

Biochemie

Abcg2 an der porcinen Blut-Hirn-Schranke

(Methoden zur funktionellen Charakterisierung)

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

**vorgelegt von
Markus Seidl
aus Wilhelmshaven**

Dekan: Prof. Dr. F. Ekkehardt Hahn
Erster Gutachter: Prof. Dr. H.-J. Galla
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. K.-H. Klempnauer

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2008

Tag der Promotion: 18.07.2008

Gesine, Johanna und meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1. Schrankensysteme im Gehirn | 1 |
| 1.2. Blut-Hirn-Schranke (BHS) | 2 |
| 1.2.1. <i>Tight junctions</i> | 3 |
| 1.2.2. Stofftransport an der BHS | 5 |
| 1.3. <i>Multidrug-resistance (MDR)</i> | 6 |
| 1.4. <i>MDR-Transporter an der BHS</i> | 6 |
| 1.5. ABC-Transporter | 7 |
| 1.5.1. Struktureller Aufbau | 10 |
| 1.5.2. P-Gp (P-Glykoprotein, MDR1, ABCB1) | 10 |
| 1.5.3. ABCG2 (BCRP) | 12 |
| 1.6. RNA-Interferenz (RNAi) | 15 |
| 1.7. Zielsetzung | 18 |
| 2. METHODEN | 19 |
| 2.1. Zellkultur | 19 |
| 2.1.1. Beschichtung der Kulturgefäße | 19 |
| 2.1.2. <i>PBCEC</i> als Modellsystem für die Blut-Hirn-Schranke (BHS) <i>in vitro</i> | 20 |
| 2.1.3. Permanente Zelllinien | 24 |
| 2.2. Transfektionsmethoden | 26 |
| 2.2.1. Kalziumphosphat-Kopräzipitation | 27 |
| 2.2.2. Transfektion mittels kationischer Lipide (Liposomale Transfektion) | 28 |
| 2.2.3. <i>Nukleofektion</i> | 32 |
| 2.2.4. Adenoviraler Gentransfer | 33 |
| 2.3. Untersuchungen zur Funktionalität des Transporters | 33 |
| 2.3.1. Zytotoxizitätstest | 34 |
| 2.3.2. <i>Uptake</i> -Messungen | 36 |
| 2.3.3. Bestimmung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER) | 37 |
| 2.3.4. Fluoreszenz Mikroskopie | 38 |
| 2.4. Molekularbiologische Arbeiten | 39 |
| 2.4.1. Agarosegelelektrophorese von DNA | 39 |
| 2.4.2. Quantifizierung von Nukleinsäuren | 40 |

II

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.4.3. | DNA-Isolierung aus Agarosegelen | 40 |
| 2.4.4. | Isolierung von Plasmid-DNA | 41 |
| 2.4.5. | RNA-Isolierung | 43 |
| 2.4.6. | Erststrang-cDNA-Synthese für PCR | 43 |
| 2.4.7. | Polymerasekettenreaktion (PCR) | 44 |
| 2.4.8. | Konstruktion der Expressions-Vektoren | 47 |
| 2.4.9. | Ligation | 48 |
| 2.4.10. | TA-Cloning | 48 |
| 2.4.11. | Sequenzierung | 48 |
| 2.5. | Mikrobiologische Arbeiten | 49 |
| 2.5.1. | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen | 49 |
| 2.5.2. | Transformation von <i>E. coli</i> | 49 |
| 2.5.3. | Kultivierung von <i>E. coli</i> Zellen | 50 |
| 2.5.4. | Lagerung von <i>E. coli</i> | 50 |
| 2.6. | Proteinbiochemische Methoden | 50 |
| 2.6.1. | Proteinisolierung | 50 |
| 2.6.2. | Proteinkonzentrationsbestimmung | 51 |
| 2.6.3. | Diskontinuierliche-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Disk-SDS-PAGE) | 51 |
| 2.6.4. | Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western Blot) und Immunodetektion | 53 |
| 2.6.5. | Immunozytochemische Färbungen | 55 |
| 2.6.6. | Zelloberflächen-Biotinylierung | 56 |
| 2.6.7. | Deglykosylierung | 58 |
| 3. | ERGEBNISSE | 59 |
| 3.1. | Regulation/Induktion der pAbcg2-Expression in PBCEC | 59 |
| 3.1.1. | Einfluss verschiedener potentieller Substrate und Modulatoren auf die Expression von Abcg2 und Abcb1 (P-Glykoprotein (P-Gp)) in <i>PBCEC</i> | 59 |
| 3.1.2. | Apikale Oberflächenexpression von pAbcg2 unter Hydrocortison-Einfluss | 61 |
| 3.1.3. | Einfluss verschiedener Hydrocortison-Konzentrationen auf die Expression von Abcg2 in <i>PBCEC</i> unter serumfreien und serumhaltigen Bedingungen | 62 |
| 3.1.4. | Inhibition des durch Hydrocortison induzierten Anstiegs der Abcg2-Expression | 63 |
| 3.2. | Expressionsinhibierung von Abcg2 durch RNA-Interferenz | 66 |
| 3.2.1. | Direkte Transfektion von siRNA-Oligonukleotiden mittels kationischer Lipide | 66 |
| 3.2.2. | Überprüfung der Transfektionseffizienz von <i>PBCEC</i> mittels GFP exprimierender Vektoren | 69 |
| 3.3. | Generierung von pAbcg2 überexprimierenden Zelllinien | 74 |
| 3.4. | Charakterisierung der generierten ABCG2 exprimierenden Zelllinien | 75 |
| 3.4.1. | Immunozytochemische Färbungen | 75 |
| 3.4.2. | Western Blot Analysen der überexprimierten ABCG2-Transporter | 78 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.4.3. | Zytotoxizitätstest | 86 |
| 3.4.4. | <i>Uptake</i> Messungen an <i>MDCK</i> -YFP/pAbcg2 und <i>HEK</i> -YFP/pAbcg2-Zellen | 97 |
| 4. | DISKUSSION | 99 |
| 4.1. | Regulation/Induktion der Abcg2-Expression in PBCEC | 100 |
| 4.2. | Expressionsinhibierung von ABCG2 durch RNA-Interferenz | 103 |
| 4.2.1. | Expressionsinhibierung von ABCG2 durch Transfektion von siRNA | 103 |
| 4.2.2. | Vektor-Transfektion von <i>PBCEC</i> | 105 |
| 4.3. | Generierung und Charakterisierung von ABCG2 exprimierenden Zelllinien | 108 |
| 4.3.1. | Western-Blot-Analysen und immunozytochemische Färbungen | 109 |
| 4.3.2. | Zytotoxizitäts- und <i>Uptake</i> -Messungen | 112 |
| 5. | ZUSAMMENFASSUNG | 116 |
| 6. | AUSBLICK | 118 |
| 7. | LITERATUR | 120 |
| 8. | ANHANG | 135 |
| 8.1. | Abkürzungen | 135 |
| 8.2. | Material | 139 |
| 8.2.1. | Chemikalien / Kits | 139 |
| 8.2.2. | Verbrauchsmaterialien | 142 |
| 8.2.3. | Geräte und Software | 142 |
| 8.3. | Genotyp des verwendeten <i>E. coli</i> K12 Stammes | 143 |
| 8.4. | Primer/siRNA | 144 |
| 8.5. | Sequenzen der klonierten Transporter | 145 |
| 8.6. | Vektoren | 150 |
| 8.6.1. | Klonierungsvektor | 150 |
| 8.6.2. | Eukaryotische Expressions-Vektoren/Systeme | 151 |
| 8.6.3. | generierte ABCG2-Expressionsvektoren | 154 |
| 8.7. | Abbildungsverzeichnis | 155 |
| 8.8. | Tabellenverzeichnis | 157 |

1. Einleitung

Die Blut-Hirn-Schranke stellt eine anatomische und physiologische Barriere dar, die es ermöglicht, das zentrale Nervensystem vor seiner Umgebung zu schützen. Anatomische Basis dieses Schrankensystems sind die Endothelzellen der Mikrokapillaren des Gehirns. Sie bilden aufgrund ihrer gegenüber anderen Endothelzellen speziell differenzierten *tight junctions* eine anatomische Barriere, die parazellulären Stofftransport nahezu unterbindet (BRIGHTMAN und REESE, 1969). Darüber hinaus verfügen diese Endothelzellen über metabolische Charakteristika, die es ihnen ermöglichen den über sie vermittelten Stoffaustausch zwischen Blut und Gehirn zu kontrollieren. So versorgen spezifische Transportproteine das Gehirn mit den für seine funktionelle Aufrechterhaltung essentiellen Substanzen.

Eine besondere und anders gelagerte Bedeutung kommt in diesem Zusammenhang den sogenannten *multidrug resistance-(MDR)*-Transportern zu, dessen Vertreter ABCG2 im Blickpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit steht. Diese Gruppe von Proteinen ermöglicht den Transport einer breiten Palette xenobiotischer Substanzen, darunter zahlreicher Arzneimittel. So wichtig diese Transporter für den Schutz des Gehirns vor potentiell schädlichen Substanzen sind, so folgenschwerer ist es, wenn sich ihre Bestimmung ins Gegenteil verkehrt und Erkrankungen des ZNS schwer behandelbar werden, weil den in der Therapie eingesetzten Arzneistoffen der Übergang ins Gehirn verwehrt bleibt.

1.1. Schrankensysteme im Gehirn

Das ZNS stellt einen Schonraum dar, der durch verschiedene Barrieren geschützt wird. Diese Barrieren sorgen für eine selektive Auf- und Abgabe sowie metabolische Umsetzung von endogenen und exogenen Substanzen. Sie sorgen hierdurch für die Aufrechterhaltung eines für die neuronale Funktion unentbehrlichen konstanten inneren Milieus (Homöostase) und spielen eine wichtige Rolle beim Schutz des Gehirns vor dem Zutritt etwaiger neurotoxischer Substanzen. Sie sind Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Funktion, im speziellen der neuronalen Signaltransduktionsprozesse, des Gehirns.

Es lassen sich drei wesentliche Barrieren unterscheiden (ABBOTT, 2005). Dies sind die Blut-Hirn-Schranke (BHS), repräsentiert durch die Kapillarendothelzellen des Gehirns, die ein Schrankensystem zwischen dem Blutkreislauf und dem Gehirnparenchym bilden und die Blut-Liquor-Schranke (BLS), an deren Aufrechterhaltung die Epithelzellen des *Plexus chorioideus* (CP) und das Neurothel der *Arachnoidea* (Spinnwebhaut) beteiligt sind. Den an diesen Barrieren beteiligten Zellen (Endothel- bzw. Epithelzellen) ist dabei gemeinsam, dass sie untereinander durch speziell differenzierte *tight junctions* verbundenen sind. Diese

minimieren einen parazellulären Stofftransport und bilden dadurch die Grundlage für einen aktiv gesteuerten Transport von Substanzen über die Zellmembran.

1.2. Blut-Hirn-Schranke (BHS)

Die Existenz einer Permeabilitätsbarriere zwischen Blut und Gehirn zeigte als erster der Bakteriologe PAUL EHRLICH. Er injizierte Versuchstieren intravenös den Farbstoff Trypanblau und beobachtete, dass alle Organe mit Ausnahme des Gehirns angefärbt wurden (EHRLICH, 1885). EHRLICH dachte, dass der Farbstoff keine Affinität zu dem Hirngewebe besitzt und daher dort keine Anfärbung zu sehen war. Sein Student EDWIN GOLDMANN konnte allerdings zeigen, dass durch direkte Injektion des Farbstoffs in die Zerebrospinalflüssigkeit Teile des Gehirns, aber keine anderen Gewebe angefärbt wurden (GOLDMANN, 1913).

Bis Ende der sechziger Jahre konnte nicht eindeutig geklärt werden, welche zellulären Strukturen für die Ausprägung der BHS verantwortlich sind. Erst 1967 gelang REESE und KARNOVSKY in elektronenmikroskopischen Untersuchungen ein entsprechender Nachweis. Sie injizierten Versuchstieren Meerrettich-Peroxidase und zeigten, dass dieses Enzym die dichten Zell-Zell-Kontakte (*tight junctions*) der zerebralen Kapillarendothelzellen (*brain capillary endothelial cells, BCEC*) nicht überwinden konnte (REESE und KARNOVSKY, 1967). Damit war das Hirnkapillarendothelium als anatomische Grundlage der BHS identifiziert.

Neben den dichten *tight junctions* unterscheiden sich die Endothelzellen der BHS gegenüber peripheren Endothelzellen durch minimale Pinocytose und nicht vorhandene Fenestrierungen (FENSTERMACHER et al., 1988; SEDLAKOVA et al., 1999).

Abb. 1-1 gibt einen Überblick über den Aufbau einer Hirnkapillare und der angrenzenden Gewebe. Das Lumen (1) der Kapillare ist von Endothelzellen (2) umschlossen. Ein Gürtel aus dichten *tight junctions* (3) verbindet die Endothelzellen miteinander und bewirkt, dass sich eine interzelluläre Barriere zu dem umgebenden Hirngewebe (7) ausbildet.

Die BCEC sind an der abluminalen Seite von einer Basalmembran (4) umgeben, die eine Fusion der vaskulären und der Basalmembran der *lamina limitans gliae perivascularis*, darstellt (BECHMANN et al., 2007). Die *lamina limitans gliae perivascularis* entspricht den Astrozytenfortsätzen (6), die flächendeckend die BCEC umgeben. Die Astrozyten kommunizieren über ihre Fortsätze (Astrozyten-Endfüßchen) mit den BCEC und spielen in der Interaktion mit diesen eine wichtige Aufgabe in der Regulation des Wasser- und Elektrolyt-Haushaltes des Gehirns (ABBOTT et al., 2006).

Die Basalmembran besteht aus verschiedenen Proteinen der extrazellulären Matrix wie Laminin, Collagen IV, Fibronectin und Proteoglykanen (DERMIETZEL und KRAUSE, 1991). In ihr eingebettet sind Perizyten, die ca. 40-60 % der Endothelzellfläche abdecken (FRANK et al., 1990). Perizyten und vaskuläre glatte Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMC) haben gemeinsame Vorläuferzellen. Untersuchungen belegen, dass Perizyten den Blutfluss in Gehirnkapillaren durch Kontraktion und Relaxation regulieren können und demnach in ähnlicher Weise wirken wie VSMC in Arteriolen (VIRGINTINO et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die Angiogenese von Gehirndothelzellen (*brain endothelial cells*, BEC) im Telencephalon durch Perizyten gelenkt wird. Darüber hinaus drängt sich durch *in vitro* Untersuchungen an BEC der Verdacht auf, dass Perizyten die BHS-Permeabilität verringern, für die Aufrechterhaltung der vaskulären Integrität mit verantwortlich sind und die Ausdifferenzierung der Gefäße unterstützen. Sie könnten demnach im Einfluss auf die Integrität der BHS ähnlich wichtig sein wie die Astrozyten (NAKAGAWA et al., 2007).

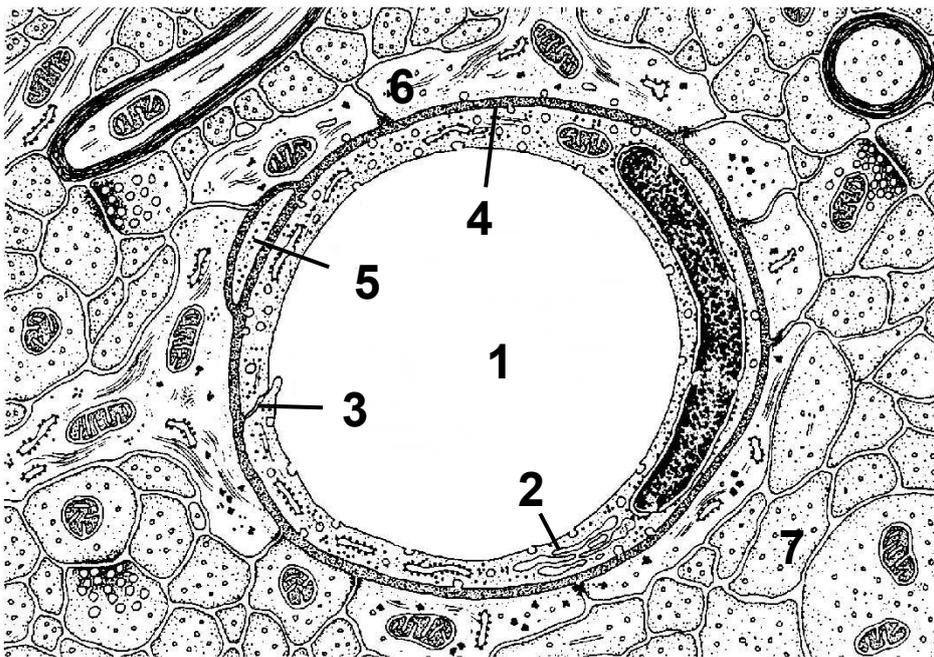


Abb. 1-1 Schematischer Querschnitt einer Hirnkapillare mit angrenzendem Gewebe
 (1) Kapillarlumen, (2) Endothelzelle, (3) *tight junction*, (4) Basalmembran, (5) Pericyt, (6) Astrozyten-Endfüßchen, (7) Hirngewebe; modifiziert nach (KRSTIC, 1988)

1.2.1. *Tight junctions*

Der Aufbau der *tight junctions* (*TJ*, lat.: *zonulae occludentes*) ist komplex (vgl. Abb. 1-2). Zu den wichtigsten strukturgebenden Transmembranproteinen gehören Occludin, die

Claudine und *JAMs* (*junctional adhesion molecules*) sowie assoziierte Proteine wie die der *zonula occludens* (ZO).

Während die Hauptaufgabe des Occludins in der Regulation der *TJ* zu finden ist (YU et al., 2005), sind die an den *TJ* der BHS exprimierte Claudine 3 und 5 für die hohen transendothelialen elektrischen Widerstände (*transendothelial/epithelial electrical resistance*, TEER) verantwortlich (WOLBURG und LIPPOLDT, 2002).

JAM-A, JAM-B und JAM-C wurden in Gehirn-Endothelzellen nachgewiesen und sind an der Ausbildung und Aufrechterhaltung der *TJ* beteiligt. Diese Transmembranproteine sind an der zyttoplasmatischen Seite mit peripheren Adapterproteinen verbunden (ABBOTT et al., 2006). Zu diesen Adapterproteinen gehören die ZO-Proteine ZO-1 (STEVENSON et al., 1986), ZO-2 (GUMBINER, 1996) und ZO-3 (HASKINS et al., 1998), die an der zyttoplasmatischen Seite nahe der Plasmamembran lokalisiert sind. Diese gehören als intrazelluläre, membranassoziierte Bestandteile zur Familie der MAGUK (*membrane-associated guanylate kinase homologues*) und besitzen Bindungsstellen für Actin, das Hauptprotein des Cytoskeletts (Itoh et al., 1999b). Sie stellen damit eine Verbindung zwischen dem Zytoskelett und *TJ* her. Neben ihrer Funktion als Schrankenbildner für die parazelluläre Permeabilität bewirken die *TJ* zusätzlich eine Segregation der apikalen und basalen Domäne der Zelle. Diese Teilung trägt zur Erhaltung der Polarität der Zellen bei. Die Domänen zerebraler Kapillarendothelzellen (*brain capillary endothelial cells*) BCEC unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lipidzusammensetzung (TEWES und GALLA, 2001) und auch in der Verteilung spezifischer Transportsysteme (ZLOKOVIC, 2008).

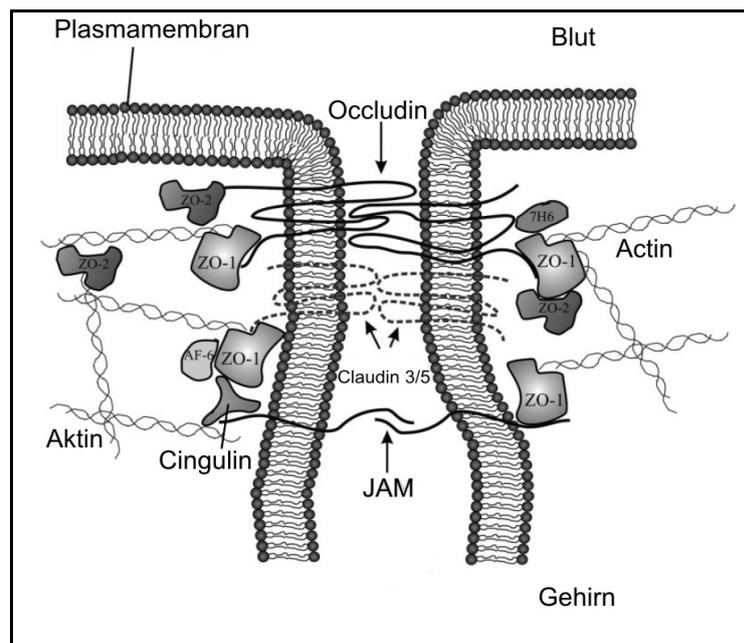


Abb. 1-2 Molekularer Aufbau der an der BHS gebildeten *tight junctions*; modifiziert nach (HAWKINS und DAVIS, 2005)

1.2.2. Stofftransport an der BHS

Die durch die *TJ* bewirkte parazelluläre Impermeabilität impliziert, dass der Stoffaustausch über die Endothelzellen der BHS transzellulär erfolgen muss. Für diesen transzellulären Transport stehen verschiedene Wege zur Verfügung (vgl. Abb. 1-3.). Während für hydrophile Moleküle diffusive Prozesse nahezu keine Rolle spielen, stellt für lipophile Substanzen, worunter auch viele Arzneimittel fallen die transzelluläre Diffusion den Haupttransportweg dar (**b**). Für viele physiologisch wichtige Nährstoffe aber auch Abfallstoffe existieren Transport-Proteine (**c**). Hierzu zählen u.a. Transporter für Glucose (Glut-1), Na-abhängige und unabhängige Transporter für Aminosäuren, sowie Transporter für Purinbasen und Nucleoside aber auch die am aktiven Efflux von Xenobiotika beteiligten ABC-Transporter P-Gp und ABCG2. Einige Substanzen werden durch rezeptorvermittelte Endozytose und Transzytose ins Interstitium des Gehirns transportiert. Hierzu gehören Peptide wie Insulin, das Eisentransportprotein Transferrin, Leptin und der insulin-ähnliche Wachstumsfaktor (insulin-like growth factor, IGF) (PARDRIDGE, 1999). Desweiteren besteht auch die Möglichkeit einer adsorptiven Endocytose und Transzytose, wie sie für kationisiertes Albumin beschrieben wurde (KUMAGAI et al., 1987).

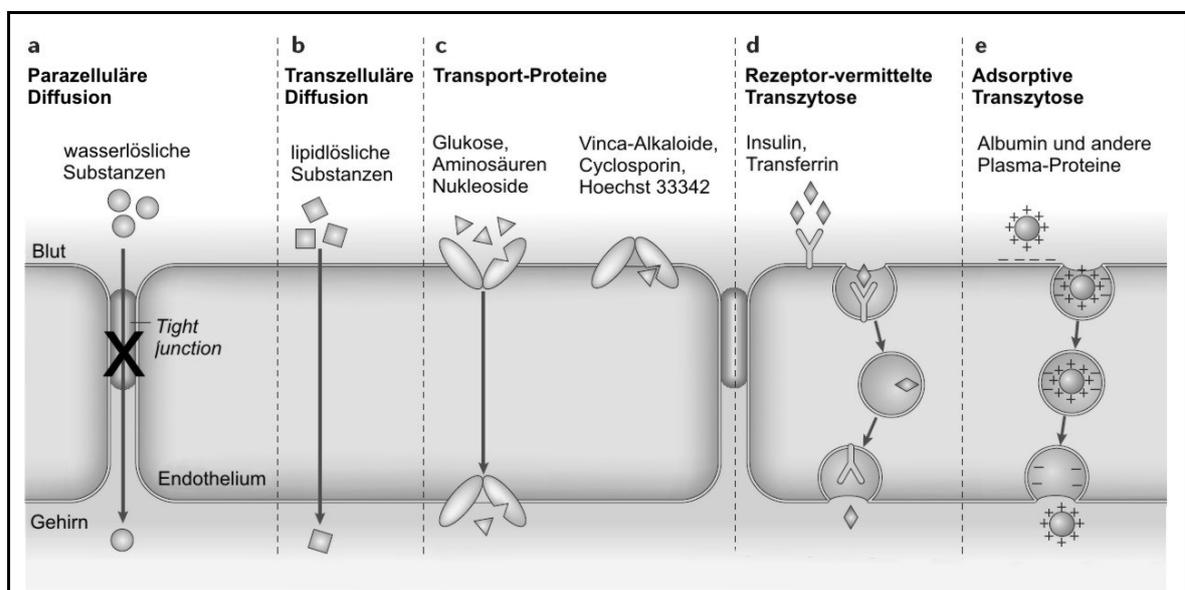


Abb. 1-3 Transportwege über die BHS. **a** Durch *tight junctions* wird die parazelluläre Diffusion für wasserlösliche Substanzen nahezu unterbunden, **b** Eine transzelluläre Diffusion für lipidlösliche Substanzen über die BHS ist hingegen möglich, **c** Die Endothelzellmembran enthält Transporter z.B. für Glukose, Aminosäuren und andere Substanzen. Einige dieser Transporter sind primär energieabhängig und fungieren als Effluxpumpen. **d** Insulin und Transferrin werden durch rezeptorvermittelte Endozytose und Transzytose ins Gehirn überführt, **e** Plasma-Proteine wie Albumin werden nur schwach transportiert. Allerdings kann ihr Transport in Form der adsorptiv vermittelten Endozytose und Transzytose durch Kationisierung gesteigert werden, modifiziert nach (ABBOTT et al., 2006)

1.3. *Multidrug-resistance (MDR)*

Der Begriff der *multidrug-resistance (MDR)*, zu deutsch: Multiresistenz) bezeichnet ein Phänomen, das während der Behandlung von Infektionen oder Tumoren zu beobachten ist und sich darin äußert, dass die Zielzellen (Mikroorganismen, Tumorzellen) gegenüber einer breiten Palette von Arzneistoffen mit unterschiedlicher Struktur und Wirkungsweise resistent sind.

Transmembrantransporter, die aktiv xenobiotische Substanzen aus den Zellen ausschleusen sind eine mögliche Ursache für die Ausbildung dieser Multiresistenzen. Bedeutende Vertreter dieser *MDR* vermittelnden Transporter gehören zur Superfamilie der sogenannten ABC-Transporter. Diese Transporter werden nicht nur in malignen Zellen exprimiert, sondern schützen auch gesunde Zellen, Gewebe oder Organe vor potentiell zelltoxischen Substanzen. Das ZNS stellt als zentrales Steuerorgan der Vertebraten solch ein zu schützendes Organ dar. Es ist daher nicht verwunderlich, dass an der Blut-Hirn-Schranke, insbesondere in den sie bildenden Endothelzellen, die einen kontrollierten Stofftransport zwischen dem Blutstrom und der Interstitialflüssigkeit des Gehirns ermöglichen, *MDR*-Transporter exprimiert werden.

1.4. *MDR-Transporter an der BHS*

Die meisten an der *MDR* beteiligten Transporter, die bisher in zerebralen Kapillarendothelzellen identifiziert wurden gehören zur Gruppe der primär aktiven ABC-(*ATP-binding cassette*, ATP-Bindungskassette)-Transporter (LÖSCHER und POTSCHKA, 2005). Der bisher am Besten untersuchte Transporter dieser Gruppe ist das Expressionsprodukt des *MDR1*-Gens P-Gp (P-Glykoprotein, ABCB1). Dieses Protein besitzt eine hohe Affinität gegenüber einer breiten Palette von kationischen und lipophilen Substanzen und minimiert die Aufnahme zahlreicher Wirkstoffe wie z.B. in der Krebstherapie eingesetzter Zytostatika, Antibiotika, Hormone oder HIV-Protease-Inhibitoren. Neben P-Gp sind weitere ABC-Transporter auf Proteinebene in *BCEC* lokalisiert worden. Dies sind im Menschen das zur ABCC-Familie zuzurechnende MRP1, MRP4 und MRP5 (ABCC1, ABCC4 und ABCC5) sowie das zur ABC-Transporter Untergruppe G gehörende ABCG2. Darüber hinaus wird angenommen, dass auch Transporter der so genannten *solute carrier (SLC)* Superfamilie in *BCEC* an der *MDR* beteiligt sind. Auf Proteinebene wurde an *BCEC (bovine capillary endothelial cells)* OAT3 als Vertreter der organischen Aniontransporter (OAT) der *SLC22*-Genfamilie sowie Oatp2 und Oatp3 als Vertreter der organischen Anionentransporterpolypeptide der *SLCO*-Genfamilie nachgewiesen.

1.5. ABC-Transporter

ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter sind integrale Membranproteine, die sich im gesamten Spektrum der auf der Erde lebenden Organismen (Bakterien, Archaeen und Eukaryoten) wieder finden (HIGGINS, 1992). Bei den ABC-Transportern handelt es sich um eine der größten bekannten Proteinfamilien, deren Mitglieder zum Großteil primär aktiv lösliche Stoffe über Membranen transportieren. Die hierfür benötigte Energie wird durch Hydrolyse energiereicher Phosphatbindungen zumeist ATP bereitgestellt. Das Substratspektrum dieser so genannten ABC-Transporter-Superfamilie ist breit und reicht von einfachen anorganischen Ionen, Zuckern, Lipiden und Aminosäuren über größere Verbindungen wie Oligosaccharide und Polypeptide bis hin zu komplexen Proteinen.

Ausgehend von der Vielfalt der transportierten Substrate, sind die ABC-Transporter an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt. Dazu gehören neben aktiver Aufnahme von Nährstoffen in Bakterien, Prozesse wie Signaltransduktion, Protein Sekretion, Antigen Präsentation, bakterielle Pathogenese und Sporulation sowie Arzneimittel-Resistenz. Zudem sind im Zusammenhang mit der Dysfunktion von ABC-Transportsystemen im Menschen verschiedene Krankheiten bekannt, wie z.B. Cystische Fibrose (ABCC7), Adrenoleukodystrophie (ABCD1) und Morbus Stargardt (ABCA4).

Im Menschen sind bisher 49 verschiedene ABC-Transporter entdeckt worden, die sich basierend auf phylogenetischen Analysen in sieben Unterfamilien (ABCA - ABCG) ordnen lassen. Tab. 1-1 gibt Auskunft über diejenigen ABC-Transporter, von denen bekannt ist, dass sie in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert werden. Hierbei wird zwischen verschiedenen Spezies (Schwein, Maus, Rind und Mensch) unterschieden.

Es ist herauszustellen, dass die Expression und Lokalisation der Transporter in den *BCEC* speziesabhängig ist und die Expressionsstärke darüber hinaus in Abhängigkeit von Erkrankungen des ZNS oder der regelmäßigen Behandlung mit Chemotherapeutika variiert (HERMANN und BASSETTI, 2007). Von allen aufgelisteten ABC-Transportern ist bekannt, dass sie mit einer Vielzahl von Substraten darunter auch Chemotherapeutika wechselwirken können (vgl. Tab. 1-2).

Tab. 1-1 ABC-Transporter in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (modifiziert nach (HERMANN und BASSETTI, 2007))

| Transporter | Schwein | Maus | Rind | Mensch |
|--------------|---|--|--|---|
| ABCB1 | Proteinexpression in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen, luminale Lokalisation (NOBMAN et al., 2001) (FRICKER et al., 2002) | Proteinexpression in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen, luminale Lokalisation (SOONTORNMALAI et al., 2006) | Proteinexpression in kultivierten zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen, luminale Lokalisation (ZHANG et al., 2004) | Proteinexpression in zerebralen Kapillarendothelzellen, luminale und abluminale Lokalisation (BENDAYAN et al., 2006; CORDON-CARDO et al., 1989) |
| ABCC1 | keine mRNA- und Proteinexpression in frisch isolierten Endothelzellen, allerdings nach 10 Tagen in Kultur (GUTMANN et al., 1999) (FRICKER et al., 2002) | Proteinexpression in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen, abluminale Lokalisation (SOONTORNMALAI et al., 2006) | Proteinexpression in kultivierten zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen, luminale Lokalisation (ZHANG et al., 2004) | Proteinexpression in zerebralen Kapillarendothelzellen, luminale Lokalisation (NIES et al., 2004) |
| ABCC2 | Proteinexpression in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen, luminale Lokalisation (FRICKER et al., 2002) | Proteinexpression in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen, luminale und abluminale Lokalisation in C57bl/6 Swiss und SvJ aber keine Exp. in FVB-Mäusen (SOONTORNMALAI et al., 2006) | keine Protein- und mRNA-Expression in kultivierten Endothelzellen (ZHANG et al., 2004) | keine Proteinexpression (NIES et al., 2004) |
| ABCC3 | nicht bekannt | keine Proteinexpression in mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns (SOONTORNMALAI et al., 2006) | keine mRNA-Expression in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen, allerdings sehr geringe Expression in kultivierten Endothelzellen (ZHANG et al., 2000) | keine Proteinexpression (NIES et al., 2004) |
| ABCC4 | mRNA-Expression in kultivierten zerebralen Kapillarendothelzellen (DREES, 2004) | nicht bekannt | Proteinexpression in kultivierten zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen, luminale und abluminale Lokalisation (ZHANG et al., 2004) | Proteinexpression in zerebralen Kapillarendothelzellen, luminale Lokalisation (NIES et al., 2004) |
| ABCC5 | mRNA-Expression in kultivierten zerebralen Kapillarendothelzellen (DREES, 2004) | Proteinexpression, luminale Lokalisation (SOONTORNMALAI et al., 2006) | Proteinexpression in kultivierten zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen, luminale Lokalisation (ZHANG et al., 2004) | Proteinexpression in zerebralen Kapillarendothelzellen, luminale Lokalisation (NIES et al., 2004) |
| ABCC6 | nicht bekannt | endotheliale mRNA-Expression (BECK et al., 2003) | mRNA-Expression in kultivierten Endothelzellen (ZHANG et al., 2000) | keine mRNA-Expression in zerebralen Kapillarendothelzellen, de- tektierbar (NIES et al., 2004) |
| ABCG2 | Proteinexpression in kultivierten zerebralen Kapillarendothelzellen, luminale Lokalisation (DREES, 2004) | Proteinexpression in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen, luminale Lokalisation (LEE et al., 2006; TACHIKAWA et al., 2005) | nicht bekannt | Proteinexpression in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen, luminale Lokalisation (COORAY et al., 2002) |

Tab. 1-2 Substrate und Inhibitoren/Modulatoren von ABC-Transportern. Modifiziert nach (SZAKACS et al., 2006) unter Verwendung von (BAKOS und HOMOLYA, 2007; ROBEY et al., 2001; ROBEY et al., 2007; SCHINKEL et al., 1995; UHR et al., 2002; EJENDAL und HRYCYNA, 2005), Ein "+" markiert, dass die Substanz schon einmal als Substrat oder Inhibitor/Modulator des jeweiligen Transporters aufgefallen ist (Die Angaben fassen Ergebnisse aus unterschiedlichen Spezies und Zellsystemen zusammen). Leere Zellen weisen auf unerforschte oder abwesende Droge-Transporterbeziehungen hin. * Der Transport von einigen ABCG2-Substraten hängt von einer Aminosäurevariation an Position 482 ab (Wildtyp ist Arg482; Varianten Arg482Gly und Arg482Thr sind bekannt), +/- widersprüchliche Aussagen in der Literatur

| Substanzklasse | Substanz | Transporter | | | | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|-----|
| | | ABCB1 | ABCC1 | ABCC2 | ABCC3 | ABCC4 | ABCC5 | ABCC6 | ABCG2 | | |
| Substrate | | | | | | | | | | | |
| Vinca-Alkaloide | <i>Vinblastin</i> | + | + | + | | | | | | | |
| | <i>Vincristin</i> | + | + | + | | | | | | | |
| Anthracycline | <i>Daunorubicin</i> | + | + | + | | | | + | + | * | |
| | <i>Doxorubicin</i> | + | + | + | | | | + | + | * | |
| | <i>Epirubicin</i> | + | + | + | | | | | | + | * |
| Epipodophyllotoxine | <i>VP-16 (Etoposide)</i> | + | + | + | + | | | | + | + | |
| | <i>VM-26 (Teniposide)</i> | + | | | + | | | | + | + | |
| Taxane | <i>Docetaxel</i> | + | | + | | | | | | | |
| | <i>Paclitaxel</i> | + | | + | | | | | | | |
| Kinase-Inhibitoren | <i>Imatinib (Gleevec)</i> | + | + | | | | | | | + | |
| | <i>Flavopiridol</i> | | | | | | | | | + | |
| Camptothecine | <i>Irinotecan (CPT-11)</i> | + | + | + | | + | | | | + | |
| | <i>SN-38</i> | + | + | + | | + | | | | + | |
| | <i>Topotecan</i> | | | + | | + | | | | + | |
| Thiopurine | <i>6-Mercaptopurine</i> | | | | | + | + | | | | |
| | <i>6-Thioguanine</i> | | | | | + | + | | | | |
| | <i>5-FU (Fluorouracil)</i> | | | | | | + | | | | |
| Anthracene | <i>Bisantren</i> | + | | | | | | | | + | |
| | <i>Mitoxantron (NOVANTRONE®)</i> | + | + | + | | | | | | + | |
| Fluorophore | <i>Hoechst 33342</i> | + | | | | | | | | + | |
| | <i>Lysotracker Green</i> | | | | | | | | | + | * |
| | <i>Rhodamine 123</i> | + | | | | | | | | + | * |
| Andere | <i>Arsenit</i> | | + | + | | | | | | | |
| | <i>Colchicin</i> | + | + | | | | | | | | |
| | <i>Dexamethason</i> | + | | | | | | | | | |
| | <i>Hydrocortison</i> | + | | | | | | | | | |
| | <i>Methotrexat</i> | + | + | + | + | + | + | | | + | * |
| | <i>Cisplatin</i> | | | + | | | | + | + | | |
| | <i>Saquinavir</i> | + | + | + | | | | | | | |
| | <i>PMEA</i> | | | | | + | + | | | | |
| | <i>Actinomycin D</i> | + | | | | | | | | | |
| <i>Azidothymidin (Retrovir®)</i> | | | | | + | + | | | | + | |
| Inhibitoren/Modulatoren | | | | | | | | | | | |
| Erste Generation | <i>Amiodaron</i> | + | | | | | | | | | |
| | <i>Cyclosporin A</i> | + | + | + | | | | | | | +/- |
| | <i>Quinidin</i> | + | + | | | | | | | | |
| | <i>Quinine</i> | + | + | | | | | | | | |
| | <i>Verapamil</i> | + | + | | | | | | | | |
| | <i>Nifedipin</i> | + | | | | | | | | | |
| Zweite Generation | <i>Dexniguldipin</i> | + | | | | | | | | | |
| | <i>PSC 833</i> | + | | + | | | | | | | +/- |
| | <i>VX-710 (Bircodar)</i> | + | + | | | | | | | | + |
| Dritte Generation | <i>GF 120918 (Elacridar)</i> | + | | | | | | | | | + |
| | <i>LY475776</i> | + | + | | | | | | | | |
| | <i>LY335979 (Zosuquidar)</i> | + | | | | | | | | | |
| | <i>XR-9576 (Tariquidar)</i> | + | | | | | | | | | + |
| | <i>V-104</i> | + | + | | | | | | | | |
| Andere | <i>R101933 (Laniquidar)</i> | + | | | | | | | | | |
| | <i>Disulfiram</i> | + | + | | | | | | | | |
| | <i>Fumitremorgin C</i> | | | | | | | | | | + |
| | <i>MK571</i> | | + | + | + | + | + | | | | |

1.5.1. Struktureller Aufbau

Trotz der großen Substratdiversität und des breiten Funktionsspektrums basiert der strukturelle Aufbau der ATP-Transporter auf einer gemeinsamen modularen Architektur.

Typischerweise besteht ein funktioneller ABC-Transporter aus zwei ABC-Domänen, die auch als Nukleotidbindungsdomänen (NBD) bezeichnet werden und zwei Transmembrandomänen (TMD). Die ABC-Domänen liefern durch Bindung und Hydrolyse von ATP die für die Translokation der Substrate nötige Energie.

Während in Bakterien und Archaeen sowohl ABC-Importer als auch Exporter bekannt sind, besitzen Eukaryoten nach bisherigem Kenntnisstand ausschließlich Exporter.

Im Unterschied zu den Export-Systemen besitzen die Import-Systeme zusätzlich neben den Systemen gemeinsamen Basis-Struktur (NBD₂TMD₂) so genannte Substrat-Bindungsproteine (SBR).

Der Name der ABC-Transporter leitet sich von der gegenüber dem Rest des Proteins weniger variablen spezifischen ABC-Domäne ab. Der Bereich ist durch einige konservierte Sequenzmotive gekennzeichnet. Diese sind neben dem Walker A (*P-loop*) und B-Motiv ein konserviertes Histidin (*His-switch*) und Glutamin (*Q-loop*), sowie das ABC-Signatur Motiv, welches auch *C-loop* genannt wird. Letzteres ist das kennzeichnende Motiv für die ABC-Transporter, während die Walker-Sequenzen in vielen ATP nutzenden Proteinen zu finden sind (WALKER et al., 1982).

Die bisher am besten untersuchten an der *MDR* beteiligten ABC-Transporter sind P-Gp (ABCB1), MRP1(ABCC1) und ABCG2.

1.5.2. P-Gp (P-Glykoprotein, MDR1, ABCB1)

P-Gp ist ein ca. 170-kDa großes Membranprotein. Es wurde 1976 in Arzneimittel-resistenten *CHO* (*chinese hamster ovary*)-Zellen entdeckt (JULIANO und LING, 1976).

P-Gp konnte ebenfalls in den Epithelien der Lunge, des Magens und der Niere sowie in den Endothelien der Hoden und des Gehirns nachgewiesen werden (SCHINKEL, 1997). Auf Proteinebene konnte P-Gp zuerst in Hirnkapillaren aus Rindern nachgewiesen werden (JETTE und BELIVEAU, 1993). Versuche am Hirngewebe aus Ratten erbrachten den Nachweis auf RNA-Ebene, zeigten aber dabei eine geringe Expression des P-Gp auf Proteinebene (REGINA et al., 1998). P-Gp konnte zusätzlich in humanen Kapillaren (CORDON-CARDO et al., 1989) und in Kapillaren des Rattenhirns nachgewiesen werden (SCHINKEL, 1999). Die Expression an der BHS wurde mit den Befunden der Expression von P-Gp in Endothelzellen der Hirnkapillaren verschiedener Spezies bestätigt (BIEGEL et al., 1995; JETTE und BELIVEAU, 1993; SHIRAI et al., 1994; TSUJI et al., 1992).

Für humanes P-Gp wurde zusätzlich die Expression in Astrozytenendfüßchen detektiert (PARDRIDGE et al., 1997), was zu kontroversen Diskussionen bezüglich der Lokalisation des P-Gp an der humanen BHS führte (SCHINKEL, 1999). Untersuchungen, in denen nach Separation der luminalen und abluminalen Membranseite zerebraler Kapillaren in der luminalen Fraktion die stärkste P-Gp Expression nachgewiesen werden konnte, brachten Aufklärung (BEAULIEU et al., 1997). Darüber hinaus konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen nachgewiesen werden, dass das P-Gp bei Ratten an der luminalen Membran der Hirnkapillarendothelzellen lokalisiert ist (BEGLEY et al., 2000).

P-Gp, als Produkt des *Mdr*-Gens, wird beim Menschen zweifach, in Form des MDR1 und MDR2, exprimiert (CHEN et al., 1986; RONINSON et al., 1986), die sich bezüglich ihrer Transporteigenschaften unterscheiden: MDR1 vermittelt Multiresistenz, während MDR2 in der Leber die Funktion einer Phosphatidylcholin-Translocase übernimmt (RUETZ und GROS, 1994). Eine dritte Form das *Mdr3* konnte in Hamstern und Mäusen nachgewiesen werden, deren Substrate gleichfalls aus Phospholipiden bestehen.

In zahlreichen Transportstudien konnte bewiesen werden, dass P-Gp/MDR1 hauptsächlich amphipathische Substanzen wie Paclitaxel (Taxol), Anthracycline und Vinca alkaloid transportiert. Dieser Transporter ist im Gehirn an der apikalen Membran der Endothelzellen lokalisiert und steht dadurch in direktem Kontakt zum Blut (TSUJI et al., 1992). P-Gp transportiert also seine Substrate, welche durch freie Diffusion über die Zellmembran in die Endothelzellen gelangt sind, direkt zurück ins Blut (SCHINKEL, 1999).

Über einen längeren Zeitraum wurde die besondere Bedeutung des P-Gp an der BHS in vivo nur vermutet, bis Untersuchungen an *Mdr1a* (-/-) Mäusen diese bestätigen konnten. *Mdr1a* (-/-) Mäuse sind 100-fach sensitiver für das neurotoxische P-Gp-Substrat Ivermectin und akkumulieren 100-mal mehr Ivermectin im Gehirn als Wildtypmäuse (SCHINKEL, 1997; SCHINKEL et al., 1997). Weitere Studien belegen die verringerte Wirkung des P-Gp auf die Akkumulation einer großen Palette von zelltoxischen Substanzen, darunter viele Medikamente, die in der Chemotherapie Einsatz finden, wie Doxorubicin, Paclitaxel und Vincristin oder auch Inhibitoren der HIV-Protease, wie Indinavir, Nelfinavir und Saquinavir (SUN et al., 2003).

1.5.3. ABCG2 (BCRP)

Struktur

Das humane *ABCG2*-Gen (*hABCG2*) hat eine Länge von ca. 66 kb und umfasst 16 Exons und 15 Introns (BAILEY-DELL et al., 2001). Das exprimierte Protein besteht aus 655 Aminosäuren und erscheint in SDS Gelen unter reduzierenden Bedingungen bei ca. 72 kDa (DOYLE und ROSS, 2003). Die Struktur von ABCG2 entspricht der eines Halbtransporters, bestehend aus einer N-terminalen NBD gefolgt von einer C-terminalen TMD, die aus 6 Transmembranhelices besteht (DOYLE et al., 1998). Somit hat der ABCG2 verglichen mit dem Halbtransporter in P-Gp eine inverse Topologie. Das humane ABCG2 verfügt über drei potentielle extrazelluläre N-Glykosylierungsstellen (vgl. Abb. 1-4a), wobei nur eines dieser Asparagine, nämlich das N596, glykosyliert vorliegt (DIOP und HRYCYNA, 2005). Der porcine Transporter verfügt lediglich über zwei potentielle extrazelluläre N-Glykosylierungsstellen (vgl. Abb. 1-4b). Für den humanen Transporter ist bekannt, dass die Glykosylierung an Arginin 596 nicht für den Transport des Transporters zur Plasmamembran und auch nicht für seine funktionelle Aktivität essentiell ist. Zwischen der Aminosäuresequenz des humanen und porcinen ABCG2 besteht eine Sequenzsimilarität von 84 %.

Während ABCG5 und ABCG8 Proteine ihre Aktivität in einer heterodimerisierten Form entfalten, ist für ein funktionelles ABCG2 eine Homodimerisierung notwendig (LORKOWSKI und CULLEN, 2002). Des Weiteren wurden auch Beweise für höhermolekulare Verbindungen wie Tetramere, Oktamere oder Dodekamere gefunden (LITMAN et al., 2002; McDEVITT et al., 2006; XU et al., 2004).

Im normalen Gewebe werden hohe ABCG2-Expressionen in Stammzellen (ZHOU et al., 2001), Epithelzellen des Dick- und Dünndarms, endothelialen Zellen von Venen und Kapillaren (COORAY et al., 2002; MALIEPAARD et al., 2001a) und in der Plazenta (LITMAN et al., 2002) gefunden. COORAY et al. (2002) gelang der Nachweis von humanem ABCG2 an der luminalen Membran von humanen zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen. Darüber hinaus konnten EISENBLÄTTER und GALLA die Expression eines ABCG2-Homologs (BMDP, pAbcg2) in *PBCEC* auf RNA und Protein-Ebene nachweisen.

ABCG2 transportiert eine breite Palette von positiv und negativ geladenen Molekülen. Einen Überblick hierüber liefert Tab. 1-2. Der Transport einiger dieser Substrate hängt direkt mit Variationen in der Aminosäuresequenz zusammen. Der ABCG2-Wildtyp (R482) zeigt andere Substratspezifitäten als die Mutanten R482T oder R482G. So sind *Mitoxantrone*, *BODIPY-prazosin*, und *Hoechst 33342* Substrate von allen Transportern, während *Rhodamine 123*, *Daunorubicin* und *LysoTracker Green* nur von den Mutanten effizient transportiert werden.

Physiologische und pharmakologische Bedeutung

Neben der Rolle, die ABCG2 bei der Ausbildung von Multiresistenzen in Tumoren spielt, hat ABCG2 auch eine natürliche Schutzfunktion in Stammzellen (KIM et al., 2002; SCHARENBERG et al., 2002; ZHOU et al., 2002; ZHOU et al., 2001). So schützt es haematopoetische Stammzellen vor den toxischen Effekten des Chemotherapeutikums Mitoxantron (ZHOU et al., 2002).

Untersuchungen an *Abcg2* (-/-) *knockout* Mäusen, zeigen, dass die Tiere keine gravierenden phänotypischen Abweichungen aufweisen (JONKER et al., 2002; ZHOU et al., 2002). Allerdings konnte ein erhöhter Protoporphyrin-IX-Wert (PPIX) in Erythrozyten beobachtet werden. ZHOU et al. (2005) fand heraus, dass während der Erythrozytenreifung parallel zur Biosynthese von Hämoglobin auch die ABCG2-Expression induziert wird. Durch Behandlung mit ABCG2-Inhibitoren gelang der indirekte Beweis dafür, dass ABCG2 für den PPIX Transport verantwortlich ist und es wurde postuliert, dass ABCG2 möglicherweise eine wichtige Rolle in der Homöostase von endogenen Porphyrinen spielt. Unterstützt wird diese Annahme durch Experimente von (KRISHNAMURTHY et al., 2004), die zeigen konnten, dass Zellen unter hypoxischen Bedingungen durch ABCG2 eine schädigende Häm- oder Porphyrin-Akkumulation reduzieren können. Neben Porphyrinen werden auch Polyglutamatkonjugate der Folsäure von ABCG2 transportiert, was eine Beteiligung an der Folsäure-Homöostase nahelegt.

JONKER et al. (2002) entdeckte einen phototoxischen Effekt in ABCG2 (-/-) Mäusen, der mit einem 100-fachen Anstieg der Sensitivität gegenüber Pheophorbid a, einem Abbauprodukt des Chlorophylls, assoziiert war. *In vitro* Experimente zeigen, dass ABCG2 exprimierende Zellen eine reduzierte Pheophorbid a Akkumulation aufweisen, die mit dem ABCG2 Inhibitor Ko143 aufgehoben werden kann. Es wurde geschlossen, dass ABCG2 die Bioverfügbarkeit von Pheophorbid a aus der Nahrung durch verstärkten Efflux in das Darmlumen reduziert.

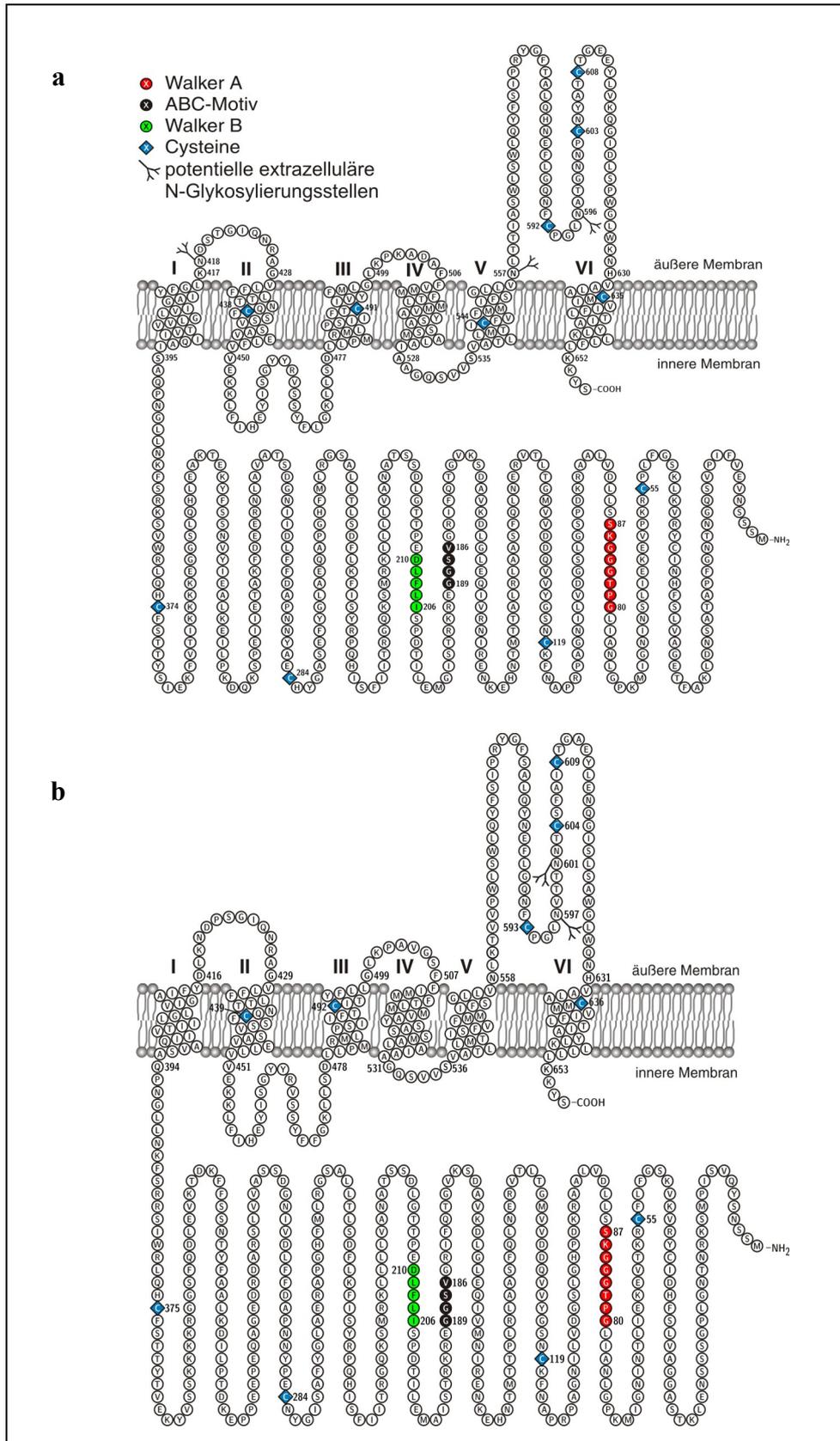


Abb. 1-4 Voraussichtliche Membrantopologie des humanen (a) und porcinen (b) ABCG2. Neben den typischen Sequenzmotiven (Walker A, Walker B und ABC-Motiv) sind Glykosylierungsstellen und Cysteine gekennzeichnet. Die Grafik wurde mit dem Programm *Textopo* unter Verwendung der im Anhang zu findenden Sequenzen erstellt (Kap. 8.5).

1.6. RNA-Interferenz (RNAi)

Der Name "RNA-Interferenz" (RNAi) wurde zuerst von FIRE und MELLO verwendet. Sie bezeichneten damit ein biologisches Phänomen, das sie an ihrem Untersuchungsobjekt *Caenorhabditis elegans* (FIRE et al., 1998) beobachteten. Durch Einbringen von doppelsträngiger RNA [dsRNA (*double-stranded* RNA)], die homologe Bereiche zu der vom Organismus synthetisierten mRNA aufweist, konnten die Expression von Genen spezifisch inhibiert werden. Die verwendete doppelsträngige RNA hatte gegenüber einzelsträngiger RNA, wie sie bisher auch in der *Antisense*-Technik eingesetzt wurde, einen wesentlich stärkeren Inhibierungs-Effekt. Für die Entdeckung dieses natürlichen Phänomens erhielten FIRE und MELLO 2006 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Mittlerweile ist bekannt, dass diese durch dsRNA vermittelte Form der Expressionsinhibition in vielen evolutionär divergierenden Organismen (Algen, Pilze, Pflanzen und Metazoa) auftritt (BERNSTEIN et al., 2001).

Die RNA-Interferenz beruht auf einem mehrschrittigen intrazellularen Prozess. Untersuchungen an Zell-Extrakten aus *Drosophila*-Embryonen zeigten, dass die langen dsRNAs in kleinere Fragmente, die ca. 22 Nukleotide (nt) lang waren, hydrolysiert wurden (ZAMORE et al., 2000). Analysen dieser sogenannten siRNAs (small interfering RNA) zeigten, dass es sich um Doppelstränge mit 2-nt-3'-Überhängen, sowie phosphorylierten 5'-Termini handelte (ELBASHIR et al., 2001a; ZAMORE et al., 2000). Ausgehend von diesen Informationen ergaben weitere Untersuchungen, dass das für die Spaltung verantwortliche Enzym zu einer Klasse der RNase III-Familie gehört, die über zwei katalytische Domänen sowie Helicase und PAZ-Motive verfügt. Mittlerweile wurde bestätigt, dass diese sogenannten *Dicer*-Proteine für die Erkennung von dsRNA und deren Prozessierung zu siRNA in verschiedenen Organismen (*Drosophila*, *Arabidopsis*, *C. elegans*, *Neurospora* und Säugetieren) verantwortlich sind (BERNSTEIN et al., 2001; HANNON, 2002; KETTING et al., 2001). Auf der Basis der Struktur einer katalytischen RNase III-Domäne wurde ein Modell für die Entstehung von siRNAs aus dsRNA entwickelt. Nach diesem Modell bilden zwei *Dicer*-Einheiten in antiparalleler Ausrichtung mit der dsRNA einen Komplex, in dem zwei der vier katalytischen Zentren inaktiviert sind. Durch die Aktivität der beiden aktiven Zentren entstehen die 22-nt langen siRNAs (HANNON, 2002).

Untersuchungen an immunopräzipitierten *Dicer*-Proteinen und *Drosophila*-Embryo-Lysaten wiesen darauf hin, dass für diesen ersten Schritt, der Spaltung von dsRNA in siRNAs, ATP benötigt wird (BERNSTEIN et al., 2001; ZAMORE et al., 2000). Ausgehend von der über *Dicer*-Proteinen gebildeten siRNA (Abb. 1-5 Mitte) folgt nun der eigentliche RNAi-Mechanismus (Abb. 1-5 links), in dessen Folge es zu einer spezifischen Expressionsinhibition bestimmter Gene kommt. Die siRNAs werden von einem sogenannten *RISC*

(RNA-induced silencing complex) inkorporiert. Dieser Nuklease-Komplex nutzt die Sequenz der siRNA als Zielsequenz für die auf Basenpaarung basierende Identifizierung und Degradierung von homologen mRNAs aus (HAMMOND et al., 2000; TUSCHL et al., 1999; ZAMORE et al., 2000).

An Zell-Lysaten von *Drosophila*-Embryonen vorgenommene Experimente lassen vermuten, dass der vom *RISC* bewirkte Prozess in drei Schritten abläuft. Im ersten Schritt wird die siRNA in einen Komplex von ca. 360 kDa aufgenommen, dann erfolgt eine ATP-abhängige Entwindung des siRNA-Duplexes und schließlich ein ATP-unabhängiges Erkennen und Schneiden der Ziel-RNA (NYKANEN et al., 2001). Voraussetzung ist dabei, dass das 5'-Ende der siRNA phosphoryliert ist. *In vitro* wird diese Phosphorylierung von einer Kinase durchgeführt, die zuverlässig siRNAs erkennt (NYKANEN et al., 2001). Der vom *RISC* durchgeführte Schnitt der Ziel-RNA (mRNA) erfolgt offenbar endonukleolytisch und innerhalb der zur siRNA homologen Sequenz. Durch Einfügen von Nukleotiden am 3'- und 5'-Ende der zur Ziel-RNA komplementären siRNA wurde herausgefunden, dass der Schnittpunkt der Ziel-RNA offenbar nur vom 5'-Ende der komplementären siRNA vorgegeben wird (ELBASHIR et al., 2001b). Demnach könnte es sich bei dem 5'-Phosphat um einen molekularen Referenz-Punkt handeln, von dem aus der Schnittpunkt der Ziel-RNA gemessen wird.

Durch Ausnutzung des Phänomens der RNAi steht heutzutage eine effiziente Methode zur Verfügung, gezielt einzelne Gene in ihrer Expression zu suppremierem. In Säugerzellen stellte sich hierbei das Problem, dass die Verwendung von langer dsRNA zur Induktion einer Interferon-abhängigen Immunantwort führte. ELBASHIR et al. (ELBASHIR et al., 2001a) konnten allerdings zeigen, dass dieser unerwünschte Effekt bei der direkten Verwendung von siRNA nicht auftritt, womit die Anwendung der RNAi-Technik auch in Säugerzellen ermöglicht wurde.

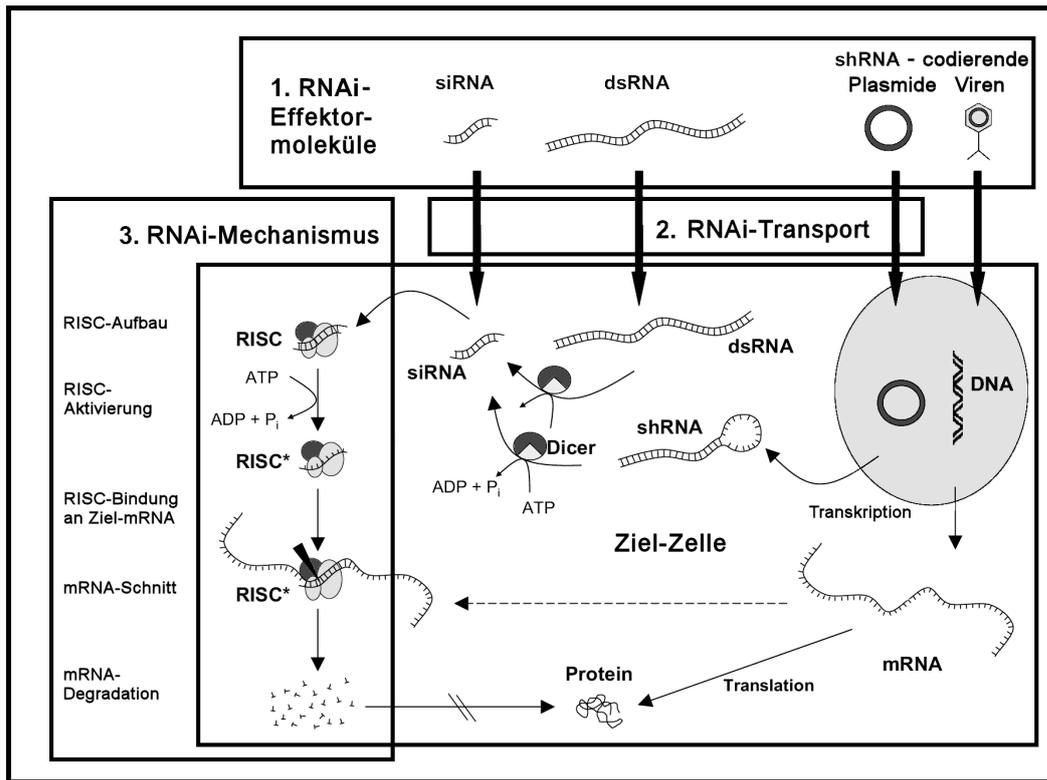


Abb. 1-5 RNA-Interferenz (RNAi) Die Bildung von siRNA kann über verschiedene Ausgangsverbindungen (RNAi-Effektormoleküle) induziert werden (1.). Nach der Aufnahme in die Zielzelle (2) erfolgt nach siRNA-bildenden Zwischenschritten der eigentliche RNAi-Mechanismus (3). Dieser besteht aus Aufbau und Aktivierung eines so genannten *RISC*-Komplexes, der Bindung des Komplexes an komplementäre mRNA und der Restriktion sowie anschließenden Degradierung der mRNA.; (modifiziert nach (AIGNER, 2007))

1.7. Zielsetzung

ABC-Transporter haben einen wesentlichen Anteil an dem Phänomen der *Multidrug-resistance* (*MDR*), da sie für den zellulären Export einer breiten Palette strukturell mannigfaltiger u. a. zelltoxischen Substanzen verantwortlich sind. Ihre Expression in den Endothelzellen der Mikrokapillaren der Blut-Hirn-Schranke (BHS) trägt wesentlich zum Schutz vor xenobiotischen Substanzen bei, die dem sensiblen Schonraum Gehirn gefährlich werden könnten. Während sie in ihrer Schutz-Funktion als Exportpumpen für Fremdstoffe einen wichtigen Beitrag leisten, kann sich ihre Bestimmung ins Gegenteil verkehren, wenn Erkrankungen des ZNS schwer behandelbar werden, weil den in der Therapie eingesetzten Arzneistoffen der Übergang ins Gehirn verwehrt bleibt.

Zu den bekanntesten an der humanen BHS exprimierten *MDR* vermittelnden ABC-Transportern gehören neben P-Gp und MRP1 das sogenannte ABCG2. Ein porcines Homolog wurde auch in porcinen zerebralen Kapillarendothelzellen (*porcine brain capillary endothelial cells / PBCEC*) entdeckt (EISENBLÄTTER und GALLA, 2002).

Ziel dieser Arbeit war es, Untersuchungssysteme zu entwickeln, die eine weiterführende funktionelle Charakterisierung des in *PBCEC* exprimierten porcinen Abcg2 (pAbcg2) ermöglichen. Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurde versucht diesen Transporter funktionell näher zu charakterisieren (DREES, 2004; HOLLNACK, 2005), was sich in Anbetracht der breiten Palette der in *PBCEC* exprimierten *MDR* vermittelnden ABC-Transporter mit ihren überschneidenden Substrat- und Inhibitorspektren als problematisch erwies.

Um diesem Ziel näher zu kommen, wurden zwei Strategien verfolgt. Mittels RNA-Interferenz sollte die Expression des Abcg2-Transporters in *PBCEC*, dem *in vitro* Modell der porcinen BHS, reprimiert werden. Des Weiteren sollte der Transporter selektiv in stabil transfizierten Zelllinien überexprimiert werden. In beiden Ansätzen galt es Zellsysteme zu generieren, die eine gezielte funktionelle Analyse des porcinen Abcg2 zulassen.

Darüber hinaus wurden weiterführende Untersuchungen im Hinblick auf die Charakterisierung und Regulation des Abcg2-Transporters im *PBCEC* Kulturmodell durchgeführt.

2. Methoden

In allen hergestellten Lösungen wurde, falls nicht anders angegeben, bidestilliertes Wasser (ddH₂O) als Lösungsmittel verwendet. Die Experimente wurden, sofern nicht abweichend erwähnt, bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

2.1. Zellkultur

Alle die Zellkultur betreffenden Arbeiten wurden an einer Sterilbank (*Holten*) durchgeführt, wobei ausschließlich sterile Medien und Lösungen verwendet wurden. Für die Zellkultivierung wurden 25 cm² und 75 cm² Kulturflaschen (*Nunc*), Petrischalen (d = 10 cm), 12-*well*-Mikroplatten, 6-*well*-Mikroplatten, 12-*well*-Filterplatten (*Costar*) und 96-*well*-Mikroplatten (*Greiner Bio-One*) verwendet. Die Zellen wurden in Brutschränken in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und einem CO₂-Partialdruckanteil von 5 % (v/v) kultiviert.

2.1.1. Beschichtung der Kulturgefäße

Zur Verbesserung der Adhäsion und Differenzierungsvorgänge der Zellen wurden die Zellkulturgefäße beschichtet. Die Kulturgefäße für die porcinen zerebralen Kapillarendothelzellen (*porcine brain capillary endothelial cells, PBCEC*) wurden mit Collagen G (*Biochrom AG*) beschichtet. Eine Ausnahme bilden die 12-*well*-Filterplatten, deren Oberfläche mit Rattenschwanzcollagen inkubiert wurde.

Für die Beschichtung mit Collagen G wurde aus einer Stammlösung (3 mg/ml Collagen G in 12 mM HCl) eine 1:29-Verdünnung mit destilliertem Wasser hergestellt. Diese wurde auf die jeweiligen Kulturgefäße pipettiert, bis deren Boden komplett bedeckt war, und dann im Wärmeschrank bis zur vollständigen Trocknung für mindestens einen Tag inkubiert.

Die Rattenschwanzcollagen-Stammlösung (0,54 mg/ml in 0,1 %-iger (v/v) Essigsäure) wurde im Verhältnis 1:19 mit destilliertem Wasser verdünnt und 113 µl auf einen 12-*well*-Filter aufgetragen. Die Filter wurden über Nacht in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C und einem CO₂-Partialdruckanteil von 5 % (v/v) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Filterplatten für 2-4 h mit geöffnetem Deckel in der Sterilbank aufgestellt, getrocknet und anschließend entweder direkt verwendet, oder in Alufolie eingewickelt bei 4 °C gelagert.

Für die Experimente (*Uptake*-Messungen, Zytotoxizitätstest) an *HEK 293*-Zellen in 96-*well*-Mikroplatten, Kultivierung von *PBCEC* auf *Lab-Tek™ Chambered Coverglass* (*Nunc*) sowie für die immunozytochemischen Anfärbungen (Kap. 2.6.5) von *HEK 293*-Zellen auf Deckgläschen erfolgte zuvor eine Beschichtung der Oberflächen mit vernetzter Gelatine.

Hierfür wurden die 96-*well*-Mikroplatten direkt, die Deckgläschen nach Überführung in eine 6-*well*-Mikroplatte mit einer 0,5 %-igen (w/v) Gelatine-Lösung überschichtet und bei RT für 1,5 - 2 h inkubiert. Danach wurde die Gelatine-Lösung abgesaugt und durch 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd-Lösung ersetzt. Nach einer Inkubation von 15 min wurden die Oberflächen zehnmal mit destilliertem Wasser gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C unter destilliertem Wasser gelagert.

MDCK-und *Caco-2*-Zellen wurden generell beschichtungsfrei kultiviert.

2.1.2. *PBCEC* als Modellsystem für die Blut-Hirn-Schranke (BHS) *in vitro*

2.1.2.1. Isolierung porciner zerebraler Kapillarendothelzellen

Die Isolierung zerebraler Endothelzellen erfolgte aus den Gehirnen ca. 6 Monate alter Hausschweine (*Sus scrofa*) und wurde entsprechend der Methode von (FRANKE et al., 2000) durchgeführt. Die Trennung beruht auf einem mechanisch-enzymatischen Aufschluss des Hirngewebes, in dessen Verlauf die Endothelzellen von umliegendem Gewebe befreit und durch Zentrifugationsschritte abgetrennt werden.

Die verwendeten Hirnhälften wurden im Schlachthof frisch geschlachteten Schweinen entnommen und sofort in Behälter mit 4 °C kaltem 70%-igem Ethanol überführt. Anschließend wurden die Hirnhälften in 4 °C kaltem Phosphatpuffer (*PBS*) in Gegenwart von jeweils 200 µg/ml *Streptomycin* und 200 U/ml Penicillin ($P_{200 \text{ U/ml}}/S_{200 \text{ µg/ml}}$) gewaschen. Für den Transport wurden die Hirnhälften in mit $P_{200 \text{ U/ml}}/S_{200 \text{ µg/ml}}$ versetztem *PBS* gelagert.

Die weitere Verarbeitung erfolgte unter der Sterilbank. Die Hirnhälften wurden in mit P/S versetztes *PBS* überführt. Nach kurzem Abflammen der Hirnhemisphäre wurden die Hirnhäute und anhaftende größere Gefäße sorgfältig entfernt.

Sekretorische Bereiche wurden mit einem Skalpell abgetrennt, der verbleibende Cortex wurde mit dem Skalpell erst grob und dann mit einem Kräuterschneider fein zerkleinert. Diese Hirnmasse wurde in 37 °C warmes Präparationsmedium in einem Endvolumen von 100 ml pro Hirn aufgenommen und mittels eines Magnetrührers homogenisiert. Nach Zugabe von 0,3 % (w/v) Protease/Dispase II (*Sigma*) aus *Bacillus polymyxa* wurde das Homogenat für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die hierbei freigelegten Kapillaren wurden

mittels Zentrifugation in einer 18 %-igen (w/v) *Dextran*-Lösung (MW ca. 160 kDa) isoliert. Dazu wurden jeweils 100 ml des Homogenats mit 150 ml 4 °C kalter *Dextran*-Lösung vermischt und bei 4 °C und 6890 x g 10 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet mit den zerebralen Kapillaren wurde in Präparationsmedium (9 ml/Hirn) resuspendiert und zur Abtrennung größerer Gefäße durch ein Nylonsieb (180 µm Porengröße) filtriert. Das Filtrat wurde zur Vereinzelnung der Kapillaren starken Scherkräften ausgesetzt, indem es fünfmal aus einer auf den Boden einer Petrischale aufsetzenden Glaspipette gedrückt wurde (Trituieren). Anschließend wurden die Kapillarfragmente eine halbe Stunde bei 37 °C mit einem Enzymgemisch aus Collagenase/Dispase-II [1 % (w/v)] (*Roche*) aus *Vibrio alginolyticus* und *Bacillus polymyxa* bei 37°C inkubiert. Das Enzymgemisch dissoziiert die überwiegend aus Collagen bestehende Basalmembran der Kapillaren und bewirkt damit eine Freisetzung der Endothelzellen. Um Scherkräfte und damit verbundene Schädigungen der Zellen zu vermeiden, fand die enzymatische Dissoziation in einem Gefäß mit frei hängendem Magnetprüher statt. Nach abgeschlossener Proteolyse wurden die aufgebrochenen Kapillaren bei Raumtemperatur (RT) für 10 Minuten bei 110 x g zentrifugiert und das Pellet in Präparationsmedium resuspendiert. Durch die Zentrifugation in einem diskontinuierlichen *Percoll*-Gradienten wurden die Endothelzellen von Erythrozyten und anderen Fremdzellen getrennt. Hierfür wurden vorsichtig 15 ml *Percoll*-Lösung der Dichte $\rho = 1,08 \text{ g/cm}^3$ mit 20 ml *Percoll*-Lösung der Dichte $\rho = 1,04 \text{ g/cm}^3$ überschichtet. Darüber wurden 10 ml der Zellsuspension geschichtet und anschließend bei 4 °C und 1380 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Die sich nach der Zentrifugation in der Interphase befindenden Kapillarfragmente wurden abgenommen und in Präparationsmedium zur Entfernung der *Percoll*-Reste bei Raumtemperatur und 110 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Resuspension in *Plating*-Medium, dem 2 µg/ml *Puro-mycin* (*Sigma*) zugesetzt worden waren, erfolgte die Aussaat der Zellen in Kulturflaschen, die zuvor mit Collagen G (*Biochrom*, 133 µg/ml in ddH₂O) beschichtet worden waren. Die Aussaatdichte wurde so gewählt, dass die Endothelzell-Ausbeute eines Hirns auf sechs 75 cm²-Kulturflaschen ausgesät wurde.

Dextran-Lösung (1,061 g/cm³)

| | |
|--------|---|
| 200 ml | <i>Earle's Puffer</i> (10x) mit Phenolrot |
| 4,4 g | NaHCO ₃ |
| 360 g | <i>Dextran</i> (~ 162 kDa/mol) |
| ad 2 l | ddH ₂ O |

Percoll-Lösungen

| | |
|------------------------------|------------|
| $\rho = 1,03 \text{ g/cm}^3$ | |
| 400 ml | <i>PBS</i> |

90 ml *Percoll*
10 ml *Earle's Medium M199 (10x)*

$\rho = 1,08 \text{ g/cm}_3$

200 ml *PBS*
270 ml *Percoll*
30 ml *Earle's Medium M199 (10x)*

Präparationsmedium (*Earle's Medium M199 1x*)

0,7 mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin
100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin
100 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin

Plating-Medium

Präparationsmedium
10 % (v/v) *NCS (newborn calf serum)*

2.1.2.2. Kultivierung der Endothelzellen

Einen Tag nach der Präparation und der Aussaat (1. *DIV (day(s) in vitro)*) wurden die Zellen zweimal mit *PBS⁺⁺* gewaschen, um Zelldebris und nicht-adhärenente Endothel- und Fremdzellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit Kulturmedium, dem 2 $\mu\text{g/ml}$ *Puromycin* zugesetzt wurde, überschichtet.

PBS

140 mM NaCl
2,7 mM KCl
8,1 mM Na_2HPO_4
1,5 mM KH_2PO_4

PBS⁺⁺

PBS
0,5 mM MgCl_2
0,9 mM CaCl_2

Kultur-Medium

Plating-Medium ohne Gentamycin

2.1.2.3. Zellpassage mit fraktionierender Trypsinierung und anschließendem Einfrieren

Am 2. *DIV* wurde die Kultur durch eine selektive Zellpassage so weit wie möglich von Fremdzellen befreit. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit *PBS* (37°C) gewaschen, um die am Adhäsionsprozess beteiligten bivalenten Ionen zu entfernen. Die enzymatische Dissoziation erfolgte durch Zugabe von 4 ml einer 0,0625 %igen Trypsin-*PBS*-Lösung pro 75 cm²-Kulturflasche. Der Verlauf der Proteolyse wurde am Mikroskop verfolgt. Nach ca. 6 Minuten hatte sich ein Großteil der *PBCEC* vom Boden abgelöst, während Fremdzellen noch anhafteten. Durch mehrfaches Aufziehen mit einer Glaspipette wurden die Zellaggregate in kleinere Gruppen vereinzelt.

Die Suspension wurde für 10 Minuten bei 110 x g zentrifugiert und anschließend in Cryo-Röhrchen in einem Volumen von 1,8 ml Einfriermedium (*NCS* mit 10 % (v/v) *DMSO*) pro 75 cm²-Kulturflasche aufgenommen. Die Cryo-Röhrchen wurden in ein mit Isopropanol gefülltes Einfriergefäß gestellt und bei -70°C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Röhrchen für die weitere Lagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.1.2.4. Auftauen von *PBCEC*

Die Cryo-Röhrchen wurden dem Stickstofftank entnommen und bei -20°C für 10 min zwischengelagert. Danach wurden die Röhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und aufgetaut. Direkt nach dem Auftauvorgang wurden die Zellen in ein 50 ml Polypropylen-Röhrchen (*Greiner Bio-One*) pipettiert und unter leicht schwenkenden Bewegungen tropfenweise mit *Plating-Medium* versetzt. Die Zellen wurden daraufhin für 10 min bei RT und 110 x g zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde in *Plating-Medium* resuspendiert und der Zell-Inhalt von zwei Cryo-Röhrchen (ein Cryo-Röhrchen enthält die Zellen von einer 75 cm²-Kulturflasche) auf eine 75 cm²-Kulturflasche ausgesät.

Für die Impedanzmessung auf Rattenschwanzcollagen-beschichteten 12-*well*-Filterplatten (Kap. 2.1.1) wurden 250.000 Zellen pro Filter ausgesät. Die Zellzahl wurde zuvor mittels eines *Bürker*-Haemocytometers bestimmt. In das untere Kompartiment wurde 1,5 ml *Plating-Medium* vorgelegt, bevor das obere Kompartiment mit 0,5 ml Zelllösung befüllt wurde.

2.1.2.5. Umstellung auf serumfreies Medium

Zwei Tage nach dem Auftauen (4. *DIV*) hatten die Zellen Konfluenz erreicht und wurden auf serumfreie Bedingungen umgestellt. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und durch

chemisch definiertes serumfreies Medium (SFM) ersetzt. Diesem Medium wurde, falls nicht anders angegeben, 550 nM Hydrocortison zugesetzt. Die Zellen wurden weitere zwei Tage kultiviert, bis sie für Experimente eingesetzt wurden.

Serumfreies Medium (SFM)

| | |
|-----------|-------------------------------|
| | <i>DMEM/Ham's F12</i> -Medium |
| 4 mM | L-Glutamin |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |

2.1.3. Permanente Zelllinien

In dieser Arbeit wurden neben der Primärkultur der *PBCEC* drei permanente Zelllinien verwendet. Es handelt sich dabei um *HEK 293*-Zellen (*human embryonal kidney cells*) *MDCK*-Zellen des Typs *II* (*Madin-Darby canine kidney*) und *Caco-2* (*human colon adenocarcinoma*).

HEK 293-Zellen wurden ursprünglich durch Transformation von humanen embryonalen Nierenzellkulturen mit gescherter DNA des Adenovirus Typ 5 generiert (GRAHAM et al., 1977). Morphologisch betrachtet handelt es sich um adhärenente fibroblastoide Zellen, die in Monolayern wachsen (DSMZ).

Die Zellen enthalten 4-5 Kopien vom linken Ende (12% des viralen Genoms, E1a,b-Gene) und 1 Kopie vom rechten Ende (10% des viralen Genoms, E4-Gen) des Adenovirus Typ 5-Genoms (*Central Commission for Biological Safety, ZKBS*) und sind die am häufigsten verwendeten Helferzelllinien für die Verpackung von replikationsdefekten (Deletion der E1-Region) adenoviralen Vektoren und Helferviren.

Darüber hinaus eignen die Zellen sich aufgrund ihrer leichten Kultivier- und Transfizierbarkeit gut für die Erzeugung von stabilen heterologen Expressionssystemen.

Die ebenfalls verwendeten ***MDCK*** (*Madin-Darby canine kidney*-Zellen) ***II-Zellen*** wurden von S. H. MADIN and N. B. DARBY aus dem Nierengewebe eines adulten weiblichen Cockerspaniels abgeleitet. Die *MDCK II*-Zellen ähneln morphologisch dem Epithel der proximalen Nierentubuli, sie wachsen in Monolayern und bilden dichte Zell-Zellkontakte (*tight junctions*) aus, wodurch die Möglichkeit eröffnet wird, an ihnen Transportstudien durchzuführen.

Caco-2-Zellen wurden 1974 aus dem Darm-Tumor eines 72 Jahre alten Kaukasiers isoliert. Es sind morphologisch adhärenente epitheliale Zellen, die als Modellsystem für die Zellbarriere des Darmepithels insbesondere als System für Arzneimittel-*Screening*-Assays *in vitro* weite Verwendung finden.

2.1.3.1. Kultivierung und Passage von *MDCK (Madin-Darby canine kidney)-Zellen*

Die Kultivierung der *MDCK*-Zellen erfolgte in 25 cm²-Flaschen. Das Kulturmedium (4 ml) wurde alle 3-4 Tage gewechselt. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen 10-fach verdünnt auf neuen Kulturflaschen subkultiviert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit *PBS* gewaschen und in *PBS* mit 5 mM EDTA bei 37°C inkubiert. Der Zustand der Zellen wurde in regelmäßigen Abständen am Mikroskop beobachtet. Bei Beginn der Abrundung der Zellen wurde der Puffer abgesaugt und durch eine 0,25 %ige (w/v) Trypsin-Lösung in *PBS* mit 1 mM EDTA ersetzt.

Unter moderatem horizontalem Schütteln wurden die Zellen bis zum Ablösevorgang inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml Kulturmedium wurde die Proteolyse abgestoppt. Die Zellen wurden in 50 ml PP-Röhrchen (*Greiner Bio-One*) überführt und bei 111 x g 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen für eine weitere Kultivierung auf die zehnfache Aussaatfläche in 25 cm²-Flaschen ausgesät.

Kulturmedium der *MDCK*-Zellen (*MDCK*-Medium)

| | |
|------------|-------------------------------|
| | <i>MEM Earle</i> (1X) |
| 10 % (v/v) | <i>FCS (fetal calf serum)</i> |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |
| 4 mM | L-Glutamin |

2.1.3.2. Kultivierung und Passage von *HEK 293 (human embryonic kidney-293)*

Die Kultivierung der *HEK 293*-Zellen erfolgte in 25 cm²-Flaschen. Das Kulturmedium (4 ml) wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen 10-fach verdünnt auf neuen Kulturflaschen subkultiviert. Dazu wurden die Zellen zweimal mit *PBS* gewaschen und eine Minute in 2 ml 0,25 %ige (w/v) Trypsin-Lösung unter moderatem horizontalem Schütteln inkubiert. Die weiteren Schritte bis zur Aussaat erfolgten wie bei der Kultivierung von *MDCK*-Zellen (2.1.3.1).

Kulturmedium der *HEK 293*-Zellen (*HEK*-Medium)

| | |
|------------|---------------------------|
| | <i>Dulbeccos MEM</i> (1X) |
| 10 % (v/v) | <i>FCS</i> |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |
| 1 mM | L-Glutamin |

2.1.3.3. Kultivierung und Passage von *Caco-2*-Zellen

Caco-2-Zellen stammten von der *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, USA). Der Wechsel des Mediums in den Kulturflaschen erfolgte zweimal wöchentlich. Die Passage und weiteren Schritte bis zur Aussaat erfolgten wie bei den *HEK-293*-Zellen

Kulturmedium der *Caco-2*-Zellen (*Caco*-Medium)

| | |
|------------|---|
| | <i>Dulbeccos MEM</i> (1X) |
| 10 % (v/v) | <i>FCS</i> |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |
| 1 % | <i>NEAA (Non-Essential Amino Acids)</i> |

2.1.3.4. Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Das Einfrieren und Auftauen der Zelllinien erfolgte in gleicher Weise wie bei den *PBCEC* (Kap. 2.1.2.3 und 2.1.2.4). Die Aussaatdichte wurde den Versuchsbedingungen angepasst (s. u.)

2.2. Transfektionsmethoden

Unter Transfektion versteht man die Überführung von Fremd-DNA in eine eukaryotische Zelle. Die hierfür verwendeten Verfahren lassen sich in chemische (Liposomen vermittelte Transfektion, Kalziumphosphat-Kopräzipitation, Transfektion über DEAE oder Dendrimere), physikalische (Elektroporation, *Gene-Gun*, Mikroinjektion) oder biologische Methoden (virale Transfektion, Transfektion mittels *Agrobacterium tumefaciens*) gliedern. In Abhängigkeit davon, ob die transfizierte DNA ins Genom inseriert wird unterscheidet man zwischen stabiler (Plasmid inseriert ins Genom und ist längerfristig vorhanden) oder transienter (Plasmid inseriert nicht und wird relativ schnell abgebaut) Transfektion.

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Transfektionsmethoden aufgeführt. Die Auswertung der Transfektionseffizienz erfolgte bei der Transfektion von fluoreszierenden Oligonukleotiden oder Fremd-DNA, die zur Bildung fluoreszierender Genprodukte führte, mittels Lichtmikroskopie. Die Transfektionseffizienz oder Transfektionsrate bezeichnet hierbei das Verhältnis zwischen fluoreszierenden Zellen und der Gesamtzellzahl in Prozent.

2.2.1. Kalziumphosphat-Kopräzipitation

Die Kalziumphosphat-Kopräzipitation beruht darauf, dass DNA in einer Kalziumchloridlösung durch Zugabe einer phosphathaltigen Lösung zusammen mit Kalziumphosphat als feinkristalliner Niederschlag präzipitiert. Dieser feinkristalline Niederschlag und damit auch die DNA wird von Zellen aufgenommen.

Für die Kalziumphosphat-Kopräzipitation wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße mit der zu transfizierenden Plasmidmasse beschickt und anschließend mit DNA-Verdünnungspuffer auf 150 µl aufgefüllt. Die DNA wird durch Zugabe von 600 µl Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Unmittelbar vor der Transfektion der Plasmide in die Zielzellen wird die gefällte DNA für 15 min bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgegossen und nochmals 10 sec zentrifugiert. Verbleibende Ethanolreste werden mit einer Pipette vorsichtig abgenommen. Unter der Sterilbank werden die Gefäße offen solange gelagert bis sämtliches Ethanol verdampft ist.

Die Plasmid-DNA wird in 438 µl ddH₂O gelöst und anschließend mit 62 µl 2 M CaCl₂-Lösung gemischt. Die Lösung wird tropfenweise in ein 5 ml PP-Röhrchen pipettiert, in das 500 µl 2 x HBS vorgelegt wurden. Das PP-Röhrchen wird dabei ständig geschüttelt. Das Präzipitat wird möglichst gleichmäßig auf die Kulturgefäße pipettiert und durch Schwenken verteilt. Nach 4 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen einem Glycerinschock ausgesetzt. Dazu wurde das Medium abgesaugt und zu den Gefäßen 0,3 ml Schocklösung pro Milliliter Kulturmedium zugesetzt. Nach 2 min wurden die Zellen 3 mal vorsichtig mit PBS gewaschen und in der angemessenen Menge Kulturmedium weiter inkubiert.

DNA-Verdünnungspuffer Tris-HCl (pH 7,8) 10 mM

| | |
|--------|----------|
| 10 mM | Tris/HCl |
| 1 mM | EDTA |
| 300 mM | NaCl |

2 x HBS

| | |
|--------|----------------------------------|
| 280 mM | NaCl |
| 1,5 mM | Na ₂ HPO ₄ |
| 50 mM | HEPES |

mit 1 N NaOH exakt auf pH 7,13 einstellen

Schocklösung

| | |
|------------|----------|
| | 1 x HBS |
| 15 % (v/v) | Glycerin |

2.2.2. Transfektion mittels kationischer Lipide (Liposomale Transfektion)

Die Transfektion von eukaryotischen Zellen mit ABCG2- und GFP (*green fluorescent protein*)-Expressionsvektoren sowie siRNA (*small interfering RNA*) erfolgte unter anderem mittels kationischer Lipidvesikel, die in Form des Transfektionsreagenzes *Lipofectamine*TM 2000 (*Invitrogen*) oder *Oligofectamine*TM (*Invitrogen*) eingesetzt wurden. Es wird angenommen, dass die positiv geladenen Liposomen durch Wechselwirkung mit dem negativ geladenen Phosphat-Rückgrat der zu transfizierenden Nukleinsäuren einen Lipid-Nukleinsäure-Komplex (Transfektionskomplex) bilden. Die positive Oberflächenladung der Liposomen vermittelt zudem die Wechselwirkung zwischen den Nukleinsäuren und der Zellmembran der Empfängerzelle. Es wird ferner angenommen, dass die Aufnahme der Komplexe durch Endozytose stattfindet. Wie der Transfektionskomplex dem endosomalen Stoffwechselweg entkommt und die aufgenommenen Nukleinsäuren in den Zellkern gelangen, um dort transkribiert zu werden, ist nicht bekannt.

2.2.2.1. Transfektion von Expressionsvektoren (Generierung stabiler ABCG2-exprimierender eukaryotischer Zellen)

Durch Transfektion und anschließende Selektion wurden insgesamt sechs verschiedene stabil ABCG2-exprimierende eukaryotische Zellsysteme erzeugt. Eine Übersicht über die erstellten Expressionssysteme ist Tab. 2-1 zu entnehmen.

Neben einfachen Expressionssystemen, die lediglich aus einem eukaryotischen Expressionsvektor bestehen, wurde in *HEK* Zellen zusätzlich ein *Tetracyclin* reguliertes (T-RExTM)-Vektorsystem (*Invitrogen*) transfiziert. Dieses besteht neben einem induzierbaren Expressionsvektor (pcDNA4TM/TO/ *myc*-His B, *Invitrogen*), in den die Sequenz von porcinem *Abcg2* (*pAbcg2*) inseriert wurde, aus einem Regulator-Vektor (pcDNA6/TR), der für den Tet-Repressor (TetR) kodiert. Der induzierbare Vektor besitzt eine CMV-Promotor-Region, die zwei hintereinander liegende Tet-Operator-Sequenzen (TetO₂) enthält. In Zellen bindet der vom Regulator-Vektor konstitutiv exprimierte TetR in Form eines Dimers an die TetO₂-Sequenzen des pcDNA4-Vektors und reprimiert die Transkription der vom CMV-Promoter abhängigen DNA-Sequenzen (in diesem Fall *pAbcg2*). Durch Zugabe von *Tetracyclin*-Derivaten wie *Doxycyclin* kann die Expression induziert werden. *Doxycyclin* bindet hochaffin an den TetR und bewirkt eine Konformationsänderung des Repressors, die zu dessen Dissoziation vom TetO₂ führt und die Transkription des hinter dem CMV-Promotor inserierten Gens nach sich zieht.

Die für die Transfektion verwendeten ABCG2-Expressionsvektoren wurden wie unter 2.4.8 beschrieben hergestellt. Der hABCG2/pcDNA3.1-Vektor wurde freundlicherweise von Joachim WEGENER und der hABCG2/pEYFP-Vektor von Thomas ENGEL zur Verfügung gestellt. Als Expressionssystem wurden ausschließlich *HEK 293*- und *MDCK*-Zellen genutzt.

Ein Tag vor der Transfektion wurden die Zellen auf antibiotikafreies Medium umgestellt. Es wurde darauf geachtet, dass diese zum Zeitpunkt der Transfektion subkonfluent waren (70-80 %ige Belegung der Kulturgefäßoberfläche).

Zunächst wurde die Vektor-DNA und serumfreies Medium (*Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium*) vermischt (Lösung I). Transfektionsreagenz wurde in *Opti-MEM I* aufgenommen (Lösung II), für 5 Minuten bei RT inkubiert und schließlich mit Lösung I vereint. Anschließend erfolgte bei Raumtemperatur eine Inkubation für 20 Minuten. Die Transfektionslösung (Lösung I+II) wurde in das antibiotikafreie Medium der zu transfizierenden Zellen gegeben und für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte ein Austausch des Mediums gegen antibiotikahaltiges Kulturmedium. Die genauen Mengenangaben der Transfektionsreagenzien in Abhängigkeit zur Zellkulturfläche sind der Tab. 2-3 zu entnehmen. Bei den *HEK 293*-Zellen mit dem T-RExTM-Vektorsystem wurde darauf geachtet, dass das Verhältnis zwischen induzierbaren Expressionsvektor und Regulations-Vektor 1:6 betrug. Damit sollte gewährleistet sein, dass in positiven Transformanten ein Überschuss an Repressor-exprimierenden Regulationsvektoren vorliegt, die die Bildung des auf dem pcDNA4 kodierten pAbcg2 vollständig reprimieren.

Für die Selektion stabiler Klone wurden die Zellen mehrere Wochen lang in Kulturmedium gehalten, dem das für das Vektorsystem entsprechende Selektionsreagenz zugesetzt war (vgl. Tab. 2-2). Stellte sich während des Selektionsvorgangs eine zu hohe Belegungsdichte ein, wurden die Zellen verdünnt auf neue Gefäße passagiert. Der stetige Selektionsdruck führte bei den *HEK*-Zellen zur Bildung von Kolonien, die unter dem Mikroskop mittels Pipette von der Zellgefäßoberfläche isoliert und weiter kultiviert wurden. In Fällen, bei denen Zweifel bestanden, ob es sich bei der betrachteten Kolonie nur um einen einzigen Zell-Klon handelte, folgte eine weitere klonale Selektion nach der Methode der *limited dilution*. Dafür wurden die Zellen vereinzelt und hochverdünnt (1 Zelle / well) auf 96-well-Mikroplatten ausgesät. Durch mikroskopische Beobachtung während des weiteren Kulturverlaufs wurden Zellklone identifiziert und bis zur Kultur auf Flaschen expandiert.

Bei der Selektion, der mit dem YFP-Fusionsprotein-System transfizierten *MDCK*-Zellen konnte kein Absterben von sichtbar nicht transfizierten Zellen beobachtet werden. Daraufhin wurden ABCG2/YFP exprimierende Zellcluster analog zur Vorgehensweise bei den *HEK*-Zellen mittels einer Pipette aus dem Zellverband isoliert und in 96-well-

Mikroplatten, in die Selektionsmedium vorgelegt war, überführt. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert und dann ebenfalls dem Verfahren der *limited dilution* unterzogen.

Tab. 2-1 Übersicht der verwendeten ABCG2-Expressionssysteme

| Leervektor | kloniertes cDNA-Insert | Bezeichnung des Expressionsvektors | Bezeichnung der mit dem vollständigen Vektor stabil transfizierten Zellen | |
|--|------------------------|------------------------------------|---|-----------------|
| | | | MDCK-Zellen | HEK 293-Zellen |
| pcDNA3 | pAbcg2 | pAbcg2/pcDNA3 | - | HEK-pAbcg2 |
| pEYFP-C1 | pAbcg2 | pAbcg2/pEYFP | MDCK-YFP/pAbcg2 | HEK-YFP/pAbcg2 |
| pcDNA4 TM /TO/myc-His B u. pcDNA6/TR (T-REx TM) | pAbcg2 | pAbcg2/pcDNA4 | - | HEK-TREx/pAbcg2 |
| pcDNA3.1/Zeo (+) | hABCG2 | hABCG2/pcDNA3.1 | - | HEK-hABCG2 |
| pEYFP-C1 | hABCG2 | hABCG2/pEYFP | MDCK-YFP/hABCG2 | - |

Tab. 2-2 Verwendete Selektionsantibiotika

| Bezeichnung der mit dem vollständigen Vektor stabil transfizierten Zellen | Selektionsantibiotikum | Konzentration des Selektionsantibiotikums / (µg/ml) |
|---|------------------------|---|
| HEK-YFP/pAbcg2 MDCK-YFP/pAbcg2 MDCK-YFP/hABCG2 HEK-pAbcg2 | G418 | 750 |
| HEK-hABCG2 | Zeocin | 750 |
| HEK-TREx/pAbcg2 | Zeocin / Blasticidin | 750 / 10 |

Tab. 2-3 Mengenskalierung der Transfektionsreagenzien für unterschiedliche Zellkulturflächen (modifiziert nach *Invitrogen*)

| Kulturgefäß | Fläche | Lösung I | | Lösung II | | antibiotikafreies Kulturmedium (vorgelegte Volumen auf den Zellen) |
|-------------|--------------------|--------------|-----------------|--------------------------|-----------------|--|
| | | DNA-Masse/µg | Opti-MEM I / µl | Transfektionsreagenz /µl | Opti-MEM I / µl | |
| 24-well | 2 cm ² | 0,8 | 50 | 1,2 | 50 | 500 µl |
| 12-well | 4 cm ² | 1,6 | 100 | 2,4 | 100 | 1 ml |
| 6-well | 10 cm ² | 4,0 | 250 | 6 | 250 | 2 ml |
| 100-mm | 60 cm ² | 24 | 1500 | 35 | 1500 | 15 ml |

2.2.2.2. Transfektion von siRNA (RNA-Interferenz)

Die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) ermöglicht es, die Expression von Proteinen auf mRNA-Ebene zu reduzieren. Grundlage dieser Methode in Säugerzellen ist die Transfektion von so genannten *small interfering RNAs* (siRNAs) in die Zielzellen (ELBASHIR et al., 2001a). Bei den siRNAs handelt es sich um kleine 21-25 nt lange doppelsträngige Oligonukleotide, die nach dem Transfer in die Zielzellen von einem Proteinkomplex (*RNA-induced silencing complex*; *RISC*) aufgenommen werden (HAMMOND et al., 2000). Dort wird die doppelsträngige RNA ATP-abhängig zu einem Einzelstrang (*guidance RNA*) entwunden. Der so aktivierte *RISC* (*RISC**) bindet an die RNA des Zielproteins und schneidet sie (NYKANEN et al., 2001). Die geschnittene Ziel-RNA wird aufgrund ihrer ungeschützten Enden rasch abgebaut. Abb. 2-1 zeigt einen schematischen Überblick der für die Methode relevanten einzelnen Abfolgeschritte.

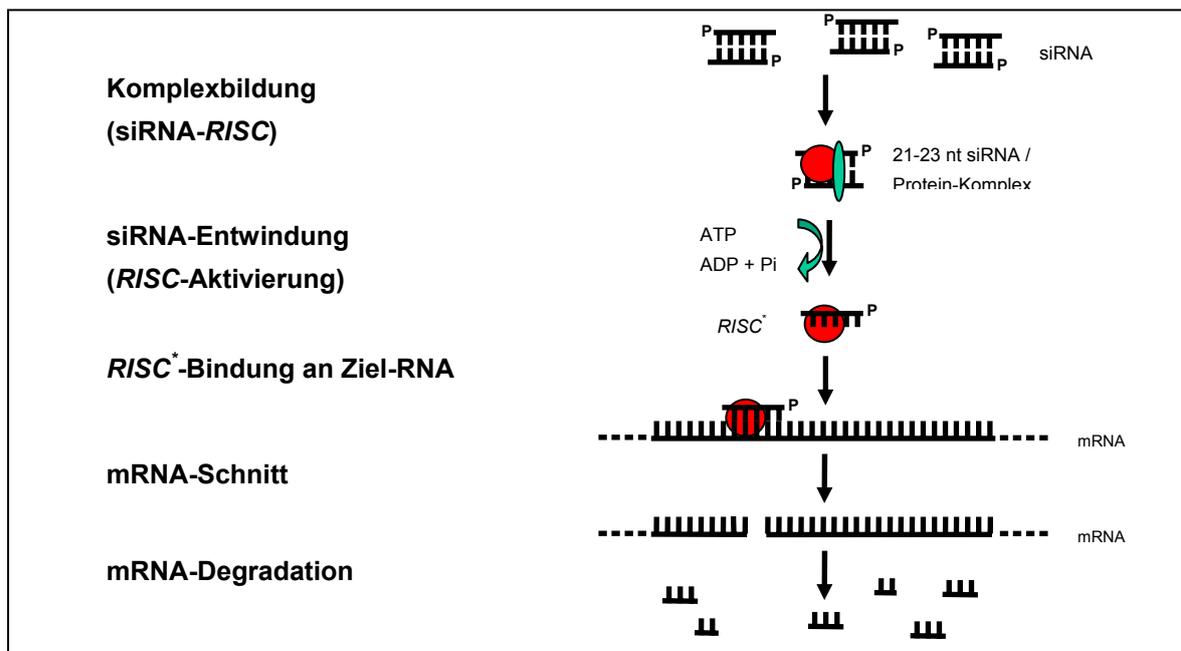


Abb. 2-1 Modell des RNAi-Mechanismus. Modifiziert nach (NYKANEN et al., 2001).

Die Transfektion mit siRNA und vergleichbarer Fluoreszenzoligonukleotide erfolgte analog zu der Übertragung der Expressionsvektoren (Kap. 2.2.2.1). Anstelle der Vektor-DNA wurde siRNA eingesetzt. Als Transfektionsreagenzien wurden OligofectamineTM Reagent und LipofectamineTM 2000 eingesetzt. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, funktionsfähige siRNA-Oligonukleotide zu identifizieren, wurde bei der Auswahl der siRNA-Sequenzen darauf geachtet, die von TUSCHLE et al. und REYNOLDS et al. aufgestellten, empirisch herausgefundenen Regeln zur Generierung von siRNAs zu beachten (REYNOLDS et

al., 2004), (ELBASHIR et al., 2001a), (ELBASHIR et al., 2001b), (ELBASHIR et al., 2002). In Tab. 2-1 sind diese verwendeten Kriterien tabellarisch aufgelistet.

Tab. 2-4 Kriterien für die Auswahl effektiver siRNA-Sequenzen

| Kriterium | Beschreibung |
|------------------|---|
| 1 | siRNA ist gewöhnlich 21 nt lang |
| 2 | Intron-Regionen sind zu vermeiden |
| 3 | Wiederholungen von 4 oder mehr Basen in Reihenfolge sind zu vermeiden |
| 4 | 30 - 50 % GC-Gehalt |
| 5 | Mindestens 3 A/Us an Position 15-19 (codierender Strang) |
| 6 | Möglichst keine intermolekularen Sequenzwiederholungen |
| 7 | A an Position 19 (codierender Strang) |
| 8 | A an Position 3 (codierender Strang) |
| 9 | U an Position 10 (codierender Strang) |
| 10 | Möglichst kein G/C an Position 19 (codierender Strang) |
| 11 | Möglichst kein G an Position 13 (codierender Strang) |
| 12 | Eine siRNA negativ-Kontrolle mit derselben Nukleotid-Zusammensetzung wie der Ziel-RNA, allerdings mit mindestens 4-5 nicht komplementären Basen. |
| 13 | Um Effekte auf andere Gene zu minimieren, sollten die identifizierten Sequenzen keine Homologie zu anderen in der Spezies vorhandenen mRNA-Sequenzen besitzen. Die Überprüfung erfolgte mittels Homologiesuche durch BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/) |

2.2.3. Nukleofektion

Die *Nukleofektion* ist eine von der Firma *Amaxa Biosystems* entwickelte Technologie. Sie ist eine auf Elektroporation basierende Methode, die es ermöglicht durch Kombination einer spezifischen *Nukleofektor-Lösung* und spezifischen elektrischen Parametern Plasmid-DNA direkt in den Zellkern zu transferieren.

Die Transfektion der *PBCEC* wurde nach dem *Basic Nucleofection* Protokoll für primäre Säugendothelzellen durchgeführt. Nach Trypsinierung und Abzentrifugation der Zellen wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 20 °C warmer Nucleofector™-Lösung in

einer Endkonzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/100 μl resuspendiert. Für jeden Ansatz wurden jeweils 100 μl Zell-Suspension mit 2 μg pmaxGFP-Plasmid-DNA versetzt. und in eine Elektroporationsküvette (*Amaxa Biosystems*) überführt. Die Küvette wurde in die *Nukleofektor*-Apparatur (*Amaxa Biosystems*) transferiert und das erwünschte Elektroporationsprogramm gestartet. Es kamen 5 verschiedene Elektroporationsprogramme (M-03, T-05, T-23, T-27 und U-11) zum Einsatz. Zur Kontrolle wurde eine Probe mit dem Programm T-23 ohne DNA elektroporiert, sowie eine Probe mitgeführt, die mit 2 μg pmaxGFP versetzt aber nicht elektroporiert wurde.

Die behandelten Zellsuspensionen wurden in *6-wells* überführt, in die Kulturmedium vorgelegt worden war, und bis zur weiteren Untersuchung im Brutschrank kultiviert.

2.2.4. Adenoviraler Gentransfer

Die adenovirale Transfektion von *PBCEC* wurde von J. Seebach am Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden durchgeführt.

Adenovirales GFP (Ad-GFP) wurde freundlicherweise von J. Seebach zur Verfügung gestellt. Die *PBCEC* wurden vor der Infektion auf *8-well Lab-Tek™ Chambered Coverglass* (*Nunc*) kultiviert und bei einer Zelldichte von ca. 50.000 Zellen/ cm^2 mit Ad-GFP infiziert. Nach 4 h wurde das virushaltige Medium gegen Kulturmedium ausgetauscht. Weitere 24 h später wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

2.3. Untersuchungen zur Funktionalität des Transporters

Um die Funktionalität der stabil ABCG2 transfizierten Zellklone zu überprüfen und modulorenabhängige Einflüsse zu charakterisieren, wurden sowohl Zytotoxizitätstests und *Uptake*-Studien als auch Transportmessungen durchgeführt. Als Substrat für die Zytotoxizitäts- und *Uptake*-Studien wurde ausschließlich der Fluoreszenzfarbstoff *Hoechst 33342* eingesetzt. *Hoechst 33342* ist eine membrangängige Substanz, die bei Bindung an DNA stark blau fluoresziert ($\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}} = 350/461 \text{ nm}$). Sie wird in der Zellkultur zur Anfärbung der Nukleoli von lebenden Zellen verwendet.

2.3.1. Zytotoxizitätstest

Für den Zytotoxizitätstest wurden die zu untersuchenden Zellen in 96 well Mikroplatten (*Greiner Bio-One*) in einem Endvolumen von 200 µl Kulturmedium pro well bis zur Konfluenz kultiviert. Nachfolgend wurde das Medium durch Substrat (*Hoechst 33342*) bzw. Substrat-Modulator-Kulturmediumgemische in einem Endvolumen von 200 µl ersetzt.

Tab. 2-5 zeigt die Konzentrationen der verwendeten Modulator-Stammlösungen.

Nach einer Inkubationsdauer von 72 h wurden die Zellen mittels eines MTS-Assay (*CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)*) hinsichtlich ihrer Vitalität überprüft. Es wurden jeweils Vierfach-Bestimmungen für jede Bedingung durchgeführt.

Das MTS-Assay ist eine kolorimetrische Methode, mit deren Hilfe es möglich ist, die Anzahl lebender Zellen zu quantifizieren. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

Das *CellTiter 96[®] AQueous One Solution*-Reagenz wurde direkt zu den Zellen pipettiert und für 1-3 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Absorptionsmessung mittels eines Mikroplattenphotometers (*Mikrotek Laborsysteme*) bei einer Wellenlänge von 492 nm. Vitale Zellen können das im *CellTiter 96[®] AQueous One Solution*-Reagenz vorhandene MTS-Tetrazolium zu einem wasserlöslichen farbigen Formazan-Produkt umwandeln.

Als Reduktionsmittel dient dabei vermutlich das von metabolisch aktiven Zellen gebildete NADPH oder NADH.

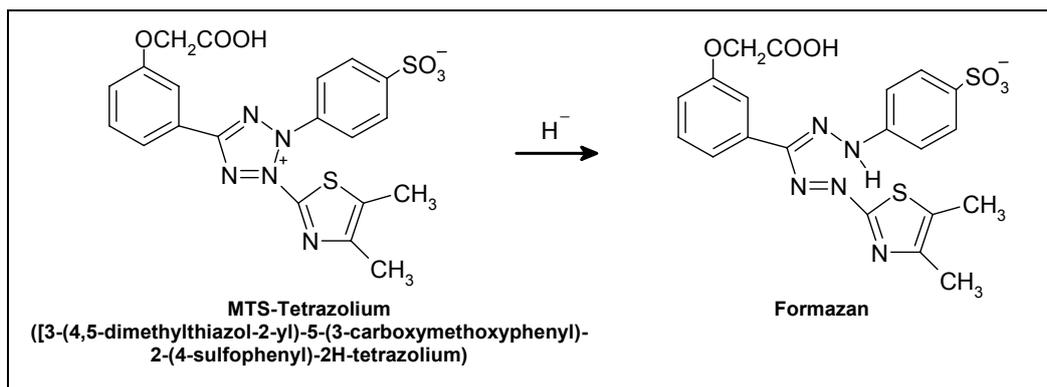


Abb. 2-2 Struktur des MTS-Tetrazoliums und des reduzierten Formazan-Produkts

Tab. 2-5 Konzentrationen der verwendeten Modulator-Stammlösungen

| Modulator | Konzentration Stammlösung (in DMSO) |
|------------------------|--|
| <i>Cyclosporin A</i> | 10 mM |
| <i>Fumitremorgin C</i> | 10 mM |
| <i>GF 120918</i> | 1 mM |
| <i>PSC 833</i> | 10 mM |

Im Fall der *HEK 293*-Zellen wurde auf die Auswertung mittels MTS-Assay verzichtet und die Mediumfärbung des Zellüberstands nach 72 h mit der Software *Phoretix Total Lab* (Version 2003, *Biostep*) densitometrisch ausgewertet. Der Grund für dieses Vorgehen lag in der besseren Reproduzierbarkeit der densitometrischen Auswertungsmethode. Dass die Aussagen des MTS-Assay (Abb. 2-3. a) mit denen der Densitometrie korrelieren, zeigt Abb. 2-3. Zellen mit einer hohen Stoffwechselaktivität (hohe Vitalität) bewirken über 72 h eine Gelbfärbung (Ansäuerung) des ansonsten magentafarbenen Mediums (Abb. 2-3 b). Da die Software *Phoretix Total Lab* für die densitometrische Analyse Graustufenbilder benötigt, wurde aus den mit Hilfe einer Digitalkamera erstellten farbigen Photos der Magenta-Kanal isoliert (Abb. 2-3. c). Für diese Bildbearbeitung wurde die Software *Paint Shop* verwendet (CMYK-Kanaltrennung). Helle Bereiche besitzen einen hohen Magenta-Farbanteil und sind demzufolge Regionen mit niedriger Stoffwechselaktivität bzw. geringer Vitalität.

Die Auswertung der Ergebnisse des MTS-Assay und der densitometrischen Auswertung erfolgte mit der Software *Origin* (Version 7.5). Von den Mittelwerten der Vierfach-Bestimmungen wurde der Messwert von reinem Medium abgezogen. Der Mittelwert der Zellen, die nicht mit Substrat versetzt worden waren, wurde auf 100 % normiert und alle anderen Werte in Relation gesetzt. Weiterhin wurden die Parameter einer Anpassungsfunktion (Abb. 2-4) iterativ über einen *nonlinear least square fit* den Messwerten angenähert und daraus der EC_{50} -Wert (halbmaximaler Dosis-Wirkungs-Wert) ermittelt.

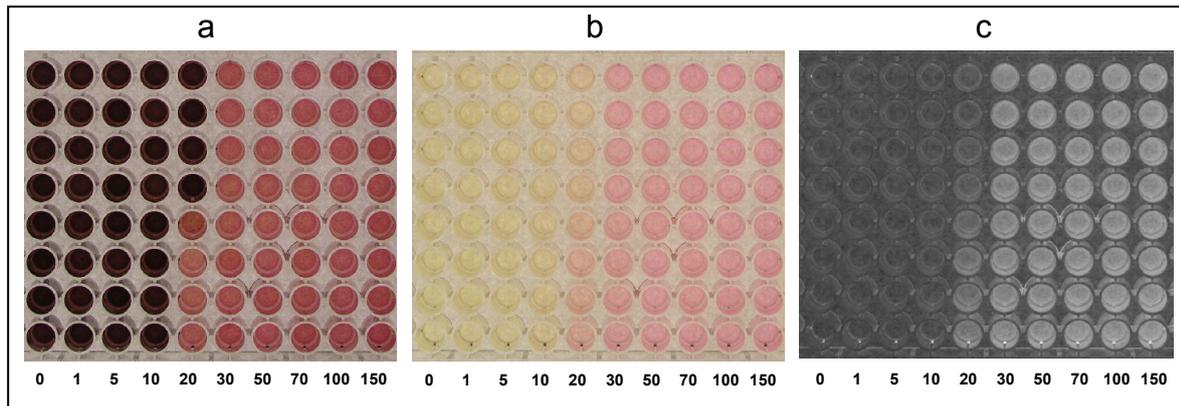


Abb. 2-3 Vergleich zwischen (a) MTS-Assay, (b) Mediumfarbe und (c) dem für die Densitometrie verwendeten Graustufenbild (Magenta-Kanal) von in 96-wells kultivierten HEK-wt-Zellen. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen *Hoechst 33342*-Konzentrationen (Zahlenwerte in μM) 3 Tage inkubiert. In den unteren vier *well*-Reihen war dem Medium zeitgleich zusätzlich jeweils $10 \mu\text{M}$ Cyclosporin zugesetzt worden.

$$y = a - \frac{a - b}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{c} \right)^d}$$

Abb. 2-4 Anpassungsfunktion für die Bestimmung der EC_{50} -Werte des Zytotoxizitätstests. y = Vitalität der Zellen, EC_{50} = halbmaximaler Dosis-Wirkungs-Wert. a = Vitalität der Zellen ohne Substrat, b = Vitalität der Zellen bei höchster Substratkonzentration, c = Substratkonzentration, d = Steigung

2.3.2. Uptake-Messungen

Zusätzlich zu den Zytotoxizitätstests wurden *Uptake*-Messungen mit dem *Fluorescence reader GENios (Tecan)* durchgeführt. Auch hierfür wurden die Zellen in 96 *well* Mikroplatten (*Greiner Bio-One*) in einem Endvolumen von $200 \mu\text{l}$ Kulturmedium pro *well* bis zur Konfluenz kultiviert. Direkt vor der Messung wurde das Medium gegen phenolrotfreies Kulturmedium ausgetauscht. Der Austauschlösung war $10 \mu\text{M}$ *Hoechst 33342* in Kombination mit unterschiedlichen Modulatoren zugesetzt. Es wurden jeweils Vierfach-Bestimmungen durchgeführt. Zur Normierung wurden Zellen mitgeführt, deren Zellmembran durch Zugabe von $10 \mu\text{l}$ Triton X (1 % v/v) permeabilisiert worden war (100 %-Wert). Die gemessenen relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU = *relative fluorescence units*) wurden in der Auswertung auf den RFU-Wert der Normierungszellen bezogen. Die Messung am *Fluoreszenz reader GENios* fand bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Detektionswellenlänge von 465 nm statt.

2.3.3. Bestimmung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER)

Mit Hilfe der Impedanzspektroskopie (IS) ist es möglich den transendothelialen elektrischen Widerstand (TEER) von *PBCEC* zu bestimmen. Der durch IS ermittelte TEER liefert eine Aussage über die parazelluläre Ionenpermeabilität und damit über die Dichtigkeit eines Zellmonolayers. Für die Messung wird eine frequenzabhängige ($1-10^5$ Hz) sinusförmige Wechselspannung (10-100 mV) an das zu untersuchende System (auf Filterplatten kultivierte *PBCEC* (Kap. 2.1.2.4)) angelegt. Dafür wurden die mit dem apikalen Medium befüllten Filtereinsätze in die Messkammer überführt und eine ringförmige Platinelektrode in das apikal befindliche Medium eingetaucht. Der mit Gold beschichtete Boden der Messkammer, der als Gegenelektrode fungiert, wurde mit konditioniertem Medium beschichtet. Alternativ zu diesen Einzelkammermessungen können zeitaufgelöste Messungen über ein von WEGENER et al. (2004) etabliertes Messsystem mit 12 Filtern durchgeführt werden. Aus den aufgezeichneten Impedanzspektren (Abb. 2-5) lässt sich der TEER berechnen. Dazu werden iterativ über einen *nonlinear least square fit* (WEGENER, 1998) die Parameter einer auf einem Ersatzschaltbild basierenden Übertragungsfunktion an das Impedanzspektrum angenähert. Detaillierte Informationen zu diesem nicht invasiven Messverfahren sind bei WEGENER et al. (2000) zu finden.

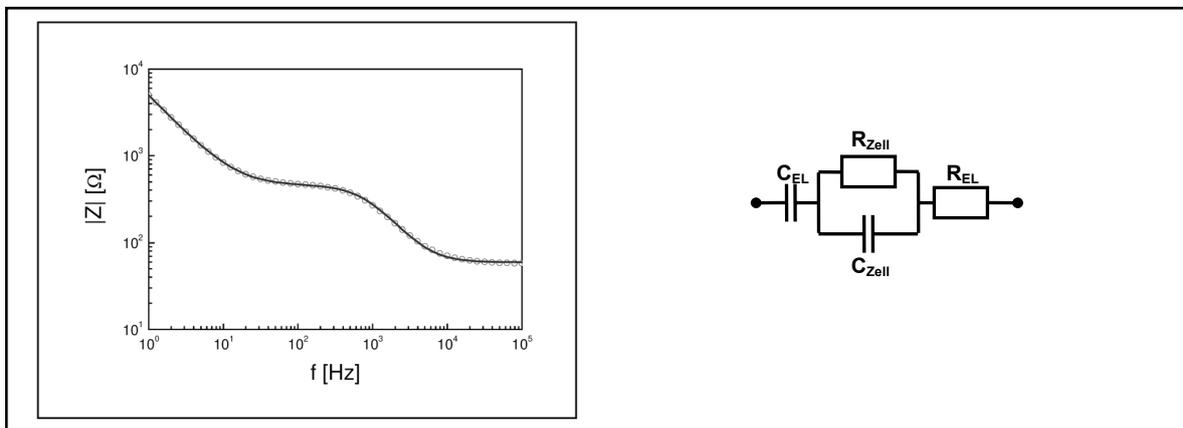


Abb. 2-5 Exemplarisches Impedanzspektrum eines konfluenten *PBCEC*-Monolayers auf permeablem Kultursubstrat. Die Kreise entsprechen der frequenzabhängig gemessenen Impedanz und die Linie der auf Basis des gezeigten Ersatzschaltbildes angenäherten Funktion des Impedanzspektrums. R_{EL} = Widerstand des Mediums, R_{Zell} = TEER, C_{EL} = Kapazität der Helmholtz-Schicht zwischen Elektrode und Elektrolyt, C_{Zell} = Kapazität des Monolayers.

2.3.4. Fluoreszenz Mikroskopie

Fluoreszenz Mikroskopie wurde genutzt, um sowohl die Expression von fluoreszierenden YFP/ABGC2-Fusionsproteinen als auch immunozytochemische Färbungen unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern zu untersuchen.

Neben einem inversen Phasenkontrastmikroskop (*Leika*) wurde auch ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (*CLSM, Leika*) verwendet.

Die entscheidende Besonderheit eines *CLSM* gegenüber einem herkömmlichen Lichtmikroskop ist, dass, bedingt durch die Anordnung der optischen Komponenten, verstärkt Licht aus der Fokusebene detektiert wird. Voraussetzung hierfür ist ein so genannter konfokaler Strahlengang. Das bedeutet, dass der Beleuchtungspunkt, der durch einen fokussierten Laserstrahl angeregt wird, und der Beobachtungspunkt (Konfokalpunkt) in der Zwischenbildebene ineinander abgebildet werden können (in konjugierten Ebenen liegen). Das Anregungslicht wird über einen Laser erzeugt und durch einen Hauptfarbteiler (dichroider Spiegel) durch das Objektiv auf die Probe fokussiert (Fokuspunkt). Über einen Scanspiegel wird der fokussierte Laserstrahl zeilenweise über das Objekt bewegt. Das erzeugte Fluoreszenzlicht wird von demselben Objektiv, das in diesem Fall als Kondensor wirkt, gesammelt und über den Farbteiler zum Detektor weitergeleitet. Die Selektion der interessierenden Wellenlänge erfolgt durch einen Emissionsfilter. Eine in dieser Zwischenbildebene angebrachte Blende (*pinhole*) sorgt dafür, dass Licht, welches durch Anregung außerhalb (ober- oder unterhalb) der Fokusebene abgestrahlt wird, nicht detektiert wird. Da nur Fluoreszenzlicht aus einer Ebene detektiert wird, ist durch Verschiebung des Objektes in z-Richtung (mittels z-Motor) die Aufnahme von x-y-Schnittstapeln oder x-z- und y-z-Schnitten möglich.

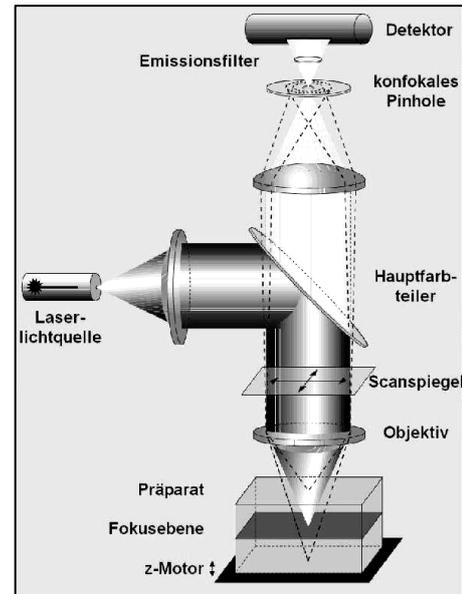


Abb. 2-6 Schematische Darstellung eines CLSM¹

¹ <http://www.zeiss.com.cn/C1256CFB00332E16/0/15C9ECEF992A7996C1256E5C004288D7>

2.4. Molekularbiologische Arbeiten

Alle verwendeten Lösungen, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden vor Gebrauch 20 min bei 120°C autoklaviert. Glaswaren wurden für 3 h bei 200°C sterilisiert. Für die Versuche mit RNA wurden die verwendeten Lösungen, sofern sie nicht vom Hersteller RNase frei geliefert wurden, zusätzlich über Nacht mit 0,1 % (v/v) Dimethylpyrocarbonat (DMPC) behandelt.

2.4.1. Agarosegelelektrophorese von DNA

Nukleinsäuren werden in Agarosegelen entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeit aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Größe der Nukleinsäuren, dem verwendeten Elektrodenpuffer, der angelegten Spannung und dem Porendurchmesser der Gelmatrix (Agarosekonzentration) ab. So lassen sich in Abhängigkeit von der Agarosekonzentration des Gels DNA-Fragmente in einem sehr weiten Größenbereich auftrennen (Tab. 2-6).

Es wurden ausschließlich nicht-denaturierende (formaldehydfreie) Gele verwendet. Die Agarosemenge wurde entsprechend der Größe der aufzutrennenden DNA durch Erhitzen in einer Mikrowelle in 0,5 x Tris-Acetat (TAE) - Puffer gelöst. Anschließend wurde die Lösung in eine Gelkammer gegossen, in der sie für mindestens 20 min abkühlte. Vor dem Auftragen wurden die Proben 1:9 mit DNA-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 5 V/cm oder 10 V/cm Elektrodenabstand in 0,5 x TAE-Puffer. Zur Bestimmung der Größe der Fragmente wurden Längenstandards (*NEB*) mit aufgetragen. Im Anschluss wurden die Gele in ethidiumbromidhaltigem (0,5 mg/ml) 0,5 x TAE-Puffer inkubiert und mittels langwelligen UV-Lichts visualisiert.

Tab. 2-6 Auftrennungsbereich in Abhängigkeit von der Agarosegelkonzentration (Aus: Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)

| Agarosekonzentration (% w/v) | 0,3 | 0,6 | 0,7 | 0,9 | 1,2 | 1,5 | 2 |
|------------------------------------|------|------|--------|-------|-------|-------|-------|
| optimaler Auftrennungsbereich (kb) | 5-60 | 1-20 | 0,6-10 | 0,5-7 | 0,4-6 | 0,2-3 | 0,1-2 |

50 x TAE-Puffer, pH 7,4 - 7,8

| | |
|--------|----------|
| 2 M | Tris/HCl |
| 2 M | NaCl |
| 0,05 M | EDTA |

10 x DNA-Ladepuffer

| | |
|--------------|----------------|
| 0,25 % (w/v) | Bromphenolblau |
| 0,25 % (w/v) | Xylencyanol |
| 15 % (w/v) | <i>Ficoll</i> |

2.4.2. Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.4.2.1. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration und Reinheit von DNA- und RNA-Lösungen wurde mittels eines UV-VIS Spektrophotometers bestimmt.

Grundlage dieser Messung ist, dass die optische Dichte (OD) bei 260 nm (OD_{260}) vor allem auf der Absorption der aromatischen Ringe der Nukleinsäure-Basen beruht, während bei 280 nm (OD_{280}) vor allem die aromatischen Aminosäurereste absorbieren.

Demzufolge kann aus dem OD_{260} -Wert die Konzentration der Nukleinsäuren ermittelt werden. Durch die Bestimmung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} wird es möglich, eine Aussage über die Reinheit einer Nukleinsäurelösung zu treffen. Bei Verwendung einer 1 cm-Küvette entspricht eine OD von 1 einer Einzelstrang-RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ bzw. einer Doppelstrang-DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$.

Der OD_{260}/OD_{280} -Wert, der eine Aussage über die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren zulässt, sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Werte außerhalb dieses Bereichs weisen auf Verunreinigungen hin.

2.4.2.2. Quantifizierung der Nukleinsäuremenge mittels eines Molekulargewichtsmarkers

Im Besonderen für Klonierungsarbeiten wurde die DNA-Menge in Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen mit Hilfe der parallel aufgetragenen Molekulargewichtsmarker bestimmt. Im Speziellen wurde die so genannte *SmartLadder* (*Eurogentec*) eingesetzt, deren Größenstandards eine definierte Masse zugeordnet ist.

Die DNA-Menge kann durch visuellen Vergleich der Färbungsintensität der Probenfragmente mit denen der Leiter abgeschätzt werden.

2.4.3. DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Zur Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das *QIAquick Gel Extraction Kit* (*QIAGEN*) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 10.000 x g durchgeführt.

Die DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten, mit dem dreifachen Volumen *QG*-Puffer (*QIAGEN*) versetzt (1 mg Gel ~ 3 μl Puffer) und bei 50°C für 10 min inkubiert. Danach wurde ein Gelvolumen Isopropanol zugesetzt und die Lösung in eine *QIAquick spin* Säule (*QIAGEN*) überführt und für eine Minute zentrifu-

giert. Danach wurde die an der Silicagel-Membran absorbierte DNA zunächst mit 500 µl *QG* und in der Folge mit 750 µl ethanolhaltigem *PE*-Puffer (*QIAGEN*) gewaschen und jeweils für eine Minute zentrifugiert. Die Durchflüsse wurden verworfen. Ein weiterer abschließender Zentrifugationsschritt diente der Entfernung von verbliebenem, aus dem *PE*-Puffer stammenden, Ethanol. Nach Zugabe von 50 µl *EB*-Puffer (*QIAGEN*) auf die Silicagel-Membran und einminütiger Inkubation wurde die DNA durch Zentrifugation abgetrennt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie unter 2.4.2.1 beschrieben. Die Proben wurden bei einer Temperatur von -20°C gelagert.

2.4.4. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte aus *E. coli*-Kulturen, die über Nacht in antibiotikahaltigem LB-Medium vermehrt worden waren. Die Auswahl des Antibiotikums richtete sich nach der von den Plasmiden vermittelten Antibiotikaresistenz.

Es wurden zwei verschiedene Isolierungsmethoden verwendet. Für Experimente, in denen nur kleine Mengen (<10 µg) Plasmid-DNA nötig waren, wie Sequenzierung, Restriktionsanalyse Ligation oder PCR, wurde das *QIAprep Spin Miniprep Kit* (*QIAGEN*) verwendet. Die Isolierung von größeren Plasmid-Mengen (<500 µg) für Transfektionsexperimente erfolgte durch das *QIAGEN Maxi Prep Kit* (*QIAGEN*). Beide Methoden basieren auf dem Verfahren der alkalischen Lyse. Bei dieser Technik wird die Bakterienzelle alkalisch lysiert und die DNA in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen an eine Silica-Gel-Membran gebunden. Durch Medien geringer Ionenstärke und einem pH zwischen 7 und 8,5 wird die DNA wieder eluiert.

Durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm (OD_{260} , OD_{280}) wurde die Konzentration und Reinheit der eluierten DNA bestimmt (Kap. 2.4.2.1).

Die Plasmid-DNA wurde entweder direkt verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.4.4.1. QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)

Es wurden 2 ml Bakteriensuspension in ein 2 ml Reaktionsgefäß transferiert und bei 10.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 250 µl *P1*-Puffer (*QIAGEN*) resuspendiert. Es wurden 250 µl *P2*-Puffer (*QIAGEN*) zugegeben und vorsichtig 4-6 mal invertiert. Danach wurden dem Gemisch 350 µl *N3*-Puffer (*QIAGEN*) hinzugefügt und es wurde für 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein *QIAprep*-Säulchen (*QIAGEN*) appliziert und dieses in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 10.000 x g wurde der Durchfluss verworfen und auf das Membransäulchen 500 µl *PB*-Puffer (*QIAGEN*) gegeben. Es

wurde wie im Schritt zuvor zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Darauf folgte ein weiterer Waschschrift mit 750 µl *PE*-Puffer bei 10.000 x g für 1 min. Um das Ethanol, das Bestandteil des *PE*-Puffers ist und störend auf anschließende enzymatische Reaktionen wirken kann, vollständig zu entfernen, wurde noch einmal zentrifugiert. Eluiert wurde die DNA durch Zugabe von 50 µl *EB*-Puffer (*QIAGEN*) und Zentrifugation (10.000 x g, 1 min nach erfolgter einminütiger Inkubation).

2.4.4.2. *QIAGEN* Plasmid Maxi Kit (*QIAGEN*)

100 ml *E. coli*-Kultur wurden bei 4°C und 6000 x g für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 10 ml *RNase A*-haltigem *P1*-Puffer (*QIAGEN*) in einem 50 ml PP-Röhrchen resuspendiert. Es wurden 4 ml *P2*-Puffer (*QIAGEN*) zugegeben und gründlich durch Invertieren gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation wurden dem Lysat 10 ml auf Eis vorgekühlter *P3*-Puffer (*QIAGEN*) hinzugesetzt und vorsichtig vier bis sechsmal invertiert. Das Lysat wurde in einen *QIAfilter*-Einsatz (*QIAGEN*) transferiert und für 10 min inkubiert. Währenddessen wurde ein *QIAGEN-tip 500* (*QIAGEN*) mit 10 ml *QBT*-Puffer (*QIAGEN*) äquilibriert. Nach der Inkubation wurde das Lysat in das vorbereitete *QIAGEN-tip 500* überführt und gewartet, bis die Lösung vom Säulenmaterial aufgenommen wurde. Danach wurde zweimal mit jeweils 30 ml *QC*-Puffer (*QIAGEN*) gewaschen. Mit 15 ml *QF*-Puffer (*QIAGEN*) wurde die DNA von der Säule eluiert. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und anschließender Zentrifugation (30 min, 4°C, 15.000 x g) wurde die DNA präzipitiert und abgetrennt. Sie wurde mit 5 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 4°C, 15.000 x g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 10 min luftgetrocknet und daraufhin in 250 µl *EB*-Puffer (*QIAGEN*) resuspendiert.

P1-Puffer (Resuspensionspuffer)

| | |
|-----------|------------------|
| 50 mM | Tris/HCl, pH 8.0 |
| 10 mM | EDTA |
| 100 µg/ml | <i>RNase A</i> |

QBT-Puffer

| | |
|--------------|--------------|
| 750 mM | NaCl |
| 50 mM | MOPS, pH 7,0 |
| 15 % (v/v) | Isopropanol |
| 0,15 % (v/v) | Triton X-100 |

P2-Puffer (Lysis-Puffer)

| | |
|-----------|------|
| 200 mM | NaOH |
| 1 % (w/v) | SDS |

QC-Puffer

| | |
|------------|--------------|
| 1 M | NaCl |
| 50 mM | MOPS, pH 7,0 |
| 15 % (v/v) | Isopropanol |

P3-Puffer (Neutralisations-Puffer)

| | |
|--------|---|
| 3 M | Kaliumacetat (KCH ₃ CO ₂) |
| pH 5,5 | |

QF-Puffer

| | |
|------------|------------------|
| 1,25 M | NaCl |
| 50 mM | Tris/HCl, pH 8.5 |
| 15 % (v/v) | Isopropanol |

2.4.5. RNA-Isolierung

Für die Isolierung von Gesamt-RNA (gRNA) wurde das *RNeasy Mini Kit (QIAGEN)* verwendet. Das *RNeasy*-Verfahren beruht auf der selektiven Anbindung von RNA an eine Silicagel-Membran in der Anwesenheit eines Hochsalz-Puffers. Durch stark denaturierende Lysisbedingungen in Gegenwart von Guanidinisothiocyanat können eventuell vorhandene RNasen effizient inaktiviert werden.

Alle für dieses Protokoll durchgeführten Zentrifugationen fanden bei 8000 x g statt.

Die Zellen einer 75 cm²-Flasche wurden zweimal mit *PBS* gewaschen. Zur Zellyse wurde zu den Zellen jeweils 600 µl *RLT*-Puffer (*QIAGEN*), dem 10 % v/v β-Mercaptoethanol (β-EtSH) zugesetzt worden waren, gegeben. Nach einer Minute wurden die Zellen mit einem Zellschaber entfernt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde fünfmal durch eine Kanüle ($d_A = 0,45$ mm) gezogen und mit 600 µl Ethanol (70 %) versetzt. Anschließend wurde die Lösung in eine *RNeasy Mini*-Säule (*QIAGEN*) pipettiert und für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 350 µl *RWI*-Puffer (*QIAGEN*) in die *RNeasy Mini*-Säule pipettiert und für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und die *RNeasy Mini*-Säule nach Zupipettieren einer Mischung aus 10 µl DNase-I-Lösung (2,7 Kunitz-Einheiten/µl) und 70 µl *RDD*-Puffer (*QIAGEN*) für 15 min inkubiert. Danach erfolgten zwei Waschschrte durch Zugabe von jeweils 500 µl ethanolhaltigem *RPE*-Puffer zur *RNeasy Mini*-Säule mit anschließender Zentrifugation für 15 s bzw. 2 min. Nach dem ersten Waschschrte erfolgte eine Zentrifugation für 15 s, nach dem Zweiten eine für 2 min. Die *RNeasy Mini*-Säule wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für eine Minute bei maximaler Drehzahl zentrifugiert um etwaige Reste Ethanol vollständig zu entfernen. Die *RNeasy Mini*-Säule wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 30-50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Silicagel-Membran pipettiert. Durch Zentrifugation (1 min) wurde die RNA aus der Membran eluiert. Die RNA-Lösungen wurden bei -70°C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wie unter 2.4.2.1 beschrieben.

2.4.6. Erststrang-cDNA-Synthese für PCR

cDNA wurde aus Gesamt-RNA unter Verwendung der *SuperscriptTM II RNase H* reversen Transkriptase (*Gibco Life technologies*) synthetisiert. Für die Erststrang-cDNA-Synthese wurde RNA-Lösung (2,5 µg Gesamt-RNA) mit 1 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/ml) und 1 µl dNTP Mix (jeweils 10 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP) versetzt und mit ddH₂O auf 12 µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis

schnell abgekühlt. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wurde durch eine kurze Zentrifugation gesammelt und anschließend mit 4 µl *5x First-Strand-Puffer* (*Gibco Life technologies*) und 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (*DTT*) versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde bei 42°C für 2 min inkubiert. Danach wurde 1 µl *SuperscriptTM II RNase H* reverse Transkriptase zugesetzt und für 50 min bei 42°C inkubiert. Die Transkriptase wurde durch Aufheizen auf 70°C für 15 min inaktiviert. 10 % der Lösung wurden für eine anschließende PCR eingesetzt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.4.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR wurden unter Verwendung von genspezifischen Oligonukleotiden (Primern) DNA-Fragmente exponentiell vermehrt. Die Amplifikation erfolgt durch einen zyklischen Prozess, bei dem der DNA-Doppelstrang denaturiert wird, die Primer an der DNA-Matrize hybridisieren und eine hitzestabile DNA-Polymerase die Startsequenzen elongiert. In Abhängigkeit vom Verwendungszweck wurden unterschiedliche Polymerasen eingesetzt. Für die Vermehrung der porcinen *ABCG2* (*pAbcg2*) Sequenz aus *PBCEC*-cDNA (Kap. 2.4.6) wurde, um möglichst mutationsfreie Synthesebedingungen zu gewährleisten, die *KOD Hot Start DNA Polymerase* (aus: *Thermococcus kodakaraensis*, *Novagen*) verwendet. Diese Polymerase verfügt über eine 3'-5' Exonukleaseaktivität, die ein Korrekturlesen und damit eine hohe Ablesegenauigkeit ermöglicht. Zudem wird die *KOD*-DNA-Polymerase hitzeaktiviert, wodurch unspezifische Amplifikationen und Primer-Degradation, bedingt durch die Exonukleaseaktivität, effizient inhibiert werden. Für alle anderen Anwendungen, bei denen Plasmid DNA als Matrize verwendet wurde, kam eine herkömmliche *Thermus aquaticus* (*Taq*)-DNA-Polymerase (*New England Biolabs*) zum Einsatz.

Die PCR erfolgte entweder im *Mastercycler gradient* (*Eppendorf*) oder im *Mastercycler person* (*Eppendorf*).

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (Kap. 2.4.1), gegebenenfalls aus dem Gel aufgereinigt (Kap. 2.4.3) und quantifiziert (Kap. 2.4.2.1). Die PCR-Produkte wurden entweder direkt verwendet oder bei -20°C gelagert.

2.4.7.1. KOD Hot Start DNA Polymerase PCR-Protokoll

Zur Vervielfältigung der *pAbcg2*-Sequenz aus *PBCEC*-cDNA unter Verwendung von *KOD*-DNA-Polymerase wurde als Ausgangsmaterial ein cDNA-Äquivalent von ca. 250 ng gRNA eingesetzt.

In einem Reaktionsvolumen von 25 μl wurden 2,5 μl 10 x PCR-Puffer für *KOD Hot Start DNA Polymerase* (Novagen), 1 μl MgSO_4 (25 mM) (Novagen), 2,5 μl dNTP-Mix (je 2 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP) (Novagen), 1,5 μl *pAbcg2_For* und *pAbcg2_Rev* - Primer (je 5 pmol/ μl), 1 μl cDNA, 14,5 μl ddH₂O und 0,5 μl *KOD Hot Start DNA Polymerase* (1 U/ μl) (Novagen) pipettiert.

Die PCR wurde dem folgenden Programm entsprechend durchgeführt:

Nach einer dreiminütigen initialen Denaturierung bei 95°C folgten 30 Zyklen mit jeweils einer Denaturierung der DNA für 30 s bei 95°C, einer einminütigen Hybridisierung der Primer bei 50°C und einer dreiminütigen Elongation bei 75 °C. Anschließend wurde für weitere 10 min bei 37° inkubiert, um der DNA-Polymerase die Möglichkeit zu geben, nicht beendete DNA-Stränge fertig zu stellen.

Da die *KOD*-DNA-Polymerase nicht fähig ist die für ein *TA-Cloning* benötigten A-Überhänge zu synthetisieren, wurde im Anschluss an die PCR eine A-Überhang-Synthese mittels *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt.

2.4.7.2. *Taq*-DNA-Polymerase PCR-Protokoll

Bei der Vervielfältigung von Plasmid-DNA-Sequenzabschnitten, wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 μl 5 μl 10 x PCR-Puffer (*New England Biolabs*), 1,5 μl MgCl (50 mM), 2 μl dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP), 0,5 μl 5'- und 3'-Primer (je 5 μM), 0,5 μl Plasmid-DNA, 40,5 μl ddH₂O und 0,5 μl *Taq*-DNA-Polymerase pipettiert. Das PCR-Programm entspricht dem der *KOD*-DNA-Polymerase (Kap. 2.4.7.1) mit den Modifikationen, dass die Elongationszeit auf 1 min verkürzt ist und die Hybridisierungstemperatur den verwendeten Primern entsprechend angepasst wurde (Kap. 8.4).

2.4.7.3. Quantitative Echtzeit-PCR unter Verwendung von *SYBR Green*

Die Quantitative Echtzeit-PCR (*quantitative Real-Time PCR*; *qRT-PCR*) ist eine Methode, die es ermöglicht, mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen die Vervielfältigung eingesetzter Ausgangs-cDNA und damit ursprünglich vorliegender mRNA während des PCR-Verlaufs zu detektieren. Die Generierung des Fluoreszenzsignals wird in der vorliegenden Arbeit durch Interkalation des Farbstoffes *SYBR Green* in die DNA- Doppelhelix bewirkt. Die auf einen internen Referenzfarbstoff (ROX) normierte Fluoreszenzintensität (R_n) wird gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Aus dem Kurvenverlauf von R_n gegen die Zyklenzahl am Ende eines jeden Elongationsschrittes lässt sich die Bildung der Amplikone direkt (*Real-Time*) verfolgen. In der exponentiellen Phase der PCR, der den linearen Bereich der Kurve

bei logarithmischer Auftragung der Fluoreszenzintensität darstellt und in der die Reagenzienkonzentrationen noch nicht limitierend wirken, wird ein Fluoreszenz-Schwellenwert (*threshold*) bestimmt. Je größer die ursprünglich eingesetzte Template-Menge am Anfang der Reaktion war, desto weniger Zyklen müssen ablaufen um den Schwellenwert zu erreichen. Der Zyklus, an dem das Fluoreszenz-Signal der amplifizierten doppelsträngigen DNA (dsDNA) den Schwellenwert erreicht, wird als Schwellenwertzyklus (*threshold cycle*) bezeichnet. In Abhängigkeit von der Ausgangsmenge der amplifizierten Sequenz in den untersuchten Proben ergeben sich unterschiedliche C_t -Werte. Zur Normierung wurden von den C_t -Werten der Zielgene die C_t -Werte des stets mitgeführten *housekeeping* Gens β -Aktin abgezogen. Die so erhaltenen ΔC_t -Werte ($\Delta C_t = C_t^{\text{Zielgen}} - C_t^{\beta\text{-Aktin}}$) sind umgekehrt proportional zum Expressionsgrad des Zielgens und wurden aus Gründen der Anschaulichkeit umgerechnet in $15\text{-}\Delta C_t$ -Werte. Hohe Expressionen des Zielgens entsprechen somit auch hohen $15\text{-}\Delta C_t$ -Werten.

Die qRT-PCR wurde unter Verwendung des *qPCRTM Core Kit for SYBR[®] Green I* (Eurogentec) im Thermocycler *GeneAMP[®] 5700* (PE Biosystems) durchgeführt. Die Lösungen wurden entsprechend Tab. 2-7 a) zusammengegeben.

Die für die qRT-PCR verwendeten Primer (Kap. 8.4) wurden mit Hilfe der Software *Primer Express v 1.0* (Applied Biosystems) anhand porciner Sequenzen ausgewählt. Die Primereffizienz wurde nicht ermittelt, da lediglich ein einzelnes Gen unter verschiedenen Bedingungen untersucht und darüber hinaus keine absoluten mRNA-Mengenunterschiede bestimmt wurden. Um zu überprüfen, ob unspezifische Amplifikationen oder Primer-Primer-Dimere auftraten, wurden im Anschluss an die PCR Dissoziationskurven des PCR-Ansatzes aufgenommen und analysiert. Das Temperaturprogramm der PCR und das Dissoziationsprotokoll sind in Tab. 2-7 b) aufgeführt.

Tab. 2-7 qRT-PCR Pipettierschema und Temperaturprogramm

| a) | |  | b) | | |
|-----------------------------------|------------------|---|------------------------|------------|--------|
| Reagenz | Volumen/ μ l | | Schritt | Temperatur | Zeit |
| ddH ₂ O | 14,875 | 40 Zyklen | initiale Denaturierung | 95 °C | 10 min |
| 10x-Puffer | 2,500 | | Denaturierung | 95 °C | 15 sec |
| Magnesiumchlorid (50 mM) | 1,750 | | Hybridisierung | 60 °C | 1 min |
| dNTP-Mix (5 mM) | 1,000 | | Elongation | 60 °C | 1 min |
| 3'-Primer (300 nM) | 0,750 | | finale Elongation | 60 °C | 15 min |
| 5'-Primer (300 nM) | 0,750 | | Dissoziationsprotokoll | 95 °C | 15 sec |
| SYBR Green working solution | 0,750 | | | 60 °C | 20 sec |
| cDNA | 2,500 | | langames Aufheizen | 60-95 °C | |
| Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μ l) | 0,125 | | | | |

2.4.8. Konstruktion der Expressions-Vektoren

Für die Konstruktion des pAbcg2/pcDNA3-, pAbcg2/pEYFP-C1- und pAbcg2/pcDNA4-Expressionsvektors wurde ausgehend von *PBCEC*-cDNA zunächst mit Hilfe einer PCR (Kap. 2.4.7.1) unter Verwendung der Primer *pAbcg2_For* und *pAbcg2_Rev* ein Fragment vermehrt, das die pAbcg2 codierende Sequenz (*coding sequence (cgs)*) einschließt. Dieses Fragment wurde dann mittels *TA-Cloning* (2.4.10) in den Klonierungsvektor pCR2.1 (*Invitrogen*) inseriert und in *E. coli* Top 10F' transformiert (Kap. 2.5.2). Die klonierten Fragmente von positiven Transformanten wurden sequenziert (Kap. 2.4.9). Von der Sequenzanalyse ausgehend wurden Primer generiert (*Abcg2_S_for* / *Abcg2_S_rev* und *Schnitt_c1_fo2_por* / *Schnitt_c1_rev*), die Schnittstellen enthalten, mit denen eine gerichtete und das Leseraster berücksichtigende Subklonierung der pAbcg2 codierenden Sequenz in die Expressionsvektoren pcDNA3 (*Invitrogen*) und pEYFP-C1 (*BD Biosciences Clontech*) ermöglicht wurde.

Die Herstellung des **pAbcg2/pcDNA3**-Expressionsvektors erfolgte dabei durch direkte Ligation (Kap. 2.4.9) des mit *Abcg2_S_for* und *Abcg2_S_rev* amplifizierten und mit *EcoRI* geschnittenen PCR-Produkts in einen mit diesem Enzym linearisierten pcDNA3-Vektor.

Für die Konstruktion des **pAbcg2/pEYFP-C1**-Vektors wurde das mit den Primern *Schnitt_c1_fo2_por* und *Schnitt_c1_rev* amplifizierte PCR-Produkt zunächst wieder mittels *TA-Cloning* in einen pCR2.1-Klonierungsvektor inseriert. Als Template hierfür diente der pAbcg2-pcDNA3-Expressionsvektor. Durch anschließende Restriktion des Klonierungs- und des Expressionsvektors (pEYFP-C1) mit *BamHI* und *XhoI* und Ligation des *pAbcg2-Inserts* in den linearisierten Expressionsvektor wurde schließlich der pAbcg2-pEYFP-C1-Expressionsvektor generiert.

Um den **pAbcg2/pcDNA4**-Vektor zu generieren, wurde das *pAbcg2-Insert* aus dem pAbcg2/pcDNA3-Vektor mit *EcoRI* herausgeschnitten und in einen mit *EcoRI* linearisierten pcDNA4TM/TO/*myc*-His B-Vektor (*Invitrogen*) ungerichtet ligiert.

In allen Fällen erfolgte nach der PCR sowie nach der Restriktion eine Auftrennung und Aufreinigung der Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese und -elution. Die hergestellten Vektoren wurden sequenziert (Kap. 2.4.11). Die verwendeten Vektoren und die Sequenzen der Primer sind im Anhang (Kap. 8.4) aufgelistet.

2.4.8.1. Restriktion

Für die Restriktion wurden 1-3 µg DNA mit 1 µl Restriktionsendonuklease (10 U/µl, *New England Biolabs*) und 2 µl 10x Restriktionspuffer (*New England Biolabs*) vermischt und mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert und

die Restriktionsendonukleasen den Herstellerangaben gemäß hitzeinaktiviert. Die Restriktion wurde wenn möglich mittels Gelelektrophorese (Kap. 2.4.1) kontrolliert und die geschnittenen Fragmente mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Kap. 2.4.3) aufgereinigt.

2.4.9. Ligation

Für die Ligation wurde in der Regel ein Vektor/*Insert* Mengenverhältnis von 1:3 gewählt. Die hierfür notwendige Quantifizierung der Nukleinsäure-Menge erfolgte wie in 2.4.2 beschrieben. Für den Ligationsansatz wurden 1 µl T4 DNA Ligase (4 U/µl, *New England Biolabs*), 2 µl 10 x Ligationspuffer (*New England Biolabs*), Vektor- und *Insert*-DNA im berechneten Verhältnis und ddH₂O in einem Endvolumen von 20 µl vermischt. Die Ligation wurde bei 14°C über Nacht durchgeführt. Bis zur Transformation in *E. coli* Zellen wurde der Ligationsansatz bei 4°C gelagert.

2.4.10. TA-Cloning

Das *TA-Cloning* erfolgte mit Hilfe des *TA Cloning® Kit* von *Invitrogen*. Das Verfahren beruht auf der Matrizen-unabhängigen Eigenschaft der *Taq*-Polymerase einzelne Desoxyadenosine (A) an das 3'-Ende von PCR-Produkten anzuhängen. Der im *TA Cloning® Kit* enthaltene linearisierte Vektor (pCR2.1) hat einzelne 3' Desoxythymidin-(T)-Reste. Diese ermöglichen eine effiziente Ligation des PCR-Produkts in den Vektor.

Für die Ligation wurden 50 ng pCR2.1-Vektor und frisches PCR-Produkt mit 1 µl 10 x Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (4 U/µl) (beides im *Kit* enthalten) vermischt und mit ddH₂O auf 10 µl aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde bei 14°C über Nacht inkubiert und am folgenden Tag in *E. coli* transformiert.

2.4.11. Sequenzierung

Um sicherzustellen, dass die hergestellten Vektoren die korrekte Sequenz aufwiesen, wurden die Vektorkonstrukte, deren *Insert*-Größe durch Restriktionsanalyse oder PCR den Erwartungen entsprechend bestätigt werden konnte, sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma *Seqlab* (Göttingen) unter Verwendung von Sequenzierungsprimern (Kap. 8.4).

2.5. Mikrobiologische Arbeiten

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden an der Sterilbank (BSB 4a) mit sterilen Lösungen und Geräten entsprechend den Vorschriften, die für das Arbeiten in der Sicherheitsstufe 1 zu erfüllen sind, durchgeführt. Sowohl Flüssig- als auch Plattenkulturen wurden bei 37°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden zusätzlich während der Inkubation stetig geschüttelt.

2.5.1. Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Die Bakterien (TOP10F'-*E. coli*) wurden zwecks Vereinzlung auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde in 10 ml LB-Medium inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden 5 ml der Kultur in 100 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD₂₆₀ von 0,7-1,0 bei 37°C inkubiert. 50 ml dieser Kultur wurden bei 4°C für 5 min bei 4500 x g zentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde in 20 ml 4°C kalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 4500 x g, 4°C) wurde das Pellet in 2 ml 4°C kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und nach Mischung mit 500 µl Glycerol sofort in flüssigem Stickstoff in 100 µl Aliquote eingefroren. Die kompetenten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

2.5.2. Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden die bei -70 °C eingefrorenen kompetenten *E. coli*-Zellen (TOP10F') auf Eis aufgetaut. Es wurden 10 µl Ligationsansatz in ein Reaktionsgefäß mit 100 µl kompetenten Zellen transferiert, vorsichtig durch Rühren mit der Pipettenspitze gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein zweiminütiger Hitzeschock bei 42°C. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis gestellt, 250 µl LB-Medium hinzugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf LB-Platten, die ein dem transformierten Vektor entsprechendes Selektionsantibiotikum (50 µg/ml Kanamycin oder 50 µg/ml Ampicillin) enthielten, ausgestrichen und bei 37°C bis zur Ausbildung einzelner Kolonien inkubiert.

Im Fall des *blue/white-screenings* wurden vor dem Ausstreichen der Bakterien die LB-Platten zusätzlich mit 40 µl *X-Gal* (0,01 %) und 40 µl *IPTG* (0,1 mM) beschichtet.

LB (*lysogeny broth*)-Medium

| | |
|-------------|-------------|
| 1 % (w/v) | Peptone |
| 0,5 % (w/v) | Hefeextrakt |
| 1 % (w/v) | NaCl |

LB-Platten

| | |
|-------------|-----------|
| | LB-Medium |
| 1,5 % (w/v) | Agar |

2.5.3. Kultivierung von *E. coli* Zellen

Zur Isolierung von Plasmid-DNA oder Anlegen von Glycerol-Stammkulturen wurden einzelne Kolonien von LB-Platten gepickt, in 3 ml LB-Medium inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.5.4. Lagerung von *E. coli*

Für eine längerfristige Lagerung der *E. coli*-Zellen wurden 700 µl einer *E. coli*-Suspension mit 300 µl Glycerol in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt und bei -70°C eingelagert.

2.6. Proteinbiochemische Methoden

2.6.1. Proteinisolierung

Für die Isolierung von Gesamtprotein aus kultivierten eukaryotischen Zellen wurden diese zunächst zweimal mit *PBS* gewaschen. Der Zellrasen wurde daraufhin mit *CellLyticTM-M-Lysis*puffer (*Roche*), der zuvor mit 25 x Proteaseinhibitor (*Complete EDTA-free, Roche*) versetzt worden war, überschichtet (300 µl / 25 cm²) und 15 min auf einem Schüttler inkubiert.

Um die Proteinausbeute zu maximieren, wurde die Gefäßoberfläche nach der Inkubation mit einem Zellschaber abgekratzt. Das Zellysate wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und zur Abtrennung von Zelltrümmern bei 4 °C und 10.000 x g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt (Kap. 2.6.2). Die Proteinlösung wurde 1:3 mit 4 x Probenpuffer (s. u.) versetzt. Um reduzierende Bedingungen einzustellen, wurde den Proteinproben gegebenenfalls 1 % (144 mM) β-EtSH zugesetzt. Die Proteinproben wurden für 10 min bei 60 °C inkubiert, bevor sie mittels Disk-SDS-PAGE (Kap. 2.6.3) aufgetrennt wurden. Die Proteinproben wurden bei -20 °C gelagert.

4 x Probenpuffer (pH 6,8)

| | |
|--------------|----------------|
| 252 mM | Tris/HCl |
| 40 % (v/v) | Glycerin |
| 8 % (w/v) | SDS |
| 4 mM | EDTA |
| 0,02 % (w/v) | Bromphenolblau |

2.6.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das *DC Protein Assay (BioRad)* verwendet. Wie beim *Lowry-Assay* (LOWRY et al., 1951) erfolgt die Farbentwicklung durch die Komplexbildung von zweiwertigem Kupfer mit Peptidbindungen (Biuret-Reaktion), sowie der nachfolgenden Reduktion des Folin-Reagenz durch das Kupfer behandelte Protein.

Die Konzentrationsbestimmung wurde in *96-wells* in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt. Neben den eigentlichen Proben wurde eine Kalibrationsreihe mit BSA (bovines Serumalbumin, *Sigma*) als Standardprotein erstellt. In jedes *well* wurden 5 µl der zu untersuchenden Proteinlösung vorgelegt und 25 µl Reagenz A' bestehend aus Reagenz A und 2 % (v/v) Reagenz S (beides im *DC Protein Assay* enthalten) überschichtet. In der Folge wurden 200 µl Reagenz B (*BioRad*) zu den Proben pipettiert und nach 15 min die Absorption bei 620 nm in dem Mikroplattenphotometer MPP4008 gemessen.

2.6.3. Diskontinuierliche-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Disk-SDS-PAGE)

Bei der Disk-SDS-PAGE werden die Proteine in einem elektrischen Feld in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgetrennt. SDS ist ein anionisches Detergenz, das an Proteine bindet, diese denaturiert und deren Eigenladung überdeckt. Die so entstehenden anionischen Mizellen besitzen ein konstantes Ladung/Massen-Verhältnis, wodurch eine ausschließlich von dem Molekulargewicht abhängige Auftrennung ermöglicht wird.

Um die Trennschärfe zu erhöhen, wird ein diskontinuierliches Trennmedium nach LÄMMLI (1970) verwendet, das aus einem engporigen so genannten Trenngel und einem darüber geschichteten, weitporigen Sammelgel besteht. Das Trenngel enthält 0,375 mol/l Tris-HCl pH 8,8, das Sammelgel 0,120 mol/l Tris-HCl pH 6,8. Der Elektrodenpuffer enthält Glycin, dessen isoelektrischer Punkt nahe am pH des Sammelgels liegt. Dadurch hat Glycin zu Beginn der Trennung im Sammelgel eine sehr niedrige elektrophoretische Mobilität (Folge-Ion). Die in den Gelpuffern enthaltenen Chlorid-Ionen haben demgegenüber eine sehr hohe Mobilität (Leit-Ionen). Die zwischen Elektrodenpuffer und Sammelgel aufgetragenen Proteine besitzen Mobilitäten, die zwischen denen der Leit- und Folge-Ionen liegen. In

einem elektrischen Feld beginnen alle Ladungsträger gleich schnell zu wandern (Isotachophorese). In Bereichen mit niedriger Mobilität stellt sich demnach eine hohe Feldstärke und umgekehrt in Bereichen hoher Mobilität eine niedrige Feldstärke ein. Proteine, die in Bereiche niedriger Mobilität zurückfallen, erfahren eine größere beschleunigende Kraft. Proteine, die in Bereiche höherer Mobilität wandern, fallen aufgrund der dort wirkenden geringeren Feldstärke wieder zurück. Dies bewirkt eine Stapelung der Proteine entsprechend ihrer Mobilität zwischen Leit- und Folge-Ionen.

Der Proteinstapel bewegt sich in Richtung Anode. An der Grenzschicht zum engmaschigen Trenngel steigt der Reibungswiderstand sprunghaft an, und es kommt zu einem Stau und einer weiteren Konzentrierung der Proteine. Die kleinen Glycinmoleküle sind davon nicht betroffen. Bedingt durch den höheren pH im Trenngel ist das Gleichgewicht der Glycinmoleküle in Richtung des negativ geladenen Glycinats verschoben. In der Folge überholt das Glycin die Proteinfront. Die Proteine befinden sich nun in einem homogenen Puffer und trennen sich bedingt durch den hohen Reibungswiderstand im Trenngel gemäß ihrer Größe auf.

Die Komponenten für das Trenngel wurden entsprechend den Angaben in Tab. 2-8 gemischt und zwischen die Glas-Platten des *Vertical Mini-Gel-System (Sigma)* gegossen. Um einen sauberen Grenzverlauf zu erhalten, wurde das Trenngel mit Ethanol überschichtet. Die Polymerisation erfolgte über eine halbe Stunde. Anschließend wurde das Ethanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Gel zwischen den Glasplatten in die Laufapparatur eingesetzt, der Kamm entfernt und die Taschen durch Spülen mit Elektrodenpuffer von Gelresten befreit. Die Proteinproben wurden in die Taschen appliziert und eine Spannung von 80 V eingestellt. Beim Übergang der Proben ins Trenngel wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Als Größenmarker diente der *Prestained Protein Marker (New England Biolabs)*.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel von den Glasplatten entfernt und das Sammelgel mit einem Skalpell abgetrennt. Das Gel wurde vor dem Western Blot (Kap. 2.6.4) für 20 min bei Raumtemperatur in Transferpuffer inkubiert.

Tab. 2-8 Komponenten des Sammel- und Trenngels für die DISK-SDS-PAGE

| | Sammelgel (4 %) / μl | Trenngel (8 %) / μl |
|--|---------------------------------|--------------------------------|
| ddH ₂ O | 1850 | 2900 |
| Sammelgelpuffer | 750 | - |
| Trenngelpuffer | - | 1500 |
| Acrylamid-Stammlösung | 500 | 1600 |
| APS (10 %) (Ammoniumperoxodisulfat) | 20 | 20 |
| TEMED | 12 | 12 |

Sammelgelpuffer (pH = 6,8)

0,5 M Tris/HCl
0,4 % (w/v) SDS

Trenngelpuffer (pH = 8,8)

1,5 % M Tris/HCl
0,4 % (w/v) SDS

Acrylamid-Stammlösung

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1)

Elektrodenpuffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
1 % (w/v) SDS

Transferpuffer

25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % (v/v) Methanol
0,2 % (w/v) SDS

2.6.4. Elektrottransfer von Proteinen auf Nitrocellulose (Western Blot) und Immunodetektion

Der Elektrottransfer wurde nach dem *semi-dry*-Verfahren in einer *Fastblot-Apparatur* (*Biometra*) durchgeführt, bei dem sich das Blotsandwich, bestehend aus *Whatman*TM-Papier, Nitrocellulose-Membran und Gel, zwischen zwei Plattenelektroden befindet. Sowohl die Nitrocellulose-Membran von *GE Healthcare Bio-Sciences* (*Hybond*TM*ECL*TM), als auch die verwendeten *Whatman*TM-Papiere wurden vor dem Transfer in Transferpuffer getränkt. Der Blot wurde entsprechend Abb. 2-7 zusammengesetzt. Mit einer Pipette wurden eingeschlossene Luftblasen herausgestrichen. Der Transfer wurde über Nacht bei einer Spannung von 0,5 mA/cm² Membranfläche durchgeführt.

Im Anschluss an den Blot wurde die Membran mit einer *Ponceau-S*-Färbelösung (3 % (w/v)) Trichloressigsäure, 0,2 % (w/v) *Ponceau-S* inkubiert. Die Trichloressigsäure dient zur Fixierung der Proteine auf der Membran. Der Farbstoff *Ponceau-S* bindet reversibel an hydrophobe Proteinbereiche und ermöglicht dadurch eine der Immunodetektion vorausge-

hende visuelle Überprüfung der Qualität des Blot-Vorgangs. Durch mehrmaliges Waschen mit ddH₂O ist es möglich den Farbstoff wieder vollständig zu entfernen.

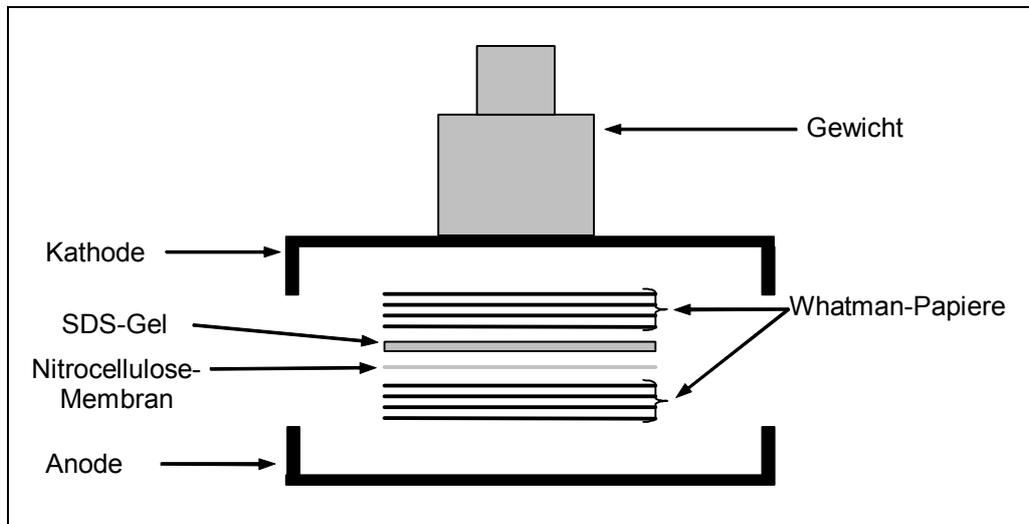


Abb. 2-7 Schemazeichnung der Western Blot-Apparatur

Es folgte die Immunodetektion der transferierten und auf der Nitrocellulose immobilisierten Proteine durch die Markierung mit einem proteinspezifischen Erstantikörper und einem Meerrettichperoxidase-markierten Zweitantikörper.

Dazu wurde die Membran zunächst 10 min in *PBST* (*PBS*, 0,05 % *Tween-20* (v/v)) gewaschen und anschließend unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 5 % Magermilchpulver (w/v) in *PBST* für 30 min blockiert. Die Membran wurde dreimal für 10 min gewaschen und danach für 1 h in der 1. Antikörperlösung (verdünnt in *PBST* mit 5 % Milchpulver) geschwenkt. Nach weiteren drei Waschsritten (10 min in *PBST* mit 5 % Milchpulver) wurde mit dem 2. Antikörper (verdünnt in *PBST*) für 1 h inkubiert und schließlich wieder dreimal gewaschen (10 min in *PBST*). Nach dem letzten Waschsritt erfolgte der Nachweis mit Hilfe des *ECL Western Blotting Detection Reagents* (*GE Healthcare Bio-Sciences*).

Der Nachweis beruht darauf, dass die Peroxidase in Gegenwart von H₂O₂ Luminol in einen energetisch angeregten Zustand überführt. Durch den Übertritt in den Grundzustand wird Licht ($\lambda_{\max} = 428 \text{ nm}$) emittiert, das durch Auflegen eines Fotofilms (*Hyperfilm*, *GE Healthcare Bio-Sciences*) detektiert wird. Die Entwicklung des Films erfolgte in einer *Cu-rix 60* Entwicklermaschine (*Agfa*) mit Standard-Photochemikalien. Die verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Tab. 2-9 aufgeführt.

Tab. 2-9 Liste der verwendeten Antikörper für die Immunodetektion

| Antigen | Erstantikörper | Verdünnung | Zweitantikörper | Verdünnung |
|----------|--|------------|--|------------|
| pAbcg2 | anti-pAbcg2, (aufgereinigter Antikörper von Anja DREES) | 1:2000 | anti-Kaninchen IgG, Peroxidase konjugiert, polyklonal aus Schaf, (<i>Chemicon</i>) AP304P | 1:2000 |
| P-Gp | anti-P-Glykoprotein, monoklonal aus Maus, (<i>Alexa</i>) ALX-801-002 | 1:100 | anti-Maus-POD polyklonal aus Kanin- chen, (<i>DAKO</i> Dänemark) P0260 | 1:1000 |
| Vimentin | anti-Vimentin monoklonal aus Maus <i>Oncogene</i> TM IF01 | 1:4000 | anti-Kaninchen IgG, Peroxidase konjugiert, polyklonal aus Schaf, (<i>Chemicon</i>) AP304P | 1:4000 |
| Aktin | anti- β -Aktin polyklonal aus Kanin- chen, (<i>Sigma</i>) A2066 | 1:2000 | anti-Kaninchen IgG, Peroxidase konjugiert, polyklonal aus Schaf, (<i>Chemicon</i>) AP304P | 1:2000 |

Nach Abschluss der Immunodetektionen wurde die gleichmäßige Beladung der Geltaschen durch Anfärbung der Proteine mit *Protogold* (*British Biocell International*) überprüft. Die Färbung basiert auf einer unspezifischen Bindung zwischen den immobilisierten Proteinen auf der Membran und den Goldpartikeln in der Färbelösung.

Um eine objektive Auswertung der Bandengröße und Bandenintensität unter Berücksichtigung der Gesamtproteinbeladungsmenge zu ermöglichen, wurden die Software *Phoretix Total Lab* (Version 2003, *Biostep* (Jahnsdorf, Deutschland)) eingesetzt. Die Analyse der Proteinbeladung beruht dabei auf der Quantifizierung der Schwärzungsintensität der Banden (Densitometrie). Die Masse der Polypeptide wurde mit Hilfe einer auf den Molekulargewichtsmarker angepassten Spline-Kurve abgeschätzt.

2.6.5. Immunozytochemische Färbungen

Zur Überprüfung der Lokalisation von ABCG2 in den hergestellten stabilen *HEK*-Klonen, wurden immunozytochemische Anfärbungen durchgeführt.

Die Anfärbung erfolgte über fluoreszenzmarkierte Zweitantikörper, die spezifisch an die proteinspezifischen Erstantikörper binden und dadurch indirekt ABCG2 nachweisen (Tab. 2-10). Die verwendeten *HEK*-Zellen wurden für die Experimente auf mit Poly-D-Lysin (*Sigma*) beschichteten Deckgläschen bis zur Konfluenz kultiviert. Im Fall der *HEK*-Zellen,

die mit dem T-RExTM-System stabil transfiziert worden waren, wurden die Zellen zuvor 4 Tage in Kulturmedium mit 1 µg/ml *Doxycyclin* kultiviert.

Die Zellen auf den Deckgläschen wurden zunächst zweimal mit *PBS*⁺⁺ gewaschen und danach 10 min mit 4 % PFA (Paraformaldehyd) fixiert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde nach viermaligem Waschen mit *PBS*⁺⁺ für 30 min bei 37°C mit bovinem Serumalbumin (3% (w/v) BSA in *PBS*⁺⁺) inkubiert. Es folgte die Erstantikörper-Inkubation bei 4°C in 0,5 % BSA/*PBS*⁺⁺ über Nacht. Nach viermaligem Waschen mit *PBS*⁺⁺ wurden die Zellen für 30 min bei 37°C mit 3% (w/v) BSA in *PBS*⁺⁺ inkubiert und dann mit der Zweitantikörper-Lösung (in 0,5% BSA/*PBS*⁺⁺) 1 h bei 37 °C behandelt. Im Anschluss wurde viermal mit *PBS*⁺⁺ gewaschen und die Deckgläschen einmal in ddH₂O getaucht, bevor sie auf einem Objektträger in *Aqua-Poly/Mount Coverslipping Medium* (*Polysciences Europe*) eingebettet wurden. Die Untersuchung der Präparate erfolgte mittels Fluoreszenz-Mikroskopie (Kap. 2.3.4).

Tab. 2-10 Verwendete Antikörper für die immunozytochemischen Anfärbungen

| Antigen | Erstantikörper | Verdünnung | Zweitantikörper | Verdünnung |
|---------|--|------------|------------------------|------------|
| pAbcg2 | anti-pAbcg2 (aufgereinigter Antikörper von Anja DREES) | 1:100 | anti-Kaninchen FITC | 1:1000 |

2.6.6. Zelloberflächen-Biotinylierung

Die Zelloberflächen-Biotinylierung ist ein wichtiges Werkzeug, um die Expression und Regulation von Membranproteinen zu studieren (DANIELS und AMARA, 1998). Das Verfahren ermöglicht die Differenzierung zwischen Plasmamembranproteinen und Proteinen, die in Organellmembranen lokalisiert sind. Die Markierung der Oberflächenproteine der zu untersuchenden Zellen erfolgt durch Zugabe des nicht membrangängigen *EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin* (Sulfosuccinimidyl 2-(biotinamido)-ethyl-1, 3-dithiopropionat).

Die N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS)-Estergruppe reagiert mit deprotonierten primären Aminen (ε-Aminogruppen von Lysinresten) durch nukleophilen Angriff des Aminostickstoffs auf den Carbonylkohlenstoff der Estergruppe (Abb. 2-8). Die biotinylierten Proteine können dann durch Avidin-Präzipitation isoliert werden.

Die für das Experiment verwendeten *PBCEC* wurden auf 25 cm²-Flaschen kultiviert. Am 6. DIV wurden die konfluenten Zellen dreimal mit 4 ml 4 °C kaltem *PBS*⁺⁺ gewaschen und

anschließend mit 1 ml Biotinylierungspuffer mit 2 mg/ml *EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin* für 1 Stunde bei 4 °C und moderatem Schütteln inkubiert. Nicht reagiertes Biotin wurde durch zweimalige 15-minütige Inkubation bei 4 °C in 2 ml PBS^{++} mit 100 mM Glycin umgesetzt. Die Zellen wurden erneut mit 4 ml eiskaltem PBS^{++} gewaschen und 30 min bei 4 °C in 500 μ l Lysis-Puffer inkubiert. Das Lysat wurde aufgenommen und bei 4°C und 6500xg 10 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 200 μ l (100 μ g) mit 50 μ l Neutravidin *beads* (Pierce) über Nacht bei 4°C in einem Überkopf-Schüttler inkubiert (Bindung von Biotin an Neutravidin).

Am nächsten Tag wurden die *beads* durch Zentrifugation bei 4°C und 6500 x g für 15 min abgetrennt. Die *beads* wurden dreimal in 1 ml 4°C kaltem Lysis Puffer, zweimal in 1 ml 4°C kaltem Hochsalz-Puffer und schließlich noch dreimal in 1 ml 4°C kaltem Tris-Puffer (50 mM Tris) gewaschen. Durch Zugabe von 50 μ l 2 x SDS-Puffer (das im Puffer enthaltene β -EtSH reduziert die Disulfidbindung des SS-Biotins) wurden die biotinylierten Proteine von den *beads* abgespalten und eluiert. Die Abtrennung der *beads* erfolgte durch Zentrifugation bei 4°C und 6500 x g für 15 min. Der Überstand stellt die biotinylierte Protein-Fraktion (Oberflächenproteine) dar und wurde mittels Disk-SDS-PAGE weiter analysiert.

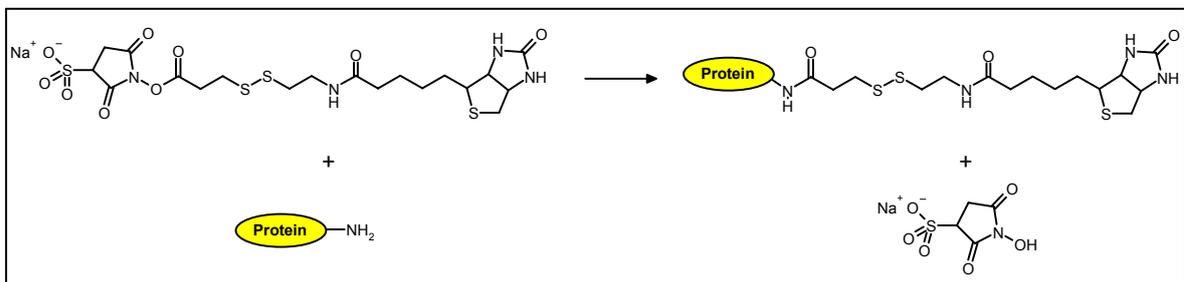


Abb. 2-8 Biotinylierungsreaktion (nach http://www.piercenet.com/media/Sulfo-NHS-SS-Biotin_rxn.gif)

Biotinylierungspuffer

| | |
|--------|---------------------------------|
| 2 mM | CaCl |
| 150 mM | NaCl |
| 10 mM | Triethanolamin in PBS^{++} |

Hochsalz-Puffer (pH 7,5)

| | |
|-----------|--------------|
| 50 mM | Tris/HCl |
| 1 % (v/v) | Triton X-100 |
| 500 mM | NaCl |
| 5 mM | EDTA |

Lysis-Puffer (pH 7,5)

| | |
|-----------|--|
| 50 mM | Tris/HCl |
| 150 mM | NaCl |
| 5 mM | EDTA |
| 1 % (v/v) | Triton X-100 |
| 1 x | 25 x Proteaseinhibitor (Complete EDTA-free) |

2.6.7. Deglykosylierung

Die *in vitro* Deglykosylierung von ABCG2 erfolgte durch Inkubation von Proteinlysaten mit *Peptid-N-Glykosidase F* (*PNGase F*, 500 units/ml, *Sigma*). *PNGase F* spaltet Asparagin-N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide von Glykoproteinen ab. Minimalsubstrat ist ein Tripeptid mit einem zentralen, Oligosaccharid-verknüpften Asparagin (Asn). Es werden alle Haupttypen von N-Glykoproteinen (*high mannose*, *hybrid* und *complex*-Typ) gespalten. Eine Ausnahme stellen N-Glykane dar, in denen Fukose $\alpha(1-3)$ -glykosidisch mit dem Asn-gebundenen N-Acetylglucosamin verknüpft ist.

Die Proteinproben (in 1 x SDS-Probenpuffer Kap. 2.6.1) wurden 1:3 mit Triton X-100 Lösung (1 % v/v) versetzt und dann mit *PNGase F* (0,16 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ Gesamtprotein) versetzt. Die Mischung wurde bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert und dann einer Disk-SDS-PAGE unterzogen (Kap. 2.6.3).

3. Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zielten im Wesentlichen darauf ab, Untersuchungssysteme zu entwerfen, die eine funktionelle Charakterisierung des *Multi-drug*-Transporters *Abcg2* (pAbcg2) an der Blut-Hirn-Schranke (BHS) des Schweins ermöglichen.

Es wurden dabei grundsätzlich zwei Ansätze verfolgt: einerseits die Expressionsinhibierung (*knockdown*) des *Abcg2*-Transporters mittels RNA-Interferenz in *PBCEC* als *in vitro* Modell der porcinen BHS, andererseits die selektive Überexpression des Transporters in stabil transfizierten Zelllinien.

Beide Ansätze dienten der Generierung von Zelltypen, deren Proteinausstattung gegenüber denen von Kontrollzellen im Hinblick auf die Expression von ABCG2 differiert.

Überprüft wurde dieser Effekt zunächst durch qualitativen Nachweis der ABCG2-Expression mittels Western Blot Analyse und *Real-Time* PCR. An Erfolg versprechenden Systemen wurden schließlich zur funktionellen Analyse *Uptake*- und Zytotoxizitätstests durchgeführt.

Darüber hinaus wurde der Einfluss verschiedener Substrate und Inhibitoren bzw. Modulatoren auf die Proteinexpression des Transporters in *PBCEC* untersucht, wobei die Rolle des Glucocorticoids Hydrocortison im Fokus der Untersuchungen stand.

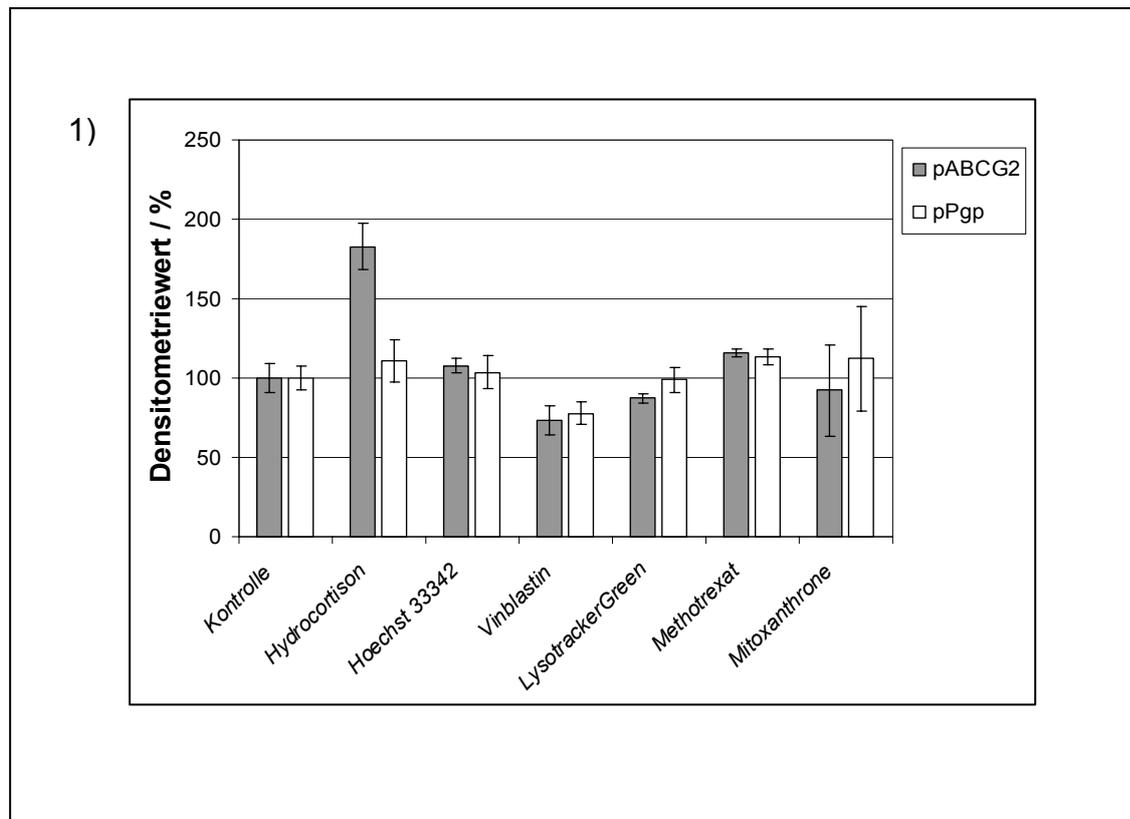
3.1. Regulation/Induktion der pAbcg2-Expression in PBCEC

Zusätzlich zu den Untersuchungen (*Uptake* und Zytotoxizitätstests) an pAbcg2-überexprimierenden Zelllinien (*HEK* und *MDCK*), die zum einen dem Funktionalitätsnachweis des stabil exprimierten Transporters dienten und zum anderen Aufschluss über mögliche Inhibitoren bzw. Modulatoren des pAbcg2 erbringen sollten, wurden zusätzlich in *PBCEC* die Einflüsse verschiedener Substrate bzw. Modulatoren auf die Proteinexpression des *Abcg2* und porcines P-Gp, einem weiteren *Multidrug*-Transporter, untersucht.

3.1.1. Einfluss verschiedener potentieller Substrate und Modulatoren auf die Expression von *Abcg2* und *Abcb1* (P-Glykoprotein (P-Gp)) in *PBCEC*

Als potentielle Substrate bzw. Modulatoren wurden neben Hydrocortison die Fluoreszenzfarbstoffe *Hoechst 33342* und *Lysotracker Green* sowie die Zytostatika *Vinblastin*, *Me-*

thotrexat und *Mitoxantron* eingesetzt. Anstelle der Umstellung auf 550 nM Hydrocortison am 4. DIV (Kap. 2.1.2.5) wurden jeweils 200 nM der oben angegebenen Substanzen dem SFM zugesetzt. Der Western Blot (Abb. 3-1 2)) sowie die densitometrische Auswertung (Abb. 3-1 1)) zeigen, dass nach zwei Tagen Inkubation mit den Substraten bzw. Modulatoren ausschließlich bei den mit Hydrocortison und *Vinblastin* behandelten Proben eine signifikante Veränderung der Transporterexpression gegenüber der Kontrolle (w/o Hydrocortison) zu detektieren ist. Die Expression des als Referenz verwendeten Vimentins (*house-keeping* Protein) bleibt nahezu unverändert. Während unter Einfluss von 200 nM *Vinblastin* sowohl bei Abcg2 als auch P-Gp eine leichte Expressionsverringering zu beobachten ist, führt der Einfluss von 200 nM Hydrocortison zu einer deutlichen Expressionssteigerung von Abcg2. Der Densitometriewert verdoppelte sich gegenüber der Kontrolle auf ca. 182 % (Abb. 3-1 1). Die Bildung von P-Gp wird durch Hydrocortison nicht signifikant verändert. Der Vergleich der Expression von P-Gp gegenüber Abcg2 bei den einzelnen Bedingungen weist nur bei der Verwendung von Hydrocortison signifikante Unterschiede auf.



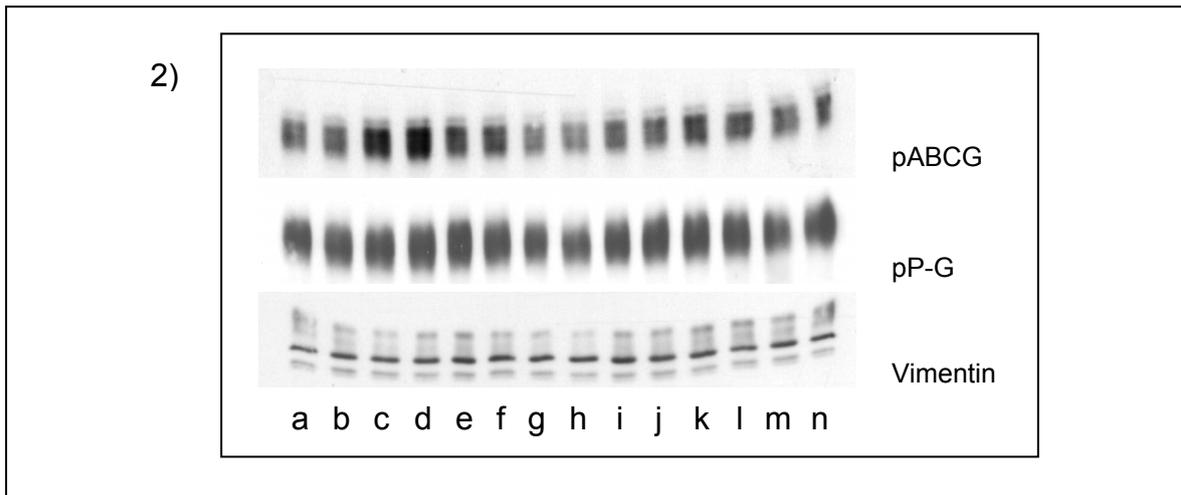


Abb. 3-1 Einfluss verschiedener Modulatoren auf die Expression von Abcg2 und P-Gp in PBCEC. Die Zellen wurden am 4. DIV auf SFM mit je 200 nM Modulator umgestellt. Zwei Tage später wurde das Gesamtprotein aus den Zellen isoliert. Den Proteinproben wurde 1 % (v/v) β -EtSH zugesetzt (reduzierende Bedingungen). **1)** Densitometrische Auswertung der Immunodetektion mittels der Software *Phoretix Total Lab* (Abgleich auf Vimentin; $n = 2$, \pm absoluter Fehler); **2)** Immunodetektion von Abcg2 und P-Gp (nebeneinander Doppelbestimmungen von Proteinlysaten aus unterschiedlichen Zellkulturflaschen). **(a), (b):** Kontrolle (unbehandelte Zellen); **(c), (d):** Hydrocortison; **(e), (f):** Hoechst 33342; **(g), (h):** Vinblastin; **(i), (j):** LysoTracker Green, **(k), (l):** Methotrexat; **(m), (n):** Mitoxantron. Es wurden jeweils 5 μ g Gesamtprotein pro Spur aufgetragen.

3.1.2. Apikale Oberflächenexpression von pAbcg2 unter Hydrocortison-Einfluss

Um zu klären, ob sich die unter Hydrocortison-Einfluss stattfindende Expressionserhöhung des Abcg2-Transporters in PBCEC auf die Menge des Transporters in der apikalen Zytoplasmamembran der Zellen auswirkt oder es sich um eine rein zytoplasmatische Transporteranreicherung handelt, wurde eine Zelloberflächen-Biotinylierung (2.6.6) durchgeführt. Mit Hilfe dieses Verfahrens lassen sich die Proteine isolieren, die zum Zeitpunkt der Biotinylierung auf der extrazellulären Zelloberfläche für das Biotinylierungsagens zugänglich waren. Diese biotinylierte Fraktion wurde nach der Aufreinigung unter reduzierenden Bedingungen mittels Western Blot Analyse hinsichtlich ihrer Abcg2-Expression untersucht (Abb. 3-2). Es zeigte sich, dass in der mit 550 nM Hydrocortison inkubierten Probe (Abb. 3-2 b) gegenüber der Kontrolle (Abb. 3-2 a) eine wesentlich stärkere Bande bei ca. 83 kDa detektiert werden konnte. Darüber hinaus lässt sich bei der mit Hydrocortison behandelten Proteinprobe eine schwache Bande oberhalb von 175 kDa erkennen. Die Auswertung mittels Densitometrie ergab beim Vergleich der 83 kDa Banden von Kontrolle (a) und mit

Hydrocortison behandelter Probe (b) eine Zunahme der Schwärzungsintensität um ca. 115 %.

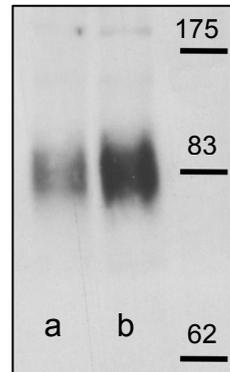


Abb. 3-2 Western Blot zur immunologischen Detektion der Oberflächenexpression von pAbcg2 in PBCEC in An- und Abwesenheit von Hydrocortison. Aufgetragen wurde die nach Biotinylierung der Zellen abgetrennte biotinylierte Fraktion (reduzierende Bedingungen). (a) Kontrolle (w/o Hydrocortison), (b) 550 nM Hydrocortison. Die Größe der Marker-Banden ist in kDa angegeben.

3.1.3. Einfluss verschiedener Hydrocortison-Konzentrationen auf die Expression von Abcg2 in PBCEC unter serumfreien und serumhaltigen Bedingungen

Mittels Western Blot Analyse wurde untersucht, inwieweit der Serumentzug während der Kultur und verschiedene Hydrocortison-Konzentrationen Einfluss auf die Proteinexpression von Abcg2 in PBCEC haben (Abb. 3-3). Die PBCEC wurden dazu, wie unter Kap. 2.1.2 beschrieben, kultiviert, wobei am 4. DIV sowohl auf serumfreies (SFM) als auch serumhaltiges Medium (SFM +10 % NCS) umgestellt wurde. Zusätzlich wurde die übliche Hydrocortison-Konzentration von 550 nM variiert.

Es zeigt sich, dass die Abcg2-Expression sowohl unter serumfreien als auch serumhaltigen Bedingungen mit zunehmender Hydrocortison-Konzentration ansteigt. Unter serumfreien Bedingungen werden insgesamt stärkere Expressionswerte erreicht. Auffällig ist, dass die Abcg2-Bande zweigeteilt ist. Unter serumfreien Bedingungen dominiert die untere der beiden Banden, während bei den in serumfreiem Medium kultivierten PBCEC beide Abcg2-Banden ähnlich stark ausgeprägt sind. Im Unterschied zu den serumhaltigen Konditionen ist im serumfreien Zustand ab einer Hydrocortison-Konzentration von 550 nM keine weitere Expressionserhöhung zu detektieren. Die 12 nM Hydrocortison-Probe zeigt in ihrer Expressionsstärke keinen signifikanten Unterschied zu der hydrocortisonfreien Probe.

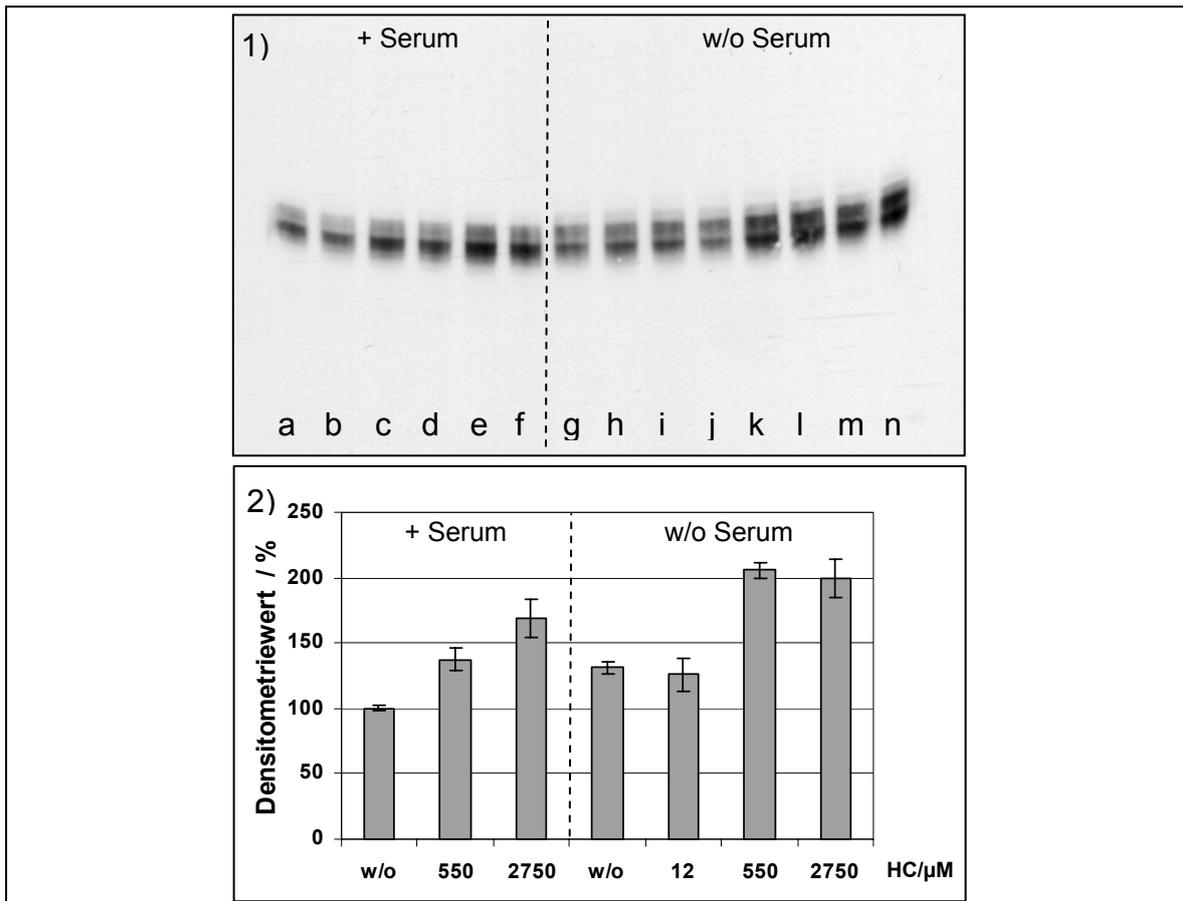


Abb. 3-3 Einfluss verschiedener Hydrocortison-Konzentrationen auf die Expression von Abcg2 in PBCEC unter serumfreien (SFM) und serumhaltigen (SFM + 10 % NCS) Bedingungen. Die Umstellung auf SFM mit verschiedenen Hydrocortison-Konzentrationen erfolgte am 4. DIV. Am 6. DIV wurde das Gesamtprotein aus den Zellen isoliert. Den Proteinproben wurde 1 % (v/v) β -EtSH zugesetzt (reduzierende Bedingungen). Es wurden jeweils 5 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Die Gleichmäßigkeit der Beladung wurde mittels einer *Protogold*-Färbung überprüft. **1)** Immunodetektion von Abcg2 (nebeneinander Doppelbestimmungen von Proteinlysaten aus unterschiedlichen Zellkulturflaschen). **(a), (b), (g), (h):** w/o Hydrocortison, **(c), (d), (k), (l):** 550 nM Hydrocortison, **(e), (f), (m), (n):** 2750 nM Hydrocortison, **(i), (j):** 12 nM Hydrocortison; **2)** Densitometrische Auswertung der Immunodetektion mittels der Software *Phoretix Total Lab*; (n = 2, \pm absoluter Fehler)

3.1.4. Inhibition des durch Hydrocortison induzierten Anstiegs der Abcg2-Expression

Wie gezeigt, führt Hydrocortison zu einer verstärkten Expression des Abcg2-Transporters an der apikalen zytoplasmatischen Membran der PBCEC. Es stellte sich die Frage, über welchen Signaltransduktionsweg dieser Effekt ausgelöst wird.

Mittels Mifepriston (RU486), einem Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten, wurde versucht, die induzierende Wirkung des Hydrocortisons auf die Expression von Abcg2 zu

blockieren. Um die antagonistische Wirksamkeit des eingesetzten Mifepristons zu überprüfen, wurde zunächst der von (NITZ, 2001) nachgewiesene TEER senkende Effekt des Mifepristons auf *PBCEC* untersucht. Im Gegensatz zu (NITZ, 2001) wurde der TEER nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt, sondern über 3 Tage nach Umstellung auf serumfreies Medium gemessen. Abb. 3-4 zeigt, dass der höchste TEER von Zellen erreicht wird, die mit Hydrocortison ohne Zusatz von Mifepriston behandelt wurden. Die Zugabe von Mifepriston hebt diesen Effekt nahezu auf: Der TEER-Kurvenverlauf gleicht sich den Kontrollbedingungen an. Die Kontrollbedingungen, hydrocortisonfreie *PBCEC* mit und ohne Mifepriston, zeigen im Vergleich zueinander keine signifikanten Unterschiede.

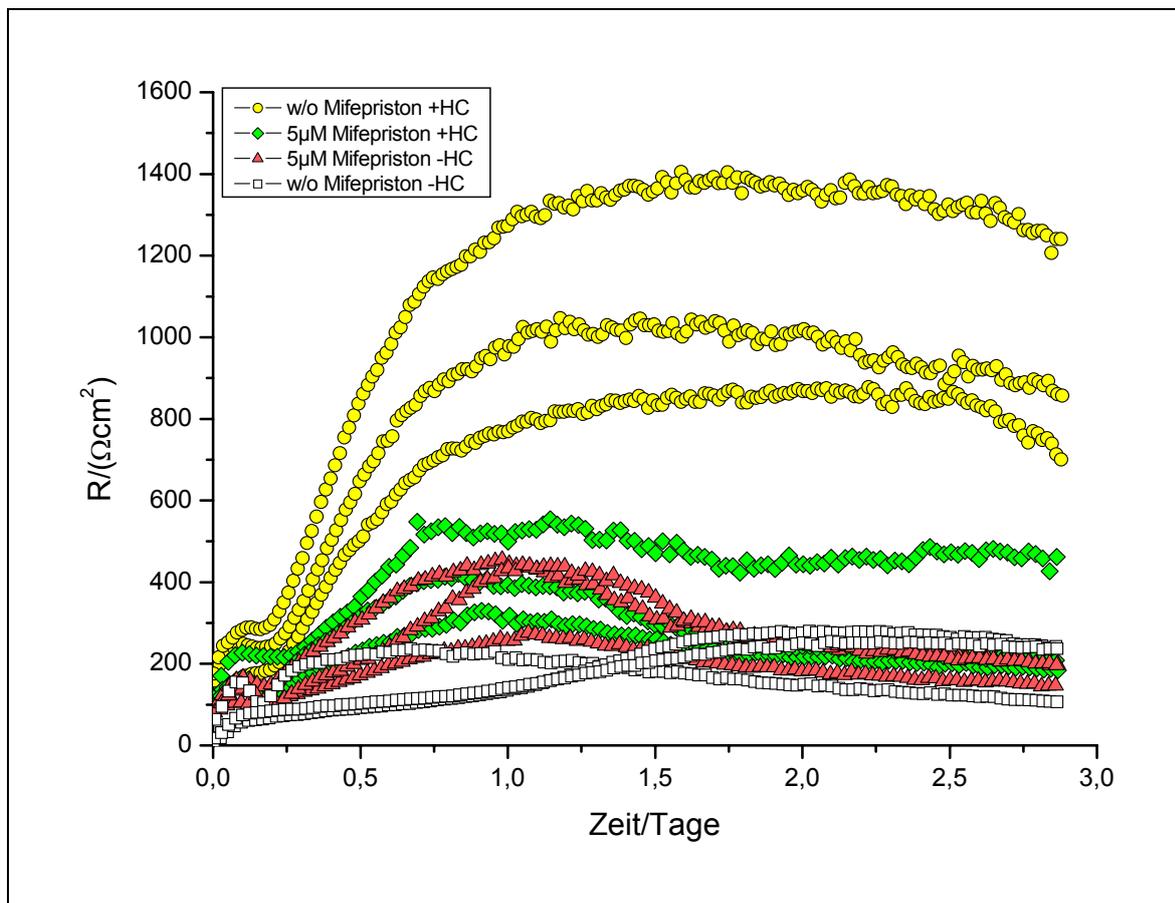


Abb. 3-4 Einfluss des Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten Mifepriston (5 µM) auf den TEER von *PBCEC* in An- oder Abwesenheit von Hydrocortison (550 nM). Die Zugabe von Mifepriston (apikal und basolateral) erfolgte einen Tag vor der Umstellung auf serumfreies Medium (+/- Hydrocortison). Die Messung startete direkt nach der Umstellung auf serumfreie Bedingungen. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Ausgehend von diesen Befunden wurde mit *PBCEC* aus derselben Zellpräparation die Expression von *Abcg2* unter den gleichen Kulturbedingungen überprüft (Abb. 3-5). Die Proteinisolierung erfolgte zwei Tage nach der Umstellung auf serumfreie Bedingungen. Der densitometrischen Auswertung (Abb. 3-5 3), bei der die Schwärzung der *Abcg2*-Banden auf Vimentin abgeglichen wurde, ist zu entnehmen, dass die Expression von *Abcg2* in *PBCEC*, die mit Hydrocortison und Mifepriston behandelt wurden, ähnlich stark ist wie die in den Kontrollzellen (w/o Mifepriston, w/o Hydrocortison). Proben, die ohne Hydrocortison, aber mit Mifepriston inkubiert wurden, zeigen einen gegenüber der Kontrolle erhöhten Densitometriewert, der allerdings deutlich unter dem von Zellen liegt, die ausschließlich mit Hydrocortison behandelt wurden.

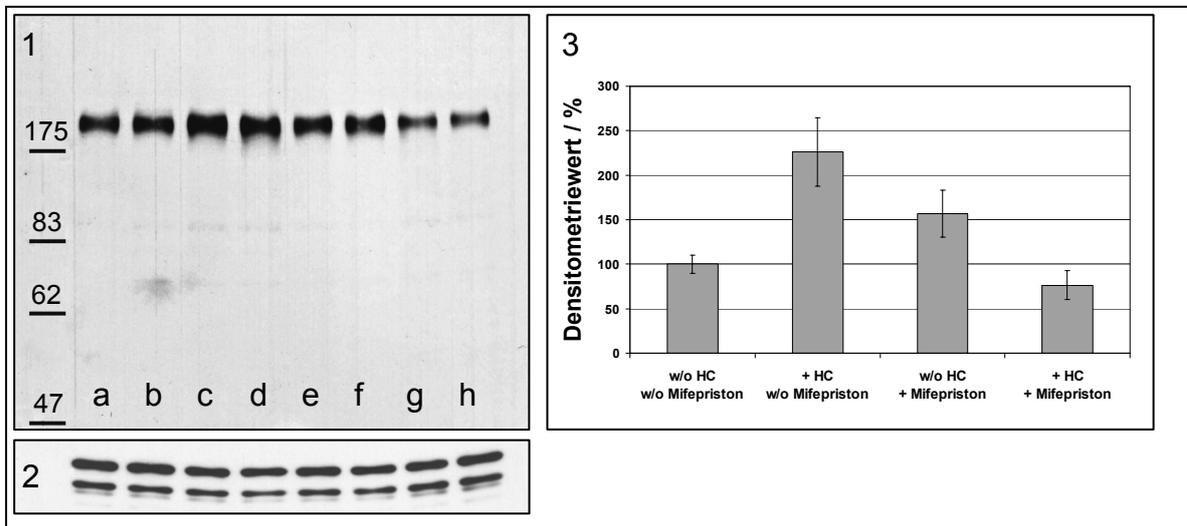


Abb. 3-5 Einfluss von Mifepriston (5 μM) auf die Expression von *Abcg2* in *PBCEC* in An- oder Abwesenheit von Hydrocortison (550 nM). Die Zugabe von Mifepriston erfolgte einen Tag (3. *DIV*) vor der Umstellung auf serumfreies Medium (+/- HC). Am 6. *DIV* wurde das Gesamtprotein aus den Zellen isoliert. Den Proteinproben wurde kein β -EtSH zugesetzt (nicht reduzierende Bedingungen). **1.** Immunodetektion von *Abcg2* (nebeneinander Doppelbestimmungen von Proteinlysaten aus unterschiedlichen Zellkulturflaschen (jeweils 5 μg Gesamtprotein pro Spur)); **(a), (b):** w/o Hydrocortison, **(c), (d):** + Hydrocortison, **(e), (f):** w/o Hydrocortison, + Mifepriston, **(g), (h):** + Hydrocortison, + Mifepriston. Die Größe der Marker-Banden ist in kDa angegeben **2.** Vimentin-Abgleich; **3.** Densitometrische Auswertung der Immunodetektion mittels der Software *Phoretix Total Lab* (Abgleich auf Vimentin; n = 2, \pm absoluter Fehler).

3.2. Expressionsinhibierung von *Abcg2* durch RNA-Interferenz

Die Methode der RNA-Interferenz ist eine relativ neue Technik, mit deren Hilfe die Proteinexpression einzelner Gene gezielt ausgeschaltet werden kann. Besonders im Bereich der Zellkultur stellt sie aufgrund ihrer relativ einfachen experimentellen Durchführbarkeit ein interessantes Verfahren dar, die Funktion von *Abcg2* in *PBCEC* zu untersuchen.

Parallel zu der direkten Transfektion von 21 nt siRNA-Oligonukleotiden wurde die Möglichkeit geprüft, ob sich *PBCEC* mit siRNA exprimierenden Vektoren transfizieren lassen. Hierfür wurde vorerst eine Reihe von Experimenten durchgeführt, mit deren Hilfe die Transfektionseffizienz der *PBCEC* gegenüber GFP exprimierenden Vektoren ermittelt wurde. Die durchgeführten Experimente zeigten, dass die Transfektionseffizienz zu niedrig war, um den Aufwand für die Konstruktion von siRNA exprimierenden Vektoren zu rechtfertigen.

3.2.1. Direkte Transfektion von siRNA-Oligonukleotiden mittels kationischer Lipide

Um prinzipielle methodische Fehler auszuschließen und die Effizienz der RNA-Interferenz in Bezug auf die Expressionsreduzierung eines Zielgens zu untersuchen, wurden zunächst *Caco-2*-Zellen, die in 6-wells kultiviert wurden, mit unterschiedlichen Mengen siRNA gegen die Kernintermediärfilamente Lamin A und C (*siLamin A/C*) transfiziert.

48 h nach der Transfektion (Kap. 2.2.2.2) wurde das Gesamtprotein aus den Zellen isoliert und mittels Western Blot Analyse (Abb. 3-6 a)) auf die Expression von Lamin A/C untersucht. Es zeigt sich, dass es mit zunehmender siRNA-Menge zu einer stärker werdenden Reduzierung der Lamin A/C-Expression kommt. Bei einer siRNA-Menge von 480 pmol zeigt die densitometrische Auswertung noch ca. 20 % des Kontrollprobensignals (w/o siRNA). Die Verdopplung des Transfektionsreagenzvolumens (480^{*}) reduziert die Expression nochmals um ca. die Hälfte.

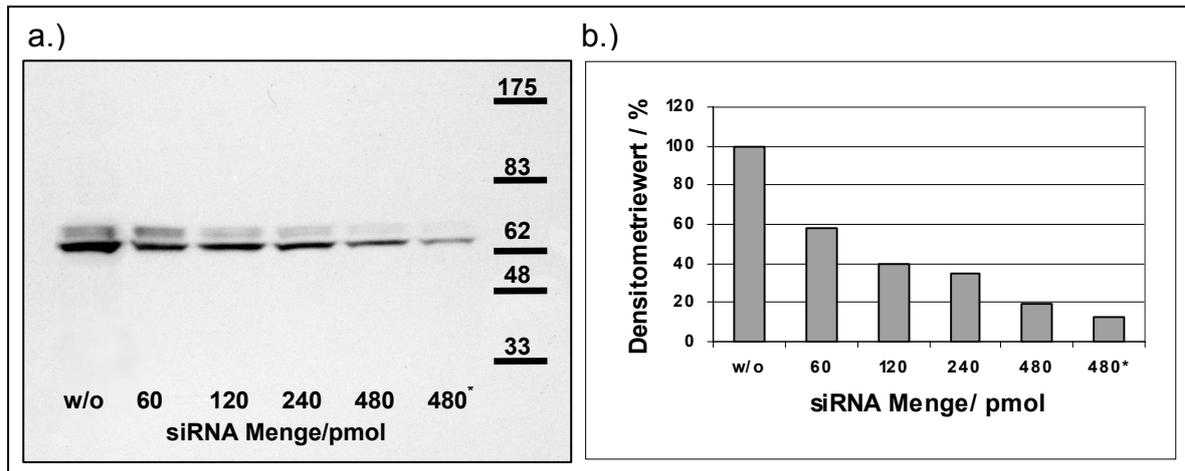


Abb. 3-6 Proteinexpression von Lamin A/C in Caco-Zellen 48 h nach Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Mengen siRNA (*siLamin A/C*). Die Zellen wurden in 6-wells kultiviert und transfiziert. **a)** Western Blot (die Größe der Marker-Banden ist in kDa angegeben) **b)** Densitometrische Auswertung. Das Verhältnis von siRNA-Menge zu Transfektionsreagenzvolumen betrug 100 pmol/ μ l. In der 480* pmol-Probe wurde das Verhältnis auf 50 pmol/ μ l halbiert. Es wurden jeweils 10 μ g Gesamtprotein pro Spur aufgetragen.

Nachdem bestätigt werden konnte, dass die RNA-Interferenz Technik in Caco-2-Zellen einen deutlichen Reduzierungseffekt (*knockdown*) auf die Expression von Lamin A/C gezeigt hat, wurde die Technik auf PBCEC übertragen mit dem Ziel, die Abcg2-Expression zu reduzieren. Es wurden zwei verschiedene siRNA-Sequenzen (*siAbcg2-1* und *siAbcg2-2*) in PBCEC transfiziert und mittels qRT-PCR die mRNA Expression des Transporters detektiert. Beide Sequenzen zeigten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Expression von Abcg2. Spätere Untersuchungen auf Proteinebene (Ergebnisse nicht gezeigt) konnten dies bestätigen.

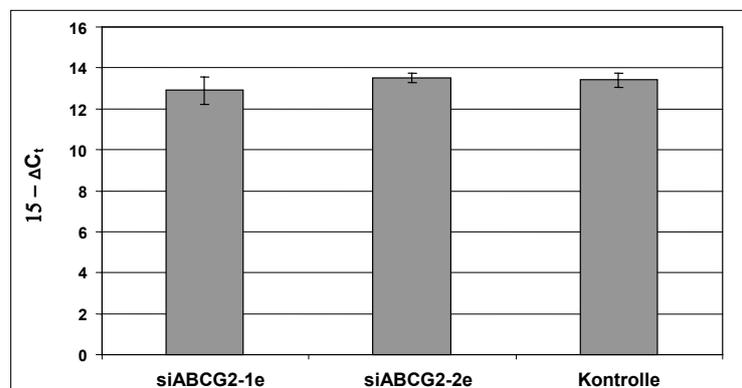


Abb. 3-7 Real-Time-PCR von PBCEC, die mit zwei verschiedenen siRNAs (*siABCG2-1e*, *siABCG2-2e*) gegen Abcg2 transfiziert wurden. Normierung auf β -Aktin (n=3, \pm SD). Es wurden 480 pmol siRNA pro well (6-well) eingesetzt (Dreifachbestimmung). Das Verhältnis von siRNA-Menge zu Transfektionsreagenzvolumen betrug 100 pmol/ μ l. Die Kontrolle wurde nur mit Transfektionsreagenz behandelt. Die RNA-Isolierung fand 48 h nach der Inkubation mit siRNA statt.

Um auszuschließen, dass dieser Misserfolg nicht *PBCEC* spezifisch ist, wurde die Transfizierbarkeit der *PBCEC* mit Hilfe von fluoreszierenden siRNAs untersucht (Abb. 3-8).

Einen Tag nach der Transfektion war ein deutliches Fluoreszenzsignal innerhalb der Zellen zu beobachten, wobei die Fluoreszenzintensität im Kern der Zellen am stärksten ausgeprägt war. Durch Vergleich der Anzahl fluoreszierender Kerne mit der Gesamtzahl der Kerne konnte eine Transfektionseffizienz von über 95% ermittelt werden.

Aufgrund dieser positiven Ergebnisse wurden weitere vier siRNAs auf ihre Fähigkeit untersucht die *Abcg2*-Expression zu reduzieren. Als leicht zu transfizierendes und gut charakterisiertes Zellsystem wurden *Abcg2*-überexprimierende *HEK 293-Zellen* verwendet.

Von den vier eingesetzten siRNA-Oligonukleotiden (*siAbcg2-3*, *siAbcg2-4*, *siAbcg2-5*, *siAbcg2-6*; Kap. 8.4) wurde nach Voruntersuchungen die siRNA *siAbcg2-4* als diejenige Sequenz identifiziert, die zu der stärksten *Abcg2*-Expressionsreduzierung führte (Reduzierung um ca. 40% gegenüber der Negativ-Kontrolle). Abb. 3-9 repräsentiert eine Western Blot Analyse und die dazugehörige densitometrische Auswertung eines weiterführenden Experiments zur Optimierung der Transfektionseffizienz. Es wurden verschiedene *siAbcg2-4*-Mengen und unterschiedliche siRNA-Menge/Transfektionsreagenz-Verhältnisse getestet. Im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3-9 a) bewirkt die eingesetzte siRNA im Mittel eine Expressionsreduzierung von ca. 40 %. Es zeigt sich, dass variierende *siAbcg2-4*-Mengen auch mit unterschiedlichen Transfektionsreagenzvolumina keine verbesserte Inhibition bewirken.

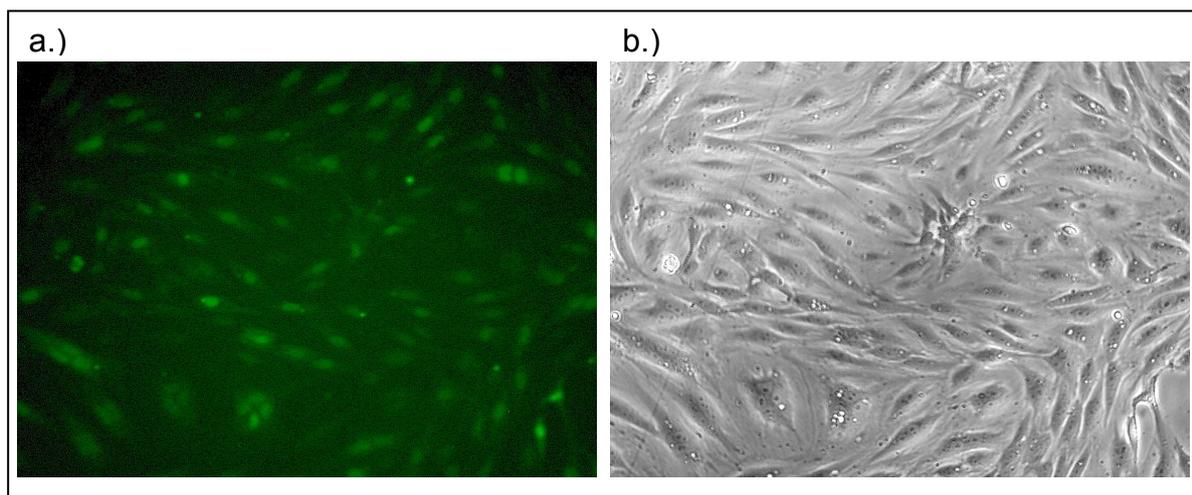


Abb. 3-8 Transfektion von *PBCEC* mit *BLOCK-iT™* Fluoreszenz-Oligonukleotide. Die Zellen wurden in 12-wells kultiviert und bei einer Konfluenz von ca. 50 % mit 200 pmol/well Fluoreszenz-Oligonukleotide transfiziert. Das Verhältnis von siRNA-Menge zu Transfektionsreagenzvolumen betrug 100 pmol/ μ l.

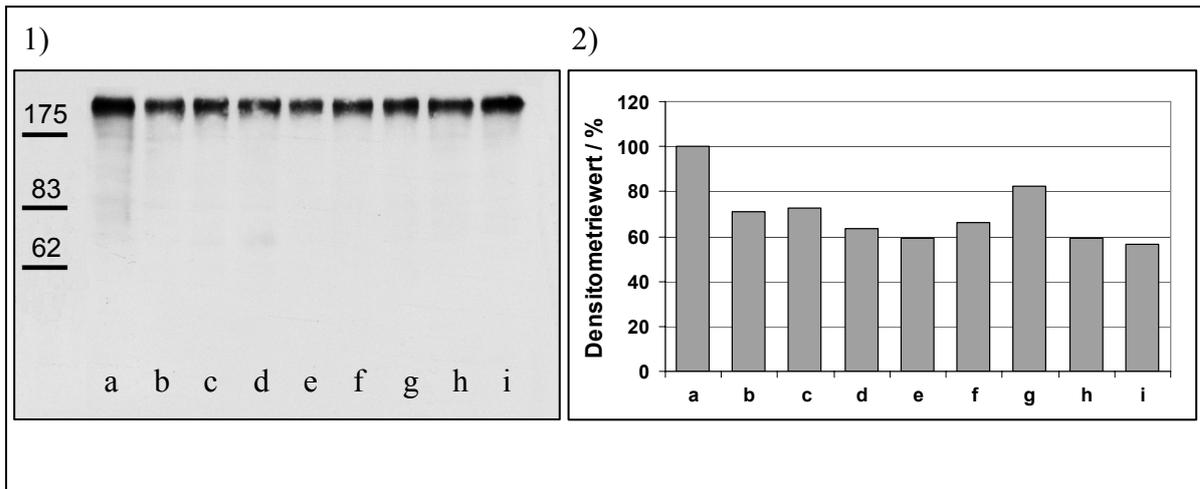


Abb. 3-9 Relative Expression des porcinen Abcg2-Transporters in Abcg2-überexprimierenden HEK 293-Zellen nach Behandlung mit siRNA (*siAbcg2-4*): 1) Western Blot, die Größe der Marker-Banden ist in kDa angegeben, es wurden jeweils 22 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen, die Zellen wurden in 12-wells kultiviert, 48 h nach der siRNA-Zugabe wurde das Gesamtproteinlysate isoliert. 2) Densitometrische Auswertung. (a) Kontrolle (*siAbcg2-Kontrolle*); (b) 300 pmol *siABCG2-4* (100 pmol/µl), (c) 300 pmol *siABCG2-4* (75 pmol/µl), (d) 300 pmol *siABCG2-4* (60 pmol/µl), (e) 400 pmol *siABCG2-4* (100 pmol/µl), (f) 400 pmol *siABCG2-4* (80 pmol/µl), (g) 400 pmol *siABCG2-4* (67 pmol/µl), (h) 500 pmol *siABCG2-4* (100 pmol/µl), (i) 500 pmol *siABCG2-4* (83 pmol/µl). Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf das Verhältnis von siRNA-Menge zu Transfektionsreagenz volumen.

3.2.2. Überprüfung der Transfektionseffizienz von PBCEC mittels GFP exprimierender Vektoren

Parallel zu den Versuchen, siRNA-Oligonukleotide direkt in PBCEC mittels kationischer Lipide einzuschleusen, wurde überprüft, inwieweit sich PBCEC mit Vektoren transfizieren lassen. Hintergrund dieser Überlegung war die Generierung von siRNA exprimierenden Vektorkonstrukten, die es ermöglichen sollten, kostengünstig und immer wieder verfügbar siRNAs in PBCEC einzuführen. Zu diesem Zweck wurde die Transfektionseffizienz der PBCEC gegenüber GFP-exprimierenden Vektoren als Basis für weiterführende Experimente untersucht. Es kamen dabei unterschiedliche Transfektionstechniken zum Einsatz. Neben der klassischen Kalziumphosphat-Kopräzipitation und der Transfektion mittels kationischer Lipide wurde versucht, über Nukleofektion mit GFP exprimierenden Vektoren sowie durch Transduktion der Zellen mit GFP-Adenoviren Vektorkonstrukte in die PBCEC einzuführen.

3.2.2.1. Transfektion von *PBCEC* mittels Kalziumphosphat-Kopräzipitation und kationischer Lipide

Zunächst wurden *PBCEC* mit pCMV-EGFP-Vektoren unter Verwendung der Kalziumphosphat-Kopräzipitation und mit Hilfe von kationischen Lipiden (*Lipofectamin 2000*) transfiziert. Dabei zeigte sich, dass bei der Transfektion von *PBCEC* mittels Kalziumphosphat-Kopräzipitation nur einzelne oder gar keine positiven Transformanten detektierbar waren (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Verwendung von *Lipofectamin 2000* als Transfektionsreagenz verbesserte die Transfektionseffizienz geringfügig. Abb. 3-10 zeigt in 12-wells kultivierte *PBCEC*, die mit 3,2 µg pCMV-EGFP Vektor/well unter Verwendung von 4 µl/well *Lipofectamin 2000* transfiziert wurden. Es sind einige wenige positive Transformanten zu erkennen. Der Großteil der Zellen zeigt unter der gewählten Belichtungszeit keine sichtbare Fluoreszenz.

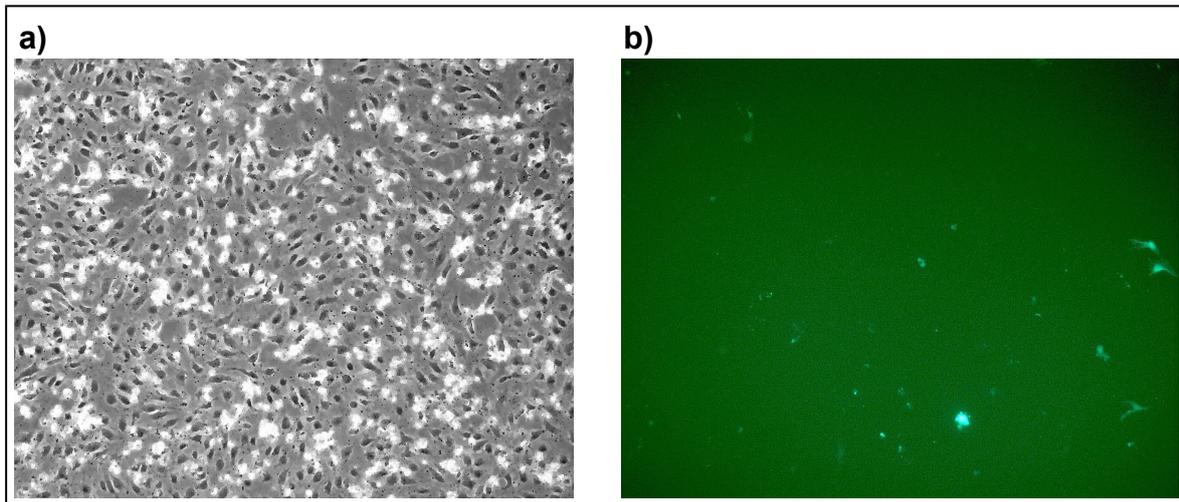


Abb. 3-10 Fluoreszenzaufnahme von *PBCEC* 1 Tag nach Transfektion von pCMV-EGFP mittels *Lipofectamin 2000*. Die Zellen wurden in 12-wells kultiviert und bei einer Konfluenz von ca. 80 % mit 3,2 µg Vektor/well pCMV-EGFP transfiziert. Das Verhältnis von Vektormasse zu Transfektionsreagenzvolumen betrug 0,8 µg/µl. a) Phasenkontrastaufnahme, b) Fluoreszenzaufnahme

3.2.2.2. Transfektion von *PBCEC* mittels *Nukleofektion* und GFP-exprimierender Adenoviren (Ad-GFP)

Neben der Kalziumphosphat-Kopräzipitation und der liposomalen Transfektion wurden *PBCEC* mittels der *Nukleofektions*-Technologie (Kap. 2.2.3) mit pmaxGFP-Plasmiden transfiziert sowie über GFP-Adenoviren (Ad-GFP) infiziert (Kap. 2.2.4).

Abb. 3-11 zeigt repräsentative Überlagerungsbilder (Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen) von *PBCEC*, die mit verschiedenen *Nukleofektor*-Elektroporationsprogrammen behandelt wurden. Es zeigt sich, dass programmabhängig sowohl die Transfektionseffizienz als auch die Mortalität der Zellen verändert wird. Tab. 3-1 gibt einen Überblick über die verwendeten Elektroporationsprogramme und die damit erreichten Transfektionseffizienzen sowie die erreichte Konfluenz auf den Kulturgefäßen nach unterschiedlichen Zeiten. Der Vergleich zwischen der Elektroporations-Kontrolle (Ansatz 1) und der Probe, die keiner Elektroporation unterworfen wurde (Ansatz 6), zeigt deutlich Unterschiede in der Konfluenz einen Tag nach der Transfektion. In der Kontrollprobe lebte in Relation zum nicht elektroporierten Ansatz nur noch ca. die Hälfte der Zellen. Diese hohe Mortalität lässt sich bei allen verwendeten Elektroporationsprogrammen wiederfinden, wobei die *PBCEC* nach Elektroporation durch die Programme M-03 und T-05 die geringste Sterblichkeit aufweisen. Die Ansätze 3 und 4 zeigen mit ca. 20 % die höchste Transfektionseffizienz, wobei diese Proben allerdings auch die größte Zell-Mortalität aufweisen. Ansatz 2 besitzt mit 8 % eine erheblich niedrigere Transfektionseffizienz, dafür haben die Zellen die Transfektionsprozedur wesentlich besser überstanden und erreichen 2 Tage nach Transfektion eine Konfluenz von ca. 90 %.

Die adenovirale Transfektion von *PBCEC* wurde von J. SEEBACH am Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden durchgeführt.

Die höchste Infizierungsrate von *PBCEC* mit GFP exprimierenden Adenoviren (Ad-GFP) wurde bei einer MOI von 2200 erreicht und betrug ca. 10 %. Die Phasenkontrastaufnahmen einen Tag nach der Transfektion zeigen, dass die Zellen einen konfluenten Monolayer ausgebildet haben und morphologisch mit nicht infizierten Zellen vergleichbar sind (Abb. 3-12).

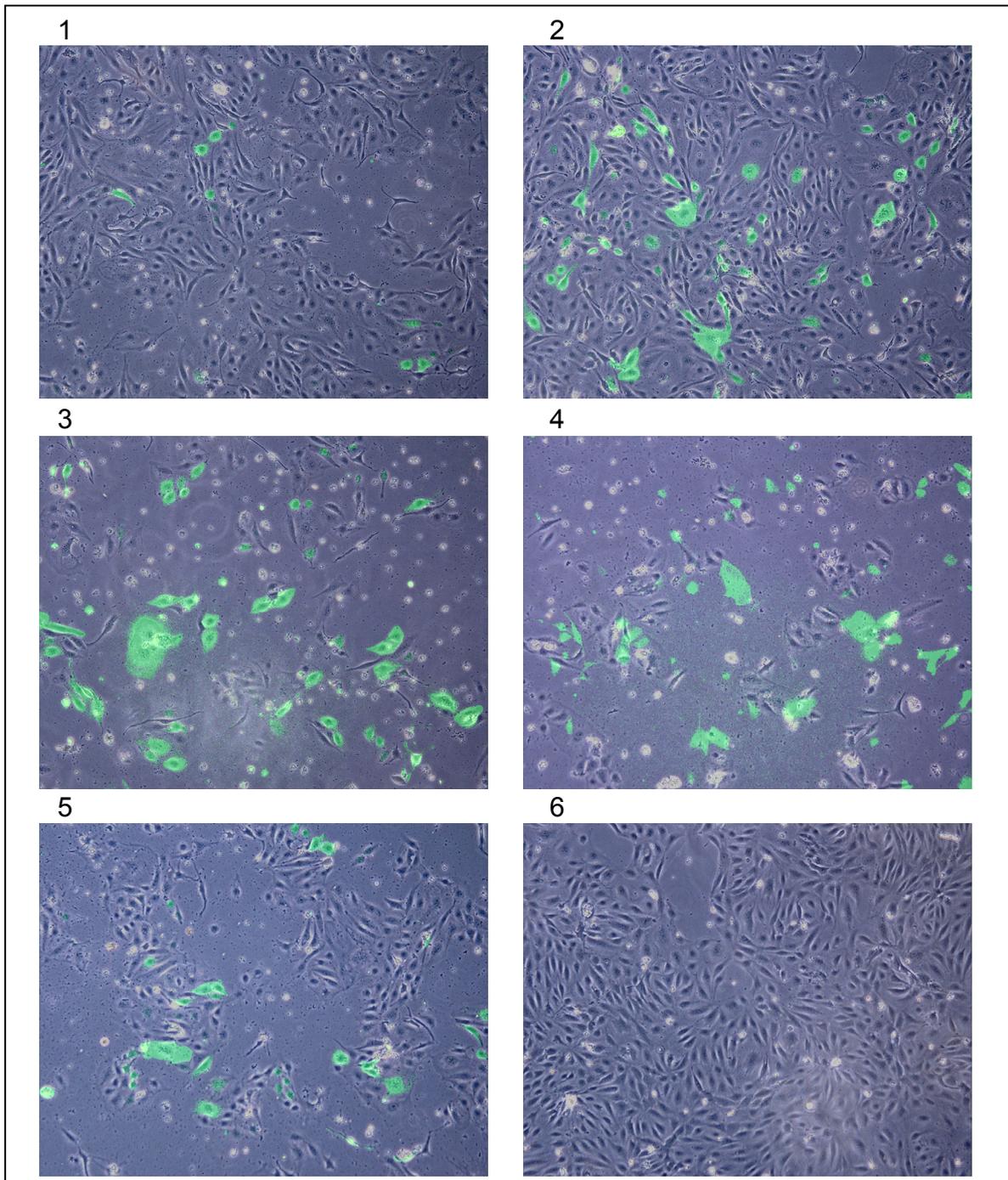


Abb. 3-11 Nukleofektion von $0,5 \cdot 10^6$ PBCEC mit jeweils $2 \mu\text{g}$ pmaxGFP-Vektor (2 Tage nach Transfektion). Es wurden verschiedene *Nukleofektor*-Programme eingesetzt: (1) M-O3, (2) T-05, (3) T-23, (4) T-27, (5) U-11, (6) keine Elektroporation. Bei den gezeigten Abbildungen handelt es sich um Überlagerungen von Phasenkontrastaufnahme und Fluoreszenzbild.

Tab. 3-1 Tabellarische Zusammenfassung der Transfektionsexperimente an *PBCEC* mittels *Nukleofektion*.

| An-satz | Nukleofektor-programm | Plasmid-DNA (pmaxGFP) | Konfluenz nach Transfektion / % | | Transfektionseffizienz 2. Tag / % |
|---------|-----------------------|-----------------------|---------------------------------|--------|-----------------------------------|
| | | | 1 Tag | 2 Tage | |
| 1 | M-03 | 2 µg | ~50 | ~70 | ~1 |
| 2 | T-05 | 2 µg | ~44 | ~90 | ~8 |
| 3 | T-23 | 2 µg | ~23 | ~30 | ~20 |
| 4 | T-27 | 2 µg | ~25 | ~30 | ~20 |
| 5 | U-11 | 2 µg | ~30 | ~45 | ~6 |
| 6 | - | 2 µg | ~70 | ~95 | 0 |
| 7 | T-23 | - | ~33 | ~75 | 0 |

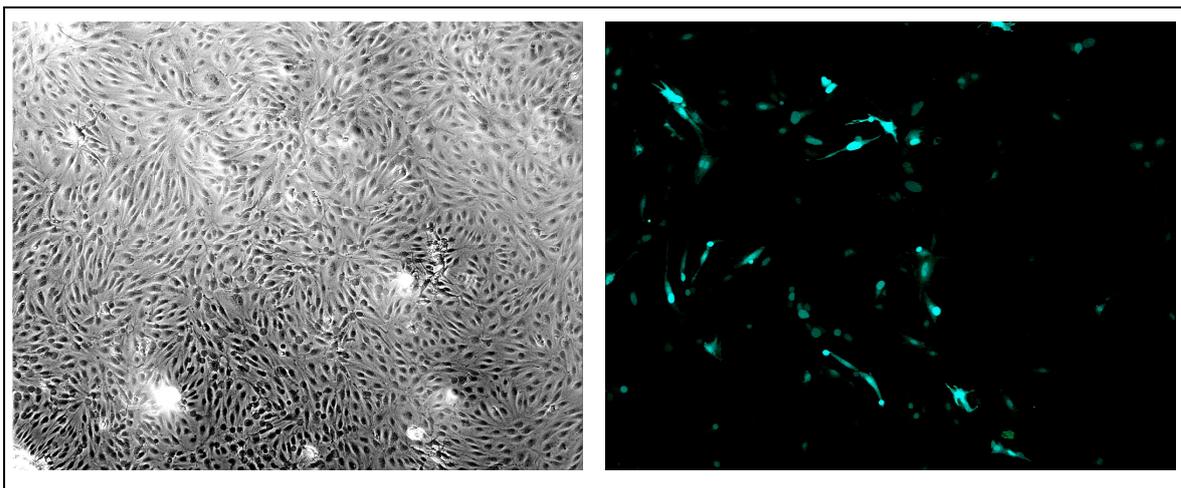


Abb. 3-12 Gentransfer in *PBCEC* mittels GFP exprimierender Adenoviren (Ad-GFP). Links: Phasenkontrastbild. Rechts: Fluoreszenzaufnahme. Die MOI (Multiplizität der Infektion) betrug 2200. Die Aufnahmen wurden einen Tag nach Infektion erstellt.

3.3. Generierung von pAbcg2 überexprimierenden Zelllinien

Die Expressionsreduzierung (*knockdown*) des porcinen Abcg2 (pAbcg2)-Transporters mittels RNA-Interferenz stellte eine potentielle Möglichkeit dar, die Funktion des pAbcg2 an dem *in vitro* Modell der BHS des Schweins zu charakterisieren. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse eines zweiten experimentellen Ansatzes gezeigt, indem versucht wurde, die Expression des Zielgens nicht zu reprimieren, sondern gezielt durch Einführung von pAbcg2-Expressionsvektoren pAbcg2-überexprimierende Zellsysteme zu erhalten. Um vergleichende Aussagen zwischen porcinen und humanen Systemen treffen zu können, wurden neben pAbcg2 exprimierenden Systemen auch Zelllinien generiert, die humanes ABCG2 (hABCG2) exprimieren.

Wie in 2.2.2.1 und 2.4.8 beschrieben, wurden verschiedene ABCG2-Expressionssysteme auf Basis unterschiedlicher Expressionsvektoren (Tab. 3-2) erzeugt. Neben pAbcg2 und hABCG2 exprimierenden HEK-Zellen wurden sowohl HEK als auch MDCK-Zellen generiert, die pAbcg2 in Fusion mit YFP (*yellow fluorescent protein*) exprimieren. Darüber hinaus wurde ein YFP/hABCG2 exprimierender MDCK-Klon sowie ein *Tetracyclin* induzierbares pAbcg2-System in HEK-Zellen (HEK-TREx/pAbcg2) hergestellt. Da die Expression des pAbcg2-Transporters im TREx-System unter der Kontrolle eines *Tetracyclin* induzierbaren CMV-Promoters steht, wurde für die Expression des Transporters in diesen Zellen das *Tetracyclin*-Derivat *Doxycyclin* dem Zellkulturmedium zugesetzt. Das in den Expressionsvektoren inserierte porcine und humane ABCG2 entspricht in seiner Sequenz den jeweiligen Wildtypen (vgl. Kap. 8.5). Eine Ausnahme bildet hierbei das porcine Abcg2 in Fusion mit EYFP (pAbcg2/pEYFP). In diesem Konstrukt liegt eine Mutation gegenüber dem porcinen Wildtyp an Position 564 vor (Pro564Leu): Anstelle von Prolin ist dort Leucin eingebaut.

Tab. 3-2 Eingesetzte ABCG2-Expressionssysteme. Der hABCG2/pcDNA3.1-Vektor wurde freundlicherweise von Joachim WEGENER und der hABCG2/pEYFP-Vektor von Thomas ENGEL zur Verfügung gestellt. (für die Sequenzen der klonierten Transporter siehe Kap. 8.5)

| Leervektor | klonierte Transporter-Sequenz | Bezeichnung des Expressionsvektors | Bezeichnung der mit dem vollständigen Vektor stabil transfizierten Zellen | |
|------------|-------------------------------|------------------------------------|---|----------------|
| | | | MDCK-Zellen | HEK 293-Zellen |
| pcDNA3 | pAbcg2 | pAbcg2/pcDNA3 | - | HEK-pAbcg2 |
| pEYFP-C1 | pAbcg2 | pAbcg2/pEYFP | MDCK-YFP/pAbcg2 | HEK-YFP/pAbcg2 |

| | | | | |
|---|---------------|-----------------|---------------------|---------------------|
| pcDNA4™/TO/myc-His B u. pcDNA6/TR (T-REx™) | <i>pAbcg2</i> | pAbcg2/pcDNA4 | - | HEK- TREx/pAbcg2 |
| pcDNA3.1/Zeo (+) | <i>hABCG2</i> | hABCG2/pcDNA3.1 | - | HEK-hABCG2 |
| pEYFP-C1 | <i>hABCG2</i> | hABCG2/pEYFP | MDCK- YFP/hABCG2 | - |

3.4. Charakterisierung der generierten ABCG2 exprimierenden Zelllinien

Die Charakterisierung der hergestellten ABCG2 exprimierenden Zelllinien erfolgte auf Proteinebene mittels immunozytochemischer Färbung sowie Western Blot Analyse. Die Immunodetektionen wurden in allen Fällen mit dem von Anja DREES (DREES, 2004) gegen porcines ABCG2 entwickelten Antikörper (anti-pAbcg2) durchgeführt.

Die Zellklone wurden im Weiteren in Zytotoxizitäts- und *Uptake*-Experimenten hinsichtlich der Transporterfunktionalität untersucht.

3.4.1. Immunozytochemische Färbungen

3.4.1.1. Immunozytochemische Färbungen der generierten pAbcg2 exprimierenden HEK-Zellen

Die immunozytochemische Anfärbung der pAbcg2-exprimierenden HEK-pAbcg2- und der 3 Tage mit *Doxycyclin* induzierten HEK-TREx/pAbcg2-Zelllinien zeigt eine deutliche Expression des Transporters im Vergleich zu nicht transfizierten HEK- (*HEK-wt*) und den nicht induzierten HEK-TREx/pAbcg2-Zellen (Abb. 3-13). Das Fluoreszenzsignal ist im Bereich der Zellmembran stärker ausgeprägt als im Rest der Zelle, was auf einen korrekten Transport des Proteins zur Zellmembran hindeutet und mit den von Anja DREES (DREES, 2004) an *PBCEC* durchgeführten Experimenten übereinstimmt. Die Zweitantikörper-Kontrollen zeigen nahezu keine Fluoreszenz. Da das in HEK-hABCG2-Zellen überexprimierte humane ABCG2 von dem für porcines ABCG2 entwickelten Antikörper in immunozytochemischen Färbungen nur schwach erkannt wird, sind von HEK-hABCG2 keine Fluoreszenzaufnahmen gezeigt.

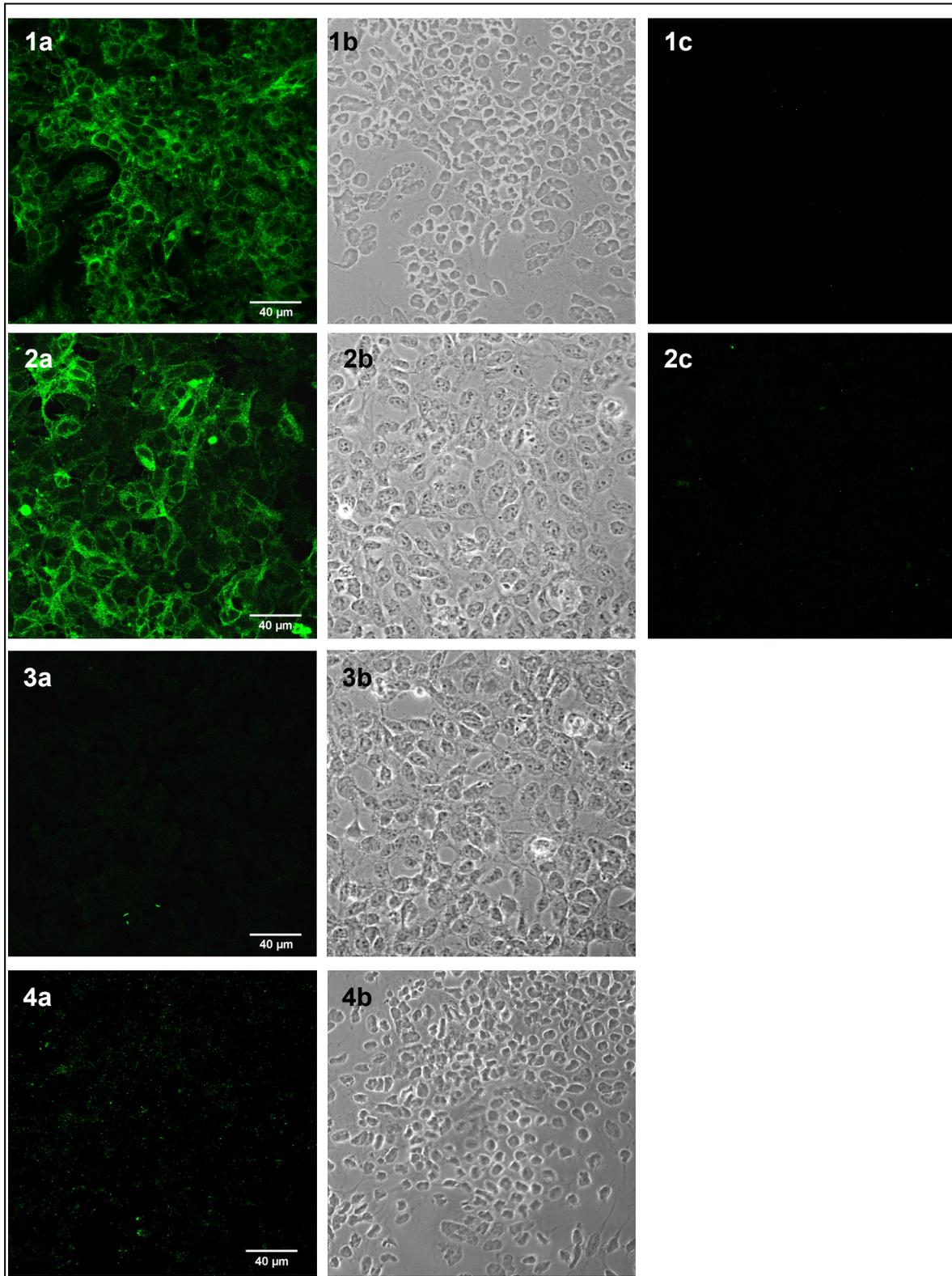


Abb. 3-13 Immunocytochemische Färbung von *Abcg2* in stabil transfizierten *HEK*-Zellen. **(1)** *HEK*-p*Abcg2*-Zellen, **(2)** *HEK*-TREx/p*Abcg2*-Zellen (3 Tage nach Induzierung der *ABCG2*-Expression mittels 1 µg/µl *Doxycyclin*), **(3)** *HEK*-TREx/p*Abcg2*-Zellen (nicht induzierte Zellen) und **(4)** *HEK*-wt-Zellen; **(a)** Fluoreszenzaufnahme (CLSM) der Immunodetektion mittels Erst- und Zweitantikörper, xy-Schnitt, **(b)** Phasenkontrastaufnahme, **(c)** Fluoreszenzaufnahme der Immunodetektion mittels Zweitantikörper (Zweitantikörper-Kontrolle).

3.4.1.2. CLSM-Aufnahmen der generierten YFP/Abcg2-Fusionsprotein exprimierenden MDCK- und HEK-Zellen

Ebenso wie die pAbcg2 überexprimierenden *HEK*-Zellen zeigen auch die *MDCK*-YFP/pAbcg2, *MDCK*-YFP/hABCG2 und *HEK*-YFP/pAbcg2-Zelllinien eine deutliche sichtbare Expression des Fusionsproteins. Sowohl bei den *MDCK*- als auch *HEK*-Zellen ist eine auffallende membranständige Lokalisierung des Transporters zu beobachten. Die z-Schnitte (Abb. 3-14 b und c) lassen bei den *MDCK*-Zellen eine eindeutige apikale Verteilung des Transporters erkennen. Im Gegensatz hierzu ist das Fluoreszenzsignal des Fusionsproteins in den *HEK*-YFP/pAbcg2-Zellen über die gesamte Zellmembran verteilt. Während die *MDCK*-Zellen einen einschichtigen Zellrasen ausbilden, sind bei den *HEK*-Zellen teilweise mehrere Zellschichten übereinander zu erkennen.

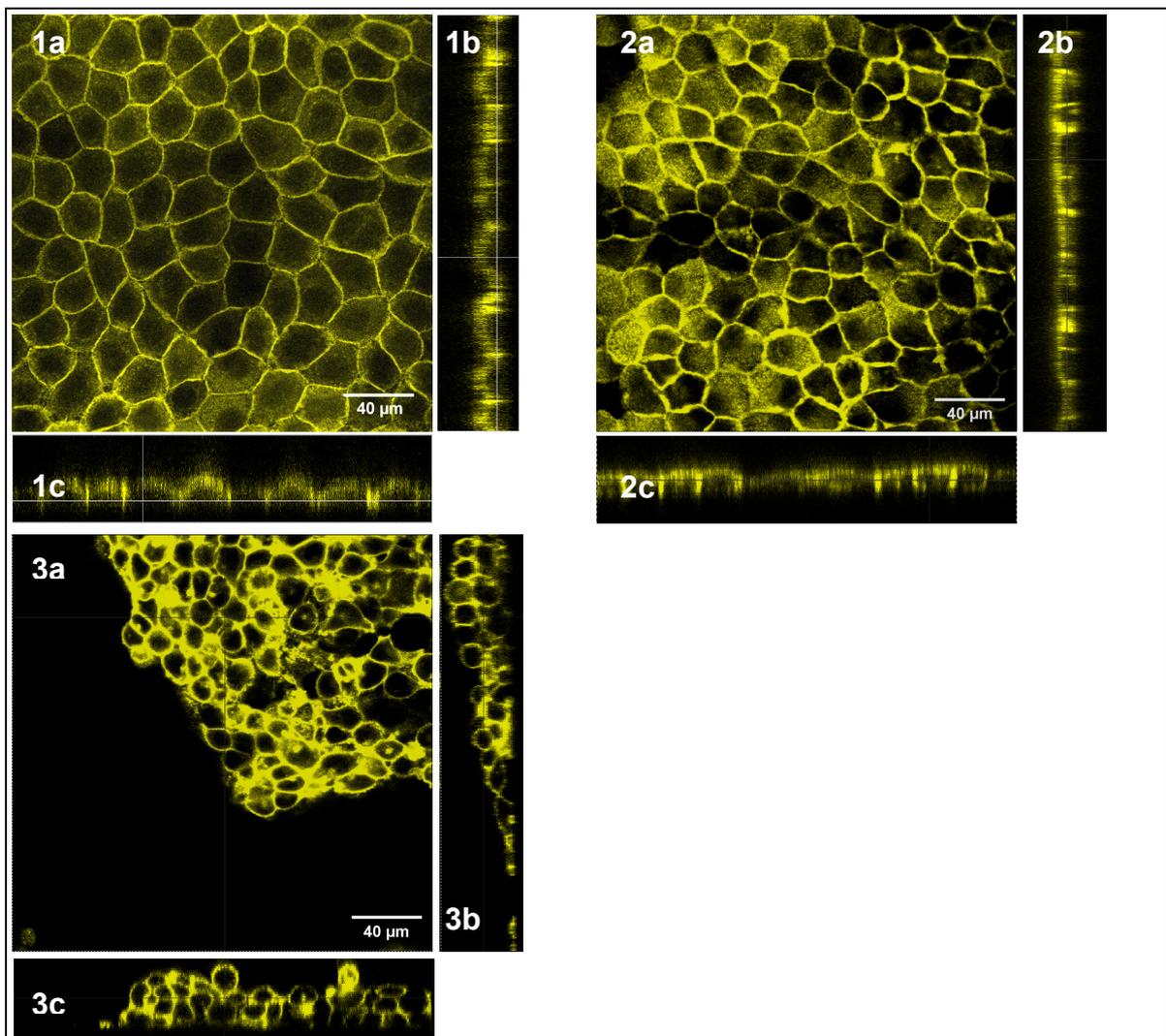


Abb. 3-14 CLSM-Fluoreszenz-Aufnahmen von stabil transfizierten YFP/ABCG2-Zelllinien. (1) stabil transfizierte *MDCK*-YFP/hABCG2-Zellen, (2) stabil transfizierte *MDCK*-YFP/pAbcg2-Zellen und (3) stabil transfizierte *HEK*-YFP/pAbcg2-Zellen; **a)** xy-Schnitt, **(b)** yz-Schnitt, **(c)** xz-Schnitt. Die Aufnahmen wurden an lebenden Zellen, die in 6-wells kultiviert wurden, erstellt.

3.4.2. Western Blot Analysen der überexprimierten ABCG2-Transporter

Zur weiteren Charakterisierung der entwickelten Expressionssysteme im Hinblick auf Größe, Oligomerisierungs- und Glykosylierungszustand der Transporterproteine und Vergleich dieser Daten mit in der Literatur bekannten Angaben wurden Western Blot Analysen durchgeführt.

Es ist bekannt, dass sich in Abhängigkeit der Zugabe eines Reduktionsmittels wie β -EtSH zum Proteinlysate unterschiedliche Bandenmuster in der Immunodetektion von ABCG2-Proteinen ergeben. Dieses Bandenmuster resultiert daraus, dass es sich beim ABCG2 um einen so genannten Halbtransporter handelt, der als funktionelle Einheit *in vivo* Dimere oder Oligomere bildet, welche in Abhängigkeit von den Reduzierungsbedingungen in der SDS-PAGE sichtbar werden. **Abb. 3-15** veranschaulicht dieses Phänomen. Es zeigt eine Western Blot Analyse von Gesamtprotein-Isolierungen aus *PBCEC*, denen unterschiedliche Mengen β -Mercaptoethanol (β -EtSH) zugesetzt wurden. Während im Bereich von 5 bis 100 mM β -EtSH die pAbcg2-Banden fast ausschließlich im Bereich von 83 kDa zu detektieren sind, welche der monomeren Halbtransporterform (Monomer, M) entsprechen, zeigt sich unter nicht reduzierenden Bedingungen ausschließlich eine Bande oberhalb von 175 kDa. Bei dieser handelt es sich um eine dimere oder oligomere Form (Oligomer, O) des Transporters. Bei einer β -EtSH-Konzentration von 1 mM sind die beiden Transporterformen in etwa gleich verteilt.

Darüber hinaus liegt das pAbcg2 in *PBCEC* in glykosylierter Form vor und zeigt demzufolge nach Behandlung mit Glykosidasen ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE (Abb. 3-17).

Ob vergleichbare Effekte auch in den generierten ABCG2 überexprimierenden Zelllinien zu beobachten sind und sich insbesondere oligomere Strukturen finden lassen, die auf potentielle funktionelle Transporter schließen lassen, wurde in den folgenden Experimenten geprüft.

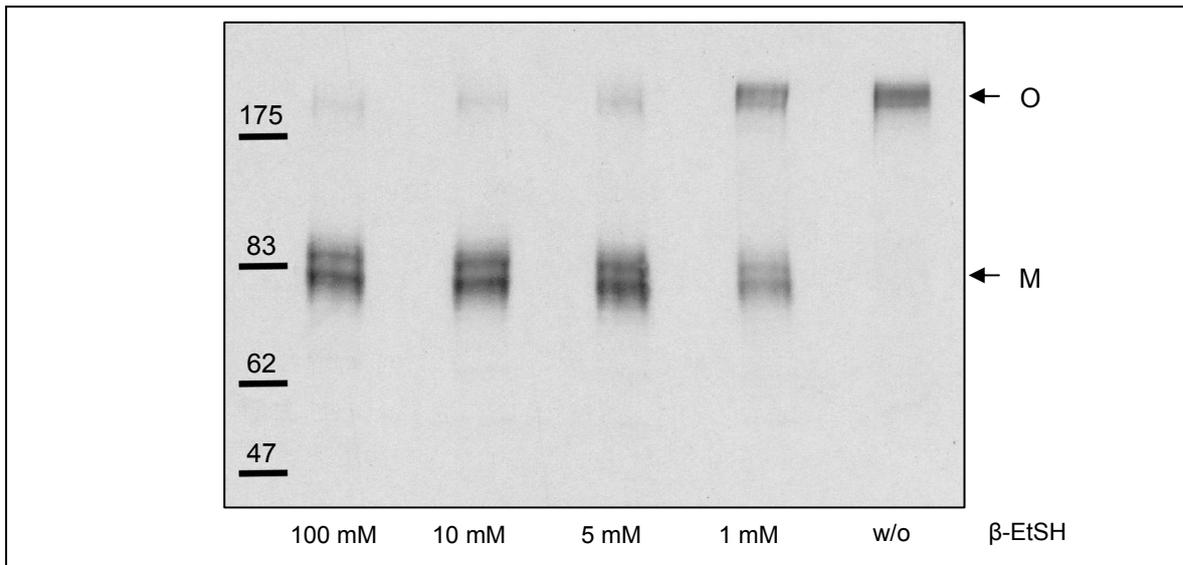


Abb. 3-15 Immunodetektion von Abcg2 in PBCEC unter Standardkulturbedingungen. Die Gesamt-Proteinlysate wurden vor dem 60 °C Denaturierungsschritt mit unterschiedlichen Mengen β -EtSH versetzt. Es wurden 5 μ g Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Die Größe der Marker-Banden ist in kDa angegeben (Abkürzungen: O: Oligomer, M: Monomer)

3.4.2.1. hABCG2 und pAbcg2 exprimierende HEK-Zellen

Abb. 3-16 zeigt Western Blot Analysen von Proteinlysaten aus hABCG2 und pAbcg2 überexprimierenden Zelllinien, bei denen unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen die Wirkung der Glykosidase *PNgase F* untersucht wurde.

Es wird deutlich, dass es in den Proben, die mit der Glykosidase *PNgase F* inkubiert wurden, zu einer Verschiebung der Proteinbanden in Richtung kleinerer Molekulargewichte kommt. Da *PNgase F* Asparagin-N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide abspaltet, ist davon auszugehen, dass diese Verschiebung direkte Folge eines durch die Abspaltung von Zuckerresten verbesserten Laufverhaltens ist. Auffällig ist, dass die relativ schmalen porcinen Abcg2-Banden in Proben, die mit Glykosidase behandelt wurden, auf der Membran unterhalb des gleichbehandelten humanen Homologs bei ca. 65 kDa zu detektieren sind, während sie im unbehandelten Fall oberhalb der hABCG2-Banden bei ca. 80 kDa verlaufen. Unter reduzierenden Bedingungen lassen sich sowohl für pAbcg2 als auch hABCG2 neben den stark geschwärzten niedermolekularen Banden (monomere Formen) schwach gefärbte höhermolekulare Banden (Oligomere) erkennen. Die Proben, die unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragen wurden, zeigen für das ABCG2 beider Spezies höhermolekulare Oligomerisierungszustände im Bereich oberhalb von 175 kDa, die durch Inkubation mit *PNgase F* in Richtung niedrigerer Molekulargewichte verschoben sind. Auch hier sind schwache niedermolekulare Banden zu unterscheiden, die in ihrer Größe bzw. Lage zu den stark geschwärzten Banden unter reduzierenden Bedingungen vergleich-

bar sind. Im Fall des porcinen Abcg2 bewirkt die Inkubation mit Glykosidase unter nicht reduzierenden Bedingungen eine relativ breite verschmierte Bande zwischen 83 und 175 kDa, wohingegen beim hABCG2 eine relativ scharfe Bande bei ca. 157 kDa zu detektieren ist.

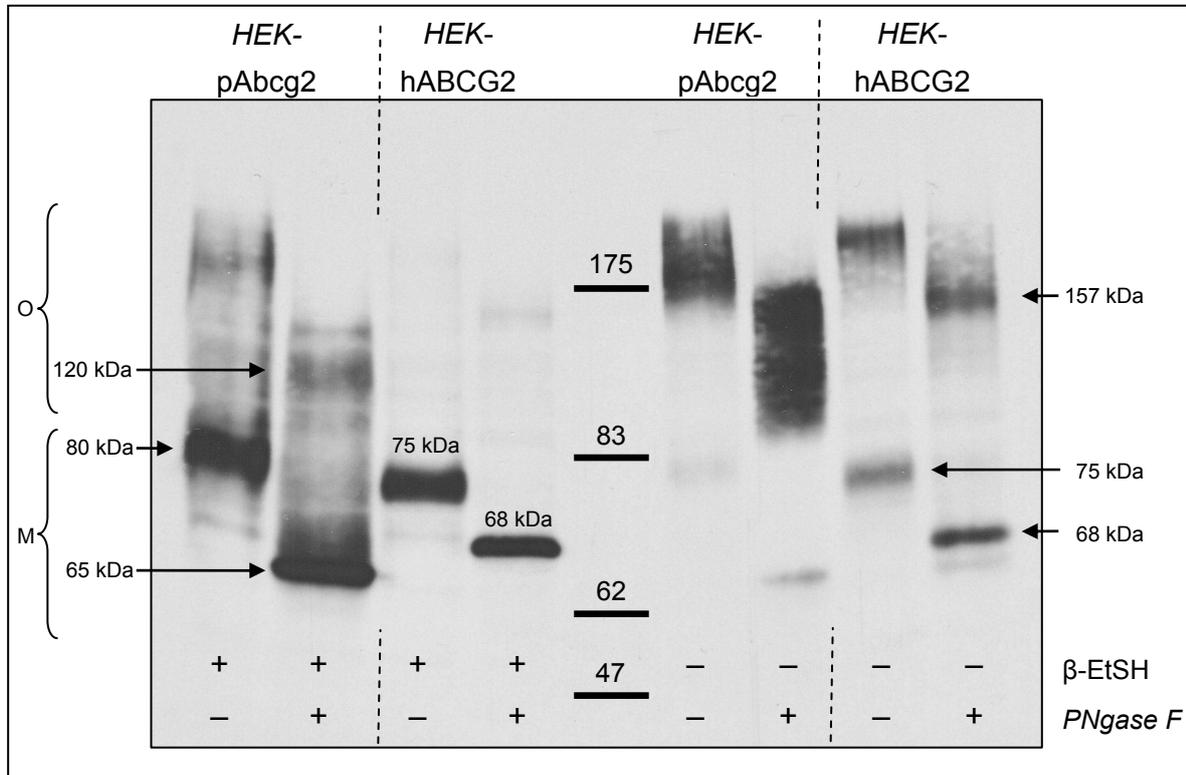


Abb. 3-16 Immunodetektion von ABCG2 in HEK-pAbcg2 und HEK-hABCG2-Zellen +/- Behandlung mit PNgase F. Es wurden 10 µg Gesamtprotein pro Spur unter reduzierenden (+ β-EtSH) und nicht reduzierenden (- β-EtSH) Bedingungen aufgetragen. Die Größe der Marker-Banden ist in kDa angegeben (Abkürzungen: O: Oligomer, M: Monomer).

Eine Gegenüberstellung der Glykosylierungsmuster zwischen dem in *PBCEC* natürlich exprimierten Abcg2 und dem in *HEK*-Zellen künstlich eingeführten aus *PBCEC* klonierten Transporter zeigt Abb. 3-17. Wie im vorangegangenen Experiment wird unter Einfluss von *PNgase F* auch bei *PBCEC* die Abcg2-Bande in Richtung kleinerer molekularer Masse verschoben. Die molekularen Größen der Abcg2 Banden in *PBCEC* und *HEK*-pAbcg2-Zellen sind nicht unterscheidbar. In der Immunodetektion des *PBCEC*-Protein-Extrakt sind neben den typischen, unter reduzierenden Bedingungen auftretenden niedermolekularen Banden (Monomer), jeweils schwächere hochmolekulare Banden bei ca. 175 kDa (- *PNgase F*) und 120 kDa (+ *PNgase F*) zu detektieren, die ABCG2-Oligomeren zuzuordnen sind.

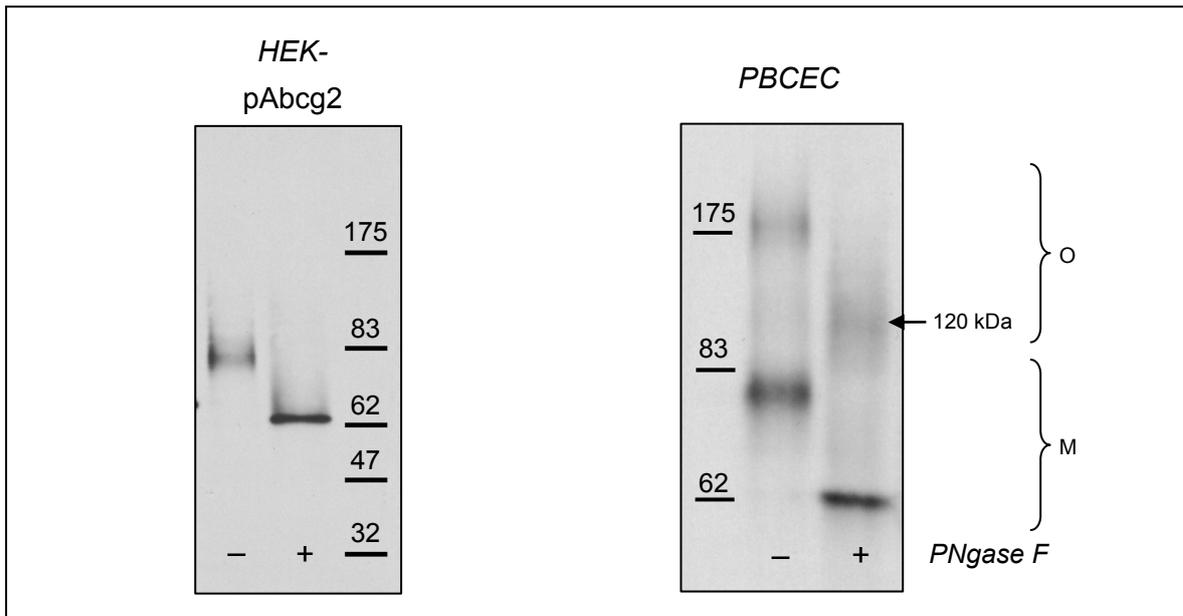


Abb. 3-17 Immunodetektion von ABCG2 in HEK-pAbcg2 und PBCEC (6. DIV) unter reduzierenden Bedingungen +/- Behandlung mit PNGase F. Es wurden 5 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Die Größe der Marker-Banden ist in kDa angegeben (Abkürzungen: O: Oligomer, M: Monomer).

3.4.2.2. HEK-TREx/pAbcg2-Zellen

Die generierten HEK-TREx/pAbcg2-Zellen, deren Abcg2-Expression durch Zugabe von *Doxycyclin* induzierbar ist, zeigen 3 Tage nach Inkubation mit *Doxycyclin* eine deutliche und im Vergleich zu PBCEC (bezogen auf den Gesamtproteingehalt) stärkere pAbcg2-Expression (Abb. 3-18). Die Zugabe von Glykosidase bewirkt wie in den vorigen Fällen unter reduzierenden Bedingungen eine Verschiebung der HEK-TREx/pAbcg2-Bande in Richtung kleinerer Molekularmasse und liegt damit auf derselben Höhe wie die entsprechende monomere Transporter-Bande in den PBCEC. Wie in HEK-pAbcg2-Proteinextrakten (Abb. 3-16) sind unter nicht reduzierenden Bedingungen höhermolekulare Oligomere im Bereich knapp oberhalb von 175 kDa in PNGase F unbehandelten HEK-TREx/pAbcg2-Proteinproben und als breite Schmierbande zwischen 83 und 175 kDa in PNGase F behandelten Proben zu erkennen. Die vergleichbaren relativ schwachen PBCEC-pAbcg2-Banden liegen unter nicht reduzierenden Bedingungen in beiden Fällen höher.

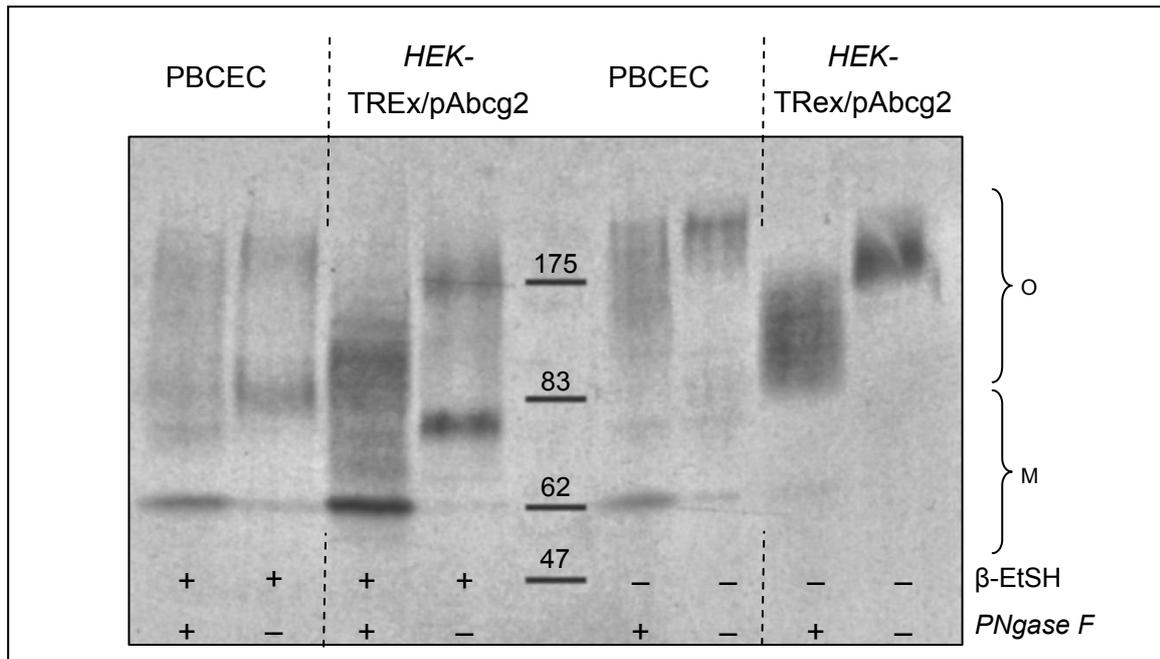


Abb. 3-18 Immunodetektion von pAbcg2 in PBCEC (6. DIV) und HEK-TREx/pAbcg2-Zellen (3-tägige Doxycyclin-Inkubation) +/- Behandlung mit PNGase F. Es wurden 5 µg Gesamtprotein pro Spur unter reduzierenden (+ β-EtSH) und nicht reduzierenden (- β-EtSH) Bedingungen aufgetragen. Die Größe der Marker-Banden ist in kDa angegeben (Abkürzungen: O: Oligomer, M: Monomer).

3.4.2.3. YFP/pAbcg2-Zellen

Auch in den YFP/pAbcg2 exprimierenden *HEK* und *MDCK*-Zellen, in denen der Transporter in C-terminaler Fusion mit YFP gebildet wird, lassen sich in Abhängigkeit von den Reduzierungsbedingungen Proteinbanden von monomeren oder oligomeren Transportern finden (Abb. 3-19). Diese liegen aufgrund des fusionierten YFP bei höherer Molekularmasse als in den vergleichbaren *PBCEC* oder *HEK*-pAbcg2-Zellen. Bei den Proteinlysaten aus YFP/pAbcg2-*HEK*-Zellen ist unter reduzierenden Bedingungen eine starke Proteinbande bei ca. 100 kDa zu detektieren, die wahrscheinlich einer monomeren glykosylierten Form des Transporters entspricht. Eine weitere schwache höhermolekulare Bande ist weit oberhalb von 175 kDa zu erkennen. Unter nicht reduzierenden Bedingungen verblasst die 100 kDa-Bande, und es tritt eine starke Proteinbande oberhalb von 175 kDa auf. Darüber hinaus ist sowohl unter reduzierenden als auch nicht reduzierenden Bedingungen eine weitere niedermolekulare Bande im Bereich von ca. 87 kDa detektierbar, die einer monomeren deglykosylierten Transporterform zuzuordnen ist. Im Vergleich zu den YFP/pAbcg2-*HEK*-Zellen zeigen die von der Lage her vergleichbaren detektierten Transporterbanden der YFP/pAbcg2-*MDCK*-Zellen eine wesentlich geringere Schwärzungsintensität und damit

eine bezogen auf den Gesamtproteingehalt geringere Expressionsstärke. Niedermolekulare deglykosylierte Transporterformen lassen sich nicht erkennen.

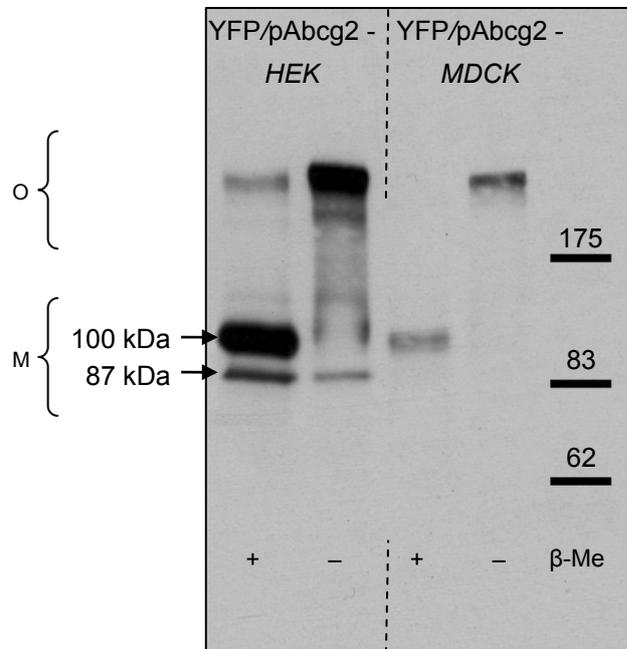


Abb. 3-19 Immunodetektion von Gesamt-Proteinlysaten aus HEK-YFP/pAbcg2 und MDCK-YFP/pAbcg2-Zellen unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen. Es wurden 10 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Die Größe der Marker-Banden ist in kDa angegeben. (Abkürzungen: O: Oligomer, M: Monomer)

3.4.2.4. Weiterführende Experimente an HEK-TREx/pAbcg2-Zellen

An den generierten HEK-TREx/pAbcg2-Zellen, deren Abcg2-Expression durch Zugabe von *Doxycyclin* induzierbar ist, wurde neben den Deglykosylierungs- und Oligomerisierungsexperimenten zusätzlich die Zeitabhängigkeit der durch *Doxycyclin* induzierten pAbcg2-Expression untersucht. Dies war zwingend notwendig, um abschätzen zu können, wie schnell der Transporter nach Zugabe von *Doxycyclin* gebildet wird und zu welchem frühestmöglichen Zeitpunkt demzufolge weiterführende Zytotoxizitätstests sinnvoll durchführbar sind.

Wie Abb. 3-20 zeigt, ist nach 24 h Inkubation mit *Doxycyclin* ein deutliches Expressionssignal des Transporters bei ca. 62 kDa zu erkennen, das einer gering oder nicht glykosylierten Form des Transporters zuzuordnen ist. Bei längeren Inkubationszeiten mit *Doxycyclin* taucht neben dieser ersten Bande eine weitere bei ca. 75 kDa auf, die das glykosylierte monomere pAbcg2 darstellt. Das Proteinlysat der 72 h Probe unterscheidet sich hinsichtlich des pAbcg2 Expressionsmusters nicht mehr signifikant von der 144 h Probe. Für

weiterführende Zytotoxizitätstests an *HEK-TREx/pAbcg2*-Zellen wurde daher eine Inkubationszeit von wenigstens 72 h festgelegt.

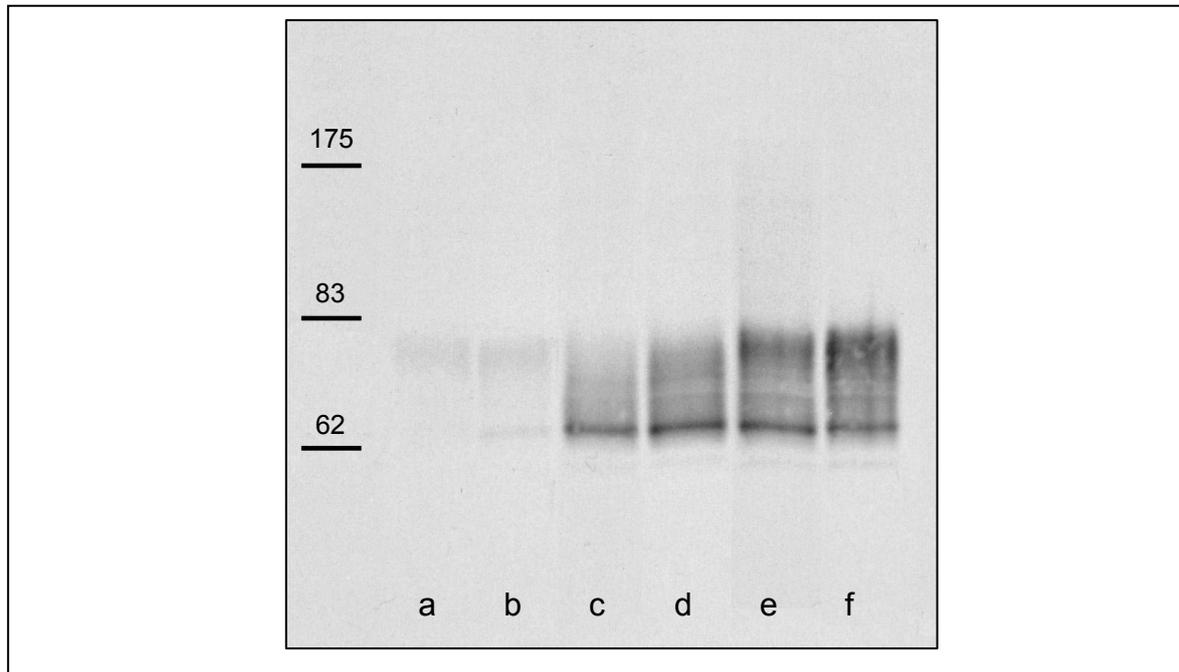


Abb. 3-20 Expression von pAbcg2 in *HEK-TREx/pAbcg2*-Zellen in zeitlicher Abhängigkeit zur *Doxycyclin*-Zugabe (2 μM). Es wurden 5 μg Gesamtprotein unter reduzierenden Bedingungen pro Spur aufgetragen. **a)** w/o *Doxycyclin*, **(b)** 4h, **(c)** 24 h, **(d)** 48 h **(e)** 72 h, **(f)** 144 h nach *Doxycyclin*-Zugabe. Die Größe der Marker-Banden ist in kDa angegeben.

Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, ob durch Erhöhung der eingesetzten *Doxycyclin*-Konzentration im Kulturmedium die pAbcg2-Expression erhöht werden kann und ob die über *Tetracyclin*-Derivate induzierbaren *HEK-TREx/pAbcg2*-Zellen in Abhängigkeit von potentiell den pAbcg2-Transport beeinflussenden Modulatoren zur Expression des Transporters veranlasst werden können.

Hierfür wurden die Zellen 3 Tage in Kulturmedium mit jeweils 2 μM verschiedener potentieller Modulatoren inkubiert. Zusätzlich wurden Proteinextrakte aus Ansätzen isoliert, die mit der Standard- und der 10-fachen-*Doxycyclin*-Konzentration (20 μM) inkubiert wurden. Die Immunodetektion (Abb. 3-21) belegt, dass eine Erhöhung der *Doxycyclin*-Konzentration zu keiner weiteren Verstärkung der pAbcg2-Expression führt und demzufolge eine Konzentration von 2 μM *Doxycyclin* schon über der Sättigungsgrenze des Systems liegt. Die eingesetzten Modulatoren bewirken einen gegenüber der geringen Hintergrundexpression nicht detektierbaren Induktionseffekt und sind diesbezüglich als Induktionsauslöser zu vernachlässigen.

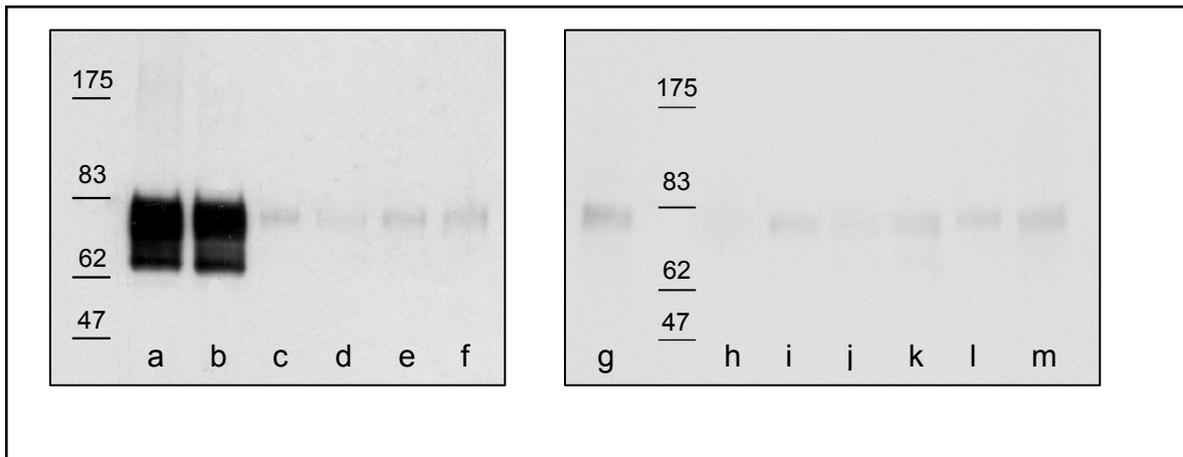


Abb. 3-21 Expression von pAbcg2 in HEK-TREx/pAbcg2-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen potentiellen Modulatoren. Es wurden 10 μg Gesamtprotein (reduzierende Bedingungen) pro Spur aufgetragen. **a)** 2 μM Doxycyclin, **(b)** 20 μM Doxycyclin, **(c)** 2 μM Methothrexat, **(d)** 2 μM Etoposide, **(e)** 2 μM Cyclosporin A, **(f)** u. **(m)** Kontrolle (w/o Doxycyclin), **(g)** 2 μM Verapamil, **(h)** 2 μM Novobiocin, **(i)** 2 μM Mitoxantron **(j)** 2 μM Vincristin, **(k)** 2 μM Vinblastin, **(l)** 2 μM Doxorubicin. Die Größe der Marker-Banden ist in kDa angegeben.

3.4.3. Zytotoxizitätstest

In den vorangegangenen Kapiteln wurde veranschaulicht, dass in den generierten stabilen ABCG2-Expressionssystemen die Transporter auf Proteinebene eindeutig und in Bezug auf ihr Oligomerisierungs- und Glykosylierungsverhalten sowie ihrer Lokalisierung in der Zellmembran in einer dem *PBCEC*-pAbcg2 vergleichbaren Art gebildet werden. Über Zytotoxizitätstests und *Uptake*-Messungen sollte nun geklärt werden, ob die stabil eingebrachten ABCG2-Proteine auch Transportaktivität zeigen und ob sich diese durch den Einsatz verschiedener Modulatoren/Inhibitoren beeinflussen lässt.

In den durchgeführten Experimenten wurde *Hoechst 33342* als zu transportierendes Substrat gewählt. *Hoechst 33342* ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in der Fluoreszenzmikroskopie zur Anfärbung von DNA verwendet wird. Es ist bekannt, dass *Hoechst 33342* effizient von humanem und murinem ABCG2 transportiert wird (KIM et al., 2002; SCHARENBERG et al., 2002; ZHOU et al., 2001) und daher möglicherweise auch ein Substrat des porcinen Abcg2 darstellt.

3.4.3.1. HEK-TREx/pAbcg2

Die Untersuchungen zur Transporter-Funktionalität des porcinen Abcg2 wurden in *HEK-TREx/pAbcg2*-Zellen durchgeführt. Wie Abb. 3-22 verdeutlicht, sind signifikante Unterschiede in Abhängigkeit vom Zusatz von *Doxycyclin* und in Bezug auf die Zytotoxizität von *Hoechst 33342* in *HEK-TREx/pAbcg2* zu beobachten. Zellen, denen kein *Doxycyclin* zugesetzt wurde, sterben bei kleineren *Hoechst 33342*-Konzentrationen ($EC_{50} = 37 \pm 2 \mu\text{M}$) als Zellen, in denen die Expression des Transporters durch *Doxycyclin*-Zugabe induziert wurde. Aufgrund der hohen Vitalitätswerte der induzierten Zellen im gesamten gewählten *Hoechst 33342*-Konzentrationsbereich ließ sich kein konkreter EC_{50} -Wert bestimmen. Bei Betrachtung aller gezeigten Experimente (Abb. 3-23 bis Abb. 3-26) lässt sich feststellen, dass der EC_{50} -Wert der induzierten Zellen im Mittel oberhalb von $150 \mu\text{M}$ liegt. Die Verwendung der Modulatoren bzw. Inhibitoren führte demnach zu keinem messbaren modulatorischen Effekt. In den Zellen, deren pAbcg2-Expression nicht induziert wurde, bewirken *Cyclosporin A* ($EC_{50} = 14 \pm 1 \mu\text{M}$), *PSC 833* ($EC_{50} = 16 \pm 2 \mu\text{M}$) und *GF 120918* ($EC_{50} = 28 \pm 4 \mu\text{M}$) eine Steigerung der zytotoxischen Wirkung von *Hoechst 33342* gegenüber den unbehandelten nicht induzierten Zellen ($EC_{50} = 37 \pm 2 \mu\text{M}$). Die mit *Fumitremorgin C* ($EC_{50} = 42 \pm 6 \mu\text{M}$) behandelten Zellen zeigen hingegen keine signifikante Änderung gegenüber den unbehandelten nicht induzierten *HEK-TREx/pAbcg2*-Zellen (Abb. 3-23 bis Abb. 3-26).

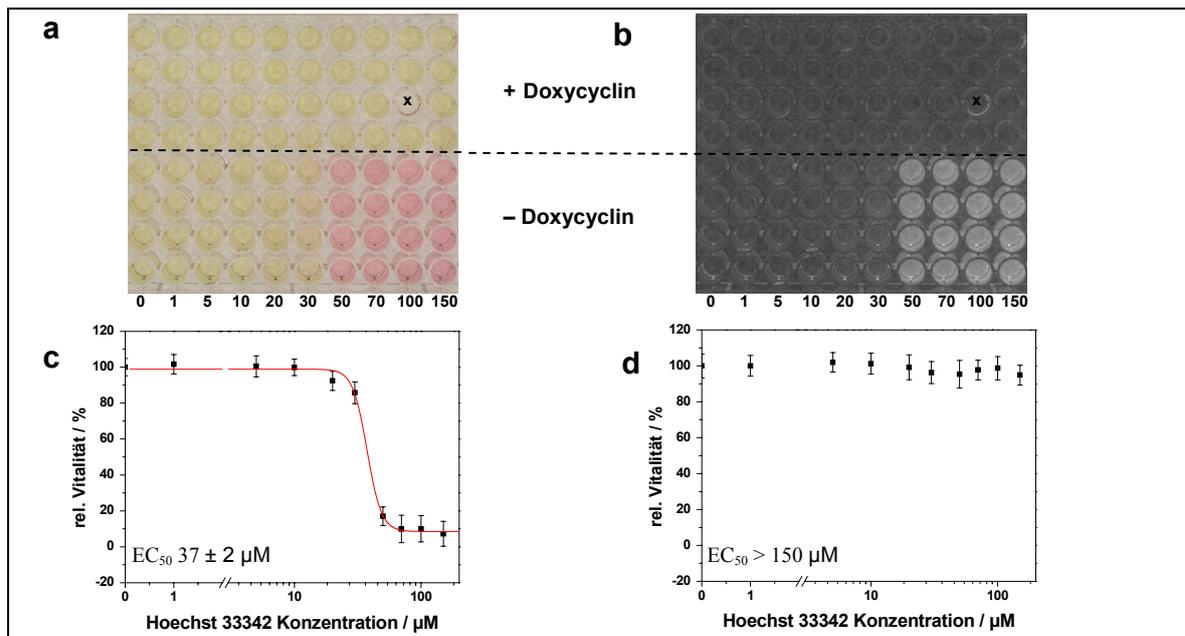


Abb. 3-22 Zytotoxizität von *Hoechst 33342* gegenüber *HEK-TREx/pAbcg2*-Zellen (+/- *Doxycyclin*) (n = 4). (a) Mediumfärbung in den 96-wells (Zahlwerte = *Hoechst 33342* Konzentration [µM]); (b) Graustufenbild für die Densitometrie (Magenta-Kanal); (c) Densitometrische Auswertung der Messung von *HEK-TREx/pAbcg2*-Zellen, die nicht mit *Doxycyclin* behandelt wurden; (d) Densitometrische Auswertung der Messung von *HEK-TREx/pAbcg2*-Zellen, die mit *Doxycyclin* behandelt wurden. Das mit x markierte well wurde in der Auswertung nicht berücksichtigt.

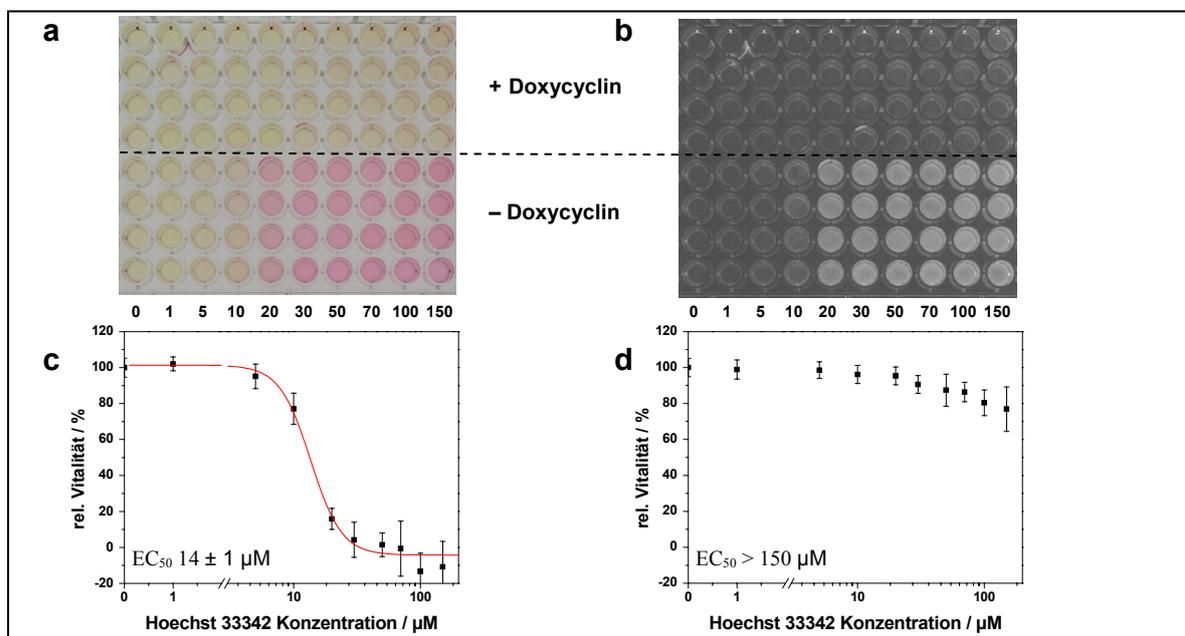


Abb. 3-23 Einfluss von 10 µM *Cyclosporin A* auf die Zytotoxizität von *Hoechst 33342* in *HEK-TREx/pAbcg2*-Zellen (+/- *Doxycyclin*) (n = 4). (a) Mediumfärbung in den 96-wells (Zahlwerte = *Hoechst 33342* Konzentration [µM]); (b) Graustufenbild für die Densitometrie (Magenta-Kanal); (c) Densitometrische Auswertung der Messung von *HEK-TREx/pAbcg2*-Zellen, die mit *Cyclosporin A* ohne *Doxycyclin* inkubiert wurden; (d) Densitometrische Auswertung der Messung von *HEK-TREx/pAbcg2*-Zellen, die mit *Cyclosporin A* und *Doxycyclin* inkubiert wurden.

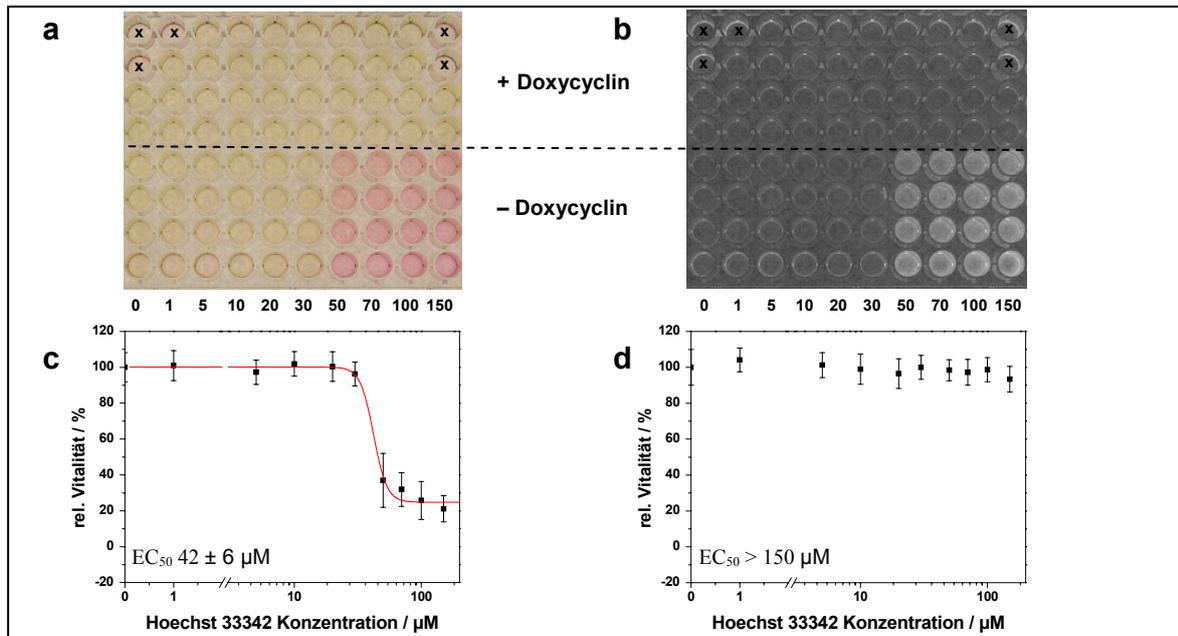


Abb. 3-24 Einfluss von 1 μM Fumitremorgin C auf die Zytotoxizität von Hoechst 33342 in HEK-TREx/pAbcg2-Zellen (+/- Doxycyclin) (n = 4). (a) Mediumfärbung in den 96-wells (Zahlwerte = Hoechst 33342 Konzentration [μM]); (b) Graustufenbild für die Densitometrie (Magenta-Kanal); (c) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-TREx/pAbcg2-Zellen, die mit Fumitremorgin ohne Doxycyclin inkubiert wurden; (d) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-TREx/pAbcg2-Zellen, die mit Fumitremorgin und Doxycyclin inkubiert wurden. Die mit x markierten wells wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

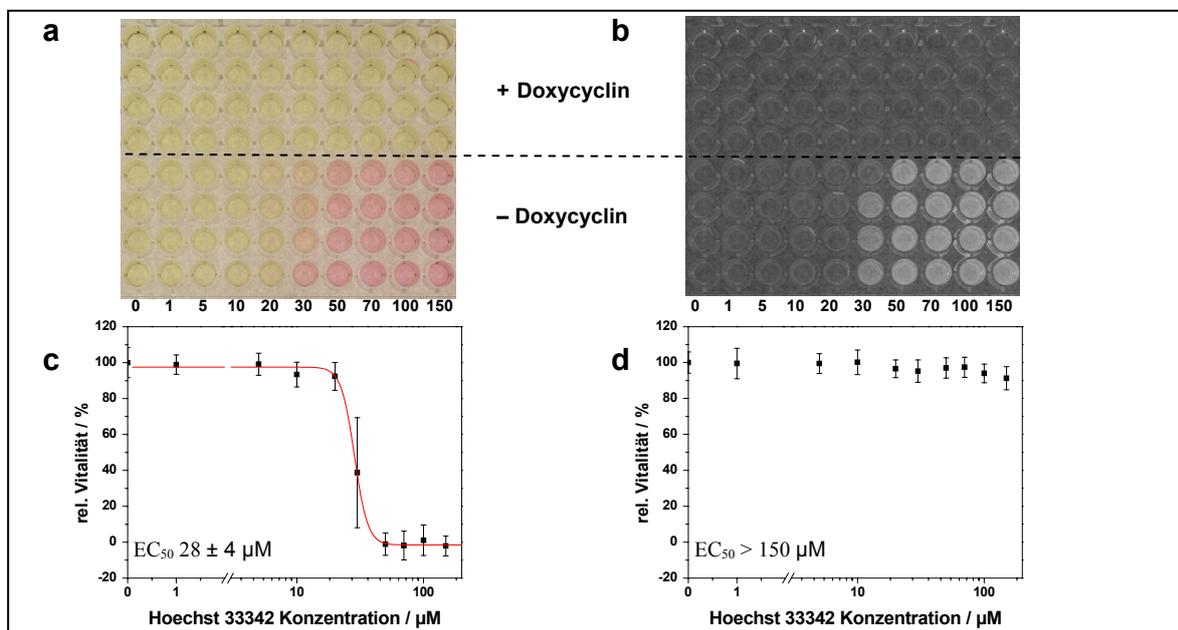


Abb. 3-25 Einfluss von 1 μM GF 120918 auf die Zytotoxizität von Hoechst 33342 in HEK-TREx/pAbcg2-Zellen (+/- Doxycyclin) (n = 4). (a) Mediumfärbung in den 96-wells (Zahlwerte = Hoechst 33342 Konzentration [μM]); (b) Graustufenbild für die Densitometrie (Magenta-Kanal); (c) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-TREx/pAbcg2-Zellen, die mit GF 120918 ohne Doxycyclin inkubiert wurden; (d) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-TREx/pAbcg2-Zellen, die mit GF 120918 und Doxycyclin inkubiert wurden.

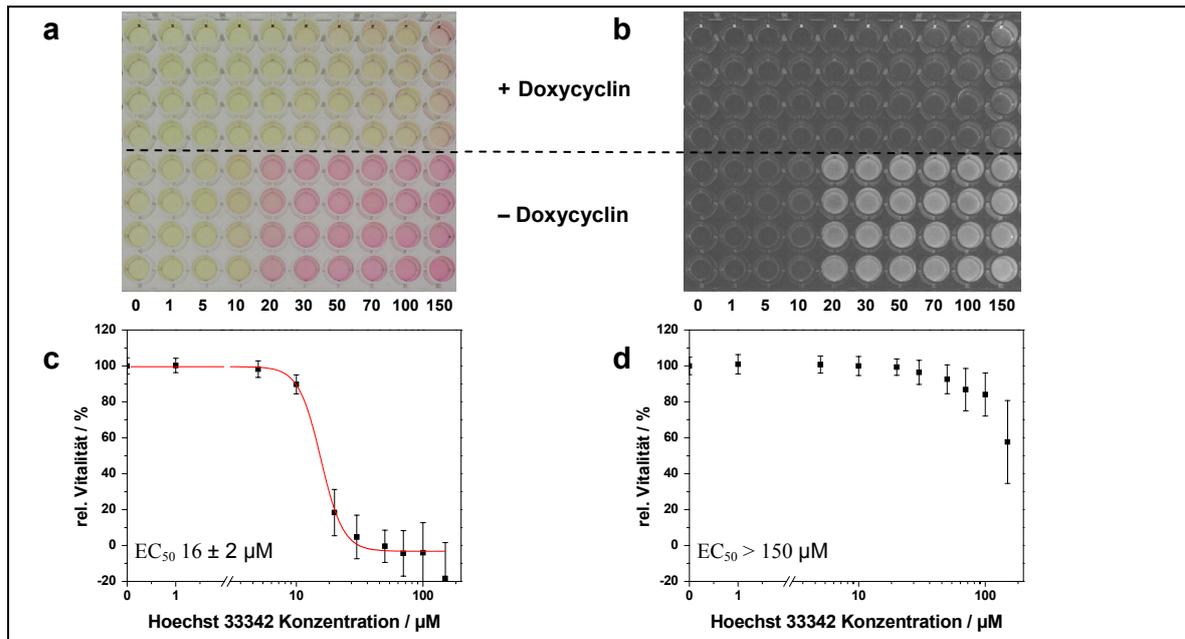


Abb. 3-26 Einfluss von 10 µM PSC 833 auf die Zytotoxizität von Hoechst 33342 in HEK-TREx/pAbcg2-Zellen (+/- Doxycyclin) (n = 4). (a) Mediumfärbung in den 96-wells (Zahlwerte = Hoechst 33342 Konzentration [µM]); (b) Graustufenbild für die Densitometrie (Magenta-Kanal); (c) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-TREx/pAbcg2-Zellen, die mit PSC 833 ohne Doxycyclin inkubiert wurden; (d) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-TREx/pAbcg2-Zellen, die mit PSC 833 und Doxycyclin inkubiert wurden.

3.4.3.2. HEK-hABCG2

Analog zu den an pAbcg2 durchgeführten Messungen wurden auch an stabil hABCG2 exprimierenden HEK-Zellen Experimente durchgeführt. Diese sollten einen Vergleich zwischen humanen und porcinen Transportern ermöglichen.

Die HEK-hABCG2 (Abb. 3-27 bis Abb. 3-30) weisen wie die induzierten HEK-TREx/pAbcg2 ($EC_{50} = 37 \pm 2 \mu\text{M}$, Abb. 3-22) eine gegenüber HEK-wt ($EC_{50} = 18 \pm 1 \mu\text{M}$, Abb. 3-31) oder nicht induzierten HEK-TREx/pAbcg2-Zellen ($EC_{50} = 37 \pm 2 \mu\text{M}$, Abb. 3-22) höhere Hoechst 33342-Verträglichkeit auf. Der EC_{50} -Wert der hABCG2-überexprimierenden Zellen ließ sich auch in diesem Fall nicht konkret bestimmen, liegt im Mittel aber über 150 µM. Die verwendeten Modulatoren bewirken auch hier eine Kompensation dieses Effekts. Die stärkste Wirkung zeigen wie in den HEK-TREx/pAbcg2-Zellen PSC 833 ($EC_{50} = 27 \pm 3 \mu\text{M}$, Abb. 3-30) und Cyclosporin A ($EC_{50} = 26 \pm 7 \mu\text{M}$, Abb. 3-27) gefolgt von GF 120918 ($EC_{50} = 31 \pm 3 \mu\text{M}$, Abb. 3-29) und Fumitremorgin C ($EC_{50} = 43 \pm 7 \mu\text{M}$, Abb. 3-28).

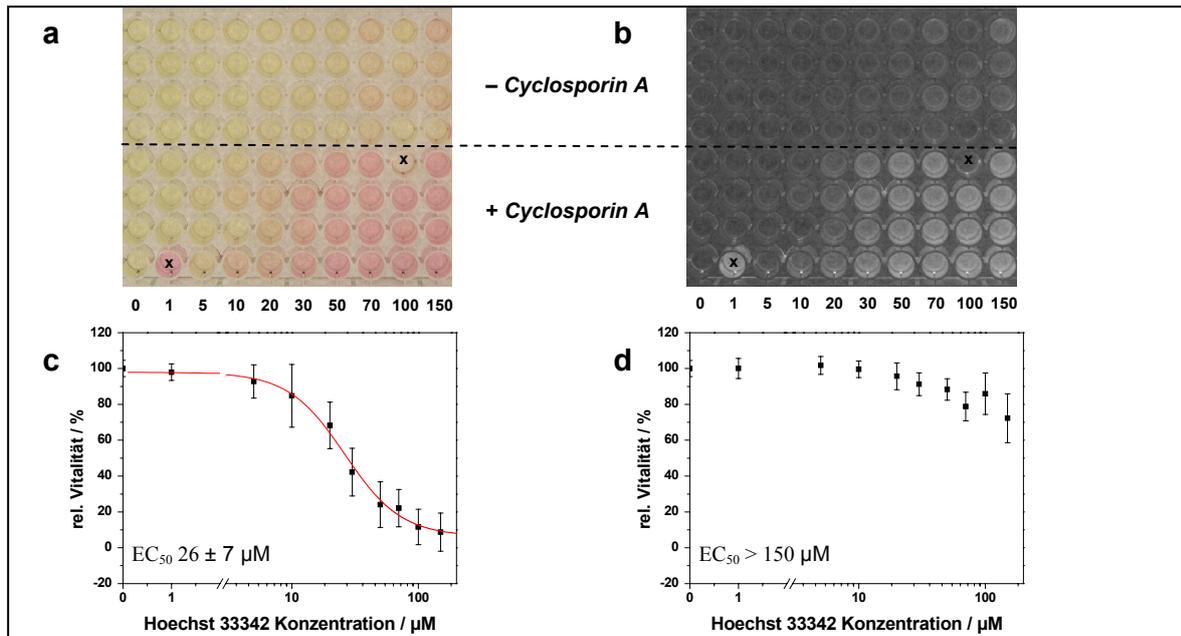


Abb. 3-27 Einfluss von 10 µM Cyclosporin A auf die Zytotoxizität von Hoechst 33342 in HEK-hABCG2-Zellen (n = 4). (a) Mediumfärbung in den 96-wells (Zahlwerte = Hoechst 33342 Konzentration [µM]); (b) Graustufenbild für die Densitometrie (Magenta-Kanal); (c) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-hABCG2-Zellen, die mit Cyclosporin A inkubiert wurden; (d) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-hABCG2-Zellen, die ohne Cyclosporin A inkubiert wurden. Die mit x markierten wells wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

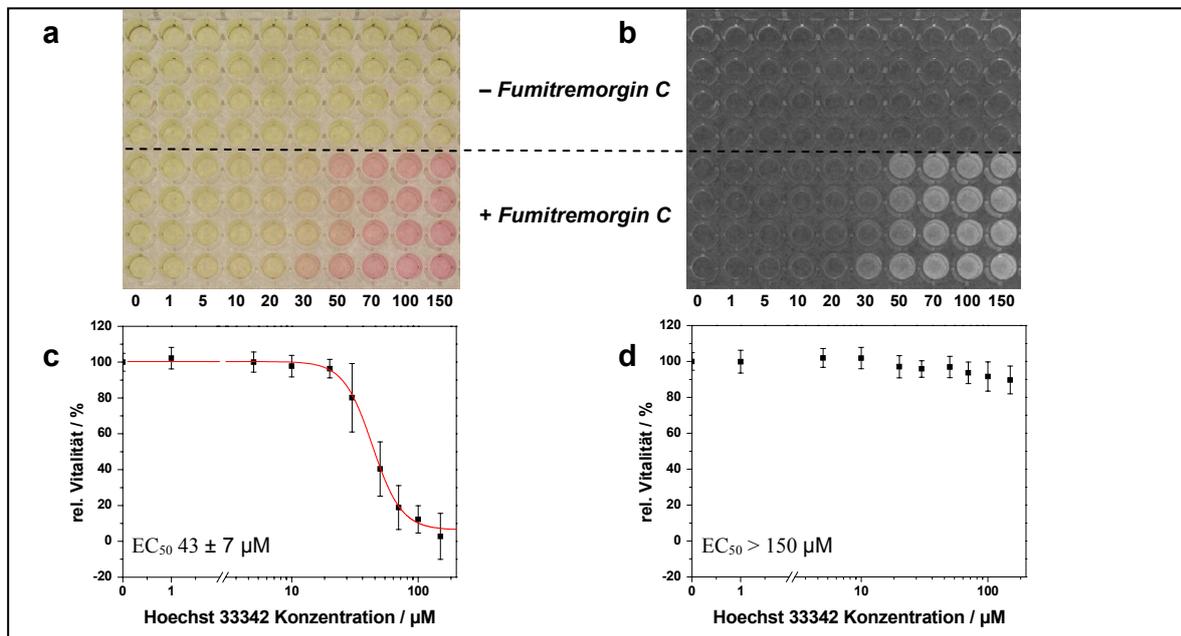


Abb. 3-28 Einfluss von 1 µM Fumitremorgin C auf die Zytotoxizität von Hoechst 33342 in HEK-hABCG2-Zellen (n = 4). (a) Mediumfärbung in den 96-wells (Zahlwerte = Hoechst 33342 Konzentration [µM]); (b) Graustufenbild für die Densitometrie (Magenta-Kanal); (c) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-hABCG2-Zellen, die mit Fumitremorgin C inkubiert wurden; (d) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-hABCG2-Zellen, die ohne Fumitremorgin C inkubiert wurden.

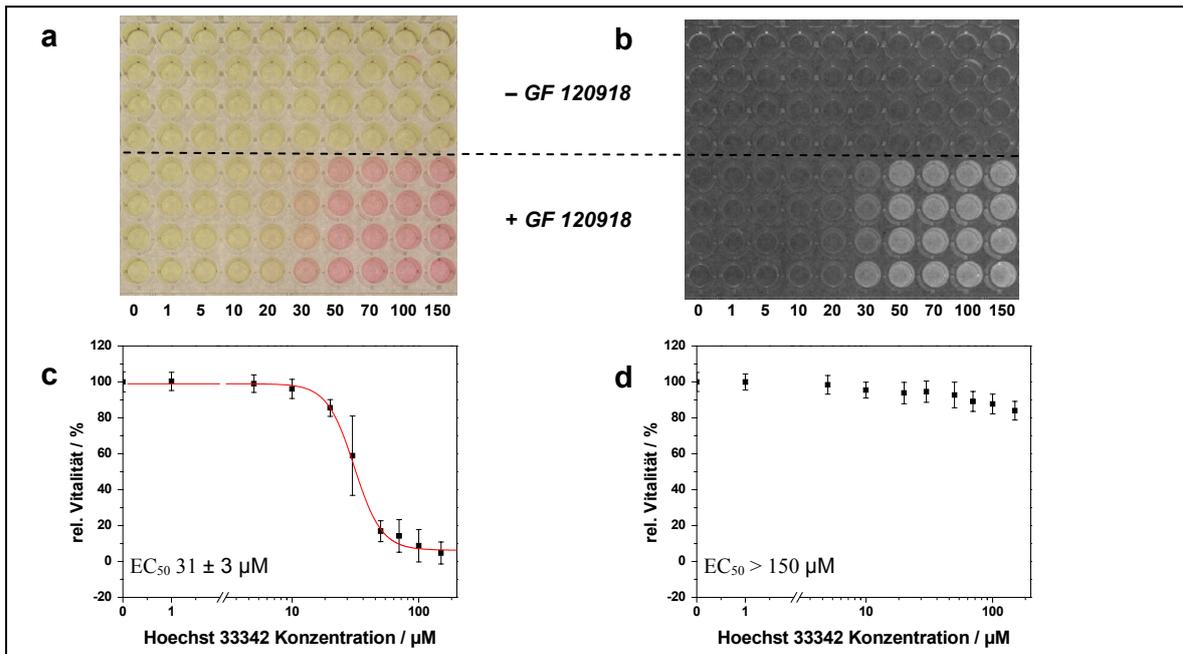


Abb. 3-29 Einfluss von 1 µM *GF 120918* auf die Zytotoxizität von *Hoechst 33342* in *HEK-hABCG2*-Zellen (n = 4). (a) Mediumfärbung in den 96-wells (Zahlwerte = *Hoechst 33342* Konzentration [µM]); (b) Graustufenbild für die Densitometrie (Magenta-Kanal); (c) Densitometrische Auswertung der Messung von *HEK-hABCG2*-Zellen, die mit *GF 120918* inkubiert wurden; (d) Densitometrische Auswertung der Messung von *HEK-hABCG2*-Zellen, die ohne *GF 120918* inkubiert wurden.

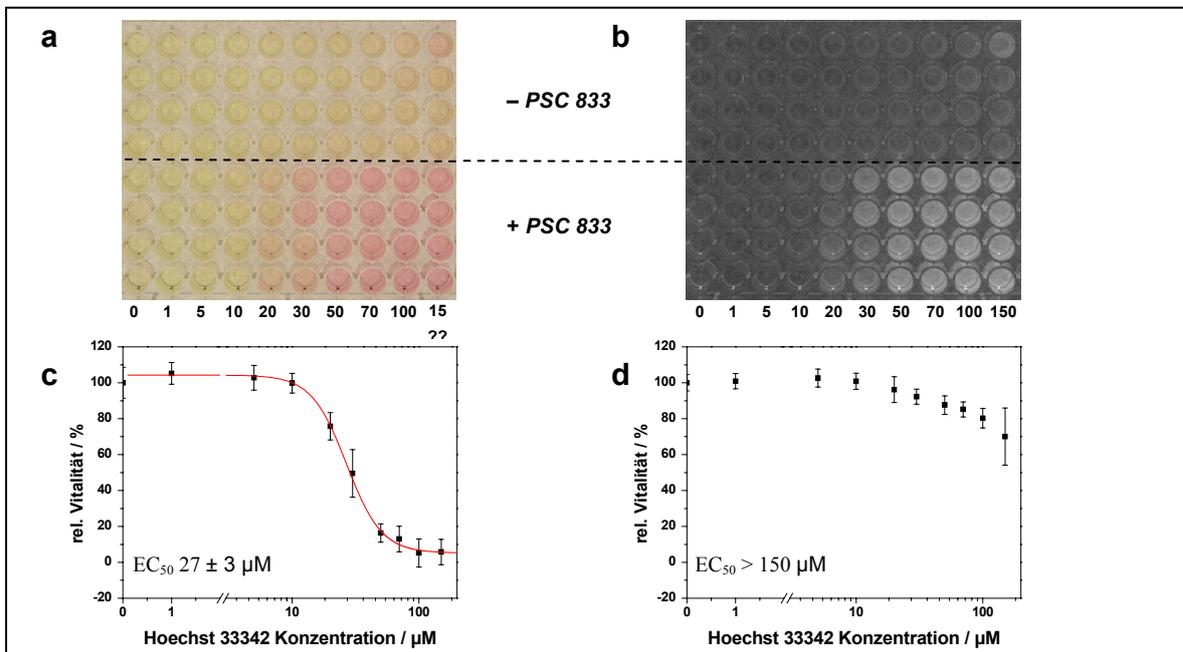


Abb. 3-30 Einfluss von 10 µM *PSC 833* auf die Zytotoxizität von *Hoechst 33342* in *HEK-hABCG2*-Zellen (n = 4). (a) Mediumfärbung in den 96-wells (Zahlwerte = *Hoechst 33342* Konzentration [µM]); (b) Graustufenbild für die Densitometrie (Magenta-Kanal); (c) Densitometrische Auswertung der Messung von *HEK-hABCG2*-Zellen, die mit *PSC 833* inkubiert wurden; (d) Densitometrische Auswertung der Messung von *HEK-hABCG2*-Zellen, die ohne *PSC 833* inkubiert wurden.

3.4.3.3. HEK-YFP/pAbcg2-Zellen

Auch *HEK*-YFP/pAbcg2-Zellen, die pAbcg2 in Fusion mit YFP exprimieren, zeigen im Vergleich zu *HEK*-wt-Zellen eine größere Toleranz gegenüber der zytotoxischen Wirkung von *Hoechst 33342*. Während die *HEK*-wt Zellen bereits bei einer *Hoechst 33342*-Konzentration von 18 μM eine relative Vitalität von 50 % erreichen, liegt dieser Wert bei *HEK*-YFP/pAbcg2-Zellen jenseits von 200 μM (Abb. 3-31). Die Zugabe der Modulatoren *Cyclosporin A* (Abb. 3-32), *Fumitremorgin C* (Abb. 3-33) oder *PSC 833* (Abb. 3-34) bewirkt eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von *Hoechst 33342*. Die größte Wirkung zeigen *PSC 833* ($\text{EC}_{50} = 58 \pm 13 \mu\text{M}$) und *Cyclosporin A* ($\text{EC}_{50} = 70 \pm 6 \mu\text{M}$) gefolgt von *Fumitremorgin C* mit einem EC_{50} -Wert von $120 \pm 9 \mu\text{M}$.

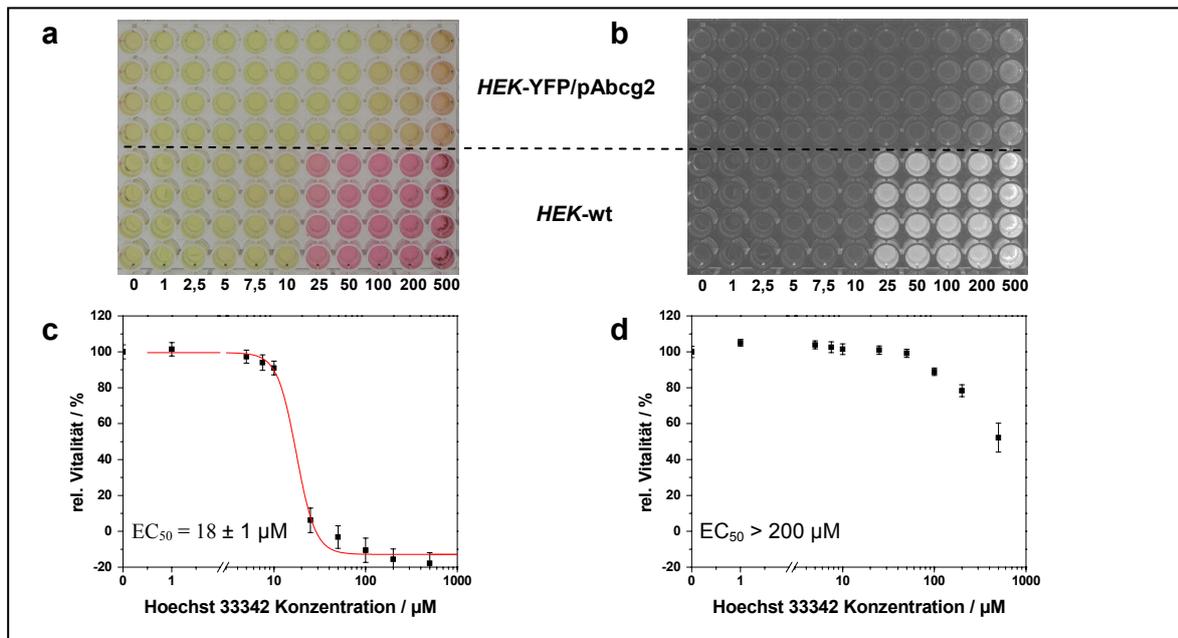


Abb. 3-31 Zytotoxizität von *Hoechst 33342* gegenüber *HEK*-YFP/pAbcg2- und *HEK*-wt-Zellen ($n = 4$). (a) Mediumfärbung in den 96-wells (Zahlwerte = *Hoechst 33342* Konzentration [μM]); (b) Graustufenbild für die Densitometrie (Magenta-Kanal); (c) Densitometrische Auswertung der Messung von *HEK*-YFP/pAbcg2-Zellen; (d) Densitometrische Auswertung der Messung von *HEK*-wt-Zellen

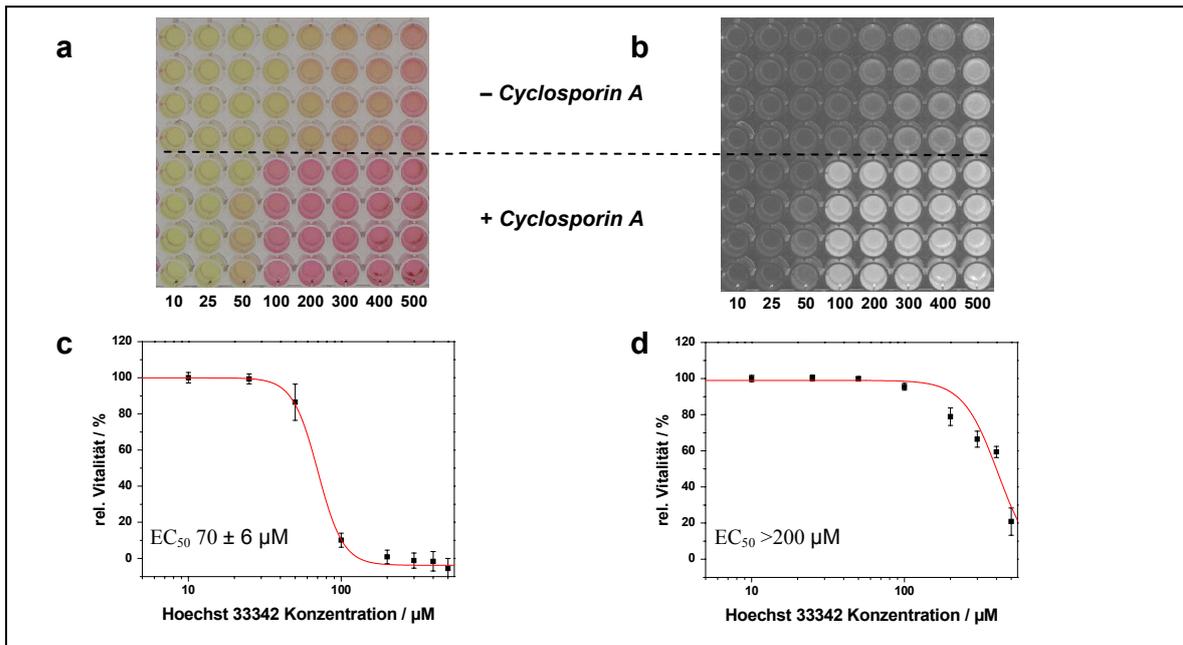


Abb. 3-32 Einfluss von 10 µM Cyclosporin A auf die Zytotoxizität von Hoechst 33342 in HEK-YFP/pAbcg2-Zellen (n = 4). (a) Mediumfärbung in den 96-wells (Zahlwerte = Hoechst 33342 Konzentration [µM]); (b) Graustufenbild für die Densitometrie (Magenta-Kanal); (c) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-YFP/pAbcg2-Zellen, die mit Cyclosporin A inkubiert wurden. (d) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-YFP/pAbcg2-Zellen, die ohne Cyclosporin A inkubiert wurden.

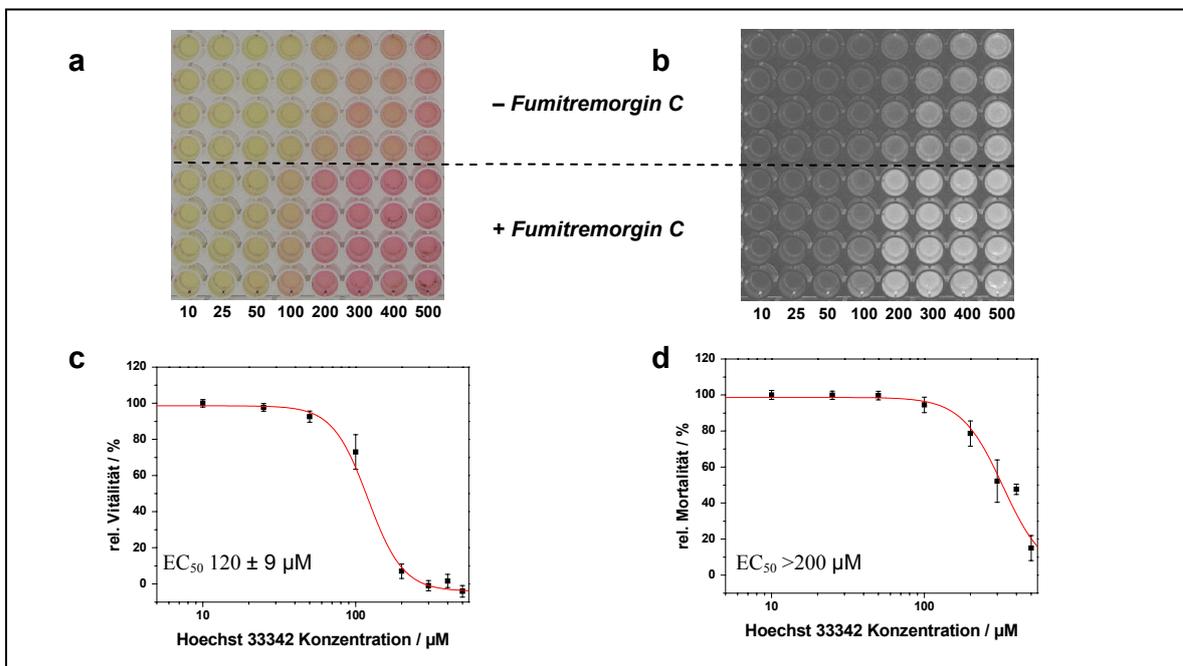


Abb. 3-33 Einfluss von 1 µM Fumitremorgin C auf die Zytotoxizität von Hoechst 33342 in HEK-YFP/pAbcg2-Zellen (n = 4). (a) Mediumfärbung in den 96-wells (Zahlwerte = Hoechst 33342 Konzentration [µM]); (b) Graustufenbild für die Densitometrie (Magenta-Kanal); (c) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-YFP/pAbcg2-Zellen, die mit Fumitremorgin C inkubiert wurden. (d) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-YFP/pAbcg2-Zellen, die ohne Fumitremorgin C inkubiert wurden.

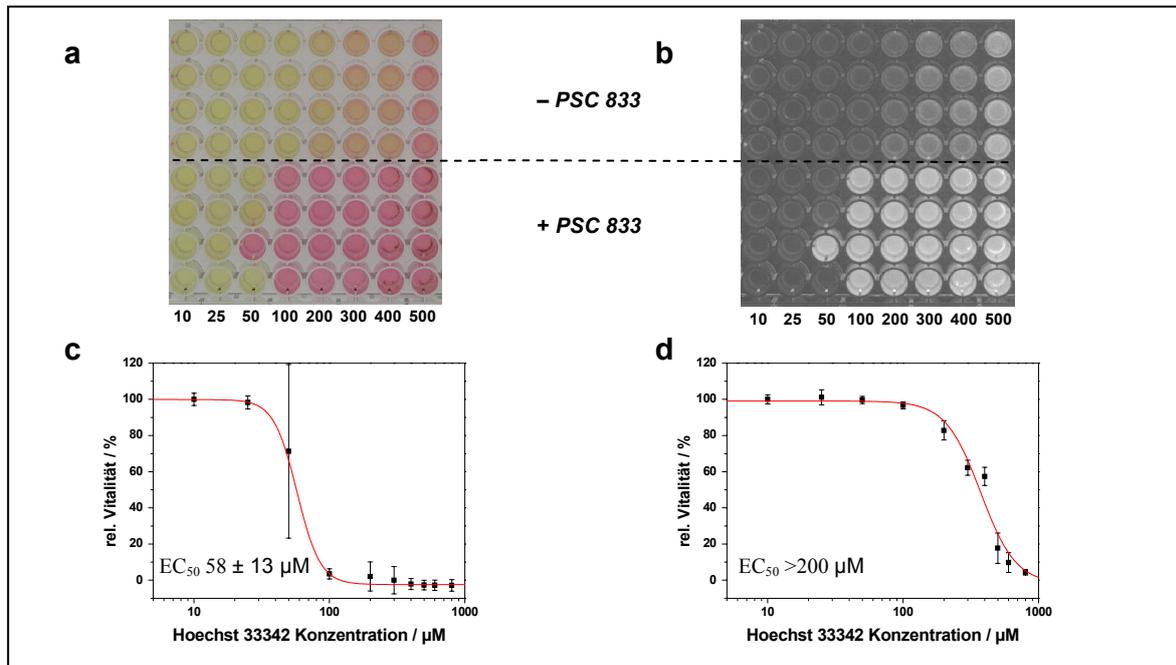


Abb. 3-34 Einfluss von 10 μM PSC 833 auf die Zytotoxizität von Hoechst 33342 in HEK-YFP/pAbcg2-Zellen ($n = 4$). (a) Mediumfärbung in den 96-wells (Zahlwerte = Hoechst 33342 Konzentration [μM]); (b) Graustufenbild für die Densitometrie (Magenta-Kanal); (c) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-YFP/pAbcg2-Zellen, die mit PSC 833 inkubiert wurden. (d) Densitometrische Auswertung der Messung von HEK-YFP/pAbcg2-Zellen, die ohne PSC 833 inkubiert wurden.

3.4.3.4. MDCK-YFP/ABCG2-Zellen

Sowohl die YFP/pAbcg2 (Abb. 3-35) als auch die YFP/hABCG2 (Abb. 3-36) exprimierenden MDCK-Zellen zeigen im Vergleich zu MDCK-wt-Zellen ($EC_{50} = 52 \pm 30 \mu\text{M}$, Abb. 3-35 e) eine erhöhte zytotoxische Toleranz gegenüber Hoechst 33342.

Auch bei extrem hohen Hoechst 33342-Konzentrationen konnte kein eindeutiger EC_{50} -Wert bestimmt werden (Abb. 3-35 c). Der zu erwartende EC_{50} -Wert liegt demnach oberhalb von 500 μM .

Die Zugabe von PSC 833 bewirkt im Fall der MDCK-wt Zellen eine Senkung des EC_{50} -Wertes auf 6 μM (Abb. 3-35 f, Abb. 3-36 c) zeigt aber keine Auswirkung auf die Vitalität der YFP/hABCG2- sowie YFP/pAbcg2-Zellen im Bereich bis 150 μM Hoechst 33342 (Abb. 3-35 d, Abb. 3-36 b).

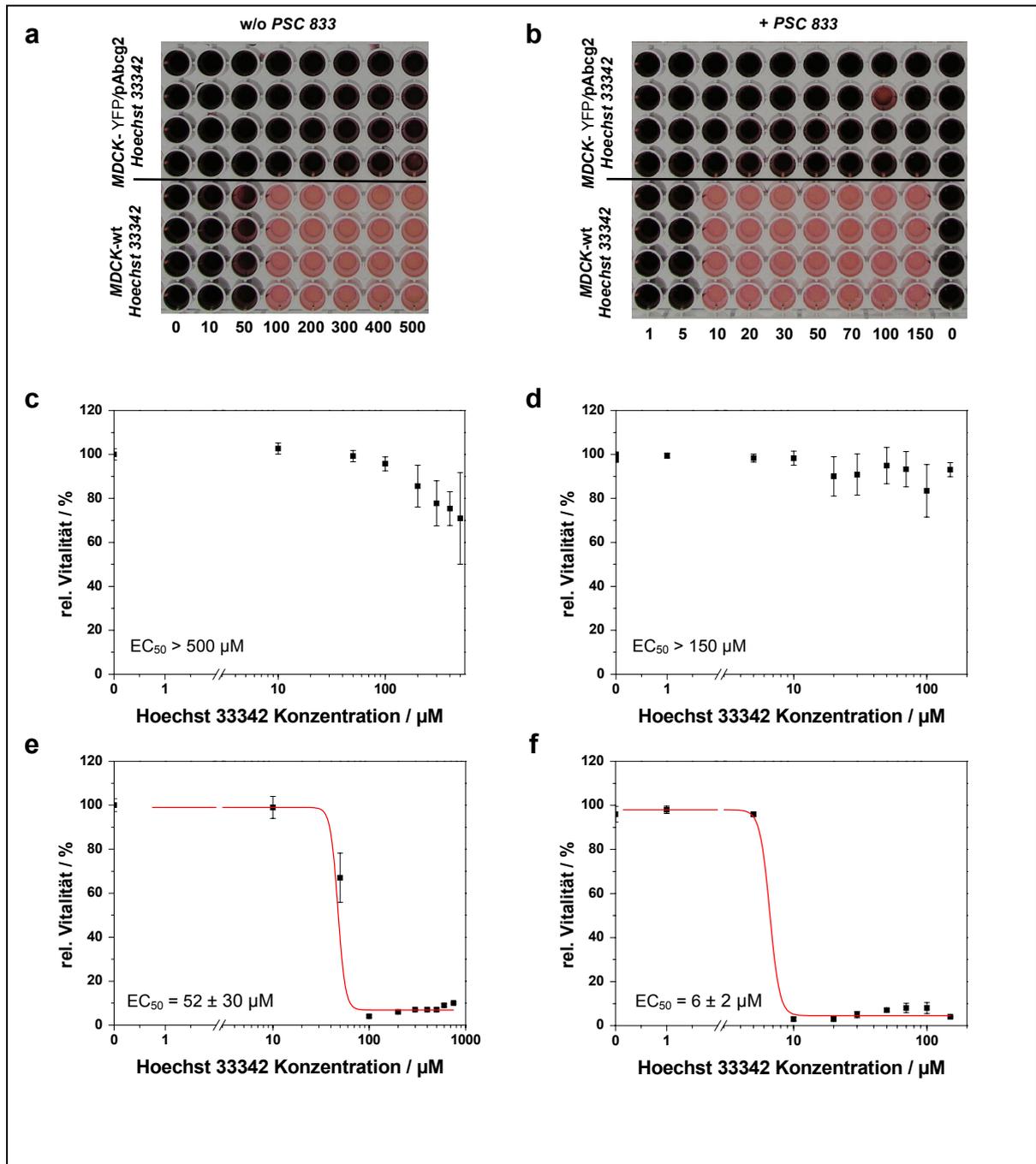


Abb. 3-35 Zytotoxizität von Hoechst 33342 auf MDCK-YFP/pAbcg2-Zellen und MDCK-wt-Zellen in An- und Abwesenheit von 10 μM PSC 833 nach 3-tägiger Inkubation. (a) u. (b) Mediumfärbung in den 96-wells nach MTS-Assay (Zahlwerte = Hoechst 33342 Konzentration [μM]), (c)-(f) Auswertung der Absorptionsmessung des MTS-Assays, (c) MDCK-YFP/pAbcg2-Zellen (w/o PSC 833), (d) MDCK-YFP/pAbcg2-Zellen (+ 10 μM PSC 833), (e) MDCK-wt-Zellen (w/o PSC 833), (f) MDCK-wt-Zellen (+ 10 μM PSC 833). Die Werte ohne Hoechst 33342 wurden als 100 %-Referenz verwendet.

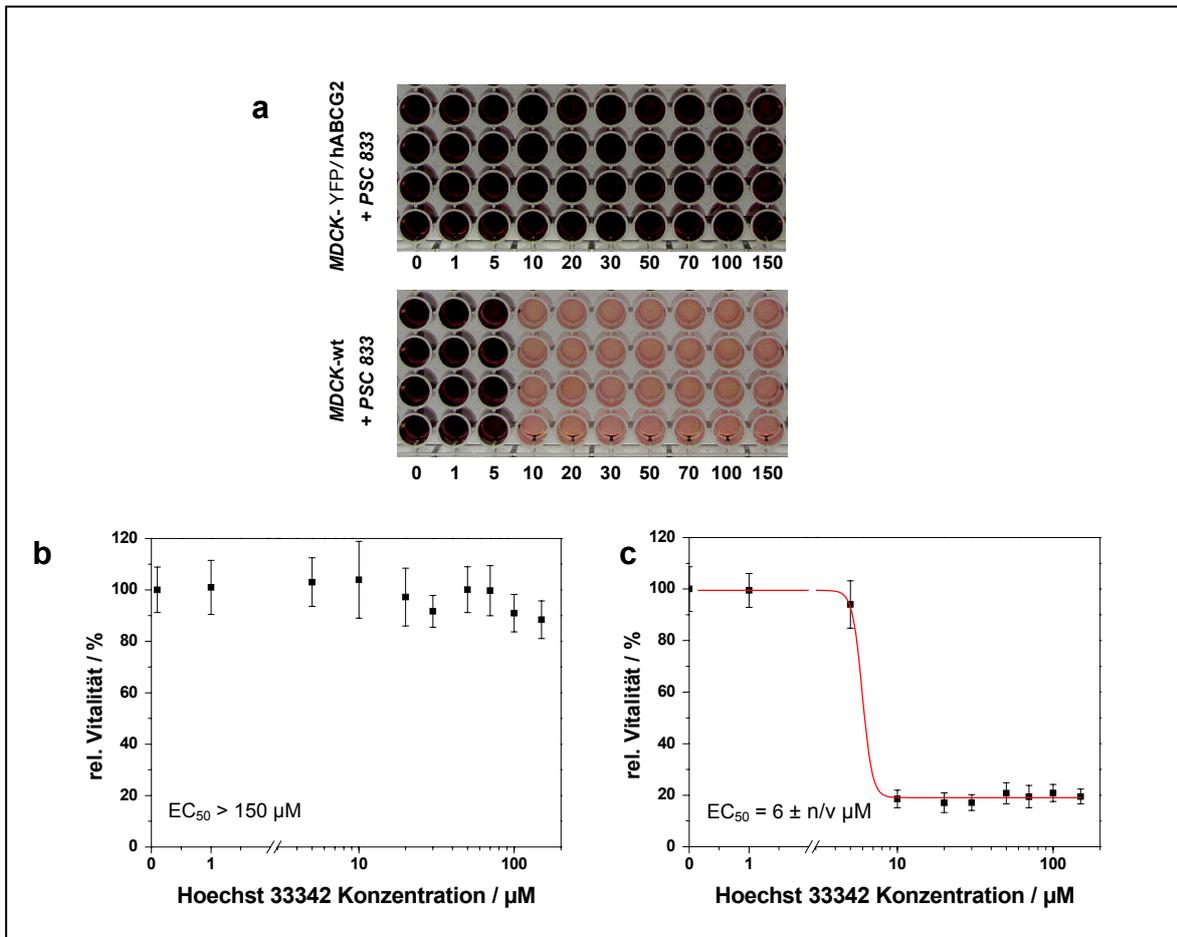


Abb. 3-36 Zytotoxizität von *Hoechst 33342* auf *MDCK-YFP/hABCG2*-Zellen und *MDCK-wt*-Zellen in Anwesenheit von 10 μM *PSC 833* nach 3-tägiger Inkubation (n = 4). (a) Mediumfärbung in den 96-wells nach *MTS*-Assay (Zahlwerte = *Hoechst 33342* Konzentration [μM]), (b), (c) Auswertung der Absorptionsmessung des *MTS*-Assays, (b) *MDCK-YFP/hABCG2*-Zellen (+ 10 μM *PSC 833*), (c) *MDCK-wt*-Zellen (+ 10 μM *PSC 833*). Die Werte ohne *Hoechst 33342* wurden als 100 %-Referenz verwendet.

3.4.4. Uptake Messungen an MDCK-YFP/pAbcg2 und HEK-YFP/pAbcg2-Zellen

In YFP/pAbcg2-exprimierenden MDCK- und HEK-Zellen wurden ergänzend zu den Zytotoxizitätstests Uptake-Messungen durchgeführt. Den Zellen wurde hierfür apikal 10 μ M Hoechst 33342 zugesetzt und die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von unterschiedlichen Modulatoren über 125 min aufgezeichnet (Kap. 2.3.2). Die Fluoreszenzintensität bei 465 nm korreliert hierbei mit der Aufnahme des Substrats Hoechst 33342 in die Zellen. Abb. 3-37 1a und 2a zeigen deutlich, dass im Laufe der Zeit wesentlich weniger Hoechst 33342 in den YFP/pAbcg2 überexprimierenden Zellen angereichert wird als in den pAbcg2 defizienten Kontroll-Zellen. Dies betrifft sowohl die untersuchten MDCK- als auch HEK-Zellen. Auch die Zugabe der Modulatoren/Inhibitoren Cyclosporin A, PSC 833, Fumitremorgin C und GF 120918 zeigt in beiden Zelltypen vergleichbare Effekte. Im Fall des GF 120918 führt die Zugabe des Inhibitors zu einem signifikanten inhibitorischen Effekt, der sich in der Annäherung der Kurvenverläufe von Kontrollzellen und Zellen, die den Transporter überexprimieren, äußert (Abb. 3-37 d).

Auffällig ist, dass die erreichten relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) von HEK- und MDCK-Kontroll-Zellen stark differieren. So erreichen die HEK-Zellen nach 125 min ca. 70 % der maximal möglichen Fluoreszenz (die prozentualen RFU-Werte beziehen sich auf die Hoechst 33342-Aufnahme nach Permeabilisierung der Zellmembran mittels Triton-X), wohingegen die MDCK-Zellen nur ca. 30 % erreichen. Demnach nehmen die HEK-Kontrollzellen Hoechst 33342 wesentlich effizienter auf als pAbcg2 defiziente MDCK-Zellen.

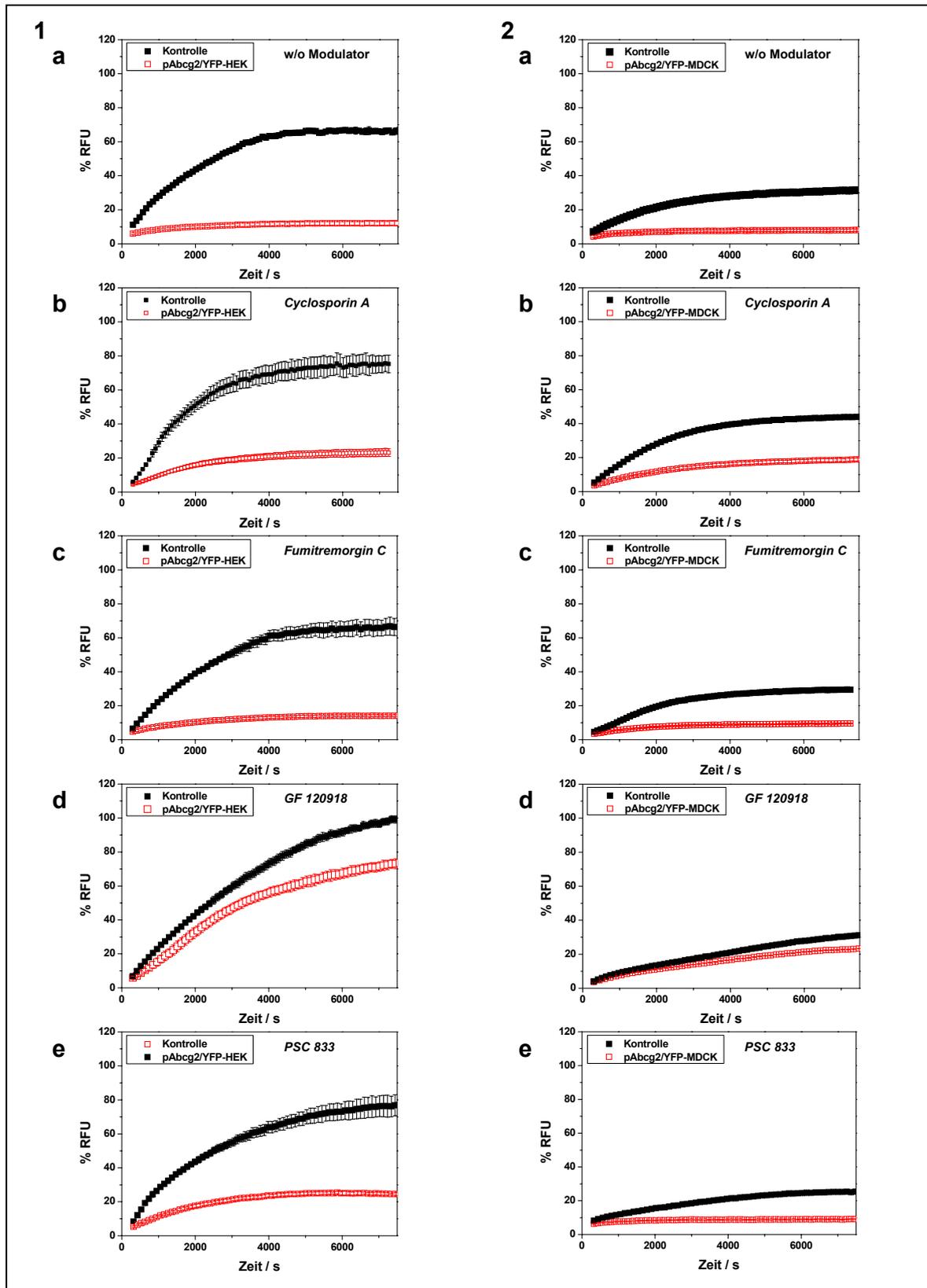


Abb. 3-37 Relative Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes *Hoechst 33342* (10 μ M) in (1) HEK-YFP/pAbcg2-Zellen und (2) MDCK-YFP/pAbcg2-Zellen (n=4) im Vergleich zu nicht pAbcg2 exprimierenden HEK bzw. MDCK-Zellen (Kontrolle). (a) w/o Modulator/Inhibitor; (b) 10 μ M Cyclosporin A; (c) 1 μ M Fumitremorgin C; (d) 1 μ M GF 120918 ; (e) 10 μ M PSC 833

4. Diskussion

Die Aufnahme von Arzneistoffen ins Zentrale Nervensystem (ZNS) wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Einen bedeutenden regulativen Beitrag leisten in diesem Zusammenhang die an der Blut-Hirn- (BHS) und Blut-Liquor-Schranke (BLS) vorhandenen so genannten *multidrug resistance*-(MDR)-Transporter.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde speziell ein Vertreter der an der porcinen BHS lokalisierten MDR-Transporter, das so genannte porcine Abcg2 (pAbcg2), untersucht.

Dieser wurde zuerst von EISENBLÄTTER et al. (2002; 2003) in *PBCEC* entdeckt und beschrieben. Bereits in vorangegangenen Arbeiten (DREES, 2004; HOLLNACK, 2005) wurde die funktionelle Bedeutung des pAbcg2 im Kontext der BHS des Schweins erforscht. Es stellte sich heraus, dass sich eine eindeutige funktionelle Charakterisierung des Transporters in kultivierten *PBCEC* (vgl. Kap. 2.1.2), einem *in vitro* Modell der porcinen BHS, durch rein kombinatorischen Einsatz von potentiellen pAbcg2 Substraten und Inhibitoren als äußerst problematisch erwies (HOLLNACK, 2005). Der Grund für diese Schwierigkeiten liegt in dem komplexen Aufbau der durch Endothelzellen gebildeten MDR vermittelnden Barriere. Diese Komplexität äußert sich in dem Vorhandensein einer breiten Palette von Transportern mit sich überlagernden Substrat- und Inhibitor-Spektren (KUSUHARA und SUGIYAMA, 2005; LÖSCHER und POTSCHKA, 2005).

Die vorliegende Arbeit widmete sich der Aufgabe, Untersuchungssysteme zu entwickeln, um die bisher unzureichende funktionelle Charakterisierung des in *PBCEC* exprimierten porcinen Abcg2 zu ermöglichen. Die zwei dabei verfolgten Ansätze, die Expressionsinhibierung (*knockdown*) des Abcg2-Transporters mittels RNA-Interferenz in *PBCEC* und die selektive Überexpression des Transporters in stabil transfizierten Zelllinien, dienten dabei der Generierung von Zellsystemen, in denen der pAbcg2-Transporter gegenüber nicht modifizierten *PBCEC* funktionell deutlicher in Erscheinung tritt. Darüber hinaus wurden weiterführende Untersuchungen an *PBCEC* im Hinblick auf die Regulation der pAbcg2-Expression durchgeführt, mit deren Diskussion im Folgenden begonnen wird.

4.1. Regulation/Induktion der Abcg2-Expression in PBCEC

In Anbetracht der Bedeutung des durch *MDR*-Proteine vermittelten Schutzes von wichtigen Geweben bzw. Organen wie dem Gehirn vor endogenen oder exogenen zelltoxisch wirkenden Substanzen, ist es wichtig die Mechanismen zu untersuchen, durch die diese Transporter reguliert werden. Über das Verständnis dieser Regulation lassen sich im Fall von Erkrankungen ggf. Ansatzpunkte für therapeutische Maßnahmen finden. Insbesondere wurden in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte erzielt, die das Verständnis über die transkriptionelle Regulation der *MDR*-Transporter erweitert haben.

Für das humane P-Gp (*MDR1*), dem bisher am besten untersuchten *MDR*-Transporter, ist nachgewiesen, dass seine Expression auf verschiedene Arten induziert werden kann. Zu diesen Induktoren gehören neben Hitze-Schock, Entzündung, Hypoxie, UV- und Röntgenstrahlung auch die Induktion mit Chemotherapeutika (SARKADI et al., 2006). Dass sich Arzneimittel und zellulärer Stress wahrscheinlich auch auf die Regulation der ABCG2-Expression auswirken, ist anzunehmen.

Die 48 h Inkubation von *PBCEC* mit verschiedenen aus der Literatur bekannten ABCG2- und P-Glycoprotein-(P-Gp)-Substraten bzw. Modulatoren (vgl. Kap. 3.1.1) führte nur im Fall des Glucocorticoids Hydrocortison zu einer deutlichen Induktion der ABCG2-Expression. Dass Hydrocortison einen induzierenden Effekt auf die Abcg2-Expression in *PBCEC* bewirkt, wurde bereits auf RNA und Protein-Ebene nachgewiesen (DREES et al., 2005; EISENBLÄTTER und GALLA, 2002). Darüber hinaus konnte in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass Hydrocortison einen TEER steigernden Effekt auf *PBCEC*-Monolayer ausübt und parallel die parazelluläre Permeabilität senkt (TEWES B., 1996).

Über welchen Signaltransduktionsmechanismus der Abcg2 Expressionsanstieg bewirkt wird, ist bisher unbekannt. Im Weiteren durchgeführte Experimente an *PBCEC* belegen allerdings erstmals (vgl. Kap. 3.1.4), dass die expressionsinduzierende Wirkung von Hydrocortison auf ABCG2 in *PBCEC* durch Zugabe des als Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten bekannten Mifepriston (RU486) kompensiert werden kann und demnach über einen vom Glucocorticoid-Rezeptor (GR) vermittelten Signaltransduktionsweg erfolgt. Es ist nachweisbar, dass der ligandenaktivierte GR die Expression von Genen auf verschiedenen Wegen beeinflusst. Dazu gehören transkriptionell aktivierende (Transaktivierung) und reprimierende Mechanismen (Transrepression), die über die direkte Bindung des GR an eine entsprechende positiv oder negativ expressionsregulierende DNA-Erkennungssequenz (*glucocorticoid response element, GRE*) oder durch Wechselwirkung mit anderen Transkriptionsfaktoren wie dem dimeren Aktivator Protein 1 (AP-1) oder dem nukleären Faktor- κ B (NF- κ B) bewirkt werden. Sequenzanalysen der humanen ABCG2-Promotorregion deuten auf kein *GRE* hin, zeigen allerdings wie auch beim humanen P-Gp

unter anderem Erkennungssequenzen für das AP-1 (BAILEY-DELL et al., 2001). Dass AP-1-Bindungselemente im humanen P-Gp-Promotor an der transkriptionellen Aktivierung beteiligt sein können, wurde nachgewiesen (DASCHNER et al., 1999). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ligandenaktivierte GR negativ und positiv auf die Expression von AP-1 untergeordneten Genen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des dimeren AP-1-Komplexes wirken.

Liegt ein heterodimerer c-Fos/c-Jun-AP-1-Komplex vor, wirkt dieser reprimierend auf Zielgene ein, während beim c-Jun-Homodimer ein expressionsaktivierender Effekt nachgewiesen werden kann (TEURICH und ANGEL, 1995). Dies zeigt, dass eine GR vermittelte Aktivierung von Genen nicht abhängig ist von GR-Bindungssequenzen im Promotor, sondern auch über die DNA-Bindungsdomäne von AP-1 vermittelt werden kann und auch AP-1 abhängige Gene möglicherweise von Steroidhormonen wie Hydrocortison aktiviert werden können.

Im Gegensatz zum porcinen *Abcg2* zeigt beim porcinen P-Gp (pP-Gp) keine der gewählten Substanzen, von denen bis auf *Lysotracker Green* alle schon als P-Gp-Substrate beschrieben worden sind, einen signifikanten pP-Gp-expressionsinduzierenden Effekt, obwohl nachweisbar ist, dass Substrate von *MDR*-Transportern, u. a. Chemotherapeutika, Einfluss auf die Expression von *MDR*-Transportern insbesondere P-Gp nehmen können. So zeigte CHAUDHARY (CHAUDHARY und RONINSON, 1993) in K562-Zellen, einer Leukämie-Zelllinie, dass die *P-Gp*-Expression durch *Doxorubicin*, *Daunorubicin*, *Vinblastin*, *Etoposide* und *Methotrexat* auf mRNA-Ebene induzierbar ist. In *DON*-Zellen, einer Subzelllinie von *CHO* (*Chinese hamster ovary*)-Zellen, wurde nach kurzzeitiger Inkubation mit *Mito-xantron* eine vierfache Erhöhung der *Abcg2* sowie eine 1,8-fache *P-Gp*-mRNA-Menge nachgewiesen (NIETH und LAGE, 2005). In Bezug auf die transkriptionelle Regulation von ABC-Transportern haben unter diesem Gesichtspunkt in den vergangenen Jahren insbesondere die so genannten verwaisten Kernrezeptoren (*orphan nuclear receptors*) an Bedeutung gewonnen. So fungieren PXR/SXR (Pregnan X Rezeptor/Steroid und Xenobiotika Rezeptor), CAR (konstitutiver Androstan Rezeptor) und FXR (Farnesoid X Rezeptor) als spezifische Sensoren für Xenobiotika und wirken hierüber regulativ auf einige Proteine, die an der Detoxifizierung und Ausschleusung von Xenobiotika beteiligt sind. Auch Hydrocortison wird ein PXR-aktivierender Effekt zugeschrieben (BERTILSSON et al., 1998; BLUMBERG et al., 1998). BAUER et al. (2004) konnten nachweisen, dass PXR in *BCEC* der Ratte exprimiert wird und dort durch den PXR-Liganden Dexamethason, einem künstlichen Glucocorticoid, die *P-Gp*-Expression induziert. Sowohl Dexamethason als auch Hydrocortison wurden als P-Gp-Substrate beschrieben (SCHINKEL et al., 1995; UHR et al., 2002). Im Gegensatz zu *ABCG2* lässt sich allerdings beim Hydrocortison wie oben beschrieben keine P-Gp expressionsinduzierende Wirkung in *PBCEC* finden.

Ob die in *PBCEC* durch Hydrocortison induzierte *Abcg2*-Expression auch zu einer potentiell höheren Transportleistung beiträgt, wurde nicht direkt untersucht. Experimente zur apikalen Oberflächenexpression von *pAbcg2* mittels Biotinylierung zeigten allerdings erstmals eine deutliche Zunahme der Transportermenge in der apikalen Zellmembran von *PBCEC* unter Hydrocortison-Einfluss (vgl. Kap. 3.1.2). Eine höhere Anzahl von Transportern in der Zellmembran lässt auch ein gesteigertes Transportvermögen sehr glaubhaft erscheinen. Für einen direkten Beweis sind allerdings Transportversuche an *PBCEC* in Abhängigkeit von der Hydrocortisonzugabe nötig.

In diesem Zusammenhang und im Hinblick auf die weitere Charakterisierung des Zellkulturmodells der *PBCEC* wäre auch der Frage nach dem Einfluss des Serums auf die Transportleistung nachzugehen, da die Qualität des verwendeten Zellkulturmodells der *PBCEC* in Bezug auf die *in vivo* Situation ausschlaggebend von dem Serum-Entzug und der Zugabe von Hydrocortison beeinflusst wird. Hohe TEER und geringe Permeabilitäten, wie sie unter physiologischen Bedingungen charakteristisch für die *in vivo* Situation sind, werden im *in vitro* Modell der BHS durch serumfreie Bedingungen und Zugabe von Hydrocortison maximiert. Dass diese Bedingungen auch das *pAbcg2*-Expressionsverhalten charakterisieren, zeigen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an *PBCEC*, in denen belegt wird, dass Serum Einfluss auf die hydrocortisoninduzierte *pAbcg2*-Expression nimmt. So steigt die Transportermenge unter serumfreien und serumhaltigen Bedingungen mit zunehmender Hydrocortison-Konzentration an (s. Abb. 3-3). Unter serumfreien Bedingungen werden allerdings insgesamt stärkere Expressionswerte erreicht. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte in der Tatsache begründet liegen, dass Hydrocortison im Blut zu 90-95 % an Serumbestandteile gebunden ist. Ca. 80 % binden hoch affin an das spezifische Transportprotein "*cortisol binding protein*" und ca. 10-15 % niedrig affin an Albumin (ALTMAYER, 2005). Die Konzentration an "freiem" Hydrocortison ist demnach unter serumhaltigen Bedingungen minimiert, wodurch für eine Sättigung der Rezeptor-(GR)-Bindungsstellen eine höhere Hydrocortisonkonzentration nötig ist. Diese Gegebenheit erklärt auch, warum unter serumfreien Bedingungen bereits bei einer Konzentration von 550 nM Hydrocortison im Medium eine Sättigung des expressionsinduzierenden Effekts sichtbar ist, wohingegen unter den serumhaltigen Bedingungen diese Sättigung nicht bestimmbar ist (vgl. Kap. 3.1.3).

4.2. Expressionsinhibierung von ABCG2 durch RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein Phänomen, das, durch doppelsträngige RNA (dsRNA) vermittelt, auf potente und spezifische Weise die Expression von Genen inhibieren kann. Für die Entdeckung der RNAi in der Nematode, *Caenorhabditis elegans*, erhielten ANDREW FIRE und CRAIG MELLO Ende 2006 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Bei dem Mechanismus der RNAi handelt es sich um ein weit verbreitetes natürliches Phänomen, dessen genregulatorische Applikation allerdings bei Säugern Schwierigkeiten verursacht. Während lange dsRNA in anderen Organismen entsprechend der RNAi die Inaktivierung von sequenzhomologer mRNA bewirkt, initiiert RNAi in Säugern eine unerwünschte Immunantwort durch Aktivierung von Interferon abhängigen Stoffwechselwegen, die ihrerseits für eine unspezifische Inhibition der Proteintranslation führen. Erst die Entdeckung, dass der RNAi-Apparat speziesübergreifende Gemeinsamkeiten besitzt und die Degradierung von mRNAs über die Bildung von so genannten kleinen dsRNAs (*small interfering RNAs*, siRNA) vermittelt wird (TUSCHL et al., 1999; ZAMORE et al., 2000), ermöglichte die Anwendung beim Säuger. Die Applikation dieser 21-23 nt langen siRNAs sorgt nämlich auch in Säugerzellen für eine Zerstörung von mRNAs mit entsprechend homologen Sequenzbereichen ohne Interferon-Antwort und deren Folgen (ELBASHIR et al., 2001a). Der Mechanismus, nachdem exogen zugefügte siRNA homologe mRNA degradiert, verläuft über die Assemblierung der siRNA mit einem Protein-Komplex, der *RISC* genannt wird (*RNA-induced silencing complex*). Die Inkorporierung eines der beiden RNA-Stränge in den *RISC* führt zu einem aktivierten Komplex, der auf Basis der gebundenen einzelsträngigen RNA (*guide RNA*) komplementäre mRNAs findet, schneidet und der Degradation durch zelleigene Mechanismen zugänglich macht (vgl. Kap. 1.6). Dass dieser Mechanismus auch zur Inhibition von Transporterproteinen und im Speziellen *MDR*-Proteinen in Säugerzellen erfolgreich einsetzbar ist, belegen eine Vielzahl von Studien (CELIUS et al., 2004; DREES, 2004; LOGASHENKO et al., 2004; NIETH et al., 2003).

4.2.1. Expressionsinhibierung von ABCG2 durch Transfektion von siRNA

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur ABCG2-Expressionshemmung mittels der RNA-Interferenz sind diskrepant (vgl. Kap. 3.2.1). Die grundsätzliche Effektivität dieser relativ neuen Methode bestätigt die erfolgreich durchgeführte Expressionsinhibierung der Kern-Intermediärfilamente Lamin A und C durch siRNA-Oligonukleotide in *Caco-2* Zellen (vgl. Abb. 3-6). Es zeigte sich, dass bereits geringe siRNA-

Konzentrationen (60 pmol/well (6-well)) zu einer Expressionsinhibierung des Zielgens (Lamin) in *Caco-2*-Zellen führen. Höhere Konzentrationen und die Variation der siRNA/Transfektionsreagenz-Relation bewirken einen maximalen Inhibierungseffekt von ca. 90 %. Diese positiven Ergebnisse lassen sich allerdings nicht auf *PBCEC* übertragen. Unter den gewählten Bedingungen zeigen die für die Degradierung von *pAbcg2*-mRNA ausgewählten siRNAs keinen inhibitorischen Effekt auf die mRNA-Expression des Transporters (vgl. Abb. 3-7). Dass die Transfektion von primären Zellkulturen wie den *PBCEC* generell ein Problem darstellt, ist bekannt. Viele Transfektionsmethoden, die sich für Zelllinien als effizient erweisen, zeigen an Primärkulturmodellen nur wenig Erfolg (HAMM et al., 2002). Die hierauf durchgeführte Überprüfung der Transfektionseffizienz von *PBCEC* mit Hilfe von fluoresceinmarkierten Oligonukleotiden zeigt allerdings auf, dass über 95 % der Zellen Oligonukleotide aufnehmen und verstärkt im Nukleus anreichern (vgl. Abb. 3-8). Die dabei auftretende Akkumulation der fluoreszierenden RNA-Duplexe im Zellkern ist kein untypisches Verhalten, sondern wird auch bei Mikroinjektion von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden in das Zytoplasma von Zellen beobachtet (FISHER et al., 1993). Da die fluoresceinmarkierten, doppelsträngigen Oligonukleotide in ihrer Länge und Ladung laut Hersteller Standard-siRNAs entsprechen, ist davon auszugehen, dass siRNA in ähnlicher Effizienz von *PBCEC* aufgenommen wird. Aus diesem Grund wurde mit weiteren vier verschiedenen siRNAs versucht, die Transporter-Expression in *pAbcg2*-überexprimierenden *HEK*-Zellen (*HEK-pAbcg2*) zu inhibieren.

Anders als erwartet zeigte sich allerdings auch unter optimierten Bedingungen nur eine mäßige Inhibition der *pAbcg2*-Expression (vgl. Abb. 3-9), was den Schluss nahe legt, dass entweder die verwendeten siRNA-Duplexe hinsichtlich ihrer Sequenz nicht zu einer optimalen Repression des Transporters befähigt sind oder aber ihre Ausgangsqualität nicht hinreichend ist. Dass siRNAs sequenzabhängig sehr unterschiedliche Repressionseffizienzen besitzen, ist bekannt (HOLEN et al., 2002). Von den siRNAs, deren Sequenzen innerhalb des gleichen Gens liegt, hat ein Großteil einen mäßigen, geringen oder keinen Effekt auf die Expression des Zielgens. In den seltensten Fällen wird die Bildung des Zielproteins zu 100 % inhibiert (CAPLEN, 2003). Durch Auswahl zum größten Teil empirisch gewonnener Daten konnten Auswahlkriterien bezüglich möglichst effizienter siRNA-Duplexe erstellt werden (AMARZGUIQUI und PRYDZ, 2004; ELBASHIR et al., 2001b; HOHJOH, 2004; REYNOLDS et al., 2004), die Rücksicht auf Länge, GC-Gehalt, Sequenzwiederholungen und Asymmetrien in der 5'-3'-Verteilung von Adenin und Uracil im Sinn-Strang der siRNAs nehmen (vgl. Kap. 2.2.2.2). Aufgrund welcher molekularen Wechselwirkungen diese Kriterien allerdings Einfluss auf die Effizienz der Inhibierung nehmen, ist noch Gegenstand der Forschung. Analysen zeigen, dass die thermodynamische Stabilität der RNA-Duplexe an ihren Enden darüber bestimmt, welcher Strang im *RISC* inkorporiert und als Suchvorla-

ge zur Erkennung von Ziel-mRNAs dient. Da bei der Auswahl der eingesetzten siRNA-Duplexe auf die oben erwähnten Auswahlkriterien geachtet wurde und vier verschiedene siRNAs eingesetzt wurden, ist der mäßige Erfolg in *HEK*-Zellen vielleicht doch auf eine unzureichende Qualität der Ausgangs siRNAs zurückzuführen. Unterstützt wird diese These durch die erfolgreiche Inhibierung der rAbcg2-Expression in *HEK* und TR-BBB13-Zellen, einer immortalisierten *BCEC*-Zelllinie aus der Ratte (HORI et al., 2005). Auch hier wurden siRNA-Duplexe und *Lipofectamin* als Transfektionsreagenz verwendet. In den *HEK*-Zellen wurde mit einer der verwendeten siRNAs eine Suppression auf Proteinebene von nahezu 100 % erreicht. Allerdings bezieht sich dieser Wert im Unterschied zu den hier durchgeführten Studien auf die Inhibierung eines myc-rAbcg2-cDNA-Genprodukts, das mit der siRNA in Form eines Vektors (pCMV-Tag3A/rAbcg2) cotransfiziert wurde. In TR-BBB13-Zellen, die endogen rAbcg2 exprimieren, sind deutlich geringere Inhibierungseffekte auf Proteinebene zu erzielen.

4.2.2. Vektor-Transfektion von *PBCEC*

Neben den Versuchen, mittels siRNA-Oligonukleotiden die Expression von Abcg2 in *PBCEC* zu inhibieren, wurde der Frage nachgegangen, ob auch die Transfektion von shRNA (*small hairpin*)-bildenden Vektorkonstrukten eine geeignete Methode darstellen, RNAi in *PBCEC* auszulösen.

Der Vorteil von Vektoren als Vehikel für RNAi vermittelte Suppression von Genprodukten liegt vor allem darin begründet, dass, wenn sie einmal hergestellt sind, eine leichte Vermehrung im Labor möglich ist und damit eine kostengünstige Alternative zu den siRNA-Duplexen besteht. Des Weiteren bieten sie die Möglichkeit, stabil exprimierende Zelllinien herzustellen, in denen bestimmte Gene dauerhaft supprimiert werden. Zudem besteht die Möglichkeit, entsprechende Vektoren, neben den klassischen physikalischen Gentransfermethoden, über zumeist effizientere virale Transfektionssysteme in die Zielzellen einzuführen.

Von entscheidender Bedeutung für die Auswertung der hervorgerufenen Transporterinhinderung ist dabei, dass möglichst viele Zellen RNAi vermittelnde Vektorkonstrukte aufnehmen und exprimieren. Nur eine hohe Transfektionsrate kann eine spätere funktionelle Charakterisierung des pAbcg2-Transporters ermöglichen. Dies trifft umso mehr zu, als auch bei positiv transfizierten Zellen von keiner vollständigen Repression des Zielgens auszugehen ist.

Zur Überprüfung dieser Transfizierbarkeit wurden *PBCEC* unter Verwendung von verschiedenen Methoden mit GFP exprimierenden Vektorkonstrukten transfiziert (vgl. Kap. 3.2.2).

Die Ergebnisse dieser Studien sind ernüchternd. Mit keiner der gewählten Methoden ließ sich eine Transfektionseffizienz von mehr als 20 % erreichen. Den geringsten Erfolg wiesen die klassische Kalziumphosphat-Kopräzipitation und die Transfektion mittels *Lipofectamin 2000* auf. Dass sich bei der Transfektion von primären Zellkulturen die klassischen Transfektionsmethoden oft als ineffizient erweisen, wurde bereits erwähnt (HAMM et al., 2002). Auffällig ist allerdings, dass im Vergleich zu der *LipofectamineTM Plus*-Transfektion von fluoresceinmarkierten dsRNA-Duplexen, bei der in über 95 % der Zellen ein Fluoreszenzsignal zu detektieren war (vgl. Abb. 3-8), die Transfektion des GFP-Vektors nur zu einigen wenigen positiven Transformanten führte. Dass der enorme Größenunterschied zwischen dsRNA und Vektor ausschlaggebend für diese Resultate ist, lässt sich vermuten. Transfektionsexperimente mit kationischen Lipiden belegen zumindest eine deutliche Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Größe der transfizierten DNA (KREISS et al., 1999; YIN et al., 2005). Darüber hinaus muss berücksichtigt werden, dass für ein positives Transfektionsergebnis in den betrachteten Fällen unterschiedliche Voraussetzungen erfüllt sein müssen. Bei den fluoresceinmarkierten dsRNA-Duplexen ist die Aufnahme der Oligonukleotide hinreichende Bedingung für die Detektion eines erfolgreichen Transfektionsergebnisses, wohingegen im Fall eines GFP exprimierenden Vektors die Aufnahme des Vektors zwar notwendig, aber nicht hinreichend für die Expression des Markergens ist.

Die größte Transfektionsrate (~ 20 %) wurde mit Hilfe der *Nukleofektion* erreicht (vgl. Kap. 3.2.2.2). Bei dieser Methode wird die DNA durch Elektroporation direkt in den Nukleus der Zielzellen transferiert. Dabei werden neben den elektrischen Impulsen Speziallösungen verwendet, die den Elektroporationsvorgang unterstützen. Besonders schwer transfizierbare primäre Zellen stehen im Fokus dieses Transfektionsverfahrens (HAMM et al., 2002). Die erhöhte Effizienz dieser Methode gegenüber Verfahren, die kationische Lipide verwenden ist belegt. So ließen sich primäre humane Melanozyten (PHM), glatte Muskelzellen (hcSMCs), Chondrozyten and humane mesenchymale Stammzellen (HMSCs) auf effiziente Weise mit GFP-exprimierenden Vektoren transfizieren. Die Transfektionsrate lag dabei zwischen 29 bis 45 % und damit erheblich höher als diejenige, die mit *LipofectamineTM Plus*, einem kationischen Lipid, erzielt wurde (HAMM et al., 2002). Letztere erlangte lediglich Werte zwischen 0 bis 2 % und ist damit vergleichbar mit den Ergebnissen aus den in dieser Arbeit erzielten Transfektionseffizienzen an *PBCEC* mittels Kalziumphosphat-Kopräzipitation und *Lipofectamin 2000*.

Die mit Hilfe der *Nukleofektion* erreichte relativ hohe Transfektionsrate wird allerdings mit einer für Elektroporationen nicht ungewöhnlichen hohen Zellsterblichkeit erkaufte. So steht

der Transfektionsrate von 20 % eine Mortalität von über 60 % gegenüber. Der mit dieser hohen Sterblichkeit einhergehende Zellverlust führt unter anderem zu einer zeitlichen Verzögerung in der Ausbildung von konfluenten Zellschichten, die notwendige Voraussetzung für die Etablierung des *in vitro* Kulturmodells der BHS ist. Die zeitliche Verzögerung stellt einen, gerade aufgrund der relativ schnell erfolgenden De-Differenzierung der *PBCEC* im Kulturverlauf, nicht hinnehmbaren Effekt dar. Die Auswirkung der nekrotischen oder apoptotischen Zellen und der durch sie freigesetzten Zellinhalte auf den Differenzierungsstatus sind dabei noch unberücksichtigt, tragen aber sicherlich nicht zu einer Entwicklung der Zellen bei, die die Qualität des Zellkulturmodells in Bezug auf die *in vivo* Situation positiv beeinflusst. Moderatere Elektroporationseinstellungen führen zwar zu weniger Zellverlusten (vgl. Abb. 3-11), bedingen aber auch eine erheblich geringere Transfektionsrate (~8 %). Eine derartige niedrige Transfektionseffizienz lässt keine funktionelle Charakterisierung von Transportern im *in vitro* Modell der *PBCEC* zu.

Eine Alternative zu den oben angesprochenen Methoden stellen virale Transfektionssysteme dar. Die Effizienz dieser Systeme liegt in der natürlichen, evolutiv ausgereiften Gentransfer-Potenz der Viren begründet und stellt die klassischen physikalischen Methoden zumeist in den Schatten. Entgegen den Erwartungen führen aber auch die Transduktionsversuche mit Adenoviren im Rahmen dieser Arbeit zu keiner wesentlich gesteigerten Gentransferleistung. Mit den verwendeten GFP-exprimierenden Adenoviren wird eine maximale Transduktionseffizienz von ca. 10 % erreicht (vgl. Abb. 3-12).

Studien an humanen Zellen belegen, dass wesentlich höhere Transduktionsraten in Endothelzellen möglich sind. So zeigen Experimente an *HUVEC*-Zellen (humanen Endothelzellen der Nabelschnur), dass durch Adenoviren in 98 % der Zellen die Expression von GFP transduzierbar ist (DE MARTIN et al., 1997).

DE MARTIN et al. (1997) berichten in ihrer Studie allerdings auch, dass erhebliche speziesabhängige Unterschiede in der Transduktionsfähigkeit der Adenoviren auftreten. So wird in porcinen im Vergleich zu humanen Endothelzellen eine ungefähr 10-fach geringere Transduktionseffizienz der adenoviralen Vektoren detektiert. Diese Befunde sind vergleichbar mit der Transduktionseffizienz der adenoviralen Vektoren in *PBCEC*. Möglicherweise ist der Grund für diese speziesabhängigen Unterschiede in Expressionsdifferenzen des sogenannten Cocksackie-Adenovirus-Rezeptors (CAR) zu finden. Der CAR ist ein Transmembranprotein, das für die effiziente Bindung der meisten Adenoviren-Serotypen an die Zelloberfläche notwendig ist. Studien belegen, dass die CAR Expression mit der Effizienz der Adenovirusvektor-Aufnahme korreliert (FECHNER et al., 2000; HIDAKA et al., 1999; KANER et al., 1999; WALTERS et al., 1999). Eventuell liegt in *PBCEC* unter den entsprechenden Kulturbedingungen kein oder nur wenig CAR vor, wodurch eine effiziente

Transduktion verhindert wird. Denkbar ist auch, dass CAR vorhanden, aber nicht genügend apikal lokalisiert ist, wodurch kultivierungsbedingt die Infizierung von der apikalen Seite ungünstig ist oder die Affinität der verwendeten Viren gegenüber dem CAR speziesabhängig variiert.

Daneben konnte konstatiert werden, dass die CAR-Expression zumindest in HUVEC-Zellen bei zunehmender Konfluenz ansteigt (Carson et al. 1999). Entsprechende kulturbedingte Expressionseinflüsse auf den CAR könnten auch in *PBCEC* möglich sein.

Es lässt sich festhalten, dass mit keiner der gewählten Methoden unter Berücksichtigung einer tolerierbaren Zellsterblichkeit eine Transfektionsrate von 10 % überschritten wurde. Dies ist für ein primäres Zellkulturmodell nicht untypisch, zeigt aber auch, dass die Generierung und Transfektion von shRNA-bildenden Vektorkonstrukten zur Inhibierung und funktionellen Charakterisierung des Abcg2-Transporters in *PBCEC* wenig erfolgreich sein dürfte. Dies trifft umso mehr zu, wenn berücksichtigt wird, dass isolationsbedingt die physiologische Schwankungsbreite einer Primärkultur, auch bezogen auf die Transporterzusammensetzung (nicht veröffentlichte im Arbeitskreis durchgeführte Untersuchungen), wesentlich größer ist als die einer Zelllinie. Hinzu kommt, dass auch ein erfolgreiches Transfektionsereignis RNAi induzierender Vektorkonstrukte erfahrungsbedingt nicht zu einer hundertprozentigen Expressionsinhibierung der Ziel-Proteine führt.

4.3. Generierung und Charakterisierung von ABCG2 exprimierenden Zelllinien

Abgesehen von den Versuchen, ABCG2 mittels der RNA-Interferenz-Methode in seiner Expression zu inhibieren, um Einsichten in die funktionelle Bedeutung dieses Transporters zu erlangen, wurden mit demselben Ziel verschiedene stabil ABCG2-exprimierende Zellsysteme generiert. Der Vorteil solcher Systeme liegt in der besseren Reproduzierbarkeit von Ergebnissen im Vergleich zur *PBCEC* Primärkultur, deren Zellen präparationsabhängige physiologische Unterschiede zeigen. Des Weiteren ist die Kultivierung und Vermehrung weniger kompliziert. Zu den gravierenden Nachteilen gehört die physiologische Entfernung von der Situation der Endothelzellen *in vivo*, die in Anbetracht der möglichen funktionellen Bedeutung eines Transporters entscheidend sein kann. Sofern das Ziel ist, lediglich Aussagen über potentiell vom Transporter akzeptierte Substrate oder inhibitorisch wirksame Substanzen zu erlangen, können solche Zellsysteme einen nützlichen Beitrag leisten.

Es wurden erfolgreich stabil ABCG2-exprimierende *HEK*- und *MDCK*-Zellen generiert und mittels immunochemischer Verfahren (Immunoblot und immunozytochemische Fär-

bung) hinsichtlich Größe, Glykosylierung und Lokalisation untersucht. Darüber hinaus wurden *Uptake* und Zytotoxizitätstests zur funktionellen Charakterisierung durchgeführt.

4.3.1. Western-Blot-Analysen und immunozytochemische Färbungen

Die durchgeführten Western-Blot-Analysen zeigen, dass ABCG2 in den generierten Zelllinien exprimiert wird (vgl. Kap. 3.4.2). Es ließen sich sowohl stabil pAbcg2 und hABCG2 exprimierende *HEK*-Zellen als auch YFP/pAbcg2 exprimierende *HEK*- und *MDCK*-Zellen nachweisen. Darüber hinaus wurde erfolgreich ein durch Tetracyclin-Derivate induzierbares pAbcg2-Expressionssystem in *HEK*-Zellen (*HEK*-TREx/pAbcg2) generiert. Das in den Expressionssystemen inserierte porcine und humane ABCG2 entspricht in seiner Sequenz den jeweiligen Wildtypen (vgl. Kap. 8.5). Eine Ausnahme bildet hierbei das porcine Abcg2 in Fusion mit EYFP (pAbcg2/pEYFP). In diesem Konstrukt liegt eine Mutation gegenüber dem porcinen Wildtyp an Position 564 vor (Pro564Leu). Anstelle von Prolin ist dort Leucin eingebaut.

Sowohl in pAbcg2 als auch in hABCG2 exprimierenden *HEK*- sowie *MDCK*-Zellen lassen sich monomere und höhermolekulare Formen des Transporters nachweisen. Außerdem zeigen die Untersuchungen in *HEK*- und *MDCK*-Zellen, dass hABCG2, pAbcg2, und YFP/pAbcg2 vorwiegend in glykosylierter Form in den stabil transfizierten Zellen vorliegt. Diese Ergebnisse decken sich sowohl mit den Befunden aus *PBCEC* (vgl. Abb. 3-17) als auch mit Studien an humanem ABCG2 (DIOP und HRYCYNA, 2005; HENRIKSEN et al., 2005; MOHRMANN et al., 2005) und deuten darauf hin, dass die stabil transfizierten Zellen den Transporter in einer potentiell funktionellen Weise exprimieren.

Es wird angenommen, dass das humane ABCG2 als sogenannter Halbtransporter in seiner aktiven Form in der Plasmamembran als Homodimer vorliegt, das über eine intermolekulare Cystein-Disulfidbrücke verknüpft ist. Es ist nicht auszuschließen, dass es auch zur Bildung von Oligomeren höherer Ordnung kommt (BHATIA et al., 2005; LITMAN et al., 2002; WAKABAYASHI et al., 2007). Folglich ist die Detektion von höhermolekularen Transporterformen ein erstes Indiz für die Existenz funktioneller Transporter.

Ob es sich bei den in *HEK*- und *MDCK*-Zellen detektierten höhermolekularen Proteinbanden um ABCG2-Dimere handelt, konnte aus der Größenbestimmung der Proteinproben aufgrund des durch die Glykosylierung veränderten Laufverhaltens nicht eindeutig bestimmt werden. Die durchgeführten Immunodetektionen deglykosylierter Proteinlysate deuten allerdings darauf hin, dass es sich bei den in *HEK*-pAbcg2 (vgl. Abb. 3-16) und *HEK*-TREx/pAbcg2 (vgl. Abb. 3-18) exprimierten höhermolekularen Transporterformen

um pAbcg2-Dimere handelt, da der ermittelte Größenunterschied zwischen dem Monomer und Oligomer unter diesen Bedingungen ungefähr den Faktor 2 beträgt.

Auffällig ist, dass das in *HEK*-Zellen überexprimierte deglykosylierte pAbcg2 in der SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen bei niedrigeren molekularen Massen detektiert wird als der humane Transporter, wohingegen das glykosylierte pAbcg2 ein scheinbar höheres Molekulargewicht besitzt als das glykosylierte humane Pendant (vgl. Abb. 3-16.)

Da zwischen pAbcg2 und hABCG2 lediglich eine Längendifferenz von einer Aminosäure besteht, ist nicht davon auszugehen, dass diese Divergenz wesentlichen Einfluss auf das Laufverhalten nimmt. Denkbar ist aber, dass die Sequenzunterschiede - zwischen humanem und porcinem ABCG2 besteht eine Sequenzsimilarität von 84 % - zu einer leicht veränderten Konformation und SDS-Bindungs-Affinität führen, wodurch die elektrophoretische Mobilität variiert wird. Es ist allerdings nicht ersichtlich, warum dieser Effekt beim glykosylierten hABCG2 zu einer Vergrößerung und beim glykosylierten Transporter zu einer Verringerung der Mobilität im Vergleich zum glykosylierten bzw. deglykosylierten porcinen Transporter führt.

Möglicherweise beruht das veränderte Laufverhalten auf einer verschiedenartigen Glykosylierung des humanen und porcinen Transporters. Sequenzanalysen des hABCG2 zeigen, dass drei potentielle extrazelluläre N-Glykosylierungsstellen vorhanden sind (vgl. Abb. 1-4). Ortsgerichtete Mutagenese-Experimente weisen allerdings darauf hin, dass nur eines dieser Asparagine, nämlich das N596, glykosyliert vorliegt (DIOP und HRYCYNA, 2005). Der porcine Transporter verfügt lediglich über zwei potentielle extrazelluläre N-Glykosylierungsstellen (vgl. Abb. 1-4). Ob beide Positionen glykosyliert werden oder möglicherweise auch hier nur das zum humanen homologe N596 glykosyliert vorliegt, ist nicht bekannt, könnte aber durch ortsgerechte Mutagenese-Experimente untersucht werden. Eventuell sind auch speziesabhängige Phosphorylierungsunterschiede an den variierenden Mobilitäten der Transporter beteiligt. Zumindest für das humane ABCG2 ist eine Phosphorylierungsstelle bekannt (Threonin 362), die Einfluss auf die Multimerbildung des Transporters nimmt (XIE et al., 2007) und auch zu einem veränderten Laufverhalten des Monomers führen könnte.

Der Vergleich zwischen den porcinen ABCG2 überexprimierenden *HEK*-Zellsystemen, *HEK*-pAbcg2 und *HEK*-TREx/pAbcg2, zeigt deutlich, dass beide generierten Zellsysteme den porcinen Transporter in einer, bezogen auf Oligomerisierung und Glykosylierung, vergleichbaren Art und Weise bilden. Der Vorteil des induzierbaren TREx-Systems liegt dabei vor allem darin begründet, dass in Untersuchungen, in denen ABCG2 exprimierende Zellen mit ABCG2 defizienten Kontroll-Zellen verglichen werden sollen (z.B. Zytotoxizitätsmessungen und *Uptake*-Messungen), mit demselben Zellklon gearbeitet werden kann.

Hierbei unterscheiden sich die Untersuchungsbedingungen lediglich in der Zugabe des Induktors (Doxycyclin) und klonale Unterschiede, die möglicherweise über die gewollte reine Expression des Transporters hinausgehen, können unberücksichtigt bleiben.

Es konnte gezeigt werden, dass die maximale Induktivität der pAbcg2-Expression in den generierten *HEK*-TREx/pAbcg2-Zellen bei der standardmäßig verwendeten Konzentration von 2 μ M Doxycyclin erreicht ist. Zudem belegen die Untersuchungen mit einigen in der Literatur bekannten potentiellen Substraten und Inhibitoren/Modulatoren des Transporters, die zum Teil strukturelle Ähnlichkeit zu Doxycyclin besitzen, dass die Induktion der Expression für Doxycyclin spezifisch ist und nicht durch die verwendeten Substanzen stimuliert wird. Die Bildung des Transporters in zeitlicher Abhängigkeit zur Doxycyclin-Zugabe verdeutlicht auf besondere Weise den Bildungsweg des Proteins von einer nicht glykosylierten Core-Form zu einer glykosylierten Form. Dabei ist festzuhalten, dass erst drei Tage nach Induktor-Zugabe eine stabile Menge glykosylierten Transporters in den Zellen nachweisbar ist. Diese Zeit ist bei der Durchführung etwaiger Experimente zu berücksichtigen, da erst zu diesem Zeitpunkt von einer zeitlich stabilen Transportermenge in den Zellen auszugehen ist.

Die hinsichtlich einer potentiellen Funktionalität der Transporter ermittelten positiven Ergebnisse zu Größe, Oligomerisierungsfähigkeit und Glykosylierungsverhalten im Western-Blot werden durch die immunozytochemischen Untersuchungen bekräftigt. Diese zeigen deutlich, dass die Transporter vornehmlich in der Plasmamembran der generierten Zelllinien lokalisieren (vgl. Kap. 3.4.1). Dies trifft sowohl für das in *HEK*-Zellen überexprimierete pAbcg2 und YFP/pAbcg2 als auch für die in *MDCK*-Zellen exprimierte YFP/hABCG2- und YFP/pAbcg2-Fusionsproteinkonstrukte zu. Die Membranständigkeit ist im Hinblick auf die physiologische Bedeutung des Transporters als ATP-abhängige *MDR*-Exporter-Pumpe sinnvoll und für hABCG2 und pAbcg2 analog. Die Zellmembranlokalisation ist vergleichbar mit den Befunden aus Untersuchungen menschlicher Gewebe (MALIEPAARD et al., 2001a) und entspricht auch den Beobachtungen, die im Zellkulturmodell der porcinen BHS gemacht wurden (DREES, 2004). Darüber hinaus stimmt sie mit den Resultaten aus literaturbekannten transfizierten oder über Substrat-Selektion generierten hABCG2 überexprimierenden Zellsystemen überein (MITOMO et al., 2003; SCHEFFER et al., 2000; XIA et al., 2005). Zudem zeigen die *CLSM*-Aufnahmen von Zellen, die mit YFP/ABCG2-Fusionsproteinkonstrukten stabil transfiziert worden sind (vgl. Kap. 3.4.1.2), dass bei den barrierebildenden *MDCK*-Zellen im Gegensatz zu *HEK*-Zellen eine deutliche apikale Membranständigkeit des porcinen und humanen Transporters vorliegt. Diese ist vergleichbar zu der Lokalisation von ABCG2 in humanen, porcinen und murinen zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen (COORAY et al., 2002; LEE et al., 2006; TACHIKAWA et

al., 2005) (DREES, 2004). Es lässt sich folgern, dass ein N-terminal fusioniertes YFP demzufolge keinen Einfluss auf die apikale Lokalisation des Transporters in *MDCK*-Zellen hat. Darüber hinaus zeigen diese Untersuchungen auch, dass die Aminosäuremutation an Position 564 (Pro564Leu) in YFP/pAbcg2-stabil transfizierten Zellen keinen lokalisationsbestimmenden Einfluss nimmt.

Studien an LLC-PK1-Zellen zeigen vergleichbare Ergebnisse. In Zellen, die mit einem Vektorkonstrukt, das aus ABCG2 und einem N-terminalen EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) besteht, transfiziert wurden, lokalisiert das exprimierte Fusionsprotein in der apikalen Membran (IMAI et al., 2003). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die aus Western-Blot-Analysen und immunozytochemischen Färbungen ermittelten Ergebnisse (Größe, Oligomerisierungsfähigkeit und Glykosylierungsverhalten) auf Grund ihrer guten Vergleichbarkeit zwischen den in *HEK* und *MDCK* überexprimierten Transportern und dem in PBCEC natürlicherweise exprimierten Abcg2 dafür sprechen, potentiell funktionelle stabil ABCG2-exprimierende Zellsysteme generiert zu haben.

4.3.2. Zytotoxizitäts- und Uptake-Messungen

Nach den immunozytochemischen Untersuchungen in den generierten Zellsystemen, die Aufschluss über Oligomerisierungs- und Glykosylierungszustand sowie die Lokalisation des Transporters in der Zellmembran erbrachten, wurde die Funktionalität des Transporters durch Zytotoxizitäts- und *Uptake*-Messungen überprüft.

Sowohl die Zytotoxizitäts- als auch die *Uptake*-Messungen belegen eine deutliche Aktivität der Transporter. Diese äußert sich in den Zytotoxizitätstests (vgl. Kap. 3.4.3) in einer vergrößerten Resistenz der ABCG2-exprimierenden Zellen gegenüber Kontrollzellen in Bezug auf die zelltoxische Wirkung des Fluoreszenzfarbstoffs *Hoechst 33342*, von dem durch Studien an pluripotenten Stammzellen bekannt ist, dass er effizient von ABCG2 transportiert wird (KIM et al., 2002; SCHARENBERG et al., 2002)

Sowohl die induzierten *HEK*-TREx/pAbcg2-, *HEK*-hABCG2- als auch *HEK*-YFP/pAbcg2-Zellen besitzen einen signifikant höheren EC_{50} -Wert als vergleichbare *HEK*-wt-Zellen ($EC_{50} = 18 \pm 1 \mu\text{M}$). Die Resistenz gegenüber *Hoechst 33342* ist im gewählten Konzentrationsbereich so groß, dass eine genaue Bestimmung des EC_{50} -Wertes nicht möglich ist, dieser jedoch oberhalb $150 \mu\text{M}$ liegen muss.

Vergleichbares trifft auf die *MDCK*-YFP/pAbcg2- und *MDCK*-YFP/hABCG2-Zellen zu. Auch hier ist der EC_{50} -Wert von *Hoechst 33342* nicht eindeutig bestimmbar, liegt aber oberhalb $150 \mu\text{M}$ und ist damit deutlich höher als der von *MDCK*-wt-Zellen ($52 \pm 30 \mu\text{M}$).

Sowohl hABCG2 als auch pAbcg2 sowie ihre Fusionskonstrukte besitzen demnach eine funktionelle Aktivität.

Diese Aktivität kann für *MDCK*-YFP/pAbcg2- und *HEK*-YFP/pAbcg2-Zellen durch *Uptake*-Messungen bestätigt werden. Die beiden Zelllinien nehmen zeitabhängig gegenüber den Kontrollzellen wesentlich weniger *Hoechst 33342* auf (vgl. Kap. 3.4.4). Sowohl das N-terminal fusionierte EYFP als auch die in diesem Konstrukt vorliegende Abcg2-Aminosäuremutation an Position 564 (Pro564Leu) haben demnach keinen deaktivierenden Effekt auf den Transporter.

Der Vergleich von *MDCK*- und *HEK*-Kontrollzellen in den *Uptake*-Messungen zeigt, dass *HEK*-Zellen *Hoechst 33342* wesentlich effizienter aufnehmen als *MDCK*-Zellen. So erweist sich, dass die verwendeten pAbcg2 defizienten Kontrollzellen, insbesondere die *MDCK*-Zellen, die maximale *Hoechst 33342* Aufnahmekapazität (100 %-Wert), die durch Permeabilisierung der Zellen ermittelt wurde, nicht erreichen. Die *HEK*-Zellen erlangen nach 125 min ca. 70 % der maximal möglichen Fluoreszenz, die *MDCK*-Zellen nur ca. 30 %. Eine mögliche Ursache könnte in der ursprünglichen Transporterausstattung der Zellen zu finden sein. Unter den *MDR*-Transportern wurde neben ABCG2 bisher nur P-Gp als Transporter für *Hoechst 33342* beschrieben (SHAPIRO et al., 1997). Darüber hinaus ist nachgewiesen, dass sowohl *HEK* als auch die verwendeten *MDCK*-Zellen endogen P-Gp bilden (HÖING, 2004; RAO et al., 2005). Wahrscheinlich ist also endogen gebildetes P-Gp am Transport von *Hoechst 33342* in den generierten Zellen beteiligt und sorgt dementsprechend auch in den pAbcg2 defizienten Zellen für die Aufrechterhaltung eines basalen *Hoechst 33342* Exports. Dass diese basale Aktivität in *MDCK*-Zellen größer als in *HEK*-Zellen ist, könnte darin begründet sein, dass in *MDCK*-Zellen eine erhöhte Expression von P-Gp oder auch anderen Transportern, die bisher nicht als *Hoechst 33342*-Transporter in Erscheinung getreten sind, vorliegt. Dies könnte auch erklären, warum *MDCK*-wt-Zellen eine größere Toleranz gegenüber der zytotoxischen Wirkung von *Hoechst 33342* besitzen als *HEK*-wt Zellen.

Eventuell ist der ausschlaggebende Grund aber auch nicht ausschließlich in der Transportermenge und -aktivität zu suchen, sondern vor allem in der Morphologie des Zellverbands. *HEK*-Zellen bilden im Gegensatz zu *MDCK*-Zellen keinen konfluenten Monolayer aus, wodurch es auch nicht zu einer apikal-basolateralen Differenzierung der Membran kommt, was die aufgenommenen *CLSM*-Bilder bestätigen (vgl. Abb. 3-14). Es ist davon auszugehen, dass aufgrund dieser Morphologie die für *Hoechst 33342* zugängliche Zelloberfläche in *HEK*-Zellen erheblich größer ist als in *MDCK*-Zellen und hierüber auch bei gleichartiger Transportermenge und -aktivität eine verstärkte Aufnahme von *Hoechst 33342* erfolgt. Dass die *HEK*- und *MDCK*-Zellen, in denen YFP/pAbcg2 stabil exprimiert wird, sich trotz der physiologischen Unterschiede hinsichtlich der *Hoechst*

33342-Aufnahme sehr ähnlich verhalten - beide Zelllinien erreichen nach 125 min eine relative Fluoreszenz von ca. 10 % - ist erstaunlich. Eine mögliche Ursache könnte in einer stärkeren pAbcg2-Expression in den transfizierten *HEK*-Zellen zu finden sein. Die durchgeführten Western-Blot Analysen zeigen, dass in *HEK*-YFP/pAbcg2-Zellen, bezogen auf die Gesamtproteinmenge, deutlich mehr Abcg2 exprimiert wird als in *MDCK*-YFP/pAbcg2-Zellen (vgl. Abb. 3-19). Es muss allerdings festgehalten werden, dass dieser Befund nicht automatisch mit einer höheren Anzahl aktiver Transporter in der Plasmamembran korrelieren muss.

Die Zugabe der Modulatoren *Cyclosporin A*, *PSC 833*, *Fumitremorgin C* und *GF 120918* bewirkt an *HEK*-hABCG2-Zellen in allen Fällen eine deutliche Sensibilisierung gegenüber der zytotoxischen Wirkung von *Hoechst 33342*. Die niedrigsten EC_{50} -Werte bewirken *Cyclosporin A*, *PSC 833* und *GF 120918* gefolgt von *Fumitremorgin C*.

Die ermittelten EC_{50} -Werte sind dabei vergleichbar mit den EC_{50} -Werten, die bei der Verwendung der Modulatoren in nicht induzierten und damit ABCG2 defizienten *HEK*-TREx/pAbcg2-Zellen erreicht werden. Hieraus folgt, dass alle verwendeten Modulatoren in ähnlich effizienter Weise die Toleranz von *HEK*-hABCG2-Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von *Hoechst 33342* aufheben.

Auch in den mittels Zytotoxizitätstests untersuchten YFP/pAbcg2-*HEK*-Zellen bewirken die verwendeten Modulatoren *Cyclosporin A*, *PSC 833* und *Fumitremorgin C* eine messbare Zytotoxizitätssteigerung von *Hoechst 33342*, wobei die ermittelten EC_{50} -Werte deutlich über denen in *HEK*-hABCG2-Zellen liegen, was darauf hindeutet, dass YFP/pAbcg2 eine geringere Affinität zu den verwendeten Modulatoren aufweist.

Sowohl *Cyclosporin A* als auch im Besonderen *GF 120918* wird eine inhibierende Wirkung auf den hABCG2- und hP-Gp-Transport zugeschrieben (QADIR et al., 2005; RABINDRAN et al., 1998), was durch die eigenen Zytotoxizitätstests an hABCG2 exprimierenden *HEK*-Zellen untermauert wird und zumindest im Fall von *Cyclosporin A*, wenn auch weniger stark, für das porcine YFP/Abcg2 in *HEK*-Zellen zutrifft. Es ist allerdings darauf hinzuweisen, dass für die modulatorische Wirkung von *Cyclosporin A* auf hABCG2 auch gegensätzliche Aussagen in der Literatur zu finden sind. So kommen EJENDAL und HRYCYNA (2005) in ihren Untersuchungen an Arzneimittel-selektierten MCF-7-Subzelllinien (Brustkrebszelllinie) und transient transfizierten *HeLa*-Zellen zu dem Ergebnis, dass *Cyclosporin A* zwar ein Substrat und Inhibitor für hP-Gp ist, aber nicht für hABCG2. Dies trifft sowohl für den hABCG2-Wildtyp (R482) als auch für die Mutanten R482T und R482G zu.

In einer anderen Studie wird berichtet, dass sowohl *Cyclosporin A* als auch *PSC 833*, das als spezifischer Modulator für P-Gp, aber nicht für ABCG2 gilt (QADIR et al., 2005), einen

inhibierenden Effekt auf den ABCG2-Transport in stabil hABCG2 (R482, R482T und R482G) exprimierenden Zelllinien aufweisen (GARCIA-ESCARP et al., 2004).

Fumitremorgin C hingegen wird als spezifischer und potenter Modulator für hABCG2 beschrieben und soll keinen wesentlichen Einfluss auf hP-Gp besitzen (RABINDRAN et al., 1998).

Dass *PSC 833* und *Fumitremorgin C* auch in den generierten hABCG2 und in geringem Maße in YFP/pAbcg2 überexprimierenden *HEK*-Zellen für eine erhöhte Zytotoxizität von *Hoechst 33342* sorgen, unterstützt diese Beobachtungen.

Allerdings führten die durchgeführten Zytotoxizitätsmessungen in *MDCK*-YFP/pAbcg2- und *MDCK*-YFP/hABCG2-Zellen, in denen als Modulator ausschließlich *PSC 833* eingesetzt wurde, zu keiner messbaren Steigerung der zytotoxischen Wirkung von *Hoechst 33342*, was dafür spricht, dass *PSC 833* weder für den YFP/hABCG2- noch für den YFP/pAbcg2-Transporter ein effizienter Inhibitor ist. Möglicherweise nimmt das in *HEK*-YFP/pAbcg2-Zellen mit pAbcg2 fusionierte YFP Einfluss auf die Wirkung der Inhibitoren, indem es die Konformation des Transporters geringfügig abwandelt oder die Zugänglichkeit der Inhibitor-Bindungsstellen variiert. Es ist auch nicht auszuschließen, dass die in den YFP/pAbcg2 vorhandene Aminosäuremutation an Position 564 (Pro564Leu) in diesem Zusammenhang ebenfalls Einfluss auf die Konformation des Transporters nimmt und hierdurch die Wirkung von Modulatoren verändert.

In Widerspruch zu der oben erwähnten inhibitorischen Wirkung der verwendeten Inhibitoren auf *HEK*-hABCG2- und *HEK*-YFP/pAbcg2-Zellen, zeigt keiner der verwendeten Modulatoren einen Einfluss auf die Zytotoxizität von *Hoechst 33342* in *HEK*-TREx/pAbcg2-Zellen.

Eine Erklärung wäre, dass pAbcg2 eine geringere Affinität zu den verwendeten Inhibitoren aufweist als hABCG2 und möglicherweise als ABCG2, das mit YFP fusioniert wurde. Möglicherweise ist auch die Expression von aktivem plasmamembranständigem pAbcg2 in induzierten *HEK*-TREx/pAbcg2-Zellen höher als in *HEK*-hABCG2- oder *HEK*-YFP/pAbcg2-Zellen und führt hierdurch auch unter Inhibitor-Einfluss zu einer erhöhten *Hoechst 33342* Toleranz.

Während in Zytotoxizitätstests *Fumitremorgin C*, *PSC 833* und *Cyclosporin A* eine messbare Wirkung auf die Zytotoxizität von *Hoechst 33342* in *HEK*-YFP/pAbcg2-Zellen erzielen, konnte die YFP/Abcg2-inhibitorische Wirksamkeit dieser Modulatoren in *Uptake*-Messungen an *HEK*-YFP/pAbcg2 und *MDCK*-YFP/pAbcg2 nicht bestätigt werden.

Der einzige Modulator, der zu einer signifikanten Änderung in der Aufnahme von *Hoechst 33342* gegenüber Abcg2 defizienten Kontroll-Zellen führte, ist *GF 120918*.

Warum *PSC 833*, *Cyclosporin A* und *Fumitremorgin C*, die im Zytotoxizitätstest an *HEK*-YFP/pAbcg2 zumindest eine geringe Wirkung zeigten, in den *Uptake*-Messungen an *HEK*-

YFP/pAbcg2 keine Effekte erzielen ist unklar, unterstreicht aber wie die Zytotoxizitätstests an *HEK-TREx/pAbcg2*-Zellen, dass die Affinität des porcinen Transporters und damit auch die des YFP/pAbcg2-Fusionsproteins gegenüber den verwendeten Modulatoren wesentlich geringer sein könnte als die des humanen Pendantes.

Des Weiteren könnte auch eine Erklärung in den unterschiedlichen Zeitfenstern zu finden sein, in denen die Experimente abliefen. Die Auswertung der Zytotoxizitätsmessungen erfolgte 72 h nach Zugabe der Substrat-Modulator-Lösungen, während die *Uptake*-Messungen über 2 h verliefen. Demzufolge könnte es sich bei der zytotoxizitätssteigernden Wirkung der Modulatoren um einen Langzeit-Effekt handeln, der im zeitlichen Rahmen der *Uptake*-Messungen nicht zu erfassen ist.

Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass in den Zellen endogen exprimiertes P-Gp Einfluss auf die ermittelten Werte nimmt, da *GF 120918* ein Inhibitor ist, der nachweislich sowohl ABCG2 als auch hP-Gp hocheffizient inhibiert (MALIEPAARD et al., 2001b).

Möglicherweise konkurrieren ABCG2 und P-Gp mit unterschiedlichen Affinitäten sowohl um das Substrat *Hoechst 33342* als auch um die zugesetzten Modulatoren. Erst ein Inhibitor, der beide Transporter effizient inhibiert, zeigt ein messbares signifikantes Ergebnis in den Zytotoxizitätstests. Dies würde allerdings bedeuten, dass die generierten stabil YFP/pAbcg2-exprimierenden Zelllinien sich selektionsbedingt gegenüber den verwendeten ABCG2 defizienten Kontrollzellen nicht nur in der Expression von ABCG2, sondern auch in derjenigen von P-Gp oder anderer am *Hoechst 33342*-Transport beteiligter Proteine unterscheiden.

5. Zusammenfassung

Die zerebralen Kapillarendothelzellen (*brain capillary endothelial cells / BCEC*) stellen die anatomische und physiologische Barriere dar, die einen selektiven Stofftransport zwischen Blut und der Interstitialflüssigkeit des Gehirns ermöglicht. Einen wichtigen Beitrag zum Schutz des Gehirns vor xenobiotischen Substanzen vermitteln die in den *BCEC* exprimierten *multidrug resistance-(MDR)*-Transporter aus der Familie der ABC-Transporter. Diese Gruppe von Proteinen ermöglicht den Transport einer breiten Palette xenobiotischer Substanzen.

Während die Transporter als Exportpumpen für Fremdstoffe einen wichtigen Beitrag zum Schutz des Gehirns leisten, können sie bei der pharmakologischen Behandlung von ZNS-Erkrankungen ein Problem darstellen, da sie den Zugang der in der Therapie eingesetzten Arzneistoffe zum Gehirn erschweren.

Zu den bekanntesten an der humanen BHS exprimierten *MDR* vermittelnden ABC-Transportern gehört neben P-Gp und MRP1 das so genannte ABCG2. Ein Homolog (pAbcg2) wurde auch in porcinen zerebralen Kapillarendothelzellen (*porcine brain capillary endothelial cells / PBCEC*) entdeckt (EISENBLÄTTER und GALLA, 2002).

Die vorliegende Arbeit widmete sich der Aufgabe, Untersuchungssysteme zu entwickeln, um die bisher unzureichende funktionelle Charakterisierung des in *PBCEC* exprimierten Abcg2 zu ermöglichen. Die zwei dabei verfolgten Ansätze, die Expressionsinhibierung (*knockdown*) des Abcg2-Transporters mittels RNA-Interferenz in *PBCEC* und die selektive Überexpression des Transporters in stabil transfizierten Zelllinien, dienten dabei der Generierung von Zellsystemen, in denen der pAbcg2-Transporter gegenüber nicht modifizierten *PBCEC* funktionell deutlicher in Erscheinung tritt. Darüber hinaus wurden weiterführende Untersuchungen an *PBCEC* im Hinblick auf die Regulation der pAbcg2-Expression durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass außer Hydrocortison keiner der verwendeten aus der Literatur bekannten humanen ABCG2- und P-Glycoprotein-(P-Gp)-Substrate bzw. Modulatoren einen signifikanten regulatorischen Beitrag an der Abcg2-Expression in *PBCEC* aufweist. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass Hydrocortison die apikale Expression von Abcg2 in *PBCEC* erhöht und dieser Prozess über einen vom Glucocorticoid-Rezeptor vermittelten Signaltransduktionsweg verläuft. Darüber hinaus wurde eine serumbedingte Regulation der über Hydrocortison induzierten Abcg2-Expression in *PBCEC* nachgewiesen.

Die Expressionsinhibierung von Proteinen mittels RNAi konnte zwar in *Caco-2*-Zellen erfolgreich angewendet werden, führte aber zu keiner befriedigenden Suppression der Abcg2-Expression in *PBCEC*. Versuche über vektoriellen Transfer auf der Basis verschiedener Transfektionsverfahren (Kalziumphosphat-Kopräzipitation, Transfektion mittels kationischer Lipide, *Nukleofektion* und adenoviraler Gentransfer) GFP-exprimierende Vektorkonstrukte in *PBCEC* einzuschleusen zeigten keine ausreichenden Transfektionsraten und machten die Generierung und Transfektion von shRNA-bildenden Vektorkonstrukten zur Inhibierung und funktionellen Charakterisierung des Abcg2-Transporters in *PBCEC* obsolet.

Des Weiteren ließen sich im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich sowohl stabil pAbcg2 und hABCG2 exprimierende *HEK*-Zellen als auch YFP/pAbcg2 exprimierende *HEK*- und *MDCK*-Zellen generieren. Darüber hinaus wurde erfolgreich ein durch Tetracyclin-Derivate induzierbares pAbcg2-Expressionssystem in *HEK*-Zellen (*HEK*-TREx/pAbcg2) erzeugt. Hinsichtlich Größe, Lokalisierung, Oligomerisierungsfähigkeit und Glykosylierungsverhalten ist das in den Zelllinien exprimierte porcine Abcg2 vergleichbar mit dem in *PBCEC* exprimierten Transporter.

Es konnte gezeigt werden, dass *Hoechst 33342* sowohl für das porcine als auch für das humane ABCG2 ein Substrat darstellt, unabhängig davon, ob das humane oder porcine ABCG2 N-terminal mit EYFP fusioniert ist.

Hinsichtlich des Inhibitorspektrums sind die Aussagen für das humane und porcine ABCG2 nicht übereinstimmend. Während für hABCG2 die Zytotoxizitätstests eine inhibierende Wirkung von *Cyclosporin A*, *PSC 833*, *Fumitremorgin C* und *GF 120918* belegen, zeigen diese Modulatoren in induzierten *HEK-TREx/pAbcg2*-Zellen keinen Effekt. Eine Erklärung wäre, dass der porcine Transporter eine geringere Affinität zu diesen Modulatoren aufweist oder aber unterschiedliche Expressionsstärken des Transporters in *HEK-hABCG2*- und *HEK-TREx/pAbcg2*-Zellen vorliegen.

Uptake-Messungen an *HEK-YFP/pAbcg2* zeigen, dass *Cyclosporin A*, *PSC 833* und *Fumitremorgin C* ebenfalls keinen signifikant inhibierenden Effekt auf die Aufnahme von *Hoechst 33342* ausüben. *GF 120918* indes ist in diesen Zellen eine eindeutige inhibierende Wirkung zuzuschreiben, was im Widerspruch zu den Zytotoxizitätsmessungen an *HEK-TREx/pAbcg2*-Zellen steht, in denen *GF 120918* keinen nachweisbaren Effekt zeigte, aber möglicherweise eine Besonderheit des YFP-Fusionskonstruktes darstellt.

6. Ausblick

Über die Regulation von ABCG2 an der BHS ist bisher wenig bekannt. Die Mechanismen mit denen *MDR*-vermittelnde Transporter in ihrer Expression oder Lokalisation beeinflusst werden sind aber aktueller Gegenstand der Forschung. So bietet ein Verständnis dieser Prozesse aus therapeutischer Sicht für die Bekämpfung von Erkrankungen des ZNS eine Alternative oder Ergänzung zu dem Einsatz von Inhibitoren, die die Aktivität einzelner oder mehrerer *MDR*-Transporter verändern und damit die Zugänglichkeit des Gehirns für therapeutisch wirksame Arzneimittel erhöhen.

Eine weiterführende Untersuchung der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Regulation des Abcg2-Transporters erscheint somit wichtig. Es konnte bereits in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass pAbcg2 in *PBCEC* durch einen vom Glucocorticoid-Rezeptor (GR) vermittelten Signaltransduktionsweg in seiner apikalen Expression reguliert wird. Über welchen vom GR vermittelten Prozess die pAbcg2-Expression durch Hydrocortison induziert wird, ist bisher aber nicht bekannt und muss in weiteren Studien untersucht werden. In diesem Zusammenhang wäre eine Analyse der pAbcg2-Promotorregion bezüglich etwaiger potentieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren hilfreich.

Bezüglich der funktionellen Analyse von Abcg2 in *PBCEC* an der BHS war die Methode der RNAi prinzipiell ein vielversprechender Ansatz, da sie eine direkte Suppression des

Zielproteins (pAbcg2) in dem durch die *PBCEC* dargestellten *in vitro* Modell der BHS ermöglicht. Dass die durchgeführten Experimente nicht den entsprechenden Erfolg zeigten ist bedauerlich und hängt wahrscheinlich unmittelbar mit der generell schweren Transfizierbarkeit der Primärkultur der *PBCEC* zusammen. Weiterführende Experimente mit potenten viralen Systemen wie Retroviren könnten eine erfolgversprechende Alternative gegenüber den für porcine Systeme wenig effizienten Adenoviren darstellen.

Die generierten pAbcg2 exprimierenden *HEK*- und *MDCK*-Zellsysteme, in denen der Transporter funktionell gegenüber Abcg2-defizienten Zellen durch den Transport von *Hoechst 33342* in Erscheinung tritt, stellen einen Ansatzpunkt dar für tieferegreifende Untersuchungen bezüglich der Inhibitor- und Substratspektren von Abcg2. Besonders der in der pAbcg2-Expression induzierbaren *HEK*-TREx/pAbcg2-Zelllinie ist auf Grund ihres Vorteils gegenüber nicht induzierbaren Systemen - in Untersuchungen, in denen Abcg2 exprimierende Zellen mit Abcg2 defizienten Kontroll-Zellen verglichen werden (z.B. Zytotoxizitätsmessungen und *Uptake*-Messungen) kann mit demselben Zellklon gearbeitet werden - eine vorrangige Stellung einzuräumen. Hierdurch lassen sich mögliche selektionsbedingte Unterschiede zwischen defizienten und stabil Abcg2 exprimierenden Zellen umgehen.

7. Literatur

Abbott, N.J. (2005)

"Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation"

Cell Mol Neurobiol, 25, 1, 5-23.

Abbott, N.J., Ronnback, L. und Hansson, E. (2006)

"Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier"

Nat Rev Neurosci, 7, 1, 41-53.

Aigner, A. (2007)

"Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo"

Appl Microbiol Biotechnol.

Altmeyer, P. (2005)

Therapielexikon Dermatologie und Allergologie

(2. vollständig überarbeitete Auflage Edition), Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.

Amarzguioui, M. und Prydz, H. (2004)

"An algorithm for selection of functional siRNA sequences"

Biochem Biophys Res Commun, 316, 4, 1050-8.

Bailey-Dell, K.J., Hassel, B., Doyle, L.A. und Ross, D.D. (2001)

"Promoter characterization and genomic organization of the human breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette transporter G2) gene"

Biochim Biophys Acta, 1520, 3, 234-41.

Bakos, E. und Homolya, L. (2007)

"Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1)"

Pflugers Arch, 453, 5, 621-41.

Bauer, B., Hartz, A.M., Fricker, G. und Miller, D.S. (2004)

"Pregnane X receptor up-regulation of P-glycoprotein expression and transport function at the blood-brain barrier"

Mol Pharmacol, 66, 3, 413-9.

Beaulieu, E., Demeule, M., Ghitescu, L. und Beliveau, R. (1997)

"P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain"

Biochem J, 326 (Pt 2), 539-44.

Bechmann, I., Galea, I. und Perry, V.H. (2007)

"What is the blood-brain barrier (not)?"

Trends Immunol, 28, 1, 5-11.

Beck, K., Hayashi, K., Nishiguchi, B., Le Saux, O., Hayashi, M. und Boyd, C.D. (2003)

"The distribution of Abcc6 in normal mouse tissues suggests multiple functions for this ABC transporter"

J Histochem Cytochem, 51, 7, 887-902.

Begley, D.J., Khan, E.U., Rollinson, C., Abbott, J., Regina, A. und Roux, F. (2000)

"The role of brain extracellular fluid production and efflux mechanisms in drug transport to the brain"

Blood-Brain Barrier and Drug Delivery to the CNS, 93-108.

Bendayan, R., Ronaldson, P.T., Gingras, D. und Bendayan, M. (2006)

"In situ localization of P-glycoprotein (ABCB1) in human and rat brain"

J Histochem Cytochem, 54, 10, 1159-67.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. und Hannon, G.J. (2001)

"Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference"

Nature, 409, 6818, 363-6.

Bertilsson, G., Heidrich, J., Svensson, K., Asman, M., Jendeberg, L., Sydow-Backman, M., Ohlsson, R., Postlind, H., Blomquist, P. und Berkenstam, A. (1998)

"Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction"

Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 21, 12208-13.

Bhatia, A., Schafer, H.J. und Hrycyna, C.A. (2005)

"Oligomerization of the Human ABC Transporter ABCG2: Evaluation of the Native Protein and Chimeric Dimers"

Biochemistry, 44, 32, 10893-904.

Biegel, D., Spencer, D.D. und Pachter, J.S. (1995)

"Isolation and culture of human brain microvessel endothelial cells for the study of blood-brain barrier properties in vitro"

Brain Res, 692, 1-2, 183-9.

Blumberg, B., Sabbagh, W., Jr., Juguilon, H., Bolado, J., Jr., Van Meter, C.M., Ong, E.S. und Evans, R.M. (1998)

"SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor"

Genes Dev, 12, 20, 3195-205.

Brightman, M.W. und Reese, T.S. (1969)

"Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain"

J Cell Biol, 40, 3, 648-77.

Caplen, N.J. (2003)

"RNAi as a gene therapy approach"

Expert Opin Biol Ther, 3, 4, 575-86.

Celius, T., Garberg, P. und Lundgren, B. (2004)

"Stable suppression of MDR1 gene expression and function by RNAi in Caco-2 cells"

Biochem Biophys Res Commun, 324, 1, 365-71.

Chaudhary, P.M. und Roninson, I.B. (1993)

"Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs"

J Natl Cancer Inst, 85, 8, 632-9.

Chen, C.J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M. und Roninson, I.B. (1986)

"Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells"

Cell, 47, 3, 381-9.

Cooray, H.C., Blackmore, C.G., Maskell, L. und Barrand, M.A. (2002)

"Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain"

Neuroreport, 13, 16, 2059-63.

Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R. und Bertino, J.R. (1989)

"Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites"

Proc Natl Acad Sci U S A, 86, 2, 695-8.

Daniels, G.M. und Amara, S.G. (1998)

"Selective labeling of neurotransmitter transporters at the cell surface"

Methods Enzymol, 296, 307-18.

Daschner, P.J., Ciolino, H.P., Plouzek, C.A. und Yeh, G.C. (1999)

"Increased AP-1 activity in drug resistant human breast cancer MCF-7 cells"

Breast Cancer Res Treat, 53, 3, 229-40.

De Martin, R., Raidl, M., Hofer, E. und Binder, B.R. (1997)

"Adenovirus-mediated expression of green fluorescent protein"

Gene Ther, 4, 5, 493-5.

Dermietzel, R. und Krause, D. (1991)

"Molecular anatomy of the blood-brain barrier as defined by immunocytochemistry"

Int Rev Cytol, 127, 57-109.

Diop, N.K. und Hrycyna, C.A. (2005)

"N-Linked glycosylation of the human ABC transporter ABCG2 on asparagine 596 is not essential for expression, transport activity, or trafficking to the plasma membrane"

Biochemistry, 44, 14, 5420-9.

Doyle, L.A. und Ross, D.D. (2003)

"Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2)"

Oncogene, 22, 47, 7340-58.

Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K. und Ross, D.D. (1998)

"A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells"

Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 26, 15665-70.

Drees, A. (2004)

"ABC-Transporter an der Blut-Hirn-Schranke in vitro", Institut für Biochemie, Münster, WWU.

Drees, A., Hollnack, E., Eisenblätter, T. und Galla, H.-J. (2005)

"The multidrug resistance protein BMDP/ABCG2: A new and highly relevant efflux pump at the blood-brain barrier"

International Congress Series, 1277, 154-168.

Ehrlich, P. (1885)

Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie., Berlin, Verlag von August Hirschwald.

Eisenblätter, T. und Galla, H.J. (2002)

"A new multidrug resistance protein at the blood-brain barrier"

Biochem Biophys Res Commun, 293, 4, 1273-8.

Eisenblätter, T., Huwel, S. und Galla, H.J. (2003)

"Characterisation of the brain multidrug resistance protein (BMDP/ABCG2/BCRP) expressed at the blood-brain barrier"

Brain Res, 971, 2, 221-31.

Ejendal, K.F. und Hrycyna, C.A. (2005)

"Differential sensitivities of the human ATP-binding cassette transporters ABCG2 and P-glycoprotein to cyclosporin A"

Mol Pharmacol, 67, 3, 902-11.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. und Tuschl, T. (2001a)

"Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells"

Nature, 411, 6836, 494-8.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K. und Tuschl, T. (2002)

"Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs"

Methods, 26, 2, 199-213.

Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. und Tuschl, T. (2001b)

"Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate"

Embo J, 20, 23, 6877-88.

Fechner, H., Wang, X., Wang, H., Jansen, A., Pauschinger, M., Scherubl, H., Bergelson, J.M., Schultheiss, H.P. und Poller, W. (2000)

"Trans-complementation of vector replication versus Coxsackie-adenovirus-receptor overexpression to improve transgene expression in poorly permissive cancer cells"

Gene Ther, 7, 22, 1954-68.

Fenstermacher, J., Gross, P., Sposito, N., Acuff, V., Pettersen, S. und Gruber, K. (1988)

"Structural and functional variations in capillary systems within the brain"

Ann N Y Acad Sci, 529, 21-30.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. und Mello, C.C. (1998)
"Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans"
Nature, 391, 6669, 806-11.

Fisher, T.L., Terhorst, T., Cao, X. und Wagner, R.W. (1993)
"Intracellular disposition and metabolism of fluorescently-labeled unmodified and modified oligonucleotides microinjected into mammalian cells"
Nucleic Acids Res, 21, 16, 3857-65.

Frank, R.N., Turczyn, T.J. und Das, A. (1990)
"Pericyte coverage of retinal and cerebral capillaries"
Invest Ophthalmol Vis Sci, 31, 6, 999-1007.

Franke, H., Galla, H. und Beuckmann, C.T. (2000)
"Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro"
Brain Res Brain Res Protoc, 5, 3, 248-56.

Fricker, G., Nobmann, S. und Miller, D.S. (2002)
"Permeability of porcine blood brain barrier to somatostatin analogues"
Br J Pharmacol, 135, 5, 1308-14.

Garcia-Escarp, M., Martinez-Munoz, V., Sales-Pardo, I., Barquinero, J., Domingo, J.C., Marin, P. und Petriz, J. (2004)
"Flow cytometry-based approach to ABCG2 function suggests that the transporter differentially handles the influx and efflux of drugs"
Cytometry A, 62, 2, 129-38.

Goldmann, E.E. (1913)
Vitalfärbung am Zentralnervensystem. Beitrag zur Physio-Pathologie des Plexus Chorioideus und der Hirnhäute., Berlin, Königl. Akademie der Wissenschaften.

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. und Nairn, R. (1977)
"Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5"
J Gen Virol, 36, 1, 59-74.

Gumbiner, B.M. (1996)
"Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis"
Cell, 84, 3, 345-57.

Gutmann, H., Torok, M., Fricker, G., Huwyler, J., Beglinger, C. und Drewe, J. (1999)
"Modulation of multidrug resistance protein expression in porcine brain capillary endothelial cells in vitro"
Drug Metab Dispos, 27, 8, 937-41.

Hamm, A., Krott, N., Breibach, I., Blindt, R. und Bosserhoff, A.K. (2002)
"Efficient transfection method for primary cells"
Tissue Eng, 8, 2, 235-45.

Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. und Hannon, G.J. (2000)

"An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells"

Nature, 404, 6775, 293-6.

Hannon, G.J. (2002)

"RNA interference"

Nature, 418, 6894, 244-51.

Haskins, J., Gu, L., Wittchen, E.S., Hibbard, J. und Stevenson, B.R. (1998)

"ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin"

J Cell Biol, 141, 1, 199-208.

Hawkins, B.T. und Davis, T.P. (2005)

"The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease"

Pharmacol Rev, 57, 2, 173-85.

Henriksen, U., Gether, U. und Litman, T. (2005)

"Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2"

J Cell Sci, 118, Pt 7, 1417-26.

Hermann, D.M. und Basseti, C.L. (2007)

"Implications of ATP-binding cassette transporters for brain pharmacotherapies"

Trends Pharmacol Sci, 28, 3, 128-34.

Hidaka, C., Milano, E., Leopold, P.L., Bergelson, J.M., Hackett, N.R., Finberg, R.W., Wickham, T.J., Kovesdi, I., Roelvink, P. und Crystal, R.G. (1999)

"CAR-dependent and CAR-independent pathways of adenovirus vector-mediated gene transfer and expression in human fibroblasts"

J Clin Invest, 103, 4, 579-87.

Higgins, C.F. (1992)

"ABC transporters: from microorganisms to man"

Annu Rev Cell Biol, 8, 67-113.

Hohjoh, H. (2004)

"Enhancement of RNAi activity by improved siRNA duplexes"

FEBS Lett, 557, 1-3, 193-8.

Höing, J. (2004)

"Substratspezifität von ABC-Transportern an der Blut-Hirn-Schranke in vitro", Institut für Biochemie, Münster, WWU.

Holen, T., Amarzguioui, M., Wiiger, M.T., Babaie, E. und Prydz, H. (2002)

"Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor"

Nucleic Acids Res, 30, 8, 1757-66.

Hollnack, E. (2005)

"Funktionelle Charakterisierung des Brain Multidrug resistance proteins (BMDP) an der Blut-Hirn-Schranke in vitro." Institut für Biochemie, Münster, WWU.

Hori, S., Ohtsuki, S., Ichinowatari, M., Yokota, T., Kanda, T. und Terasaki, T. (2005)
"Selective gene silencing of rat ATP-binding cassette G2 transporter in an in vitro blood-brain barrier model by short interfering RNA"

J Neurochem, 93, 1, 63-71.

Imai, Y., Asada, S., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T. und Sugimoto, Y. (2003)
"Breast cancer resistance protein exports sulfated estrogens but not free estrogens"

Mol Pharmacol, 64, 3, 610-8.

Jette, L. und Beliveau, R. (1993)

"P-glycoprotein is strongly expressed in brain capillaries"

Adv Exp Med Biol, 331, 121-5.

Jonker, J.W., Buitelaar, M., Wagenaar, E., Van Der Valk, M.A., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Plosch, T., Kuipers, F., Elferink, R.P., Rosing, H., Beijnen, J.H. und Schinkel, A.H. (2002)

"The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria"

Proc Natl Acad Sci U S A, 99, 24, 15649-54.

Juliano, R.L. und Ling, V. (1976)

"A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants"

Biochim Biophys Acta, 455, 1, 152-62.

Kaner, R.J., Worgall, S., Leopold, P.L., Stolze, E., Milano, E., Hidaka, C., Ramalingam, R., Hackett, N.R., Singh, R., Bergelson, J., Finberg, R., Falck-Pedersen, E. und Crystal, R.G. (1999)

"Modification of the genetic program of human alveolar macrophages by adenovirus vectors in vitro is feasible but inefficient, limited in part by the low level of expression of the coxsackie/adenovirus receptor"

Am J Respir Cell Mol Biol, 20, 3, 361-70.

Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J. und Plasterk, R.H. (2001)

"Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans"

Genes Dev, 15, 20, 2654-9.

Kim, M., Turnquist, H., Jackson, J., Sgagias, M., Yan, Y., Gong, M., Dean, M., Sharp, J.G. und Cowan, K. (2002)

"The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells"

Clin Cancer Res, 8, 1, 22-8.

Kreiss, P., Cameron, B., Rangara, R., Mailhe, P., Aguerre-Charriol, O., Airiau, M., Scherman, D., Crouzet, J. und Pitard, B. (1999)

"Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency"

Nucleic Acids Res, 27, 19, 3792-8.

Krishnamurthy, P., Ross, D.D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K.E., Sarkadi, B., Sorrentino, B.P. und Schuetz, J.D. (2004)

"The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme"

J Biol Chem, 279, 23, 24218-25.

Krstic, R.V. (1988)

Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere, Berlin, Springer-Verlag.

Kumagai, A.K., Eisenberg, J.B. und Pardridge, W.M. (1987)

"Absorptive-mediated endocytosis of cationized albumin and a beta-endorphin-cationized albumin chimeric peptide by isolated brain capillaries. Model system of blood-brain barrier transport"

J Biol Chem, 262, 31, 15214-9.

Kusuhara, H. und Sugiyama, Y. (2005)

"Active efflux across the blood-brain barrier: role of the solute carrier family"

NeuroRx, 2, 1, 73-85.

Laemmli, U.K. (1970)

"Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4"

Nature, 227, 5259, 680-5.

Lee, S.W., Kim, W.J., Park, J.A., Choi, Y.K., Kwon, Y.W. und Kim, K.W. (2006)

"Blood-brain barrier interfaces and brain tumors"

Arch Pharm Res, 29, 4, 265-75.

Litman, T., Jensen, U., Hansen, A., Covitz, K.M., Zhan, Z., Fetsch, P., Abati, A., Hansen, P.R., Horn, T., Skovsgaard, T. und Bates, S.E. (2002)

"Use of peptide antibodies to probe for the mitoxantrone resistance-associated protein MXR/BCRP/ABCP/ABCG2"

Biochim Biophys Acta, 1565, 1, 6-16.

Logashenko, E.B., Vladimirova, A.V., Repkova, M.N., Venyaminova, A.G., Chernolovskaya, E.L. und Vlassov, V.V. (2004)

"Silencing of MDR 1 gene in cancer cells by siRNA"

Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 23, 6-7, 861-6.

Lorkowski, S. und Cullen, P. (2002)

"ABCG subfamily of human ATP-binding cassette proteins"

Pure and Applied Chemistry, 74, 11, 2057-2081.

Löscher, W. und Potschka, H. (2005)

"Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters"

Nat Rev Neurosci, 6, 8, 591-602.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951)

"Protein measurement with the Folin phenol reagent"

J Biol Chem, 193, 1, 265-75.

Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Faneyte, I.F., Van Gastelen, M.A., Pijnenborg, A.C., Schinkel, A.H., Van De Vijver, M.J., Scheper, R.J. und Schellens, J.H. (2001a)

"Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues"

Cancer Res, 61, 8, 3458-64.

Maliepaard, M., Van Gastelen, M.A., Tohgo, A., Hausheer, F.H., Van Waardenburg, R.C., De Jong, L.A., Pluim, D., Beijnen, J.H. und Schellens, J.H. (2001b)

"Circumvention of breast cancer resistance protein (BCRP)-mediated resistance to camptothecins in vitro using non-substrate drugs or the BCRP inhibitor GF120918"

Clin Cancer Res, 7, 4, 935-41.

Mcdevitt, C.A., Collins, R.F., Conway, M., Modok, S., Storm, J., Kerr, I.D., Ford, R.C. und Callaghan, R. (2006)

"Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2"

Structure, 14, 11, 1623-32.

Mitomo, H., Kato, R., Ito, A., Kasamatsu, S., Ikegami, Y., Kii, I., Kudo, A., Kobatake, E., Sumino, Y. und Ishikawa, T. (2003)

"A functional study on polymorphism of the ATP-binding cassette transporter ABCG2: critical role of arginine-482 in methotrexate transport"

Biochem J, 373, Pt 3, 767-74.

Mohrmann, K., Van Eijndhoven, M.A., Schinkel, A.H. und Schellens, J.H. (2005)

"Absence of N-linked glycosylation does not affect plasma membrane localization of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)"

Cancer Chemother Pharmacol, 56, 4, 344-50.

Nakagawa, S., Deli, M.A., Nakao, S., Honda, M., Hayashi, K., Nakaoke, R., Kataoka, Y. und Niwa, M. (2007)

"Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells"

Cell Mol Neurobiol, 27, 6, 687-94.

Nies, A.T., Jedlitschky, G., Konig, J., Herold-Mende, C., Steiner, H.H., Schmitt, H.P. und Keppler, D. (2004)

"Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain"

Neuroscience, 129, 2, 349-60.

Nieth, C. und Lage, H. (2005)

"Induction of the ABC-transporters Mdr1/P-gp (Abcb1), mrpl (Abcc1), and bcrp (Abcg2) during establishment of multidrug resistance following exposure to mitoxantrone"

J Chemother, 17, 2, 215-23.

Nieth, C., Pribsch, A., Stege, A. und Lage, H. (2003)

"Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi)"

FEBS Lett, 545, 2-3, 144-50.

Nitz, T. (2001)

"Modulation der interendothelialen Permeabilität an der BHS", Institut für Biochemie, Münster, WWU.

Nobmann, S., Bauer, B. und Fricker, G. (2001)

"Ivermectin excretion by isolated functionally intact brain endothelial capillaries"

Br J Pharmacol, 132, 3, 722-8.

Nykanen, A., Haley, B. und Zamore, P.D. (2001)

"ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway"

Cell, 107, 3, 309-21.

Pardridge, W.M. (1999)

"Blood-brain barrier biology and methodology"

J Neurovirol, 5, 6, 556-69.

Pardridge, W.M., Golden, P.L., Kang, Y.S. und Bickel, U. (1997)

"Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein"

J Neurochem, 68, 3, 1278-85.

Qadir, M., O'loughlin, K.L., Fricke, S.M., Williamson, N.A., Greco, W.R., Minderman, H. und Baer, M.R. (2005)

"Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator"

Clin Cancer Res, 11, 6, 2320-6.

Rabindran, S.K., He, H., Singh, M., Brown, E., Collins, K.I., Annable, T. und Greenberger, L.M. (1998)

"Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C"

Cancer Res, 58, 24, 5850-8.

Rao, P.S., Govindarajan, R., Mallya, K.B., West, W. und Rao, U.S. (2005)

"Characterization of a new antibody raised against the NH2 terminus of P-glycoprotein"

Clin Cancer Res, 11, 16, 5833-9.

Reese, T.S. und Karnovsky, M.J. (1967)

"Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase"

J Cell Biol, 34, 1, 207-17.

Regina, A., Koman, A., Piciotti, M., El Hafny, B., Center, M.S., Bergmann, R., Couraud, P.O. und Roux, F. (1998)

"Mrp1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells"

J Neurochem, 71, 2, 705-15.

Reynolds, A., Leake, D., Boese, Q., Scaringe, S., Marshall, W.S. und Khvorova, A. (2004)

"Rational siRNA design for RNA interference"

Nat Biotechnol, 22, 3, 326-30.

Robey, R.W., Medina-Perez, W.Y., Nishiyama, K., Lahusen, T., Miyake, K., Litman, T., Senderowicz, A.M., Ross, D.D. und Bates, S.E. (2001)

"Overexpression of the ATP-binding cassette half-transporter, ABCG2 (Mxr/BCrp/ABCP1), in flavopiridol-resistant human breast cancer cells"

Clin Cancer Res, 7, 1, 145-52.

Robey, R.W., Polgar, O., Deeken, J., To, K.W. und Bates, S.E. (2007)

"ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance"

Cancer Metastasis Rev.

Roninson, I.B., Chin, J.E., Choi, K.G., Gros, P., Housman, D.E., Fojo, A., Shen, D.W., Gottesman, M.M. und Pastan, I. (1986)

"Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells"

Proc Natl Acad Sci U S A, 83, 12, 4538-42.

Ruetz, S. und Gros, P. (1994)

"Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the mdr2 gene"

Cell, 77, 7, 1071-81.

Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G. und Varadi, A. (2006)

"Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinmunity defense system"

Physiol Rev, 86, 4, 1179-236.

Scharenberg, C.W., Harkey, M.A. und Torok-Storb, B. (2002)

"The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors"

Blood, 99, 2, 507-12.

Scheffer, G.L., Maliepaard, M., Pijnenborg, A.C., Van Gastelen, M.A., De Jong, M.C., Schroeijs, A.B., Van Der Kolk, D.M., Allen, J.D., Ross, D.D., Van Der Valk, P., Dalton, W.S., Schellens, J.H. und Scheper, R.J. (2000)

"Breast cancer resistance protein is localized at the plasma membrane in mitoxantrone- and topotecan-resistant cell lines"

Cancer Res, 60, 10, 2589-93.

Schinkel, A.H. (1997)

"The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins"

Semin Cancer Biol, 8, 3, 161-70.

Schinkel, A.H. (1999)

"P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier"

Adv Drug Deliv Rev, 36, 2-3, 179-194.

Schinkel, A.H., Mayer, U., Wagenaar, E., Mol, C.A., Van Deemter, L., Smit, J.J., Van Der Valk, M.A., Voordouw, A.C., Spits, H., Van Tellingen, O., Zijlmans, J.M., Fibbe, W.E. und Borst, P. (1997)

"Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins"

Proc Natl Acad Sci U S A, 94, 8, 4028-33.

Schinkel, A.H., Wagenaar, E., Van Deemter, L., Mol, C.A. und Borst, P. (1995)

"Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A"

J Clin Invest, 96, 4, 1698-705.

Sedlakova, R., Shivers, R.R. und Del Maestro, R.F. (1999)

"Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit"

J Submicrosc Cytol Pathol, 31, 1, 149-61.

Shapiro, A.B., Corder, A.B. und Ling, V. (1997)

"P-glycoprotein-mediated Hoechst 33342 transport out of the lipid bilayer"

Eur J Biochem, 250, 1, 115-21.

Shirai, A., Naito, M., Tatsuta, T., Dong, J., Hanaoka, K., Mikami, K., Oh-Hara, T. und Tsuruo, T. (1994)

"Transport of cyclosporin A across the brain capillary endothelial cell monolayer by P-glycoprotein"

Biochim Biophys Acta, 1222, 3, 400-4.

Soontornmalai, A., Vlaming, M.L. und Fritschy, J.M. (2006)

"Differential, strain-specific cellular and subcellular distribution of multidrug transporters in murine choroid plexus and blood-brain barrier"

Neuroscience, 138, 1, 159-69.

Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S. und Goodenough, D.A. (1986)

"Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia"

J Cell Biol, 103, 3, 755-66.

Sun, H., Dai, H., Shaik, N. und Elmquist, W.F. (2003)

"Drug efflux transporters in the CNS"

Adv Drug Deliv Rev, 55, 1, 83-105.

Szakacs, G., Paterson, J.K., Ludwig, J.A., Booth-Genthe, C. und Gottesman, M.M. (2006)

"Targeting multidrug resistance in cancer"

Nat Rev Drug Discov, 5, 3, 219-34.

Tachikawa, M., Watanabe, M., Hori, S., Fukaya, M., Ohtsuki, S., Asashima, T. und Terasaki, T. (2005)

"Distinct spatio-temporal expression of ABCA and ABCG transporters in the developing and adult mouse brain"

J Neurochem, 95, 1, 294-304.

Teurich, S. und Angel, P. (1995)

"The glucocorticoid receptor synergizes with Jun homodimers to activate AP-1-regulated promoters lacking GR binding sites"

Chem Senses, 20, 2, 251-5.

Tewes B., F.H., Hellwig S., Hoheisel D., Decker S., Griesche D., Tilling T., Wegener J. Und Galla H.-J. (1996),

"Preparation of endothelial cells in primary cultures obtained from the brains of 6-month-old pigs"

in W., D.B.B.S. (ed.), *Drug Transport across the Blood-Brain Barrier*, Amsterdam, Harwood academic publishers.

Tewes, B.J. und Galla, H.J. (2001)

"Lipid polarity in brain capillary endothelial cells"

Endothelium, 8, 3, 207-20.

Tsuji, A., Terasaki, T., Takabatake, Y., Tenda, Y., Tamai, I., Yamashima, T., Moritani, S., Tsuruo, T. und Yamashita, J. (1992)

"P-glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured bovine brain capillary endothelial cells"

Life Sci, 51, 18, 1427-37.

Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P. und Sharp, P.A. (1999)

"Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro"

Genes Dev, 13, 24, 3191-7.

Uhr, M., Holsboer, F. und Müller, M.B. (2002)

"Penetration of endogenous steroid hormones corticosterone, cortisol, aldosterone and progesterone into the brain is enhanced in mice deficient for both mdr1a and mdr1b P-glycoproteins"

J Neuroendocrinol, 14, 9, 753-9.

Virgintino, D., Girolamo, F., Errede, M., Capobianco, C., Robertson, D., Stallcup, W.B., Perris, R. und Roncali, L. (2007)

"An intimate interplay between precocious, migrating pericytes and endothelial cells governs human fetal brain angiogenesis"

Angiogenesis, 10, 1, 35-45.

Wakabayashi, K., Nakagawa, H., Tamura, A., Koshiba, S., Hoshijima, K., Komada, M. und Ishikawa, T. (2007)

"Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein"

J Biol Chem, 282, 38, 27841-6.

Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. und Gay, N.J. (1982)

"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, 1, 8, 945-51.

Walters, R.W., Grunst, T., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Welsh, M.J. und Zabner, J. (1999)

"Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia"

J Biol Chem, 274, 15, 10219-26.

Wegener, J. (1998)

"Impedanzspektroskopische und mikrogravimetrische Untersuchungen an barrierebildenden Zellen auf planaren Goldelektroden."

Dissertation, WWU Münster.

Wegener, J., Abrams, D., Willenbrink, W., Galla, H.J. und Janshoff, A. (2004)

"Automated multi-well device to measure transepithelial electrical resistances under physiological conditions"

Biotechniques, 37, 4, 590, 592-4, 596-7.

Wegener, J., Hakvoort, A. und Galla, H.J. (2000)

"Barrier function of porcine choroid plexus epithelial cells is modulated by cAMP-dependent pathways in vitro"

Brain Res, 853, 1, 115-24.

Wolburg, H. und Lippoldt, A. (2002)

"Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation"

Vascul Pharmacol, 38, 6, 323-37.

Xia, C.Q., Liu, N., Yang, D., Miwa, G. und Gan, L.S. (2005)

"Expression, localization, and functional characteristics of breast cancer resistance protein in Caco-2 cells"

Drug Metab Dispos, 33, 5, 637-43.

Xie, Y., Xu, K., Linn, D.E., Yang, X., Guo, Z., Shimelis, H., Nakanishi, T., Ross, D.D., Chen, H., Fazli, L., Gleave, M.E. und Qiu, Y. (2007)

"The 44 kD Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug resistant activity in human prostate cancer cells"

J Biol Chem.

Xu, J., Liu, Y., Yang, Y., Bates, S. und Zhang, J.T. (2004)

"Characterization of oligomeric human half-ABC transporter ATP-binding cassette G2"

J Biol Chem, 279, 19, 19781-9.

Yin, W., Xiang, P. und Li, Q. (2005)

"Investigations of the effect of DNA size in transient transfection assay using dual luciferase system"

Anal Biochem, 346, 2, 289-94.

Yu, A.S., McCarthy, K.M., Francis, S.A., McCormack, J.M., Lai, J., Rogers, R.A., Lynch, R.D. und Schneeberger, E.E. (2005)

"Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells"

Am J Physiol Cell Physiol, 288, 6, C1231-41.

Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. und Bartel, D.P. (2000)

"RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals"

Cell, 101, 1, 25-33.

Zhang, Y., Han, H., Elmquist, W.F. und Miller, D.W. (2000)

"Expression of various multidrug resistance-associated protein (MRP) homologues in brain microvessel endothelial cells"

Brain Res, 876, 1-2, 148-53.

Zhang, Y., Schuetz, J.D., Elmquist, W.F. und Miller, D.W. (2004)

"Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain capillary endothelial cells"

J Pharmacol Exp Ther, 311, 2, 449-55.

Zhou, S., Morris, J.J., Barnes, Y., Lan, L., Schuetz, J.D. und Sorrentino, B.P. (2002)

"Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo"

Proc Natl Acad Sci U S A, 99, 19, 12339-44.

Zhou, S., Schuetz, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H. und Sorrentino, B.P. (2001)

"The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype"

Nat Med, 7, 9, 1028-34.

Zhou, S., Zong, Y., Ney, P.A., Nair, G., Stewart, C.F. und Sorrentino, B.P. (2005)

"Increased expression of the Abcg2 transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels"

Blood, 105, 6, 2571-6.

Zlokovic, B.V. (2008)

"The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders"

Neuron, 57, 2, 178-201.

8. Anhang

8.1. Abkürzungen

| | |
|--------------------|--|
| 1 x, 25 x | ein-fach, 25-fach |
| Abb. | Abbildung |
| ABC | <i>ATP-binding cassette</i> (ATP-Bindungskassette) |
| ABC* | Transporter der „ATP-Bindungskassetten-Unterfamilie *“ (<i>ATP-binding cassette subfamily *</i>). In Fällen, in denen die Spezieszuordnung nicht eindeutig ist, wurde dem Protein- oder Gen-Namen speziesabhängig ein kleiner Buchstabe vorangestellt: h = Mensch, p = Schwein, m = Maus, r = Ratte (z.B. hABCG2). Darüber hinaus wurde bei nicht menschlichen Spezies die Bezeichnung nach dem „A“ klein geschrieben (z.B. pAbcg2 oder rAbcg2). ABC-Transporter-Gene wurden kursiv geschrieben (z.B. <i>pAbcg2</i>). |
| G | |
| AP-1 | Aktivator-Protein-1 (<i>activator protein-1</i>) |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| AS | Aminosäure/n |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BBB | <i>blood-brain barrier</i> |
| BCEC | <i>brain capillary endothelial cells</i> (Gehirn-Kapillarendothelzellen) |
| Bez. | Bezeichnung |
| BHS | Blut-Hirn-Schranke |
| BMDP | <i>brain multidrug resistance protein</i> |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| cDNA | <i>complementary</i> (komplementäre) DNA |
| CDS | <i>Code determining Sequence</i> (codierende Sequenz) |
| CLSM | <i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i> |
| CP | <i>Plexus chorioideus</i> |
| CSF | Zerebrospinalflüssigkeit |
| d | