ATP durch Imatinib erhöht ist, sinkt auch die Hydrolysegeschwindigkeit von ATP unter das basale Niveau. Erst bei Erreichen von hohen Konzentrationen Imatinib in der Membran erkennt das P-Gp Imatinib als Substrat und wechselt in den gekoppelten Pfad. Das Verhalten dieser Substanz ist also ein Beweis für die Gültigkeit des von *Al-Shawi et al.* postulierten kinetischen P-Gp Modells.

## 3.6 log P-Wert Bestimmung

### 3.6.1 Bestimmung des log P-Wertes ausgewählter Modulatoren

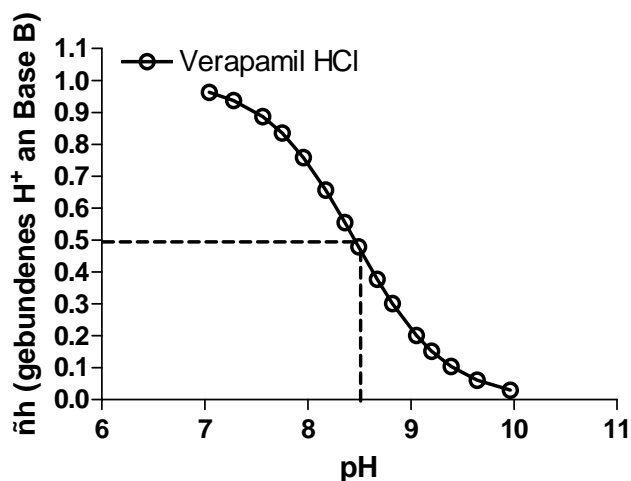
Der log P-Wert einer Substanz ist ein Maß für die Lipophilie der Neutralform. Die log P-Werte in dieser Arbeit wurden mit dem Programm *ACD/Log P* berechnet. Die Berechnung beruht auf einem Fragment basierten Ansatz bei dem die Beiträge der einzelnen Fragmente zu dem log P-Wert der Substanz addiert werden. Die Vorhersagen bei komplexen Strukturen (wie zum Beispiel den WK-X-Verbindungen) sind nicht sehr genau, was sich auch in der Standardabweichung niederschlägt die *ACD/Log P* ausgibt. Daher sollten für einen ausgewählten Datensatz von WK-X-Verbindungen die log P-Werte experimentell bestimmt werden. Da es sich um ionisierbare Substanzen (am Isochinolin) handelt, sind die log P-Werte potentiometrisch zugänglich. Mit Hilfe der log P-Werte sollte anschließend überprüft werden, ob eine Korrelation zwischen den P-Gp Affinitätsdaten, bestimmt durch den ATPase-Assay und log D und den zellbasierten Assays, besteht. Untersuchungen

eines Datensatzes bestehend aus heterologen Substanzen, basierend auf einer Propafenongrundstruktur, konnten keine signifikante Korrelation zwischen der Lipophilie und den pharmakologischen Affinitätsdaten aufweisen. Sie stellten aber eine signifikante Korrelation zwischen den Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor-Eigenschaften und den Affinitätsdaten fest [27]. Dies steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass mit der Anzahl der Protonenakzeptoreinheiten eines Substrats auch dessen Affinität zu P-Gp wächst [101]. Es gibt aber auch Untersuchungen bei dem die Lipophilie eine signifikante Korrelation mit den Affinitätsdaten in *in vitro* Studien zeigt [100]. Dagegen konnten *Pajeva und Wiese* zeigen, dass hydrophobe Felder besser mit den Affinitätsdaten korrelieren [83]. Da es in der Literatur sehr viele unterschiedliche Resultate bezüglich des Einflusses von der Lipophilie auf die Affinität eines Modulators bzw. Substrats zu P-Gp gibt, wurde in dieser Arbeit versucht für den WK-X-Datensatz zu bestimmen, ob eine Korrelation zwischen Lipophilie und Affinität besteht.

#### 3.6.1.1 Validerung der potentiometrischen $pK_a$ und Log P Bestimmung

Die potentiometrische log P-Bestimmung erfordert die Kenntnis über die Dissoziationskonstante  $pK_a$  der zu untersuchenden Substanz. Die  $pK_a$ -Werte der Modulatoren wurden daher ebenfalls potentiometrisch mit dem Sirius PCA200 nach Kapitel 2.4.5 bestimmt. Damit eine potentiometrische  $pK_a$  Bestimmung möglich ist, muss die Substanz über den zu titrierenden pH Bereich ausreichend löslich sein. Die Methode wurde durch Bestimmung des  $pK_a$ -Wertes des Modulators Verapamil getestet, da dessen physikochemische Eigenschaften bekannt sind. Da Verapamil nicht über den gesamten zu titrierenden pH-Bereich im wässrigen ausreichend löslich ist, wurden die Titrations mit Verapamil in Gegenwart des Kosolvenz DMSO in unterschiedlichen Konzentrationen (0 - 40%) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *Refine 200* von Sirius Analytical.

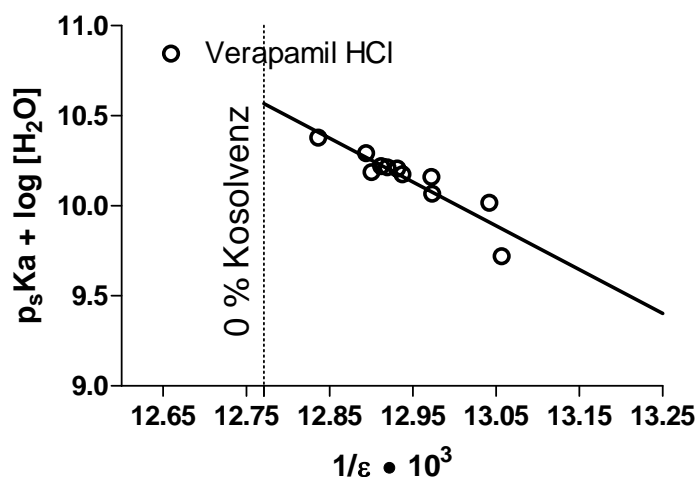
Um den exakten Wendepunkt der Titrationskurve zu bestimmen, wurden die Daten in eine Unterschiedskurve (Bjerrum-Plot) transformiert. Der Wendepunkt der Kurve ist der  $p_sK_a$ -Wert (siehe Abbildung 3-51).



**Abbildung 3-51.** Bjerrum Plot der Titrationskurve von Verapamil (Der ermittelte  $p_sK_a$  beträgt  $8,46 \pm 0,02$ ) bei 28,14% DMSO Kosolvenz.

Verapamil wurde als Hydrochlorid in einem Konzentrationsbereich zwischen  $10^{-3}$  mol/L und  $10^{-4}$  mol/L eingesetzt. Die Titration wurde über den pH-Bereich von 5 bis 11 durchgeführt. Allgemein sollte bei der Titration der pH-Bereich zwei Einheiten ober- und unterhalb des zu erwartenden  $pK_a$ -Wertes umfassen. Die Titrationsen erfolgten aufgrund der schlechten Löslichkeit der basischen Substanzen ausnahmslos von niedrigem pH-Wert zu hohem pH-Wert. Eine Probe wurde mehrmals nacheinander in einer Multititration mit drei unterschiedlichen Kosolvenz/ISA-Wasser-Mischungen vermessen.

Um den wässrigen  $pK_a$ -Wert zu bestimmen wurde die Yasuda-Shedlovsky-Extrapolation (Gleichung 2-5) angewendet. Die  $p_sK_a$ -Werte der Substanzen wurden bei mindestens sechs unterschiedlichen Kosolvenz/ISA-Wasser Mischungen bestimmt und der wässrige  $pK_a$ -Wert nach Yasuda-Shedlovsky ermittelt. Die Abbildung 3-52 zeigt beispielhaft den Yasuda-Shedlovsky-Plot von Verapamil.



**Abbildung 3-52.** Yasuda-Shedlovsky-Plot von Verapamil bestimmt mit dem Kosolvenz DMSO. Der  $pK_a$ -Wert für Verapamil ergibt sich zu  $8,73 \pm 0,02$  bei einem  $GOF = 1,15$  und  $R^2 = 0,9735$ . (Die Yasuda-Shedlovsky Gleichung für Verapamil lautet  $p_s K_a + \log[H_2O] = 31,765 - 1667,5/e$ .)

**Tabelle 3-30.** Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Literaturwerte der Dissoziations-konstante  $pK_a$  von Verapamil.

berechnet (ACD labs)	Literatur	$pK_a$	
		Diss. Franke [36].	diese Arbeit
$9,04 \pm 0,50$	8,60; 8,66[118]	$8,74 \pm 0,09$	$8,73 \pm 0,02$

Der Vergleich des in dieser Arbeit bestimmten  $pK_a$ -Wertes von Verapamil mit Literaturwerten zeigt, dass kein signifikanter Unterschied zu den Werten von Franke besteht [36]. Franke bestimmte den  $pK_a$ -Wert von Verapamil ebenfalls potentiometrisch durch Yasuda-Shedlovsky Extrapolation, wobei Dioxan und Methanol als Lösungsvermittler verwendet wurden. Dies zeigt auch, dass die Methodik nach Yasuda-Shedlovsky unabhängig vom Kosolvenz gleiche Werte liefert. Auch die in der Literatur gefundenen  $pK_a$ -Werte für Verapamil liegen im Größenbereich des in dieser Arbeit bestimmten Wertes. Der mit dem Programm ACD Labs berechnete Wert liegt höher als die experimentell bestimmten Werte. Der Unterschied ist aufgrund des höheren Fehlers aber nicht signifikant.

Zur Bestimmung des Verteilungskoeffizienten der Verbindungen wurde ISA-Wasser gesättigtes n-Octanol verwendet. Es wurden mindestens sechs Titrations bei verschiedenen Volumenverhältnissen Octanol/Wasser ( $r_v$ )

durchgeführt. Verapamil diente auch für die log P-Wert Bestimmung als Referenzsubstanz. Die untersuchten Substanzen zeigen eine hohe Verteilung in die organische Phase. Deswegen wurde 0,1 ml bis 5 ml n-Octanol bei einem H<sub>2</sub>O Volumen von ca. 7,5 ml zugesetzt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *Refine 200* von Sirius Analytical mit dem die p<sub>0</sub>K<sub>a</sub>-Werte der einzelnen Titrationsen bestimmt wurden und anschließend wurde mit Gleichung 2-7 und Gleichung 2-8 der log P bzw. der log P<sub>ion</sub>-Wert berechnet.

**Tabelle 3-31.** log P- und log P<sub>ion</sub>-Werte von Verapamil.

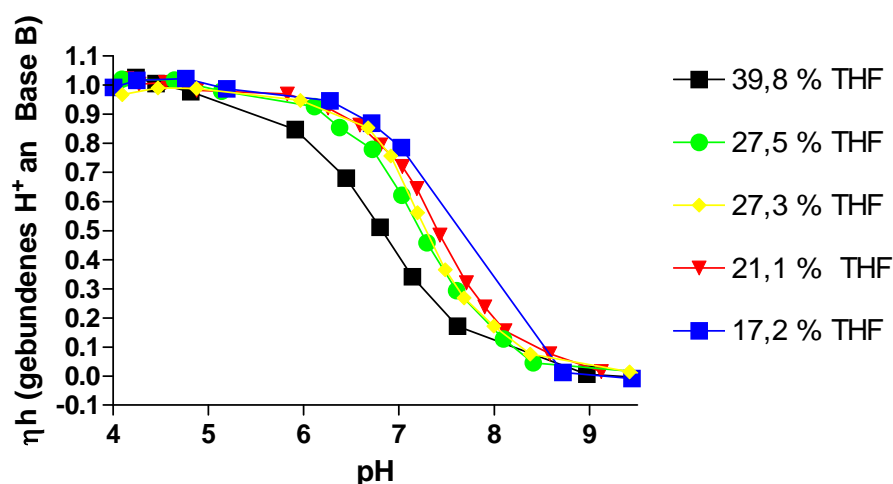
berechnet (ACD labs)	log P		log P <sub>ion</sub>	
	Literatur	diese Arbeit	Literatur	diese Arbeit
4,91±0,04	3,96[118]	4,11±0,02	0,96[118]	0,68±0,03
	3,78±0,12[36]		1,37±0,16[36]	

Die Tabelle 3-32 zeigt, dass der experimentell bestimmte log P<sub>ion</sub>-Wert von 0,68 etwas unterhalb den Literaturwerten von *Winiwarter et. al.* und *Franke, Diss.* [36;118]. mit 0,96 und 1,37 liegt. Der log P-Wert liegt mit 4,11 im Bereich der Literatur Werte.

### 3.6.1.2 Bestimmung des pK<sub>a</sub>-Wertes ausgewählter WK-X-Verbindungen

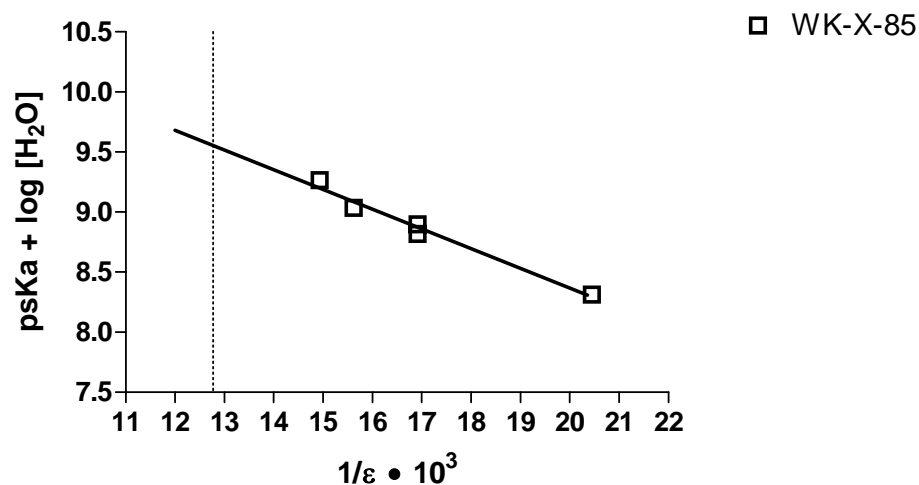
Die schlechte Löslichkeit in Wasser stellt bei den WK-X-Verbindungen eine Problematik bei der potentiometrischen pK<sub>a</sub>-Wert Bestimmung dar. Zunächst wurde analog zu den Versuchen mit Verapamil DMSO als Kosolvenz eingesetzt. Jedoch selbst in 40% DMSO/ISA-Wasser waren die Substanzen nicht über den gesamten Titrationsbereich in Lösung. Daher wurde das lipophilere THF als nächstes Kosolvenz eingesetzt, das sehr viel bessere Ergebnisse lieferte. Stellvertretend für alle WK-X-Verbindungen sieht man in Abbildung 3-53 die Titrationskurve und in Abbildung 3-54 den Yasuda-Shedlovsky-Plot von WK-X-85. Bei einer THF Konzentration von 17,2% fällt WK-X-85 bei pH ~7,4 während der Titration aus.





**Abbildung 3-53.** Titrationskurve von WK-X-85 in unterschiedlichen THF/ISA-Wasser Mischungen.

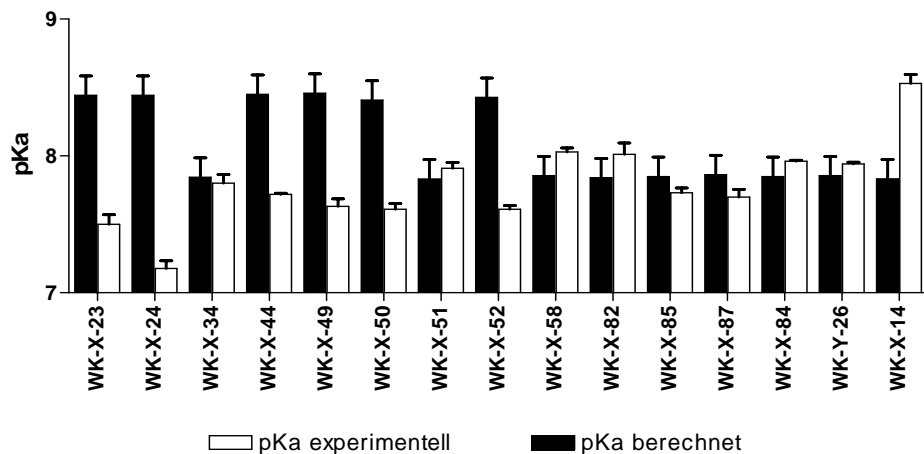
Der  $p_s K_a$ -Wert wurde wie in Kapitel 3.6.1.1 beschrieben, durch den Bjerrum Plot berechnet. Die Extrapolation nach Yasuda-Shedlovsky (Abbildung 3-54) lieferte den wässrigen  $pK_a$ -Wert.



**Abbildung 3-54.** Der Yasuda-Shedlovsky-Plot von WK-X-85 ergab einen  $pK_a$  von  $7,73 \pm 0,05$  25°C bei einem GOF = 1,45 und  $R^2=0,9882$ .

Entsprechend wurden die  $pK_a$ -Werte der restlichen WK-X-Verbindungen bestimmt. Die Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 3-32 aufgeführt. Die

Abbildung 3-55 stellt die experimentell bestimmten Werte den berechneten  $pK_a$ -Werten graphisch gegenüber.



**Abbildung 3-55.** Übersicht über berechnete und experimentell bestimmte  $pK_a$ -Werte der WK-X-Verbindungen.

**Tabelle 3-32.** Dissoziationskonstanten der WK-X-Verbindungen.

Verbindung	$pK_a$ berechnet	$pK_a$ potent.	GOF	Teilstruktur	Mittelwert ( $pK_a$ potent.)
WK-X-23	8,44±0,20	7,50±0,10	0,79		7,54±0,19
WK-X-24	8,44±0,20	7,18±0,08	1,34		
WK-X-44	8,45±0,20	7,72±0,01	0,08		
WK-X-49	8,46±0,20	7,63±0,08	0,66		
WK-X-50	8,41±0,20	7,61±0,06	1,04		
WK-X-52	8,43±0,20	7,61±0,04	0,99		
WK-X-14	7,83±0,20	8,53±0,09	0,89		7,96±0,25
WK-X-34	7,84±0,20	7,80±0,09	0,94		
WK-X-51	7,83±0,20	7,91±0,06	0,83		
WK-X-58	7,86±0,20	8,03±0,04	0,55		
WK-X-82	7,84±0,20	8,01±0,12	2,18		
WK-X-84	7,85±0,20	7,96±0,01	0,10		
WK-X-85	7,78±0,20	7,73±0,05	1,21		
WK-X-87	7,86±0,20	7,70±0,08	0,52		
WK-Y-26	7,86±0,20	7,94±0,02	0,42		

Grundsätzlich zeichnen sich bei den Verbindungen basierend auf ihrer Struktur zwei  $pK_a$ -Werte ab. Der Dimethoxytetrahydroisochinolin-Rest hat

durch den +M-Effekt der OCH<sub>3</sub>-Substituenten einen basischeren pK<sub>a</sub>-Wert. Diese Tendenz ist bei allen 6,7 Dimethoxytetrahydroisochinolin WK-X-Verbindungen zu beobachten. Deswegen wurde für die beiden Teilstrukturen eine mittlere Dissoziationskonstante gebildet, die unter der Spalte „Mittelwert“ in Tabelle 3-32 zu finden ist. Die gemittelten pK<sub>a</sub>-Werte sind signifikant unterschiedlich (p = 0,004). Die berechneten pK<sub>a</sub>-Werte weisen allerdings eine umgekehrte Tendenz des pK<sub>a</sub> Wertes auf. Daher kann man bei den WK-X-Strukturen nicht auf die berechneten pK<sub>a</sub>-Werte zurückgreifen. Entsprechend dem Vorgehen bei Verapamil (siehe 3.6.1.1) wurde der log P und der log P<sub>ion</sub> Wert der WK-X-Verbindungen bestimmt.

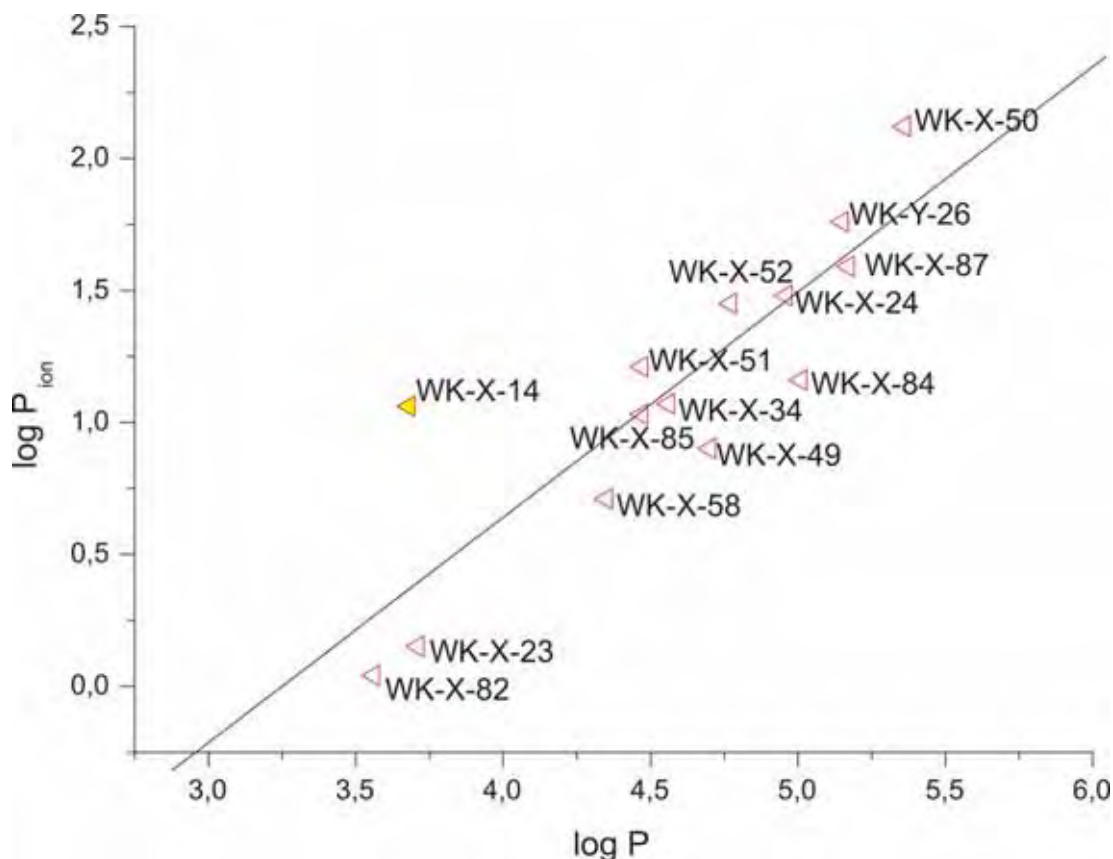
**Tabelle 3-33.** log P Werte der WK-X-Verbindungen. Für die Derivate mit basischem Tetrahydrochinolin Rest wurde ein gemittelter pK<sub>a</sub>-Wert 7,54 zugrunde gelegt. Für 6,7-Dimethoxytetrahydroisochinolin Derivate entsprechend der gemittelte pK<sub>a</sub>-Wert von 7,96. Die Titrationsen wurden bei mindestens zwei unterschiedlichen Volumenverhältnissen r<sub>v</sub> durchgeführt. log P und der log P<sub>ion</sub> wurden nach Gleichung 2-8 und Gleichung 2-9 berechnet. Angegeben ist der Mittelwert ± Standardabweichung.

