

**Björn Schröder**

# **Transporter-Eigenschaften**

von **ABCC 1** *in vitro* und *in silicio*

–2004–



**Biochemie**

**Transporter-Eigenschaften**  
von **ABCC 1** *in vitro* und *in silicio*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im  
Fachbereich *Chemie* und *Pharmazie* der Mathematische-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
**BJÖRN SCHRÖDER**  
aus Siegen

–2004–

Dekan:	Prof. Dr. J. Leker
Erster Gutachter:	Prof. Dr. H.-J. Galla
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. B. Krebs
Tag der mündlichen Prüfung:	16.11.2004
Tag der Promotion:	16.11.2004



Die experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Oktober 2001 bis September 2004 am Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster durchgeführt.



*Erfahrung ist immer die Parodie auf die Idee*  
Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)



*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Funktion von Transportproteinen bei der Arzneimitteldisposition . . . . .	1
1.1.1	<i>Multidrug Resistenz</i> . . . . .	2
1.2	ABC-Transportsysteme . . . . .	3
1.3	ABCC1 . . . . .	5
1.4	Die Struktur von ABC-Transportern . . . . .	8
1.4.1	Die Struktur der ABC-Domäne . . . . .	9
1.4.2	Der Transportmechanismus von ABC-Transportern . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1	Zellkultur . . . . .	19
3.2	Fluoreszenzmikroskopie und Konfokale Laser Scanning Mikroskopie . . . . .	20
3.3	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i> . . . . .	23
3.4	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	24
3.4.1	Immunopräzipitation . . . . .	28
<b>4</b>	<b>Moleküldynamik</b>	<b>31</b>
4.1	Einleitende Bemerkungen . . . . .	31
4.2	<i>Homology Modelling</i> . . . . .	35
4.2.1	Strukturvorhersage aufgrund von Homology Modelling . . . . .	35
4.2.2	Verwendete Programme und Kraftfelder . . . . .	37
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
5.1	Die Modellierung der C-terminalen ATP Bindungsdomäne von ABCC1 . . . . .	41
5.1.1	Ergebnisse der Suche nach homologen Proteinen . . . . .	41
5.1.2	Sequenzabgleich der ausgewählten Proteinsequenzen . . . . .	41
5.1.3	Modellierung der C-terminalen ATP-Bindungsdomäne von ABCC1 . . . . .	43
5.1.4	Solvatisierung der erstellten Proteinmodelle in explizitem Wasser . . . . .	56
5.1.5	Zeitabhängige Analysen - Molecular Dynamics . . . . .	62
5.2	Die Isolierung von ABCC1 und seine Rekonstitution in Proteoliposomen . . . . .	66
5.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären Verteilung von ABCC1 in H69AR Zellen . . . . .	70
5.3.1	Die Verteilung von Doxorubicin in Multidrug Resistenten Zellen . . . . .	73
5.4	Die Isolierung von ABCC1 . . . . .	75
5.5	Funktionelle Rekonstitution von ABCC1 in Liposomen . . . . .	78
5.5.1	ATP-abhängige Aufnahme von LTC <sub>4</sub> . . . . .	79

<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>83</b>
6.1	Die Modellierung der C-terminalen ATP-Bindungsdomäne von ABCC 1 . . . . .	83
6.1.1	Die Modellierung der C-terminalen ATP-Bindungsdomäne. . . . .	84
6.1.2	Moleküldynamische Analysen der C-terminalen ATP-Bindungsdomäne im Komplex mit ATP . . . . .	90
6.1.3	Analyse der Moleküldynamischen Berechnungen . . . . .	92
6.1.4	Vorschlag eines Modells zum sequentiellen Ablauf der ATP-Hydrolyse und der Kommunikation der nicht-äquivalenten ATP-Bindungsdomänen von ABCC 1 . . . . .	94
6.2	Die Funktion intrazellulären ABCC 1 bei der Arzneimitteldisposition. . . . .	97
6.3	Die quantitative Isolierung und funktionelle Rekonstitution von ABCC 1 in Li- posomen . . . . .	100
6.3.1	Die Isolierung des monoklonalen Antikörpers QCRL-1 im quantitati- vem Maßstab. . . . .	100
6.3.2	Die quantitative Isolierung von ABCC 1 . . . . .	102
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>105</b>
<b>A</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>121</b>
<b>B</b>	<b>Materialien</b>	<b>123</b>
<b>C</b>	<b>Geräte</b>	<b>125</b>
C.1	Zellkultur . . . . .	125
C.2	Zentrifugen . . . . .	125
C.3	Elektrophorese und Blotten . . . . .	125
C.4	Mikroskopie . . . . .	125
C.5	Photometer . . . . .	125
C.6	Sonstiges . . . . .	125
C.7	Verbrauchsmaterialien . . . . .	126
<b>D</b>	<b>Verwendete Skripte und Steuerdateien</b>	<b>127</b>
D.1	Eingabedateien für die verwendeten Programme . . . . .	127
D.1.1	MODELLER Steuerdateien . . . . .	127
D.1.2	GROMACS Parameterdatei . . . . .	130
D.1.3	Steuerdatei für APBS . . . . .	134





# 1 Einleitung

Die Kompartimentierung lebender Zellen wird durch biologische Membranen realisiert, die aus Lipiddoppelschichten aufgebaut sind. Biologische Membranen sind zwar für Wasser, Gase (z. B. O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> oder NH<sub>3</sub>) sowie für kleine aliphatische Moleküle permeabel, für wasserlösliche Substanzen stellen sie hingegen eine Permeabilitätsbarriere dar, die die unkontrollierte inter- und intrazelluläre Diffusion verhindert. Ein Austausch von hydrophilen Substanzen über diese Permeabilitätsgrenzen hinweg, wie er aufgrund der Vielzahl der in der Zelle ablaufenden Stoffwechselprozesse, der Zell-Zell-Kommunikation sowie dem Export toxischer Verbindungen erforderlich ist, wird durch Transportproteine ermöglicht. Zu diesem Zweck steht der Zelle eine reichhaltige Auswahl an Transportproteinen, wie Shuttle, Carrier und Kanäle zur Verfügung, die Barriereigenschaften einer Phospholipidschicht selektiv modifizieren. Strukturell gesehen gehören diese Proteine zur Klasse der Membranproteine. Im Darmbakterium *Escherichia coli* beispielsweise, bilden Transportproteine mit einem Anteil von 10 % am Gesamtproteingehalt die umfangreichste funktionelle Gruppe.

Die Akkumulation von Substanzen im Zytoplasma bzw. in Zellkompartimenten ist thermodynamisch nicht vorteilhaft und erfordert im Gegensatz zur freien Diffusion und der Proteinkatalysierten Diffusion Energie. Bei dieser Art des Transports wird von einem *aktiven Transport* gesprochen. Aktive Transportsysteme lassen sich nach der Energiequelle, die für die Aktivität genutzt wird, in primäre und sekundäre Transportsysteme unterteilen.

Primäre Transportsysteme nutzen Adenosintriphosphat (ATP) als Energiequelle für den vektorialen Transport über Membranen. *ATP binding cassette* (ABC)-Proteine sind dabei eine der größten Proteinfamilien und wurden bisher in allen untersuchten Lebewesen gefunden.

Sekundäre Transportsysteme nutzen als Energiequelle für die durch sie vermittelte Transportprozesse vorhandene elektrochemischer Gradienten. Je nach Stöchiometrie des Transports wird dabei zwischen *Uniport*, *Symport* oder *Antiport* unterschieden.<sup>1,2</sup>

Medizinisch relevante Vertreter der Transportproteine sind sowohl bei den primären als auch bei den sekundären Transportproteine zu finden. Im folgenden soll eine Übersicht über die verschiedenen Klasse der Transportproteine erbracht und damit das immense pharmakologische Potential, das Transportproteine besitzen, gezeigt werden.

## 1.1 Die Funktion von Transportproteinen bei der Arzneimitteldisposition

Nukleotid-Transporter von Säugetieren vermitteln die zelluläre Aufnahme von physiologischen Nukleosiden für die Synthese von Nukleinsäuren.<sup>3</sup> Diese Transporter spielen jedoch eine ebenso große Rolle bei der *in vivo* Verteilung und dem intrazellulären Protein-Targeting vieler Nukleosid-Analoga, wie sie in der Krebs-Therapie und der medikamentösen Behandlung viraler Infektionen eingesetzt werden.<sup>3</sup>

Peptid-Transporter sind in die Aufnahme von Peptiden aus der Nahrung involviert. Peptid Transporter akzeptieren di- und tri-Peptide als Substrat und besitzen eine breitere Substratspezifität

als Transporter anderer Nährstoffe. Aus diesem Grund dienen Peptid-Transporter nicht nur als Nährstoff-Transporter sondern auch als Transporter von Medikamenten, die eine strukturelle Ähnlichkeit mit Peptiden haben, wie z. B.  $\beta$ -Lactam Antibiotika.

*Organic Anion* Transportproteine und *Organic Cation* Transportproteine sind zwei der wichtigsten Klassen von Proteinen für die Aufnahme, Verteilung und die Eliminierung von natürlich vorkommenden Xenobiotika, Toxinen und medizinisch relevanten Medikamenten. Obwohl beide Vertreter dieser Klasse von Transportproteinen eine unterschiedliche Präferenz für Substrate besitzen, teilen sie einige gemeinsame Eigenschaften: Sie besitzen die gleiche vorhergesagte Transmembran-Topologie, interagieren beide mit einer Vielzahl strukturell und pharmakologisch verschiedener Substanzen und werden in unterschiedlichsten Gewebetypen exprimiert.<sup>4</sup> Die Mitglieder der *Organic Cation* Transportprotein (OCT) Familie sind aktive Transporter organischer Kationen, endogener, biologisch aktiver Amine wie Acetylcholin, Cholin, Dopamin, Epinephrin, Guanidin, *N*-Methylnicotinamid und -thiamin sowie Transporter therapeutischer Arzneimittel wie Cimetidin, Amilorid, Mepiperphenidol, Morphin, Quinidin, Tetramethylammonium, Verapamil und Trimethoprim.

Im Fall von OAT1 und OAT3, die der Familie der *Organic Anion* Transportproteine (OAT) angehören, konnte ein tertiärer Transportprozess gezeigt werden. Der  $\text{Na}^+$ /Dicarboxylat Cotransporter SDCT<sub>2</sub> nutzt einen durch die  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase aufgebauten Ionengradienten, um einen Dicarboxylat-Gradienten aufzubauen, der wiederum von OAT1 und OAT3 als Energiequelle zum Transport genutzt wird.

### 1.1.1 *Multidrug Resistenz*

Bei der Behandlung maligner Gewebsveränderung ist die Applikation von Chemotherapeutika oft eine aussichtsreiche Therapiestrategie, die allerdings durch die Ausbildung von Chemoresistenzen limitiert wird. Viele Studien an Tumorzelllinien haben zudem gezeigt, daß die Aufnahme eines Medikamentes oft zu einer Kreuz-Resistenz mit anderen sowohl chemisch als auch strukturell verschiedenen Substanzen führt. Eine Chemoresistenz richtet sich daher zumeist gegen eine große Zahl strukturell unterschiedlicher Substanzen und wird durch zelluläre Transportsysteme vermittelt. Dieses Phänomen wird gemeinhin als *multidrug resistance* (MDR) Phänotyp charakterisiert.

MDR ist ein Hauptfaktor für das Versagen vieler Formen der Chemotherapie. Ein Mechanismus der MDR ist die gesteigerte Fähigkeit von Tumorzellen, zytotoxische Substanzen aktiv aus der Zelle zu transportieren, um so die intrazelluläre Konzentration dieser Substanz unterhalb toxischer Konzentrationen zu halten.<sup>5</sup>

Die medizinische Bedeutung der für die MDR verantwortlichen Transportproteine übersteigt dabei ihre Rolle bei der Behandlung von Krebs mit einer Chemotherapie. Die Transportfunktion dieser Proteine hindert zudem in vielen Fällen die Behandlung anderer Krankheiten, wie z. B. Malaria und AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*). Da in die MDR involvierte Proteine die Absorption, Distribution und Exkretion einer Vielzahl pharmakologisch wirksamer

Substanzen modulieren, besteht ein ausgeprägtes medizinisches Interesse an diesen Proteinen.

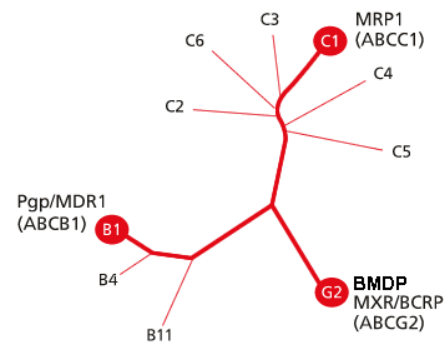
Die Resistenz gegenüber einer Therapie bei der Behandlung von Krebs konnte mit mindestens zwei Transportern in Zusammenhang gebracht werden. Die beiden Transporter sind das *P-glycoprotein* (ABCB 1) und das sogenannte *multidrug resistance-associated protein* (ABCC 1). Sowohl ABCB 1 als auch ABCC 1 sind primäre Transporter und gehören der Überfamilie der ABC-Transporter an. Aufgrund ihrer Funktion und Bedeutung sind sie das Ziel verschiedener Ansätze bei der Krebs-Behandlung. Obwohl sich diese Arbeit ausschließlich mit ABCC 1 beschäftigt, ist es wichtig einen Überblick über die Familie der ABC-Transporter zu gewinnen. Daher wird im folgenden zunächst die Familie der ABC-Transportproteine vorgestellt, bevor auf ABCC 1 Bezug genommen wird.

## 1.2 ABC-Transportsysteme

Der spezifische Transport von Molekülen über Lipidmembranen ist unabdingbare Voraussetzung für alle lebenden Organismen und eine große Anzahl an spezifischen Transportern hat sich entwickelt, um diese Aufgabe auszuführen. Dabei ist die größte Genfamilie der Transportproteine die der ABC-Transporter. Diese primären Transporter binden ATP und nutzen dessen Hydrolyseenergie, um enorm viele, unterschiedliche Moleküle, darunter Zucker, Aminosäuren, Metallionen, Peptide, Proteine und eine große Zahl hydrophober Moleküle und Metaboliten, gegen elektrochemisch Gradienten über intrazelluläre Membranen und Plasmamembranen zu transportieren. Viele ABC-Transporter verteilen Metaboliten zwischen den Zellkompartimenten. Zudem pumpen Vertreter dieser Transportfamilie Substrate aus dem Zytoplasma auf die Außenseite der Zelle in das umgebende Gewebe oder zur Sekretion aus dem Körper. Daher sind ABC-Transporter für viele in der Zelle ablaufende Prozesse essentiell. Mutationen der zugehörigen Gene verursachen Krankheitsbilder wie Mukoviszidose, neurologische Krankheiten, retinaler Degeneration, Cholesteroll- und Gallensalz-Transportdefizite sowie Anämie bzw. tragen zu deren Ausbildung bei. Darüber hinaus sind viele ABC-Transporter auch an der *Multidrug-Resistenz* beteiligt (siehe Abbildung 1). Diese Medikamente transportierenden Proteine sind in allen Gewebe- und Zelltypen in unterschiedlichen Mengen und, unter bestimmten Umständen, unterschiedlichen Membranen vertreten. Zusammen bilden sie eine wichtige Einheit des Verteidigungsmechanismus von sowohl normalen als auch malignen Zellen gegen zytotoxische Substanzen.

Die Klassifizierung von Proteinen als ABC-Transporter erfolgt anhand dreier Sequenzmotive ihrer zytoplasmatischen ATP-Bindungsdomänen (NBDs), die hoch konserviert sind. Diese Motive tragen die Namen Walker A Motiv, Walker B Motiv und ABC-Signatursequenz.

Derzeit sind auf Grundlage des humanen Genoms 48 Gene für ABC-Proteine identifiziert worden. Die Gruppe der ABC-Proteine wurde in sieben Unterklassen, von ABCA bis ABCG, eingeteilt<sup>1</sup>. Die Einteilung erfolgte basierend auf genomischer Organisation, Ordnung von Domänen und Sequenzhomologien. In Abbildung 1 ist der phylogenetische Stammbaum der zur Zeit bekannten ABC-Transporter dargestellt, die in die MDR involviert sind.



**Abbildung 1:** Phylogenetischer Stammbaum MDR involvierter ABC-Transporter. Eine fett gedruckte Linie und ein Kreis indiziert die an der MDR beteiligten Transporter. Ihre nahen Verwandten sind ebenfalls im Diagramm eingetragen.

Die **ABCA**-Unterfamilie der ABC-Transporter besitzt zwölf Mitglieder. Bisher wurden zwei Mitglieder dieser Unterfamilie eingehender studiert. Defekte des Transporters ABCA 1 führen zu Krankheitsbildern des Cholesterol-Transports und der HDL Lipoprotein Biosynthese. ABCA 4 transportiert Vitamin A Derivate in die äußeren Segmente von Photorezeptorzellen und besitzt daher eine wichtige Funktion im Sehzyklus.

Die Einzigartigkeit der **ABCB**-Unterfamilie besteht darin, daß in ihr sowohl Voll- als auch Halbtransporter vertreten sind. ABCB1 (MDR 1, P-gp), ein 170 kDa großes Protein, war der erste humane ABC-Transporter, der identifiziert und charakterisiert wurde. Dieser Transporter erregte Aufsehen, da eine verstärkte Expression von ABCB 1 häufig mit einer MDR assoziiert werden kann.<sup>6-9</sup> Das Auftreten einer Multidrug-Resistenz konnte somit zum ersten Mal mit der Expression eines Proteins in Zusammenhang gebracht werden. ABCB 1 ist das am besten charakterisierte ABC-Transportsystem. Seine Substrate schließen hydrophobe und kationische Wirkstoffe ein. So transportiert diese Protein beispielsweise die Anthracycline Doxo- und Daunorubicin, sowie die Vinca Alkaloide Vincristin und Vinblastin. Eine wichtige physiologische Funktion von ABCB 1 wurde 1989 entdeckt, als dieses der luminalen, also der dem Blut zugewandten Seite der Kapillarendothelzellen im Gehirn zugeordnet und damit ABCB 1 (P-gp) eine Rolle im Export von Pharmaka aus dem Gehirn zugeschrieben werden konnte.<sup>10</sup> ABCB 4 und ABCB 11 sind in der Leber lokalisiert und an der Sekretion von Gallensalzen beteiligt. ABCB 2 und ABCB 3, die auch TAP genannt werden, sind Halbtransporter, die zum Transport von Peptiden in das Endoplasmatische Retikulum ein Heterodimer bilden. Der Halbtransporter ABCB 9 befindet sich in den Lysosomen und die Halbtransporter ABCB 6, ABCB 7, ABCB 8 und ABCB 10 wurden in den Mitochondrien gefunden, wo sie am Eisen Metabolismus und dem Transport von Fe/S Protein Vorläufern beteiligt sind.

Die **ABCC** Unterfamilie enthält zwölf Volltransporter, die verschiedene Funktionen ausführen und die nicht alle dem Phänotyp der MDR zugeordnet werden können. Transporter der ABCC Unterfamilie transportieren Ionen, sind Rezeptoren an der Zelloberfläche und sekretieren Toxi-

<sup>1</sup><http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>

ne. ABCC 7 (CFTR) ist ein cAMP regulierter Chloridkanal und ist beteiligt an der exokrinen Sekretion.<sup>11</sup> Mutationen des ABCC 7 führen zum Krankheitsbild der Mukoviszidose. ABCC 8 und ABCC 9 (SUR 1 und SUR 2) sind Zellrezeptoren, die Sulfonylurea binden. Sie regulieren die in die Insulin Sekretion involvierten Kalium Kanäle und können am besten als intrazelluläre ATP-Sensoren beschrieben werden.<sup>11</sup> Der Rest dieser Unterfamilie besteht aus neun *Multidrug Resistance associated* Proteingenen. Von diesen Proteinen transportieren ABCC 1, 2 und 3 (MRP 1, 2 und 3) zu Gluthathion konjugierte Medikamente und andere organische Anionen. ABCC 4, ABCC 5 ABCC 11 und ABCC 12 sind kleiner als die anderen Mitglieder dieser Unterfamilie und besitzen nicht die aminoternale Domäne. Diese Domäne scheint allerdings nicht essentiell für den Transport zu sein. Die Membranproteine ABCC 4 und ABCC 5 (MRP 4 und 5) vermitteln Resistenzen gegen Nukleosidanaloga.

Die **ABCD** Unterfamilie ist aus vier Genen aufgebaut. Alle Gene kodieren für Halbtransporter, die in den Peroxisomen lokalisiert sind. Dort fungieren sie als Homo- und/oder Heterodimere bei der Regulation des Transports sehr langer Fettsäuren.

Die **ABCE** und **ABCF** Unterfamilien enthalten Gene, die offensichtlich von ABC-Transportern abstammen, aber keine Transmembrandomänen besitzen. Eine Transportaktivität in Membranen ist nicht bekannt.

Die humane **ABCG** Unterfamilie besteht aus sechs sogenannten *reversen* Halbtransportern, deren NBD am Aminoternus und deren Transmembrandomänen am Carboxyterminus positioniert ist. Der Säugetier ABCG 1 Transporter ist in den Cholesterol-Transport und seine Regulation involviert. ABCG 2 ist ebenfalls ein *Multidrug*-Transporter. Dieser Transporter wird unter anderem in der Blut-Hirn-Schranke exprimiert.<sup>12,13</sup> ABCG 5 und ABCG 8 sind Transporter von Sterolen in Darm und Leber.

Von den vorgestellten Transportern sind mindestens sieben ABC-Transporter an der MDR beteiligt (ABCB 1, ABCC 1–5 und ABCG 2). Durch ihr breites Substratspektrum und die große Zahl an Transportern, wird Zellen die Resistenz zu einer solch großen Zahl strukturell diverser Moleküle vermittelt.

Trotz der Fülle von Informationen, die bereits über *Multidrug*-Transporter vorliegt, ist jedoch noch immer unklar, wie es zu der breiten Substratspezifität kommt und wie der eigentliche Transportmechanismus auf molekularem Niveau abläuft.

### 1.3 ABCC 1

1987 wurde eine ABCB 1 (P-gp) unabhängige Form der MDR beschrieben<sup>16–18</sup>, die einem zweiten *Multidrug Resistance* Protein zugeschrieben werden konnte. Dieses Protein wurde *Multidrug Resistance Associated Protein* (MRP, MRP 1, ABCC 1) genannt und besitzt nur eine 20 %ige Sequenzhomologie zu ABCB 1 (P-gp). Dennoch besitzen beide Proteine ein sich überschneidendes Spektrum an Substanzen, die von ihnen transportiert werden.<sup>19,20</sup> ABCC 1 ist das zuerst entdeckte und zugleich am besten charakterisierte Mitglied der zuvor erwähnten C-Typ Unterfamilie der ABC-Transporter. Dieser Transporter wurde zuerst aus einer Zelllinie kloniert, bei der die Expres-

Symbol	Synonym	Funktion
ABCA 1	ABC1	Cholesterol-Transport
ABCA 2	ABC2	<i>Drug resistance</i>
ABCA 3	ABC3, ABCC	Surfactant Sekretion?
ABCA 4	ABCR	<i>N-Retinyldiene-PE Efflux</i>
<b>ABCB 1</b>	PGY1, MDR	<i>Multidrug Resistance</i>
ABCB 2	TAP1	Peptidtransport
ABCB 3	TAP2	Peptidtransport
ABCB 4	PGY3	Phosphatidylcholin-Transport
ABCB 6	MTABC3	Eisen-Transport
ABCB 7	ABC7	Fe/S-Cluster transport
ABCB 11	SPGP	Transport von Gallensalzen
<b>ABCC 1</b>	MRP 1	<i>Drug resistance</i>
ABCC 2	MRP 2	<i>Organic Anion-Efflux</i>
ABCC 3	MRP 3	<i>Drug resistance</i>
ABCC 4	MRP 4	Nukleosid-Transport
ABCC 5	MRP 5	Nukleosid-Transport
ABCC 6	MRP 6	
ABCC 7	CFTR	Chlorid Ionen Kanal
ABCC 8	SUR	Sulfonylurea Rezeptor
ABCC 9	SUR2	K(ATP) Kanal Regulation
ABCC 10	MRP7	
ABCD 1	ALD	VLCFA-Transport-Regulation
ABCD 2	ALDL1, ALDR	
ABCD 3	PXMP1, PMP70	
ABCD 4	PMP69, P70R	
ABCE 1	OABP, RNS4I	Oligoadenylate-Bindungsprotein
ABCF 1	ABC50	
ABCG 1	ABC8, White	Cholesterol-Transport?
<b>ABCG 2</b>	ABCP, MXR, BCRP	Toxin Efflux, <i>Drug resistance</i>
ABCG 5	White3	Sterol transport

**Tabelle 1:** Auflistung einer Auswahl von ABC-Transportproteinen. Neben der vorgeschlagenen Nomenklatur für ABC-Transporter ist/sind in der Tabelle der/die Trivialname(n) aufgeführt. Soweit bekannt ist zudem die (vermutliche) Funktion des Transportes, bzw. die mit diesem Transporter in Zusammenhang gebrachte Krankheit aufgeführt. Fett hervorgehoben sind die Transportproteine die an dem Phänotyp der multiplen Resistenz beteiligt sind.<sup>14,15</sup>

sion von ABCB 1 (P-gp) nicht hochreguliert ist.<sup>16,21,22</sup> Das 190 kDa große Glycoprotein wird in den meisten Gewebetypen synthetisiert, wobei das Expressionsniveau in der Lunge, den Hoden und der Niere geringfügig höher ist.<sup>21,23</sup> Verschiedene Zelltypen des Hirns, wie z. B. der Choroid Plexus, exprimieren ABCC 1 und es wird angenommen, daß ABCC 1 Teil der Permeabilitätsbarriere zwischen Blut und der cerebrospinalen Flüssigkeit ist.<sup>24</sup> Es gibt Hinweise darauf, daß die natürliche Funktion von ABCC 1 der Schutz von Zellen vor durch Xenobiotica induzierten Schäden ist.<sup>24</sup>

In polarisierten Endothelzellen wird ABCC 1, im Gegensatz zu anderen Transportern wie ABCB 1 (P-gp), ABCC 2 und ABCG 2, die in der apikalen Membran gefunden werden, in der basolateralen Membran gefunden.<sup>25</sup> Unter gewissen Umständen und in bestimmten Zelltypen kann ABCC 1 auch in intrazellulären Membranen der sekretorischen Vesikel gefunden werden, die dem Golgi-Apparat entstammen.<sup>26</sup> Intrazelluläres ABCC 1 ist aktiv, seine physiologische Funktion ist jedoch noch nicht verstanden.

Die Transportmechanismen von ABCC 1 und ABCB 1 (P-gp) unterscheiden sich. Im Gegensatz zu ABCB 1 benötigt ABCC 1 zum Transport einiger Naturstoffe, wie z. B. Vincristin und Daunorubicin, physiologische Mengen Gluthation (GSH). Zudem ist ABCC 1 ein aktiver Transporter erster Art bezüglich GSH, oxidiertem GSH (GSSG), sowie vieler mit GSH, Glucoronat und Sulfat konjugierten organischer Anionen.<sup>11,27</sup> In Tabelle 2 ist ein Ausschnitt des Substratspektrum von ABCC 1 aufgelistet. Das Substrat mit der bislang höchsten Affinität zu ABCC 1 ist LTC<sub>4</sub> 4 ( $K_m \approx 100$  nM). Ein anderes, möglicherweise physiologisch relevantes Substrat von ABCC 1 ist das GSH konjugierte 4-Hydroxy-*trans*-2-nonenol (4-HNE). 4-HNE ist ein hochreaktives, toxisches Produkt der Lipidperoxidation,<sup>28</sup> das entsteht wenn Membranen oxidativem Stress ausgesetzt werden. Dieser Stress kann von Substanzen wie Doxorubicin erzeugt werden. Die Hauptentgiftungsroutine der Zelle für solche toxischen Aldehyde ist die spontane Konjugation mit GSH, das sukzessive aus dem Zellumen transportiert werden muß, um eine Produkt-hemmung der konjugierenden Enzyme zu vermeiden. Die Affinität zu GSH ( $K_m$  1–5 mM<sup>29,30</sup>) ist geringer als die seiner oxidierten Form.<sup>31,32</sup> Die geringe Stereoselektivität und das breite Spektrum strukturell unterschiedlicher Substanzen, die ABCC 1 transportiert, können bislang noch nicht durch ein Modell erklärt werden. Die Funktion von GSH in dem durch ABCC 1 vermitteltem Transport scheint Komplex zu sein und auch hierfür konnten noch keine mechanistischen Details ergründet werden. Es ist jedoch klar, daß nicht die reduzierenden Eigenschaften von GSH entscheidend sind, da auch nicht reduzierende GSH Analoga ohne Sulfhydrylfunktion in der Lage sind, die Transportaktivität von ABCC 1 zu stimulieren.<sup>27,29,33,34</sup>

Therapeutische Substanzen	Vincristin, Vinblastin, Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Etoposide (VP-16), CPT-11, SN-38, Methotrexate, Hydroxyflutamid, Flutamid, Ritonavir, Sequinovar
GSH konjugierte Substanzen	LTC <sub>4</sub> , LTD <sub>4</sub> , GS-4-HNE, GS-Prostaglandin A <sub>2</sub> , GS-15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ , Prostaglandin J <sub>2</sub> , GS-Thiotepa, GS-Cyclophosphamid, GS-chlorambucil, GS-Melphalan, GS-ethacrynic Säure, GS-Sulforaphane, GS-DNP, GS-CDNB, GS-4-Nitroquinolin-1-oxid, GS-aflatoxin B <sub>1</sub> , GS-metolachlor
Glucoronid Konjugierte Substanzen	E <sub>2</sub> 17 $\beta$ G, SN-38-glucoronid, NNAL-O-glucoronid
Sulfat konjugierte Substanzen	Sulfatolithocholat, Estrone-3-sulfat, DHEAS
Fluorophore	Calcein, Fluo-3, BCECF, SNARF
Andere Substanzen	GSH, GSSG, ALLN, <sup>99m</sup> Tc-Sestamibi, <sup>99m</sup> Tc-Tetrofosmin, B22956/1, Natriumarsenit, Kaliumantimonit, Natriumantimonat

**Tabelle 2:** Substrate des humanen ABCC 1. ABCC 1 transportiert endogene und exogene Metaboliten einer bemerkenswerten strukturellen Diversität. Die Bandbreite der transportierten Substrate umfasst natürlich vorkommende Substanzen, aber auch synthetische Medikamente. Das Substratspektrum von ABCC 1 unterscheidet sich von dem des ABCB 1 (P-gp) als ABCC 1 eine stärkere Präferenz für organische Anionen besitzt.<sup>25</sup>

## 1.4 Die Struktur von ABC-Transportern

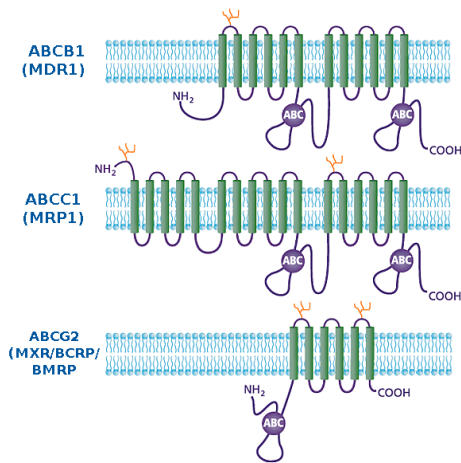
### Die Transmembrandomänen

Die meisten ABC-Proteine sind Transportproteine, die eine Vielzahl von Substanzen über Membranen transportieren. Zu diesem Zweck enthalten diese Proteine Domänen, die Membranen durchspannen, die im folgenden Transmembrandomänen (TMD) genannt werden. Diese Transmembrandomänen sind gewöhnlich aus sechs Transmembran-(TM-)Helices aufgebaut.

Neben den Transmembrandomänen enthalten ABC-Transporter auch zytosolische Domänen, die die Fähigkeit zur Bindung und Hydrolyse von ATP besitzen. Die Domänen werden ATP-Bindungsdomänen oder ABC-Domänen genannt.

Die Minimal-Voraussetzungen für einen aktiven ABC-Transporter sind anscheinend zwei TMD- und zwei ATP-Bindungsdomänen. Diese Untereinheiten können innerhalb einer Polypeptidkette liegen, wie es bei sogenannten Voll-Transportern der Fall ist; sie können aber auch als Homo- oder Heterodimer innerhalb einer Membranmatrix vorliegen.<sup>15</sup>





**Abbildung 2:** Wahrscheinliche Topologie der Transmembranbereiche der wichtigsten in die MDR involvierten ABC-Transporter. Grüne Balken repräsentieren die TM-Helices, die goldenen Verzweigungen glykolisierte Bereiche auf der extrazellulären Seite und die violetten Bereiche die ATP-Bindungsdomänen.

Domäne bildet, die mit dem Mittelstück von ABCC 1 interagiert.<sup>36</sup>

Das dritte ABC-Protein, das wahrscheinlich eine Funktion in der klinischen MDR besitzt ist der sogenannte Halbtransporter ABCG 2 (MXR/BCRP/BMDP)<sup>12,37</sup>. Dieser Transporter hat eine einzigartige Anordnung seiner Domänen mit einer *N*-terminalen Lokalisierung der ATP-Bindungsdomäne. Es konnte gezeigt werden, daß dieses Protein ein aktives Homodimer für seine Transportaktivität formt.<sup>38,39</sup>

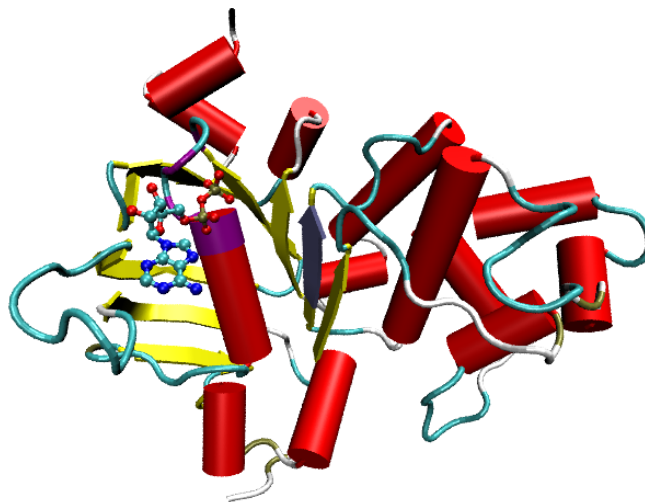
### 1.4.1 Die Struktur der ABC-Domäne

1998 wurde von der ersten hochaufgelösten Kristallstruktur einer ABC-Domäne berichtet<sup>40</sup>. In Abbildung 3 ist das ATP-Bindungsmotiv von ABCB 2 (Tap 1) graphisch dargestellt.<sup>40</sup> Diese, wie auch andere ABC-Bindungsdomänen offenbaren eine aus zwei Unterdomänen aufgebaute Architektur. Zum einen eine Unterdomäne, die ausschließlich aus  $\alpha$ -Helices aufgebaut ist (Domäne II) und eine Unterdomäne, die aus einer zentralen  $\alpha$ -Helix aufgebaut ist (Domäne I), die von  $\beta$ -Faltblattstrukturen umgeben ist. Alle ABC-Proteine enthalten mindesten drei charakteristische Peptid Sequenzen. Zusätzlich zu ihren Walker A und Walker B Motiven<sup>41</sup> enthalten ABC-Transportproteine eine hoch konservierte Signatursequenz. Die ABC-Signatursequenz lautet im IUPAC Einbuchstabencode für Aminosäuren *LSGGQ*, von der angenommen wird, daß sie an der Erkennung, der Bindung und der Hydrolyse von ATP beteiligt ist.<sup>42</sup> Sämtliche dieser Sequenzen befinden sich in der ABC-Domäne der Transporter. Während die Walker-Motive in

In Abbildung 2 sind die wahrscheinlichsten topologischen Modelle für die Transmembran-Helices der drei am in die MDR involvierten ABC-Transporter illustriert. ABCB 1 (P-gp) besitzt in beiden TMD jeweils sechs TM Helices. Jede TMD wird von einer ABC-Domäne gefolgt. Diese Tandem-Topologie wurde auch für ABCB 4 (MDR 3) und ABCB 11 berechnet.

Im Gegensatz zu ABCB 1 besitzt ABCC 1 ein zusätzliches *N*-terminales Segment von ca. 280 Aminosäuren. Der größte Teil dieses Segments ist in die Membran eingebettet. Wahrscheinlich besitzt dieses Fragment (TMD0) fünf Transmembran-Helices. Ein kurzer zytoplasmatischer Loop einer Länge von ungefähr 80 Aminosäuren verbindet die TMD0 mit den anderen Transmembrandomänen.<sup>19,35</sup> Während die TMD0 alleine keine entscheidene Funktion bei der Transportaktivität besitzt, ist die Anwesenheit des zytoplasmatischen Loops von entscheidender Bedeutung für die intrazelluläre Ziel-Steuerung und die Transportaktivität des Proteins. Es gibt Hinweise darauf, daß die L0 Region eine ausgeprägte strukturelle und funktionelle

allen ATP bindenden Proteinen präsent sind, ist anhand der ABC-Signatur, die sich in der Unterdomäne II der 200–250 Aminosäure langen ATP-Bindungsdomäne befindet, die ausschließlich  $\alpha$ -Helices enthält, eine Identifizierung von ABC-Proteinen möglich. Domäne I besitzt eine  $\alpha/\beta$  Struktur und enthält die Bindungsstelle für Nukleotide. Diese Bindungstasche ist zum einen aus dem Walker A Motiv aufgebaut, das aus den ersten drei Aminosäuren der zentralen Helix besteht. Zum anderen ist an der ATP-Bindung das Walker B Motiv beteiligt, das sich im  $\beta$ -Faltblatt neun befindet und ein konserviertes Histidin besitzt, das als  $\gamma$ -Phosphat-Sensor dient. Dieses konservierte Histidin befindet sich in der sogenannten »switch II« Region zwischen  $\beta$ -Faltblatt zehn und Helix sieben der ATP-Bindungsdomäne.<sup>43</sup> Die Interaktion der Phosphatan-



**Abbildung 3:** Ribbonstyle Darstellung der Kristallstruktur der C-Terminalen ATPase Domäne humanen ABCB 2 (TAP 1). Die ATP-Bindungsdomäne komplexiert ADP und Magnesium(II). Violett eingefärbt ist das Walker A Motiv und blau das Walker B Motiv. Die Abbildung wurde mit dem Programm VMD erstellt.

teile des Nukleotids erfolgt in kanonischer Weise mit den Aminosäure-Gruppen des Walker A Motivs. Der Hauptkontakt erfolgt zwischen dem aromatischen Ringsystem des ATPs über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit einem konservierten Tyrosin oder Phenylalanin. Dies erklärt die geringe Präferenz von ABC-Domänen für verschiedene Nukleotidtriphosphate. Aufgrund der Kooperativität der ATP-Hydrolyse und der Tatsache, daß für die Funktionalität der Transporteigenschaften von ABC-Transportern zwei ABC-Bindungsdomänen notwendig sind, führt zu der Annahme, daß die ATP-Bindungsdomänen miteinander interagieren. Nachdem verschiedene mögliche ABC-Dimere kristallisiert wurden<sup>44,45</sup>, wird heute angenommen, daß die ATP-Hydrolyse ein kooperativer Prozeß ist, bei dem die Schlüsselaminosäuren jedes Monomers bei der ATP-Bindung und -Sensorik teilnehmen und dabei ein Dimer in einer Kopf zu Schwanz Anordnung bilden. Die sogenannte Signaldomäne Domäne II besteht ausschließlich aus  $\alpha$ -Helices und enthält die

Signatursequenz. Wahrscheinlich interagiert diese Domäne mit den Transmembrandomänen. Bis heute wurden drei ABC-Transporter in voller Länge kristallisiert.<sup>46-48</sup> Abbildung 4 zeigt die Struktur eines solchen Transporters.

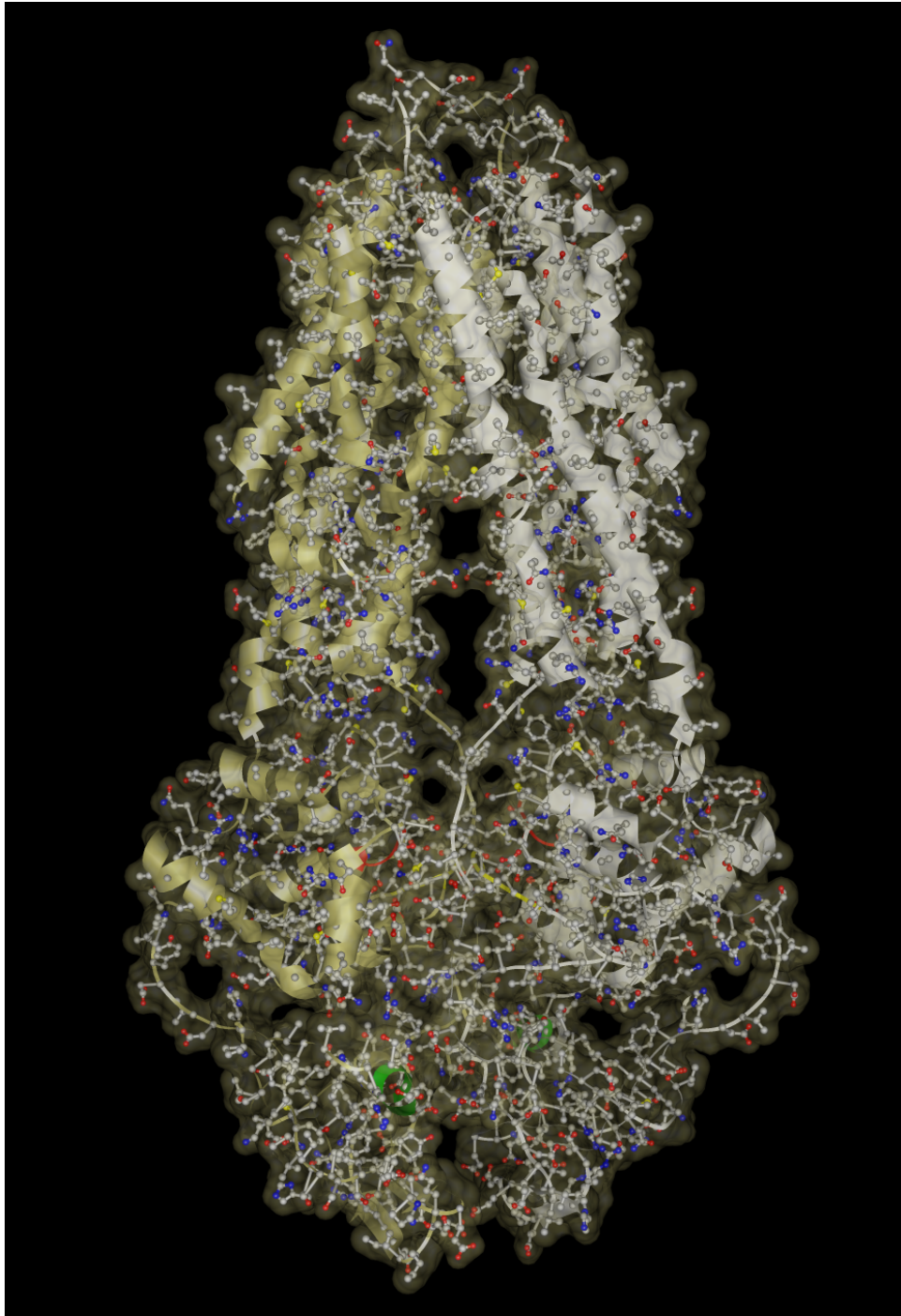
Die gewonnenen Daten lassen den Schluß zu, daß die Struktur und die Packung der TMD wahrscheinlich von ABC-Transporter zu ABC-Transporter variieren wird und daß nicht nur Substratspezifität, sondern auch die chemische Natur des transportierten Substrats einen Einfluß auf die Anordnung haben könnte.<sup>43</sup>

#### 1.4.2 Der Transportmechanismus von ABC-Transportern

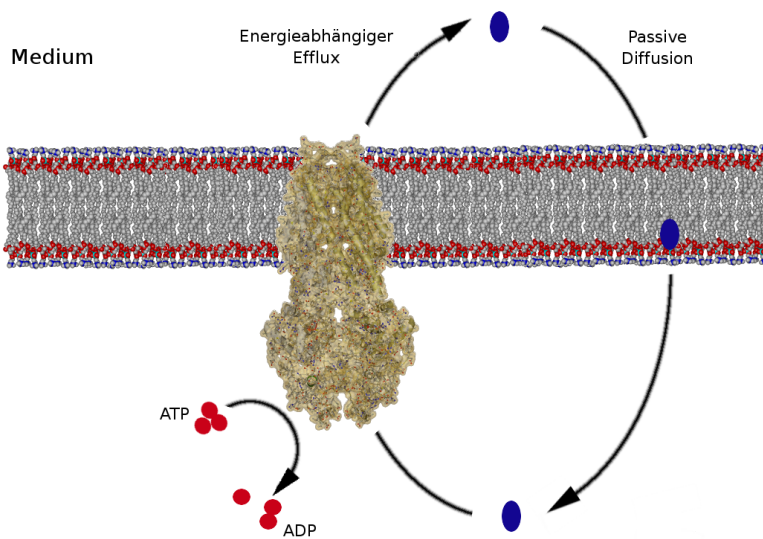
Trotz der Aufklärung der Strukturen dreier unterschiedlicher ABC-Transporter in voller Länge bleibt der Mechanismus des Transports von Substraten weiterhin heftig debatiert. Der Mangel an aufgeklärten Strukturen in Schlüsselschritten des Transports mit Substraten und Inhibitoren läßt trotz der inzwischen großen Zahl struktureller Daten bisher keine Schlüsse auf den genauen Mechanismus zu. In Mutationsanalysen und auf Grundlage von *Homology Modelling* basierten Strukturen konnten jedoch bisher wichtige Aminosäuren betreffend der Aktivität und der Substratspezifität verschiedener Transporter ermittelt werden.<sup>50</sup> Es bleibt jedoch unklar auf welche Weise der Substrat-Transport erfolgt und auf welche Weise die Bindung des Substrats an welcher Stelle erfolgt.

Im Falle von MDR1 wird angenommen, daß es zwei Bindungsstellen, eine mit hoher und eine (oder mehrere) mit niedriger Affinität, innerhalb seiner TMD besitzt. Die publizierte Struktur geringer Auflösung von MDR1<sup>51</sup> läßt auf eine große konformationelle Umlagerung bei dem Transportprozeß innerhalb der TMD schließen, die durch die Bindung von ATP induziert wird. Beide vorgeschlagenen Modelle gehen von einer alternierend agierenden Weise der NBD aus. In einem Modell wird der Transport des Substrats von der Bindungsstelle mit hoher Affinität zu der niedriger Affinität bei Dissoziation anorganischem Phosphats von der NBD vorgeschlagen was mit einem Übergang von einem energetisch hohem auf ein niedrigeres Niveau einhergeht.<sup>52</sup> Das andere Modell geht von einer simultanen Bindung zweier Substratmoleküle an Bindungsstellen aus und daß ATP-Hydrolyse die notwendige Energie für die Dissoziation des Substrats liefert.

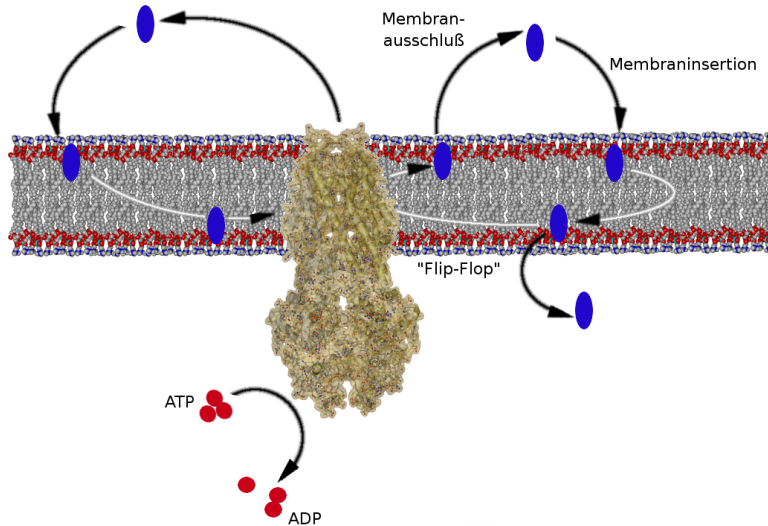
Des weiteren bleibt umstritten, ob die Bindung von ATP, seine Hydrolyse oder die Dissoziation des anorganischen Phosphats der Anstoß für den Transport ist.<sup>53</sup> Ebenso diskutiert wird, warum zwei ATP-Bindungsdomänen nötig sind und wie ihre Interaktion untereinander ist. Es wurde ein modifiziertes Modell vorgeschlagen<sup>54</sup>, in dem beide ATP-Bindungsstellen zufällig belegt werden. Nach Bindung von ATP an eine Bindungsstellen wird dabei die Affinität der anderen Bindungsstelle reduziert und erst nach ADP-Dissoziation wird die hohe Affinität dieser ATP-Bindungsstelle wieder hergestellt. ATP bindet nun an diese zweite Bindungsstelle mit nunmehr hoher Affinität und seine Hydrolyse wird genutzt, um den Grundzustand des Transporter wieder herzustellen. Während dieses Modell die Tatsache erklärt, daß ATP Hydrolyse und Bindung des Substrats eng miteinander gekoppelt sind, impliziert das alternative Modell jedoch die



**Abbildung 4:** *Ribbonstyle* Darstellung der Kristallstruktur von MsbA aus *vibrio cholerae*, einem ABC-Transporter homologen Proteins, in einer Auflösung von 3,8 Å. Der Bereich der Aminosäuren, der das obere Drittel der Abbildung repräsentiert, ist in die Membran eingebettet. Der untere Bereich enthält zwei ATP-Bindungsmotive. Der Transporter liegt in der geschlossenen Form vor.<sup>48</sup>



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung eines möglichen Transportmechanismus für den Substrat-Transport aus der Zelle durch ABCB 1 (P-gp).<sup>49</sup> Das Substrat wird im Zytosol aufgenommen und aktiv ins Medium transportiert. Der Eintritt des Substratmoleküls in die Zelle erfolgt durch passive Diffusion über die Membran. Trotz der schematischen Natur der Zeichnung sind die Größenverhältnisse von Protein zu Membran und der Bereich mit dem das Protein in die Membran eingelagert ist, korrekt dargestellt.



**Abbildung 6:** Im linken Bereich ist der Mechanismus des *hydrophobic vacuum cleaners* vorgestellt. Das in der Membran befindliche Molekül wird von der inneren Seite der Membran aufgenommen und ins Medium transportiert. Rechts ist das Flippase-Modell abgebildet. Zwischen äußerer Seite der Membran und Medium, sowie zwischen innerer Seite der Membran und dem Medium besteht ein Konzentrationsgleichgewicht, daß durch die Flippaseaktivität auf die äußere Membranseite und somit Richtung Medium verschoben wird.

Hydrolyse von jeweils zwei Molekülen ATP.

Im Falle von MDR1 und des Maltose-Importers konnte gezeigt werden, daß ungefähr ein ATP während eines Transportzyklus hydrolysiert wird.<sup>55,56</sup> Inhibitorstudien haben zudem gezeigt, daß jeweils nur eine der ATP-Bindungsstellen durch Vanadat besetzt wurde.

Ein zur Zeit diskutiertes Modell schlägt eine Dimerisierung beider ATP-Bindungsdomänen vor, die durch die Bindung von ATP induziert wird. Diese Dimerisierung ist nach diesem Modell der Schlüsselschritt zur ATP-Hydrolyse und die Umsetzung der freiwerdenden Energie in einen Transportprozess. Dabei könnte die Dissoziation der Dimere den eigentlichen Transportprozess in Gang setzen. Da die ABC-Bindungsdomänen eng mit den Transmembrandomänen verknüpft sind, könnte die Assoziation/Dissoziation der ABC-Bindungsdomänen die Öffnung des Translokationspfades regulieren.

Im Falle von ABCB 1 scheint der Kraftstoß für den Substrattransport dabei von der ATP-Bindung und nicht von der Hydrolyse des ATP auszugehen.<sup>57</sup> Die Beobachtung jedoch, daß einige ABC-Transporter in Pilzen wie auch die humanen ABC-Transporter ABCC 7 (CFTR) und ABCB 2 (TAP) einen degenerierten C-Loop in einer der beiden NBDs besitzen, läßt die Möglichkeit offen, daß nur eine NBD funktionell agiert und die andere eine regulatorische Funktion haben könnte, wie es auch für ABCC 1 diskutiert wird.<sup>25</sup>

Welches dieser Modelle den Transportmechanismen korrekt interpretiert, bleibt zur Zeit Gegenstand der aktueller Forschung. Insgesamt ist es jedoch immer noch ungewiß, ob und warum beide Domänen unterschiedlich agieren, wie sie miteinander kommunizieren und zu welchem Zeitpunkt des Substrat-Transport stattfindet.

### **Transportmechanismus von ABCC 1**

Es konnte gezeigt werden, daß die Substrat-Bindung an ABCC 1 von der inneren Seite der Membran erfolgt<sup>58-64</sup>, während die Bindungsstelle für Glutathion jedoch von der zytosolischen Seite zugänglich ist.<sup>65</sup> Die ATP-Hydrolyse reduziert die Affinität von ABCC 1 für das Substrat derart, daß es dessen Diffusion ins extrazelluläre Medium erlaubt.<sup>33,66</sup>

Manciu et al. untersuchten die in einem Glutathion abhängigen Substrat-Transport involvierten strukturellen Änderungen von ABCC 1<sup>67</sup>. Sie konnten zeigen, daß während eines GSH-abhängigen Substrat-Transportes ABCC 1 keine Änderungen in seiner Sekundärstruktur vollzieht, sich jedoch die Zugänglichkeit zur äußeren Umgebung ändert. Die Substratbindung erzeugt eine Umordnung der in die Membran eingelagerten Domänen, die sich allerdings nicht auf die zytosolischen Bereiche des Proteins auswirkt. Von der Bindung des Substrats allein geht also kein allosterisches Signal aus. Die Bindung von GSH induziert wiederum eine strukturelle Änderung der zytosolischen Bereiche des Transporters, die die Bindung und/oder Hydrolyse von ATP verstärkt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß durch GSH-Bindung vermittelte Konformationsänderungen des Proteins für die Kopplung von Substrat-Transport und Hydrolyse von

ATP entscheidend sind.

Nach Bindung von ATP adaptiert das Protein eine Konformation, die sich durch eine verringerte Stabilität und/oder eine erhöhte Zugänglichkeit bezüglich des wässrigen Mediums auszeichnet. Eine Änderung der Konformation der Transmembran-Helices konnte dem gegenüber nicht beobachtet werden.<sup>67</sup>

Kritische Determinanten für eine Interaktion von GSH mit seiner Bindungsdomäne in ABCC 1 sind der Raumbedarf der  $\gamma$ -Glutaminsäure und dessen  $\gamma$ -COOH Verknüpfung zum Cystein.<sup>34</sup>





## 2 Zielsetzung

Ein Drittel aller im Menschen gefundener Proteine sind membrangebundene Proteine, von denen ein signifikanter Teil Transport-Proteine ist. Eine der größten dieser Proteinfamilien ist dabei die Überfamilie der ABC-Transporter. ABC-Transporter transportieren getrieben durch die Hydrolyse von ATP eine große Zahl unterschiedlichster Substanzen, von denen einige therapeutisch wirksam sind, aktiv über Membranen.

Defekte bei diesen Transportern führen beim Menschen zu Krankheitsbildern wie z. B. der Mukoviszidose. Darüber hinaus sind mindestens drei dieser Proteine für eine Multiresistenz gegenüber strukturell und funktionell verschiedener Substanzen verantwortlich. Die Überexpression dieser Transporter in malignem Gewebe erschwert die Behandlung durch eine Chemotherapie aber auch die medikamentöse Behandlung anderer Krankheiten, wie z. B. AIDS.

Die Fähigkeit, in der Entwicklung befindliche Medikamente dahingehend zu beurteilen, ob sie mögliche Kandidaten für einen Transport durch Membran-Transporter sind, ist von großem Interesse. Diese Fähigkeit setzt jedoch detaillierte mechanistische Kenntnisse des Transportablaufs auf molekularer Basis voraus.

Eine elegante Methode zum Entwurf von Modellvorstellungen, der Deutung und Planung zukünftiger Experimente ist das *Molecular Modelling*. Die homologie-basierte Konstruktion von dreidimensionalen Modellen kann wertvolle Einblicke in mögliche strukturelle Details eines Proteins liefern, auf deren Grundlage neue Ideen und Vorstellungen für Transportmechanismen gewonnen werden können.

ABCC 1 ist eines der am besten untersuchten Transportproteine, die am Phänotyp multipler Resistenzen beteiligt sind. Dennoch gibt es bisher nur wenig Informationen über die Struktur dieses Proteins. Auf der anderen Seite ist die Struktur der ATP-Bindungsdomäne potentiell homologer Proteine bekannt. Wie auch andere Volltransporter der ABC-Überfamilie enthält ABCC 1 zwei ATP-Bindungsdomänen, die jedoch im Gegensatz zu anderen Transportproteinen nicht äquivalent sind. In der vorliegenden Arbeit soll die Struktur dieser C-terminalen ABC-Bindungsdomäne von ABCC 1 mit der Methode der homologie-basierten Modellierung von Proteinen untersucht werden. Um mechanistische Informationen über den Transportprozeß zu erhalten, soll die Funktion der ATP-Bindung an die C-terminale ATP-Bindungsdomäne charakterisiert werden.

Mit Hilfe der gewonnenen Daten soll ein Modell entworfen werden, das die charakteristischen Eigenschaften des Transportmechanismus des *Multidrug*-Transporters ABCC 1 zu deuten vermag.

Darüber hinaus soll die Isolierung und funktionelle Rekonstitution von ABCC 1 die Voraussetzungen schaffen, dieses Protein für Experimente einzusetzen, anhand derer diese Modellvorstellungen experimentell evaluiert werden können. Gleichzeitig soll mit der Bereitstellung des Proteins in quantitativen Mengen die Basis für die Entwicklung von dringend erforderlichen Screening-Verfahren geschaffen werden.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Zellkultur

Zellkulturarbeiten wurden nach Vorschriften von Freshney<sup>68</sup> durchgeführt. Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Lamillar-Sterilbank (Flow BSB 4a/6a oder Lamin Air Model 1,2) mit sterilem Equipment durchgeführt. Lösungen und Zellkulturmedium wurden steril bezogen oder vor Gebrauch sterilisiert. Die Zellen wurden bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### Kultivierung der humanen Lungenkrebszelllinie H69AR

Die Lungenkrebszelllinie H69AR wurde durch Selektion aus der Zelllinie H69 erhalten. Eine Zelllinie, die aus der Pleural-Flüssigkeit eines 55 Jahre alten Kaukasischen Mannes gewonnen wurde, der an kleinzelligem Lungenkrebs erkrankt war. Die Zelllinie wurde vor Behandlung des Patienten gewonnen. Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (GIBCO), versetzt mit 20 % Hitze inaktiviertem FBS, 4 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 1 % Penicillin/Streptomycin, kultiviert. Die Aussaat der Zellen erfolgte in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen; sukzessive Mediumzugabe während der Kultur erfolgte bis zu einem Gesamtvolumen von 100 ml. Die Zellzahl wurde zwischen  $6 \cdot 10^5$  und  $3 \cdot 10^6$  Zellen ml<sup>-1</sup> gehalten und verdoppelte sich alle 24 h. Bei Mediumzufuhr wurde mit einer Pipette auf- und abpipettiert, um die Zellklumpen aufzubrechen. Adhärierte Zellen wurden durch einen Zellschaber vorsichtig vom Boden gelöst. In regelmäßigen Abständen (monatlich) wurden die Zellen in Medium kultiviert, das 0,8 µM Adriamycin ADM enthielt (*drug challenge*).

#### Kultivierung QCRL-1 exprimierender Hybridoma Zellen

Die Kultivierung von Hybridoma Zellen erfolgte in Standard Zellkulturmedium RPMI 1640 unter Zusatz von 10 % FBS, 4 mM L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin. Die Zellen wurden bei einer Zellzahl zwischen  $2 \cdot 10^4$  und  $10^6$  Zellen ml<sup>-1</sup> kultiviert. Subkultivierung erfolgte durch Zugabe von Medium im Verhältnis von 1:10 bis 1:20, in Abhängigkeit von der Zelldichte. Die Umstellung auf Serumfreie Bedingungen erfolgte durch sukzessive Konzentrationserniedrigung des Serums und Verwendung geeigneten Mediums für die Kultur von Hybridomazellen unter Serumfreien Bedingungen.

#### Handhabung der Zelllinie zur Gewinnung großer Mengen ABCC1 spezifischen Antikörpers

Die Zellen wurden zunächst bis zu einer Konzentration von  $10^6$  Zellen ml<sup>-1</sup> kultiviert. Sobald diese Zellzahl erreicht wurde, wurden die Zellen bei 400 · g für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen erneut in einer Konzentration von  $10^5$  Zellen ml<sup>-1</sup> in das bereits verwendete Medium ausgesät und ihnen dann erlaubt, bis zum Tode zu wachsen. Zellfragmente wurden bei 1000 · g abgetrennt und das Medium durch Filtration durch Sterilfilter einer Porengröße von 20 µm von Partikeln getrennt. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand über eine 1 ml-

Protein G-Sepharose-Säule mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt (Kap. 3.3).

### **Kyrokonservierung von Zellen**

Zur Vorratshaltung wurden regelmäßig Zellen tiefgefroren. Dazu wurden die Zellen zunächst durch Zentrifugation bei  $400 \cdot g$  geerntet und in einer Konzentration von  $10^6$  Zellen in je  $1,8 \mu\text{l}$  Einfriermedium (NCS +10 % DMSO) resuspendiert. Die Zellen wurden in Kyrogefäße gefüllt, anschließend im Isopropanolbad bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren und nach einer halben Stunde in den Kyrotank überführt, wo sie bis zur Wiederverwendung in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

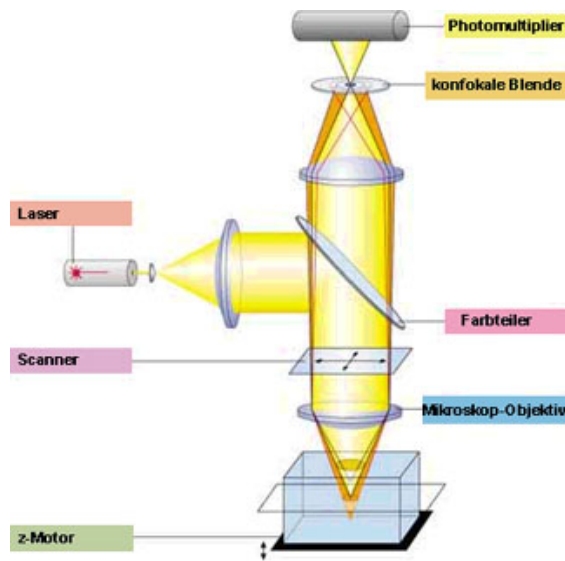
Zum Auftauen der Zellen wurden diese zunächst aus dem Kyrotank entnommen, für 20 min bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  temperiert und schließlich in einem temperierten Wasserbad bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  aufgetaut. Die Zellen wurden in ein Greinerröhrchen überführt und die Zellsuspension sofort tropfenweise mit auf  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  temperierten Kulturmedium versetzt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei  $800 \cdot g$  für 10 min pelletisiert um Reste von DMSO zu entfernen und anschließend in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^5$  Zellen in Medium resuspendiert und in einer Kulturflasche ausgesät.

## **3.2 Fluoreszenzmikroskopie und Konfokale Laser Scanning Mikroskopie**

Die Konfokale Laserscanning Mikroskopie (*Confocal Laser Scanning* Mikroskopie, CLSM) hat ihre Wurzeln in den frühen 90er Jahren, obwohl das Fluoreszenzmikroskop bereits im Jahre 1904 entwickelt wurde. Die Einführung von Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt an Antikörper und die damit gegebene Möglichkeit spezifisch Proteine z. B. des Zytoskeletts von Zellen zu färben<sup>69</sup>, verlieh der Entwicklung der Fluoreszenzmikroskopie einen weiteren Innovationsschub. Als die Entwicklung geeigneter Laser weit genug fortgeschritten war, wurde schließlich fast 30 Jahre nach Einführung der konfokalen Mikroskopie das Konfokale Laserscanning Mikroskop (CLSM) durch Boyde und Petran eingeführt<sup>70</sup>.

Das CLSM vereint die Vorzüge eines konfokalen Mikroskops mit denen Vorzügen eines Fluoreszenzmikroskops. Mit dem CLSM ist es möglich, optische Schnitte mit mikroskopischer Auflösung in räumlich ausgedehnten Objekten zu erzeugen.<sup>71,72</sup> Mit einem Computer können diese Schnittbilder dann schichtweise zu einer räumlichen Darstellung zusammengesetzt werden. Die Auflösung des Ebenenabstandes zweier »optische Ebenen« beträgt ungefähr  $100 \mu\text{m}$ , kann jedoch unter günstigen Bedingungen auch bis auf  $0,5 \mu\text{m}$  optimiert werden.

Abbildung 7 illustriert schematisch das Prinzip der CLSM. Das von einem Laser erzeugte polarisierte Licht definierter Wellenlänge wird mit Hilfe eines flexiblen Spiegelsystems durch die Linsenanordnung des Mikroskops auf die Probe gelenkt. Die zu untersuchende Probe wird von dem Laserstrahl abgerastert, wobei die Auslenkung des Lasers computer-gesteuert durch eine Änderung der Auslenkung der Spiegel erreicht wird. Die intrinsischen bzw. extrinsischen Fluorophore werden durch das Laserlicht angeregt und emittieren Fluoreszenzlicht, das zu einer längeren Wellenlänge verschoben ist. Das emittierte und das reflektierte Licht werden durch die optischen Elemente des Mikroskops zum dichroitischen Spiegel geleitet. Das reflektierte Licht, das eine kleinere Wellenlänge besitzt als das emittierte Fluoreszenzlicht, wird hier aus dem Strahlengang des Fluoreszenzlichtes gefiltert, so daß schließlich alleine das emittierte Licht detektiert wird.



**Abbildung 7:** Schematische Illustration eines konfokalen Laserscanning Mikroskops. Streulicht, das unter bzw. oberhalb der Fokussierebene liegt, wird durch die konfokale Blendenanordnung vor der Detektion durch den Photomultiplier eliminiert.<sup>71</sup>

Durch zwei Blenden, die in konfokaler Anordnung zueinander stehen, wird eine zusätzliche Verbesserung der Auflösung des Mikroskops erreicht. Bei einer konfokalen Blendenanordnung stehen Anregungsblende und Detektionsblende im gleichen Abstand von der fokussierten Ebene. Licht, das von Probenmaterial außerhalb der fokussierten Ebene emittiert wird, wird so durch die Detektionsblende abgefangen und so von der Detektion ausgeschlossen. Das Ergebnis ist die alleinige Detektion von Licht, das aus der Fokusebene emittiert wird. Durch Variation des Durchmessers des Pinholes kann der Grad der Konfokalität bestimmt werden. Durch Öffnung dieser Blende wird Ebenenschnitt verbreitert. Bei offener Blende fungiert das Mikroskop als herkömmliches Fluoreszenzmikroskop, da nun die Vorzüge der Konfokalität nicht mehr genutzt werden. Da die Menge an Licht, die detektiert wird und damit die Empfindlichkeit des Mikroskops bezüglich Lichtausbeute, ebenfalls durch die Öffnung der Blende reguliert wird, ist in der Praxis ein Kompromiss zwischen Konfokalität und Sensitivität zu schließen.

Bei dem Scanvorgang erfolgt die Fluoreszenzanregung der Probe zeilenweise durch das Laserlicht. Das Fluoreszenzlicht der Fokussierebene, daß das konfokale Pinhole passiert wird mit einem Photomultiplier (PMT) detektiert und die Information computergestützt verarbeitet.

Die Detektion intrinsischer bzw. extrinsischer Fluoreszenz erfolgt entweder mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop der Firma *Nikon* oder mit einem CLSM der Firma *Leica* (*Leica TCS SL*). Dieses Gerät besitzt einen Laser, der Licht der Wellenlängen 458 nm, 488 nm, 516 nm und 543 nm aussenden kann.

## Immunocytochemie

Immunfluoreszenzfärbung wurde für den Nachweis und die Detektion der Position von Proteinen in kultivierten Zellen durchgeführt

Die verwendeten Suspensionszellen wurden zunächst auf Poly-L-Lysin immobilisiert. Lysin kann zu Ketten beliebiger Länge polymerisiert werden und Poly-L-Lysin bindet aufgrund seiner geladenen Seitenketten an die meisten Oberflächen. Das positiv geladene Polymer bietet Zellen die Möglichkeit, an die mit dem Polymer beschichtete Oberfläche zu binden, da Zellen auf der Außenseite negativ geladen sind. Obwohl diese Bindung nicht kovalenter Natur ist, ist sie für die meisten Anwendungen ausreichend.

Zunächst erfolgt die Präparation der beschichteten Deckgläschen. Saubere Deckgläschen wurden für 15 min mit einer Poly-L-Lysin Lösung der Konzentration 1 mg/mL (Durchschnittliches Molekulargewicht  $M_r = 400000$ ) inkubiert. Die so beschichteten Deckgläschen werden anschließend durch mehrmaliges Eintauchen in Wasser gewaschen, an der Luft getrocknet und bei Raumtemperatur bis zur Verwendung gelagert.

Die Suspensionszellen werden durch Zentrifugation für 15 min bei  $400 \cdot g$  geerntet und durch Resuspendieren in PBS und erneuter Zentrifugation zweimal gewaschen. Das Zellpellet wird in einer Konzentration von  $10^5$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  resuspendiert und die Suspension anschließend für 10 min bei Raumtemperatur mit den beschichteten Deckgläschen inkubiert und sind anschließend bereit, fixiert zu werden.

Die adhärenierten Zellen werden durch Inkubation von 5 min mit einer 4 % igen Lösung von Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert, dreimal mit jeweils 1 mL PBS gewaschen und schließlich mit 500  $\mu\text{L}$  PBS x überschichtet.

Durch eine 5–10 minütige Inkubation mit einer 0,2 % igen TritonX 100 Lösung in PBS werden die Zellen in einem weiteren Schritt zunächst permeabilisiert und dann erneut mit PBS gewaschen.

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 3 % iger (w/v) Lösung BSA in PBS für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  abgesättigt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte entweder bei Raumtemperatur für eine Dauer von 1,5 Stunden, oder bei  $4^\circ\text{C}$  über Nacht. Nach Inkubation mit dem Erstantikörper wurden die Zellen fünf mal mit PBS gewaschen und anschließend mit dem Zweitantikörper, gelöst in 0,5 % iger Lösung von BSA in PBS, bei Raumtemperatur für eine Dauer von 40 min inkubiert. Als Zweitantikörper wurde je nach Experiment entweder ein Fluorescein Isothiocyanat (FITC) oder Tetramethylrhodaminisocyanat (TRITC) markierter Schaf-*anti*-Maus-Antikörper der Firma *Chemicon* verwendet. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und in *aqua polymount*<sup>®</sup> (*Polyscience*) auf Objektträgern eingebettet. Die Lagerung erfolgte bei  $4^\circ\text{C}$  unter Ausschluß von Licht.

## Zellkernfärbung mit Propiodin Iodid

Propiodiniodid ist ein DNA (und RNA) interkalierendes fluoreszierendes Molekül, das zur spezifischen Zellkernfärbung verwendet wird. Wie auch im Falle von Ethidiumbromid steigt die Fluoreszenz dieses Farbstoffes um ein Vielfaches, sobald es zwischen die Basenpaarungen der DNA interkaliert. Neben der Interkalation dieses Farbstoffes zwischen die Basen der DNA ist

auch in RNA-Interkalation möglich, führt jedoch zu einem schwächeren Fluoreszenzsignal. Die Zellkernfärbung mit Propiodin Iodid wurde in dieser Arbeit in Kombination mit der Immunfluoreszenz angewandt. Die Applikation einer Propiodin Iodid Lösung der Konzentration 0,01 µg/ml für 10 min bei 37 °C erfolgte nach dem Waschritt der Zweitantikörperzugabe vor dem Einbetten in *aqua polymount*®(Polyscience) auf Objektträgern.

### Membranfärbung mit DiI

Zur Fluoreszenzmarkierung von Membranen wurde der lipidlösliche Farbstoff 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-Indocarbocyanin-perchlorat (DiI) verwendet.

Zur Färbung der Zellen wurde eine DiI-Stammlösung (3 mg/ml DiI in DMSO) 1:1000 in PBS verdünnt und für 15–30 min bei 37 °C den Zellen appliziert. Die Zellen wurden anschließend fünf mal gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen und so einen hohen Hintergrund zu minimieren.

### Detektion intrinsischer Doxorubicin-Fluoreszenz

Das ABCC1 Substrat Doxorubicin besitzt eine Eigenfluoreszenz und muß für Fluoreszenzaufnahmen nicht markiert werden. Doxorubicin wurde eingesetzt, um eine mögliche intrazelluläre Umverteilung dieses Cytostatikum durch Transporter zu identifizieren. Die lebenden Zellen wurden zu diesem Zweck mit DiI angefärbt und eine halbe Stunde bei 37 °C im Brutschrank durch Zugabe 1,8 µM Doxorubicin mit dem Fluorophor inkubiert.

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Fluorophore und die verwendeten Anregungswellenlängen, sowie den Detektionsbereich.

Fluorophor	Anregungswellenlänge (Maximale Absorption)	Detektion der Fluoreszenz
TRITC	543 nm (550 nm)	560–610 nm
FITC	488 nm (488 nm)	505–540 nm
DiI	543 nm (540 nm)	565 nm
Propiodin Iodid	488 nm (535 nm)	615 nm
Doxorubicine	488 nm (480 nm)	560-590 nm

**Tabelle 3:** Verwendete Fluorophore: Anregung und Detektion ihrer Emission. In Kombination wurden die Fluorophore TRITC und Propiodin Iodid, DiI und Doxorubicin verwendet.

### 3.3 Fast Performance Liquid Chromatography

Für die Antikörperaufreinigung fand die Methode der *Fast Performance Liquid Chromatography* (FPLC) Anwendung. Für alle FPLC Experimente wurde ein Modell der *Äkta*-Seria der Firma *Amersham Biosciences* verwendet. Alle für die FPLC verwendeten Puffer wurden zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur bei angelegtem Wasserstrahlvakuum unter Rühren entgast und

Puffer	Zusammensetzung	pH-Wert
Bindungspuffer	0,02 M Natriumphosphat	7,0
Elutionspuffer	0,10 M Glycin	2,5
Neutralisationspuffer	1,00 M Tris/HCl	9,0

**Tabelle 4:** Für die FPLC verwendete Puffer

vor Verwendung steril filtriert. Vor und nach jedem Lauf wurde die Säule zunächst mit zehn Säulenvolumina (*column volumes*, CV) Wasser von MilliQ-Qualität gespült, dann mit fünf Säulenvolumina Elutionspuffer und anschließend mit zehn Säulenvolumina Anbindungspuffer equilibriert (siehe Tabelle 4). Nach jedem Lauf wurde die Säule zunächst mit 10 CV MilliQ-Wasser gespült und anschließend mit 20%iger wässriger Lösung von Ethanol equilibriert, in der sie dann bei 4 °C gelagert wurde. Diese Prozedur diente der Vermeidung von Säulenkontaminationen.

Das verwendete FPLC Modell verfügte zur Analyse der Durchflusses neben einer Leitfähigkeitsmessung zwei UV Einheiten, die eine Detektion der UV Absorption bei 280 nm und bei 292 nm erlaubten. Für die Proteindetektion wurde die Absorption bei 280 nm zugrunde gelegt.

### Chromatographische Antikörperisolierung

Die Aufreinigung der der monoklonalen Antikörper von Subtyp IgG<sub>1</sub> der Spezies *Mus musculus* erfolgte mit Hilfe der FPLC an Protein G (*Amersham Biosciences*). Protein G, ein Zelloberflächenprotein von Streptokokken der Serogruppe G mit Fc-Rezeptorfunktion, bindet IgG Antikörper über ihre Fc-Region durch einen nicht-immunologischen, pH-abhängigen Mechanismus und besitzt im Vergleich zu Protein A eine höhere Affinität zu Antikörpern aus dem Organismus *Mus musculus*. Das verwendete Protein G wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 17 kDa.

Der Antikörper wurden bei niedrigem pH-Wert mit Elutionspuffer eluiert und in einem Autosampler in vorgelegtem Neutralisationspuffer fraktioniert gesammelt. Der pH-Wert der gesammelten Fraktionen wurde mit Neutralisationspuffer auf pH 7 eingestellt und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Abschließend wurden die Konzentration der Antikörper auf 5 mg/ml eingestellt, steril filtriert und mit NaN<sub>3</sub> versetzt, so daß die resultierende Azid-Konzentration 0,02 % betrug. Die Lagerung erfolgte bei –20 °C.

## 3.4 Proteinbiochemische Methoden

### Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford-Testes bestimmt, wenn keine Detergentien anwesend waren. Da Detergentien wie Triton X-100 oder CHAPS bei vielen Proteinbestim-



mungsmethoden stören, jedoch bei der Arbeit mit Membranproteinen notwendig sind, kam die Detergenz unempfindliche Bicinchoninsäure-Methode als Alternative zur Anwendung.

## **SDS-PAGE**

Die Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte mit Hilfe der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Bei dieser Methode wird die das Protein enthaltene Probe mit Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt und die Probe erhitzt. SDS ist ein anionisches Detergenz, das stark an Proteine bindet und diese derart denaturiert, das die Sekundärstruktur des Proteins in einer *random-coil* Anordnung vorliegt. SDS trägt eine negative Ladung, die die intrinsische Ladung des Proteins maskiert, was in einer negativen Gesamtladung des Proteins resultiert. Die Ladung des SDS-Protein Komplexes ist dabei in erster Näherung abhängig von Proteingröße.

Wird der Komplex auf eine Gelmatrix gegeben und ein elektrisches Feld angelegt, wandern die nun negativ geladenen Proteins zur Anode und werden durch die Gelmatrix aufgrund ihrer Größe aufgetrennt. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE wird ein Sammelgel mit einem geringen Anteil an Acrylamid bei niedrigem pH (6,8) verwendet, um die Probe zunächst in einer scharfen Bande zu konzentrieren. Dem Sammelgel schließt ein Trenngel mit einem höheren Anteil und einem pH-Wert von 8,8 an, das der eigentlichen Trennung der Proteine nach ihrer Größe dient. Der Grad der Separation ist abhängig von der Maschenweite des Polyacrylamid Netzwerks und somit von der Konzentration des eingesetzten Acrylamids. Die Beweglichkeit der Proteine im Gel sind dem  $\log_{10}$  der relativen Molekularmasse ( $M_r$ ) umgekehrt proportional. Die Molekularmasse der zu untersuchenden Proteine kann durch Vergleich mit den Wanderungsgeschwindigkeiten von Proteinen mit bekannter Größe bestimmt werden. Vor Verwendung zur Gelelektrophorese wurden die Proteine in für 10 min bei 95 °C in Probenpuffer erhitzt. Proben, die Membranproteine und/oder Lipide enthielten wurden für 20 min bei 60 °C erhitzt. Für ein 9 cm × 6 cm Gel, wurde die Elektrophorese mit Elektrophoresepuffer bei 80 V durchgeführt, bis die Proteine in das Trenngel eingedrungen sind, um anschließend die Spannung auf 150 V zu erhöhen. Experimentelle Bedingungen sind in Tabelle 5 aufgelistet.

## **Western Blot**

Der Nachweis von Proteinen mit immunologischen Methoden erfolgte mit Hilfe eines Western-Blots. Nach der Gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE werden die Proteine dabei auf eine positiv geladene Nylon-Membran übertragen. Die auf der Membran immobilisierten Proteine sind daraufhin zugänglich für immunologische Methoden, sowie weitere Detektionsverfahren, wie z. B. MALDI.

Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nylon Membran (Hybond, *Amersham Biotech*) erfolgte mittels *semi-dry blotting*. Die Nylon Membran wurde zunächst in Transferpuffer equilibriert und das Gel auf die Membran gelegt. Das Gel und die Membran wurden zwischen jeweils drei Lagen Transferpuffer getränktes Whatman™ Papier geschichtet und zur Vermeidung von Luftblasen, die zu einem unvollständigen Transfer führten, wurde der Stapel mit einer sauberen Glaspipette abgerollt. Über zwei planare Graphitelektroden wurde über Nacht ein elektrisches

36,6 g Tris 8 ml 10 % SDS <i>ad</i> 200 ml	6,06 g Tris 4 ml 10 % SDS <i>ad</i> 100 ml
(a) Trenngelpuffer (pH 8,8)	(b) Sammelgelpuffer (pH 6,8)
14,4 g Glycin 3 g Tris 900 ml destilliertes Wasser 100 ml Methanol	30,3 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS mit destilliertem Wasser <i>ad</i> 1 l
(c) Transferpuffer	(d) 10× Laufpuffer
<hr/> 940 µl 10 % SDS 470 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5) 95 µl 100 mM EDTA 2,45 ml Glycerin 545 µl destilliertes Wasser 205 µl β-Mercaptoethanol <hr/>	
(e) 5× SDS-PAGE Probenpuffer	

**Tabelle 5:** Verwendete Puffer und Lösungen für die SDS-PAGE

0,1 % (w/v) Coomassie Blau R-250 16 % (v/v) Essigsäure mit destilliertem Wasser <i>ad</i> 500 ml	25 % (v/v) Methanol 5 % (v/v) Essigsäure 70 % destilliertes Wasser
(a) Coomassiefärber	(b) Entfärber

**Tabelle 6:** Verwendete Lösungen bei der Coomassie-Blau Färbung

Feld von  $0,4 \text{ mA/m}^2$  angelegt.

Um den Transfer der Proteine auf die Nylonmembran überprüfen zu können, wurde die Membran für 5 min mit Ponceau S-Lösung inkubiert (oder alternativ mit PROTOGOLD (*BBInternational*) entwickelt, siehe unten) und anschließend ausgiebig mit Wasser gewaschen, um den Hintergrund zu entfernen. Bei erfolgreichem Transfer wurden die Proteinbanden auf der Nylon Membran durch eine rote Färbung angezeigt und die Markerbanden daraufhin mit einem weichen Bleistift markiert. Zur Verwendung der geblotteten Membran für die darauf folgende Immundetektion, wurde sie in einem weiteren Schritt zunächst durch Waschen mit PBS entfärbt.

Eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte anschließend mit 5 %igen Milchpulveremulsion in PBS/Tween bei Raumtemperatur (RT). Nach 30 min wurde das Blockierreagenz entfernt und durch eine 0,5 %ige Milchpulverlösung in PBS/Tween ersetzt, die den Erstantikörper enthielt und, soweit nicht anders vermerkt, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit PBS/Tween gewaschen und der mit POD gelabeltem Zweitantikörper in einer Emulsion von 0,5 % Milchpulver in PBS/Tween für 30 min appliziert.

Die Signaldetektion erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemolumineszenz-Immundetektion (ECL, Amersham Biosciences Innovative ECL Kit<sup>®</sup>, (*Amersham Biotech*)). Diese Licht-emittierende, nichtradioaktive Methode zur Detektion immobilisierter spezifischer Antigene nutzt die enzymatische Spaltung von Luminol im basischen Milieu, bei der Licht der Wellenlänge 428 nm abgegeben wird. Dieses Licht schwärzt photographischen Film (Hyperfilm, *Amersham Biotech*), der zur Detektion genutzt wird.

Bei allen Arbeitsschritten wurden Handschuhe getragen, um eine Proteinkontamination auf der Nylon Membran zu vermeiden.

Die PROTOGOLD-Färbung ist empfindliche Methode, um Proteine auf einer Membran nachzuweisen. Kolloidale negativ geladene Goldpartikel binden bei dieser Methode selektiv an geblottete Proteine mit einem sehr geringem Hintergrundsignal. Die spezifische Färbung des Proteins erfolgt dabei über hydrophobe und ionische Wechselwirkungen. Membranen wurden vor Behandlung mit PROTOGOLD nicht mit Milchpulver blockiert. Immunodetektion wird durch die PROTOGOLD-Färbung nicht beeinflusst.

Die geblottete Membran wurde dabei zunächst 10 min mit PBS, daß 0,3 % Tween20 enthielt (PBS/Tween20), bei 37 °C blockiert und anschließend drei mal fünf Minuten bei 20 °C mit PBS/Tween20 gewaschen. Um Puffersalze zu entfernen, folgten drei Waschschrte mit dionisiertem Wasser von jeweils einer Minute. Anschließend wurde die Membran in dem PROTOGOLD-Reagenz inkubiert, bis sich rötliche Banden abzeichneten. Anschließend wurde die PROTOGOLD-Lösung recycelt und die Membran mit deionisiertem Wasser gewaschen.

### **Plasamembranisolierung**

Die mit ABCC1 angereicherte Plasamembran wurde aus den kultivierten H69AR Zellen isoliert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation der Zellen für 15 min bei  $800 \cdot g$ . Die Pellet wurden mit Proteaseinhibitor (*Roche*) enthaltendem PBS gewaschen, indem die Zellen zunächst

resuspendiert und anschließend erneut für 15 min bei 4 °C pelletisiert wurden. Das Pellet wurde entweder direkt auf Eis weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C bis auf weiteres bei –70 °C gelagert.

Zur Plasmamembranisolierung wurden ein Gramm (10<sup>8</sup>) bei –80 °C gelagerte Zellen auf Eis in 30 ml Homogenisierungspuffer aufgetaut. Die so resuspendierten Zellen wurden in einen Potter mit Teflonstößel überführt und durch 20 Stöße auf Eis homogenisiert. Zell-Trümmer wurden durch Zentrifugation bei geringer Geschwindigkeit (500·g, 15 min) entfernt und das Pellet ein mal mit 10 ml Homogenisierungspuffer gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden mit Hilfe einer Kanüle mit 38 %iger Sucrose unterschichtet, so daß sich zwei Phasen bildeten und bei 100 000·g für 1,5 h bei 4 °C zentrifugiert. Das trübe Material an der Grenzfläche wurde gesammelt und durch Zentrifugation bei 100 000·g für eine Stunde bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in Aufbewahrungspuffer resuspendiert und die Membransuspension fünf mal durch eine 27,5 gauge Nadel gedrückt. Die Lagerung erfolgte anschließend bei –80 °C. Die Proteinkonzentration wurde mit einem Bradfordtest bestimmt und auf 2–4 mg/ml justiert.

10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA	50 mM Tris-HCl pH 7,5 250 mM Sucrose		
(a) Puffer A	(b) Puffer B		
<table style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px;">           10 mM Tris-HCl pH 7,5            250 mM sucrose            3 mM KCl            0,25 mM MgCl<sub>2</sub>            Proteaseinhibitor         </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 5px;">(c) Homogenisierungspuffer</td> </tr> </table>		10 mM Tris-HCl pH 7,5 250 mM sucrose 3 mM KCl 0,25 mM MgCl <sub>2</sub> Proteaseinhibitor	(c) Homogenisierungspuffer
10 mM Tris-HCl pH 7,5 250 mM sucrose 3 mM KCl 0,25 mM MgCl <sub>2</sub> Proteaseinhibitor			
(c) Homogenisierungspuffer			

**Tabelle 7:** Verwendete Puffer und Lösungen für die Plasmamembranisolierung.

### 3.4.1 Immunopräzipitation

Mit Hilfe der Immunpräzipitation können Proteine spezifisch aus einem homogenen Zellysate isoliert werden. In dieser Arbeit wurde die Immunopräzipitation verwendet, um Multidrug Transporter ABCC1 präparativ aus der kultivierten Zelllinie H69AR zu isolieren. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt:

Zum einen wurde eine klassische Immunoaffinitätsäule verwendet bei der die Anbindung im *batch* Verfahren erfolgte und zum anderen wurden DYNABEADS<sup>®</sup> (*Dynal Biotech*) verwendet, um ABCC1 zu isolieren.

Zur Isolierung von Membranproteinen werden diese in der Regel erst durch milde Detergentien in Lösung gebracht.<sup>73</sup> In dieser Arbeit wurde das Detergenz [3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat (CHAPS) verwendet.<sup>74</sup>

### **Kopplung des Antikörpers QCRL-1 an Protein G**

Der isolierte Antikörper wurde mit Dimethylpimelimidat (DMP) kovalent an Protein G gekoppelt. Dazu wurden ca. 2 mg Antikörper für 1 ml nasser Beads eingesetzt. Zunächst wurden die Beads und der Antikörper eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, indem vorsichtig geschüttelt wurde. Die Beads wurden mit zehn Volumina 0,2 M Natriumboratlösung pH 9,0 gewaschen, resuspendiert und mit 20 mM DMP für 30 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Reaktin wurde waschen mit 0,2 M Ethanolamin pH 8,0 gestoppt und weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 0,2 M Ethanolamin vorsichtig geschüttelt.

### **Kopplung des Antikörpers QCRL-1 an Dynabeads**

DYNABEADS sind uniforme superparamagnetische Partikel einheitlicher Größe. Der magnetische Charakter dieser Partikel ermöglicht es, die Partikel nach Inkubation wieder leicht mit Hilfe eines Magneten zu isolieren. Die in dieser Arbeit verwendeten DYNABEADS wurden vom Hersteller mit affinitätsgereinigtem Schaaf-*anti*-Maus Antikörper beschichtet und besitzen einen Durchmesser von  $(2,8 \pm 0,2) \mu\text{m}$ . Die DYNABEADS wurden mit zuvor im Rahmen dieser Arbeit isoliertem monoklonalen Antikörper (mAb) gegen ABCC1 gekoppelt und anschließend zur Immunopräzipitation eingesetzt. Bei der Anwendung der DYNABEADS gibt es prinzipiell zwei Methoden: Bei der *direkten* Methode werden Erst- und Zweitantikörper erst aneinander gekoppelt und dann zur Immunopräzipitation eingesetzt, bei der *indirekten* Methode wird mit Hilfe der DYNABEADS der Antikörper-Antigenkomplex isoliert. Beide Methoden fanden in dieser Arbeit Anwendung.

Vor jedem Gebrauch wurden die verwendeten Dynabeads zunächst drei mal mit PBS/BSA gewaschen, indem sie zunächst im Waschpuffer resuspendiert und dann mit Hilfe eines Magneten von der Lösung separiert wurden. Die Separation der Partikel erfolgte dabei jeweils über einen Zeitraum von mindestens einer Minute. Für die eigentliche Kopplung des isolierten Antikörpers QCRL-1 wurden  $10^8$  Dynabeads M-280 mit  $15 \mu\text{g}$  mAb QCRL-1 über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  unter vorsichtigem Schwenken inkubiert. Die Dynabeads wurden am Magneten über einen Zeitraum von zwei Minuten gesammelt und anschließend drei mal gewaschen. Die Kopplung der Antikörper erfolgte mit Hilfe des Reagenzes Dimethylpimelindiimidat (*Sigma*) im basischen Milieu wie folgt: Die Beads wurden zunächst drei mal mit jeweils 1 ml 0,1 %iger Lösung von BSA in PBS und weitere drei mal mit jeweils 1 ml 0,2 M Triethanolamin (pH 8,2). Die Beads wurden am Magneten für 5 min gesammelt und in 5 ml 20 mM Dimethylpimelindiimidat enthaltendem 0,2 M Triethanolamin (pH 8,2) resuspendiert. Es wurde für eine Stunde unter vorsichtigem Schwenken durch Rotation bei Raumtemperatur inkubiert. Die Beads wurden dann zunächst 20 min mit 5 ml 50 mM Tris (pH 7,5) gewaschen und anschließend drei mal mit jeweils 1 ml einer 0,1 %igen (w/v)

BSA Lösung in PBS. Die gekoppelten Beads wurden bei 4 °C in PBS gelagert, das mit 0,1 % (w/v) BSA und 0,1 % Natriumazid enthielt.

**Direkte Methode:** Die solubilisierte Plasmamembran wurde eine Stunde bei Raumtemperatur mit den gekoppelten Dynabeads inkubiert, während die Beads durch Rotation vorsichtig in Suspension gehalten wurden. Anschließend wurden die Dynabeads magnetisch abgetrennt und gewaschen. **Indirekte Methode:** Der monoklonale Antikörper QCRL-1 wurde zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur mit der solubilisierten Plasmamembran preinkubiert. Erst anschließend wurden zuvor gewaschene (nicht mit QCRL-1 gekoppelte) Dynabeads hinzugefügt. Die Suspension wurde über Nacht bei 4 °C durch Rotation vorsichtig geschwenkt und die Beads am folgenden Tag durch magnetische Separation geerntet und gewaschen.

### **Elution des Proteins**

Die Elution des Proteins nach Immunopräzipitation erfolgte durch Substitution mit einem Peptid. 8 mg Peptid mit der Aminosäuresequenz *SSYSGDI* wurden in 2 ml Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 20 % Glycerin, 0,5 M NaCl, 5 mM CHAPS, Protease Inhibitor (Roche)) auf Eis gelöst und mit dem Immunopräzipitat über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Das Peptid wurde durch Zentrifugation durch eine Membran mit 30 kDa Ausschlußgröße (Centricon) vom Protein getrennt und durch Lyophilisierung recycelt.

### **Vesikelpräparation**

Herstellung multilamellarer Vesikel: Lipide werden verblasen und in einer Konzentration von ~1 mg/ml in Puffer resuspendiert (10 min im Wasserbad mit Puffer inkubieren und anschließend 30 s schütteln. Die Prozedur wird drei mal wiederholt.) Es wird eine trübe Lösung erhalten.

### **Herstellung Unilamellarer Vesikel**

Prinzipiell finden drei verschiedene Methoden zur Herstellung Unilamellarer Vesikel zur Anwendung: Die Detergenzverdünnung, die Extrusionsmethode und die Ultraschallmethode. Bei der Detergenzmethode werden die Multilamellaren Vesikel mit Chaps versetzt, so daß die Chaps-Konzentration oberhalb von 8 mM beträgt. Die klare Lösung wird über Sephadex gesüßt und die trüben Fraktionen des Eluats gesammelt.

### **In vitro Transportmessungen mit radioaktiven Substraten**

Proteoliposomen wurden auf Eis aufgetaut und mit Puffer versetzt, so daß die finale Konzentration 10 mM Magnesiumchlorid, 4 mM AMP oder ATP enthielt. Wurde ATP eingesetzt, so wurde zusätzlich 10 mM Kreatinphosphat und 100 µgml<sup>-1</sup> Kreatin-Kinase hinzugefügt. Weiterhin wurden 100 nCi [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> (Moravek Biochemicals) zugesetzt. Das eingesetzte [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> besaß eine Aktivität von 160 Ci/mmol.

Die Radioaktivität wurde durch *liquid scintillation counting* bestimmt. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Werte bezüglich der Transportrate von [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> ermittelt, indem die Differenz zwischen Aufnahme mit und ohne ATP gebildet wurde.

## 4 Moleküldynamik

### 4.1 Einleitende Bemerkungen

Die computerunterstützte Modellrechnungen auf molekularer Basis ist ein sich rasch entwickelndes Forschungsgebiet in der modernen Biochemie. Obwohl die Idee eines mathematischen Modells für die Beschreibung von Molekülen zum Ziel der Vorhersage von biologischen, chemischen und physikalischen Eigenschaften in ihren Ursprüngen schon über 50 Jahre alt ist<sup>75-77</sup>, konnten erst in den letzten Jahren entscheidende Fortschritte erzielt werden. Neben neuen Algorithmen spielt dabei auch der enorme Geschwindigkeitszuwachs von Prozessoren eine große Rolle.

Grundsätzlich sind zwei verschiedene Ansätze zur Berechnung von Molekülen zu betrachten: *ab initio* Rechnungen und Kraftfeldberechnungen. Die Wahl der Methode bestimmt die Zeit, die erforderlich ist, ein Minimum auf einer  $n$ -Dimensionalen Potentialhyperfläche zu bestimmen.

Es wurden eine Reihe von Methoden entwickelt, die sich direkt aus quantenmechanischen Gleichungen wie der SCHRÖDINGER-Gleichung herleiten und so keine empirischen Parametersätze benötigen. Aus diesem Grund können mit einer quantenmechanischen Berechnungsgrundlage auch Bindungsbrüche und Neuformationen – also chemische Reaktionen – berechnet und damit beschrieben werden. Ein weiterer Vorteil dieses nicht empirischen Ansatzes ist, daß quantenmechanische Rechnungen sehr akkurat sind, da sie keine Parameter aus experimentellen Daten oder Näherungen benötigen. Der Nachteil dieser Rechenverfahren ist ihr enorm hoher Rechenaufwand, der nur Problemstellungen bezogen auf Moleküle relativ geringer Größe rechtfertigt. Beispiele für solche quantenmechanische Methoden sind Berechnungen nach HARTREE-FOCK (HF) und die Dichtefunktionaltheorie (DFT).<sup>78</sup>

Für die Untersuchungen biochemischer Vorgänge, bei denen fast ausschließlich Makromoleküle eine Rolle spielen, hat sich der empirische Ansatz der Kraftfeldberechnungen als geeignet erwiesen.<sup>79-81</sup> Bei diesem molekülmechanischen Ansatz wird das System durch verhältnismäßig einfache physikalische Gleichungen mit Hilfe von empirisch ermittelten Parametern beschrieben. Dabei wird die Gesamtenergie des Systems, daß aus einem oder auch mehreren Molekülen bestehen kann, in Abhängigkeit von der Konfiguration in vielen Rechenzyklen minimiert. Berücksichtigt werden bei diesen Berechnungen sowohl Valenz- als auch nichtbindende Anteile. Verschiedene Kraftfelder benutzen zu diesem Zweck unterschiedliche Gleichungen und Parameter, die zumeist auf das spezielle Problem angepasst werden. Ergebnis einer solchen Rechnung ist ein lokales Minimum auf einer  $3N + 1$  dimensionalen Potentialhyperfläche, wobei jedes der  $N$  Atome die  $3N$  Parameter erzeugt und die zusätzliche Dimension durch die Energie definiert wird.<sup>82</sup>

Für Proteine ist es zur Zeit noch nicht möglich, diesen  $3N + 1$  dimensionalen Potentialhyperraum zufriedenstellend nach den physiologisch relevanten Energieminima abzusuchen. Für die

computerunterstützte Berechnung der Struktur von Proteinen wird aus diesem Grund die Methode des *Homology Modelling* verwendet. Eine Grundannahme dieser Methode ist es, daß die Struktur eines Proteins stärker konserviert ist, als seine Sequenz. Es ist also möglich, die bekannte Struktur von homologen Proteinen als Grundlage für die Struktur eines Proteins unbekannter Struktur zu verwenden, um so eine physiologisch relevante Konfiguration zu erhalten. Ausgehend von der so erstellten Struktur wird mit Hilfe von Kraftfeldern eine energieminierte Struktur erhalten.

Um ein molekulares System mit Kraftfeldern zu beschreiben, werden zwei fundamentale Näherungen gemacht.

Zum einen, daß die Bewegungen eines Atoms bzw. eines Moleküls hinreichend langsam sind und somit in Hinblick auf die Fluktuation der elektronischen Zustände des Systems als stationär angesehen werden können. Elektronen können somit ihren Zustand sofort an eine beliebige Änderung der Situation eines Atomkerns anpassen. Die Konsequenz dieser sog. Born-Oppenheimer Näherung ist, daß die mathematische Beschreibung des Systems von seinen elektronischen Zuständen entkoppelt ist. Alle physikalischen Interaktionen sollten durch die Beschreibung von Potentialen unter Verwendung von Funktionen, die nur abhängig von der Position des Atoms bzw. Moleküls sind, erfasst werden können.

Daß sich die Atome und Moleküle des Systems klassisch verhalten, ist die zweite fundamentale Näherung. Das Energiespektrum, das den Atomen und Molekülen des Systems zur Verfügung steht, ist nicht diskret sondern kontinuierlich. Folglich ist die *Newtonsche Bewegungsgleichung* und nicht die *Schrödinger Gleichung* für die Dynamik des Systems bestimmend. Der Nachteil dieser Näherungen ist, daß molekülmechanische Rechnungen nicht bei wichtigen Fragestellungen wie z. B. enzymatischer Aktivität, Protonen- oder Elektronentransfer, Photochemie oder chemischen Reaktionen herangezogen werden können. Dennoch bleibt ein weites Feld biologischer Fragestellungen moleküldynamischen Berechnungen zugänglich: Unter anderem die Studie von Struktur und dynamischen Eigenschaften von Proteinen, wie auch die nicht-reaktive Assoziation von Proteinen mit Liganden oder Substraten, Wasser und Ionen.<sup>83,84</sup>

Das Ensemble der Potentialfunktionen einer bestimmten Simulation, zusammen mit seinen Parametern, wird als Kraftfeld bezeichnet. Das Kraftfeld berücksichtigt in erster Linie elektrostatische Interaktionen, d. h. die Interaktionen zwischen der molekularen oder atomaren Ladungsverteilung. Bei der Berechnung dieser elektrostatischen Kräfte in moleküldynamischen (*Molecular Dynamics*, MD) Simulationen sind die am häufigsten verwendeten Methoden, die sogenannten *cut-off* Methode und der *Particle Mesh Ewald Algorithmus*.<sup>85</sup>

Die *cut-off* Methode berechnet die *Coulomb* Kräfte nur innerhalb einer vorgegebenen Distanz. In Verbindung mit Algorithmen, die die nächsten Nachbarn berechnen, führt die Einführung dieser Näherung zu einem Geschwindigkeitszuwachs der Kraftfeldberechnung gegenüber nicht eingeschränkten Berechnungen von *Coulomb*-Wechselwirkungen.

Der *Particle Mesh Ewald Algorithmus*<sup>86</sup> basiert auf der *Ewald Summation*<sup>87</sup> und wurde ent-



wickelt, um die Elektrostatik großer kristalliner Systeme präzise und ohne Einschränkungen zu berechnen.

Die Gesamtenergie wird in der Regel aus der Summe von sieben verschiedenen Gleichungen der klassischen Physik beschrieben.<sup>81,88</sup> Die folgende Gleichung ist eine typische Potentialenergiefunktion, die die Valenzterme für Änderung der Bindungslänge  $l$ , der Winkel  $\theta$  und Torsionen  $\omega$  vs.  $\gamma$  sowie nichtbindende Wechselwirkungen, wie die *Van der Waals*-Kräfte und elektrostatische Effekte berücksichtigt.<sup>89</sup> Eine Parameterisierung dieser Funktion erfolgt über die Kraftkonstanten  $k_i$ , die Ladungen der Atome  $q_{i,j}$  und ihrer Gleichgewichtsabstände  $r_{i,j}$  sowie den vom Gleichgewichtsabstand abhängigen Parameter  $\sigma_{i,j}$ .

$$\begin{aligned}
 E_r = & \sum_{\text{Bindungen}} \frac{k_i}{2} (l_i - l_{0,i})^2 + \sum_{\text{Winkel}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{0,i})^2 \\
 & + \sum_{\text{Torsionen}} \frac{V_n}{2} (1 + \cos(n\omega - \gamma)) \\
 & + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \left( 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right)
 \end{aligned}$$

Eine solche Funktion kann durch weitere Anpassung der Funktionsterme, z. B. durch eine Annäherung des harmonischen Potentials an die Morsefunktion durch Beiträge höherer Ordnung, erreicht werden.<sup>90</sup> Trotz der Vielzahl der Beiträge, die sich auch schon bei Molekülen geringer Größe ergeben, ist die Berechnung um Größenordnungen schneller als die Berechnung vergleichbarer quantenmechanischer Probleme.

Zusätzlich zu den bereits genannten Energiethermen, werden in letzter Zeit noch zusätzlich die sogenannten *out of plane*-Deformationen ( $E_\gamma$ , bei aromatischen oder  $sp^2$ -hybridisierten Systemen) und Wasserstoffbrückenbindungen ( $E_h$ ) berücksichtigt. Für die Gesamtenergie des Systems ergibt sich daraus folgende Formel:

$$U_{total} = \sum_{3N+1} (E_b + E_\theta + E_\phi + E_{nb} + E_\gamma + E_\epsilon + E_{hb})$$

Die Gesamtenergie hat für sich allein genommen keinerlei interpretierbare physikalische Bedeutung. Sie ist nur im Vergleich mit anderen Molekülen aussagekräftig. Die Parameter für die Kraftkonstanten der einzelnen Terme entstammen experimentellen Beobachtungen aus z. B. Röntgenstrukturanalysen oder der Infrarotspektroskopie aber auch den Ergebnissen von *high-level ab initio* Berechnungen.

Um die wahrscheinlichste Struktur zu finden, wird in der Regel der Konfigurationsraum nach Energieminima abgesucht, um ein globales Minimum zu finden. Dabei ist es, wie bereits besprochen, für ein Molekül mit unendlich vielen Freiheitsgraden unmöglich, das globale Minimum zu finden.

Das *simulated annealing*-Verfahren, das insbesondere bei großen Molekülen Anwendung findet, ermöglicht es, mit stochastischen Methoden den Konfigurationsraum eines Moleküls nach

Energieminima abzusuchen. Wie der Name impliziert, wird eine genügend große Temperaturerhöhung des Systems simuliert, so daß eine hohe Anzahl von Energiezuständen außerhalb der lokalen Minima besetzt ist. Es wird so eine große Zahl an Startgeometrien erzeugt, die nicht energieminiert sind. Anschließend wird eine Systemabkühlung simuliert und es werden energetisch tiefere Konfigurationen eingenommen. Das System kann sich dabei für einen Minimumsbereich entscheiden. Durch die Erzeugung repräsentativer Geometrien kann der Konfigurationsraum nach relevanten Strukturen abgesucht werden. Der Hauptvorteil des *simulated annealing* Verfahrens ist es, daß nicht die Gefahr besteht, in einem irrelevanten Minimum gefangen zu werden, da auch Zustände höherer Energien in Betracht gezogen werden.

Weitere Verfahren, die zur Energieminimierung eingesetzt werden können sind z. B. das Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (*bfgs*)<sup>91</sup>, *steepest decent* oder *conjugate gradient* Verfahren. Aufgrund ihrer Geschwindigkeit ist die *bfgs*-Methode die Methode der Wahl bei der Suche nach lokalen Energieminima.

In einem globalen MD-Algorithmus wird folgendes Schema prozessiert:

1. Startbedingungen festlegen.

Die Startbedingungen werden durch eine Potentialinteraktion  $V$  der Atompositionen  $\mathbf{r}$  aller Atome des Systems und der Geschwindigkeit  $\mathbf{v}$  aller Atome des Systems gegeben.

2. Kräfte berechnen.

Die Kraft  $\mathbf{F}_i$ , die auf ein jedes Atom wirkt, wird über die Summe der Kräfte zwischen nicht-gebundenen Atompaaaren plus der Kräfte für bindende Interaktionen, plus beschränkender oder externer Kräfte berechnet. Die potentielle und kinetische Energie wird berechnet.

3. Konfiguration auffrischen.

Die Bewegung der Atome wird durch numerische Lösung der Newtonschen Bewegungsgleichung simuliert.

$$\frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = \frac{\mathbf{F}_i}{m_i}$$

4. Daten ausgeben.

Die Positionen, Geschwindigkeiten, Energien, Temperaturen, Druck und andere Umgebungsvariablen werden zur Analyse ausgegeben

## 4.2 Homology Modelling

### 4.2.1 Strukturvorhersage aufgrund von Homology Modelling

*Homology Modelling* ist derzeit die einzige verlässliche Methode für die Strukturvorhersage von Proteinen. Durch die Annahme, daß bei homologen Proteinen die Struktur des Proteins stärker konserviert ist, als seine Sequenz, läßt sich ein homologes Protein als Strukturgrundlage für Modellberechnungen verwenden.<sup>92</sup> Bei einer Ähnlichkeit auf Basis der Aminosäuresequenz kann daher auf eine strukturelle Analogie geschlossen werden. Zudem sind häufig Proteine, die keine Sequenzhomologien aufweisen, dennoch in ihrer dreidimensionalen Struktur ähnlich. Folgende fünf Schritte werden beim *Homology Modelling* verwendet:

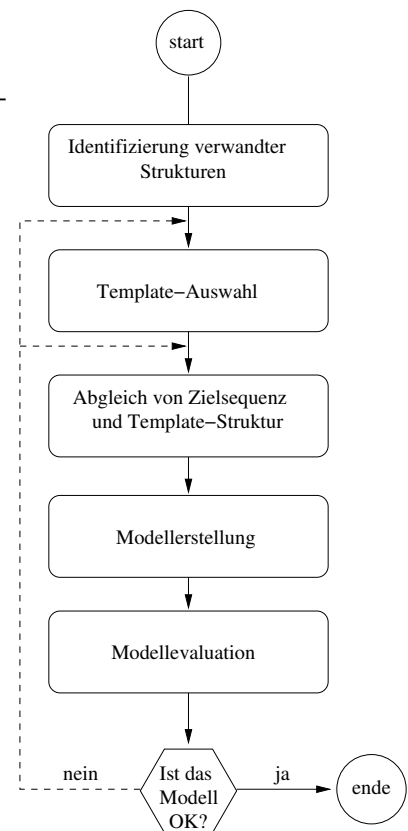
1. Die Suche nach homologen Proteinstrukturen.
2. Die Auswahl von einem bzw. mehreren Strukturen als Template
3. Die Anpassung von Ziel und Template
4. Die Modellerstellung
5. Die Modellevaluation

Es wird zunächst nach homologen Proteinen bekannter Struktur gesucht und anschließend eine Anpassung der Sequenzen aneinander durchgeführt (*Sequence Alignment* genannt). Auf Grundlage dieser Übereinstimmung wird im weiteren Verlauf ein Modell erstellt und dieses Modell dann evaluiert. Entscheidend ist, daß das Modell alle experimentellen Ergebnisse erklären kann und ihnen nicht widerspricht. Genügt das Modell den Anforderungen und verletzt keine stereochemischen Parameter, dann kann dieses Modell sowohl für die Interpretation vorhandener Ergebnisse dienen als auch für die Planung zukünftiger Experimente hilfreich sein. Verletzt das erstellte Modell diesen Anforderungen jedoch, wird der Vorgang wiederholt. Die Aminosäuresequenzen des Proteins unbekannter und bekannter Struktur müssen erneut angeglichen werden und auf Grundlage dieser alternativen Sequenzübereinstimmung wird ein neues Protein entworfen.

Obwohl die Richtigkeit eines Modells in letzter Konsequenz erst nach Lösung der Struktur durch NMR und der Röntgenstrukturanalyse bewiesen werden kann, hat die Strukturvorhersage aufgrund von Homology Modelling auch Vorteile gegenüber der Strukturlösung. Zum einen ist die Methode der Strukturvorhersage wesentlich schneller als die experimentelle Strukturlösung. Sie ist damit auch geeignet die Struktur einer größere Zahl an Proteinen zu bestimmen und damit bei Screeningverfahren eingesetzt zu werden. Sie ist zum anderen aber auch auf Proteine anwendbar, die aus bestimmten Gründen nicht kristallisieren und deren Strukturen nicht mit Hilfe von NMR-Methoden zu lösen sind. Da das Homology Modelling, wie sein Name bereits impliziert, jedoch auf bekannte Strukturen zurückgreift, ergänzen sich die Methoden der klassischen Strukturaufklärung und die des Homology Modelling auf ausgezeichnete Weise.

Homology Modelling bleibt trotz des Fortschritts der *ab initio* Protein-Struktur-Bestimmung auch weiterhin die einzige verlässliche Methode die dreidimensionale Struktur von Proteinen mit einer Präzision vorherzusagen, die vergleichbar ist mit der Strukturbestimmungen bei geringer Auflösung. Doch auch Strukturvorhersagen mit verhältnismäßig geringer Auflösung können sich als wertvoll erweisen, da einige Aspekte der Funktionsweise von Proteinen schon auf Basis einer grob umrissenen Struktur bestimmt werden können. Typische Verwendung von Homologie basiertem Modelling sind z. B. :

- Entwicklung von Mutanten, um Hypothesen bezüglich der Funktion von Proteinen zu testen.
- Identifizierung aktiver Bereiche und Bindungsstellen
- Design und Verbesserung von Liganden für identifizierte Bindungsstellen
- Modellieren von Substratspezifität
- Protein-Protein-Bindungs-Simulationen
- Vorhersage antigener Epitope
- Strukturverfeinerung von Modellen gegen Daten aus dipolaren Kopplungen bei der NMR



**Abbildung 8:** Globales Schema für Homologie basierte Modellerstellungen

- *Molecular Replacement* in der Röntgenstruktur-Verfeinerung
- Rationalisierung gewonnener Experimenteller Daten
- Planung neuer Experimente

*Molecular Modelling* konnte insbesondere auch bei der Analyse putativer mechanistischer Abläufe im Falle von ABC-Transportern dienlich sein. So konnte auf Grundlage der verschiedenen Kristallstrukturen mit Hilfe von MD-Simulationen ein Mechanismus vorgeschlagen werden, der die Interaktion beider ATP-Bindungsdomänen eines ABC-Transporters miteinander beschreibt.<sup>45,93</sup> Campbell et al. modellierten die Transmembranhelices von ABCC 1 und entwarfen eine Struktur für die Pore dieses Proteins. Darauf folgende Mutationsexperimente bestätigten die vorausgesagte funktionelle Relevanz des Phenylalanins<sup>594</sup>. Das entwickelte Modell erklärte ebenfalls die zuvor experimentell gefundene Bedeutung diverser anderer Aminosäuren.<sup>94,95</sup> Callebaut et al. haben ein Homologie basiertes Modell des humanen CFTR-NBD-Heterodimers vorgeschlagen, daß eine mögliche Interaktion beider ATP-Bindungsdomänen des CFTR mit ATP beschreibt.<sup>96</sup> Und schließlich konnten Seigneuret et al. auf Grundlage der MsbA Kristallstruktur ein Modell für ABCB 1 (P-gp) vorschlagen.<sup>97</sup>

#### 4.2.2 Verwendete Programme und Kraftfelder

Zur Vorhersage der dreidimensionalen Struktur der zweiten ATP-Bindungsdomäne von ABCC 1 wurde zunächst eine Homologiesuche mit FASTA durchgeführt. Das *Sequence Alignment* wurde mit CLUSTALW durchgeführt. Homologe Proteine mit einer Sequenzhomologie von über 30 % wurden für die initiale Strukturerstellung mit dem Program MODELLER verwendet. Anschließend erfolgte eine Simulation des Proteins in einer Wasserbox mit Hilfe des Programs GROMACS an. Die Evaluation der mit MODELLER sowie GROMACS erhaltenen Modelle wurde mit PROCHECK durchgeführt. Die graphische Darstellung der erhaltenen Modelle und anderer in dieser Arbeit abgebildeter Proteine wurde mit CHIMERA realisiert, während die Analyse von Trajektorien mittels GOPENMOL bewerkstelligt wurden.

##### FASTA

Zunächst wurde die Aminosäuresequenz des ATP-Bindungsmotivs unter Verwendung des FASTA Suchalgorithmus mit Sequenzen bekannter Proteinstrukturen der Brookhaven Protein Datenbank für Proteinstrukturen verglichen.<sup>98-100</sup> Es wurde eine Sequenz von 252 Aminosäuren abgefragt (siehe Abbildung 10 und 11) und die Blosum50<sup>99,100</sup> Matrix verwendet. Der *Gap extension penalty* betrug  $-2$  und der *Open Gap penalty* betrug  $-10$ . Von den erhaltenen homologen Proteinen wurden die Proteine mit der höchsten Übereinstimmung für weitere Berechnungen verwendet.

## MODELLER

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine mit dem Program MODELLER erstellt, daß die Modelle auf Grundlage bekannter Strukturen durch Satisfaktion räumlicher Einschränkungen berechnet.<sup>101-104</sup> Diese auf räumliche Einschränkungen aufbauende Methode der Homologie basierten Strukturvorhersage extrahiert Abstände und/oder Torsionswinkel-Einschränkungen der Zielsequenz des Sequenzabgleichs und fügt aufgrund der Sequenz bedingte stereochemische Einschränkungen hinzu. Das Modell wird durch eine Minimierung der Verletzungen dieser Einschränkungen erstellt.

MODELLER benötigt für die Berechnung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen eine im PIR-Format vorliegende Eingabedatei, die Informationen über homologe Bereiche enthält. Diese Eingabedatei wurde mit CLUSTALW erstellt.<sup>105,106</sup>

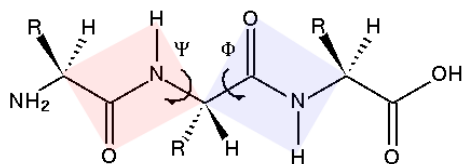
## PROCHECK

PROCHECK evaluiert die Struktur von Proteinen basierend auf stereochemischen Parametern. Ein wichtiges Analysemittel ist dabei die Erstellung von RAMACHANDRAN Diagrammen.<sup>107</sup> In einer Polypeptidkette ist die Rotation um die Peptidbindung stark eingeschränkt, da die Peptidbindung zu ca. 40 % Doppelbindungscharakter besitzt. Die Rotation um die  $C - N_\alpha$  Bindung ( $\Phi$ ) und die Drehung um die  $C_\alpha - C$  ( $\Psi$ ) Bindungen sind jedoch eingeschränkt möglich (siehe Diagramm 9(a)). Diese Einschränkungen resultieren hauptsächlich aufgrund sterischer Interaktionen benachbarter Peptidgruppen bei bestimmten Torsionswinkeln.<sup>1</sup> Die Analyse von Torsionswinkeln in Kristallstrukturen von Proteinen erlaubt die Beurteilung von Torsions- oder Diederwinkeln aufgrund empirischer Werte. Die Auftragung der Diederwinkel  $\Psi$  als Funktion von  $\Phi$  wird Ramachandran Diagramm genannt (siehe Abbildung 9(b)). In einem Ramachandran Diagramm werden gewöhnlich die Bereiche die koloriert, deren Winkelkombinationen von  $\Psi$  und  $\Phi$  den experimentell ermittelten Daten zugeordnet werden konnten. Abhängig von der Datenerhebung der erlaubten Winkelkombinationen variieren diese Bereiche zwischen verschiedenen Ramachandran Diagrammen.<sup>108-110</sup> Die Ramachandran Diagramme dieser Arbeit verwenden eine Einteilung in vier Bereiche. Die am meisten bevorzugten Bereiche sind grau schattiert und mit den Buchstaben A,B und L gekennzeichnet. Bereiche die darüber hinaus erlaubt sind, sind etwas heller schattiert und werden mit den Kleinbuchstaben a, b, l und p gekennzeichnet. Der dritte Bereich, der großzügig erlaubt ist, ist hellgrau und mit der Zeichenkombination  $\sim a$ ,  $\sim b$ ,  $\sim l$  und  $\sim p$  markiert während der nicht erlaubte Bereich weiß und ohne eine Markierung dargestellt wird. Aminosäuren, die in nicht erlaubten Bereichen sowie in großzügig erlaubten Bereichen vorliegen, werden zusätzlich mit ihrer Nummer abgebildet. Eine Ausnahme hiervon bilden Glycin und Prolin, die aufgrund ihrer Struktur weitere Diederwinkel erlauben.

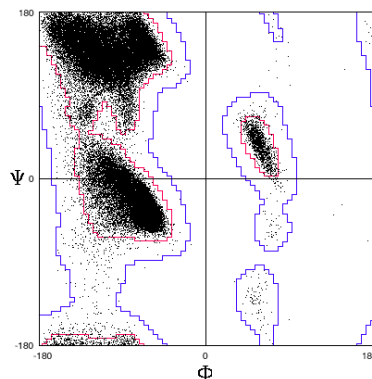
Zudem wird die Struktur auf *Van der Waals* Kontakte<sup>2</sup>, Bindungslängen und Winkel überprüft, sowie eine Analyse der Sekundärstruktur durchgeführt. PROCHECK greift dabei auf experimentelle Daten zurück.<sup>107,111</sup>

---

<sup>2</sup>Nicht gebundene Atome, die näher als 2,6 Å liegen werden bei diesem einfachen Test gekennzeichnet. Mögliche Wasserstoffbrückenbindungen werden von diesem Test ausgenommen.



(a) Strukturformel einer Peptidbindung. Die in einem Ramachandran Diagramm aufgetragenen Winkel sind gekennzeichnet. Ebenso die Ebene, die aufgrund des Doppelbindungscharakters von Peptidbindungen keine Rotation zulässt.



(b) Ramachandran Diagramm Darstellung für ein unbekanntes Protein. Rot gekennzeichnet sind erlaubte und blau gekennzeichnet sind großzügig erlaubte Bereiche. Punkte stellen Kombinationen der Torsionswinkel  $\Phi$  und  $\Psi$  dar.

**Abbildung 9:** Erläuterung zur Ramachandran-Diagramm Darstellung

## GROMACS

Energieminimierungen in einer periodischen Wasserbox und *Molecular Dynamics* Simulationen wurden mit dem Program GROMACS durchgeführt, das ein modifiziertes GROMOS87 Kraftfeld mit der *united atoms* Methode verwendet. Dabei wurde das Protein mit, bzw. ohne Ligand in einer kubischen Box expliziten Wassers (spc216) mit einem Rahmen von 2 nm solvatisiert und negative Ladung durch Natriumionen ausgeglichen.

Um ungünstige *Van der Waals*-Kontakte auszugleichen wurde anschließend eine kurze Energieminimierung von 100 Schritten eines Intervalls von 0,001 ps nach der *steepest descent* Methode durchgeführt, wobei die Bindungslängen festgehalten wurden.

Das explizite Wasser wurde in einem darauffolgendem Schritt ebenfalls relaxiert, wobei die Konfiguration des Proteins und seines Liganden (wenn vorhanden) fixiert wurden. Unter Annahme einer Relaxationszeit des Wassers von 10 ps wurde für diese Simulation ein Zeitrahmen von 20 ps gewählt. Die anschließende Energieminimierung des Gesamtsystems erfolgte nach der *l-bfgs* Methode.

Alle Simulationsschritte wurden mit dem *Particle Mesh Ewald* System durchgeführt. Nach erfolgreicher Simulation wurde für strukturelle Betrachtungen das Modell mit der geringsten potentiellen Energie gewählt, das auch für anschließende *Molecular Dynamics* Simulationen verwendet wurde. Die Simulation erfolgte bei einer konstanten Temperatur von 300 K unter Verwendung des *Berendsen Coupling* Algorithmus.<sup>85</sup>

Um die Interaktionen zwischen den Wassermolekülen, bzw. den Wassermolekülen und seinen Solubilisaten zu berechnen, wird häufig das *Simple Point Charge* (SPC) Modell verwendet. Dieses Wassermodell wurde auch in dieser Arbeit verwendet. In diesem Modell besitzt das Wassermolekül drei Zentren konzentrierter Ladung: Eine positive Ladung an den Wasserstoffatomen und eine negative Überschussladung am Sauerstoffatom. Die Annahme von Punktladungen führt jedoch zu einem nicht korrekten Wert für den permanenten Dipol des Wassermodells. Um dies zu ändern, wurde der Bindungswinkel von dem experimentell bestimmten Winkel von  $104,45^\circ$  auf einen Winkel von  $109,42^\circ$  angepasst. Diese Winkeländerung passt zum einen das Dipolmoment des Wassermodells an den experimentell ermittelten Wert an, ändert jedoch das Geschwindigkeitsverhalten des Wassermodells aufgrund nicht berücksichtigter freier Elektronenpaare. Dieser Effekt verringert sich jedoch mit steigender Temperatur.

### **PRODRG**

Da GROMACS nicht in der Lage ist Moleküle zu parametrisieren, die nicht aus Aminosäuren oder Wasser bestehen, wurde zur Parametrisierung von ATP der Onlinedienst PRODRG<sup>112</sup> verwendet. PRODRG verwendet eine Datei im PDB-Format und generiert daraus unter anderem Topologie und Koordinaten Dateien zur Verwendung für unter anderen Programmen auch GROMACS .

### **Weitere Programme**

Neben den bereits genannten Programmen wurden für die Analyse von Trajektorien das Programm VMD<sup>113</sup> verwendet. Zur Visualisierung wurden je nach Bedarf entweder CHIMERA oder VMD verwendet.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Die Modellierung der C-terminalen ATP Bindungsdomäne von ABCC 1

Wie in Kapitel 1.4.2 erläutert, ist der Mechanismus, mit dem ABC-Transporter, die am Phänotyp der multiplen Resistenz beteiligt sind, bisher noch nicht geklärt. Dies liegt unter anderem an der limitierten Zahl bekannter dreidimensionaler Strukturen für ABC-Transportproteine.

Während die Primärsequenz dieser Transporter sehr stark variiert, besteht eine große Sequenzhomologie innerhalb der ATP-Bindungsdomänen dieser Transporter, die diese Domänen zu einem geeigneten Ziel für Homologie basierte Simulationen macht.

Während für einige Transporter zwei ATP-Bindungsdomänen aufweisen, die anscheinend äquivalent sind, gibt es für ABCC 1 Hinweise darauf, daß die ATP-Bindungsdomänen nicht gleichwertig sind. Während die Möglichkeit besteht, daß die N-terminale ATP-Bindungsdomäne nur eine regulatorische Funktion wahrnimmt, ist die C-terminale ATP-Bindungsdomäne wahrscheinlich an dem eigentlichen Transportprozess beteiligt.

Im folgenden werden die Ergebnisse des Homology Modelling dargestellt. Ausgehend von der Sequenz der C-terminalen ATP-Bindungsdomäne (NBD2) wurde zunächst eine Suche nach Proteinen mit einer homologen Sequenz durchgeführt, die eine bekannte dreidimensionale Struktur besitzen. Auf Grundlage der ermittelten homologen Strukturen wurden verschiedene Proteinmodelle für die NBD2 erstellt. Die erstellten Modelle wurden nach stereochemischen Parametern evaluiert und zwei Modelle für weitere Analysen verwendet.

#### 5.1.1 Ergebnisse der Suche nach homologen Proteinen

ABCC 1 ist ein sogenannter Volltransporter, der zwei ATP-Bindungsdomänen besitzt. Von beiden Domänen wurde das C-terminale ATP-Bindungsmotiv für die Recherche nach homologen Proteinen verwendet. Für die Recherche wurde eine FASTA-Datenbankabfrage durchgeführt. Die gewählten Parameter sind Kapitel 4.2.2 zu entnehmen. Tabelle 8 gibt über die Ergebnisse der FASTA -Datenbanksuche nach homologen Sequenzen zur C-terminalen ATP-Bindungsdomäne Auskunft. Es sind nur Proteine mit gelöster Struktur aufgeführt. Der Tabelle sind zusätzliche Informationen zu entnehmen, wie Sequenzübereinstimmung zur NBD2-Sequenz von ABCC 1, die Auflösung mit der die Struktur geklärt wurde und mitkristallisierte Heteroatome. Auf Grundlage dieser Daten erfolgte die Auswahl der Templates, wie in der Diskussion erörtert wird.

#### 5.1.2 Sequenzabgleich der ausgewählten Proteinsequenzen

Der Sequenzabgleich zwischen der Sequenz des Proteins unbekannter Struktur und der Sequenz der bekannten Zielstruktur wurde mit dem Programm ClustalW wie im Experimentellen Teil beschrieben durchgeführt und nach Begutachtung auf Fehler und/oder Unstimmigkeiten ohne weitere Anpassungen verwendet.

PDB bank Code	Daten- Proteininformationen	Auflösung	Sequenzüberein- stimmung mit C-Terminaler ATP Bindungsdomäne	E-Wert	Kristallisierte He- terotome
IMTO	ATP-Bindungsdomäne des Hae- molsin B aus <i>E. coli</i>	2,6 Å	38,362 %	$8,7 \cdot 10^{-30}$	
IJSQ	MsbA aus <i>E. coli</i>	4,5 Å	38,075 %	$9,1 \cdot 10^{-31}$	
IMV5	LmrA, ATP-Bindungsdomäne	3,10 Å	36,818 %	$2,0 \cdot 10^{-29}$	Mg, ATP, ADP
IPF4	MsbA aus <i>Vibrio cholera</i> : Ein Multidrug Resistance ABC Transport homologes Protein in geschlossener Konformation	3,80 Å	34,874 %	$8,8 \cdot 10^{-29}$	ohne Nucleotide
IJJ7	C-terminale ATPase-Domäne humanen TAP1	2,40 Å	30,165 %	$2,2 \cdot 10^{-21}$	ADP, Mg
IOXV	GLCV, ATP-Bindungsdomäne eines Glucose-Transporters aus <i>Sulfolobus solfataricus</i>	1,95 Å	27,155 %	$2,4 \cdot 10^{-11}$	Mg, I, ANP
IG6H	ADP-Konformation von MJ1267. ATP-Bindungsdomäne eines ABC-Transporters	1,6 Å	24,299 %	$7,7 \cdot 10^{-4}$	Methylmercurat (HGCl), ADP, Mg
IJJ0	ABC-Transporter aus <i>Thermoto- ga maritima</i>	2,00 Å	23,113 %	$1,2 \cdot 10^{-6}$	ATP, Selenmethio- min (MSE)

**Tabelle 8:** Ergebnis der FASTA -Datenbank-Abfrage und zusätzliche Informationen zu den ermittelten Proteinen, wie z. B. kristallisierte Heterotome und die Auflösung, mit der die Struktur der Proteins gelöst wurde.

Abbildungen 10 und 11 zeigen die Sequenzvergleiche der C-terminalen ATP-Bindungsdomäne des humanen ABCC 1. Von den Leitstrukturen und Sequenzen, die aufgrund der FASTA -Abfrage erhalten wurden, wurden zum einen die Struktur von Haemolysin B und MsbA als Templategrundlage für ein Modell ohne ATP und die Struktur von LmrA als Modell für eine Struktur mit komplexiertem ATP verwendet.

Unterhalb der Aminosäuresequenzabfolgen ist in Form einer Balkendarstellung der Grad der Übereinstimmung zwischen den Sequenzen abgebildet. Türkis gefärbt in beiden Abbildungen das Walker A-Motiv der ABC-Bindungsdomänen, blau das Walker B Motiv. Die intensivere Tönung gibt die Position des Strukturmerkmals des jeweiligen Motivs an. Rot abgebildet ist die ABC-Signatursequenz der ABC-Transportproteine.

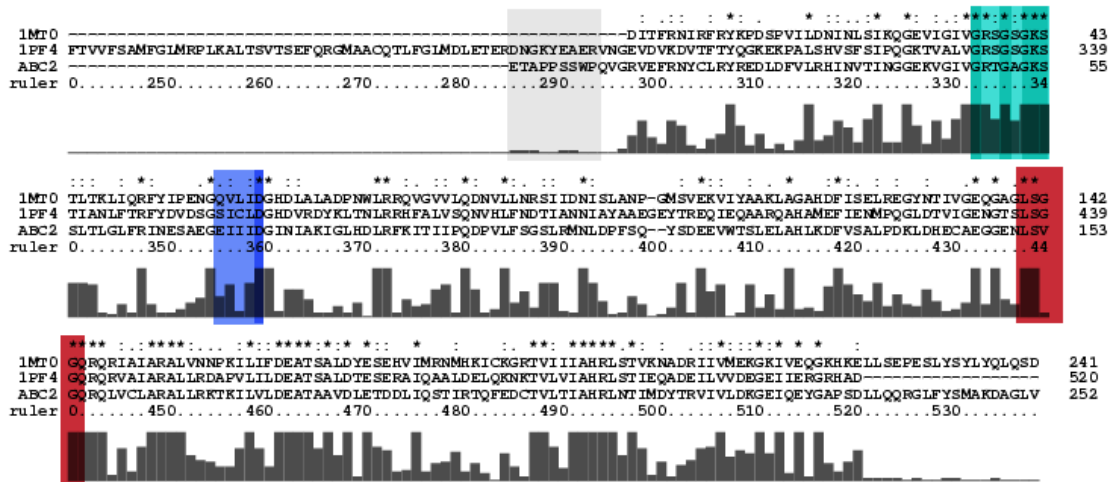
In Abbildung 10 ist der Sequenzabgleich zwischen der NBD2 von ABCC 1 und der ABC-Bindungsdomäne von MsbA aus *Vibrio cholera* abgebildet. Am N-Terminus der Sequenz, der mit einer grauen Box markiert ist, liegt ein Bereich vor, der keine Sequenzübereinstimmung zwischen den Sequenzen zeigt. Es wurden sowohl Modelle mit als auch ohne diesen Bereich erstellt. Der Abgleich dreier Sequenzen zeigt, durch Sterne indiziert, Bereiche identischer Aminosäuren. Der Doppelpunkt zeigt Bereiche ähnlicher Aminosäuren, d. h. Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften an. Insbesondere im C-terminalen Bereich ist die Übereinstimmung mit einer großen Zahl identischer Aminosäuren gut zu sehen.

In Abbildung 11 ist der Sequenzvergleich zwischen den Aminosäuresequenzen von ABCC 1 und LmrA wiedergegeben. Auch hier liegt eine sehr gute Übereinstimmung zwischen den Sequenzen vor. Wie auch bei dem Vergleich der Sequenzen für das Modell ohne ATP stimmen insbesondere die charakteristischen Motive für die ATP-Bindungsdomäne gut überein. Auch hier liegt im C-terminalen Bereich der Sequenz über weite Strecken eine identische Abfolge der Aminosäuren vor.

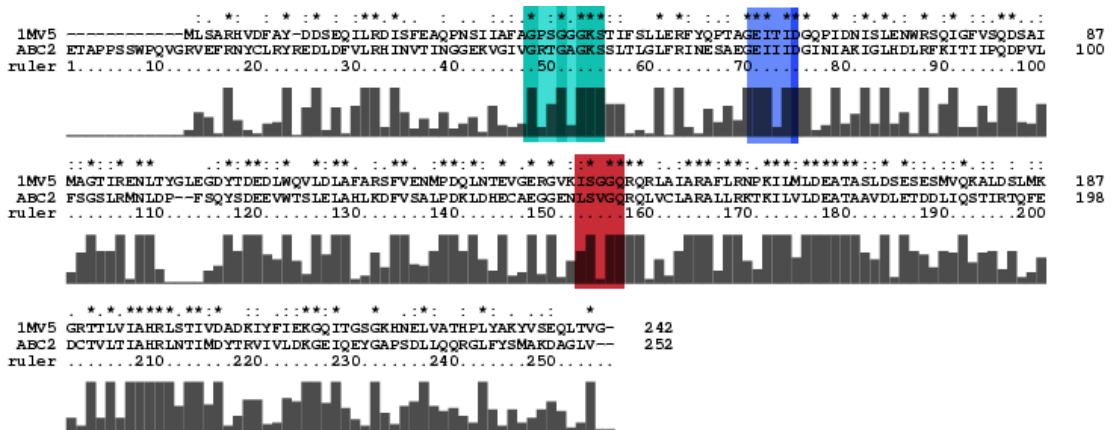
### 5.1.3 Modellierung der C-terminalen ATP-Bindungsdomäne von ABCC1

Basierend auf den Strukturen der Template-Proteine und dem Sequenzabgleich zwischen den Sequenzen der Template-Proteine und der NBD2 von ABCC 1 wurden mit dem Programm MO-DELLER jeweils 150 Proteinmodelle für ein Modell mit und ohne komplexiertes ATP erstellt. Abbildung 12 zeigt beispielhaft eine Überlagerung von 50 erstellten Modellen ohne komplexiertes ATP. Dargestellt ist für jedes Protein der Abfolge der  $\alpha$ -Kohlenstoffatome der Aminosäureketten.

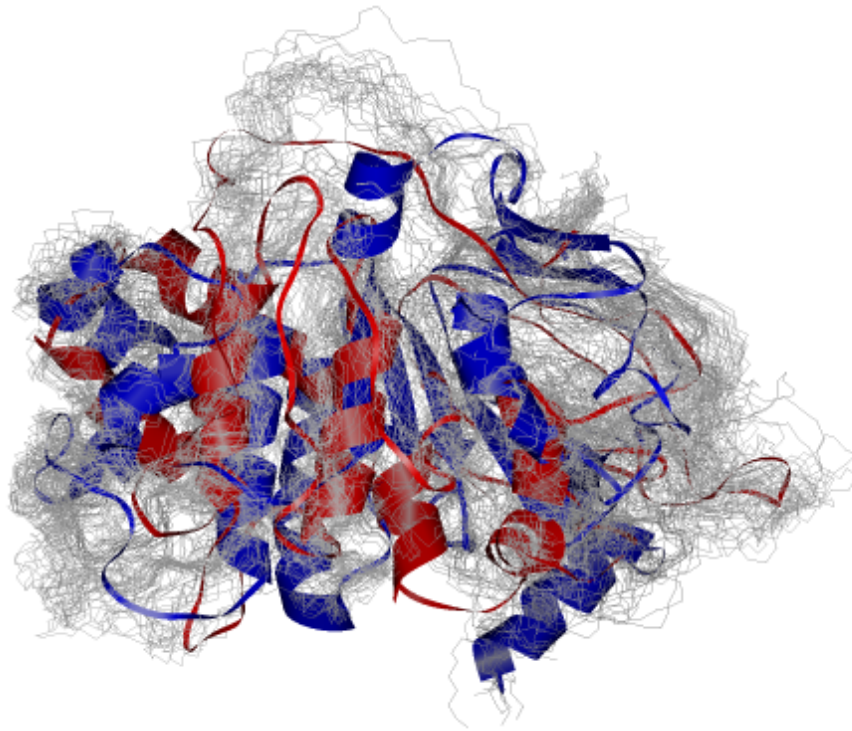
Die einzelnen Proteine sind zwar in ihrer Sequenz identisch, der dreidimensionale Aufbau unterscheidet sich jedoch zwischen den einzelnen erstellten Modellen. Aus der Überlagerung der Strukturen wird ersichtlich, daß es sich bei der Organisation der dreidimensionalen Struktur bezogen auf die verknüpften  $\alpha$ -Kohlenstoffatome um eine Streuung um wenige Leitmotive handelt. In Abbildung sind zur besseren Orientierung für den Leser zwei Strukturen als Leitmotiv in einer *Ribbonstyle*-Darstellung abgebildet.



**Abbildung 10:** Sequenzabgleich zwischen der NBD2 von humanem ABC1, hier ABC2 genannt, Haemolysin B aus *E. coli* (PDB-Code 1MT0) und MsaA aus *Vibrio cholera* (PDB-Code 1PF4). Es wurde nur der relevante Bereich dargestellt. Sterne indizieren Bereiche mit Sequenzübereinstimmung, Doppelpunkte und Punkte indizieren Bereiche ähnlicher Sequenz. Zur besseren Übersicht ist unterhalb des Sequenzvergleichs jeweils der Grad der Homologie durch ein Balkendiagramm angegeben. Die grau unterlegte Box gibt einen Bereich an, der keine Sequenzübereinstimmung mit der NBD2 von ABC1 besitzt. Dieser Bereich wurde in frühen Studien zu dieser Arbeit zunächst verwendet. Bei späteren Modellen wurde er nicht mehr verwendet. Türkis und blau unterlegt sind die Walker A und Walker B Motivsequenzen, die stark konserviert sind. Rot unterlegt ist die ABC-Signatursequenz. Die jeweils intensiver gefärbten Bereiche geben das Erkennungsmuster der jeweiligen Sequenz wieder.



**Abbildung 11:** Sequenzvergleich zwischen der NBD2 humanen ABC1 (ABC2) und der Sequenz von LmrA. Türkis und blau unterlegt sind die Walker A und Walker B Motivsequenzen, die stark konserviert sind. Rot unterlegt ist die ABC-Signatursequenz. Die jeweils intensiver gefärbten Bereiche geben das Erkennungsmuster der jeweiligen Sequenz wieder.



**Abbildung 12:** Überlagerung von 50 mit MODELLER erstellten Modellen. Die Strukturen der Modellproteine »streuen« um einige wenige globale Faltungsmotive, daher sind zwei der 50 Strukturen zur besseren Übersicht als Leitstrukturen hervorgehoben. Die Auswahl der Modelle erfolgte zufällig ohne eine Wertung der Strukturen vorzunehmen.

Die Auswahl von biochemisch relevanten Strukturen erfolgte zunächst auf Grundlage von stereochemischen Parametern. Die Daten für eine solche Beurteilung stammen aus Röntgenstrukturen, die einen kristallographischen R-Wert von wenigstens 2.0 besitzen, wobei die Evaluation mit Hilfe des Programms PROCHECK durchgeführt wurde. Grundlage für die Evaluation der erstellten Modelle war der Anteil der erlaubten  $\Psi/\Phi$ -Winkelkombinationen.

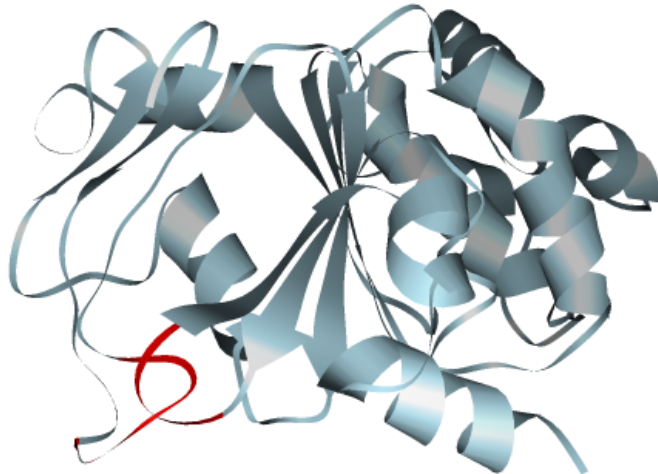
In Tabelle 9 ist das Ergebnis der Evaluation mit PROCHECK aufgeführt. Die ATP-Koordinaten wurden vor Evaluation aus der Strukturdatei gelöscht. Die Auswahl der weiter verwendeten Modelle erfolgte zunächst anhand des geringsten Anteils an Aminosäuren im nicht erlaubten Bereich. Tabellarisch aufgelistet sind jeweils nur die vier Modelle, die den geringsten Anteil nicht erlaubter  $\Phi/\Psi$ -Torsionswinkel aufweisen. Zusätzlich aufgeführt ist der Anteil an  $\Phi/\Psi$ -Torsionswinkel in favorisierten Bereichen.

Modellnummer	Nicht erlaubt	Favorisiert
Modellierung ohne Nucleotid		
047	0,2 %	86,0 %
052	0,5 %	90,3 %
075	0,5 %	85,7 %
084	0,5 %	89,4 %
Modellierung mit ATP		
021	1,8 %	89,2 %
085	1,8 %	87,4 %
134	1,8 %	89,2 %
136	1,3 %	87,0 %
Template-Strukturen		
1MTO	0,0 %	87,3 %
1PF4	0,2 %	74,1 %
1MV5	1,4 %	78,6 %

**Tabelle 9:** Ergebnis der Evaluation der erlaubten Diederwinkel der erstellten Modelle. Es ist der Anteil der  $\Phi/\Psi$ -Diederwinkel in nicht erlaubten, bzw. favorisierten Bereichen für die jeweils *besten* vier Modelle mit und ohne ATP aufgeführt. Jeweils 150 Strukturen wurden mit PROCHECK bezüglich ihrer  $\Phi/\Psi$ -Diederwinkel sortiert. Neben den erstellten Modellen, wurden auch die Template-Strukturen mit den PDB-Codes 1MTO, 1PF4 und 1MV5 zum Vergleich untersucht.

Die Modelle, die nach diesen angelegten Maßstäben die *besten* Modelle waren, wurden anschließend visuell auf Mängel geprüft. Nur in sich konsistente Modelle wurden in die weitere Betrachtung einbezogen. Von den vier nach Maßstäben der Evaluation *besten* Modellen wurden zwei Modelle aufgrund von »Schleifenbildung« aussortiert (siehe Abbildung 13). Dabei handelt

es sich um eine Einfädung der Aminosäurekette in einen entfernten Loop, so daß eine Struktur entsteht, die wie zwei Ringe einer Kette ineinander greifen. Diese Modelle wurden nicht weiter verwendet.



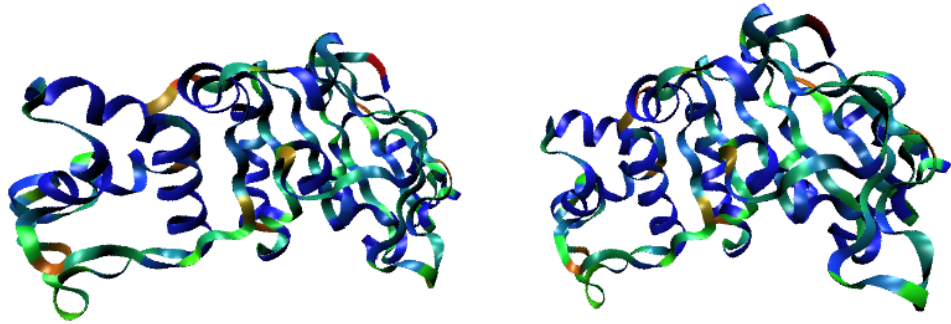
**Abbildung 13:** Ein mit MODELLER erstelltes Proteinmodell. Rot markiert ist eine Schleifenbildung in der Primärstruktur des Modells, die zu einer physiologisch irrelevanten Struktur führt. Fehler dieser Art verletzen keine stereochemischen Einschränkungen und besitzen keine ungünstigen intramolekularen Wechselwirkungen. Aus diesem Grund besitzt das Modell keine ungewöhnlich hohe Energie, die die Erstellung mit MODELLER einschränken würde, noch kann ein solches Modell durch eine automatisierte Prozessierung erfasst und aussortiert werden.

In Abbildung 14 sind die Modelle 047 und 084 und das Ergebnis ihrer stereochemischen Evaluation bezüglich ihrer Diederwinkel im Detail aufgeführt.

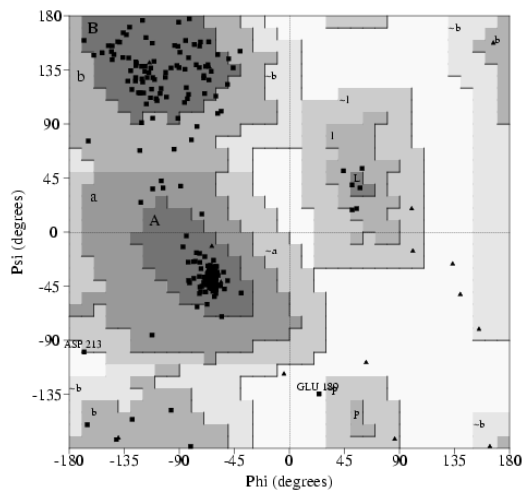
Abbildungen 14(b) und 14(c) zeigen die Ramachandran Diagramme dieser Strukturen. Die zugehörigen dreidimensionalen Darstellungen sind in den Abbildungen 14(b) und 14(c) schematisch dargestellt. Eine Färbung erfolgte aufgrund der Einordnung der Aminosäuren in das Ramachandran-Diagramm. Grundlage waren die Daten der PROCHECK -Analyse. Rottöne zeigen bei dieser Darstellung ungünstige  $\Phi/\Psi$ -Winkelkombinationen an und blautöne favorisierte Torsionswinkel.

Wie aus den Ramachandran Diagrammen ersichtlich ist, liegen in beiden Modellen die meisten Diederwinkel-Kombinationen in favorisierten Bereichen. Nur wenige Aminosäuren liegen außerhalb der erlaubten Bereiche, jedoch in der Nähe von den sogenannten großzügig erlaubten Bereichen. Wie aus der dreidimensionalen Abbildung zu entnehmen ist, liegen die unerlaubten Torsionswinkel in Loop-Bereichen des Proteins, die im allgemeinen weniger konserviert sind.

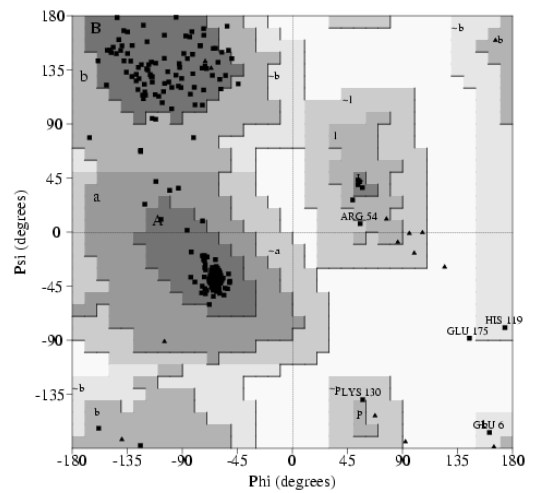
Abbildung 15 zeigt die Überlagerung aller vier Modelle. Das komplexierte ATP ist nicht mit abgebildet, da vor Evaluation die Löschung der Koordinaten des ATP aus der Datei erfolgte.



(a) Darstellung der modellierten Struktur der Modelle 047 (links) und 084 (rechts). Die Färbung der Aminosäuren erfolgte aufgrund berechneter  $\Psi/\Phi$ -Winkel. Warme Farben, wie Rot, zeigen ungünstige Konformationen an, die in nicht erlaubten Bereichen liegen.



(b)

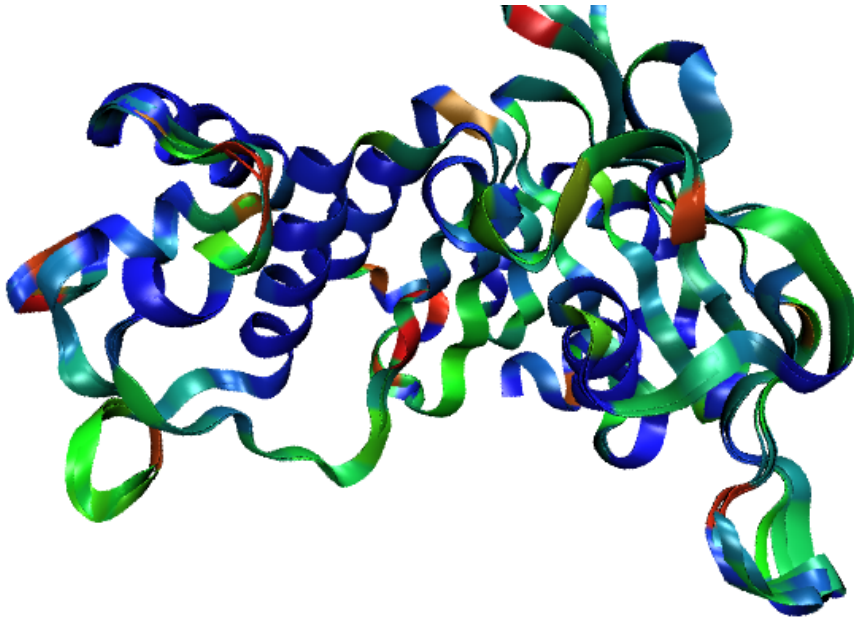


(c)

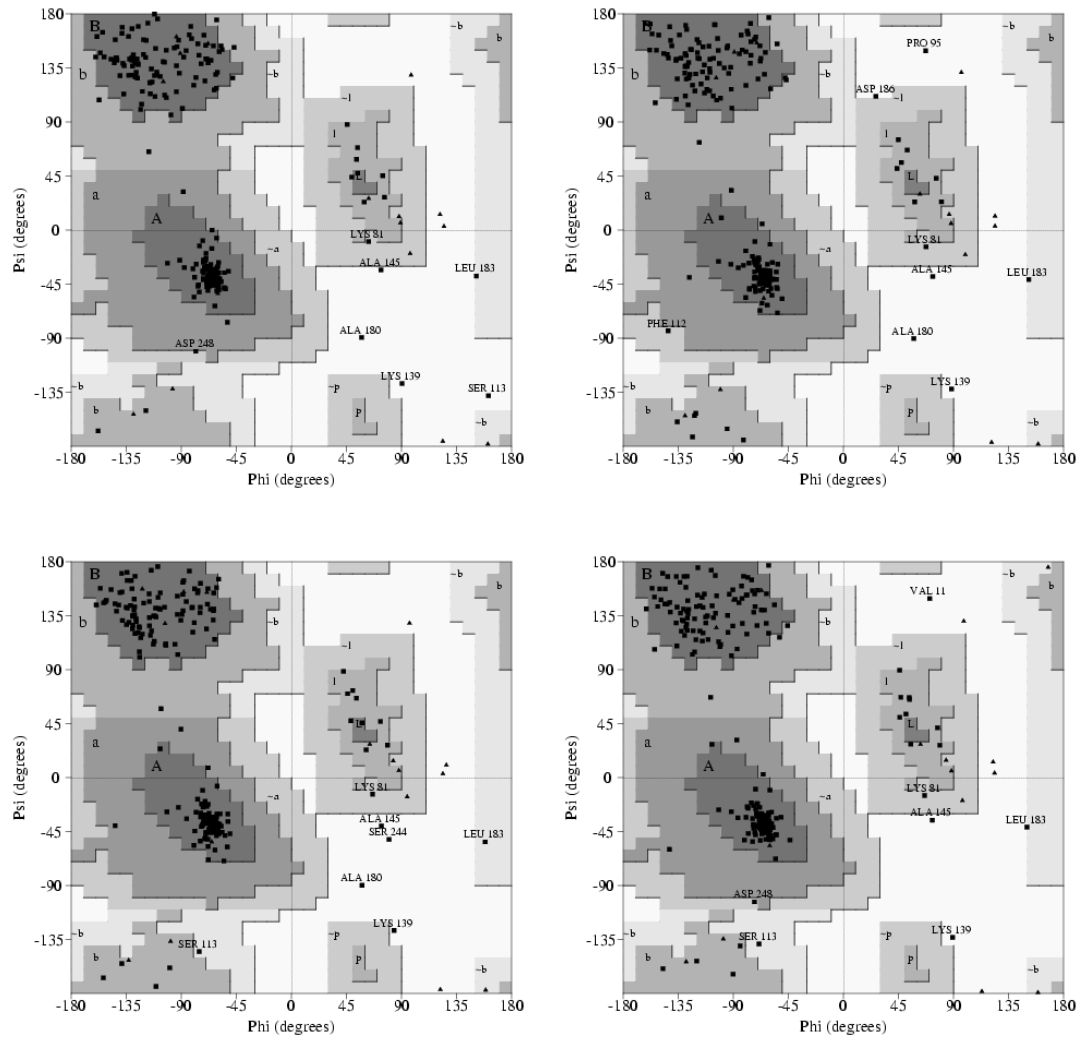
**Abbildung 14:** Visualisierung der Dieder-Winkel. *Oben:* Darstellung mit Hilfe einer kolorierten dreidimensionalen Struktur. *Unten:* Darstellung der Dieder-Winkel mit einem Ramachandran-Diagramm. *Links:* Modell 047, *rechts:* Modell 084.



Die Färbung gibt an, in welche Kategorie der  $\Phi/\Psi$ -Diederwinkel der jeweiligen Aminosäure fällt. Die zugehörigen Ramachandran- Diagramme sind in Abbildung 16 wiedergegeben. Neben Rottönen, die in Loop-Bereichen zu finden sind, stehen im Gegensatz zum ATP-freien Modell auch Aminosäuren im zentralen Bereich, in dem  $\beta$ -Faltblattstrukturen vorliegen, Torsionsspannungen vor. Die Überlagerung der vier Modelle zeigt zudem, daß eine sehr gute Übereinstimmung der besten vier ausgewählten Modelle vorliegt, die nur in dem ausgeprägten flexiblen Loop, der im Bild unten rechts zu sehen ist, nicht vorhanden ist.

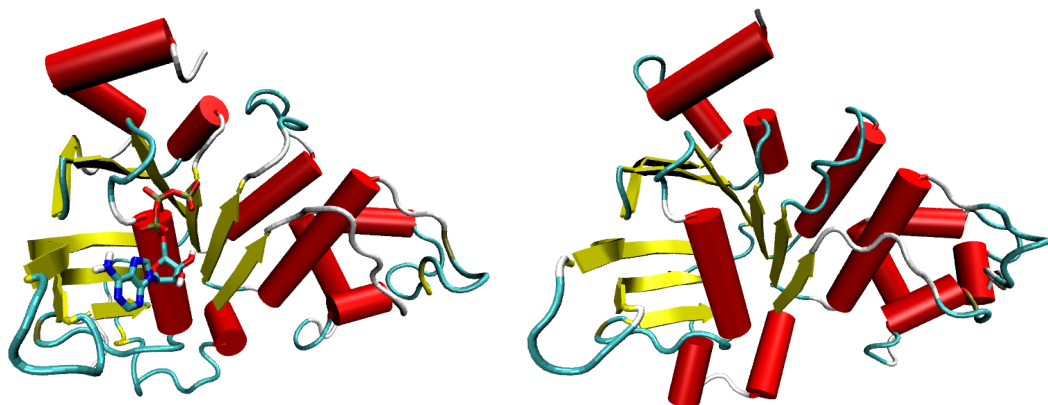


**Abbildung 15:** Analyse der  $\Phi/\Psi$ -Diederwinkel der vier *besten* modellierten Strukturen, die ATP enthalten. *a*: Dreidimensionale Struktur der modellierten Proteine im Komplex mit ATP (ATP ist nicht gezeigt). Ribbonstyle Darstellung vierer überlagerter Modellstrukturen. Die Färbung korreliert mit den  $\Psi/\Phi$ -Diederwinkeln.



**Abbildung 16:** Ramachandran Diagramme für Strukturen 021, 085, 134 und 136. Wie auch bei der Überlagerung der dreidimensionalen Strukturen, sind sich alle erstellten Modelle sehr ähnlich. Nur wenig Aminosäuren liegen in Bereichen nicht erlaubter  $\Phi/\Psi$ -Torsionswinkel.

Abbildung 17 zeigt links ein erstelltes Modell mit komplexierten ATP und rechts ein Modell ohne komplexiertes ATP in jeweils einer *ribbonstyle* Darstellung. Beide Modelle besitzen ein vergleichbares Muster der Sekundärstrukturen. Darüber hinaus weichen die Modelle in ihrer dreidimensionalen Struktur jedoch voneinander ab. Im Kern beider Modelle liegen sechs parallel angeordnete  $\beta$ -Faltblatt Strukturen, die von  $\alpha$ -Helices gesäumt sind. Jedem  $\beta$ -Faltblattmotiv folgt dabei jeweils eine  $\alpha$ -Helix. Die sechs parallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen umgeben zusammen mit drei weiteren periphär gelegenen  $\beta$ -Faltblatt Strukturen eine einzelne  $\alpha$ -Helix, deren *N*-terminales Ende das sogenannte Walker A Motiv<sup>3</sup> enthält. Das Walker A Motiv ist an der elektrostatischen Bindung von ATP beteiligt. Die ATP-Bindungsdomäne enthält eine Untereinheit, die ausschließlich aus  $\alpha$ -Helices besteht. Dieser Bereich ist mit dem Rest der Domäne über flexible Loops verknüpft. Eine lange zentrale Helix mit einer Länge von 15 Aminosäuren wird von vier kleineren Helices flankiert. Das ATP-komplexierende Modell enthält im Vergleich zum Modell ohne ATP zusätzlich einen flexiblen *N*-terminalen Loop. Dieser Loop wurde im Modell ohne ATP nicht modelliert, da der Loop bei der Modellerstellung im Kern des Proteins eingeschlossen war. Aus diesem Grund wurde er bei der Modellierung der ATP-freien Bindungsdomäne nicht berücksichtigt. Das Problem entstand bei dem ATP-haltigen Modell nicht, die verwendete Sequenz wurde daher nicht verkürzt.



(a) Schematische Darstellung des Modells 021 im Komplex mit ATP. Das Modell enthält zehn  $\alpha$ -Helices und neun  $\beta$ -Faltblätter.

(b) Schematische Darstellung des Modells 084. Das Modell entstand ohne ATP. Das Modell enthält zwölf  $\alpha$ -Helices und ebenfalls neun  $\beta$ -Faltblätter.

**Abbildung 17:** Schematische Darstellung der modellierten ATP Bindungsdomänen im Komplex mit und ohne ATP.

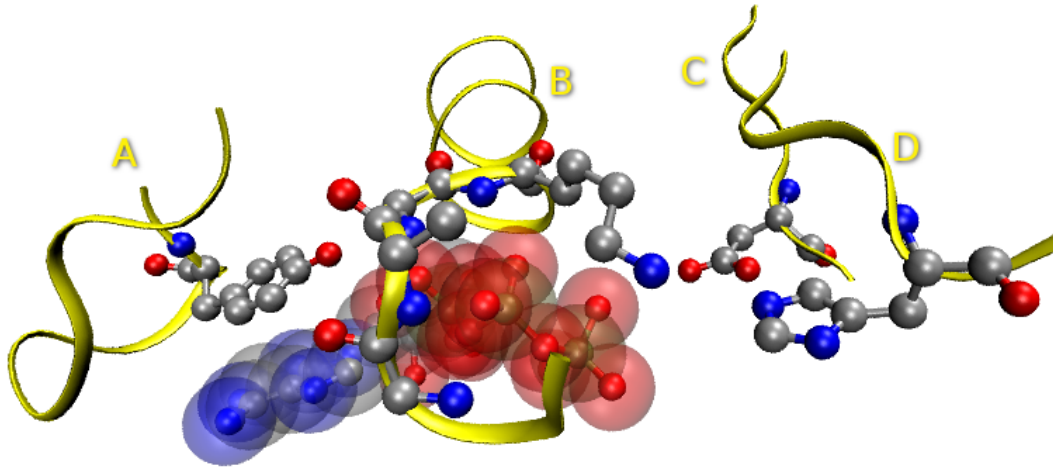
<sup>3</sup>Das Walker A Motiv wird auch P-Loop genannt

Auffällig ist in der *ribbonstyle*-Darstellung der Modelle, daß das ATP-freie Modell anscheinend zwei  $\alpha$ -Helices mehr aufweist. Eine kurze Helix in der ausschließlich aus  $\alpha$ -Helices bestehenden Domäne II und eine weitere in der Domäne I. Die stark schematisierte Natur einer *ribbonstyle*-Darstellung birgt die Gefahr einen solchen Unterschied zu stark zu bewerten.

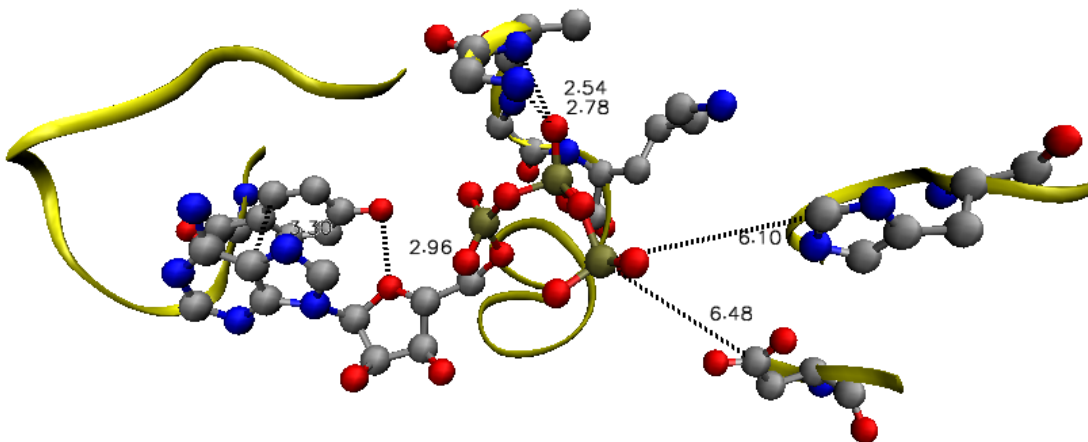
Abbildung 18(a) stellt eine schematische Detailaufnahme von ATP im Komplex mit dem Proteinmodell 021 dar. ATP ist mit einer transparenten Hülle dargestellt, die dem VDW-Abstand der Atome entspricht. Schleife A (siehe Abbildung 18(a)) enthält eine konservierte aromatische Aminosäure (hier Tyrosin), deren aromatischer Rest sich mit dem Adeningerüst von ATP stapelt. Die aromatischen Ringe liegen nicht planar übereinander und die Kohlenstoffatome sind versetzt zueinander. Der Abstand der Ebenen beträgt ca. 3,3 Å (Vergleiche Abbildung 18(b)). Schleife B ist eine  $\alpha$ -Helix und enthält das ebenfalls stark konservierte Walker A Motiv, das allen ATP-Bindungsdomänen gemein ist. Schleife C und D besitzen eine  $\beta$ -Faltblatt Struktur. Dargestellt sind die konservierten Aminosäuren Asparaginsäure und Histidin, Asparaginsäure besitzt in diesem Modell einen Abstand von ungefähr 6,5 Å zwischen dem  $\gamma$ -Kohlenstoff des Asparaginsäure und dem zentralen Phosphortatom der  $\gamma$ -Phosphatgruppe und einen Abstand von ca. 6,1 Å zwischen dem C1-Kohlenstoff des Imidazolringes des Histidins und dem zuvor genannten Phosphoratom.

Die Überlagerung zweier modellierter ATP-Bindungsdomänen ist in Abbildung 19 gezeigt. Die Darstellung erfolgt zum Zwecke der Übersichtlichkeit im *ribbonsyte*. Die Ausrichtung der Modelle aufeinander wurde mit dem Program CHIMERA realisiert und erfolgte anhand der besten Übereinstimmung der  $C_{\alpha}$ -Atome nach einem Sequenzabgleich.

Während es zu einer guten Übereinstimmung der  $\beta$ -Faltblatt Strukturmerkmale kommt, bestehen große Unterschiede zwischen der Anordnung der Loops und der Orientierung der  $\alpha$ -Helices. Darüber hinaus unterscheiden sich beide Strukturen in der Ausbildung ihrer Sekundärstrukturen, wie bereits zuvor beschrieben wurde. Während die prinzipielle Lage der Helices und Faltblätter übereinstimmt, unterscheiden sich beide Modelle in der Ausbildung ihrer Sekundärstrukturen insofern als sie nicht im gleichen Maße ausgebildet werden. Dabei ist die Bewertung von Sekundärstrukturen anhand ihrer Repräsentation in einer schematisierten Abbildung kritisch zu hinterfragen, da unter Umständen geringe Variationen der Torsion dazu führen können, daß z. B. eine  $\alpha$ -Helix nicht mehr als solche, sondern als Loop dargestellt wird.

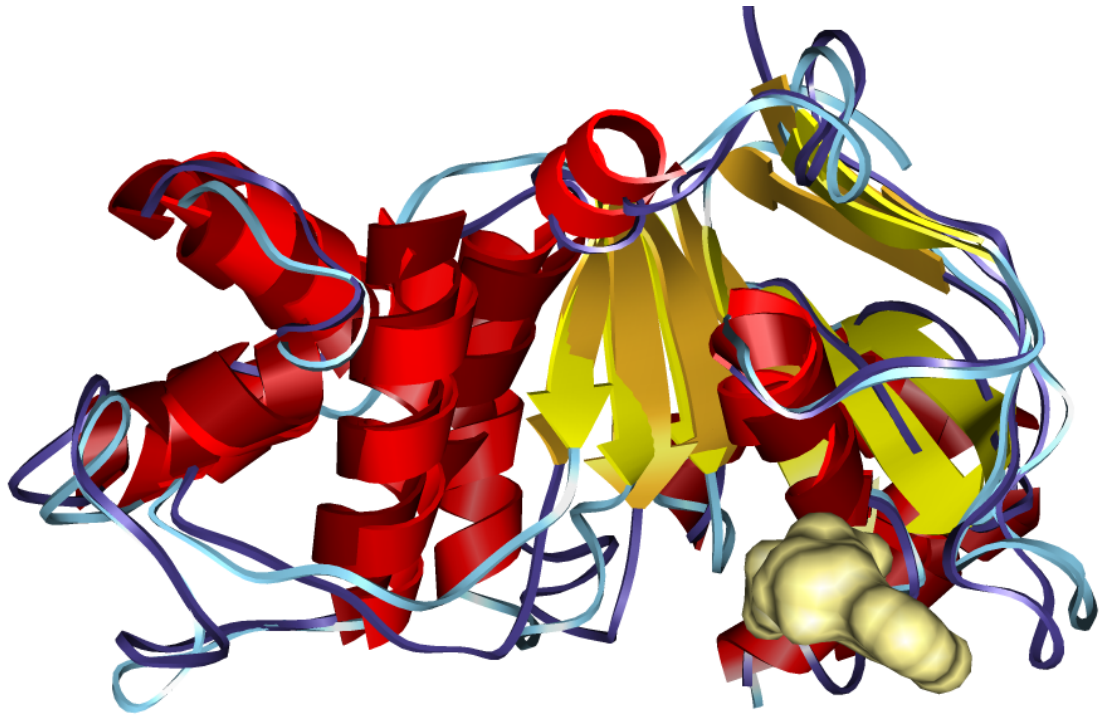


(a) Detailaufnahme des komplexierten ATP. ATP ist mit einer transparenten Hülle entsprechend der *Van der Waals* Radii abgebildet. Relevante Aminosäuren des Proteinmodells 021 in der näheren Umgebung des ATP sind in einer *ball and stick* Darstellung gezeigt. Die gelben Fäden symbolisieren den dreidimensionalen Verlauf der  $\alpha$ -Kohlenstoffatome im Protein. Im Modell ist kein Wasserstoff wiedergegeben.

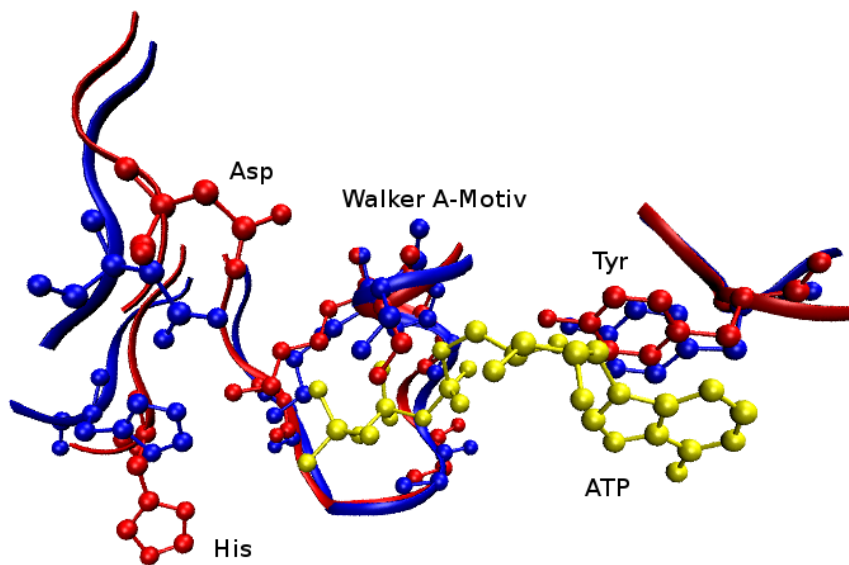


(b) Visualisierung ausgewählte Abstände zwischen ATP und komplexierenden Aminosäuren.

**Abbildung 18:** Detailaufnahme des komplexierten ATP im Modell 021. Eine genaue Beschreibung erfolgt im Text.



**Abbildung 19:** Überlagerung des Protein-ATP Komplexes (Modell 021) mit Modell 085. Die Darstellung erfolgte stark schematisiert im *Ribbonstyle*. Die Sekundärstrukturmerkmale beider Strukturen sind jeweils in einer unterschiedlichen Schattierung des gleichen Farbtons hervorgehoben.  $\beta$ -Faltblätter sind in gelb, bzw. gold dargestellt während  $\alpha$ -Helices in rot, bzw. dunkelrot und Loops in hell- und dunkelblau abgebildet sind. Die Ausrichtung erfolgte manuell. Während die Sekundärstrukturen zu einem großen Teil übereinstimmen, so weicht ihre absolute Position doch weit voneinander ab. Auffällig ist diese Abweichung insbesondere in dem  $\alpha$ -Helikalen Bereichen des Proteins. Bereiche mit  $\beta$ -Faltblattstruktur variieren weniger.



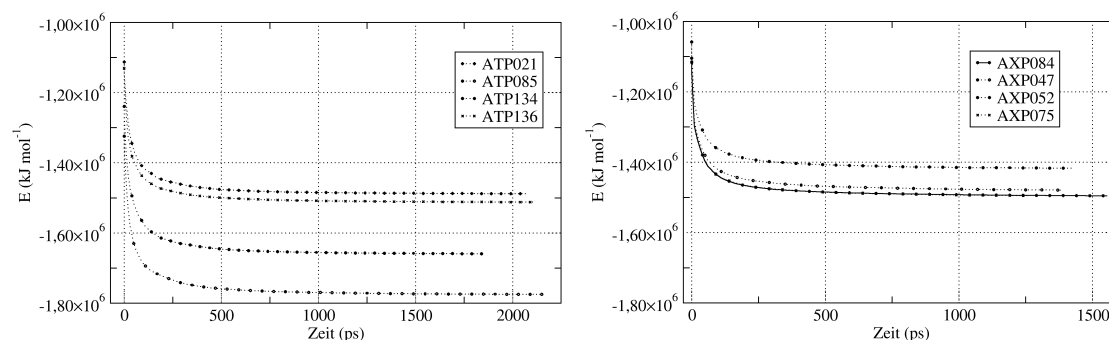
**Abbildung 20:** Überlagerung wichtiger konservierter Aminosäuren der zwei Proteinmodelle im Komplex mit (rot) und ohne (blau) ATP zusammen mit dem ATP-Molekül (gelb). Darstellung wichtiger konservierter Aminosäuren nach einer RMSD basierten Überlagerung der  $C_{\alpha}$ -Atome. Gelb dargestellt ist das vom rot abgebildeten Modell 021 komplexierte ATP und blau dargestellt ist Proteinmodell 085. Die  $C_{\alpha}$ -Atome der abgebildeten Tyrosine weichen um 1,2 Å voneinander ab, die  $C_{\alpha}$ -Atome der dargestellten Aminosäuren Asparaginsäure und Histidin weichen jeweils 2,5 Å voneinander ab. Die Auslenkung der Carbonsäuregruppe der Asparaginsäure beträgt 3,3 Å.

In Abbildung 20 ist eine Detailaufnahme wichtiger konservierter Aminosäuren abgebildet. Die Auswahl der Aminosäuren richtete sich nach einer in der Literatur beschriebenen Interaktion mit dem  $\gamma$ -Phosphat des ATP. Sowohl für das abgebildete Histidin als auch für die abgebildete Asparaginsäure wird eine mögliche Interaktion mit ATP diskutiert. Die Natur dieser Interaktion ist jedoch noch nicht bekannt. Die Atome der Aminosäurereste im Modell mit und ohne ATP weichen in ihrer modellierten Position innerhalb eines Bereiches zwischen ein und zwei Angström voneinander ab. Die dargestellten Aminosäuren Asparaginsäure und Histidin sind verglichen mit ihrer Position im Modell, das ohne ATP erstellt wurde, vom  $\gamma$ -Phosphat des ATP weg ausgelenkt. Die relative Position der  $C_{\alpha}$ -Atome dieser Aminosäuren weichen zwischen den Modellen 1,2 Å im Falle der Asparaginsäure und 2,5 Å voneinander ab. Die maximale Auslenkung der Aminosäuren beträgt für die Säurefunktion der Asparaginsäure 3,3 Å.

### 5.1.4 Solvatisierung der erstellten Proteinmodelle in explizitem Wasser

Für eine realistischere Betrachtung der erstellten Modelle wurden die Modelle solvatisiert. Es erfolgte eine Simulation des Proteinmodells in einer Wasseratmosphäre. Zudem wurde das Modell mit Wasserstoffatomen ausgestattet, die bei der Modellerstellung mit MODELLER nicht berücksichtigt wurden. Die Parameterisierung der Aminosäuren für das Protein erfolgte mit GROMACS. Die Koordinaten des ATPs wurden aus der Brookhaven Datenbank Datei extrahiert und mit Hilfe PRODRG parametrisiert. Anschließend wurden die Dateien wieder zusammengeführt.

Die anschließende Solvatisierung ausgewählter Modelle wurde mit GROMACS, wie im experimentellen Teil beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden die, nach Maßstäben der in der Evaluation angelegten Kriterien, *besten* vier mit MODELLER erhaltenen Modell für weitere Untersuchungen verwendet.



(a) Energieminimierung der ATP-Bindungsdomäne im Komplex mit ATP. Modell ATP136 konvergierte bei der niedrigsten potentiellen Energie von  $-1,78 \cdot 10^{-6} \text{ kJmol}^{-1}$

(b) Energieminimierung der ATP-Bindungsdomäne ohne Nukleotid.

**Abbildung 21:** Verlauf der potentiellen Energie der in Wasser solvatisierten ATP-Bindungsdomäne während der Energieminimierung mit dem bfgs-Algorithmus. Die Struktur, die gegen die geringste potentielle Energie konvergierte, wurde für weitere Experimente verwendet.

Zunächst erfolgte eine energiebasierte Optimierung in einer simulierten Wasserbox. Die Strukturen wurden in GROMACS eingelesen und in einer kubischen Box mit periodischen Grenzen der Kantenlänge 10 nm solvatisiert. Es erfolgte zunächst eine Energieminimierung, um energetisch ungünstige *Van der Waals*-Kontakte auszugleichen. Dies erfolgte mit der Methode des steilsten Gradienten mit anschließendem Relaxieren der Wassermoleküle über einen Zeitraum von 20 ps. Anschließend wurde eine Energieminimierung des Gesamtsystems nach dem bfgs-Algorithmus durchgeführt. Die Resultate der Energieminimierung nach dem bfgs-Algorithmus sind in Abbildung 21(a) und 21(b) graphisch dargestellt. Die Modelle wurden erneut mit PROCHECK evalu-



iert. Wassermoleküle sind aus Gründen der Übersichtlichkeit in den nachfolgenden Darstellungen nicht abgebildet. In Abbildung 21 ist der Verlauf der potentiellen Energie im Verlauf der Gesamtenergie des Systems in explizitem SPC-Wasser für alle acht verwendeten Modelle wiedergegeben. Die potentielle Energie des Modells 021 (ATP021) konvergiert bei  $-1,5 \cdot 10^6$  kJmol<sup>-1</sup>, die Energien der drei anderen Modelle konvergiert bei  $-1,5 \cdot 10^6$  kJmol<sup>-1</sup>,  $-1,7 \cdot 10^6$  kJmol<sup>-1</sup> und  $-1,78 \cdot 10^6$  kJmol<sup>-1</sup>. Alle Modelle, die ohne komplexiertes ATP erstellt wurden konvergieren zwischen  $-1,4 \cdot 10^6$  kJmol<sup>-1</sup> und  $-1,5 \cdot 10^6$  kJmol<sup>-1</sup>.

Bei allen Energieminimierungen erfolgt zunächst ein steiler Abfall der potentiellen Energie, der dann nach einer Anzahl von ca. 500 Schritten (500 ps) abgeflacht ist, so daß im Prinzip keine nennenswerte Energieminimierung mehr stattfand.

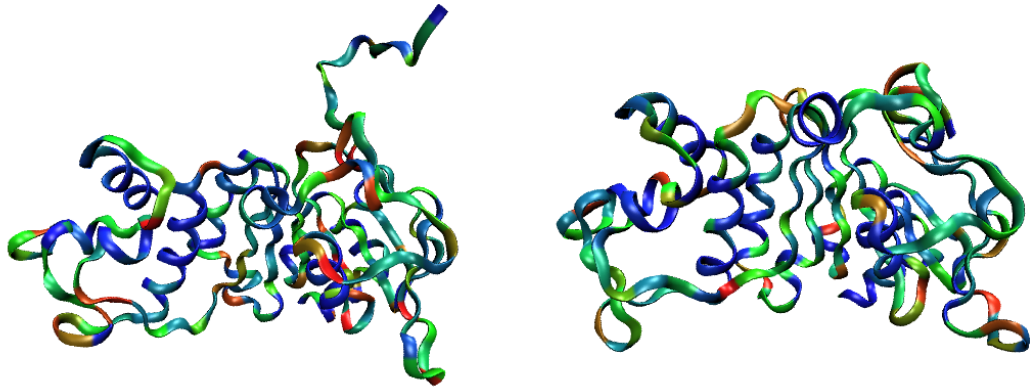
Die optimierten Modelle wurden erneut einer Evaluation unterworfen, deren detaillierte Ergebnisse in 22 abgebildet sind. In Abbildung 22(a) ist jeweils eine anhand der Diederwinkelanalyse gefärbte *ribbonstyle* Darstellung der Modelle 021 (links, ATP nicht abgebildet) und 084 (rechts) abgebildet. Die zugehörigen Ramachandran- Diagramme sind in Abbildung 22(b) dargestellt. Tabelle 10 gibt tabellarische eine Zusammenfassung der Evaluation.

Bereich	mit ATP (ATP)	ohne ATP (AXP)	
	ATP021	AXP075	AXP084
favorisiert	169 (75,8 %)	173 (79,7 %)	174 (80,2 %)
erlaubt	47 (21,1 %)	36 (16,6 %)	36 (16,6 %)
großzügig erlaubt	4 (1,8 %)	5 (2,3 %)	4 (1,8 %)
nicht erlaubt	3 (1,3 %)	3 (1,4 %)	3 (1,4 %)
Modell	Aminosäuren in nicht erlaubten Bereichen		
ATP021	Lys 081, Ala 145, Ala 180		
AXP075	Lys 130, Thr 169, Glu 164		
AXP084	Glu 016, Lys 130, Asp 190		

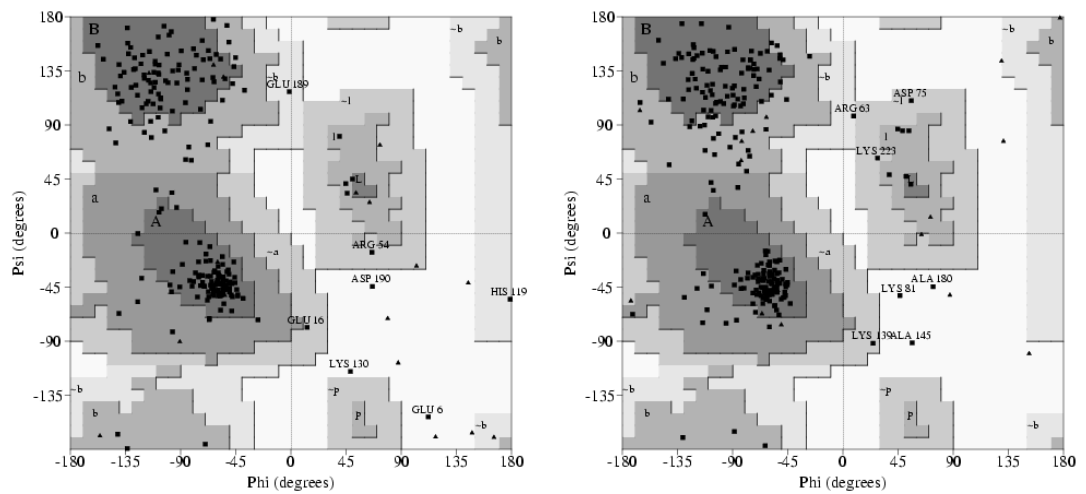
**Tabelle 10:** Zusammenfassung der Evaluation der in einer Wasserbox energieminierten Strukturen

Verglichen mit den  $\Phi/\Psi$ -Torsionswinkeln liegen bei der Simulation in Wasser weniger Torsionswinkel im optimalen Bereich. Die Anzahl der Aminosäuren im Modell verschiebt sich von favorisierten  $\Phi/\Psi$ -Torsionswinkeln zu erlaubten Bereichen. Auch in nicht erlaubten sowie dem großzügig erlaubten Bereichen nimmt die Anzahl der Aminosäuretorsionswinkel zu.

Wie in der dreidimensionalen Darstellung ersichtlich ist, befinden sich die unerlaubten Torsionswinkel in solvens exponierten Loop-Bereichen des Proteinmodells. Im Vergleich zu dem mit MODELLER erstellten Proteinmodell mit ATP befinden sich die nicht erlaubten Torsionswinkel jedoch nicht im zentralen  $\beta$ -Faltblatt-Bereichen im Zentrum des Proteinmodells.



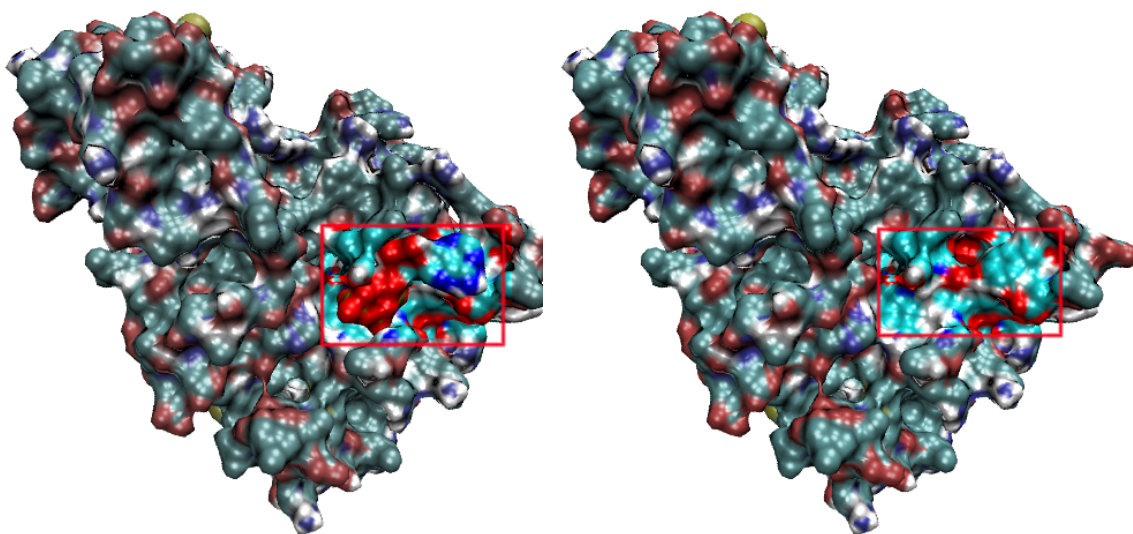
(a) *Ribbonstyle* Darstellung der solvatisierten Proteinmodelle. Die Färbung erfolgte auf Grundlage der Analyse der  $\Phi/\Psi$ -Diederwinkel und ihrer Zuordnung in erlaubte und nicht erlaubte Bereiche. Rot dargestellt sind Aminosäuren mit nicht erlaubten Diederwinkeln. Links ist Modell 021 abgebildet und rechts Modell 084.



(b) Ramachandran-Diagramme der Proteinmodelle 021 (links) und 084 (rechts)

**Abbildung 22:** Analyse der Diederwinkel der solvatisierten Proteinmodelle 021 und 084.

Es wurden die elektrostatischen Eigenschaften der beiden *besten* in Wasser optimierten Proteinmodelle untersucht. Dazu wurden die *Brookhaven Databank* Datei zunächst mit Hilfe des *pdb2pqr* Onlineservers derart modifiziert, daß die Information für Ordnungszahl und Partialladung der Atome hinzugefügt wurde. Die erhaltene *pqr*-Datei kann anschließend mit dem Programm *APBS* eingelesen werden. *APBS* löst die Poisson-Boltzmann Gleichung numerisch. Die verwendeten Steuerdateien, die die verwendeten Dielektrizitätskonstanten enthalten, sind dem Anhang zu entnehmen.



**Abbildung 23:** Darstellung der einer Sonde von 1,4 nm Radius zugänglichen Bereiche (*solvent accessible area*). Die Färbung erfolgt aufgrund des auf dieser Oberfläche berechneten elektrostatischen Potentials (Isosurface). Rot eingrahmt ist die Bindungsstelle von ATP. Links im Bild ist das Modell 021 im Komplex mit ATP gezeigt. Die der Sonde zugänglichen Bereiche wurden jeweils separat für ATP und das Protein berechnet. Rechts ist das Modell 021 ohne komplexiertes ATP gezeigt, um die elektrostatischen Eigenschaften der Oberfläche in Bindungsstelle zeigen zu können.

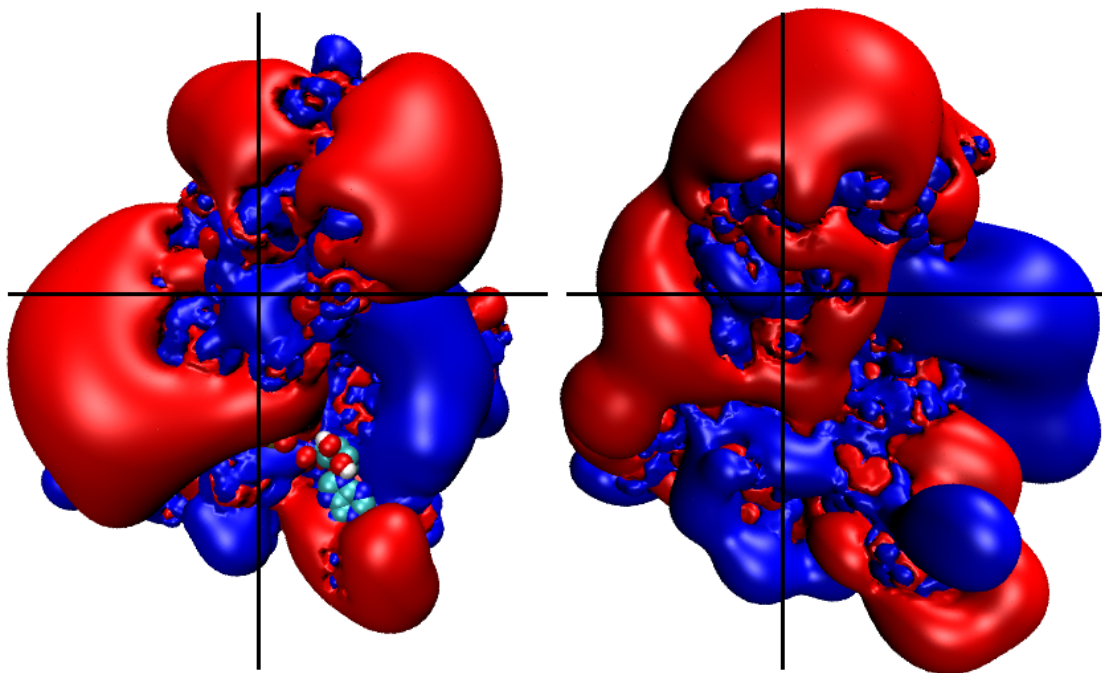
In Abbildung 23 ist das Proteinmodell 021 in einer Isosurface-Darstellung abgebildet. Die Oberfläche des Proteins wurde mit einer Sonde von 0,14 nm Radius getestet und zugängliche Bereiche (sog. *solvent accessible surface*) als Oberfläche dargestellt. Die Färbung erfolgte aufgrund des auf dieser Oberfläche berechneten elektrostatischen Potentials. Um einen besseren Einblick in die Bindungstasche für ATP zu erhalten, wurde in der rechten Abbildung das ATP-Molekül nicht abgebildet. Die Entfernung erfolgte durch Löschung der Koordinaten aus der *Brookhaven*-Datenbank-Datei und anschließender Analyse der elektrostatischen Eigenschaften mit dem Programm *APBS*.<sup>114</sup>

Wie es für den zytosolischen Bereich eines Proteins zu erwarten ist, ist die Oberfläche des Proteins hydrophil. Insgesamt überwiegen die negativ geladenen Bereiche an der Solvenz zugäng-

lichen Oberfläche des Proteinmodells. Eine bevorzugte Verteilung der Ladung ist nicht zu erkennen. Die negative Nettoladung, der Modelle wurde in allen Simulationen durch Natriumionen neutralisiert.

In diese Darstellung wird ersichtlich, daß das ATP-Molekül nicht tief in eine Bindungstasche eingebettet ist, wie es bei vielen Enzymen der Fall ist. Vielmehr ist das ATP-Molekül an das Protein angelagert. Die Wechselwirkung zwischen Proteinmodell und ATP ist zum Teil elektrostatischer Natur über Coulomb-Wechselwirkungen, aber auch durch Wasserstoffbrücken, wie im weiteren Verlauf des Ergebnisteils beschrieben wird. Dies wurde auch für die ATP-Bindungsdomänen anderer Transporter gefunden.

Eine Möglichkeit, das elektrostatische Potential durch den Raum darzustellen, bietet die in der



**Abbildung 24:** Darstellung der Isopotentialflächen der modellierten Proteine in Wasser. Links ist Modell 021 im Komplex mit ATP abgebildet, das bei der Berechnung der Isopotentialfläche nicht berücksichtigt wurde. Rechts abgebildet ist Modell 085. Beide Modelle sind von der gleichen Seite in der gleichen Orientierung abgebildet. Die abgebildete Seite des Proteins enthält die Bindungsstelle für ATP. ATP selbst ist in der *Van der Waals*-Darstellung im Modell links zu erkennen. Die Fadenkreuze sind zur besseren Orientierung zugefügt.

Abbildung 24 gezeigte Darstellung von Isopotentialflächen der in Wasser solvatisierten Proteine, die ebenfalls mit dem Programm APBS berechnet wurden. Es sind jeweils ein Modell mit ATP (links) und ein Modell ohne ATP (rechts) dargestellt. Bei der Berechnung der Potentiale wurde

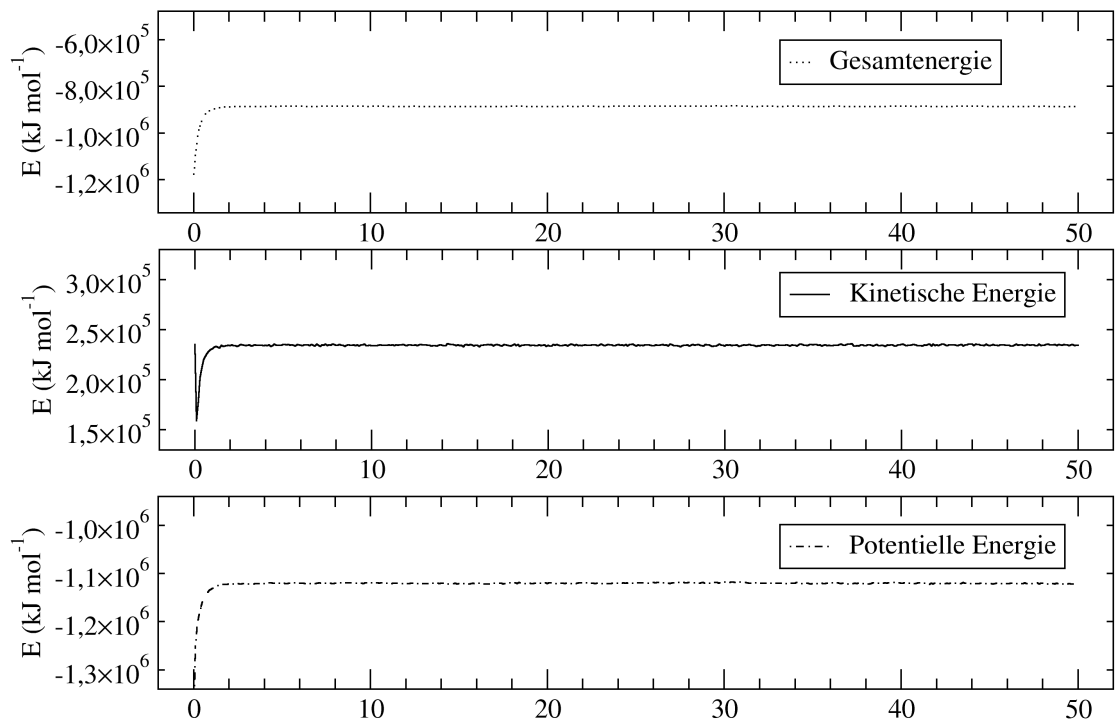
das elektrostatische Potential von ATP nicht berücksichtigt, das Potential des Solvens dagegen wurde in die Berechnung mit einbezogen. Die Modelle sind jeweils von der gleichen Seite abgebildet und besitzen die gleiche Orientierung. Die  $\alpha$ -Helicale Domäne II ist in beiden Modellen »nach oben« ausgerichtet.

Die Unterschiede der Isopotentialwolken offenbaren Unterschiede der elektrostatischen Eigenschaften zwischen den Modellen 021, das ATP gebunden hat und dem Modell 085, das in der ATP-freien Form vorliegt. Die Isopotentialwolken besitzen in beiden Modellen eine unterschiedliche Verteilung. Insbesondere die voluminösen negativen Potentialwolken im Modell mit ATP, die im Quadranten oben-rechts und unten-links zu erkennen sind, sind im Modell ohne ATP weniger stark ausgeprägt. Die positive Potentialwolke an der Grenze des oberen rechten mit dem unteren rechten Quadranten im Modell ohne ATP hat sich im Modell mit ATP zur dargestellten Modellfront verlagert.

### 5.1.5 Zeitabhängige Analysen - Molecular Dynamics

Nach der Solvatisierung der *besten* Proteinmodelle und der anschließenden Energieminimierung wurde eine dynamische Analyse der ATP-haltigen Domäne des Proteinmodells 021 durchgeführt. Im folgenden sind die Ergebnisse der zeitabhängigen Analysen aufgeführt.

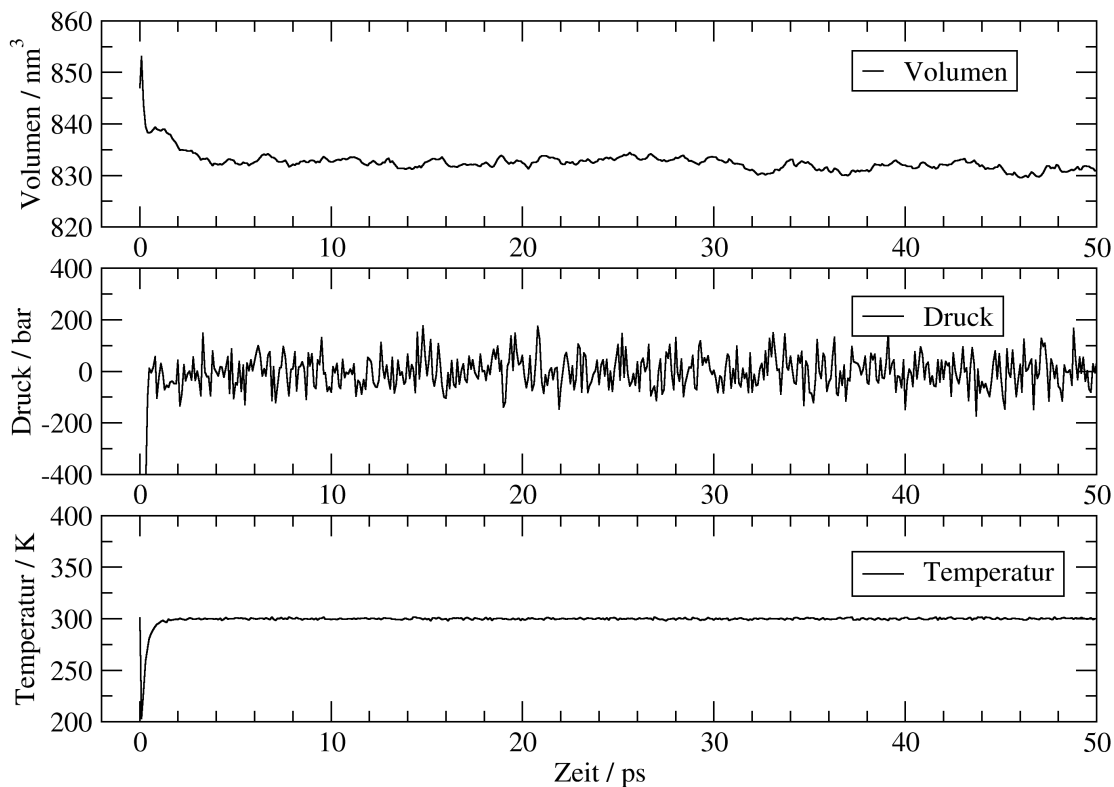
Es wurde eine Simulation über einen Verlauf von 50 ps durchgeführt. Während dieser Zeit wurden keine Einschränkungen definiert. In Abbildung 25 ist der Energieverlauf während der Simulation wiedergegeben. Aufgeführt sind die Gesamtenergie, die kinetische Energie und die potentielle Energie des Systems. Alle Energien streben in den ersten zwei Picosekunden des Simulationsverlaufes einem konstanten Wert entgegen, der dann während der Gesamtlaufzeit der Simulation konstant bleibt. Die kinetische Energie des Systems beträgt ca.  $2,5 \cdot 10^5 \text{ kJmol}^{-1}$ , die potentielle Energie beträgt  $-1,1 \cdot 10^6 \text{ kJmol}^{-1}$  und die Gesamtenergie  $-1,1 \cdot 10^6 \text{ kJmol}^{-1}$  ca.  $-2 \cdot 10^6 \text{ kJmol}^{-1}$ . Die thermodynamischen Daten während des Simulationsverlaufs sind in Abbil-



**Abbildung 25:** Trajektorie der potentiellen, kinetischen und Gesamtenergie der modellierten ATP Bindungsdomäne im Komplex mit ATP über einen Zeitraum von 50 ps.

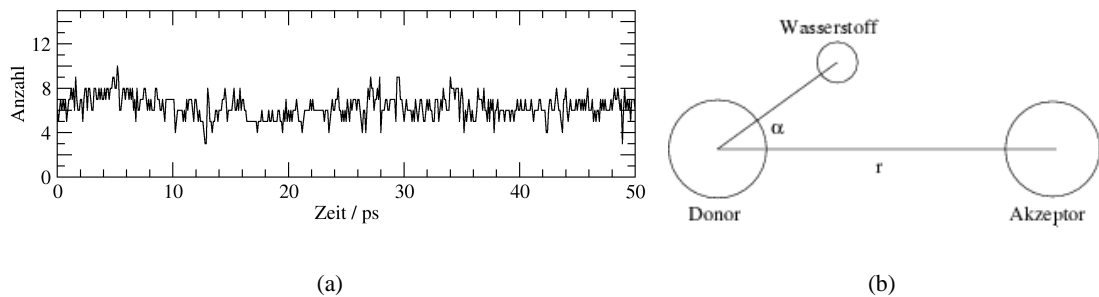
Abbildung 26 wiedergegeben. Auch hier nehmen die Daten nach einer kurzen Equilibrationsphase von 1–2 ps einem konstanten Wert an. Das Volumen pendelt sich nach einer kurzen Fluktuation

bei einem Volumen von  $(833 \pm 2) \text{ nm}^3$  ein und bleibt dann innerhalb dieses Rahmens konstant. Größere Fluktuationen treten bei Drücken auf, die sich um einen Wert von  $1 \pm 100 \text{ bar}$  bewegen. Die Temperatur sinkt innerhalb der ersten Picosekunde zunächst auf einen Wert von 200 K, steigt aber anschließend auf den Sollwert von 300 K an und bleibt während der restlichen Laufzeit der Simulation konstant bei diesem Wert. In Abbildung 27(a) ist die Anzahl der Wasserstoff-



**Abbildung 26:** Trajektorie der thermodynamischen Daten der modellierten ATP-Bindungsdomäne im Komplex mit ATP über einen Zeitraum von 50 ps.

brückenbindungen zwischen ATP und dem Modell 021 im Laufe der 50 ps dauernden Simulation graphisch dargestellt. Zur Bestimmung der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen wurde ein Abstand von maximal 0,25 nm und ein Winkel von  $60^\circ$  verwendet. Die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen fluktuiert während der Simulation zwischen vier und acht und beträgt durchschnittlich sechs. Bei stringenteren Bedingungen zur Berechnung der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen ( $r = 0,225 \text{ nm}$ ;  $\alpha = 120^\circ$ ) werden keine Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ATP und dem Protein gefunden. Wassermolekül vermittelte Wasserstoffbrückenbindung werden bei dieser Berechnung nicht berücksichtigt.



**Abbildung 27:** *a:* Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Proteinmodell 021 und dem komplexierten ATP während der MD-Simulation über einen Zeitraum von 50 ps ( $r \leq 0.35\text{nm}$ ,  $\alpha \leq 30^\circ$ ). *b:* Definition der geometrischen Parameter zur Berechnung von Wasserstoffbrückenbindungen.

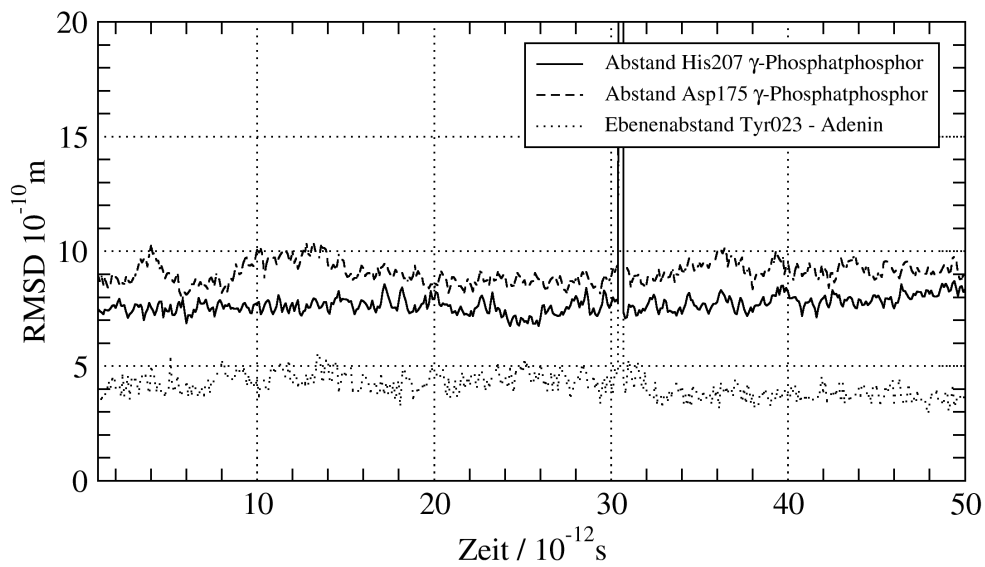
Abbildung 28 gibt Abstände zwischen ausgewählten konservierten Aminosäuren und dem komplexierten ATP im Verlauf der Simulation wieder. Auch hier bleiben die Abstände zwischen den konservierten Aminosäuren und dem Nukleotid während der gesamten Simulation konstant. Der Abstand zwischen dem konservierten Histidin 207 und dem Phosphoratom des  $\gamma$ -Phosphats des ATP beträgt dabei ca.  $7,5 \text{ \AA}$ . Asparaginsäure 175, im Q-Loop der ATP-Bindungsdomäne positioniert, besitzt durchschnittlich einen Abstand von  $9 \pm 1 \text{ \AA}$  zum Phosphor der  $\gamma$ -Phosphatgruppe des ATP. Der Abstand zwischen den Ebenen, die die aromatischen Ringe Tyrosin 23 und des Adenin spannen, beträgt während der gesamten Simulation ca.  $4 \text{ \AA}$ , was dem *Van der Waals* Abstand entspricht. Bei 30 ps erscheint ein Peak, der einen Abstand anzeigt, der über die Skala hinausgeht. Dieser Peak entsteht durch den Austritt beteiligter Gruppen aus der Elementarzelle. Die Simulation wurde mit periodischen Grenzen dieser Zelle durchgeführt, die von der Analysesoftware nicht interpretiert wurden. Der Austritt von Gruppen aus der Zelle auf einer Seite führt zum Eintritt der Gruppe auf der gegenüberliegenden Seite, was zu geänderten Abständen führt. In Abbildung 29 ist die Abweichung von der Ausgangsstruktur im Verlauf der Simulation für ATP sowie für das Proteinmodell graphisch dargestellt. Die Änderung der Struktur wurde als Wurzel der mittleren Fehlerquadrate nach folgender Formel berechnet.

$$RMSD(N; x, y) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N w_i |x_i - y_i|^2}{N \sum_{i=1}^N w_i}}$$

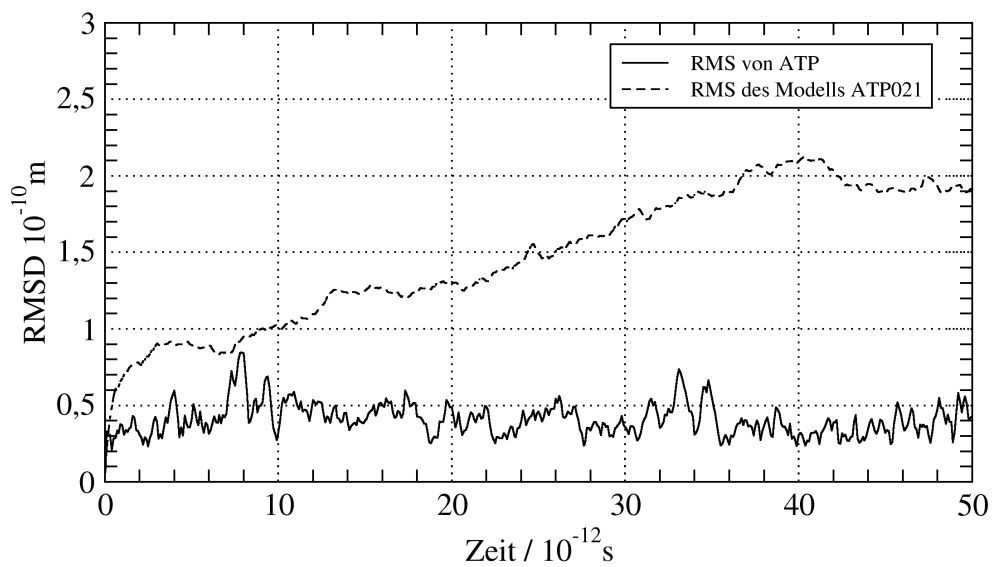
Mit  $N$  gegebenen Atompositionen der Struktur  $x$ , bzw.  $y$  und dem Gewichtungsfaktor  $w_i$ , der zu einer Differenzierung von Wasserstoffatomen und schwereren Atomen führt.

Während die Position der Atome des ATP während der Simulation im Mittel nur ca.  $0,04 \text{ nm}$  abweicht, ändert sich die Struktur des Proteins innerhalb der ersten 40 ps bis auf  $0,2 \text{ nm}$ . Während der letzten 10 ps der Simulation stagniert die Abweichung bei diesem Wert.





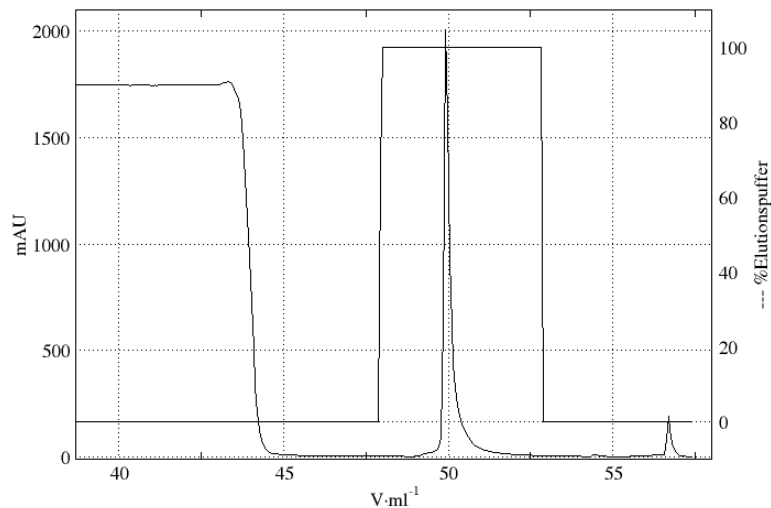
**Abbildung 28:** Ausgewählte Abstände zwischen dem ATP-Molekül und konservierten Aminosäuren der ATP- Bindungsdomäne im Modell 021.



**Abbildung 29:** Änderung der Struktur im Verlauf der Simulation über 50 ps (*Root mean square displacement*, RMSD).

## 5.2 Die Isolierung von ABCC1 und seine Rekonstitution in Proteoliposomen

Die Isolierung von ABCC1 erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe von Affinitätschromatographie an monoklonalem Antikörper des Subtyps IgG<sub>1</sub> aus *Mus musculus* mit der Bezeichnung QCRL-1. Der Antikörper aus Zellkulturüberstand einer QCRL-1 exprimierenden Hybridoma Zelllinie chromatographisch an Protein G aufgereinigt und isoliert. In Abbildung 30 ist das Elutionspro-

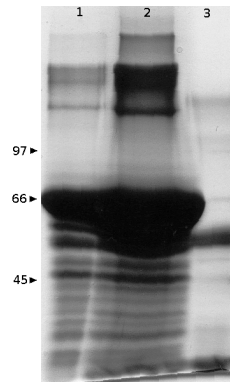


**Abbildung 30:** Fast Performance Liquid Chromatography (FPLC)-Chromatogramm der Antikörperaufreinigung

fil der Affinitätschromatographie der Antikörperaufreinigung an Protein G wiedergegeben. Die Kurve mit dem rechteckigen Verlauf gibt die Konzentration des Elutionspuffers wieder, die andere Kurve gibt die Absorption des Eluats bei einer Wellenlänge von 280 nm in Einheiten von mAU an. Die Säule wurde zunächst jeweils mit 50 ml sterilem Medium des Überstandes der Hybridomakulturen beladen und anschließend mit 5 ml Bindungspuffer gespült, bis die Absorption bei 280 nm auf das Niveau der Basislinie zurückgegangen ist. Bei 46 ml wurde die Elution des Antikörpers mit Hilfe des Elutionspuffers eingeleitet. Der Peak bei 50 ml gibt die Elution des Antikörpers in einem scharfen Peak und in großer Menge wieder.

Es konnten in mehreren chromatographischen Aufreinigungsansätzen aus 450 ml Hybridomazellkultur Mediumüberstand 15 mg Antikörper isoliert werden (Literatur:  $c(\text{IgI}_1)=38 \mu\text{g/ml}$ ). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Bradford und mit Hilfe der  $\text{OD}_{280}$ .

Die gesammelten Fraktionen wurden mit Hilfe eines Dotblotes auf Antikörper getestet und die Antikörper enthaltenden Fraktionen zusammengeführt. Abbildung 31 zeigt ein mit Coomassiebrilliant-blue gefärbtes Gel einer 10%igen SDS-PAGE einer Probe der vereinigten Fraktionen. Die Spuren 1 und 2 wurden mit erworbenen Antikörper beladen und die dritte Spur mit isolier-



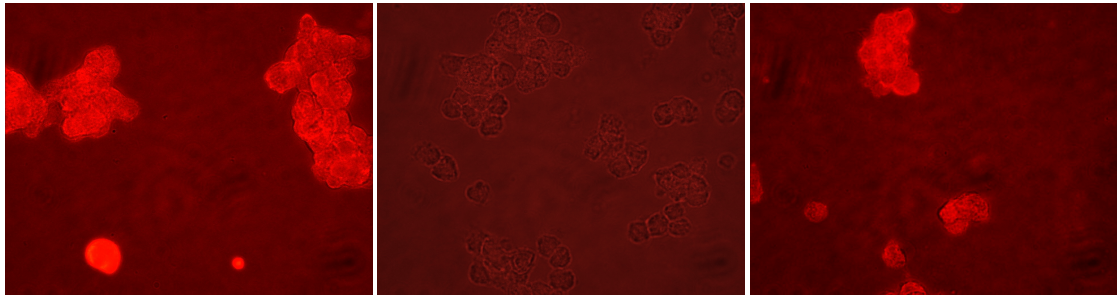
**Abbildung 31:** Coomassiegefärbtes Gel einer 10%igen SDS-PAGE. *Spur 1* und *Spur 2*: 3  $\mu$ l, bzw. 14  $\mu$ l gewerblichen Antikörpers. *Spur 3*: 3  $\mu$ l isolierten Antikörpers.

tem Antikörper vor der Zugabe von BSA. Während in den Spuren 1 und 2 viele Banden mit geringem Molekulargewicht zu finden sind, erscheinen in der dritten Spur zwei deutliche Banden bei ca. 55 kDa und bei ca. 25 kDa.

Der isolierte Antikörper wurde dahingehend überprüft, ob er für Westernblot und Immunfluoreszenzanwendungen geeignet ist. Zu diesem Zweck wurden seine Eigenschaften mit denen des kommerziell erhältlichen Antikörpers verglichen.

Abbildung 32 zeigt den Vergleich der Immunfluoreszenzeigenschaften des gewerblichen und isolierten QCRL-1 in Hinblick auf eine Kontrollmessung (Abbildung 32(b)). Für die positive Kontrolle wurde die gleiche Menge Antikörper verwendet wie im Immunfluoreszenzexperiment mit dem isolierten Antikörper. In Abbildung 32(a) und 32(c) sind sowohl Intensität als auch das Muster der Immunomarkierung equivalent. Die Plasmamembran wird intensiver angefärbt als das Zellinnere. In der Negativkontrolle (Abbildung 32(b)) sind die Zellen zwar schwach zu erkennen, es ist jedoch keine Fluoreszenz detektierbar, die über die Hintergrund-Fluoreszenz in der Positivkontrolle, sowie jener in der Immunfluoreszenzfärbung mit isolierten Antikörper, hinausgeht.

Für die quantitative Isolierung von ABCC1 wurde in dieser Arbeit eine Zelllinie verwendet, die einen erhöhten Expressionslevel von ABCC1 besitzt.<sup>21</sup> Die Zelllinie wurde freundlicherweise von S. P. Cole zur Verfügung gestellt. Um den erhöhten Expressionslevel der verwendeten Zelllinie zu gewährleisten, wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen in Medium kultiviert, das Doxorubicin enthielt. Mit Hilfe von RT-PCR konnte der erhöhte Expressionslevel verifiziert werden. Die Ergebnisse der RT-PCR sind in Abbildung 33 dargestellt. Im linken Teil der Abbildung 33 ist auf der Ordinate die Anzahl der PCR-Zyklen reziprok aufgetragen. Es wurden zwei verschiedene Zellarten (PBCEC und H69AR) verwendet und jeweils die Zyklenzahl für  $\beta$ -Aktin und ABCC 1 bestimmt, um eine gleiche Signalintensität zu erreichen. Durch die reziproke Auf-



(a) Kommerzieller QCRL-1 (Positivkontrolle)

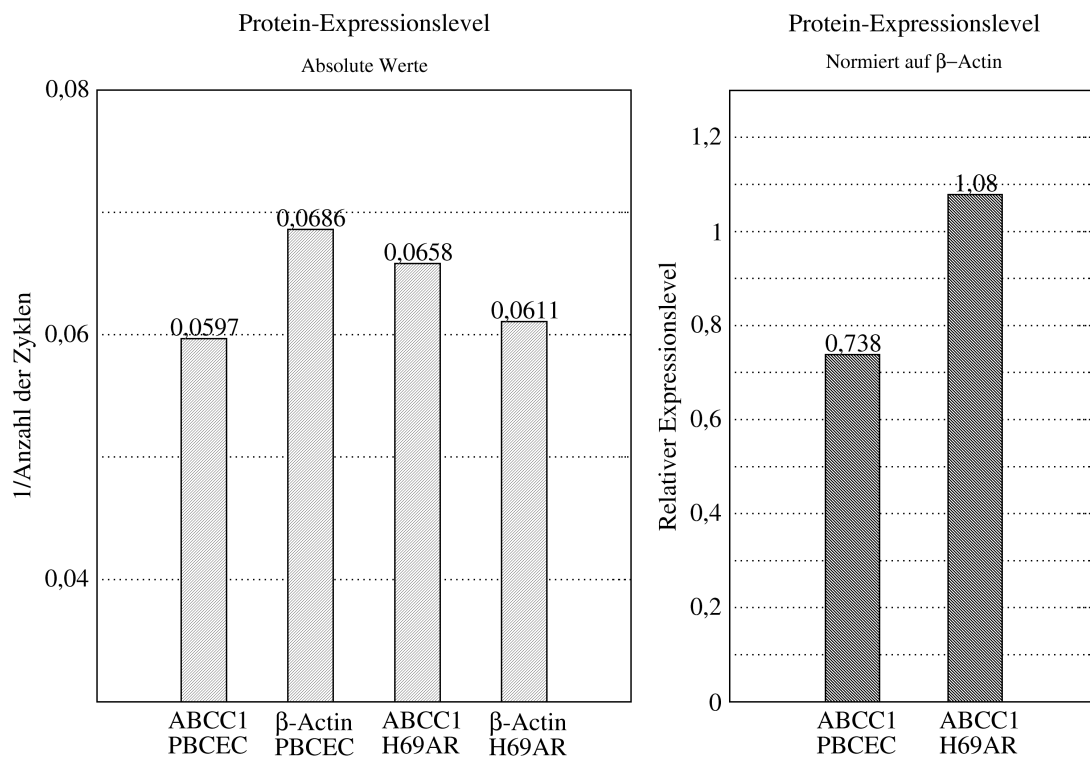
(b) Negativkontrolle

(c) Verwendung von isoliertem QCRL-1

**Abbildung 32:** Immunfluoreszenzexperiment zur Kontrolle der Aktivität des isolierten QCRL-1. Die Zellen wurden auf Poly-L-Lysin fixiert und permeabilisiert und anschließend entweder mit *a*: kommerziell erhältlichen QCRL-1, *b*: ohne Erstantikörper und *c*: mit isolierten QCRL-1 markiert. Nach Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen Maus-Antigen wurde die Fluoreszenz detektiert. Inkubationsdauer und experimentelle Details sind Kapitel 3.2 zu entnehmen.

tragung entspricht ein hoher Wert einem hohen RNA- und somit einem hohen Expressionslevel des betreffenden Proteins.

Rechts in Abbildung 33 ist der Expressionslevel von ABCC 1 normiert auf den Expressionslevel von  $\beta$ -Aktin aufgetragen. Der Expressionslevel von ABCC 1 in H69AR ist um den Faktor 1,4 größer als in PBCEC Zellen.

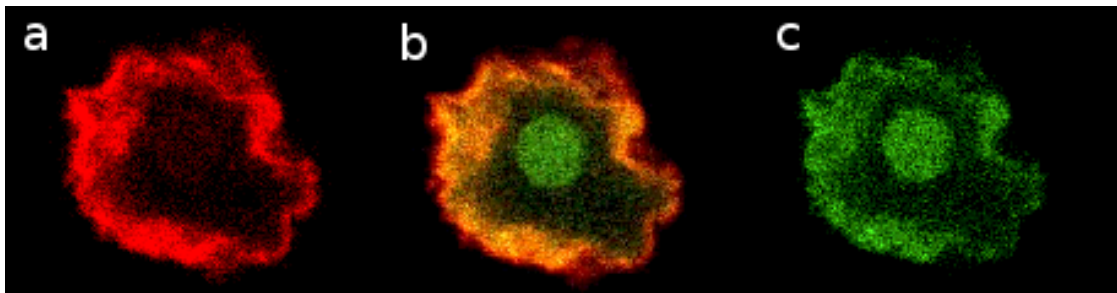


**Abbildung 33:** Quantifizierung der Transkription von ABCC1 mit Hilfe von *Realtime*-PCR. Vergleich der Transkription von ABCC1 in H69AR Zellen und in PBCEC.

### 5.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären Verteilung von ABCC 1 in H69AR Zellen

Die Isolierung von ABCC 1 erfolgte aus der Plasmamembran von H69AR-Zellen. Die in Abbildung 32 gezeigten Fluoreszenzaufnahmen lassen neben dem Auftreten von ABCC 1 in der Plasmamembran auch die Möglichkeit einer Intrazellulären Verteilung offen. Aus diesem Grund wurde die Verteilung von ABCC 1 auch mit mitteln der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) untersucht. Es wurde die intrazelluläre Verteilung von ABCC 1 in unpolarisierten Zellen an immunologisch markierten H69AR Zellen untersucht. Insbesondere wurde neben der bereits gut charakterisierten Lokalisierung von ABCC 1 in der Plasmamembran dieser Zellen auch erforscht, ob eine subzelluläre Verteilung von ABCC 1 vorliegt.

Zu diesem Zweck wurde zunächst eine kombinierte Fluoreszenzfärbung mit unterschiedlichen Fluorophoren verwendet. Zum einen wurde der Zellkern gefärbt und zum anderen ABCC 1 fluoreszenzmarkiert, um die Position des Zellkerns mit ABCC1 markierten Bereichen zu korrelieren. ABCC 1 wurde mit QCRL-1 markiert. Der verwendete Zweitantikörper war TRITC markiert und die Fluoreszenz wurde bei 570–605 nm detektiert. Die Fluoreszenz von PI wurde zwischen 610 nm und 640 nm gemessen. In Abbildung 34 ist das Ergebnis dieser Färbung



**Abbildung 34:** Konfokaler Schnitt durch eine H69AR Zelle. *a:* Immunfluoreszenzfärbung. Es wurde ABCC1 mit QCRL-1 markiert und die Fluoreszenz bei 570–605 nm detektiert. *b:* Überlagerung der detektierten Fluoreszenzen von *a* und *c*. *c* Zellkern- (bzw. DNA-) Färbung mit Propioniodid. Die Fluoreszenz wurde zwischen 610 nm und 640 nm detektiert.

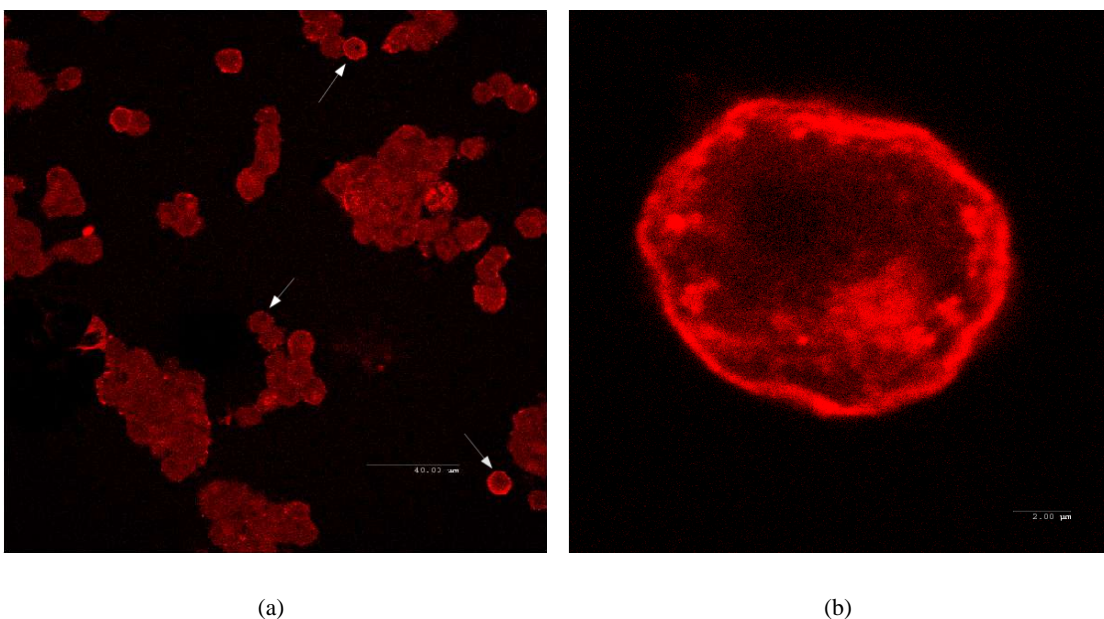
dargestellt. Abbildung 34a zeigt die von TRITC emittierte Fluoreszenz. Es tritt eine deutliche Fluoreszenz der Plasmamembran auf, die sich allerdings auch in Bereiche der Zelle fortsetzt die innerhalb der Zelle liegen. Eine schwache Färbung liegt innerhalb des Zytoplasmas vor.

Abbildung 34c illustriert das Fluoreszenzsignal nach Anregung von PI in grüner Farbe. Neben einer detektierten Fluoreszenz, die mit der detektierten Fluoreszenz in Abbildung 34a korreliert, ist in diesem Fall auch der Kern der Zelle angefärbt worden.

Die Überlagerung der detektierten Fluoreszenzen der Anregung von PI und derjenigen von TRITC ist in Abbildung 34b abgebildet. Eine gelbe Färbung zeigt die Überlagerung von detektierten Fluoreszenzsignalen an. Die Detektion des PI Signals, das grün dargestellt wurde,

überlagert demnach im Bereich des Zellkerns nicht mit dem Fluoreszenzsignal des Farbstoffes TRITC. Der äußerste Bereich der Zelle, der dem Ort der Plasmamembran entspricht, ist in der Abbildung rot gefärbt.

Neben einer kombinierten Fluoreszenzmarkierung, wie sie im vorausgegangenem Abschnitt gezeigt wurde, wurde die Markierung von ABCC 1 auch als einfache Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Diese Messung hat den Vorteil, daß es zu keiner Signalinterferenz zwischen den verwendeten Fluorophoren kommen kann. Abbildung 35 zeigt das Ergebnis der Immunfluoreszenzanalyse mit Hilfe des CLSM. ABCC 1 wurde zunächst mit QCRL-1 markiert; die Detektion des Immunkomplexes erfolgte mit einem TRITC gekoppelten Zweitantikörper. Abbildung 35

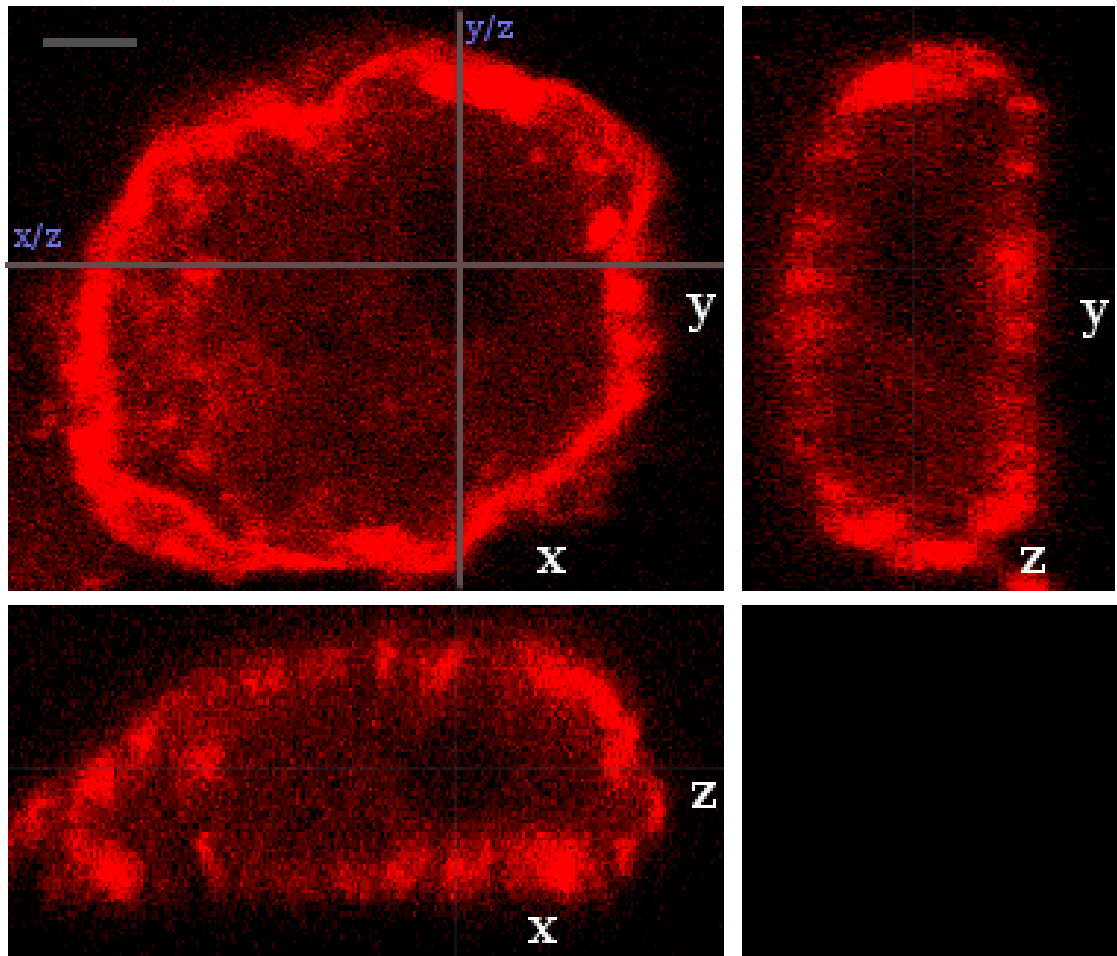


**Abbildung 35:** Immunfluoreszenzaufnahmen von fluoreszenzmarkierten Zellen. ABCC 1 wurde mit QCRL-1 markiert und das Fluoreszenzsignal des FITC-markierten Zweitantikörpers in einer konfokalen Ebene detektiert. *a*: Übersichtsaufnahme, *b*: Detailaufnahme einer einzelnen Zelle.

zeigt einen konfokalen Schnitt durch eine H69AR Zelle. In Abbildung 35(a) ist eine Übersicht über eine größere Anzahl von Zellen zu sehen. Die Zellen liegen nur selten isoliert vor, sondern bilden vielmehr Zellagglomerate. Die Plasmamembran der abgebildeten Zellen ist deutlich markiert und besitzt demzufolge einen hohen ABCC 1-Anteil. Weiterhin tritt neben der Färbung der Plasmamembran auch eine schwächere Färbung intrazellulärer Bereiche auf.

Abbildung 35(b) zeigt einen konfokalen Schnitt durch eine isoliert vorliegende Zelle. Es ist deutlich die intensive Färbung der Plasmamembran zu erkennen. Ebenso deutlich ist auch die

Färbung intrazellulärer Bereiche ersichtlich. Neben Bereichen nahe der Plasmamembran ist das gesamte Zytoplasma schwach markiert worden. Innerhalb des Zytoplasmas liegt ein kreisförmiger ungefärbter Bereich vor. In Abbildung 35(a) sind weitere Zellen mit einem Pfeil markiert, bei denen ebenfalls ein solcher ungefärbter kreisförmiger Bereich vorliegt. Bei höherer Auflösung ist dieses Phänomen auch bei anderen Zellen zu erkennen.



**Abbildung 36:** Konfokaler Schnitt durch eine immunfluoreszenz-gefärbte Zelle. Die Färbung erfolgte gegen ABCC1. Entlang der Bildkanten sind mit den weißen Buchstaben  $x$ ,  $y$  und  $z$  die Achsen des kartesischen Koordinatensystems benannt. In blau sind mit  $x/z$  und  $y/z$  die Schnitte entlang des Fadenkreuzes gekennzeichnet. Die Balkenlänge oben links im Bild entspricht  $2\ \mu\text{m}$ .

In Abbildung 36 ist die Darstellung einer weiteren fluoreszenzmarkierten Zelle dieser Präparation zu sehen. Die Zelle wurde schichtweise mit Hilfe des CLSM kartiert und daraus die



dreidimensionale Verteilung des Fluoreszenzsignals berechnet. Das Bild zeigt zum einen einen konfokalen Schnitt parallel zu x/y-Ebene und zum anderen zwei Längsschnitte entlang der x/z bzw. der y/z-Achse eines kartesischen Koordinatensystems durch die Zelle. Wie in den Schnitten durch die x/z-Achse, bzw. durch die y/z-Achse zu sehen ist, ist die Zelle nicht kugelförmig, sondern abgeflacht. Neben der deutlichen Färbung der Plasmamembran, ist eine geringere Färbung im Zytoplasma zu erkennen. Innerhalb des Zytoplasma wiederum ist ein Bereich ungefärbt, der etwa die Größe eines Zellkerns besitzt (Fadenkreuz). Entlang dieser ungefärbten Region erscheint kein Bereich erhöhter Fluoreszenz, der eine erhöhte Präsenz von ABCC1 in der Kernmembran anzeigen würde.

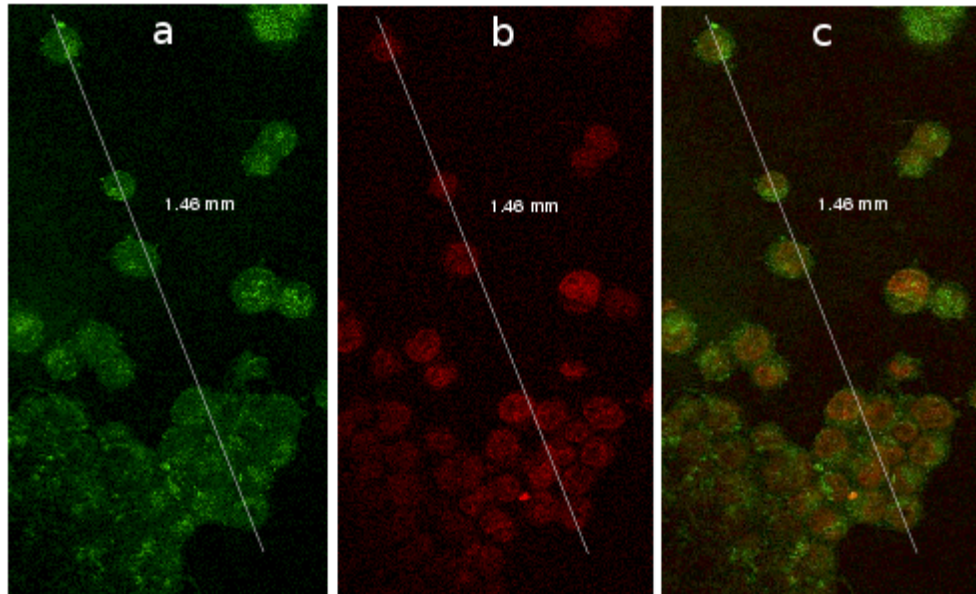
### 5.3.1 Die Verteilung von Doxorubicin in Multidrug Resistenten Zellen

Das Vorkommen intrazellulären ABCC 1 wirft die Frage nach einer möglichen Funktion dieses Proteins innerhalb der Zelle im Gegensatz zu einer ausschließlichen Exportfunktion innerhalb der Plasmamembran auf. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob und wie Doxorubicin, ein Substrat von ABCC 1 mit intrinsischer Fluoreszenz, innerhalb der Zelle verteilt ist.

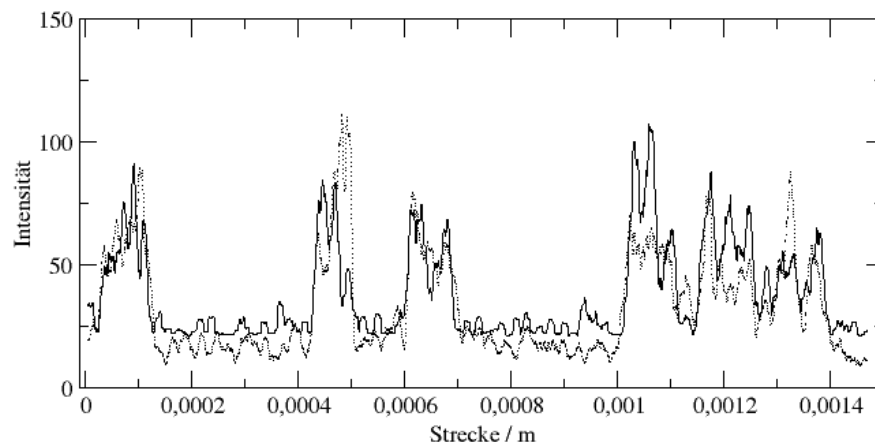
Neben der Analyse der intrazellulären Verteilung von ABCC 1 in permeabilisierten und fixierten Zellen wurde deshalb die Verteilung von Doxorubicin innerhalb der Zelle *in vitro* untersucht. Hiermit wurde die Hypothese überprüft, ob ABCC1 in H69AR neben seiner Exportfunktion in der Plasmamembran auch für eine intrazelluläre Umverteilung seiner Substrate verantwortlich ist.

Abbildung 37(b) zeigt die Fluoreszenzaufnahme von auf Poly-L-Lysin immobilisierten Zellen, die eine halbe Stunde mit Doxorubicin inkubiert wurden. Die Zellen wurden in einem Medium aufgezogen, das kein Phenolrot als pH-Indikator enthielt, da die Eigenfluoreszenz von Phenolrot das Ergebnis verfälschen könnte. Direkt vor dem Experiment wurden die Zellen einmal mit diesem Medium gewaschen. Für die Untersuchung wurden Zellen verwendet, die zuvor in Doxorubicin selektiert wurden. Da eine Fluoreszenzmarkierung intrazellulären ABCC 1 mit Antikörpern ohne Permeabilisierung nicht möglich ist, wurde stattdessen eine Membranfärbung mit dem membranlöslichen Fluoreszenzfarbstoff DiI durchgeführt, um Membranen zu markieren und somit die Zellen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen.

Abbildung 37(a)a zeigt die detektierte Fluoreszenz nach Anregung von Doxorubicin, Abbildung 37(a)b zeigt die gefärbte Membran und Abbildung 37(a)c zeigt das überlagerte Signal. In Abbildung 37(b) ist der Intensitätsverlauf der Fluoreszenz entlang der in Abbildung 37(a)a sowie die Intensität der in Abbildung 37(a)b markierten Linie dargestellt. Die gestrichelte Linie zeigt den Intensitätsverlauf der Intensität von Doxorubicin und die durchgezogene Linie den Verlauf der Intensität der Fluoreszenz von DiI. Der Verlauf der Fluoreszenzstärke entlang der indizierten Linie korreliert zwar, ist jedoch keineswegs identisch mit dem Kurvenverlauf in Abbildung 37(b). Generell steigt die Fluoreszenzintensität in Bereichen, in denen eine Zelle vorliegt sowohl bei dem Fluoreszenzsignal von Doxorubicin als auch bei dem Fluoreszenzsignal des DiI. Die Spit-



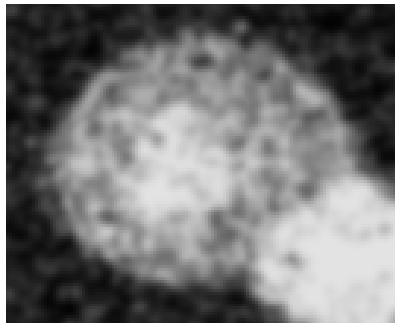
(a) Fluoreszenzaufnahmen von DiI gefärbten H69AR Zellen nach Inkubation mit Doxorubicin. *a* Detektion der Fluoreszenz von Doxorubicin. *b* Detektion der Fluoreszenz von DiI. *c* Überlagerung der Fluoreszenzen von DiI und Doxorubicin.



(b) Intensitätsverlauf der Fluoreszenz entlang der in der linken Abbildung markierten Linie. Die gestrichelte Linie gibt den Intensitätsverlauf der Fluoreszenz von Doxorubicin wieder, die durchgezogene diejenige von DiI.

**Abbildung 37:** Doppelfluoreszenzstudie von nicht fixierten Zellen. Die Aufnahmen fanden nach halbstündiger Inkubation mit Doxorubicin- und DiI-haltigem Medium ohne Phenolrot statt.

zen der Kurven liegen jedoch an unterschiedlichen Positionen der Ordinate.



**Abbildung 38:** Fluoreszenzaufnahme einer Zelle, die mit Curcumin und Doxorubicin inkubiert wurde.

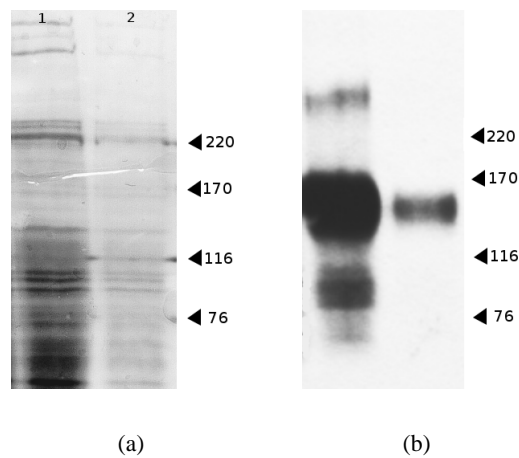
Es wurde überprüft, ob die Inhibierung von ABCC 1 das intrazelluläre Verteilungsmuster von Doxorubicin verändert. Abbildung 38 zeigt eine Zelle, die vor Inkubation mit Doxorubicin, mit Curcumin, einem Inhibitor von ABCC 1 behandelt wurde. Es wurde die Fluoreszenz von Doxorubicin detektiert. Obwohl die gesamte Zelle ist gefärbt, ist innerhalb der Zelle eine intensivere Färbung zu erkennen. Dieses Phänomen ist jedoch nicht bei allen beobachteten Zellen zu erkennen und ein hoher Hintergrund, der bei Messungen dieser Art auftrat, erlaubte keine statistische Analyse. Bei diesem Versuch erwies sich eine Vielzahl von Zellen als nicht vital. Nach Inkubation mit Doxorubicin wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen. Die Aufnahmen erfolgten ca. 15 min nach Inkubation mit Doxorubicin.

#### 5.4 Die Isolierung von ABCC 1

Für die Isolierung von ABCC 1 wurde zunächst die Plasmamembran isoliert, da innerhalb der Plasmamembran der Hauptanteil an ABCC 1 zu finden ist, wie die fluoreszenzstudien gezeigt haben. Die Isolierung der Plasmamembran erfolgte nach mechanischem Aufschluß der Zellen mit Hilfe eines Sucrose-Dichtegradienten durch Ultrazentrifugation.

In Abbildung 39(a) zu sehen ist eine PROTOGOLD gefärbte Membran, nach Transfer der mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine einer isolierten Plasmamembranfraktion. In Abbildung 39(b) ist die Immunfluoreszenzfärbung dieser Membran abgebildet. In Spur 2 der Westernblotanalyse ist eine einzelne Bande unterhalb von 170 kDa zu erkennen. In Spur 2 ist neben einer starken Bande unterhalb von 170 kDa, zusätzlich eine schwache Bande oberhalb von 220 kDa und eine Bande zwischen 76 und 116 kDa entwickelt. Keines dieser Signal bildet eine diskrete Bande, sondern ist vielmehr unscharf, so wie es für hydrophobe Proteine zu erwarten ist. Die Ausbeute an Plasmamembran beträgt bei dieser Vorgehensweise aus einem Gramm Zellen 150 µg Plasmamembran mit einer Proteinkonzentration von 3,7 mgml<sup>-1</sup>. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit einem Bradfordtest.

ABCC 1 wurde mit verschiedenen Methoden aus der Plasmamembran von H69AR Zellen isoliert. In Abbildung 40(a) ist das Ergebnis der Westernblotanalyse der Isolierung von ABCC 1 mit Hilfe von DYNABEADS gezeigt. Für die Isolierung wurde die indirekte Methode (erste Spur in Abbildung 40(a)) sowie die direkte Methode (Spuren 2 und 3 in Abbildung 40(a)) herangezogen. Während bei der direkten Methode ABCC 1 von den DYNABEADS für den Nachweis im Westernblot durch aufkochen in reduzierendem Probenpuffer eluiert wurde, wurde bei der indirekten Methode das Protein durch aufkochen mit nicht reduzierendem Probenpuffer eluiert. In Spur 4 wurde das Ergebnis der direkten Methode nach Strippen der Membran durch Entwick-



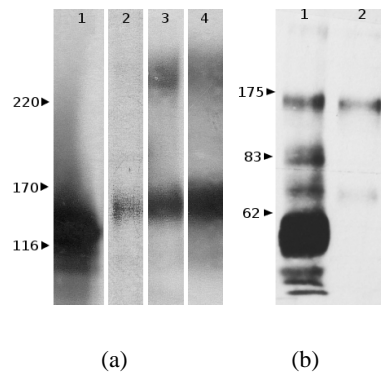
**Abbildung 39:** Westernblotanalyse der isolierten Plasmamembran auf ABCC1. *a:* Protogoldfärbung der geblotteten Membran. *b:* Die Membran wurde mit QCRL-1 in einer Verdünnung 1:1500 für eine Stunde inkubiert. Es wurden 5  $\mu$ l isolierte Plasmamembran in Spur 1, bzw. 1  $\mu$ l isolierte Plasmamembran in Spur 2 aufgetragen. Neben den Abbildungen ist jeweils die Position des Proteinstandards mit dem entsprechenden Molekulargewicht markiert.

lung mit einem alternativen Antikörper (MRP6) verifiziert.

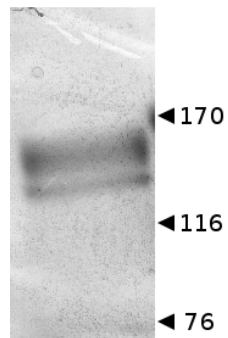
In der ersten Spur ist ein starkes Signal zwischen 100 kDa und 170 kDa zu erkennen. Aufgrund der Stärke des Signals ist keine eindeutige Zuordnung des Signals zu einem Molekulargewicht möglich. Der Mittelpunkt dieser Signale befindet sich bei ca. 150 kDa. In den Spuren 2–4 ist jeweils eine Bande unterhalb von 170 kDa und, verglichen mit dieser Bande, eine etwas schwächere Bande oberhalb von 220 kDa zu erkennen.

In Abbildung 40(b) ist das Ergebnis der Westernblotanalyse der Proteinisolierung mit Hilfe einer Affinitätschromatographie wiedergegeben. Es wurde QCRL-1 kovalent an Protein G gekoppelt. Das gewaschene Kopplungsprodukt wurde mit solubilisierter Plasmamembran inkubiert. Eine gewaschene Probe nach Inkubation mit solubilisierter Plasmamembran wurde in der ersten Spur in Abbildung 40(b) aufgetragen. ABCC 1 wurde durch Inkubation mit einem Heptapeptid eluiert. ABCC 1 wurde durch Filtration durch eine Membran mit einer Ausschlußgröße von 30 kDa vom Heptapeptid getrennt und eine Probe des aufkonzentrierten Proteins in Spur 2 in Abbildung 40(b) aufgetragen.

Sowohl in Spur 1 als auch in Spur 2 sind unterhalb von 175 kDa jeweils eine Bande zu erkennen. Ebenfalls in beiden Bahnen sind schwächere Banden im Bereich oberhalb 300 kDa und bei ca. 70 kDa zu erkennen. Darüber hinaus, sind in Spur 1 verschiedene Banden im niedermolekularen Bereich zu erkennen, von denen eine ein sehr starkes Signal besitzt.



**Abbildung 40:** (a): Westernblotanalyse der Aufreinigung von ABCC 1 mit DYNABEADS. *Spur 1:* indirekte Methode, *Spur 2:* direkte Methode (kurz belichtet), *Spur 3:* direkte Methode (länger belichtet), *Spur 4:* Entwicklung erfolgte mit Erstantikörper MRPm6. (b): Westernblotanalyse der Proteinaufreinigung mit einer Protein G Affinitätschromatographie im *Batch*-Verfahren. *Spur 1:* QCRL-1 an Protein G gekoppelt nach Inkubation mit solubilisierter Plasmamembran isoliert aus H69AR. *Spur 2:* Eluat der Affinitätschromatographie.



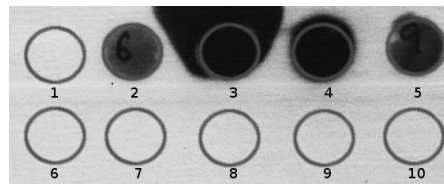
**Abbildung 41:** SDS-PAGE einer Probe aufgereinigten ABCC 1 nach einer alkalischen Silberfärbung des Gels. Es wurden 0,6 µg Protein aufgetragen.

Abbildung 41 zeigt das Ergebnis einer SDS-PAGE mit anschließender alkalischer Silberfärbung einer aufkonzentrierten Probe des isolierten ABCC 1. Kurz unterhalb von 170 kDa sind zwei Banden zu erkennen. Darüber hinaus sind keine weiteren Banden sichtbar, die eine Verunreinigung mit anderen Proteinen anzeigen würden.

Es konnte in mehreren Isolierungen insgesamt 1,3 mg QCRL-1 in reiner Form isoliert werden. Aus einem Gramm Zellen konnten dabei 90 µg ABCC 1 isoliert werden.

## 5.5 Funktionelle Rekonstitution von ABCC 1 in Liposomen

Das isolierte und aufgereinigte Protein wurde mit Hilfe einer Detergenzverdünnung durch Gelfiltration in Vesikel, rekonstituiert. Dazu wurde isoliertes ABCC 1 mit solubilisiertem Lipid (*Bovine Brain Lipid Extract, Fraktion V*) inkubiert und das Detergenz anschließend durch Gelfiltration entfernt. Die trüben Fraktionen des Durchlaufs wurden fraktioniert gesammelt und mit Hilfe einer Dotplot-Analyse auf ABCC 1 getestet. In Abbildung 42 ist das Ergebnis der Analyse gezeigt. Mit Kreisen markiert sind die Orte der Auftragung der unterschiedlichen Eluatfraktionen auf die Membran. Die Entwicklung des Dotblots erfolgte mit dem Antikörper QCRL-1. Die Fraktionen zwei bis fünf enthalten ABCC 1, wie die Schwärzung des Photofilms anzeigt. Diese Fraktionen sind die getrübbten Fraktionen des Eluats.

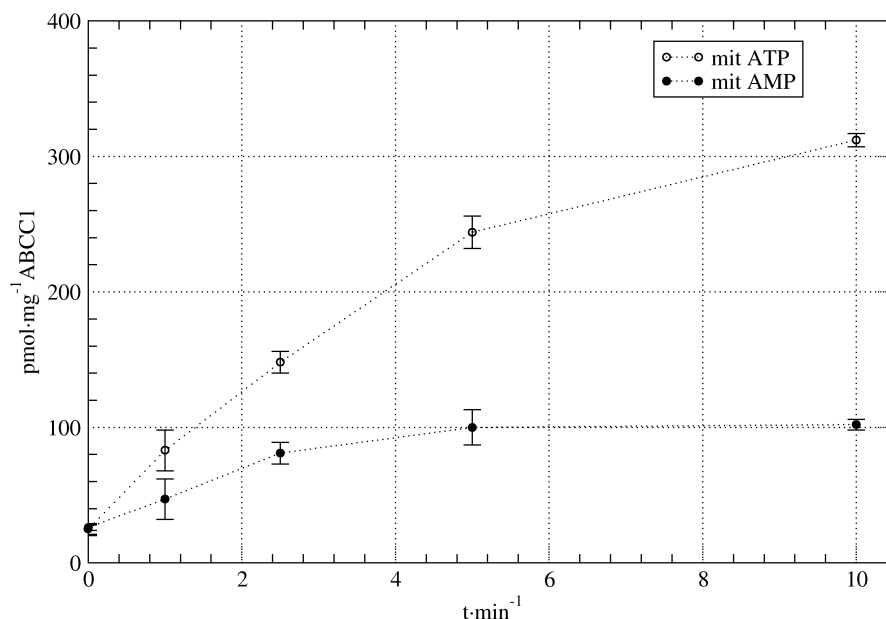


**Abbildung 42:** Dotplot-Analyse der Rekonstitution des aufgereinigten ABCC1 in Vesikel. Das Eluat der Gelfiltration wurde fraktioniert gesammelt und jeweils ein Volumen von 20 µl auf eine Membran appliziert. Die Kreise zeigen den Ort der Auftragung der Probe auf die Membran an. Die Schwärzung des Photofilms, die ABCC 1 anzeigt, korreliert mit den vesikelhaltigen Fraktionen des Eluats.

### 5.5.1 ATP-abhängige Aufnahme von LTC<sub>4</sub>

Die Isolierung von Membranproteinen ist ein schwieriges Unterfangen, da das Protein bei der Isolierung im allgemeinen aus seiner Membranmatrix gelöst werden muß. Dabei besteht die Gefahr, daß das Protein an Aktivität verliert oder seine Funktionalität einbüßt. Aus diesem Grund wurde die Aktivität des Proteins bezüglich seiner Transportleistung nach Rekonstitution in Vesikel überprüft.

Zu diesem Zweck wurden Proteoliposomen mit [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> inkubiert. Zu bestimmten Zeiten wurde jeweils ein Aliquot Vesikel entnommen. Die Vesikel wurden von freiem [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> mit Hilfe einer durch Zentrifugation beschleunigten Gelfiltration getrennt und die Radioaktivität der so *gewaschenen* Vesikel durch einen Scintillationstest bestimmt. Die gemessene Radioaktivität wurde in eine Stoffmenge umgerechnet und die transportierte Stoffmenge [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> normiert auf ABCC1-Gehalt gegen die Zeit aufgetragen. Zur Kontrolle wurde das gleiche Experiment an Stelle von ATP mit AMP durchgeführt. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abbildung 43 zu sehen. Die Unsicherheit des Meßwertes wurde aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt. Sowohl die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> in Anwesenheit von ATP als auch die Aufnahme des ra-



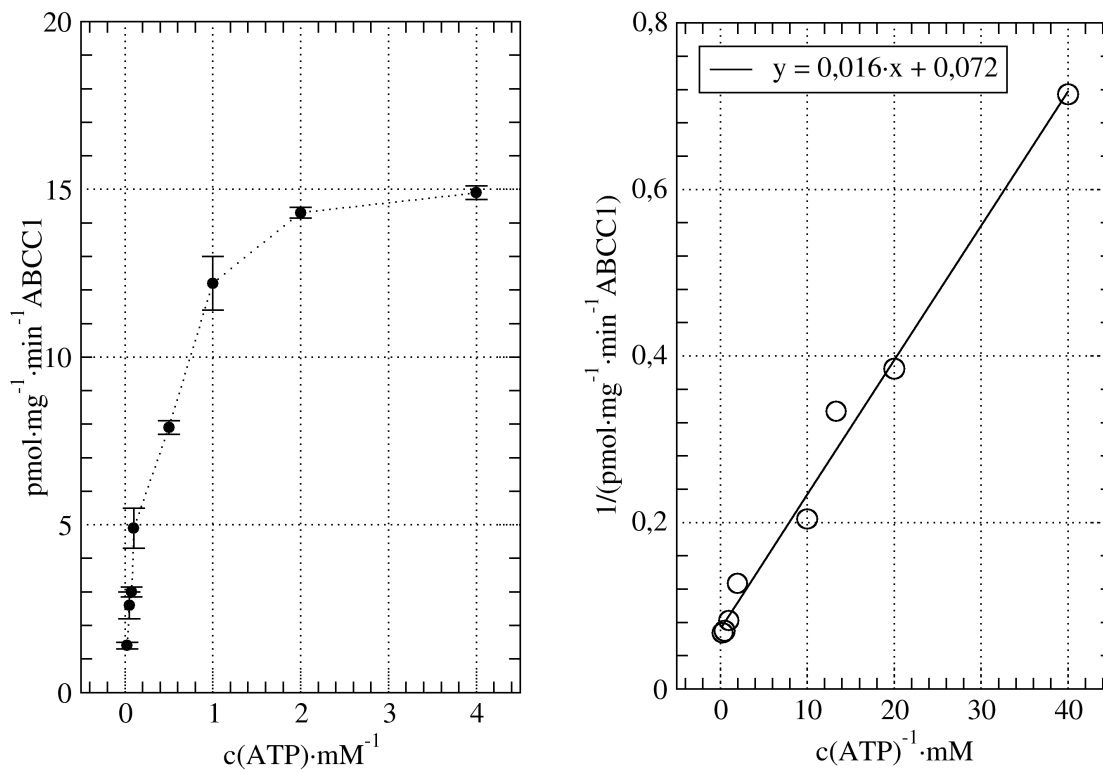
**Abbildung 43:** Zeitabhängige Aufnahme von HLTC<sub>4</sub> in Gegenwart von ATP, bzw. AMP in Proteoliposomen. Die ABCC1 enthaltenden Liposomen wurden mit 50 nM [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, Nukleotid (ATP, bzw. AMP), 10 mM Kreatinphosphat und 100 g/ml<sup>-1</sup> Kreatinkinase bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurde jeweils eine Probe von 20 µl entnommen, in eiskaltem Transportpuffer verdünnt und sofort auf Spincolumns zur Gelfiltration überführt. Die Radioaktivität des Durchlaufs wurde bestimmt und die Stoffmenge transportieren Substrats berechnet.

radioaktiv markierten Substrats in Anwesenheit von AMP in die Proteoliposomen nimmt über die Zeit zu. Allerdings nimmt der Gehalt an Radioaktivität in der ATP-haltigen Probe stärker zu. Über einen Zeitraum von 10 min scheint die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> noch nicht in einen Sättigungszustand übergegangen zu sein.

Um die ATP-abhängigkeit der Transportes des isolierten ABCC 1 zu zeigen, wurde zudem die Transportleistung von rekonstituiertem ABCC 1 in Abhängigkeit der ATP-Konzentration untersucht. Dazu wurden die ABCC 1-haltigen Proteoliposomen bei unterschiedlichem ATP-Gehalt für jeweils 10 min inkubiert und wie bereits beschrieben von freiem [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> getrennt, die Radioaktivität bestimmt und in eine Stoffmenge umgerechnet. Die Stoffmenge des in die Proteoliposomen transportierten [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> wurde normiert auf ABCC 1 gegen die eingesetzte Konzentration von ATP aufgetragen. Dabei wurde die Differenz der Aufnahme mit ATP und der Aufnahme mit AMP zugrunde gelegt.

Bei kleinen ATP-Konzentrationen ist die innerhalb von 10 min aufgenommene Menge an radioaktivem Substrat geringer, als bei größeren ATP-Konzentrationen. Im Bereich einer Konzentration von 4 mM ATP ist die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> am schnellsten. In der doppelt-reziproken Auftragung wird dieser Trend deutlich wiedergegeben. Neben einer Auftragung des in 10 min transportierten [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> gegen die ATP-Konzentration wurde auch eine doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk gewählt. In dieser Darstellungsweise liegt der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Ordinate bei  $72 \cdot 10^{-3}$  mg min / pmol. Das entspricht einem Wert von  $V_{max}$  von 13 pmol / min / mg ABCC 1. Der Wert für  $K_m$  beträgt 0,22 M. In Abbildung 44 ist das Ergebnis der Untersuchung der ATP-abhängigkeit zu finden.





**Abbildung 44:** ATP-Abhängigkeit der HLTC<sub>4</sub> Aufnahme durch ABCC 1 Proteoliposomen: Die Aufnahme von HLTC<sub>4</sub> wurde als Funktion der ATP Konzentration ermittelt. Die HLTC<sub>4</sub> -Aufnahme wurde in Gegenwart von 25 μM ATP bis 4 mM ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 nM HLTC<sub>4</sub> und dem ATP regenerierendem Kreationphosphat/Kreatinkinase System über einen Zeitraum von 10 min inkubiert.



## 6 Diskussion

### 6.1 Die Modellierung der C-terminalen ATP-Bindungsdomäne von ABCC 1

*Homology Modelling* spielt bei der Untersuchung von *Multidrug*-Transportern eine wichtige Rolle, denn trotz einer Vielzahl an biochemischen und strukturellen Daten aus der Strukturauflösung verschiedener Mitglieder der ABC-Familie liegen die molekularen Details des Transportmechanismus weitgehend im Dunkeln. Homologiebasierte Strukturerstellung von Proteinen hat in der Vergangenheit und wird auch in Zukunft wertvolle Ansatzpunkte für Experimente liefern und Vorschläge für mögliche Transportmechanismen bringen.<sup>115</sup>

Erst kürzlich wurden die Transmembrandomänen von ABCC 1 modelliert und Vorhersagen über Aminosäuren, die für den Substrat-Transport wichtig sind, konnten experimentell bestätigt werden.<sup>94,95</sup> Dieses Beispiel zeigt, daß die Kombination aus biochemischen Experimenten und *in silicio* Analysen ein mächtiges Werkzeug ist, daß bei der Auflösung des Transportvorganges von *Multidrug*-Transportern helfen kann.

Während die Transmembrandomänen der Überfamilie der ABC-Transporter große Unterschiede in ihrer Sequenz aufweisen, offenbaren ihre ATP-Bindungsdomänen einen hohen Grad an sequenzieller und struktureller Konservierung. Die ATP-Bindungsdomänen enthalten viele konservierte Sequenzmotive,<sup>116,117</sup> wie die Walker A und B Motive, die ABC-Signatursequenz und zwei kürzere Sequenzen, die ein konserviertes Glutamin (Gln-Loop) und Histidin (His-Loop) enthalten.

Im Gegensatz zu den Transmembrandomänen sind die ATP-Bindungsdomänen zum einen stärker konserviert und zum anderen im zytosolischen Bereich lokalisiert und nicht in die Membran eingebettet. Beides sind gute Voraussetzungen, um diese Domänen zu modellieren. ABCC 1 ist ein Transporter, der sich trotz vieler Gemeinsamkeiten doch in vielerlei Hinsicht von ABCB 1 (P-gp) unterscheidet. Beide Transporter besitzen ein unterschiedliches, wenn auch überlappendes Spektrum transportierter Substanzen. Im Gegensatz zu ABCB 1 ist der Transport vieler Substrate durch ABCC 1 abhängig von GSH.

Während für die ATP-Bindungsdomänen von ABCB 1 von einer Äquivalenz ausgegangen wird, gibt es Hinweise darauf, daß dies für die ABC-Bindungsdomänen von ABCC 1 nicht zutrifft.<sup>118–120</sup> ABCB 1 besitzt zwei ATP-Bindungsdomänen, die funktionell äquivalent sind. ATP-Hydrolyse findet abwechselnd in beiden Domänen statt.<sup>121,122</sup>

Auch beide ATP-Bindungsdomänen von ABCC 1 sind in der Lage ATP zu binden.<sup>123–125</sup> Dennoch agieren beide Bindungsdomänen in unterschiedlicher Weise. Die Bindung allein von ATP an die N-terminale ATP-Bindungsdomäne (NBD1) von ABCC 1 führt bei 37 °C zu einer Konformationsänderung des Proteins. Für diese Konformationsänderung ist das  $\gamma$ -Phosphat des ATPs von entscheidender Bedeutung. Die Bindung von ATP an die NBD1 führt dazu, daß verstärkt ADP in der C-terminalen ATP-Bindungsdomäne abgefangen und nachgewiesen werden kann. Bindung von ADP an die NBD1 verstärkt wiederum die Bindung von ATP an die N-terminale

ATP-Bindungsdomäne.<sup>119,126</sup>

Es ist derzeit nicht bekannt, was mit dem an der *N*-terminalen ATP-Bindungsdomäne gebundenen ATP nach Hydrolyse von ATP an der *C*-terminalen Bindungsdomäne geschieht. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß die Entlassung von ATP aus der Bindungsdomäne, entweder nach Hydrolyse oder in Form von ATP, die Ausgangskonformation wieder herstellt.<sup>126</sup>

In dieser Arbeit wurde der Effekt von ATP auf die Struktur der *C*-terminalen ATP-Bindungsdomäne untersucht. Um den Effekt der Bindung von ATP an diese Domäne zu untersuchen, wurde ein Komplex mit ATP sowie ein Modell ohne ATP erstellt. Es wurde der Komplex mit ATP und nicht der Komplex mit ADP gewählt, um die Bindung von ATP an diese Domäne zu simulieren und nicht den Effekt der ATP-Hydrolyse auf Konformationsänderungen. Der katalytische Zyklus, der zudem nicht mit moleküldynamischen Berechnungen zu erfassen ist, besteht aus der Bindung von ATP, seiner Hydrolyse und der Freisetzung von anorganischem Phosphat mit anschließender Dissoziation von ADP vom Komplex. Biochemische Daten sprechen dafür, daß die Hydrolyse von ATP und die Freisetzung von Phosphat relativ schnelle Prozesse in diesem Zyklus sind.<sup>127</sup> Aus diesem Grund sind entweder die Bindung des Nukleotids oder die ADP-Dissoziation der Geschwindigkeits-bestimmende Schritt des Zyklus.

### 6.1.1 Die Modellierung der *C*-terminalen ATP-Bindungsdomäne.

Verschiedene Faktoren sind bei der Auswahl der Templates in Betracht gezogen worden. Zunächst steigt die Qualität mit der Sequenzübereinstimmung mit der Zielsequenz und sinkt mit der Anzahl und Länge der Lücken der Sequenzüberlagerung. Die einfachste Auswahlregel ist die Wahl einer Templatesequenz, die die beste Übereinstimmung mit der Zielsequenz besitzt. Da die Proteinfamilie, der sowohl Ziel als auch Templateprotein angehört, oft in Sub-Familien aufgeteilt werden kann, ist die Konstruktion von *Multiple Alignments* und einem phylogenetischen Stammbaum oft hilfreich, um die Sequenz zu finden, die mit der Zielsequenz am engsten verwandt ist.<sup>128</sup>

Von den erhaltenen homologen Proteinen wurden die Sequenzen ausgewählt, die eine bekannte dreidimensionale Struktur und eine hohe Wahrscheinlichkeit besitzen, der gleichen Proteinfamilie anzugehören. Bewertet wurde diese Wahrscheinlichkeit auf Basis des E-Wertes. Der E-Wert (Erwartungswert) spiegelt den Grad der Übereinstimmung des Zielproteins mit dem Protein von Interesse auf Grundlagend der Sequenzübereinstimmung wieder. Dabei wird eine Übereinstimmung identischer Aminosäuren höher bewertet die Übereinstimmung mit ähnlichen Aminosäuren. Der E-Wert hängt somit von der Gesamtlänge der übereinstimmenden Sequenz ab. Die Größe des E-Wertes korreliert reciprok mit der Ähnlichkeit der Sequenzen. Proteine mit gemeinsamen evolutionären Stammbaum besitzen Werte kleiner als 0,02.<sup>99</sup> Bei Werten kleiner als  $10^{-30}$  kann auf eine strukturellen Verwandtheit geschlossen werden.<sup>129</sup> Eine bekanntere Vergleichsmethode für zwei Sequenzen ist die prozentuale Sequenzübereinstimmung. Diese Se-

quenzübereinstimmung beträgt bei den verwendeten Template-Strukturen mehr als 30 %.

Weiterhin muß die Ähnlichkeit der *Umgebung* der zu vergleichenden Protein in Betracht gezogen werden. Der Begriff *Umgebung* zielt dabei auf Wechselwirkungen, die nicht das Protein allein betreffen, wie z. B. pH-Wert, Liganden, Lösungsmittel usw. ab.

Zur Modellierung des Proteins wurde zudem berücksichtigt, ob das Protein im Komplex mit oder ohne Nukleotid vorliegt. Zur Modellierung eines ATP-haltigen Komplexes wurde folglich eine Struktur verwendet, die ATP enthält. Zur Modellierung einer *freien* ATP-Bindungsdomäne wurden nur Vorlagen verwendet, die frei von Nukleotiden kristallisiert wurden.

Aus den genannten Gründen wurde als Grundlage zur Modellierung des *freien* Proteins die ATP-Bindungsdomäne des Haemolysin B aus *E. coli* verwendet und für die Modellierung des Protein-ATP-Komplexes wurden die Strukturen der Proteine LmrA und MsbA verwendet<sup>48,130–132</sup>. Alle drei Strukturen gehören der ABC-Transporter-Überfamilie an und sind damit homologe Proteine zu ABCC 1.

Es ist bekannt, daß für die Hydrolyse von ATP ein divalentes Ion, meist Magnesium(II), benötigt wird. Da hier der Effekt der Bindung von ATP an die Teilstruktur von ABCC 1 untersucht wird und die Hydrolyse von ATP prinzipiell nicht von den hier verwendeten Methoden zu erfassen ist, wurden alle Modelle ohne Magnesium(II) erstellt. Die Möglichkeit, daß Magnesium(II) eine Rolle bei Konformationsänderungen des Proteins spielen könnte, wird dabei jedoch nicht außer acht gelassen.

Die Qualität der experimentell bestimmten Templatestruktur ist ein weiterer wichtiger Faktor bei der Templateauswahl. Die Auflösung, der kristallographische R-Faktor und die Anzahl der Einschränkungen pro Aminosäure bei NMR-Strukturen sind hier ein Maß für die Qualität des Templates.

Von den homologen Proteinen wurden die Strukturen ausgewählt, deren Struktur mit einer Auflösung besser als 3,8 Å gelöst werden konnten.

Die Sequenzen der Zielstrukturen wurden untereinander und mit der Sequenz der C-terminalen ATP-Bindungsdomäne von ABCC 1 verglichen und die Sequenzen aufeinander abgestimmt (*Sequence Alignment*). Für die Erstellung eines Modells im Komplex mit ATP wurden die Sequenzen der ATP-Bindungsdomäne des Proteins Haemolysin B aus *E. coli* und die ATP-Bindungsdomäne von MsbA aus *Vibrio cholera* mit der C-terminalen ATP-Bindungsdomäne von ABCC 1 verglichen und abgestimmt. Für ein Modell der C-terminalen ATP-Bindungsdomäne im Komplex mit ATP wurde die Sequenz mit der Sequenz der Proteins LmrA verglichen und aufeinander abgestimmt.

Alle Sequenzen weisen die für ABC-Transporter typischen Signatursequenzen auf.<sup>133</sup> Der Sequenzabgleich liefert in allen Fällen eine Überlagerung dieser typischen Sequenzen über alle verglichenen Primärstrukturen hinaus. Merkmale der ATP-Bindungsdomäne, die für die katalytische Funktion von Bedeutung sind, stimmen somit in ihrer Position überein. Weiterhin sind weite Bereiche der Sequenz identisch oder semikonserviert, d. h. konserviert bezüglich der

Aminosäure-Eigenschaften wie Acidität/Basizität, dem aromatischen Charakter und/oder ihre Größe. Zwischen den Signatursequenzen befinden sich ausschließlich kurze Bereiche, in denen keine (Semi-)Konservierung der Sequenzen vorliegt.

Die gute Entsprechung der Sequenzen und die Tatsache, daß keine größeren Sequenzlücken bei der Abstimmung vorliegen, spricht dafür, daß die Templates korrekt aufeinander abgestimmt wurden und als Grundlage für die Modell-Erstellung geeignet sind.<sup>96</sup> Dies ist eine bemerkenswerte Tatsache, da die Qualität der Sequenz-Abstimmung sich direkt auf die Qualität des Modells auswirkt (siehe unten).<sup>128</sup>

Eine schwierige Aufgabe ist die Beurteilung der Qualität eines Modells. Ein Modell wird als falsch angesehen, wenn Teile seiner Struktur bezogen auf den Rest des Makromoleküls falsch platziert sind. Dies träfe bei einem Modell zu, in welchem zwei  $\alpha$ -Helices die falsche Orientierung zueinander besitzen. Ein solches Modell muß jedoch nicht zwangsläufig auch stereochemische Kriterien verletzen.<sup>128</sup> Eine Möglichkeit, diesen Fehler zu quantifizieren, würde die Analyse der Koordinaten des Proteins auf Basis einer Fehlerabweichung bieten. Ein akkurates Modell darf nicht mehr als 0,5 Å von der Struktur einer Kontrollstruktur abweichen<sup>92</sup>. Da eine solche Kontrollstruktur jedoch nicht vorhanden ist, ist eine solche Kontrollmöglichkeit für die Struktur meist nicht gegeben. Zum anderen sind flexible Gruppen in für die Aktivität eines Proteins nicht relevanten Bereichen oft der Grund für einen erheblichen Fehler. Aus diesem Grund kann die Fehlerabweichung nicht ausschließlich als Maß für die Genauigkeit eines Modells verwendet werden.

Ein weitere Quelle für Ungenauigkeiten des Modells sind Abweichungen von idealen stereochemischen Werten für Bindungslängen und Winkel. Allerdings liefert auch solch ein Modell, daß die experimentell bestimmten Bindungslängen und Winkeln erfüllt, nicht zwangsläufig ein korrektes Modell. Eine Aminosäurekette, die keine Sekundärstruktur besitzt, kann durchaus stimmige Bindungswinkel und Längen besitzen und dennoch keine biologisch relevante Funktion besitzen. Nur ein Modell, daß biologisch relevant einzustufen ist, kann als korrekt angesehen werden.

Die Genauigkeit eines Modells wird insbesondere durch die Qualität des *Sequence Alignment* beeinflusst. Ist die Übereinstimmung in einigen Regionen falsch, wird auch das die Anordnung dieser Aminosäuren in diesem Bereich falsch sein. Aus diesem Grund ist die Genauigkeit eines Modells auch direkt beeinflusst durch die Übereinstimmung der homologen Sequenzen.

Darüber hinaus ist die Qualität der Templatestruktur von entscheidender Bedeutung. Ein Modell, daß durch auf Vergleich basierenden Methoden entstand, kann nicht genauer sein, als die Differenz zwischen einer mit NRM und einer kristallographischen Methoden gelösten Struktur des gleichen Proteins. Dieser Unterschied liegt im Bereich von 1–1,5 Å.<sup>134</sup>

Nahezu jedes Protein besitzt nicht konservierte Loops. Diese Loops sind die am wenigsten verlässlichen Bereiche bei der Modellierung. Tatsächlich weichen diese Strukturen auch bei experimentell bestimmten Strukturen voneinander ab. In vielen Fällen sind diese Loops jedoch auch sehr flexible Bereiche, wie aus dem kristallographischen Temperaturfaktor oder multiplen Lö-

sungen in NMR-Experimenten zu lesen ist.

Es liegt in der Natur eines Modells, daß es Fehler aufweisen wird. Ebenso weist ein Modell jedoch auch Merkmale auf, die helfen, experimentelle Ergebnisse zu deuten und die hilfreich bei der Planung neuer Experimente sind. Für Proteine und andere Moleküle kann es nicht nur *die eine* richtige Lösung geben, da Proteine dynamische und flexible Strukturen sind, denen ein starres Modell nicht gerecht wird. Ein Protein besitzt einen nahezu unbegrenzten Konformationsraum, wobei verschiedene Konformationen in Abhängigkeit von Energie und Temperatur nach Boltzmann populiert sind. Die Schwierigkeit, die es zu meistern gilt, ist die Auswahl eines repräsentativen Modells, mit dessen Hilfe man in der Lage ist, experimentelle Befunde auf der einen Seite zu deuten und auf der anderen Seite Hypothesen aufzustellen, die es mit weiteren Experimenten zu beweisen gilt.

Die in dieser Arbeit erstellten Modelle wurden durch das Programm MODELLER erstellt. MODELLER nutzt zur Modell-Erstellung eine auf Homologie basierende Methode, die ein Modell durch Satisfaktion räumlicher Einschränkungen berechnet. Eine Implementierung zur Parametrisierung von Heteroatomen, die nicht in Aminosäuren vorkommen, erlaubt MODELLER, Proteinstrukturen zu erstellen, die Heteroatome enthalten.<sup>103,135,136</sup>

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit jeweils 150 Strukturen mit, sowie 150 Strukturen ohne ATP erstellt. Die erstellten Strukturen sind, wie zu erwarten, nicht identisch. Vielmehr variiert die *Spur* der  $\alpha$ -Kohlenstoffatome um mehrere globale Motive, wie aus einer Überlagerung der Strukturen, wie sie in Abbildung 12 zu sehen ist, ersichtlich wird.

Die Reduktion der erhaltenen Modelle auf eine geringere Anzahl relevanter Strukturen erfolgte zunächst durch eine Analyse der Torsionswinkel und anschließend durch eine Begutachtung der Modelle. Es zeigte sich, daß zwei der Modelle, die ohne ATP modelliert wurden, für ein realistisches Protein-Modell ungeeignet sind. Bei diesen Modellen trat eine *Maschenbildung* zweier Loops auf. Eine solche Masche, wie sie in Abbildung 13 wiedergegeben ist, wurde in keiner der bekannten Kristallstrukturen für ATP-Bindungsdomänen beobachtet. Darüber hinaus ist die Bildung einer solchen Schleife *in vivo* äußerst unwahrscheinlich, da sich die naszierend Aminosäurekette vor Ausbildung von Sekundärstrukturen durch einen Loop fädeln müßte. Dennoch ist dies ein gutes Beispiel dafür, daß nicht immer alle Fehler in Modellen durch eine automatisierte Bestimmung von Bindungslängen und (Torsions-)Winkeln ausreichend sind, sondern daß es vielmehr auch der Wertung durch den Wissenschaftler bedarf.

Neben einer möglichst geringen Zahl sogenannter nicht erlaubter Torsionswinkel wurde auch die Anzahl der  $\Phi/\Psi$ -Winkel in favorisierten Bereichen begutachtet. Bei den Modellen ohne Nukleotid besitzen die *besten* vier Modelle einen Anteil von über 85 %. Dieser Wert ist vergleichbar bzw. besser als die Anzahl der favorisierten Diederwinkel, die als Vorlage dienten.

Die Darstellung eines Ramachandran-Diagramms im Zusammenhang mit der dreidimensionalen Struktur eines Proteinmodells ermöglicht es, zu beurteilen, ob eine Verletzung der in Kristallstrukturen beobachteten  $\Phi/\Psi$ -Winkel in Bereichen des Proteins auffindbar sind, die aufgrund

bereits beschriebener experimenteller Daten eine größere Verletzung für ein *richtiges* Modell darstellen, als die Werte an sich vermuten lassen. Für vier der 150 ausgewählten Modellen befinden sich die  $\Phi/\Psi$ -Winkel, die in nicht erlaubten Bereichen des Ramachandran-Diagramms liegen jedoch in Bereichen, die, soweit eine Beurteilung möglich ist, für eine Funktion des Proteinsegments nicht entscheidend sind.

In Anbetracht der Qualität der Ausgangsstrukturen kann daher aus der Diederwinkelanalyse geschlossen werden, daß optimale Werte in Bezug auf die  $\Phi/\Psi$ -Torsionswinkel erreicht wurden.

Zum Vergleich der Strukturen mit und ohne komplexiertes ATP wurden schließlich die Modelle mit bester *Diederwinkel Ausstattung* gewählt. Für ein repräsentatives Modell für die ATP-Bindungsdomäne im Komplex mit ATP wurde Modell 021 verwendet und für das Modell ohne Nukleotid wurde Modell 084 ausgewählt.

Beide Modelle weisen einige für die ATP-Bindungsdomäne typischen Strukturmerkmale auf (siehe Abbildung 17). Sie besitzen fünf im Protein verborgene parallele  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die eine einzelne zentrale  $\alpha$ -Helix umfächern, die das Walker A Motiv enthält. Dieses Motiv ist für die Bindung und Hydrolyse von ATP essentiell. Den fünf  $\beta$ -Faltblattstrukturen folgt eine weitere  $\beta$ -Faltblattstruktur, die solvens exponiert ist und wiederum in Nachbarschaft zu drei weiteren antiparallel orientierten  $\beta$ -Faltblättern steht, die die gleiche  $\alpha$ -Helix umfächern. Die im Inneren der Proteindomäne vorliegenden  $\beta$ -Faltblattstrukturen stehen auf der einen Seite in Nachbarschaft zu der bereits mehrfach erwähnten einzelnen  $\alpha$ -Helix, die das Walker A Motiv enthält, auf der anderen Seite werden diese Faltblatt-Strukturen ihrerseits von  $\alpha$ -Helices umrahmt. Diese  $\alpha$ -Helices gehören zu einer Substruktur der Proteindomäne, die ausschließlich aus helikalen Strukturen besteht.<sup>93</sup>

Die erstellten Modelle spiegeln nahezu exakt die Topologie bekannter ATP-Bindungsdomänen wieder. Wie es auch auf Grundlage biochemischer Mutationsstudien erwartet wird.<sup>137</sup>

Die in Abbildung 19 dargestellte Überlagerung beider Modelle enthüllt Unterschiede zwischen beiden Strukturen, die hier zunächst qualitativ diskutiert werden sollen. Während der  $\alpha$ -helikale Bereich eine größere Abweichung zwischen beiden Strukturen aufweist, besteht in der Unterdomäne I eine bessere Übereinstimmung. Strukturen ohne Sekundärstruktur, die Loops der Modelle, sind bei einer Modellsuperpositionierung nicht zur Deckung zu bringen. Dies ist zu erwarten, da die Loops häufig wenig konservierte Bereiche sind und daher eine größere Varianz bei der Modellerstellung vorliegt.

Die strukturellen Unterschiede insbesondere in der Unterdomäne I des erstellten Modells werfen die Frage auf, ob ATP an der Bildung der unterschiedlichen Konformationen beteiligt ist und wo die molekularen Ursachen für die Konformationsänderung zu finden sind.

Die Detailuntersuchung der ATP-Bindungsdomäne wie sie in Abbildung 18(a) zeigt ATP und seine Koordinationsphäre im Modell 021. Abgebildet sind neben dem ATP-Molekül das Walker A Motiv, das Histidin des sogenannten *Q-Loop*, die konservierte Asparaginsäure des Walker B Motivs sowie ein über  $\pi - \pi$ -Wechselwirkungen mit dem Adeninring des ATP koordinierendes



Tyrosin. Während die Aminosäure Tyrosin und die Aminosäuren des Walker A-Motivs in direkter Nachbarschaft mit ATP liegen, sind sowohl die Asparaginsäure als auch das Histidin des *Q-Loops* ca. 6 Å vom  $\gamma$ -Phosphat des ATP entfernt. Aus der Überlagerung der Koordinationssphären der Modelle mit und ohne ATP, wie sie in Abbildung 19 zu sehen ist, wird deutlich, daß die negativ geladene Asparaginsäure und das Histidin durch die negative Ladung des ATP  $\gamma$ -Phosphats verdrängt werden. Die repulsive Interaktion zwischen den Aminosäuren führt zur Auslenkung dieser Aminosäuren. Die Analyse der Torsionswinkel in der dreidimensionalen Darstellung für das Modell 021 (Abbildung 15) zeigt, daß eben genau an den Positionen dieser Aminosäuren unerlaubte Diederwinkel-Kombinationen auftreten. Dies spiegelt die Spannung wieder, der die Aminosäure durch die repulsiven Interaktionen ausgesetzt ist. Eine solche Interaktion zwischen Protein und ATP ist jedoch energetisch ungünstig. Das Modell enthält jedoch weder Wasser noch Magnesium(II), die in geeigneter Position einen stabilisierenden Effekt hätten.<sup>138</sup>

Während die maximale Auslenkung der Aminosäuren Histidin und Asparaginsäure bis zu 3 Å beträgt, ändert sich die Position der  $C_{\alpha}$ -Atome der gleichen Aminosäuren nur um ca. ein Angström. Diese Änderung ist innerhalb der Fehlergrenzen bei der Modellerstellung vernachlässigbar und eine Änderung der Signaldomäne II daher nicht auf eine Interaktion zwischen dem  $\gamma$ -Phosphat des ATP und der Asparaginsäure oder dem Histidin zurückzuführen.

Die Anwesenheit von Magnesium zwischen dem Histidin, der Asparaginsäure und dem  $\gamma$ -Phosphat des ATP könnte den Effekt haben, daß die starken elektrostatischen Wechselwirkungen auf kurze Distanz zu einem Zug auf die Aminosäuren führen würden. Die Asparaginsäure und das Histidin würden dem  $\gamma$ -Phosphat des ATP quasi nicht durch Auslenkung ausweichen können sondern würden vielmehr einen Zug Richtung ATP ausgesetzt sein.

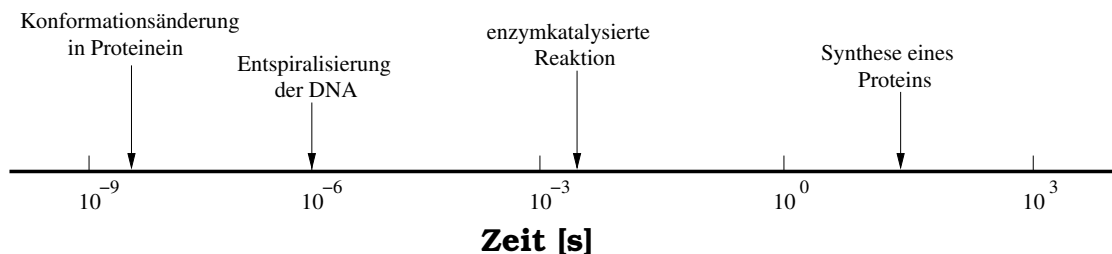
Ob eine solche Interaktion jedoch zu einer Konformationsänderung der Domäne zwei führen würde läßt sich hier nicht beantworten. Die Tatsache allerdings, daß zwischen den Signaldomänen der Modelle mit und ohne ATP eine größere Varianz vorhanden ist, als innerhalb der Domäne I beider Modelle, läßt Vermuten, daß diese Domäne eine relativ große Flexibilität aufweist. Tatsächlich ist diese Domäne in den erstellten Modellen über zwei lange Loops mit der Unterdomäne I verbunden. Diese »Zügel« lassen einen großen Spielraum zu, der diese Flexibilität erlauben könnte.

Wie gezeigt werden konnte, fällt die Bindung von ATP bei einigen ABC-Bindungsdomänen mit Konformationsänderungen des Transporters zusammen.<sup>139–141</sup> Außerdem erfolgen Konformationsänderungen auch in isolierten NBDs nach ATP-Bindung an diese Domäne, wie für sowohl MalK als auch HisP gezeigt werden konnte.<sup>142,143</sup>

Die biochemische Analyse der NBDs von ABCC 1 hat jedoch gezeigt, daß beide ATP-Bindungsdomänen *nicht* äquivalent sind.<sup>118,120</sup> Es konnte gezeigt werden, daß bei dem Transportprozess vermutlich ein sequentieller Mechanismus vorliegt. So führt die Bindung eines Substrats zu einer strukturellen Änderung des Transmembranbereiches, die sich jedoch nicht auf zytosolische Bereiche erstreckt. Die Bindung von GSH dagegen führt im Gegensatz zur Substratbindung zu einer Konformationsänderung, in die die NBDs involviert sind<sup>67</sup> und die die ATP-Bindung oder

seine Hydrolyse an der ersten NBD verstärkt.<sup>67</sup> Die Bindung von ATP an die NBD1 wiederum verstärkt die Hydrolyse von ATP an der zweiten NBD. Das  $\gamma$ -Phosphat des ATP ist hier bei der Bindung an die erste NBD von entscheidender Bedeutung.<sup>126</sup>

Erst kürzlich verwendeten Campbell et al. einen dynamischen Ansatz, um den Effekt von ATP auf strukturelle Änderungen der ATP-Bindungsdomäne von HisQMP<sub>2</sub>J aus *Salmonella typhimurium* zu untersuchen.<sup>138</sup> Sie verwendeten eine relativ lange Simulation mit einer Dauer von 80 ns, um ATP induzierte Änderungen in der Konformation dieses Proteins erfassen zu können (siehe Abbildung 45), die bei kürzerer Simulationsdauer nicht zu erfassen sind und kamen zu der Schlußfolgerung, daß die Bindung von ATP an die Modellierete Bindungsdomäne zu einer Konformationsänderung der  $\alpha$ -helikalen Untereinheit führt. Abbildung 45 zeigt zur Orientierung schematisch die Größenordnung einiger biochemischer Prozesse. Aus der Abbildung wird deutlich, daß Konformationsänderungen von Proteinen mit Moleküldynamischen Methoden derzeit noch nicht vollständig erfasst werden können.



**Abbildung 45:** Zeitleiste zum Vergleich der Geschwindigkeit einiger biologischer Prozesse. Moleküldynamische Berechnungen von Makromolekülen liegen zur Zeit im Bereich von Pico- bis Nanosekunden.

### 6.1.2 Moleküldynamische Analysen der C-terminalen ATP-Bindungsdomäne im Komplex mit ATP

Um die elektrostatischen und dynamischen Eigenschaften des ATP-Proteinkomplexes beurteilen zu können, wurde den die Proteinmodelle und das ATP mit Hilfe von GROMACS und PRODRG erneut parametrisiert und dabei mit polaren Wasserstoffatomen ausgestattet. Anschließend folgte eine moleküldynamische Analyse des Protein-(Komplexes) in einem Kasten expliziten SPC-Wassers.

Nach der Parametrisierung und Solubilisierung der verwendeten Modelle in expliziten Wasser wurde es den Wassermolekülen und anschließend dem Protein und dem ATP erlaubt, zu relaxieren. Anschließend fand eine Energieminimierung statt und die verwendeten Modelle wurden, wie schon zuvor auf Grundlage der  $\Phi/\Psi$ -Diederwinkel evaluiert.

Die Energieminimierung zeigt, daß einige Modelle, die ATP komplexieren, bei niedrigeren Ener-

gien konvergieren als die Modelle ohne ATP, was auf eine Stabilisierung des Modells durch ATP zurückzuführen sein könnte. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit eines Energieunterschieds zwischen den Modellversionen aufgrund unterschiedlicher intramolekularer Interaktion von Aminosäuren und Wasser–Aminosäureinteraktionen. Es ist nicht abschließend zu beurteilen, worin die Gründe für diesen relativ geringen Energiegewinn von etwa  $0,2 \text{ kJmol}^{-1}$  liegen.

Es zeigt sich, daß in allen Modellen die Zahl so genannter favorisierter und erlaubter Torsionswinkel nach Durchführung von Realisations- und Energieminimierungsschritten abnimmt und die der ungünstigen und nicht erlaubten Diederwinkel zunimmt und Werte annimmt, die vergleichbar sind mit Strukturen, die mit Hilfe von NMR-Analysen erhalten wurden. Zudem erscheint es, daß solvensexponierte Faltblatt-Sekundärstrukturen in weniger strukturierte Organisationsgrade übergehen. Die Auflösung der  $\beta$ -Faltblatt Sekundärstruktur in solvensexponierten Bereichen resultiert aus der Interaktion von Wassermolekülen mit den Seitenketten des Proteins in diesen Bereichen. Wasser substituiert die H-Bindungspartner der einzelnen Aminosäuren und führt somit zu einer Destabilisierung der intramolekularen Wechselwirkung des Proteins in diesen Bereichen.

Dieser Effekt kommt bei der initialen Modellerstellung nicht zum tragen, da hier keine intermolekularen Wechselwirkungen mit Wassermolekülen zum tragen kommen können. Die dem Ramachandranplot zugrundeliegenden Daten entstammen der Analyse von Kristallstrukturen. Aus diesem Grund ist der Ramachandranplot vor allem auf kristalline Systeme anwendbar. Bei NMR Strukturen z. B. ist der Bereich »großzügig erlaubter« Bereiche zu einem höheren Anteil besetzt, als bei Röntgenstrukturen. Eine Verschiebung in diesen Bereich ist bei einer Energieminimierung in Wasser daher zu erwarten.<sup>144–146</sup>

Ein Vergleich von beobachteten Diederwinkeln von Strukturen aus NMR-Strukturauflösungen wäre bei einem solvatisierten Modell die bessere Wahl, jedoch für solubilisierte Strukturen zur Zeit nicht vorhanden. Um jedoch einen Überblick über Änderungen in der Struktur im Verlauf der Energieminimierung zu erhalten, wurden die Diederwinkel dennoch mit Hilfe eines Ramachandran Diagramms begutachtet.

Insbesondere zeigt die Analyse der Diederwinkel anhand der dreidimensionalen Modelle, daß im solvatisierten Modell das Aminosäuregerüst nicht mehr im zentralen  $\beta$ -Faltblatt-Bereich auftritt. Die Abschirmung der elektrostatischen Ladungen durch Wassermoleküle hat die ungünstigen Wechselwirkungen über die Distanz von ca.  $6 \text{ \AA}$  geschwächt, so daß das Rückgrat nicht mehr unter Torsionsspannung steht.

Um die elektrostatischen Eigenschaften der erhaltenen Modelle zu untersuchen, wurden zum einen eine *Isosurface*-Darstellung (Abbildung 23) und zum anderen eine *Isopotential*-Darstellung (24) der Domäne erstellt und abgebildet. Abbildung 23 zeigt die Oberfläche, die einem sphärischem Molekül, das einen Radius von  $1,4 \text{ nm}$  besitzt, zugänglich ist. Diese Oberfläche wird auch *solvent accessible area* genannt. Die Darstellung dieser Fläche ermöglicht die Visualisierung der elektrostatischen Oberflächeneigenschaften. Dargestellt ist das in Anwesenheit von ATP erstellte Modell 021 nach Energieminimierung in Wasser zum einen mit ATP und zum anderen ohne ATP, um einen Einblick in die elektrostatischen Verhältnisse innerhalb der Bindungstasche zu erhalten. Der Hauptanteil an der Bindung hat das negativ geladenen Phosphatgerüst des ATP,

daß mit positiv polarisierten Bereichen des Proteins interagiert. Das ATP-Molekül ist nicht, wie häufig zu finden ist, tief in einer Tasche zu finden, sondern vielmehr an die Oberfläche des Proteins angeschmiegt.

Wie aus detaillierten Betrachtungen der konservierten Aminosäuren zu schließen ist, befindet sich mit Ausnahme des Lysins, das unter physiologischen Bedingungen positiv geladen ist, keine zum nukleophilen Angriff auf das Phosphatgerüst befähigten Aminosäuren in der Nähe des  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphats. Die Präsentation des ATP an der Oberfläche der Proteindomäne, im Gegensatz zu einer enzymatischen Spaltung tief in einer Proteinhöhle, wie es bei anderen Proteinen zu finden ist, und die Abwesenheit von Nukleophilen in der Nähe des Phosphatrückgrades, führt zu der Annahme, daß die ATP-Spaltung entweder durch Interaktion mit anderen Proteindomänen und/oder durch Wasser als Nukleophil zustande kommt. Dieses Modell wird in der Tat in der Literatur für den Transportmechanismus und die ATP-Hydrolyse diskutiert. Die hier erhaltenen Ergebnisse unterstützen diese These.

Die Darstellung von Isopotentialflächen, wie sie in Abbildung 24 zu sehen ist, erlaubt dem Betrachter einen räumlichen Eindruck des elektrischen Potentials in der Nähe des Proteins. Links in Abbildung 24 ist die Isopotentialfläche des Proteins in der ATP-gebundenen Konformation abgebildet. Rechts in Abbildung 24 ist das Modell ohne ATP nach abgebildet. Zwischen der Verteilung der Isopotentialwale der Modelle besteht ein deutlicher Unterschied. Obwohl das elektrostatische Potential des ATP nicht bei der Erstellung der Isopotentialflächen berücksichtigt worden ist, zeigt sich für die unterschiedlichen Modelle ein unterschiedliches *Potentialmuster*. Diese Verschiebung des elektrostatischen Potentials könnte das Protein nutzen, um über den Raum mit einer benachbarten ATP-Bindungsdomäne zu kommunizieren und eine Interaktion zu forcieren, die schließlich in der Hydrolyse von ATP und der Umsetzung seiner Hydrolyseenergie in einen Transportprozess münden könnte. Um diese These weiter zu stützen, sind Modelle der C-terminalen ATP-Bindungsdomäne und seines *Isopotentialraums* nötig.

### 6.1.3 Analyse der Moleküldynamischen Berechnungen

Neben den statischen Analysen wurden auch molekülmechanische Simulationen der modellierten C-terminalen ATP-Bindungsdomäne von ABCC 1 durchgeführt, um weitere Informationen über das Wechselspiel zwischen ATP und der Bindungsdomäne zu erhalten. Die Simulation wurde über einen Zeitraum von 50 ps durchgeführt. Innerhalb dieses Zeitfensters ist keine weitreichenden Konformationsänderungen des Proteins zu erwarten; dennoch ist es möglich Informationen über die Stabilität des Protein-ATP-Komplexes zu erfahren.

Zunächst wurde die Stabilität des Systems überwacht, indem die Energie des Systems, sowie die thermodynamischen Daten während des Verlaufs der Simulation überwacht wurden. Während des Simulationsverlauf wurden zum einen die Gesamtenergie sowie die kinetische und potentielle Energie des Systems kontrolliert, sowie die damit verknüpften Zustandsvariablen Druck, Temperatur und Volumen. In einem geschlossenen System sind diese Größen voneinander ab-

hängig und sollten in einem stabilen System konstant sein, da z. B. auf eine Druckänderung des Systems eine Regulation auf konstante Werte durch Anpassung von Temperatur und/oder Volumen erfolgt. Eine Überwachung der kinetischen Energie ist ebenfalls zweckmäßig. Zu große Zeitintervalle bei der Berechnung von Ort und Geschwindigkeit eines Atoms in einer Modellierung kann zu einer Überlagerung von Atomen führen. Diese Positionsüberlappung würde zu hohen kinetischen Energien führen, da starke repulsive Kräfte entstehen würden.

Die Evaluation der Energien zeigt jedoch nach einer kurzen Äquilibrationsphase, daß die Gesamtenergie des Systems, die Summe der kinetischen Energie über alle Atome und die Summe der potentiellen Energie über alle Atome des Systems konstant ist. Ein gleiches Bild ergibt sich bei Betrachtung der thermodynamischen Daten des Systems. Volumen, Druck und Temperatur bewegen sich im Mittel um jeweils einen konstanten Wert. Da es sich um ein kondensiertes System handelt, sind die Druckschwankungen um einen konstanten Mittelwert verhältnismäßig groß, denn eine kleine Volumenänderung muß zur Kompensation in einer großen Druckänderung resultieren.

Aus den erhobenen Daten läßt sich schließen, daß es sich im Rahmen des untersuchten Zeitfensters um ein stabiles System handelt.

Die moleküldynamische Untersuchung hatte zum Ziel, zu untersuchen, ob ATP in seiner Bindungstasche stabil komplexiert ist oder ob es zur Diffusion von ATP aus seiner Bindungstasche führt. Zu diesem Zweck wurde die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und ATP während der Simulationsdauer gemessen. Zudem wurden während der Simulationsdauer die Abweichung der Atome im Protein und im ATP bestimmt und die Abstände zwischen ausgewählten konservierten Aminosäuren und Atomen des ATP gemessen.

In Abbildung 27(a) ist das Ergebnis der Messung der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen während des Simulationsverlauf abgebildet. In die Bestimmung der Anzahl der Wasserstoffbrücken zwischen Protein und ATP wurde eine mögliche Beteiligung durch Insertion von Wassermolekülen nicht berücksichtigt. Das Kriterium für eine Wasserstoffbrückenbindung war rein geometrischer Natur. Es wurde ein Radius von 0,35 nm und ein Winkel zwischen dem Brückenbildenden Wasserstoffatom, dem Donor und dem Akzeptor von  $30^\circ$  verwendet.<sup>147</sup> Während der gesamten Simulation fluktuiert die Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen um einen Wert von sieben. ATP wird also nicht nur durch elektrostatische Kräfte zwischen dem Protein und dem ATP in der Bindungstasche fixiert, sondern auch durch Wasserstoffbrücken. Neben den gemessenen Wasserstoffbrücken ist es möglich, daß noch weitere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ATP und Protein vorhanden sind, die von Wassermolekülen *überbrückt* werden und somit einen weiteren Term zur Stabilisierung beitragen. Eine Quantifizierung der Bindungsenergie im solvatisierten Zustand erfolgt an dieser Stelle nicht.

Neben der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen wurden verschiedene Abstände im Simulationsverlauf gemessen. Berücksichtigt wurden dabei Aminosäuren, die entweder direkt an der Bindung von ATP beteiligt sind, aber auch Aminosäuren, deren Interaktion mit ATP vorausgesagt wird. Der Ebenenabstand zwischen den aromatischen Ringen des Adenins und des

Tyrosin 123 beträgt während des gesamten Simulationsverlaufs ca.  $4 \pm 1 \text{ \AA}$ .  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  TROSY NMR-Experimente konnten für die C-Terminale ATP-Bindungsdomäne von ABCC 1 ebenfalls eine enge Interaktion zeigen.<sup>148</sup> Der konstante Abstand zwischen dem Histidin 207 und der Asparigsäure 175 von über sechs Angström während der Simulation ist für eine Wechselwirkung über Wasserstoffbrückenbindungen zu groß. Dieser Zwischenraum wird vermutlich durch Magnesium(II) besetzt und führt über elektrostatische Wechselwirkungen zu einer weiteren ATP-Stabilisierung. Magnesium(II) ist jedoch nach Analyse der hier durchgeführten Experimente nicht für eine stabile Bindung von ATP an die Bindungsdomäne erforderlich. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Ramaen et al. für die erste ATP-Bindungsdomäne überein.<sup>148</sup>

Die Fluktuation der Gesamtheit der Atome für das Proteinmodell und für ATP wurden als RMSD über den Simulationsverlauf beobachtet, um einen Eindruck von der Flexibilität beider Moleküle zu erhalten. Während ATP in seiner Bindungsdomäne fixiert ist und nur eine Abweichung von  $0,5 \text{ \AA}$  besitzt, wie es für die thermische Bewegung eines Moleküls zu erwarten ist<sup>1</sup>, steigt die Abweichung des Proteins von der Ausgangsstruktur während der ersten 40 ps auf einen Wert von zwei Angström um dort zu stagnieren. Ob dies nur ein lokales Plateau ist, läßt sich ohne längere Simulationszeiten nicht zu beurteilen.

#### **6.1.4 Vorschlag eines Modells zum sequentiellen Ablauf der ATP-Hydrolyse und der Kommunikation der nicht-äquivalenten ATP-Bindungsdomänen von ABCC 1**

An dieser Stelle soll ein Modell für einen möglichen Verlauf der Umsetzung von ATP in einen Transportprozess für ABCC 1 vorgestellt werden.

Bei diesem Modell führt die Bindung von ATP an die NBD1 zu einer Konformationsänderung in der Signaldomäne I dieser Bindungsdomäne, so daß die ABC-Signatursequenz in eine Position gebracht wird, ATP an der zweiten Bindungsdomäne zu hydrolysieren. An den Konformationsänderungen ist das  $\gamma$ -Phosphat des gebundenen ATPs maßgeblich beteiligt.

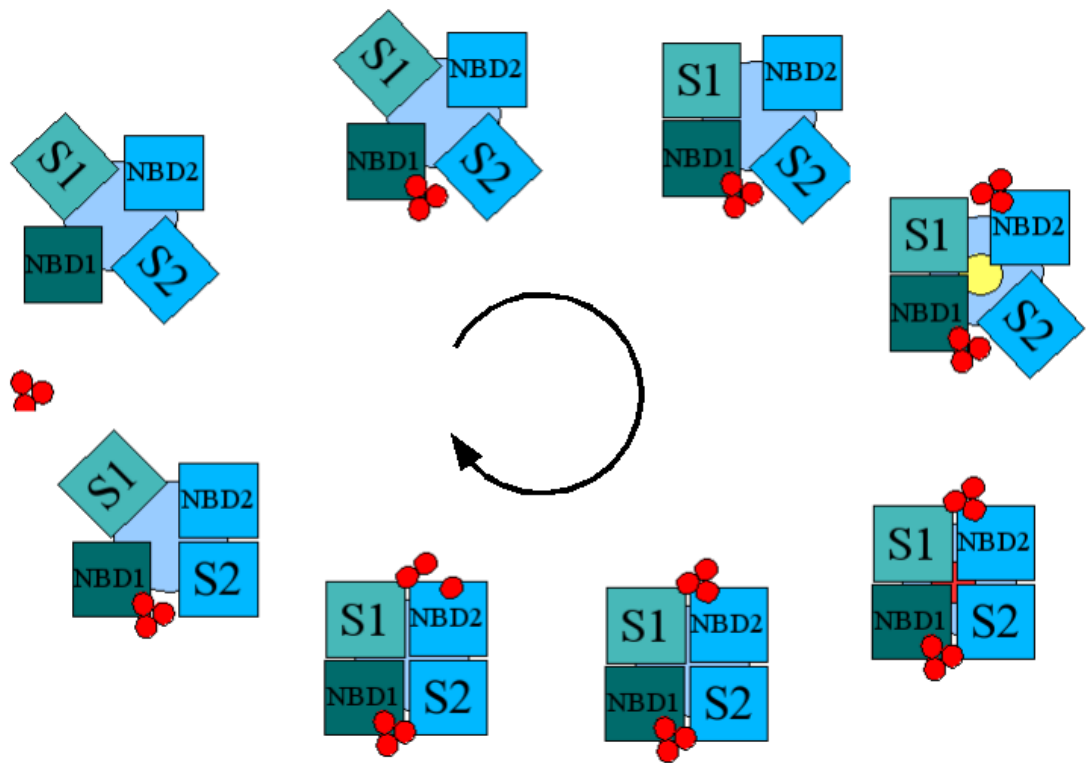
Eine Bindung von ATP an die C-terminale Bindungsdomäne könnte durch diese Konformationsänderung verstärkt werden, ist aber nach den hier durchgeführten Studien nicht notwendig. Wie gezeigt werden konnte diffundiert ATP innerhalb der Simulationsdauer nicht aus der Koordinationssphäre des Proteins.

Zu einem Zeitpunkt, an dem beide ATP-Bindungsdomänen mit ATP beladen sind, führt eine Konformationsänderung der Signaldomäne I der NBD2 zu einem Zustand, der den engen Kontakt beider ATP-Bindungsdomänen erlaubt und zur Hydrolyse von ATP in der C-terminalen Bindungsdomäne führt. Mutationen, bei denen das zweite Glycin des *LSGGQ* mutiert ist, führt zu Transport-Inkompetenten Proteinen, bei denen keine Hydrolyse von ATP erfolgt.<sup>149</sup> Die Bewegung beider Bindungsdomänen aufeinander zu, führt zu einer Konformationsänderung innerhalb der Transmembrandomänen, die den Transportprozeß vorantreibt. Die Bindung von ATP an die C-terminale Bindungsdomäne im Komplex mit Magnesium II könnte zu dieser Konformationsänderung in der C-terminalen ATP-Bindungsdomäne führen. Allerdings zeigt die Varianz zwi-

schen den aufgestellten Modelle mit und ohne ATP eine Flexibilität dieser Signaldomäne, die vermuten läßt, daß eine Regulation wahrscheinlich eher über die Transmembrandomänen erfolgt.

Die Hydrolyse von ATP zu ADP und  $P_i$  führt dazu, daß die beiden Bindungsdomänen wieder auseinander getrieben werden, um ADP und  $P_i$  entlassen zu können. Die Zugänglichkeit von ABCC 1 zur Wasserphase verringert sich wieder.<sup>150</sup> Dabei wird der Ausgangszustand wieder hergestellt. Bei diesem Modell ist eine Hydrolyse des ATP der NBD1 wahrscheinlich, ist jedoch von den Eigenschaften der ABC-Signatursequenz der NBD2 abhängig. Beide Szenarien, die Hydrolyse aber auch der Fall, daß ATP an dieser Domäne nicht hydrolysiert wird, bleiben möglich.

Eine Regulation der ATP-Hydrolyse über Konformationsänderungen der Signaldomänen einer oder beider Bindungsdomänen durch eine Substratbindung könnte in diesem Modell dafür sorgen, daß es nicht zu einem *Lehrlaufprozess* kommt, in dem ATP ohne Substrattransport hydrolysiert wird. Moleküldynamische Studien von HisP führten zu dem Vorschlag, daß eine Rotation der Signaldomänen durch die Transmembrandomänen reguliert wird.<sup>151</sup>



**Abbildung 46:** Modellvorstellung zum Transportmechanismus von ABCC 1. Die Bindung von ATP an NBD1 führt zu einer Konformationsänderung der Signaldomäne S1. ATP bindet an die zweite ATP-Bindungsdomäne NBD2. Die Bindung von Glutathion führt zu einer Konformationsänderung der Signaldomäne S2, so daß es zur paarweisen Ausbildung von Kontakten zwischen den Signaldomänen und den ATP-komplexierenden Walker A-Motiven der Bindungsdomänen kommt. Dieser Prozess führt zum Substrat-Transport und zur ATP-Hydrolyse an der NBD2. Die Hydrolyse des ATP führt dazu, daß die ATP-Bindungsdomänen wieder auseinander getrieben werden und die Ausgangskonformation wieder herstellen.



## 6.2 Die Funktion intrazellulären ABCC 1 bei der Arzneimitteldisposition.

Tumorzellen können nach Exposition mit zytotoxischen Medikamenten eine Resistenz gegenüber strukturell und funktionell verschiedenen Medikamenten erwerben.<sup>152</sup> Das Phänomen der MDR ist an die Überexpression von Multidrug-Transportern gekoppelt, die in der Plasmamembran lokalisiert sind. Dieser MDR Phänotyp ist mit der Überexpression verschiedener Mitglieder der ABC Familie verbunden. Es ist allgemein akzeptiert, daß eine Verminderung der Akkumulation toxischer Substanzen über die Zeit durch diese Transporter zum Phänotyp der MDR beiträgt.<sup>153</sup> Auf der anderen Seite existieren jedoch auch insbesondere für ABCB 1 (P-gp) Berichte, die eine subzelluläre Verteilung von Multidrug-Transportern vorschlagen.<sup>26,55,154-162</sup> Es wird vorgeschlagen, daß ABCC 1 in sekretorischen Vesikeln, sowie in Lysosomen positioniert ist, wo es an der Detoxifizierung der Zelle durch Substrattransport in intrazelluläre Kompartimente beiträgt. Neben der Expression von Multidrug-Transportern in die Plasmamembran, um zum einen eine Barriere für zytotoxische Substanzen darzustellen und zum anderen die zelluläre Konzentration aus Sicht der Zelle schädlicher Substanzen zu minimieren, scheint also auch ein alternativer Mechanismus für das Ausschleusen von Substanzen aus der Zelle, die den Golgi Apparat und vesikuläre Transportmechanismen utilisieren, möglich zu sein. Diese Vermutung wird von Untersuchungen von Coley et al. unterstützt, die eine subzelluläre Verteilung von Anthrazyklinen beobachten konnten.<sup>163</sup>

Die Überprüfung der Lokalisierung von ABCC 1 in der Plasmamembran der H69AR-Zellen zeigt, daß die präferierte Expression von ABCC 1 in der Plasmamembran ist, daß jedoch ein großer Anteil des Proteins auch intrazellulär vorliegt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Fluoreszenzstudien durchgeführt, die die Hypothese eines möglichen alternativen Detoxifizierungsmechanismus, untersuchen sollten. Zur Detektion wurde ein monoklonaler Antikörper (QCRL-1) verwendet, der ein kurzes lineares Epitop einer Länge von sieben Aminosäuren erkennt. Neben der zu erwartenden Position von ABCC 1 in der Plasmamembran ist auch zu erwarten, daß zu einem geringen Anteil auch Lysosomen und der Golgi Apparat gefärbt sind, da dies Orte der Proteinreifung und des Proteinsabbaus sind. In der Tat ist neben der Plasmamembran eine Immunfluoreszenzfärbung innerer Bereiche der Zelle zu erkennen. Diese Färbung tritt in Plasmamembran nahen Bereichen auf und ist in nahezu jeder Zelle zu erkennen. Die Immunfluoreszenzexperimente zeigen somit eine über eine Lokalisierung in der Plasmamembran hinausgehende Verteilung von ABCC 1.

Mit Hilfe einer Kernfärbung mit dem zwischen die Basen der DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff PI wurde untersucht, ob ABCC 1 wie Pgp auch in der Kernmembran exprimiert wird, um den Zellkern vor schädigenden Einflüssen von Zytostatika zu schützen.<sup>164</sup> Bei Interkalation zwischen die DNA-Basen wird das Fluoreszenzsignal, ähnlich wie bei Ethidiumbromid, verstärkt. Ein Fluoreszenzsignal von PI zeigt also seine Interkalation in DNA an. Eine schwächere Färbung dieses Fluoreszenzfarbstoffes kann durch Interkalation zwischen die Basen der RNA erfolgen. Demzufolge kann also ebenso eine Färbung ribosomaler RNA so-

wie t-RNA auftreten, die allerdings in schwächerer Intensität erfolgt.

Die gelbliche Färbung innerhalb der Zelle in Abbildung 34b könnte das raue Endoplasmatische Retikulum detektieren, einem Ort, an dem sowohl rRNA als auch ABCC 1 gleichzeitig detektiert werden könnten. Allerdings ist in direkter Nachbarschaft zum Zellkern, der mit dem rauhen ER verknüpft ist, keine Überlagerung der Fluoreszenzen von PI und TRITC zu erkennen, was gegen diese These spricht.

Vielmehr ist es wahrscheinlicher, daß es sich bei der gelblichen Färbung um ein Artefakt bei der Bildkonstruktion handelt. Die Anregung der PI-Fluoreszenz hat auch die Fluoreszenz des Farbstoffes TRITC angeregt. Die Detektion der Fluoreszenz im Bereich von 610–640 nm detektiert nicht ausschließlich die Emission des TRITC-Farbstoffes. Erst die Überlagerung der angeregten Fluoreszenz von PI und FRITC liefert Unterschiede. Aus dem Vergleich der Information ist klar ersichtlich, daß die DNA des Zellkerns und ABCC1 unabhängig voneinander markiert wurden. Die Darstellung der detektierten Fluoreszenz erfolgte in grüner Farbe und muß zwangsläufig mit der detektierten Fluoreszenz der ABCC 1 Markierung überlagern. Die Überlagerung der Bildinformationen aus Abbildung 34a mit der in Abbildung 34c führt schließlich zu der Dreifarbandarstellung in Abbildung 34b.

Die teilweise Überlagerung der Fluoreszenzanregung und die der Fluoreszenzemission führt zu einer erschwerten Interpretation bei der Fragestellung, ob sich ABCC 1 auch in der Kernmembran befindet. Aus diesem Grund wurde auch eine Immunfluoreszenzfärbung ausschließlich basierend auf der Immunofärbung von ABCC 1 mit QCRL-1 durchgeführt. Diese Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen in der Darstellung einer konfokalen Ebene eine Färbung der Plasmamembran, die deutlich zu erkennen ist. Auch hier sind intrazelluläre Kompartimente und weite Bereiche des Zytoplasmas immunologisch markiert und weisen damit auf intrazelluläres ABCC 1 hin. Wie bereits erwähnt könnte die Färbung von ABCC 1 stammen, daß im Golgi-Apparat posttranslational modifiziert wird, oder sich bereits in einem degenerierten Zustand in den Lysosomen befindet. Anhand der durchgeführten Experimente kann dies nicht ausgeschlossen werden. Es kann allerdings kein ABCC 1 in der Kernmembran detektiert werden, wie es bei einer intrazellulären Verteilung von ABCC 1 zum Schutz der DNA zu erwarten wäre.

Um Rückschlüsse auf die Funktion intrazellulären ABCC 1 ziehen zu können, wurden die Zellen mit Doxorubicin inkubiert. Die intrinsische Fluoreszenz dieses Zytostatikums läßt seine Detektion mit Hilfe der CLSM orts aufgelöst zu.<sup>165</sup>

Nach einer eingehenden Analyse der intrazellulären Verteilung von ABCC 1 mit Hilfe konfokaler Laserscanning-Mikroskopie an fixierten Zellen, wurde in weiteren Experimenten die Verteilung von Doxorubicin in nicht-fixierten, sondern vitalen, immobilisierten Zellen erkundet. In einem Doppelfluoreszenzexperiment, in dem zum einen DiI als Marker für Zellmembranen verwendet wurde und die Zellen zum anderen mit Doxorubicin inkubiert wurden, sollte die Verteilung von Doxorubicin in Zellen untersucht werden.

Abbildung 37 zeigt ein deutliches Vorkommen von Doxorubicin nach Inkubation innerhalb der Zelle. Die resistenten Zellen nehmen nicht unerhebliche Mengen des Zytostatikums auf. Auch nach 60 min ist die Fluoreszenz von Doxorubicin mit gleicher Intensität innerhalb der Zellen zu detektieren. Ob die Konzentration des Zytostatikums jedoch ober- oder unterhalb toxischer Konzentrationen befindet ist unklar. Es eröffnet sich die Frage, ob intrazellulär vorkommendes ABCC 1 Doxorubicin in intrazelluläre Kompartimente transportiert.<sup>162,166</sup> Aus Sicht der Zelle macht es durchaus Sinn, neben einem Export über die Plasmamembran auch innerhalb der Zelle zellschädigende Substanzen zum vesikulären Export aus der Zelle in sekretorische Vesikel zu verpacken. Neben einer Vergrößerung der Oberfläche, die an der Detoxifizierung beteiligt ist, muß die toxische Substanz nicht erst zur Plasmamembran diffundieren, um aus der Zelle entfernt werden zu können. Daß in Zellen die das Phänomen der MDR aufweisen oft Annexin II, ein kalziumabhängiges Protein, das an Prozessen der Membranregulation beteiligt ist, überexprimiert wird<sup>167</sup>, mag ein weiteres Indiz dafür sein, daß intrazelluläre Mechanismen eine wichtige Rolle bei dem Phänomen der MDR spielen.

Im Falle von Doxorubicin wird neben einer Schädigung der DNA durch dieses Medikament auch die Schädigung von Membranen als Möglichkeit für die Toxizität dieser Substanz diskutiert.<sup>168,169</sup> Unter Berücksichtigung dieser Möglichkeit wäre es für die Zelle neben dem Export dieser Substanz aus der Zelle hinaus auch von Bedeutung, diese Substanz aus anderen Membranen neben der Plasmamembran zu entfernen. Auch aus diesem Grund wäre es daher konsequent, ABCC 1 auch in intrazellulären Membranen zu finden. Die Tatsache, daß ABCC 1 jedoch nicht im Gegensatz zu P-gp in der Zellkernmembran gefunden wurde, spricht gegen diese These.

Zusammenfassend zeigen die unternommenen Versuche, daß ABCC 1 intrazelluläre Auftritt. Eine Expression erfolgt jedoch nicht in der Kernmembran, sondern allenfalls im Golgiapparat. Zudem wird Doxorubicin nach Inkubation innerhalb von Stunden noch nicht vollständig aus der Zelle transportiert.

Die starke Expression von ABCC 1 in der Plasmamembran deutet darauf hin, daß ABCC 1 in erster Linie verhindert, daß zellschädigende Substanzen überhaupt in die Zelle vordringen können. Schon während zellschädigende Substanzen die Membran durch Diffusion überqueren, werden sie von ABCC 1 aktiv in den extrazellulären Bereich transportiert. Substanzen, die dennoch in die innere der Zelle gelangen, könnten von aktiven intrazellulären ABCC 1 in Vesikel transportiert werden, um mit Hilfe eines vesikulären Transportes aus der Zelle transportiert zu werden. Ein solcher Transportmechanismus scheint jedoch zumindest für ABCC 1 eine untergeordnete Rolle zu spielen.

### **6.3 Die quantitative Isolierung und funktionelle Rekonstitution von ABCC 1 in Liposomen**

Eine eingehendere Untersuchung von *Multidrug* Transportern mit biophysikalischen Methoden ist nur möglich, wenn große Mengen an aufgereinigtem Protein zur Verfügung stehen. Anhand von biophysikalischen Experimenten, in denen das Protein in isolierter Form vorliegt, ist es möglich Experimente durchzuführen, die die wichtige Beiträge leisten können, um Struktur und Funktion des Proteins aufzuklären. In biophysikalischen Experimenten ist die gezielte Untersuchung des Proteins in definierter Umgebung und seine Interaktion mit definierten Substanzen möglich.

Moderne Screeningmethoden auf Basis von Zellkulturexperimenten<sup>170</sup> oder artifiziellen Systemen, die sich der Rekonstitution von Proteinen in Membranen bedienen, sollen in Zukunft die Möglichkeit bieten, Transportprozesse in Screeningverfahren zu untersuchen. Zu diesem Zweck soll ein System im Arbeitskreis bereitgestellt werden, daß geeignete Proteinmengen eines Multidrug Transporters bereitstellt. Die Etablierung und die Möglichkeit der Modifizierung eines solches Systems im Arbeitskreis wurde zum Ziel gesetzt.

Obwohl die Rekonstitution von Membranproteinen seit langer Zeit ein wichtiges Werkzeug der Biophysiker war, bleibt es dennoch eine schwierige Aufgabe, ausreichende Mengen eines Membranproteins zu isolieren, seine Funktionalität zu erhalten und das betreffende Protein funktionell zu rekonstituieren. Zudem ist der Expressionslevel von Membranproteinen in Gewebekultur im Vergleich zu zytosolischen Proteinen im allgemeinen nur sehr gering. Diese Umstand führt dazu, daß es schwierig ist, Membranproteine in ausreichenden Mengen zu isolieren. Weiterhin besitzen Membranproteine naturgemäß mehr oder weniger große Bereiche hoher Hydrophobizität, die im funktionellen biologischen System die Membran durchspannen. Diese Bereiche führen zu einer verringerten Löslichkeit im wässrigen Medium, so daß das Protein mit Hilfe von milden Detergentien gelöst werden muß. Außerdem ändert der hohe Grad an Hydrophobizität die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Membranproteinen verglichen mit zytosolischen, löslichen Proteinen. Membranproteine sind zudem unter Umständen glykolisiert. Auch dies führt zu oft außergewöhnlichen Eigenschaften von Membranproteinen. Dies macht sich z. B. an den Laufeigenschaften von vielen Membranproteinen in der SDS-PAGE bemerkbar. Aufgrund der veränderten Laufeigenschaften erscheint die Bande von ABCC 1 nicht bei 190 kDa sondern bei 160 kDa.

#### **6.3.1 Die Isolierung des monoklonalen Antikörpers QCRL-1 im quantitativem Maßstab.**

Die Isolierung von ABCC 1 erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe der Immunopräzipitation, angelehnt an die Arbeiten von Cole et al.<sup>171,172</sup>. Für die quantitative Isolierung von ABCC 1 mit Hilfe der Immunopräzipitation ist eine relativ große Menge Antikörper notwendig. Bereitgestellt

wurde die Versorgung durch diesen Antikörper durch die Zellkultur einer QCRL-1 sekretierenden Hybridoma-Zelllinie. Aus dem Mediumüberstand der Zellen wurden mit Hilfe der FPLC quantitative Mengen des monoklonaler Antikörper QCRL-1 isoliert. Monoklonale Antikörper sind für die Proteinisolierung mit Immunologischen Methoden sehr gut geeignet, da sie die Elution des Antigens, im Gegensatz zu Polyklonalen Antikörpern, unter definierten und milden Bedingungen zulassen.<sup>173</sup> In Abbildung 30 ist das Elutionsprofil des Antikörpers von der Chromatographie an Protein G wiedergegeben. Es ist nur ein einzelner Peak während der Elution des Immunogens vorhanden. In Abbildung 31 das Ergebnis einer SDS-PAGE Analyse des aufgereinigten Antikörpers im Vergleich zu kommerziell erhältlichem Antikörper wiedergegeben. Die Behandlung des Antikörpers unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen hat zur Spaltung des Immunglobulins in seine Fragmente, die schweren Fc-Ketten und die leichten Fab Fragmente geführt. Die Bande in Spur eins und zwei des Gels bei 66 kDa korrespondiert mit dem Molekulargewicht von BSA von 67 kDa. BSA wurde vom Hersteller zur Stabilisierung des Antikörpers zugesetzt. Die ausgeprägte BSA Bande verdeckt in Spur zwei die Bande bei 55 kDa, die dem Fc-Fragment zuzuordnen und in Spur eins zu erkennen ist. In Spur drei der SDS-Page ist diese Bande sehr ausgeprägt. Andere Banden sind nur sehr schwach ausgeprägt. Zusammen mit dem Elutionsprofil der FPLC-Aufreinigung des Antikörpers kann gefolgert werden, daß der Antikörper sehr rein isoliert werden konnte. Es konnten in meherer Durchgängen insgesamt 15 mg hochreinen Antikörpers isoliert werden.

Vor dem Einsatz zur Proteinisolierung wurde zunächst die Aktivität des Antikörpers im Vergleich zu seinem kommerziell erhältlichem Pendant in einem Immunfluoreszenzexperiment getestet. Wie es in Abbildung 32 zu sehen ist, haben beide Antikörper vergleichbare Eigenschaften. Während in einem Kontrollexperiment keine Fluoreszenz vorhanden war, gaben sowohl die Positivkontrolle als auch das Immunfluoreszenzexperiment mit dem isolierten Antikörper ein deutliches Fluoreszenzsignal. Der Antikörper erkennt sein Antigen offenbar und ist demnach für Immunopräzipitationsexperimente geeignet. Dies konnte auch in Westernblotanalysen gezeigt werden (hier nicht abgebildet).

Die Isolierung von ABCC 1 erfolgte aus der Plasmamembran der Lungenkrebszelllinie (H69AR). P-gp wird in dieser Zelllinie nicht überexprimiert, dennoch weist diese Zelllinie die Eigenschaften multipler Resistenzen auf, was auf einen erhöhten Expressionslevel von ABCC 1 zurückzuführen ist.<sup>22</sup> Dieser erhöhte Expressionslevel an ABCC 1 wurde durch regelmäßige Subkultivierung in Doxorubicin-haltigen Medium aufrechterhalten. Eine *Realtime*-PCR Analyse, deren Ergebnis in Abbildung 33 wiedergegeben ist, demonstriert, daß die Expression von ABCC 1 in der Tat hochreguliert ist. Der Vergleich des Transkriptionslevels von ABCC 1 in PBCE-Zellen und in H69AR-Zellen normiert auf den Transkriptionslevel von  $\beta$ -Aktin zeigt eine um den Faktor 1,4 erhöhte Transkription von ABCC 1 in der Lungenkrebszelllinie.

### 6.3.2 Die quantitative Isolierung von ABCC 1

Die Plasmamembranisolierung aus H69AR-Zellen erfolgte routinemäßig nach den im experimentellen Teil beschriebenen Methode. In Abbildung 39 ist das Ergebnis der Analyse der isolierten Plasmamembranfraktion abgebildet. Abbildung 39(a) zeigt eine PROTOGOLD gefärbte Membran vor der Westernblotanalyse. Das Ergebnis des Westernblot ist in Abbildung 39(b) abgebildet. Wie die PROTOGOLD-Färbung der Nylonmembran zeigt, enthält die Plasmamembranfraktion eine große Zahl von Membranproteinen. Neben einer Zahl unbekannter Proteine zeigt die Westernblotanalyse deutlich die Anwesenheit von ABCC 1. Die Schwärzung des Photofilms erfolgte auf einer Höhe von ca. 160 kDa. Der Auftrag der fünffachen Menge der Plasmamembranfraktion führt zu weiteren Schwärzungen des Photofilms oberhalb von 300 kDa, was auf eine Dimerisierung, wie sie bei Membranproteinen häufig zu beobachten ist, von ABCC 1 hinweisen. Eine weitere Bande ist unterhalb von 116 kDa zu finden. Diese Bande stammt wahrscheinlich von degradiertem ABCC 1. Auffällig ist, daß trotz eines intensiven Signals im Westernblot nur relativ schwache Banden nach der Färbung der Nylonmembran mit PROTOGOLD-Färbung bei einem entsprechendem Molekulargewicht zu finden ist. Es ist jedoch bekannt, daß einige Membranproteine neben ihren ungewöhnlichen Laufeigenschaften auch ein anderes Färbverhalten zeigen. Ob dies für eine PROTOGOLD-Färbung im Falle von ABCC 1 zutrifft, wurde nicht weiter untersucht. ABCC 1 besitzt ein glykolisiert ein Molekulargewicht von 190 kDa. Die Schwärzung des Photofilms unterhalb von 170 kDa ist auf die ungewöhnlichen Laufeigenschaften von glykolisierten Membranproteinen zurückzuführen. Die hohe Hydrophobizität dieses Proteins führt zu einer vermehrten Einlagerung von SDS in das Protein und damit zu einem erhöhten Masse/Ladungsverhältnis. Vergleichen mit dem Proteinstandard erfährt ein hydrophobes Protein also eine größere Beschleunigung bei gleicher Masse.

Die isolierte Plasmamembran wurde im weiteren Verlauf der Proteinisolierung mit CHAPS, einem zwitterionischen Detergenz, zunächst solubilisiert, um dann sofort immunopräzipitiert zu werden. Die Immunopräzipitation erfolgte mit dem isolierten Antikörper. Dabei wurden verschiedene Strategien verfolgt:

- Isoliertes QCRL-1 wurde kovalent an Protein G gekoppelt.
- QCRL-1 wurde kovalent an Antikörper-beschichtete DYNABEADS gekoppelt (direkte Methode).
- QCRL-1 wurde direkt eingesetzt (indirekte Methode).

Die Kopplung von QCRL-1 an Protein G und an Antikörper-beschichtete DYNABEADS erhält dabei die volle Aktivität des Antikörpers, da die Kopplung über die Fc-Fragmenten des Antikörpers erfolgt. Der Vorteil der kovalenten Kopplung des Antikörpers an eine Trägermatrix vor Immunopräzipitation, liegt unter anderem in der Wiederverwendbarkeit des Antikörpers nach Protein-elution. Die direkte Applikation des Antikörpers bei der Immunopräzipitation hat unter

Umständen der Vorteil höherer Mobilität und Vermeidung von sterischen Faktoren bei der Immunopräzipitation.

In Abbildung 40 ist das Ergebnis der Westernblotanalyse der verschiedenen Aufreinigungsstrategien zu finden. Abbildung 40(a) ist das Ergebnis der DYNABEADS basierten Methode, während in Abbildung 40(b) das Ergebnis der Isolierung mit Protein G gekoppelten QCRL-1 wiedergibt.

Die Proteinisolierung gelingt mit allen drei verwendeten Methoden. Wie schon zuvor erfolgt die Schwärzung des Photofilms unterhalb von 170 kDa. Bei der indirekten Methode wird der Antikörper zunächst mit dem Antigen inkubiert und der Antikörper-Antigen Komplex anschließend mit den Zweitantikörper beschichteten DYNABEADS isoliert. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, daß die Elution des Proteins zur Gleichzeitigen Elution des Antikörpers führen kann, der zu einem Signal im Westernblot führt. Diese Antikörper*verunreinigung* ist als starkes Signal in Spur eins der Abbildung 40(a) zu finden. Der Schwerpunkt dieses Signals liegt etwas unterhalb der vom Antigen verursachten Bande. Während allerdings sowohl bei der direkten Methode als auch bei der Proteinisolierung mit an Protein G gekoppeltem Antikörper eine Bande oberhalb des Proteinstandards bei 220 kDa zu finden ist, ist diese bei der direkten Methode obsolet, was darauf schließen läßt, daß im Verhältnis eine geringe Proteinmenge isoliert wurde. In Bezug auf die zu isolierende Proteinmenge ist in diesem Fall folglich die direkte Methode zu bevorzugen. In Abbildung 40(b) ist das Ergebnis der Westernblotanalyse der Proteinisolierung mit Protein G gekoppeltem QCRL-1 abgebildet. In Spur eins ist eine Probe des an die Protein G-Antikörper-Matrix gekoppelten ABCC 1 aufgetragen. Das Eluat dieser Säule wurde in Spur zwei aufgetragen. Da Protein G naturbedingt eine hohe Affinität zu Antikörpern besitzt, sind in Spur eins zusätzliche Banden zu finden, die Aufgrund der Bindung von Protein G-Fragmenten an Erst- und Zweitantikörper stammen.

Bei der Proteinisolierung fand letztendlich die Kopplung des Antikörpers an Protein G mit anschließender Immunopräzipitation Anwendung. Prinzipell sind erscheint diese Methode jedoch zu der Isolierung mit Hilfe der DYNABEADS (direkte Methode) equivalent zu sein. Eine Proteinisolierung mit Hilfe von DYNABEADS bietet sich bei kleineren zu isolierenden Mengen an, da diese Methode schnell und effizient ist.

In Abbildung 41 ist die Silberfärbung einer SDS-PAGE aufgereinigten Proteins abgebildet. Bei ca. 160 kDa sind zwei Banden zu erkennen. Weitere Banden haben sich nichtentwickelt. Bei der oberen Bande handelt es sich um ABCC 1, wie Westernblotanalysen zuvor gezeigt haben; bei der unteren Bande handelt es sich wahrscheinlich um eine Abbaubande des ABCC 1. Die Abwesenheit weitere Banden bei Kontrolle der Reinheit des Proteins zeigt, daß die verwendete Methode in der Lage ist, ABCC 1 in reiner Form zu isolieren.

Die Rekonstitution isolierten ABCC 1 erfolgte direkt im Anschluß an die Isolierung aus der Plasmamembran, da solubilisierte Membranproteine im solubilisierten Zustand eine höhere Proteolyseempfindlichkeit aufweisen. Die Rekonstitution gelang mit Hilfe einer Detergenzentfernung durch die Entfernung des Detergenz in Anwesenheit ebenfalls solubilierten Lipids durch Gel-

filtration. Dabei wird das Detergenz unterhalb der *kritischen micellaren Konzentration* verdünnt, so daß sich Proteoliposomen bilden.<sup>74</sup>

Zur Kontrolle der Proteinrekonstitution wurde von den Fraktionen der Gelfiltrationssäule eine Probe genommen und auf eine Nylonmembran appliziert. Die Membran wurde entsprechend eines Westernblots entwickelt. Das Ergebnis diese sogenannten Dotblots ist in Abbildung 42 gezeigt. Die Schwärzung des Photofilms korreliert mit den trüben Fraktionen des Eluats der Gelfiltration. Der Dotlot dokumentiert damit die erfolgreiche Rekonstitution des aufgereinigten ABCC 1 in Liposomen.

Um die Funktionsfähigkeit des isolierten Proteins zu zeigen, wurden Transportstudien mit radioaktiv markiertem LTC<sub>4</sub> durchgeführt. Abbildung 43 zeigt das Ergebnis der zeitabhängigen Transportstudie mit [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> bei konstantem Nukleotidgehalt mit ATP, bzw. mit AMP in Gegenwart eines ATP-regenerierenden Systems. Das Experiment zeigt, daß der Gehalt an [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> innerhalb der Proteoliposomen über die Zeit während der Dauer des Versuchs steigt. Auch die Variation des ATP-Gehaltes zeigt, daß die Reaktion ATP-abhängig ist. Aufgrund der großen Fehler, die durch die Lineweaver-Burk-Auftragung entstehen<sup>1</sup>, soll an dieser Stelle jedoch nur eine qualitative Diskussion erfolgen.

Bei Anwesenheit von ATP ist der Gehalt an Radioaktivität innerhalb der Proteoliposomen höher als bei der Vergleichsmessung in Anwesenheit von AMP. Dies ist für einen ATP abhängigen Prozess zu erwarten. Eine Möglichkeit für die Aufnahme von [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> in Anwesenheit von AMP liegt in der passiven Diffusion von [<sup>3</sup>H]LTC<sub>4</sub> durch die Membran zum Ausgleich der Konzentration.<sup>172</sup>

Wie gezeigt werden konnte, ist die Bereitstellung eines Systems für die quantitative und zugleich funktionelle Isolierung eines ABC-Transportes innerhalb der Arbeitsgruppe gelungen. Die Eigenschaften des isolierten Transportes bezüglich der ATP Abhängigkeit des Transportes von HLTC<sub>4</sub> sind vergleichbar mit den Ergebnissen anderen Gruppen.<sup>172</sup>

Für die Isolierung wurden zwei Systeme verwendet, die beide gleichermaßen für die quantitative Isolierung von nativen ABCC 1 geeignet sind und so eine flexible Anpassung der Prozedur an die jeweiligen Bedürfnisse erlauben.

Es ist zu erwarten, daß die verwendeten Methoden Isolierung auch auf Transporter mit ähnlichen Eigenschaften anzuwenden sind. Damit ist eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung von Screeningverfahren mit artifiziellen Systemen erfüllt.



## 7 Zusammenfassung

Trotz des Designs und der Entwicklung neuer potenter Medikamente, entzieht sich malignes Gewebe häufig der Behandlung durch die Ausbildung von Resistenzen. Die Resistenz von Tumoren gegenüber einer großen Zahl strukturell und funktionell verschiedenartiger Substanzen ist bei der Behandlung von Krebs mit einer Chemotherapie eine große Herausforderung. Ein Mechanismus des Phänotyps der multiplen Resistenzen basiert auf der Überexpression von mindestens einem der drei zur Zeit bekannten *Multidrug*-Transporter. Alle drei Transporter gehören zur Überfamilie der ABC-Transportproteine, deren gemeinsames Merkmal die ATP-Bindungsdomänen sind.

Der Erforschung von ABC-Transportern kommt eine enorme Bedeutung zu. Insbesondere da diese Art von Transportproteinen nicht nur eine Chemotherapie wirkungslos macht, sondern auch die medikamentöse Behandlung von Krankheiten, wie z. B. AIDS erschwert. Darüber hinaus sind ABC-Transporter an verschiedenen anderen Krankheitsbildern wie der Mukoviszidose oder dem Dubin-Johnson Syndrom beteiligt.

Obwohl die molekularen Mechanismen des Transportes für die Entwicklung von therapeutisch interessanten Inhibitoren von immensen Interesse ist, so ist derzeit wenig über den genauen Ablauf des Transportprozesses bekannt. Darüber hinaus besteht ein großes Interesse an Screeningverfahren, um potentielle Kandidaten für Multidrug-Transporter in der medizinischen Forschung auszusortieren, bevor kostenintensive klinische Studien Anwendung finden.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es mit Methoden der homologie-basierten Modellierung gelungen, Modelle für die zur Zeit unbekannt dreidimensionale Struktur der C-Terminale ATP-Bindungsdomäne zu erstellen. Dabei wurde sowohl ein Modell im Komplex mit ATP erstellt sowie eine nukleotidfreie Struktur modelliert und diskutiert. Diese entwickelten strukturellen Modelle erklären alle zur Zeit vorliegenden experimentellen Befunde für diese Bindungsdomäne. So zeigte sich, daß ATP zwar in der Lage ist, durch das Protein komplexiert zu werden, jedoch nur an der Oberfläche des Proteins angelagert ist. Eine Hydrolyse von ATP erfolgt daher wahrscheinlich wie bei anderen ABC-Transportern aus dem Zusammenspiel mit der N-terminalen ATP-Bindungsdomäne. Die Unterschiede der Modelle mit und ohne ATP lassen auf eine Modulation der  $\alpha$ -helikalen Domänenuntereinheit durch die Transmembrandomänen des Proteins und nicht durch die Bindung von ATP schließen.

Diese Beobachtung konnte zur Entwicklung eines Modell-Mechanismus genutzt werden, der unter Einbeziehung experimenteller Daten, die Divergenz der ATP-Bindungsdomänen von ABCC 1 deutet.

Mit der putativen Struktur dieser Bindungsdomäne konnte somit ein wertvoller Beitrag zur Diskussion und dem Verständnis des Transportmechanismus des Multidrug-Transporters ABCC 1 geleistet werden.

Weiterhin konnte der ABC-Transporter ABCC 1 im Milligramm-Maßstab funktionell isoliert und rekonstituiert werden.

Die ATP-Abhängigkeit des Transportes wurde mit Hilfe von radioaktiven Methoden demonstriert. Damit wurden im Arbeitskreis die Voraussetzungen geschaffen, die Struktur dieses Transporters mit biophysikalischen Methoden weiter zu erforschen und das Protein für die Entwicklung von Screeningverfahren einzusetzen. Die Expertise zur Aufreinigung von Transmembranproteinen mit hohem Molekulargewicht kann auf weitere Transportproteine, wie das BMDR Protein angewendet werden.

In dieser Arbeit konnten darüber hinaus weitere Indizien für die in der Literatur seit kurzer Zeit intensiver diskutierte subzelluläre Verteilung von ABCC 1 gewonnen werden, die die Möglichkeit eines vesikulären Transportes unter Beteiligung von ABCC 1 nicht ausschließen.

## Literatur

- 1 D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt. *Fundamentals of Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. **1999**. ISBN 0-471-58650-1.
- 2 Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter. *Molecular Biology of the cell*. Garland Science Taylor & Francis Group **2002**.
- 3 W. Kong, K. Engel, J. Wang. Mammalian nucleoside transporters. *Curr Drug Metab* **2004**. 5(1), 63.
- 4 G. You. The role of organic ion transporters in drug disposition: an update. *Curr Drug Metab* **2004**. 5(1), 55.
- 5 A. Persidis. Cancer multidrug resistance. *Nature Biotechnology* **1999**. 17, 94.
- 6 C. Chen, J. Chin, K. Ueda, D. Clark, I. Pastan, M. Gottesman, I. Roninson. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **1986**. 47(3), 381.
- 7 R. Juliano, V. Ling. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **1976**. 455(1), 152.
- 8 J. Gerlach, N. Kartner, D. Bell, V. Ling. Multidrug resistance. *Cancer Surv* **1986**. 5(1), 25.
- 9 S. Ambudkar, S. Dey, C. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, M. Gottesman. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **1999**. 39, 361.
- 10 G. Lee, S. Dallas, M. Hong, R. Bendayan. Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol Rev* **2001**. 53(4), 569.
- 11 I. B. Holland, S. P. Cole, K. Kuchler, C. F. Higgins, eds. *ABC Proteins: From Bacteria to Man*. Academic Press Elsevier Science **2002**.
- 12 T. Eisenblätter, H.-J. Galla. A new multidrug resistance protein at the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**. 293(4), 1273.
- 13 T. Eisenblätter, S. Hüwel, H.-J. Galla. Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier. *Brain Res* **2003**. 971(2), 221.
- 14 M. Dean, R. Allikmets. Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembr* **2001**. 33(6), 475.

- 15 T. Litman, T. Druley, W. Stein, S. Bates. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* **2001**. 58(7), 931.
- 16 S. Mirski, J. Gerlach, S. Cole. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer Res* **1987**. 47(10), 2594.
- 17 T. McGrath, M. Center. Adriamycin resistance in HL60 cells in the absence of detectable P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* **1987**. 145(3), 1171.
- 18 F. Baas, A. Jongsma, H. Broxterman, R. Arceci, D. Housman, G. Scheffer, A. Riethorst, M. van Groenigen, A. Nieuwint, H. Joenje. Non-P-glycoprotein mediated mechanism for multidrug resistance precedes P-glycoprotein expression during in vitro selection for doxorubicin resistance in a human lung cancer cell line. *Cancer Res* **1990**. 50(17), 5392.
- 19 D. Hipfner, R. Deeley, S. Cole. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta* **1999**. 1461(2), 359.
- 20 E. Leslie, R. Deeley, S. Cole. Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* **2001**. 167(1), 3.
- 21 S. Cole, G. Bhardwaj, J. Gerlach, J. Mackie, C. Grant, K. Almquist, A. Stewart, E. Kurz, A. Duncan, R. Deeley. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **1992**. 258(5088), 1650.
- 22 S. Cole, E. Chanda, F. Dicke, J. Gerlach, S. Mirski. Non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in a small cell lung cancer cell line: evidence for decreased susceptibility to drug-induced DNA damage and reduced levels of topoisomerase II. *Cancer Res* **1991**. 51(13), 3345.
- 23 M. Flens, G. Zaman, P. van der Valk, M. Izquierdo, A. Schroeijers, G. Scheffer, P. van der Groep, M. de Haas, C. Meijer, R. Scheper. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol* **1996**. 148(4), 1237.
- 24 J. Wijnholds, E. deLange, G. Scheffer, D. van den Berg, C. Mol, M. van der Valk, A. Schinkel, R. Scheper, D. Breimer, P. Borst. Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Clin Invest* **2000**. 105(3), 279.
- 25 A. Haimeur, G. Conseil, R. Deeley, S. P. C. Cole. The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* **2004**. 5(1), 21.
- 26 M. V. Luyn, M. Müller, J. Renes, C. Meijer, R. Scheper, E. Nienhuis, N. Mulder, P. Jansen, E. D. Vries. Transport of glutathione conjugates into secretory vesicles is mediated by the multidrug-resistance protein 1. *Int J Cancer* **1998**. 76(1), 55.

- 27 E. Leslie, K. Ito, P. Upadhyaya, S. Hecht, R. Deeley, S. Cole. Transport of the beta - O-glucuronide conjugate of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) by the multidrug resistance protein 1 (MRP1). Requirement for glutathione or a non-sulfur-containing analog. *J Biol Chem* **2001**. 276(30), 27846.
- 28 J. Renes, E. de Vries, G. Hooiveld, I. Krikken, P. Jansen, M. Iler. Multidrug resistance protein MRP1 protects against the toxicity of the major lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Biochem J* **2000**. 350 Pt 2, 555.
- 29 D. Loe, R. Deeley, S. Cole. Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res* **1998**. 58(22), 5130.
- 30 M. Salerno, A. Garnier-Suillerot. Kinetics of glutathione and daunorubicin efflux from multidrug resistance protein overexpressing small-cell lung cancer cells. *Eur J Pharmacol* **2001**. 421(1), 1.
- 31 I. Leier, G. Jedlitschky, U. Buchholz, M. Center, S. Cole, R. Deeley, D. Keppler. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Biochem J* **1996**. 314 ( Pt 2), 433.
- 32 M. Heijn, J. Hooijberg, G. Scheffer, G. ó, H. Westerhoff, J. Lankelma. Anthracyclines modulate multidrug resistance protein (MRP) mediated organic anion transport. *Biochim Biophys Acta* **1997**. 1326(1), 12.
- 33 Y. Qian, W. Song, H. Cui, S. Cole, R. Deeley. Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1. *J Biol Chem* **2001**. 276(9), 6404.
- 34 E. M. Leslie, R. J. Bowers, R. G. Deeley, S. P. C. Cole. Structural requirements for functional interaction of glutathione tripeptide analogs with the human multidrug resistance protein 1 (MRP1). *J Pharmacol Exp Ther* **2003**. 304(2), 643.
- 35 M. Rosenberg, Q. Mao, A. Holzenburg, R. Ford, R. Deeley, S. Cole. The structure of the multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). crystallization and single-particle analysis. *J Biol Chem* **2001**. 276(19), 16076.
- 36 E. Bakos, R. Evers, G. Calenda, G. Tusnády, G. Szakács, A. Váradi, B. Sarkadi. Characterization of the amino-terminal regions in the human multidrug resistance protein (MRP1). *J Cell Sci* **2000**. 113 Pt 24, 4451.
- 37 S. Bates, R. Robey, K. Miyake, K. Rao, D. Ross, T. Litman. The role of half-transporters in multidrug resistance. *J Bioenerg Biomembr* **2001**. 33(6), 503.
- 38 C. Ozvegy, T. Litman, G. Szakács, Z. Nagy, S. Bates, A. Váradi, B. Sarkadi. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**. 285(1), 111.

- 39 K. Kage, S. Tsukahara, T. Sugiyama, S. Asada, E. Ishikawa, T. Tsuruo, Y. Sugimoto. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int J Cancer* **2002**. 97(5), 626.
- 40 L. Hung, I. Wang, K. Nikaido, P. Liu, G. Ames, S. Kim. Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* **1998**. 396(6712), 703.
- 41 J. Walker, M. Saraste, M. Runswick, N. Gay. 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(8), 945.
- 42 X.-Q. Ren, T. Furukawa, M. Haraguchi, T. Sumizawa, S. Aoki, M. Kobayashi, S. ichi Akiyama. Function of the ABC signature sequences in the human multidrug resistance protein 1. *Mol Pharmacol* **2004**. 65(6), 1536.
- 43 E. Schneider. Abc-transporter: Eine proteinfamilie für den transport chemischer verbindungen über biologische membranen. *Chemie in unserer Zeit* **2000**. (2), 90.
- 44 P. Liu, G. Ames. In vitro disassembly and reassembly of an ABC transporter, the histidine permease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**. 95(7), 3495.
- 45 P. Jones, A. George. Subunit interactions in ABC transporters: towards a functional architecture. *FEMS Microbiol Lett* **1999**. 179(2), 187.
- 46 G. Chang, C. Roth. Structure of MsbA from E. coli: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* **2001**. 293(5536), 1793.
- 47 K. P. Locher, A. T. Lee, D. C. Rees. The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **2002**. 296(5570), 1091.
- 48 G. Chang. Structure of MsbA from Vibrio cholera: a multidrug resistance ABC transporter homolog in a closed conformation. *J Mol Biol* **2003**. 330(2), 419.
- 49 R. Johnstone, A. Ruefli, M. Smyth. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem Sci* **2000**. 25(1), 1.
- 50 A. Haimeur, G. Conseil, R. G. Deeley, S. P. C. Cole. Mutations of charged amino acids in or near the transmembrane helices of the second membrane spanning domain differentially affect the substrate specificity and transport activity of the multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1). *Mol Pharmacol* **2004**. 65(6), 1375.
- 51 M. Rosenberg, G. Velarde, R. Ford, C. Martin, G. Berridge, I. Kerr, R. Callaghan, A. Schmidlin, C. Wooding, K. Linton, C. Higgins. Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle. *EMBO J* **2001**. 20(20), 5615.

- 52 A. Senior. Catalytic mechanism of P-glycoprotein. *Acta Physiol Scand Suppl* **1998**. 643, 213.
- 53 L. Schmitt, R. Tampé. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol* **2002**. 12(6), 754.
- 54 Z. Sauna, S. Ambudkar. Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes. *J Biol Chem* **2001**. 276(15), 11653.
- 55 A. Shapiro, V. Ling. Transport of LDS-751 from the cytoplasmic leaflet of the plasma membrane by the rhodamine-123-selective site of P-glycoprotein. *Eur J Biochem* **1998**. 254(1), 181.
- 56 M. Muir, L. Williams, T. Ferenci. Influence of transport energization on the growth yield of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **1985**. 163(3), 1237.
- 57 G. A. Altenberg. Structure of multidrug-resistance proteins of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* **2004**. 4(1), 53.
- 58 R. Daoud, J. Desneves, L. Deady, L. Tilley, R. Scheper, P. Gros, E. Georges. The multidrug resistance protein is photoaffinity labeled by a quinoline-based drug at multiple sites. *Biochemistry* **2000**. 39(20), 6094.
- 59 R. Daoud, C. Kast, P. Gros, E. Georges. Rhodamine 123 binds to multiple sites in the multidrug resistance protein (MRP1). *Biochemistry* **2000**. 39(50), 15344.
- 60 R. Daoud, M. Julien, P. Gros, E. Georges. Major photoaffinity drug binding sites in multidrug resistance protein 1 (MRP1) are within transmembrane domains 10-11 and 16-17. *J Biol Chem* **2001**. 276(15), 12324.
- 61 Q. Mao, W. Qiu, K. E. Weigl, P. A. Lander, L. B. Tabas, R. L. Shepard, A. H. Dantzig, R. G. Deeley, S. P. C. Cole. GSH-dependent photolabeling of multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1) by [125I]LY475776. Evidence of a major binding site in the COOH-proximal membrane spanning domain. *J Biol Chem* **2002**. 277(32), 28690.
- 62 D.-W. Zhang, S. P. C. Cole, R. G. Deeley. Determinants of the substrate specificity of multidrug resistance protein 1: role of amino acid residues with hydrogen bonding potential in predicted transmembrane helix 17. *J Biol Chem* **2002**. 277(23), 20934.
- 63 D. Zhang, S. Cole, R. Deeley. Identification of a nonconserved amino acid residue in multidrug resistance protein 1 important for determining substrate specificity: evidence for functional interaction between transmembrane helices 14 and 17. *J Biol Chem* **2001**. 276(37), 34966.

- 64** D. Zhang, S. Cole, R. Deeley. Identification of an amino acid residue in multidrug resistance protein 1 critical for conferring resistance to anthracyclines. *J Biol Chem* **2001**. 276(16), 13231.
- 65** C. Blackmore, P. McNaughton, H. van Veen. Multidrug transporters in prokaryotic and eukaryotic cells: physiological functions and transport mechanisms. *Mol Membr Biol* **2001**. 18(1), 97.
- 66** J. Renes, E. de Vries, E. Nienhuis, P. Jansen, M. Müller. ATP- and glutathione-dependent transport of chemotherapeutic drugs by the multidrug resistance protein MRP1. *Br J Pharmacol* **1999**. 126(3), 681.
- 67** L. Manciu, X.-B. Chang, F. Buyse, Y.-X. Hou, A. Gustot, J. R. Riordan, J. M. Ruyschaert. Intermediate structural states involved in MRP1-mediated drug transport. Role of glutathione. *J Biol Chem* **2003**. 278(5), 3347.
- 68** R. Freshney. *Culture of animal cells: A manual of basic techniques*.. Wiley-Liss. **2000**.
- 69** E. Lazarides, K. Weber. Actin antibody: the specific visualization of actin filaments in non-muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1974**. 71(6), 2268.
- 70** A. Boyde. Bibliography on confocal microscopy and its applications. *Scanning* **1994**. 16, 33.
- 71** T. Wilson, C. Sheppard. *Theory and practice of scanning optical microscopy*.. Academic Press, London **1984**.
- 72** G. Brakenhoff, H. van der Voort, E. van Spronsen, W. Linnemans, N. Nanninga. Three-dimensional chromatin distribution in neuroblastoma nuclei shown by confocal scanning laser microscopy. *Nature* **1985**. 317(6039), 748.
- 73** J. Silvius. Solubilization and functional reconstitution of biomembrane components. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **1992**. 21, 323.
- 74** J. Cladera, J. Rigaud, J. Villaverde, M. Duñach. Liposome solubilization and membrane protein reconstitution using Chaps and Chapso. *Eur J Biochem* **1997**. 243(3), 798.
- 75** D. H. Andrews. *Phys rev* **1930**. 36, 544.
- 76** T. L. Hill. *J chem phys* **1946**. 14, 465.
- 77** F. H. Westheimer. *J chem phys* **1946**. 14, 733.
- 78** A. Leach. *Molecular modelling. Principles and applications*.. Addison Wesley Longman **1996**.



- 79 T. W. Hambley. *comments inoorg chem* **1992**. 14, 1.
- 80 P. Comba, M. Zimmer. *J chem ed* **1996**. 73, 108.
- 81 P. Comba, T. H. Hambley. *Molecular modeling of inorganic compounds*. Wiley VCH, Weinheim, 2. ed. **2001**.
- 82 M. Zimmer. *Chem rev* **1995**. 95, 2629.
- 83 M. Karplus. Molecular dynamics of biological macromolecules: a brief history and perspective. *Biopolymers* **2003**. 68(3), 350.
- 84 M. Karplus, J. A. McCammon. Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat Struct Biol* **2002**. 9(9), 646.
- 85 A. D. H. J. C. Berendsen, J. P. M. Postma, J. R. Haak. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J Chem Phys* **1984**. 81(3684-3690).
- 86 T. Darden, D. York, L. Pederson. Particle mesh ewald: an  $n \cdot \log(n)$  method for ewald sums in large systems. *J Chem Phys* **1993**. (98), 10089.
- 87 P. Ewald. *Ann Phys* **1921**. 64, 253.
- 88 *Molecular mechanics*. 177. Am.chem. soc., Washington, DC **1982**.
- 89 M. J. Forster. Molecular modelling in structural biology. *Micron* **2002**. 33(4), 365.
- 90 P. von Ragué Schleyer, ed. *Encyclopedia of Computational Chemistry*. John Wiley & Sons **1998**.
- 91 K. Saito, R. Nakano. Partial BFGS update and efficient step-length calculation for three-layer neural networks. *Neural Comput* **1997**. 9(1), 123.
- 92 C. Chothia, A. Lesk. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J* **1986**. 5(4), 823.
- 93 P. Jones, A. George. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci* **2004**. 61(6), 682.
- 94 J. D. Campbell, K. Koike, C. Moreau, M. S. P. Sansom, R. G. Deeley, S. P. C. Cole. Molecular modeling correctly predicts the functional importance of Phe594 in transmembrane helix 11 of the multidrug resistance protein, MRP1 (ABCC1). *J Biol Chem* **2004**. 279(1), 463.
- 95 K. Koike, C. J. Oleschuk, A. Haimeur, S. L. Olsen, R. G. Deeley, S. P. C. Cole. Multiple membrane-associated tryptophan residues contribute to the transport activity and substrate specificity of the human multidrug resistance protein, MRP1. *J Biol Chem* **2002**. 277(51), 49495.

- 96 I. Callebaut, R. Eudes, J.-P. Mornon, P. Lehn. Nucleotide-binding domains of human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: detailed sequence analysis and three-dimensional modeling of the heterodimer. *Cell Mol Life Sci* **2004**. 61(2), 230.
- 97 M. Seigneuret, A. Garnier-Suillerot. A structural model for the open conformation of the mdr1 P-glycoprotein based on the MsbA crystal structure. *J Biol Chem* **2003**. 278(32), 30115.
- 98 W. Pearson. Flexible sequence similarity searching with the FASTA3 program package. *Methods Mol Biol* **2000**. 132, 185.
- 99 W. Pearson. Effective protein sequence comparison. *Methods Enzymol* **1996**. 266, 227.
- 100 W. Pearson. Comparison of methods for searching protein sequence databases. *Protein Sci* **1995**. 4(6), 1145.
- 101 B. John, A. Sali. Comparative protein structure modeling by iterative alignment, model building and model assessment. *Nucleic Acids Res* **2003**. 31(14), 3982.
- 102 A. Fiser, A. Sali. ModLoop: automated modeling of loops in protein structures. *Bioinformatics* **2003**. 19(18), 2500.
- 103 R. Sanchez, A. Sali. Comparative protein structure modeling. Introduction and practical examples with modeller. *Methods Mol Biol* **2000**. 143, 97.
- 104 A. Sali, T. Blundell. Definition of general topological equivalence in protein structures. A procedure involving comparison of properties and relationships through simulated annealing and dynamic programming. *J Mol Biol* **1990**. 212(2), 403.
- 105 T. Lassmann, E. L. L. Sonnhammer. Quality assessment of multiple alignment programs. *FEBS Lett* **2002**. 529(1), 126.
- 106 R. Chenna, H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins, J. D. Thompson. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* **2003**. 31(13), 3497.
- 107 A. Morris, M. MacArthur, E. Hutchinson, J. Thornton. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* **1992**. 12(4), 345.
- 108 S. C. Lovell, I. W. Davis, W. B. Arendall, P. I. W. de Bakker, J. M. Word, M. G. Prisant, J. S. Richardson, D. C. Richardson. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins* **2003**. 50(3), 437.
- 109 G. Kleywegt, T. Jones. Phi/psi-chology: Ramachandran revisited. *Structure* **1996**. 4(12), 1395.

- 110** R. Laskowski, D. Moss, J. Thornton. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J Mol Biol* **1993**. 231(4), 1049.
- 111** W. Kabsch, C. Sander. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **1983**. 22(12), 2577.
- 112** A. W. Schüttelkopf, D. M. F. van Aalten. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**. 60(Pt 8), 1355.
- 113** W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten. VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* **1996**. 14(1), 33.
- 114** N. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. Holst, J. McCammon. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**. 98(18), 10037.
- 115** S. G. Dahl, I. Sylte, A. W. Ravna. Structures and models of transporter proteins. *J Pharmacol Exp Ther* **2004**. 309(3), 853.
- 116** I. Holland, M. Blight. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* **1999**. 293(2), 381.
- 117** K. Linton, C. Higgins. The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol* **1998**. 28(1), 5.
- 118** Y. Hou, L. Cui, J. Riordan, X. Chang. Allosteric interactions between the two non-equivalent nucleotide binding domains of multidrug resistance protein MRP1. *J Biol Chem* **2000**. 275(27), 20280.
- 119** Y. xian Hou, L. Cui, J. R. Riordan, X. bao Chang. ATP binding to the first nucleotide-binding domain of multidrug resistance protein MRP1 increases binding and hydrolysis of ATP and trapping of ADP at the second domain. *J Biol Chem* **2002**. 277(7), 5110.
- 120** M. Gao, H. Cui, D. Loe, C. Grant, K. Almquist, S. Cole, R. Deeley. Comparison of the functional characteristics of the nucleotide binding domains of multidrug resistance protein 1. *J Biol Chem* **2000**. 275(17), 13098.
- 121** I. Urbatsch, B. Sankaran, S. Bhagat, A. Senior. Both P-glycoprotein nucleotide-binding sites are catalytically active. *J Biol Chem* **1995**. 270(45), 26956.
- 122** A. Senior, M. al Shawi, I. Urbatsch. The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Lett* **1995**. 377(3), 285.

- 123** I. Leier, G. Jedlitschky, U. Buchholz, S. Cole, R. Deeley, D. Keppler. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. *J Biol Chem* **1994**. 269(45), 27807.
- 124** D. Loe, K. Almquist, R. Deeley, S. Cole. Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agents in membrane vesicles. Demonstration of glutathione-dependent vincristine transport. *J Biol Chem* **1996**. 271(16), 9675.
- 125** D. Loe, K. Almquist, S. Cole, R. Deeley. ATP-dependent 17 beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) transport by multidrug resistance protein (MRP). Inhibition by cholestatic steroids. *J Biol Chem* **1996**. 271(16), 9683.
- 126** Y. xian Hou, J. R. Riordan, X. bao Chang. ATP binding, not hydrolysis, at the first nucleotide-binding domain of multidrug resistance-associated protein MRP1 enhances ADP.Vi trapping at the second domain. *J Biol Chem* **2003**. 278(6), 3599.
- 127** I. Urbatsch, K. Gimi, S. Wilke-Mounts, A. Senior. Investigation of the role of glutamine-471 and glutamine-1114 in the two catalytic sites of P-glycoprotein. *Biochemistry* **2000**. 39(39), 11921.
- 128** M. C. Peitsch. About the use of protein models. *Bioinformatics* **2002**. 18(7), 934.
- 129** R. E. Hileman, A. Silvanovich, R. E. Goodman, E. A. Rice, G. Holleschak, J. D. Astwood, S. L. Hefle. Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int Arch Allergy Immunol* **2002**. 128(4), 280.
- 130** L. Schmitt, H. Benabdelhak, M. A. Blight, I. B. Holland, M. T. Stubbs. Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains. *J Mol Biol* **2003**. 330(2), 333.
- 131** G. Chang. Multidrug resistance ABC transporters. *FEBS Lett* **2003**. 555(1), 102.
- 132** G. F. Ecker, K. Pleban, S. Kopp, E. Csaszar, G. J. Poelarends, M. Putman, D. Kaiser, W. N. Konings, P. Chiba. A three dimensional model for the substrate binding domain of the multidrug ABC transporter LmrA. *Mol Pharmacol* **2004**.
- 133** I. Klein, B. Sarkadi, A. radi. An inventory of the human ABC proteins. *Biochim Biophys Acta* **1999**. 1461(2), 237.
- 134** S. Mosimann, R. Meleshko, M. James. A critical assessment of comparative molecular modeling of tertiary structures of proteins. *Proteins* **1995**. 23(3), 301.
- 135** A. Sali, T. Blundell. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **1993**. 234(3), 779.

- 136** A. Sali. *MODELLER A Program for Protein Structure Modeling*. Department of Biopharmaceutical Sciences and Pharmaceutical Chemistry, and California Institute for Quantitative Biomedical Research, Mission Bay Genentech Hall 600 16th Street, Suite N472D University of California, San Francisco, release 6 ed. **2001**.
- 137** Z. Szentpetery, B. Sarkadi, E. Bakos, A. Varadi. Functional studies on the MRP1 multi-drug transporter: characterization of ABC-signature mutant variants. *Anticancer Res* **2004**. 24(2A), 449.
- 138** J. D. Campbell, S. S. Deol, F. M. Ashcroft, I. D. Kerr, M. S. Sansom. Nucleotide dependent conformational changes in hisp: Molecular dynamics simulation of an abc transporter nucleotide binding domain. *Biophys J* **2004**.
- 139** E. Mechetner, B. Schott, B. Morse, W. Stein, T. Druley, K. Davis, T. Tsuruo, I. Roninson. P-glycoprotein function involves conformational transitions detectable by differential immunoreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997**. 94(24), 12908.
- 140** C. Martin, G. Berridge, P. Mistry, C. Higgins, P. Charlton, R. Callaghan. Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis. *Biochemistry* **2000**. 39(39), 11901.
- 141** N. Sonveaux, C. Vigano, A. Shapiro, V. Ling, J. Ruyschaert. Ligand-mediated tertiary structure changes of reconstituted P-glycoprotein. A tryptophan fluorescence quenching analysis. *J Biol Chem* **1999**. 274(25), 17649.
- 142** E. Schneider, S. Wilken, R. Schmid. Nucleotide-induced conformational changes of MalK, a bacterial ATP binding cassette transporter protein. *J Biol Chem* **1994**. 269(32), 20456.
- 143** D. Kreimer, K. Chai, G. F.-L. Ames. Nonequivalence of the nucleotide-binding subunits of an ABC transporter, the histidine permease, and conformational changes in the membrane complex. *Biochemistry* **2000**. 39(46), 14183.
- 144** H. Fan, A. E. Mark. Relative stability of protein structures determined by X-ray crystallography or NMR spectroscopy: a molecular dynamics simulation study. *Proteins* **2003**. 53(1), 111.
- 145** S. Aci, L. Gangneux, J. Paoletti, D. Genest. On the stability of different experimental dimeric structures of the SL1 sequence from the genomic RNA of HIV-1 in solution: a molecular dynamics simulation and electrophoresis study. *Biopolymers* **2004**. 74(3), 177.
- 146** H. Yu, M. Ramseier, R. Rgi, W. F. van Gunsteren. Comparison of properties of Aib-rich peptides in crystal and solution: a molecular dynamics study. *Chemphyschem* **2004**. 5(5), 633.

- 147** D. van der Spoel, A. van Buuren, E. Apol, P. Meulenhoff, A. Sijbers, B. Hess, K. Fene-stra, E. Lindahl, R. van Drunen, H. Berendsen. *GROMACS user manual*. University of Groningen **2002**.
- 148** O. Ramaen, S. Masscheleyn, F. Duffieux, O. Pamlard, M. Oberkamp, J.-Y. Lallemand, ro-nique Stoven, E. Jacquet. Biochemical characterization and NMR studies of the nucleotide-binding domain 1 of multidrug-resistance-associated protein 1: evidence for interaction between ATP and Trp653. *Biochem J* **2003**. 376(Pt 3), 749.
- 149** Z. Szentpetery, A. Kern, K. Liliom, B. Sarkadi, A. Varadi, E. Bakos. The role of the con-served glycines of ATP-binding cassette signature motifs of MRP1 in the communication between the substrate-binding site and the catalytic centers. *J Biol Chem* **2004**. 279(40), 41670.
- 150** L. Manciu, X. Chang, J. Riordan, F. Buyse, J. Ruyschaert. Nucleotide-induced confor-mational changes in the human multidrug resistance protein MRP1 are related to the capacity of chemotherapeutic drugs to accumulate or not in resistant cells. *FEBS Lett* **2001**. 493(1), 31.
- 151** P. M. Jones, A. M. George. Mechanism of ABC transporters: a molecular dynamics simu-lation of a well characterized nucleotide-binding subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2002**. 99(20), 12639.
- 152** E. Schneider, D. Paul, P. Ivy, K. Cowan. Multidrug resistance. *Cancer Chemother Biol Response Modif* **1999**. 18, 152.
- 153** B. Stride, S. Cole, R. Deeley. Localization of a substrate specificity domain in the multidrug resistance protein. *J Biol Chem* **1999**. 274(32), 22877.
- 154** D. Marquardt, S. McCrone, M. Center. Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells: detection of resistance-associated proteins with antibodies against synthetic peptides that correspond to the deduced sequence of P-glycoprotein. *Cancer Res* **1990**. 50(5), 1426.
- 155** A. Molinari, M. Cianfriglia, S. Meschini, A. Calcabrini, G. Arancia. P-glycoprotein expres-sion in the Golgi apparatus of multidrug-resistant cells. *Int J Cancer* **1994**. 59(6), 789.
- 156** S. Meschini, A. Molinari, A. Calcabrini, G. Citro, G. Arancia. Intracellular localization of the antitumour drug adriamycin in living cultured cells: a confocal microscopy study. *J Microsc* **1994**. 176 ( Pt 3), 204.
- 157** M. Diociaiuti, A. Calcabrini, S. Meschini, G. Arancia. Intracellular mapping of 4'-deoxy-4'-iododoxorubicin in sensitive and multidrug resistant cells by electron spectroscopic ima-ging. *Micron* **1997**. 28(5), 389.

- 158** A. Molinari, A. Calcabrini, S. Meschini, A. Stringaro, D. D. Bufalo, M. Cianfriglia, G. Arancia. Detection of P-glycoprotein in the Golgi apparatus of drug-untreated human melanoma cells. *Int J Cancer* **1998**. 75(6), 885.
- 159** S. Meschini, A. Calcabrini, E. Monti, D. D. Bufalo, A. Stringaro, E. Dolfini, G. Arancia. Intracellular P-glycoprotein expression is associated with the intrinsic multidrug resistance phenotype in human colon adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* **2000**. 87(5), 615.
- 160** A. Calcabrini, S. Meschini, A. Stringaro, M. Cianfriglia, G. Arancia, A. Molinari. Detection of P-glycoprotein in the nuclear envelope of multidrug resistant cells. *Histochem J* **2000**. 32(10), 599.
- 161** G. Arancia, A. Molinari, A. Calcabrini, S. Meschini, M. Cianfriglia. Intracellular P-glycoprotein in multidrug resistant tumor cells. *Ital J Anat Embryol* **2001**. 106(2 Suppl 1), 59.
- 162** A. Rajagopal, S. M. Simon. Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. *Mol Biol Cell* **2003**. 14(8), 3389.
- 163** H. Coley, W. Amos, P. Twentyman, P. Workman. Examination by laser scanning confocal fluorescence imaging microscopy of the subcellular localisation of anthracyclines in parent and multidrug resistant cell lines. *Br J Cancer* **1993**. 67(6), 1316.
- 164** A. Molinari, A. Calcabrini, S. Meschini, A. Stringaro, P. Crateri, L. Toccaceli, M. Marra, M. Colone, M. Cianfriglia, G. Arancia. Subcellular detection and localization of the drug transporter P-glycoprotein in cultured tumor cells. *Curr Protein Pept Sci* **2002**. 3(6), 653.
- 165** S. Burrow, D. Phoenix, M. Wainwright, M. Tobin. Intracellular localisation studies of doxorubicin and victoria blue bo in emt6-s and emt6-r cells using confocal microscopy. *Cytotechnology* **2002**. 39, 15.
- 166** I. Cleary, G. Doherty, E. Moran, M. Clynes. The multidrug-resistant human lung tumour cell line, DLKP-A10, expresses novel drug accumulation and sequestration systems. *Biochem Pharmacol* **1997**. 53(10), 1493.
- 167** S. Cole, M. Pinkoski, G. Bhardwaj, R. Deeley. Elevated expression of annexin II (lipocortin II, p36) in a multidrug resistant small cell lung cancer cell line. *Br J Cancer* **1992**. 65(4), 498.
- 168** F. de Wolf, M. Maliepaard, F. van Dorsten, I. Berghuis, K. Nicolay, B. de Kruijff. Comparable interaction of doxorubicin with various acidic phospholipids results in changes of lipid order and dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1990**. 1096(1), 67.
- 169** F. de Wolf, R. Staffhorst, H. Smits, M. Onwezen, B. de Kruijff. Role of anionic phospholipids in the interaction of doxorubicin and plasma membrane vesicles: drug binding and structural consequences in bacterial systems. *Biochemistry* **1993**. 32(26), 6688.

- 170** C. Lohmann, S. wel, H. Galla. Predicting blood-brain barrier permeability of drugs: evaluation of different in vitro assays. *J Drug Target* **2002**. 10(4), 263.
- 171** Q. Mao, E. Leslie, R. Deeley, S. Cole. ATPase activity of purified and reconstituted multidrug resistance protein MRP1 from drug-selected H69AR cells. *Biochim Biophys Acta* **1999**. 1461(1), 69.
- 172** Q. Mao, R. Deeley, S. Cole. Functional reconstitution of substrate transport by purified multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1) in phospholipid vesicles. *J Biol Chem* **2000**. 275(44), 34166.
- 173** E. Harlow, D. Lane. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press **1998**.



## A Abkürzungen

$\alpha$ -	Antikörper gegen
ABC	ATP Bindungsdomäne <i>ATP binding cassette</i>
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrom</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
bfgs	Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno Algorhythmus
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
CHAPS	[3-(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propan sulfonat
Ci	Curie
CLSM	Konfokales Laser Scanning Mikroskop
dd	bidest
DiI	1,1'-Diiododecyl-3,3',3'-tetramethyl-Indocarbocyanin-perchlorat
DME	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis( $\beta$ -amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
g	mittlere Erdbeschleunigung ( $1\text{ g} = 9.80665\text{ m s}^{-2}$ )
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion, reduzierte Form
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HFCS	Hitze inaktiviertes Fötales Kälberserum
HF	Hartree-Fock
h	Stunde
HLTC <sub>4</sub>	Leukotrien C4
IgG <sub>1</sub>	Immunglobulin Subtyp 1
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
kb	Kilobasenpaare
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionisation</i>
MD	<i>Molecular Dynamics</i> , Moleküldynamik
MEM	<i>modified eagle medium</i>
min	Minuten
M	mol/l
MRP	<i>Multidrug Resistance Associated Protein</i>
MS	Massenspektrometrie
NBD	Nukleotid Bindungsdomäne

NBD1	C-terminale Nukleotid Bindungsdomäne
NBD2	N-terminale Nukleotid Bindungsdomäne
Neo	Neomycin
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
OAT	<i>Organic Anion</i> Transporter
OCT	<i>Organic Cation</i> Transporter
OD <sub>λ</sub>	Optische Dichte bei der Wellenlänge λ
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBCEC	<i>Porcine Brain Capillary Endothelial Cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
P-gp	P-Glycoprotein
PME	<i>Particle Mesh Ewald</i>
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SDS	Natrium Dodekylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	TRIZMA Base (Tris[hydroxymethyl]aminomethan)
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
U	<i>unit</i> (Enzymaktivitätseinheit)
UV	Ultraviolett
V	Spannung
(v/v)	Volumenprozent, bezogen auf das Gesamtvolumen
(w/v)	Massenprozent, bezogen auf das Gesamtvolumen

## B Materialien

Acrylamid/Bisacrylamid	<i>AppliChem</i> (Darmstadt, Deutschland)
<i>Adult Bovine Serum</i>	<i>PAA</i> (Pasching, Österreich)
Ammonium Acetat	<i>Riedel-dde Haën</i> (Seelze, Deutschland)
Ampicillin	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Germany)
APS	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Germany)
$\beta$ -Mercaptoethanol	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
Bio-Rad <sup>®</sup> Protein Assay	<i>BioRad</i> (Hercules, Californien/USA)
<i>Broad Range</i> DNA-Marker	<i>Invitrogen</i> (Carlsbach, CA, USA)
Bromphenolblau	<i>ICN Biochemicals</i> (Eschwege, Deutschland)
<i>CaCl<sub>2</sub></i>	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Chloroform	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
<i>DMF</i>	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
<i>DMSO</i>	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
Dynabeads <sup>®</sup> M-280 <i>sheep anti-mouse</i>	<i>Dynal Biotech</i> (Oslo, Norwegen)
ECL Kit <sup>™</sup>	<i>Amersham Biotech</i> (Uppsala, Schweden)
<i>EDTA</i>	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure	<i>Merck</i> (Darmstadt, Germany)
Ethanol	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
FCS	<i>PAA</i> (Pasching, Österreich)
Formaldehyd (37 %)	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Glucose	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
Glutardialdehyd	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
Glycin	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
<i>HCl</i>	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
<i>High molecular weight marker</i>	<i>Amersham Biotech</i> (Uppsala, Schweden)
Hyperfilm MP	<i>Amersham Biotech</i> (Uppsala, Schweden)
Kälberserum	<i>PAA</i> (Pasching, Österreich)
<i>KCl</i>	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)

$KHCO_3$	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
<i>Low molecular weight marker</i>	<i>Amersham Biotech</i> (Uppsala, Schweden)
Methanol	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
MicroSpin G-50 Säulen	<i>Amersham Biotech</i> (Uppsala, Schweden)
$Na_2HCO_3$	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
$NaCl$	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
$NaH_2PO_4$	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
$NaN_3$	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
$NaOH$	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
Paraformaldehyd	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Paramount	<i>Polysciences Inc.</i> (Warrington, PA/USA)
Penicillin G	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	<i>Seromed</i> (Berlin, Deutschland)
Protease Inhibitor Cocktail	<i>Roche</i> (Basel, Schweiz)
Protogold Detection Kit™	<i>BBI International</i> (Plemington, NJ, USA)
Nitrozellulose Membran Hybond ECL RPN203 D	<i>Amersham Biotech</i> (Uppsala, Schweden)
RPMI 1640	<i>Biochrom</i> (Berlin, Deutschland)
Schaaf anti-Maus IgG (Alexa Fluor 546)	<i>Mobitech</i> (Göttingen, Deutschland)
Schaaf anti-Maus IgG (POD)	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
SDS	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
Sucrose	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
TEMED	<i>Applichem</i> (Darmstadt, Germany)
Trietanolamin	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
Tris	<i>ICN Biochemicals</i> (Eschwege, Deutschland)
TRITC-Phalloidin	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
TritonX-100	<i>Sigma-Aldrich</i> (Deisenhofen, Deutschland)
Tween20	<i>ICN Biochemicals</i> (Eschwege, Deutschland)

## C Geräte

### C.1 Zellkultur

Laminar flow hood BSB 6A und BSB 4A	<i>Gelaire</i> (Meckenheim, Deutschland)
Wasserbad GFL 1004	<i>GFL</i> (Burgwedel, Deutschland)
Brutschrank Inkubator IG 150	<i>Astel</i> (Chateau Gontier, Frankreich)
Autoklav Steam Sterilisator 3870EL	<i>Jürgens</i> (Münster, Deutschland)

### C.2 Zentrifugen

Avanti 300	<i>Beckmann</i> (München, Deutschland)
Zentrifuge 5415 D	<i>Eppendorf</i> (Hamburg, Deutschland)
Zentrifugen 5804 R	<i>Eppendorf</i> (Hamburg, Deutschland)
Ultrazentrifuge Optima-L70 mit Rotot JA-14	<i>Beckmann</i> (München, Deutschland)

### C.3 Elektrophorese und Blotten

Power Supply EPS 1000	<i>Amersham Biotech</i> (Uppsala, Schweden)
Power Pac 200	<i>BioRad</i> (Hercules, Californien/USA)
Semi-dry Blotting Ausstattung	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)
SDS-Gelelektrophorese	<i>Sigma</i> (Steinheim, Deutschland)

### C.4 Mikroskopie

Inverses Phasenkontrast Mikroskop	<i>Leica</i> (Wetzlar, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop Diaphot TMD	<i>Nicon</i> (Düsseldorf, Deutschland)
CLSM TCS SL	<i>Leica</i> (Wetzlar, Deutschland)

### C.5 Photometer

Shimadzu UV-2100	<i>Shimadzu</i> (Düsseldorf, Deutschland)
Microplate Reader	<i>Dynatech</i> (Denkendorf, Deutschland)

### C.6 Sonstiges

Scintillationszähler	<i>Beckmann</i> (München, Deutschland)
Agfa Curix 60 Film Processor	<i>Agfa</i> (Leverkusen, Deutschland)
Waage	<i>Sartorius</i> (Göttingen, Deutschland)
Magnet	<i>Dynal Biotech</i> (Oslo, Norwegen)
MilliQ RO 10 Plus Wasserbereiter	<i>Millipore</i> (Eschborn, Deutschland)
pH-Meter pH 213	<i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland)
Vortex	<i>IKA Labortechnik</i> (Staufen, Deutschland)

## C.7 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturschalen	<i>Nunc</i> (Wiesbaden, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen	<i>Greiner</i> (Frickenhausen, Deutschland)
Cyro-Röhrchen	<i>Nunc</i> (Wiesbaden, Deutschland)
Glasdeckgläschen	<i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland)
Multiwell Zellkulturplatten	<i>Nunc</i> (Wiesbaden, Deutschland)
Petrischalen	<i>Greiner</i> (Frickenhausen, Deutschland)
Sterilfilter	<i>Sarto</i> (Göttingen, Deutschland)
Whatman Papier	<i>Whatman</i> (Maidstone, UK)

## D Verwendete Skripte und Steuerdateien

### D.1 Eingabedateien für die verwendeten Programme

#### D.1.1 MODELLER Steuerdateien

Folgende Steuerdateien wurden für das Programm MODELLER bei der Erstellung der Modelle verwendet.<sup>136</sup>

#### Steuerdateien für die Modellierung der ATP Bindungsdomäne im Komplex *mit* ATP

```
INCLUDE
SET ALNFILE = 'ABC2vs1MV5mitATP.ali'
SET KNOWNNS = '1MV5'
SET SEQUENCE = 'ABC2'
SET STARTING_MODEL = 1
SET ENDING_MODEL = 150
SET TOPOLOGY_MODEL = 3, HYDROGEN_IO = off, WATER_IO = off, \\
  HETATM_IO = on
SET TOPLIB = '/usr/src/modeller6v2/modlib/top_heav.lib'
SET PARLIB = '/usr/src/modeller6v2/modlib/par.lib'
SET DEVIATION = 4.0
SET LIBRARY_SCHEDULE = 1
SET MAX_VAR_ITERATIONS = 300
SET FINAL_MALIGN3D = 1
SET MD_LEVEL = 'refine_1'
CALL ROUTINE = 'model'
SET OUTPUT_CONTROL = 1 1 1 1 1
SET OUTPUT = 'LONG'
ENERGY OUTPUT = 'ENERGY_PROFILE'
```

Sequenzalignment Steuerdatei für MODELLER :

```
>P1;1MV5
structureX:1MV5:342:..:584:.....:
-----ML SARH VDFAY-DDSEQILRDISFEAQPNSIIAFAGPSGGGKSTIFSL
LERFYQPTAGEITIDGQPIDNISLENWRSQIGFVSQDSAIMAGTIRENLTYGLEGDYTDE
DLWQVLDLAFARSFVENMPDQLNTEVGERGVKISGGQRQLAIARAFLRNPKILMLDEAT
ASLDSESESMVQKALDSLKMGRTTLVIAHRLSTIVDADKIYFIEKGQITGSGKHNELVAT
HPLYAKYVSEQLTVG-@
*
```

```
>P1;ABC2
sequence:ABC2:.....:

```

```

ETAPPSSWPQVGRVEFRNYCLRYREDLDFVLRHINVTINGGEKVGIVGRTGAGKSSLTLG
LFRINESAEGEIIIDGINIAKIGLHDLRFKITIIPQDPVLFSGSLRMNLDP--FSQYSDE
EVWTSLELAHLKDFVSALPKLDHECAEGGENLSVGQRQLVCLARALLRKTILVLDEAT
AAVDLETDDLQSTIRTQFEDCTVLTIAHRLNTIMDYTRVIVLVDKGEIQEYGAPSDLLQQ
RGLFYMAKDAGLV--@
*

```

**Steuerdateien für die Modellierung der ATP Bindungsdomäne ohne ATP**

```

INCLUDE
SET OUTPUT_CONTROL = 1 1 1 1 1
SET OUTPUT = 'LONG'
SET ALNFILE = 'ABC2AXP_komplett.ali'
SET KNOWNNS = '1MT0' '1PF4'
SET SEQUENCE = 'ABC2'
SET STARTING_MODEL = 1
SET ENDING_MODEL = 100
SET DEVIATION = 4.0
SET LIBRARY_SCHEDULE = 1
SET MAX_VAR_ITERATIONS = 300
SET FINAL_MALIGN3D = 1
SET MD_LEVEL = 'refine_1'
CALL ROUTINE = 'model'
ENERGY OUTPUT = 'ENERGY_PROFILE'

```

**Alignement Datei für MODELLER (lange Sequenz)**

```

>P1;1MT0
structureX:1MT0:.....:
-----
-----
-----
-----
-----DITF
RNIRFRYKPDSPVILDNINLSIKQGEVIGIVGRSGSGKSTLTCLIQRFYIPENGQVLIDG
HDLALADPNWLRQVGVVLQDNVLLNRSIIDNISLANP-GMSVEKVIYAAKLAGAHDFIS
ELREGYNTIVGEQGAGLSGGQRQRIAIARALVNNPKILIFDEATSALDYESEHVIMRNMH
KICKGRTVIIIAHRLSTVKNADRIIVMEKGKIVEQGHKHELLSEPESELYSYLYQLQSD
*

```

```

>P1;1PF4
structureX:1PF4:.....:

```







```

genbox -cp ${MOL}.gro -cs spc216.gro -o ${MOL}_b4em.gro\\
      -p ${MOL}.top
#### verwendete Parameter #####
cpp                = /lib/cpp
define             = -DFLEXIBLE
integrator         = steep
dt                 = 0.001
nsteps            = 500
emtol              = 1000.0
emstep            = 0.01
nstlist           = 10
ns_type           = grid
rlist              = 0.9
coulombtype       = PME
rcoulomb          = 0.9
rvdw              = 0.9
fourierspacing    = 0.12
fourier_nx        = 0
fourier_ny        = 0
fourier_nz        = 0
pme_order         = 4
ewald_rtol        = 1e-5
optimize_fft      = yes
constraints       = none
#####
grompp -v -f em1 -c ${MOL}_b4em -p ${MOL} -o ${MOL}_em
genion -s ${MOL}_em -o ${MOL}_em_ions.gro -pname Na -np 10
grompp -v -f em1 -c ${MOL}_em_ions -p ${MOL} -o ${MOL}bc
mdrun -v -nice 4 -s ${MOL}bc -o ${MOL}bc -c ${MOL}b4pr \\
      -e ${MOL}bc_energie
#### verwendete Parameter #####
warnings          = 10
cpp               = /lib/cpp
define            = -DPOSRES
constraints       = all-bonds
integrator        = md
dt                = 0.002
nsteps           = 10000
nstcomm          = 1
nstxout          = 250
nstvout          = 1000

```

```

nsthout          = 0
nsthlog          = 10
nsthenergy       = 10
nsthlist         = 10
ns_type          = grid
rlist            = 0.9
coulombtype      = PME
rcoulomb         = 0.9
rvdw             = 0.9
fourierspacing  = 0.12
fourier_nx       = 0
fourier_ny       = 0
fourier_nz       = 0
pme_order        = 4
ewald_rtol       = 1e-5
optimize_fft     = yes
Tcoupl           = berendsen
tau_t            = 0.1 0.1 0.1
tc-grps          = protein sol Na
ref_t            = 300 300 300
Pcoupl           = berendsen
tau_p            = 0.5
compressibility  = 4.5e-5
ref_p            = 1.0
gen_vel          = yes
gen_temp         = 300.0
gen_seed         = 173529
#####
grompp -f PR -c ${MOL}b4pr -p ${MOL} -o ${MOL}PR
mdrun -v -nice 4 -s ${MOL}PR -o ${MOL}PR -c ${MOL}PR
#### verwendete Parameter #####
cpp              = /lib/cpp
define           = -DFLEXIBLE
integrator       = l-bfgs
tinit           = 0
dt              = 0.001
nsteps          = 10000
init_step       = 0
comm_mode       = Linear
nstcomm         = 1
emtol           = 100.0

```

```

emstep                = 0.01
nbfscorr              = 10
nstxout               = 100
nstvout               = 100
nstenergy             = 10
nstlist               = 10
ns_type               = grid
rlist                 = 0.9
coulombtype           = PME
rcoulomb              = 0.9
rvdw                  = 0.9
fourierspacing       = 0.12
fourier_nx            = 0
fourier_ny            = 0
fourier_nz            = 0
pme_order             = 4
ewald_rtol            = 1e-5
optimize_fft          = yes
constraints           = none
#####
grompp -f EM -c ${MOL}PR -p ${MOL} -o ${MOL}EM
mdrun -nice 4 -s ${MOL}EM -o ${MOL}EM_trajektorie  \\
      -c ${MOL}EM_structure -e ${MOL}EM_energie  \\
      -x ${MOL}EM_trajektorie_xdr
#### verwendete Parameter #####
cpp                   = /lib/cpp
define                 = -DFLEXIBLE
integrator             = md
dt                    = 0.002
nsteps                = 25000
nstcomm               = 1
nstxout               = 50
nstvout               = 50
nstfout               = 50
nstlog                = 50
nstenergy             = 50
nstlist               = 10
ns_type               = grid
rlist                 = 0.9
coulombtype           = PME
rcoulomb              = 0.9

```

```

rvdw = 1.0
fourierspacing = 0.12
fourier_nx = 0
fourier_ny = 0
fourier_nz = 0
pme_order = 6
ewald_rtol = 1e-5
optimize_fft = yes
Tcoupl = berendsen
tau_t = 0.1 0.1 0.1
tc-grps = protein Na SOL
ref_t = 300 300 300
Pcoupl = berendsen
pcoupltype = isotropic
tau_p = 0.5
compressibility = 4.5e-5
ref_p = 1.0
gen_vel = yes
gen_temp = 300
gen_seed = 179529
constraints = all-bonds
#####
grompp -f MD -c ${MOL}EM_structure -p ${MOL} -o ${MOL}MD
mdrun -v -nice 4 -s ${MOL}MD -o ${MOL}MD_trajektorie \\
      -c ${MOL}MD_structure -e ${MOL}MD_energie \\
      -x ${MOL}MD_trajektorie_xdr

```

### D.1.3 Steuerdatei für APBS

```

read
  mol pqr 10957882924.pqr
end
elec
  mg-auto
  dime 129 129 129
  cglen 87.5262 83.4564 98.9230
  fglen 71.4860 69.0920 78.1900
  cgcent mol 1
  fgcent mol 1
  mol 1
  lpbe

```

```
bcfl sdh
ion 1 0.150 2.0
ion -1 0.150 2.0
pdie 2.0
sdie 78.54
srfm smol
chgm spl2
srad 1.4
swin 0.3
temp 298.15
gamma 0.105
calcenergy total
calcforce no
end
elec
mg-auto
dime 129 129 129
cglen 87.5262 83.4564 98.9230
fglen 71.4860 69.0920 78.1900
cgcent mol 1
fgcent mol 1
mol 1
lpbe
bcfl sdh
ion 1 0.150 2.0
ion -1 0.150 2.0
pdie 2.0
sdie 2.00
srfm smol
chgm spl2
srad 1.4
swin 0.3
temp 298.15
gamma 0.105
calcenergy total
calcforce no
end
print energy 2 - 1 end
quit
```





# LEBENS LAUF

## PERSÖNLICHE DATEN

---

Geburtsdatum: 22 Oktober 1974  
Geburtsort: Siegen, Deutschland  
Familienstand: ledig  
Eltern: Konrad und Anna Schröder (geb. Mansen)

## DISSERTATION

---

seit 10/2001 Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hans-Joachim Galla

## PRÜFUNGEN

---

16.10.2001 Diplom im Fach Chemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster  
09.04.1999 Vordiplom im Fach Chemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

## FÖRDERUNGEN

---

10/2001–09/2004 Stipendium der International Graduate School of Chemistry

## TÄTIGKEITEN

---

06/2001–09/2001 Studentische Hilfskraft im Institut für Biochemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

## STUDIUM

---

10/1996–09/2001 Studium der Chemie mit dem Studienziel Diplom, Westfälische Wilhelms Universität Münster  
04/2000–10/2000 Auslandsemester in der Arbeitsgruppe von P. J. Sadler, University of Edinburgh, UK

## ZIVILDienst

---

1995–1996 Zivildienst im Altenpflegeheim der Arbeiterwohlfahrt in Emden

## SCHULBILDUNG

---

17.05.1995 Erwerb der Hochschulreife in Leer, Ostfriesland  
1987–1995 Gymnasium Teletta-Groß in Leer (Gymnasium)  
1981–1985 Plytenbergschule in Leer (Grundschule)

Münster, 13. Februar 2005

## Danksagung

*Mein Dank gilt all denen, die direkt oder indirekt an dem Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren, indem sie mir hilfreich zur Seite standen und mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützten.*

*Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Galla danke ich ganz herzlich für die interessante Themenstellung, seine stetige Diskussionsbereitschaft sowie den Freiraum für die Gestaltung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit.*

*Ich möchte mich bei meinen Mentoren Herrn Prof. Dr. Bernt Krebs, Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Hinz und Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Galla sowie der International Graduate School of Chemistry für die wissenschaftliche und finanzielle Förderung bedanken, die sie mir zukommen ließen.*

*Für die bereitwillige Überlassung der H69AR Zellen möchte ich Prof. S. P. Cole danken.*

*Für die kritische Durchsicht meines Manuskriptes und ihre wertvollen Ratschläge danke ich Silke, Sebastian und insbesondere Daniel. Bei Janita bedanke ich mich ganz herzlich für die Hilfe bei der Korrektur in stürmischen Zeiten.*

*Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern des Institutes, die eine wundervolle Zusammenarbeit auch über die Schranken von Arbeitskreisen ermöglichten. Insbesondere danke ich Jörg, Nadja, Thorsten und Heike sowie Holger für Aktivitäten außerhalb der Arbeitszeit, die mir sehr viel Spaß bereitet haben.*

*Ich möchte Anja danken, die mir mit Rat, Tat und oft auch Ressourcen beigestanden hat und sich dabei nie beklagte. Sabine danke ich für ihre hervorragende Einarbeitung in die Zellkultur und ihr beständiges Engagement alles am Laufen zu halten.*

*Meinen besten Freunden Adriano und Jörg möchte ich für ihre Freundschaft danken! Meike bekommt den Preis der besten Mitbewohnerin, die es gibt, von mir!*

*Ich danke Sarah für all die wundervollen Jahre, die mir immer in Erinnerung bleiben werden.*

*Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lipidis danke ich für die tolle Zusammenarbeit und die gute Atmosphäre im Labor, die einem so manchen Tag die Arbeit leichter von der Hand gehen ließ. Die Zusammenarbeit mit Daniel Breitenstein, Christian Hennesthal, Lutz Hilterhaus, Andreas Hinz, Ute Klenz, Stefan Malcharek, Michaela Meyer, Pariya NaNakorn, Fabian Reuter, Silke Steffens, Sebastian Schrot, Stephanie Wulff war einzigartig. Vielen Dank, Stefan, Andreas, Sebastian und Daniel für euren Humor, der den Lipids erst die besondere Note gab. Ohne Steffi hätten wir eine gute Seele weniger am Institut. Vielen Dank für Deinen Einsatz. Danke auch Dir,*

*Pariya, für deine zahlreichen selbstlosen Hilfsangebote.*

*Bei meinen Eltern und meinen Geschwistern Timo, Sabrina und Torben möchte ich mich für den familiären Rückhalt und ihr Vertrauen bedanken, ohne das diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.*