Verbindung	log P berechnet	log P exp.	log P <sub>ion</sub> exp	n
WK-X-23	5,89±0,62	3,71±0,05	0,15±0,71	3
WK-X-24	6,27±0,62	4,96±0,42	1,48±0,44	3
WK-X-49	5,50±0,60	4,70±0,34	0,90±0,35	6
WK-X-50	5,74±0,58	5,36±0,23	2,12±0,34	3
WK-X-52	4,75±0,51	4,77±0,11	1,45±0,10	4
WK-X-14	4,11±0,54	3,68±0,32 (4,25±0,32)	1,05±0,30 (1,06±0,30)*	3
WK-X-34	5,96±0,66	4,56±0,12	1,07±0,11	4
WK-X-51	4,48±0,54	4,47±0,20	1,21±0,21	3
WK-X-58	4,29±0,54	4,35±0,22	0,71±0,25	4
WK-X-82	3,30±0,53	3,56±0,16	0,04±0,01	5
WK-X-84	4,93±0,60	5,01±0,03	1,16±0,08	3
WK-X-85	4,90±0,55	4,47±0,17	1,03±0,41	3
WK-X-87	5,75±0,55	5,17±0,09	1,59±0,15	4
WK-Y-26	5,43±0,52	5,15±0,10	1,76±0,08	5

\*Die beiden Verteilungskoeffizienten wurden mit dem für diese Substanz bestimmten pKa-Wert von 8,53 berechnet.

Die bestimmten log P und log P<sub>ion</sub> Werte sind in der folgenden Abbildung gegeneinander graphisch aufgetragen, um eine eventuelle Korrelation der Wertepaare aufzuzeigen.

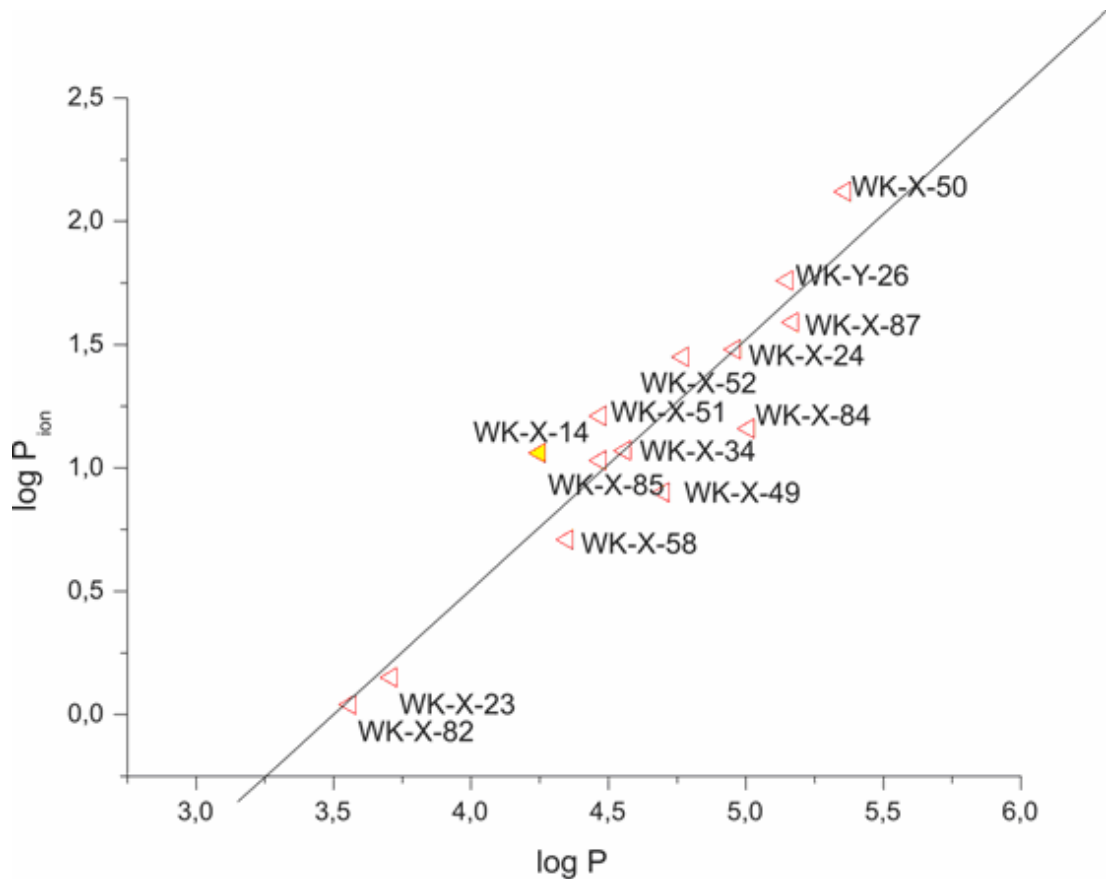
Die Abbildung 3-56 weist eine signifikante Korrelation ( $P < 0,0001$ ; 95%-iges Konfidenzintervall) zwischen den experimentell bestimmten  $\log P$  und  $\log P_{\text{ion}}$ -Werten auf. Der Pearson R der Korrelation ist 0,87.



**Abbildung 3-56.** Korrelation *n*-octanol  $\log P_{\text{ion}}$  versus  $\log P$

Mit steigender Lipophilie der Neutralform nimmt auch die Verteilung des Ionen-Paars in die lipophile Phase zu. Die Verbindung WK-X-14 fällt deutlich aus der Korrelation der Datenpaare heraus. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der für die  $\log P$  bzw.  $\log P_{\text{ion}}$  Berechnung zugrunde gelegte  $pK_a$ -Wert der Mittelwert der experimentell bestimmten  $pK_a$ -Werte ist. Wie in der Tabelle 3-32 zu sehen, weicht der  $pK_a$ -Wert der Substanz WK-X-14 mit 8,53 deutlich von dem gemittelten Wert 7,93 ab. Diese Abweichung von mehr als einer halben  $\log$  Einheit ist eine mögliche Erklärung für die Abweichung der Substanz WK-X-14 in dieser Korrelation. Setzt man nun bei der Berechnung des  $\log P$  und  $\log P_{\text{ion}}$  Wertes den tatsächlich experimentell bestimmten  $pK_a$ -Wert von WK-X-14 ein, dann erhält man für den  $\log P$  und den  $\log P_{\text{ion}}$  einen

Wert von 4,25 bzw. 1,06. Der  $\log P_{ion}$ -Wert ändert sich augenscheinlich nicht, da auf die zweite Dezimalstelle gerundet wird. Korreliert man nun die  $\log P$  und  $\log P_{ion}$  Werte erneut, dann erhält man eine Korrelation mit einem Pearson R von 0,94. Die Abbildung 3-57 zeigt diese Korrelation.



**Abbildung 3-57.** Korrelation n-Octanol  $\log P$  vs  $\log P_{ion}$  mit korrigiertem Wert für WK-X-14.

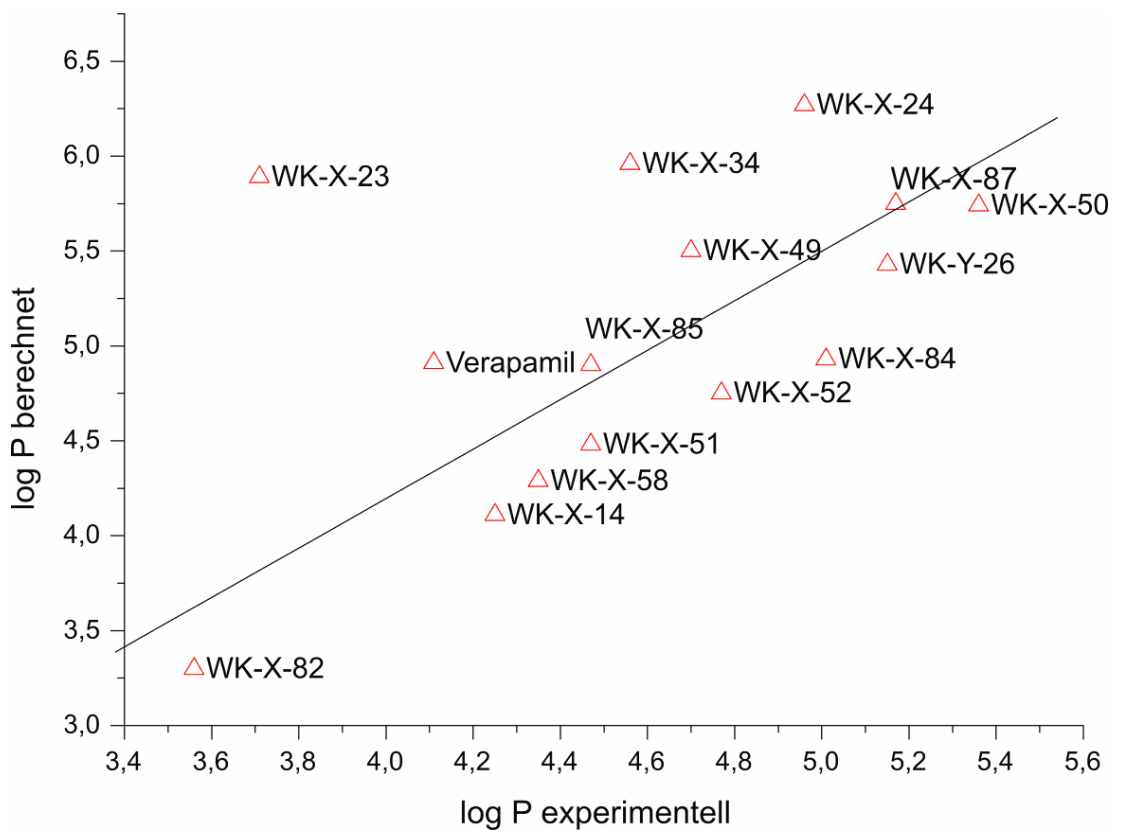
In der erneuten Korrelation weicht nur noch das Datenpaar von X-84 am meisten von der Geraden ab. *Seelig et al.* zeigten, dass eine nur eine geringe Korrelation ( $R=0,52$ ) zwischen den ATPase Affinitätsdaten und den berechneten  $\log P$  Werten von P-Gp Substraten besteht. Eine hohe Korrelation bestand allerdings zwischen den Affinitätsdaten und den Wasser-Luft-Verteilungskoeffizienten ( $R=0,95$ ). In dieser Studie ist der n-Octanol Verteilungskoeffizient allerdings nur berechnet worden. Es stellt sich die Frage, ob der berechnete n-Octanol Wert überhaupt korrekt ist. Deshalb

wurden die experimentell ermittelten log P mit den berechneten log P-Werten korreliert.

Zwischen den experimentellen und berechneten log P-Werten besteht eine Korrelation. Die Substanz WK-X-23 zeigte jedoch eine Abweichung von über zwei Log-Einheiten. Der experimentell bestimmte log P Wert ist zwei Einheiten geringer als der berechnete, was auf eine eventuelle chemische Zersetzung während der Titration hinweisen könnte, deshalb wurde diese Verbindung bei der folgenden Korrelation nicht berücksichtigt. Bei der Korrelation der log P vs. log  $P_{ion}$  Daten konnten die Werte der Verbindung X-23 verwendet werden, da hier der log P und der log  $P_{ion}$  der womöglich zersetzten Verbindung bestimmt wurde.

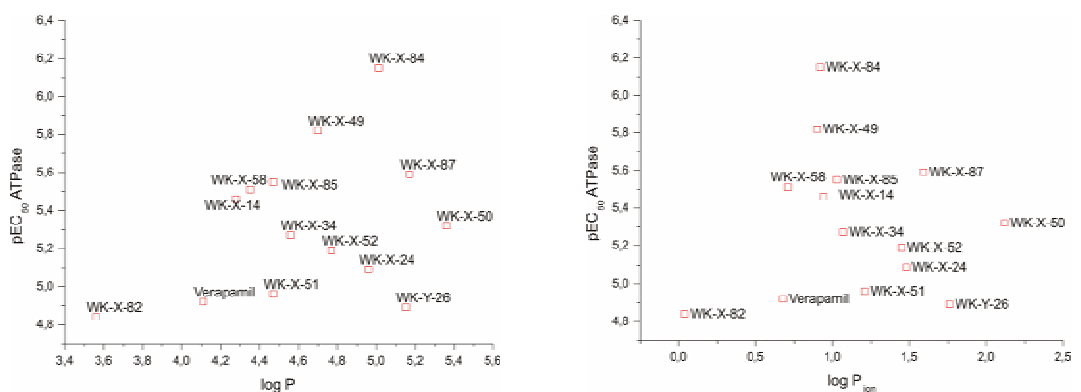
Allerdings würde man bei der Korrelation in Abbildung 3-58 den berechneten log P der intakten Substanz WK-X-23 mit dem experimentellen log P eines Zersetzungsproduktes von WK-X-23 vergleichen. Deshalb wurde diese Substanz bei der Korrelation ausgeschlossen. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,78 und zeigt somit eine signifikante Korrelation an.

Die potentiometrische log P-Wert Bestimmung stößt bei sehr lipophilen Substanzen an ihre Grenzen. Je lipophiler eine Base ist, desto höher ist die Linksverschiebung der Titrationskurve in Gegenwart einer organischen Phase. Die  $pK_a$ -Werte der WK-X-Verbindungen sind selbst bei geringen Mengen organischer Phase sehr niedrig (ungefähr um den Wert 5,0). Eine Faustregel besagt, dass mindestens der pH-Bereich zwei Log-Einheiten ober- und unterhalb des  $pK_a$ -Wertes erfasst werden sollten, um exakt den  $pK_a$ -Wert zu bestimmen. Dies bedeutet, dass die Titrationskurve über den pH-Bereich von 3 bis 7 aufgenommen werden müssen.

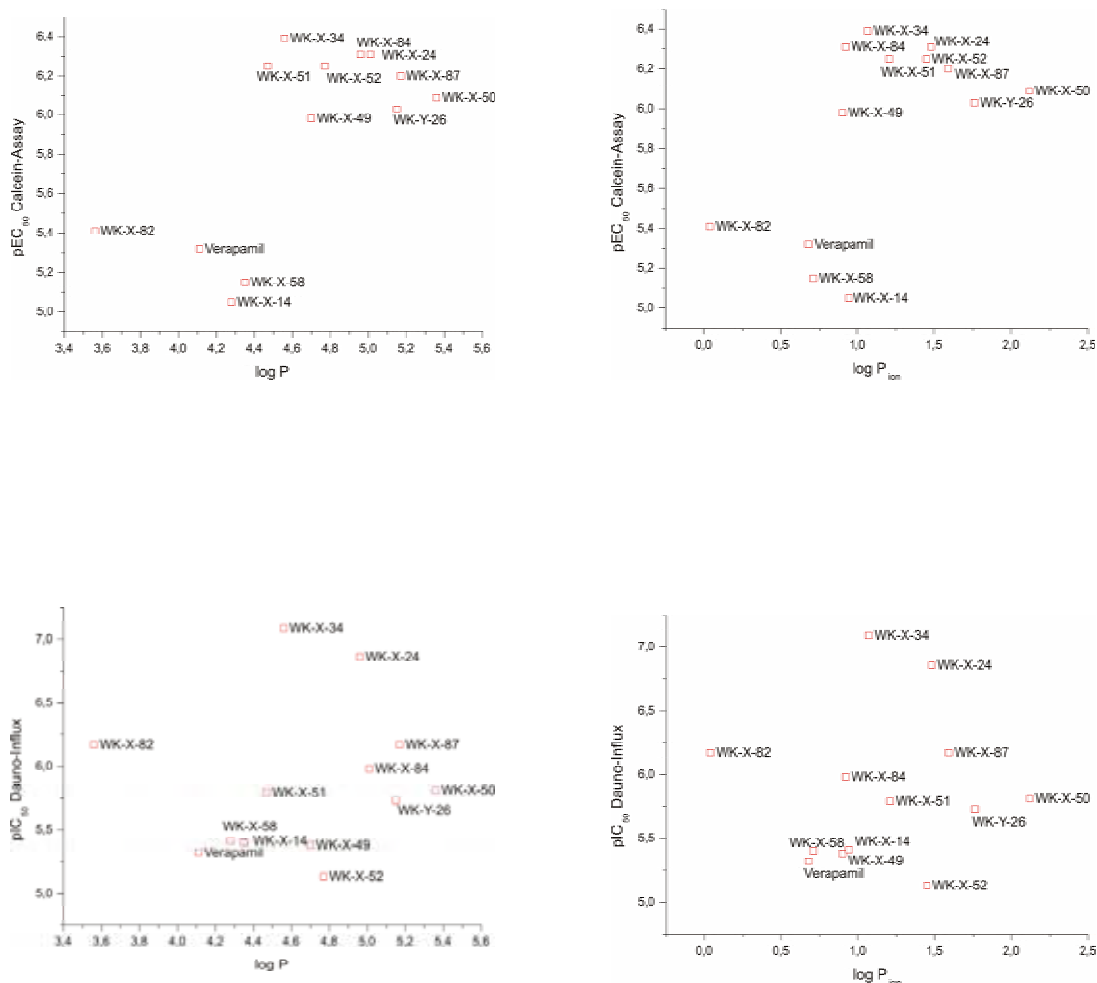


**Abbildung 3-58.** Korrelation der berechneten und der experimentellen log P-Werte. Die Substanz WK-X-23 wurde nicht in die Korrelation einbezogen.

Die experimentell bestimmten log P Werte wurden gegen Affinitätsdaten aus den ATPase-, Calcein-AM- und Efflux-Assay geplottet, um eventuell eine Korrelation zwischen den Datensätzen aufzuzeigen. Die folgenden Abbildungen zeigen die Affinitätswerte gegen den log P und log P<sub>ion</sub> geplottet:



### 3 Ergebnisse und Diskussion



**Abbildung 3-59.** Korrelation der Lipophilie und Affinitätswerte unterschiedlicher Assay-systeme

Die Graphen zeigen, dass zwischen dem log P- bzw. dem log P<sub>ion</sub>-Werten keine Korrelation mit den jeweiligen Affinitätsdaten besteht. Die in der Literatur für einige Modulatoren bestehende Korrelation zwischen dem log P und den ATPase Affinitätsdaten konnte für diesen Datensatz nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt darin, dass die Affinitätswerte der untersuchten WK-X-Substanzen nur über einen logarithmischen Bereich von 1 variieren. Dasselbe gilt auch für die bestimmten log P-Werte. Dies macht eine Korrelation der beiden Datensätze sehr schwierig und erklärt die breite Streuung. Für weiterführende Versuche sollten mehrere unterschiedliche Klassen von Modulatoren miteinbezogen



werden, damit Werte korreliert werden können die sich über mindestens zwei logarithmischen Einheiten unterscheiden. Da es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen um eine sehr heterogene Gruppe von Derivaten einer Grundstruktur handelte, war es durchaus zu erwarten, dass keine Korrelation zwischen Affinitätswerten und Lipophilie existiert.

## 4 Zusammenfassung

P-Gp ist eine ca. 170 kDa großes Protein, das aus zwei homologen Hälften besteht. Jede homologe Hälfte enthält jeweils sechs  $\alpha$ -Helix transmembranäre Domänen und eine Nukleotid-Bindungsstelle im Zytoplasma. Für P-Gp werden mehrere Bindungsstellen postuliert. Es existieren zumindest eine H- und eine R-Bindungsstelle. Unklar ist es, ob sich alle Bindungsstellen innerhalb einer großen Bindungstasche befinden, oder ob sie über den gesamten Bereich des Proteins verstreut sind. Zur Aufklärung werden unter anderem funktionelle Assays (ATPase und Calcein), Mutations- und Photoaffinitäts-Labeling-Studien durchgeführt. Um diese Studien zur Struktur-Wirkungsaufklärung direkt an homogenem Protein durchführen zu können, benötigt man ein rekombinantes Expressionssystem.

In dieser Arbeit wurde das aus der Literatur bekannte Expressionssystem für P-Gp in dem Protease-defizienten *S. cerevisiae* Stamm *BJ5457* unter der Kontrolle des Promotors PMA1 etabliert und modifiziert. Die zur Rekonstitution verwendeten Lipide beeinflussen die spezifische Aktivität von P-Gp. Eine aus Phosphatidylcholin, Phosphatidylsäure und Cholesterol bestehende Lipidmischung zeigte in den Untersuchungen das höchste Verhältnis zwischen basaler und stimulierter ATPase Aktivität (Messfenster). Daher wurde diese Lipidmischung als neue Standardmischung für alle weitergehenden Untersuchungen verwendet. Desweiteren wurde das P-Gp in extrudierte Liposomen rekonstituiert. Das P-Gp richtet sich hierbei bevorzugt mit der ATP-Bindungsstelle nach außen aus.

Für eventuelle Photoaffinitäts- oder Mutationsuntersuchungen wird eine große Menge an homogenen P-Gp benötigt. Daher wurde versucht, das etablierte System in Hinsicht auf die Ausbeute zu verbessern. Das verwendete Detergenz LPC liefert zu 100% aktives P-Gp im Vergleich zur nativen Aktivität in Hefemembranen. Das Detergenz LPC ist aber zur Gewinnung von Membranprotein im Milligramm Maßstab aufgrund der hohen Kosten nicht geeignet. Daher wurde versucht das Detergenz TDOC in

Kombination mit Phosphatidylcholin als Schutzlipid zur Solubilisierung von Hefemembranen einzusetzen. Das resultierende P-Gp ist allerdings nur zu ca. 80% aktiv. Das Messfenster liegt bei ca. 300% und ist damit ausreichend für funktionelle Assay Systeme.

Weiter wurden zwei bzw. fünf zusätzliche Histidine am C-Terminus des Proteins angefügt, um die Affinität für Nickel-Beads zu erhöhen, damit die Ausbeute an reinem Protein erhöht wird. Die Affinitätserhöhung zu den Nickel-Beads konnte zwar bei dem 15-Histidin markiertem Protein nachgewiesen werden, aber das resultierende homogene P-Gp zeigte nur eine geringe spezifische Aktivität.

Da die Versuche das *BJ5457*-Expressionssystem zu optimieren nicht die gewünschten Ausbeuten lieferten, wurde die cDNA von P-Gp unter der Kontrolle des Promotors PMA1 in Ergosterol-defiziente Stämme kloniert. Der Stamm *JS3 ERG2-4*, mit vorwiegendem Zymosterol-Anteil, hat eine Expressionsrate von  $8,16\% \pm 2,09\%$ . Der Stamm *JS6 ERG6*, mit überwiegend Fecosterol-Anteil, hat eine Expressionsrate von  $14,7 \pm 1,23\%$ . Das P-Gp ist in der Hefemembran mit veränderter Lipidordnung und -fluidität funktionell expremiert und kann aus beiden Stämmen funktionell aufgereinigt werden. Die mit diesem System erzielten Expressionsraten sind die bisher höchsten. Die Stämme besitzen gegenüber dem Expressionssystem im *BJ5457* Stamm folgende Vorteile:

1. Die Expressionsrate ist höher
2. Die Verdopplungszeit ist um den Faktor 2,5 niedriger
3. Kostengünstigere Detergenzien können verwendet werden

Das mit Octylglucosid aufgereinigte Protein aus den Ergosterol-defizienten Stämmen ist zu 100% aktiv. Die Vorteile des in dieser Arbeit entwickelten Expressionssystem für P-Gp kann auch für die Expression anderer ABC-Transporter in Hefen genutzt werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit lieferte Erkenntnisse über die Stimulation der ATPase Aktivität durch bekannte und neue Modulatoren basierend auf der

Tariquidar-Struktur. In den Untersuchungen konnte erstmals für den Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib eine Wechselwirkung mit der ATP-Bindungsstelle am aufgereinigten Protein gezeigt werden. Bei geringen Konzentrationen von Imatinib ( $pEC_{50}$ -Wert von  $4,74 \pm 0,30$ ) wird die Affinität von ATP zu der Nukleotid-Bindungsstelle von P-Gp vermindert.

Ebenfalls konnte für Hoechst, ein spezifisches Substrat der H-Seite, eine Affinitätserhöhung für Rhodamin 123, ein spezifisches Substrat der R-Seite, gezeigt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die beiden Bindungsstellen in positiver Regulation miteinander wechselwirken. Für den homologen Datensatz der WK-X-Verbindungen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Affinitätsdaten ( $D$  und  $EC_{50}$ , bestimmt durch den ATPase-Assay) ermittelt werden. Nur die Verbindung WK-X-51 zeigt höhere Stimulation der ATPase Aktivität als die anderen WK-X-Verbindungen. Dies deutet darauf hin, dass sowohl die sterische Ausrichtung des Wasserstoffbrückenbindungsakzeptors Stickstoff im Chinolin-Ring und die Methoxy-Gruppen am Isochinolin-Ring einen Einfluss auf die maximal stimulierte ATPase Aktivität besitzen. Der Vergleich der durch den ATPase-Assay bestimmten Affinitätsdaten mit den Affinitätsdaten aus den Calcein-AM-Assay und Daunorubicin-Influx-Assay mittels einer Hauptkomponentenanalyse zeigte keine Korrelation.

Weiterhin wurden die WK-X-Verbindungen auf Ihre physiko-chemischen Eigenschaften durch  $pK_a$  und  $\log P$ -Wert Bestimmung untersucht, da diese Faktoren bei Interaktion von Modulatoren mit der Lipidmembran eine Rolle spielen. Eine Korrelation der P-Gp Affinitätsdaten und der  $\log P$ -Werte konnte in keinem Fall gezeigt werden. Es bestand allerdings eine Korrelation zwischen den jeweiligen  $\log P$  und  $\log P_{ion}$  Werten.

Die vorliegende Arbeit legte die Grundvoraussetzungen für die systematische Untersuchung an aufgereinigten P-Gp mittels des ATPase Aktivitätsassays in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wiese. Erstmals wurde an einem strukturell heterogenen Datensatz, der sich von einer Grundstruktur ableitet, systematische Untersuchungen an homogenen P-Gp durchgeführt. Diese

Arbeit lieferte die Erkenntnis, dass zur vollständigen Charakterisierung eines P-Gp Modulators mehrere Assay Systeme herangezogen werden müssen.

## 5 Anhang

### 5.1 Vektorkarten

#### 5.1.1 Plasmide ohne ABCB1 cDNA Insert

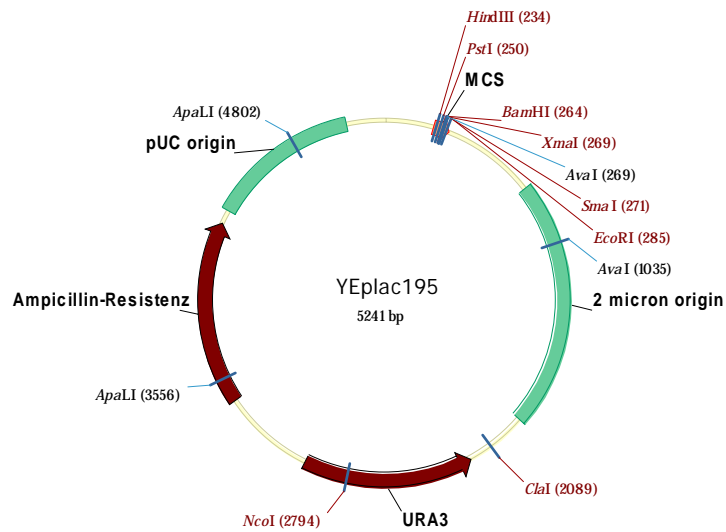


Abbildung 5-1. Vektorkarte von YEplac195 *E. coli*/Hefe shuttle Vektor [40].

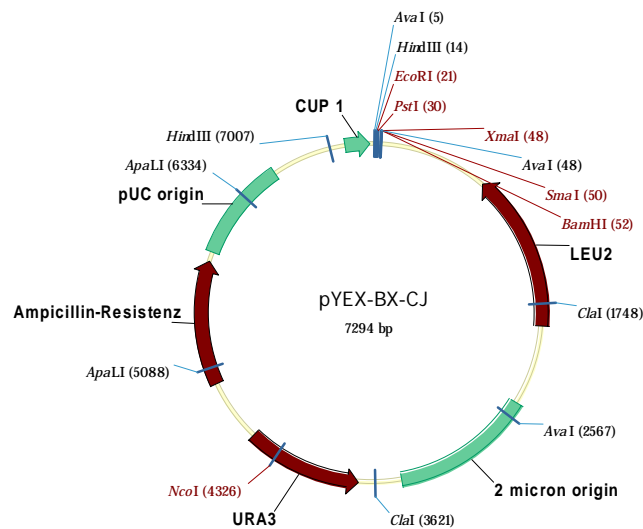


Abbildung 5-2. Vektorkarte von pYex-BX-CJ *E. coli*/Hefe shuttle Vektor [66].

## 5.1.2 Plasmide mit ABCB1 cDNA Insert

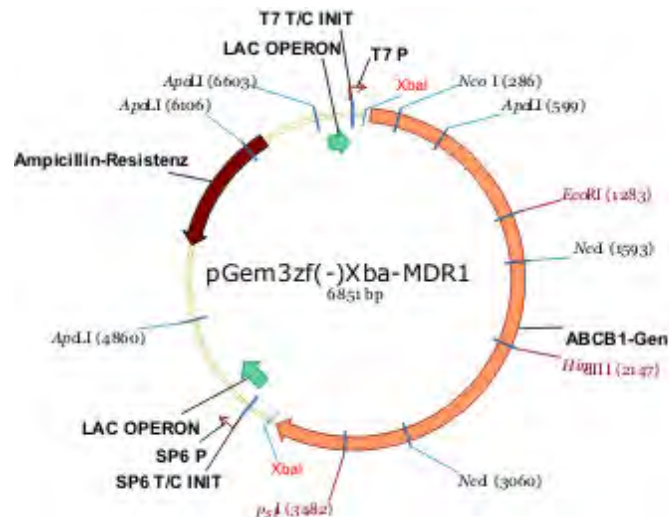


Abbildung 5-3. Vektorkarte von *pGem3zf(-)XBA-MDR1.1* Klonierungsvektor für *E. coli* [58].

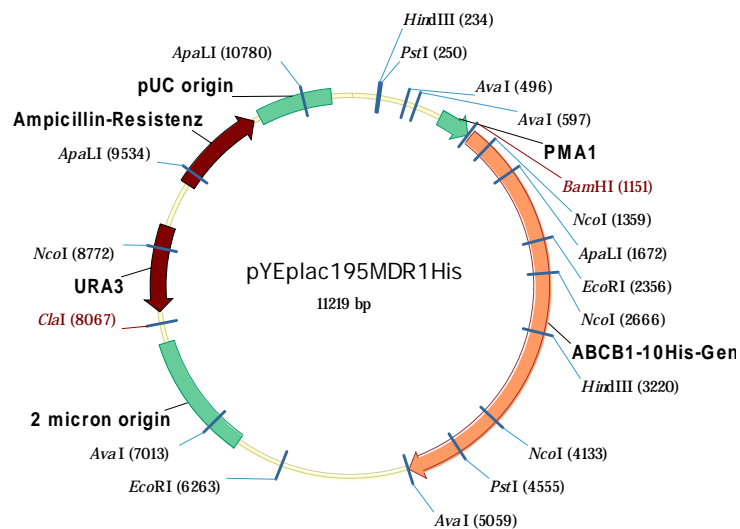
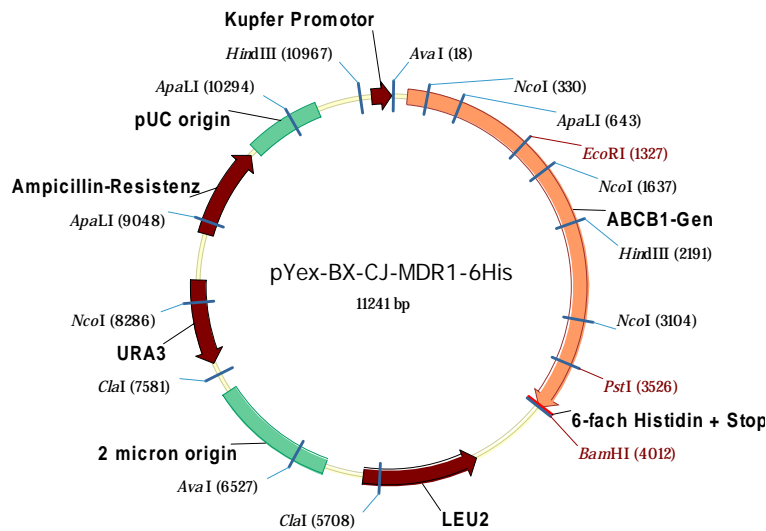
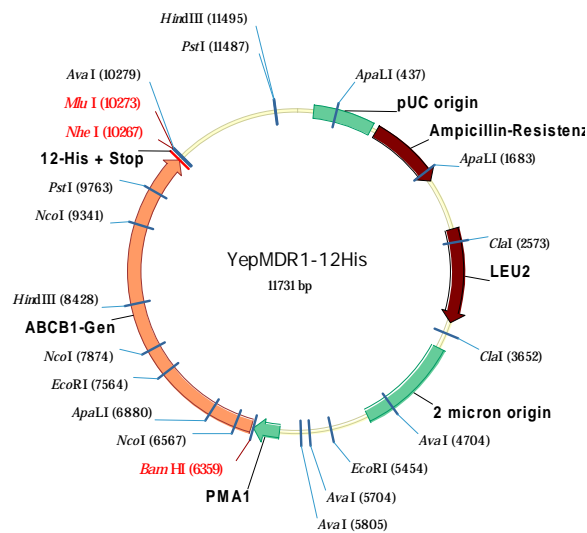


Abbildung 5-4. Vektorkarte von *Yep195MDR1His* (RAF46). *E. coli*/Hefe shuttle Vektor. Dies war ein Geschenk von Prof. Marwan K. Al-Shawi, University of Virginia, Charlottesville, USA.

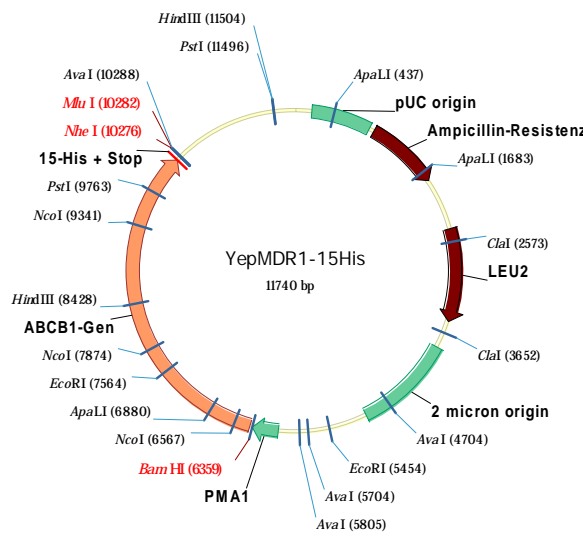


**Abbildung 5-5.** Vektorkarte von pYex-BX-CJ. *E. coli*/Hefe shuttle Vektor. Expression von 6-fach Histidin markierten P-gp unter der Kontrolle des induzierbaren Kupfer Promoters.



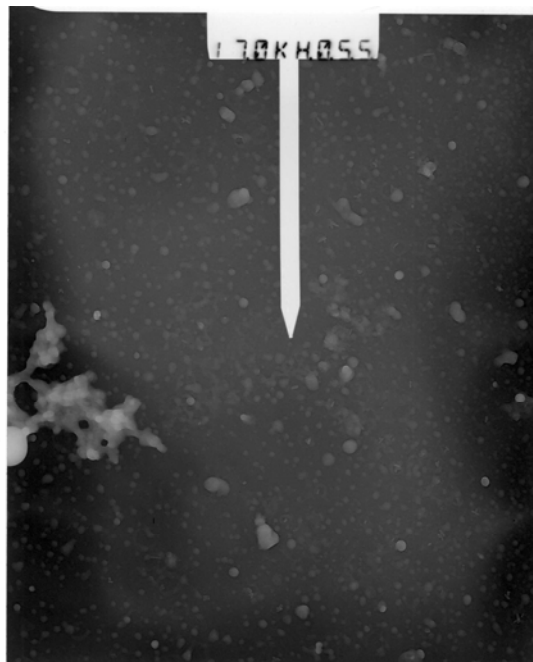
**Abbildung 5-6.** Vektorkarte von pYex-BX-CJ. *E. coli*/Hefe shuttle Vektor. Expression von 12-fach Histidin markierten P-gp unter der Kontrolle des konstitutiven Promoter PMA1. Enthält zusätzlich eine NheI Schnittstelle.





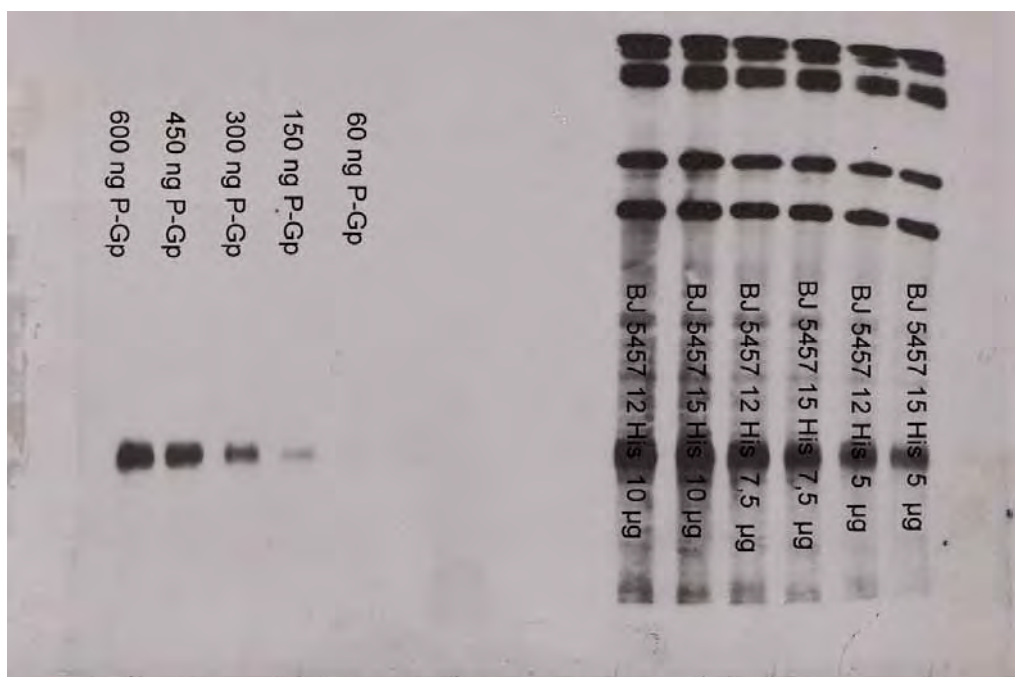
**Abbildung 5-7.** Vektorkarte von pYex-BX-CJ. *E. coli*/Hefe shuttle Vektor. Expression von 15-fach Histidin markierten P-gp unter der Kontrolle des konstitutiven Promoter PMA1. Enthält zusätzlich eine NheI Schnittstelle.

## 5.2 Elektronenmikroskopie



**Abbildung 5-8.** Elektronenmikroskopische Vergrößerung (17000-fach) von homogenen P-gp Präparation #1 in 200 nm PC/PA/Ch Liposomen, der durch Extrusion hergestellten Präparation (vgl. Abbildung 3-10).

### 5.3 Immuno Blot



**Abbildung 5-9.** Quantitativer Western-Blot der Hefe-Stämme BJ5457 12 His und BJ5457 15 His. Als Standard diente aufgereinigtes P-Gp in Proteoliposomen (Reinheit 90,2%).

## 5.4 Primer

**Tabelle 5-1.** Gesamtübersicht über die in der Arbeit verwendeten Primer.

Primer	Sequenz	Orien- -tierung	Besonderheiten
MDR-His- STOP-BAMH1	CTCGGATCCTCAATGGTGA TGGTGATGGTGCTGGCGC TTTGTTCAGCC	antisense	für pYex-BX-CJ-MDR1, 6 Histidine, Stop-Codon, BamHI- Schnittstelle
cterm_M_f	GAGGGATCCATGTCTTCAA ATGATTCAAGATCC	sense	spezifisch für MDR-1 C-terminus
ctermMluI_r	GACCTCGAGACGCGTCTAA TGGTG	antisense	spezifisch für MDR1 C-terminus
MDR1-LeftJS	GCTCCTGACTATGCCAAAG C	sense	spezifisch für MDR1
MDR1-pre- psti-s	CAGCTCCTGGAGCGGTTCT AC	sense	spezifisch für MDR1 vor der PstI-Schnittstelle
MDR1-RightJS	TCTTCACCTCCAGGCTCAG T	antisense	spezifisch für MDR1
nterm_M_f	ATAGGATCCATGGATCTTG AAGGGGACCGC	sense	Sequenzierprimer für RAF13
ntermMluI_r	CGCACGCGTCTATTCCAAG GCATCAATTTCACTTTTG	antisense	Ende der 1. homologen Hälfte von MDR1
Primer 242	TATCATATAGAAGTCATCG A	sense	Sequenzierprimer für pYex-BX- CJ
Primer 243	TTTGCAGCTACCACATTGG	antisense	Sequenzierprimer für pYex-BX- CJ
pYep15HisNheI	ATGACGCGTGCTAGCCTAG TGATGGTGATGGTGATGGT GATGGTGATGGTGATGGT GATGGTG	antisense	für MDR1, Erweiterung um 5 Histidin, Stop-Codon, Diagnostische NheI Schnittstelle
pYepBsmI	TCCACCATCCAGAATGCAG AC	sense	für MDR1 vor BsmI Schnittstelle
pYepHisNheI	ATGACGCGTGCTAGCCTAA TGGTGATGGTGATGGTGAT GGTGATGGTGATGGTG	antisense	für MDR1, Erweiterung um 2 Histidin, Stop-Codon, Diagnostische NheI Schnittstelle

## 5.5 *E. coli* Stämme

**Tabelle 5-2.** Verwendete *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp	Firma
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1, hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac<sup>f</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)</i> ]	Stratagene chemisch kompetent und für Elektroporation
DH5α	F' $\phi$ 80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)</i> U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) phoA supE44 λ<sup>-</sup> 1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen chemisch kompetent

## 5.6 Chemikalien

**Tabelle 5-3.** Verwendete Chemikalien.

Substanz	Firma	Nr.
4-Aminobenzoessäure	Sigma	R-4500
6-Aminohexansäure	Sigma	A9878
Acrylamid-Lösung (30%)	Applichem	A3626
Agar-Agar für die Mikrobiologie	Meck	1.01614
Amidoschwarz	Applichem	A1399
Ammoniummolybdat-tetrahydrat	Sigma	A1343
Ammoniumsulfat	Fluka	09978
Antifoam A	Sigma	A5633
Adenosintriphosphat	Sigma	A2383
Benzamidin HCl	Sigma	B6506
Biotin	Sigma	B4501
Borsäure	Sigma	B6768
Brilliant Blau R250	Roth	3862.1
BSA (Albumin für EIA und RIA)	Applichem	A0850
Calciumchlorid-dihydrat	Applichem	A1873
Cholesterol	Sigma	
D(+)-Glucose wasserfrei für Zellkultur	Applichem	A0883
Desoxycholinsäure, Natriumsalz	Sigma	D6750
Diisopropylfluorid	Acros	115230010
Dimethylsulfoxid	Acros	AC19773

## 5 Anhang

di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat	Applichem	A4732
di-Natriumtartrat dihydrat	Fluka	71995
D-Panθοthensäure-hemicalciumsalz	Sigma	P2250
Ethylendiamintetraessigsäure	Aldrich	E2,628-2
Ethylen-bis(oxyethylenetriol)tetraessigsäure	Sigma	E3889
Folsäure	Sigma	F7876
Glycerol 86%	Grüssing	11014
Glycerol wasserfrei	Applichem	A1123
Imidazol	Fluka	56748
Kaliumdihydrogenphosphat	Applichem	A3095
Kaliumchlorid	Merck	1.04936
Kaliumchlorid, gesättigte wässrige Lösung	Aldrich	319309
Kupfersulfat-pentahydrat	Acros	AC19773
L-Adenin-hemisulfat	Sigma	A-9126
L-Arginin-HCl	Applichem	A3680
Leupeptin-hemisulfat	Sigma	L2884
L-Histidin-HCl-monohydrat	Sigma	H8125
L-Isoleucin	Sigma	I2752
L-Leucin	Aldrich	L60-2
L-Lysin HCl	Sigma	L5626
L-Methionin	Applichem	A3897
L-Phenylalanin	Sigma	P2126
L-Threonin	Sigma	T8625
L-Tryptophan	Applichem	A3410
L-Tyrosin	Sigma	T3754
L-Uracil	Applichem	A0667
L-Valin	Sigma	V0500
Magnesiumchlorid-hexahydrat	Merck	105833
Magnesiumsulfat-heptahydrat	Applichem	A4101
Malchite Grün-HCl	Sigma	M9636
Mangansulfat-monohydrat	Fluka	63555
Mercaptoethanol	Sigma	M6250
Myoinositol	Sigma	I5125
Natriumazid	Fluka	71290
Natriumcarbonat	Aldrich	451614
Natriumchlorid	Merck	106404
Natriumdodecylsulfat	Applichem	2572
Natriumhydroxid, Pellets	Acros	13407
Natriummolybdat-dihydrat	Sigma	M1651
Natriumsulfat-decahydrat	Fluka	71969
Nicotinsäure	Sigma	N4126
Ni-NTA Superflow	Qiagen	30410
Octylglucosid	Applichem	A1010

## 5 Anhang

---

3-sn-Phosphatidylsäure-Natriumsalz	Sigma	P9511
L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin	Sigma	P3556
Pepstatin A	Sigma	P5318
Phenylmethansulfonylchlorid	Sigma	P7626
Polyvinylalkohol, hydrolysiert	Aldrich	348406
Pyridoxin-HCl	Sigma	P9755
Saccharose	ICN	821713
Trichloressigsäure	Sigma	T8657
TEMED	Applichem	A1148
Thiamin-HCl	Sigma	T4675
Tris	Applichem	A2264
Zinksulfat-heptahydrat	Sigma	Z4750

---

## 6 Abkürzungsverzeichnis

ddW	doppelt destilliertes Wasser
ABC	ATP-Binding-Cassette
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BSA	Bovines Serum Albumin
Ch	Cholesterol
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CMC	Critical Micell Concentration
DFP	Diisopropylfluorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithio-DL-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen-bis(oxyethylenitrilo)tetraessigsäure
FACS	Fluoreszenz Activated Cell Sorter
His	Histidin
ISA	Ionic Strength adjusted
LB	Luria Bertani-Medium
Leu	Leucin
Li-Ac	Lithiumacetat
LPC	Lysophosphatidylcholin
MDR	Multidrug Resistance
MRP	Multidrug Resistance Associated Protein
NBD	Nucleotid Binding Domain
OD	Optische Dichte bei 600 nm
OG	n-Ocyl-b-D-glucopyranosid
PA	Phosphatidylsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Phosphatidylcholin
PEG	Polyethylenglycol
P-Gp	P-Glykoprotein
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethansulfonylchlorid
PVA	Polyvinylalkohol
SD	Synthetische Dextrose
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris Acetat EDTA
TBE	Tris Borat EDTA
TBS	Tris-buffered-saline
TBS-T	Tris buffered saline mit Tween
TCA	Trichloressigsäure
TDOC	Taurodesoxycholin
TE	Tris EDTA

## 6 Abkürzungsverzeichnis

---

TEMED	Tetramethylethyldiamin
TMF	Tetramethylfuran
Tris	(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)
U	Unit ( $P_i \text{ min}^{-1}$ )
Ura	Uracil
YNB	Yeast-Nitrogen-Base
YPD	Yeast-Pepton-Dextrose
R-Gefäß	Eppendorf Reaktionsgefäß



## 7 Literaturverzeichnis

1. Al Shawi, M. K., Ketchum, C. J., und Nakamoto, R. K., *Energy coupling, turnover, and stability of the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase are dependent on the energy of interaction between gamma and beta subunits.* J Biol Chem, **1997**, 272, 2300-2306
2. Al Shawi, M. K., Polar, M. K., Omote, H., und Figler, R. A., *Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein.* J Biol Chem, **2003**, 278, 52629-52640
3. Al Shawi, M. K. und Senior, A. E., *Characterization of the adenosine triphosphatase activity of Chinese hamster P-glycoprotein.* J Biol Chem, **1993**, 268, 4197-4206
4. Al Shawi, M. K., Urbatsch, I. L., und Senior, A. E., *Covalent inhibitors of P-glycoprotein ATPase activity.* J Biol Chem, **1994**, 269, 8986-8992
5. Andree, H. A. und Soedjak, H. S., *Colorimetric phospholipid determination with erythrosin B.* Anal Biochem, **1994**, 222, 465-471
6. Ausubel, F. M., *Short protocols in molecular biology a compendium of methods from Current protocols in molecular biology.* **1992**,
7. Avdeef, A., Box, K. J., Comer, J. E., Hibbert, C., und Tam, K. Y., *pH-metric logP 10. Determination of liposomal membrane-water partition coefficients of ionizable drugs.* Pharm Res, **1998**, 15, 209-215
8. Barnes, K. M., Dickstein, B., Cutler, G. B., Jr., Fojo, T., und Bates, S. E., *Steroid treatment, accumulation, and antagonism of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells.* Biochem, **1996**, 35, 4820-4827
9. Beaudet, L., Urbatsch, I. L., und Gros, P., *High-level expression of mouse Mdr3 P-glycoprotein in yeast Pichia pastoris and characterization of ATPase activity.* Methods Enzymol, **1998**, 292, 397-413
10. Bernsdorff, C. und Winter, R., *Differential Properties of the Sterols Cholesterol, Ergosterol,  $\beta$ -Sitosterol, trans-Dehydrocholesterol,*

- Stigmasterol and Lanosterol on DPPC Bilayer Order*. J Phys Chem B, **2003**, 107, 10658-10664
11. Bradford, M. M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, **1976**, 72, 248-254
  12. Breitbach, K. und Wiese, M., *Characterization of the binding sites of P-Glycoprotein by a functional flow cytometric assay*. Genf (Poster), **2004**,
  13. Brown, D. A. und London, E., *Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts*. J Biol Chem, **2000**, 275, 17221-17224
  14. Callaghan, R., Berridge, G., Ferry, D. R., und Higgins, C. F., *The functional purification of P-glycoprotein is dependent on maintenance of a lipid-protein interface*. Biochim Biophys Acta, **1997**, 1328, 109-124
  15. Calvin, N. M. und Hanawalt, P. C., *High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation*. J Bacteriol, **1988**, 170, 2796-2801
  16. Chen, C. J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., und Roninson, I. B., *Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells*. Cell, **1986**, 47, 381-389
  17. Chen, Z. S., Robey, R. W., Belinsky, M. G., Shchaveleva, I., Ren, X. Q., Sugimoto, Y., Ross, D. D., Bates, S. E., und Kruh, G. D., *Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17 beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: Effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport*. Cancer Res, **2003**, 63, 4048-4054
  18. Chico, I., Kang, M. H., Bergan, R., Abraham, J., Bakke, S., Meadows, B., Rutt, A., Robey, R., Choyke, P., Merino, M., Goldspiel, B., Smith, T., Steinberg, S., Figg, W. D., Fojo, T., und Bates, S., *Phase I study of infusional paclitaxel in combination with the P-glycoprotein antagonist PSC 833*. J Clin Oncol, **2001**, 19, 832-842
  19. Choi, C. H., *ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal*. Cancer Cell Int, **2005**, 5, 30-43

20. Clarke, F. H., *Ionization constants by curve fitting: application to the determination of partition coefficients*. J Pharm Sci, **1984**, 73, 226-230
21. Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M., und Deeley, R. G., *Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line*. Science, **1992**, 258, 1650-1654
22. Czub, Jacek und Baginski, Maciej, *Comparative Molecular Dynamics Study of Lipid Membranes Containing Cholesterol and Ergosterol*. Biophys J, **2006**, 90, 2368-2382
23. Dean, M., Rzhetsky, A., und Allikmets, R., *The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily*. Genome Res, **2001**, 11, 1156-1166
24. Dodic, N., Dumaitre, B., Daugan, A., und Pianetti, P., *Synthesis and activity against multidrug resistance in Chinese hamster ovary cells of new acridone-4-carboxamides*. J Med Chem, **1995**, 38, 2418-2426
25. Doige, C. A., Yu, X. H., und Sharom, F. J., *ATPase Activity of Partially Purified P-Glycoprotein from Multidrug-Resistant Chinese-Hamster Ovary Cells*. Biochim Biophys Acta, **1992**, 1109, 149-160
26. Doyle, L. A., Yang, W. D., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y. M., Rishi, A. K., und Ross, D. D., *A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells (vol 95, pg 15665, 1998)*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1999**, 96, 2569-2569
27. Ecker, G., Huber, M., Schmid, D., und Chiba, P., *The importance of a nitrogen atom in modulators of multidrug resistance*. Mol Pharmacol, **1999**, 56, 791-796
28. Eckford, P. D. und Sharom, F. J., *The reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter is a flippase for glucosylceramide and other simple glycosphingolipids*. Biochem J, **2005**, 389, 517-526
29. Eichelbaum, M., Fromm, M. F., und Schwab, M., *Clinical aspects of the MDRI (ABCB1) gene polymorphism*. Ther Drug Monit, **2004**, 26, 180-185

30. Ejendal, K. F. K. und Hrycyna, C. A., *Multidrug resistance and cancer: The role of the human ABC transporter ABCG2*. *Curr Protein & Peptide Sci*, **2002**, 3, 503-511
31. Endicott, J. A. und Ling, V., *The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance*. *Annu Rev Biochem*, **1989**, 58, 137-171
32. Endress, E., Heller, H., Casalta, H., Brown, M. F., und Bayerl, T. M., *Anisotropic motion and molecular dynamics of cholesterol, lanosterol, and ergosterol in lecithin bilayers studied by quasi-elastic neutron scattering*. *Biochemistry*, **2002**, 41, 13078-13086
33. Eppendorf, *FastPlasmid Mini*. **2003**, Eppendorf AG, Hamburg
34. Evans, G. L., Ni, B., Hrycyna, C. A., Chen, D., Ambudkar, S. V., Pastan, I., Germann, U. A., und Gottesman, M. M., *Heterologous expression systems for P-glycoprotein: E. coli, yeast, and baculovirus*. *J Bioenerg Biomembr*, **1995**, 27, 43-52
35. Figler, R. A., Omote, H., Nakamoto, R. K., und Al Shawi, M. K., *Use of chemical chaperones in the yeast Saccharomyces cerevisiae to enhance heterologous membrane protein expression: high-yield expression and purification of human P-glycoprotein*. *Arch Biochem Biophys*, **2000**, 376, 34-46
36. Franke, U. J., *Quantitative Arzneistoff-Membran-Wechselwirkungen am Beispiel von Neuroleptika und Calcium-Kanal-Blocker*. **2000**, Dissertation, Halle
37. Garrigues, A., Nugier, J., Orlowski, S., und Ezan, E., *A high-throughput screening microplate test for the interaction of drugs with P-glycoprotein*. *Anal Biochem*, **2002**, 305, 106-114
38. Gatlik-Landwojtowicz, E., Aanismaa, P., und Seelig, A., *The rate of P-glycoprotein activation depends on the metabolic state of the cell*. *Biochemistry*, **2004**, 43, 14840-14851
39. Gietz, R. D. und Schiestl, R. H., *Applications of high efficiency lithium acetate transformation of intact yeast cells using single-stranded nucleic acids as carrier*. *Yeast*, **1991**, 7, 253-263

40. Gietz, R. D. und Sugino, A., *New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites*. Gene, **1988**, 74, 527-534
41. Globisch, C., Pajeva, I. K., und Wiese, M., *Structure-activity relationships of a series of tariquidar analogs as multidrug resistance modulators*. Bioorg Med Chem, **2005**, 14, 1588-1598
42. Gottesman, M. M. und Pastan, I., *Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter*. Annu Rev Biochem, **1993**, 62, 385-427
43. Han, B. und Zhang, J. T., *Multidrug resistance in cancer chemotherapy and xenobiotic protection mediated by the half ATP-binding cassette transporter ABCG2*. Curr Med Chem Anti-Cancer Agents, **2004**, 4, 31-42
44. Hanahan, D., Jessee, J., und Bloom, F. R., *Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria*. Methods Enzymol, **1991**, 204, 63-113
45. Hansch, C. und Leo, A., *Substituted Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*. **1979**, Wiley-Interscience, New York
46. Higgins, C. F. und Linton, K. J., *The ATP switch model for ABC transporters*. Nat Struct Mol Biol, **2004**, 11, 918-926
47. Hsiao, P., Sasongko, L., Link, J. M., Mankoff, D. A., Muzi, M., Collier, A. C., und Unadkat, J. D., *Verapamil P-glycoprotein transport across the rat blood-brain barrier: cyclosporine, a concentration inhibition analysis, and comparison with human data*. J Pharmacol Exp Ther, **2006**, 317, 704-710
48. Jacobs, Anna, *Untersuchungen von Substraten und Modulatoren von P-Glykoprotein mit Hilfe funktioneller Microplatereader-basierter Assays*. **2004**, Diplomarbeit, Bonn
49. Jones, E. W., *Tackling the protease problem in Saccharomyces cerevisiae*. Methods Enzymol, **1991**, 194, 428-453
50. Julien, M., Kajiji, S., Kaback, R. H., und Gros, P., *Simple purification of highly active biotinylated P-glycoprotein: enantiomer-specific*

- modulation of drug-stimulated ATPase activity.* Biochemistry, **2000**, 39, 75-85
51. Kaplan, R. S. und Pedersen, P. L., *Determination of microgram quantities of protein in the presence of milligram levels of lipid with amido black 10B.* Anal Biochem, **1985**, 150, 97-104
52. Karwatsky, J., Daoud, R., Cai, J., Gros, P., und Georges, E., *Binding of a photoaffinity analogue of glutathione to MRP1 (ABCC1) within two cytoplasmic regions (L0 and L1) as well as transmembrane domains 10-11 and 16-17.* Biochemistry, **2003**, 42, 3286-3294
53. Kino, K., Taguchi, Y., Yamada, K., Komano, T., und Ueda, K., *Aureobasidin A, an antifungal cyclic depsipeptide antibiotic, is a substrate for both human MDR1 and MDR2/P-glycoproteins.* FEBS Lett, **1996**, 399, 29-32
54. Klinkhammer, W., Müller, H., Sievers, J., Breitbach, K., und Wiese, M., *New Tetrahydroisoquinolin-Derivates as Modulators of P-glycoprotein.* DPhG Jahrestagung (Poster), **2004**,
55. Kolaczowski, M., Kolaczowska, A., Luczynski, J., Witek, S., und Goffeau, A., *In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network.* Microb Drug Resist, **1998**, 4, 143-158
56. Kuchler, K. und Thorner, J., *Functional expression of human mdr1 in the yeast Saccharomyces cerevisiae.* Proc Natl Acad Sci U S A, **1992**, 89, 2302-2306
57. Laemmli, U. K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature, **1970**, 227, 680-685
58. Lincke, C. R., van der Blik, A. M., Schuurhuis, G. J., Van, der, V., Smit, J. J., und Borst, P., *Multidrug resistance phenotype of human BRO melanoma cells transfected with a wild-type human mdr1 complementary DNA.* Cancer Res, **1990**, 50, 1779-1785
59. Ling, V. und Thompson, L. H., *Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine.* J Cell Physiol, **1974**, 83, 103-116

60. Litman, T., Zeuthen, T., Skovsgaard, T., und Stein, W. D., *Structure-activity relationships of P-glycoprotein interacting drugs: kinetic characterization of their effects on ATPase activity*. Biochim Biophys Acta, **1997**, 1361, 159-168
61. Lobban, P. E. und Kaiser, A. D., *Enzymatic end-to end joining of DNA molecules*. J Mol Biol, **1973**, 78, 453-471
62. Loo, T. W., Bartlett, M. C., und Clarke, D. M., *Drug binding in human P-glycoprotein causes conformational changes in both nucleotide-binding domains*. J Biol Chem, **2003**, 278, 1575-1578
63. Loo, T. W. und Clarke, D. M., *Rapid purification of human P-glycoprotein mutants expressed transiently in HEK 293 cells by nickel-chelate chromatography and characterization of their drug-stimulated ATPase activities*. J Biol Chem, **1995**, 270, 21449-21452
64. Lottspeich, F. und Zorbas, H., *Bioanalytik*. **1998**, 1. Aufl., Spektrum, Berlin
65. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., und Randall, R. J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, **1951**, 193, 265-275
66. Macreadie, I. G., Horaitis, O., Verkuylen, A. J., und Savin, K. W., *Improved shuttle vectors for cloning and high-level Cu(2+)-mediated expression of foreign genes in yeast*. Gene, **1991**, 104, 107-111
67. Mao, Q. und Scarborough, G. A., *Purification of functional human P-glycoprotein expressed in Saccharomyces cerevisiae*. Biochim Biophys Acta, **1997**, 1327, 107-118
68. Martin, C., Berridge, G., Higgins, C. F., Mistry, P., Charlton, P., und Callaghan, R., *Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein*. Mol Pharmacol, **2000**, 58, 624-632
69. Martin, C., Higgins, C. F., und Callaghan, R., *The vinblastine binding site adopts high- and low-affinity conformations during a transport cycle of P-glycoprotein*. Biochemistry, **2001**, 40, 15733-15742
70. McDonell, M. W., Simon, M. N., und Studier, F. W., *Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular*

- weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels.* J Mol Biol, **1977**, 110, 119-146
71. Mistry, P., Stewart, A. J., Dangerfield, W., Okiji, S., Liddle, C., Bootle, D., Plumb, J. A., Templeton, D., und Charlton, P., *In vitro and in vivo reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by a novel potent modulator, XR9576.* Cancer Res, **2001**, 61, 749-758
72. Modok, S., Heyward, C., und Callaghan, R., *P-glycoprotein retains function when reconstituted into a sphingolipid- and cholesterol-rich environment.* J Lipid Res, **2004**, 45, 1910-1918
73. Mueller, H., Kassack, M. U., und Wiese, M., *Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines.* J Biomol Screen, **2004**, 9, 506-515
74. Mueller, H., Klinkhammer, W., Kassack, M. U., Eckstein, N., und Wiese, M., *Novel modulators to overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells.* Int J Clin Pharm Therap, **2004**, 42, 644-645
75. Mukhopadhyay, K., Kohli, A., und Prasad, R., *Drug Susceptibilities of Yeast Cells Are Affected by Membrane Lipid Composition.* Antimicrob Agents Chemother, **2002**, 46, 3695-3705
76. Muller, M., Bakos, E., Welker, E., Varadi, A., Germann, U. A., Gottesman, M. M., Morse, B. S., Roninson, I. B., und Sarkadi, B., *Altered drug-stimulated ATPase activity in mutants of the human multidrug resistance protein.* J Biol Chem, **1996**, 271, 1877-1883
77. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., und Schäfer-Korting, M., *Arzneimittelwirkungen.* **2001**, 8. Auflage,
78. Navarrete, R. und Serrano, R., *Solubilization of yeast plasma membranes and mitochondria by different types of non-denaturing detergents.* Biochim Biophys Acta, **1983**, 728, 403-408
79. Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., und Slotte, J. P., *Cholesterol interactions with phospholipids in membranes.* Prog Lipid Res, **2002**, 41, 66-97



80. Omote, H., *Schematischer Aufbau von P-Glykoprotein*. **2003**, persönliche Kommunikation, UVA, U S A
81. Omote, H. und Al-Shawi, M. K., *Interaction of transported drugs with the lipid bilayer and P-glycoprotein through a solvation exchange mechanism*. *Biophys J*, **2006**, 90, 4046-4059
82. Omote, H., Figler, R. A., Polar, M. K., und Al-Shawi, M. K., *Improved energy coupling of human P-glycoprotein by the glycine 185 to valine mutation*. *Biochemistry*, **2004**, 43, 3917-3928
83. Pajeva, I. K. und Wiese, M., *Pharmacophore model of drugs involved in P-glycoprotein multidrug resistance: explanation of structural variety (hypothesis)*. *J Med Chem*, **2002**, 45, 5671-5686
84. Pajic, M., Norris, M. D., Cohn, S. L., und Haber, M., *The role of the multidrug resistance-associated protein 1 gene in neuroblastoma biology and clinical outcome*. *Cancer Lett*, **2005**, 228, 241-246
85. Partearroyo, M. A., Goni, F. M., Katime, I., und Alonso, A., *Micellar properties of the zwitterionic bile derivative CHAPS*. *Biochem Int*, **1988**, 16, 259-265
86. Perlin, D. S., Harris, S. L., Seto-Young, D., und Haber, J. E., *Defective H(+)-ATPase of hygromycin B-resistant pma1 mutants from Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **1989**, 264, 21857-21864
87. Peterson, G. L., *A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable*. *Anal Biochem*, **1977**, 83, 346-356
88. Polli, J. W., Wring, S. A., Humphreys, J. E., Huang, L., Morgan, J. B., Webster, L. O., und Serabjit-Singh, C. S., *Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery*. *J Pharmacol Exp Ther*, **2001**, 299, 620-628
89. QIAGEN, *QIAquick Spin Handbook*. **2002**, Qiagen GmbH, Hilden
90. Rivnay, B. und Metzger, H., *Reconstitution of the receptor for immunoglobulin E into liposomes. Conditions for incorporation of the receptor into vesicles*. *J Biol Chem*, **1982**, 257, 12800-12808

91. Roberts, R. J. und Macelis, D., *REBASE--restriction enzymes and methylases*. Nucleic Acids Res, **1993**, 21, 3125-3137
92. ROCHE, *Rapid DNA Ligation Kit*. **2003**, Roche Diagnostics, Mannheim
93. Roe, M., Folkes, A., Ashworth, P., Brumwell, J., Chima, L., Hunjan, S., Pretswell, I., Dangerfield, W., Ryder, H., und Charlton, P., *Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by novel anthranilamide derivatives*. Bioorg Med Chem Lett, **1999**, 9, 595-600
94. Safa, A. R., *Identification and characterization of the binding sites of P-glycoprotein for multidrug resistance-related drugs and modulators*. Curr Med Chem Anti -Canc Agents, **2004**, 4, 1-17
95. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Erlich, H. A., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, **1988**, 239, 487-491
96. Sarkadi, B., Price, E. M., Boucher, R. C., Germann, U. A., und Scarborough, G. A., *Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase*. J Biol Chem, **1992**, 267, 4854-4858
97. Schellens, J. H., Kuppens, I. E., Jewell, R. C., Radema, S. A., Witteveen, E. O., Paul, E. M., Mangum, S. G., Rosing, H., Beijnen, J. H., und Voest, E. E., *Phase I and pharmacological study of oral topotecan and the BCRP and P-gp inhibitor elacridar*. J Clin Onc, **2004**, 22, 127S-127S
98. Schinkel, A. H., Kemp, S., Dolle, M., Rudenko, G., und Wagenaar, E., *N-glycosylation and deletion mutants of the human MDR1 P-glycoprotein*. J Biol Chem, **1993**, 268, 7474-7481
99. Schinkel, A. H., Wagenaar, E., Mol, C. A., und van Deemter, L., *P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs*. J Clin Invest, **1996**, 97, 2517-2524
100. Schmid, D., Ecker, G., Kopp, S., Hitzler, M., und Chiba, P., *Structure-activity relationship studies of propafenone analogs based on P-*

- glycoprotein ATPase activity measurements*. *Biochem Pharmacol*, **1999**, *58*, 1447-1456
101. Seelig, A., *A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein*. *Eur J Biochem*, **1998**, *251*, 252-261
102. Seelig, A. und Landwojtowicz, E., *Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers*. *Eur J Pharm Sci*, **2000**, *12*, 31-40
103. Shapiro, A. B., Fox, K., Lam, P., und Ling, V., *Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site*. *Eur J Biochem*, **1999**, *259*, 841-850
104. Shapiro, A. B. und Ling, V., *Positively cooperative sites for drug transport by P-glycoprotein with distinct drug specificities*. *Eur J Biochem*, **1997**, *250*, 130-137
105. Shoemaker, D. G. und Nichols, J. W., *Interaction of lysophospholipid/taurodeoxycholate submicellar aggregates with phospholipid bilayers*. *Biochemistry*, **1992**, *31*, 3414-3420
106. Sutherland, F. C., Lages, F., Lucas, C., Luyten, K., Albertyn, J., Hohmann, S., Prior, B. A., und Kilian, S. G., *Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **1997**, *179*, 7790-7795
107. Teruel, J. A., Soler, F., und Gomez-Fernandez, J. C., *On the effect of lysophosphatidylcholine, platelet activating factor and other surfactants on calcium permeability in sarcoplasmic reticulum vesicles*. *Chem Phys Lipids*, **1991**, *59*, 1-7
108. Thomas, J., Wang, L., Clark, R. E., und Pirmohamed, M., *Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance*. *Blood*, **2004**, *104*, 3739-3745
109. Tiberghien, F. und Loo, F., *Ranking of P-glycoprotein substrates and inhibitors by a calcein-AM fluorometry screening assay*. *Anticancer Drugs*, **1996**, *7*, 568-578
110. Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J., *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure*

- and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1979**, 76, 4350-4354
111. Uebel, S., Plantinga, T., Weber, P. J., Beck-Sickinger, A. G., und Tampe, R., *Peptide binding and photo-crosslinking to detergent solubilized and to reconstituted transporter associated with antigen processing (TAP)*. FEBS Lett, **1997**, 416, 359-363
112. Urbina, J. A., Pekerar, S., Le, H. B., Patterson, J., Montez, B., und Oldfield, E., *Molecular order and dynamics of phosphatidylcholine bilayer membranes in the presence of cholesterol, ergosterol and lanosterol: a comparative study using <sup>2</sup>H-, <sup>13</sup>C- and <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy*. Biochim Biophys Acta, **1995**, 1238, 163-176
113. Van Veldhoven, P. P. und Mannaerts, G. P., *Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range*. Anal Biochem, **1987**, 161, 45-48
114. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., und Gay, N. J., *Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold*. EMBO J, **1982**, 1, 945-951
115. Wang, E. J., Casciano, C. N., Clement, R. P., und Johnson, W. W., *Cooperativity in the inhibition of P-glycoprotein-mediated daunorubicin transport: evidence for half-of-the-sites reactivity*. Arch Biochem Biophys, **2000**, 383, 91-98
116. Welch, W. J. und Brown, C. R., *Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding*. Cell Stress Chaperones, **1996**, 1, 109-115
117. Wiese, M. und Pajeva, I. K., *Structure-activity relationships of multidrug resistance reversers*. Curr Med Chem, **2001**, 8, 685-713
118. Winiwarter, S., Bonham, N. M., Ax, F., Hallberg, A., Lennernas, H., und Karlen, A., *Correlation of human jejunal permeability (in vivo) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach*. J Med Chem, **1998**, 41, 4939-4949
119. Yasuda, M., *Dissociation Constants of some Carboxylic Acids in Mixed Aqueous Solvents*. Bull Chem Soc Japan, **1959**, 32, 429-432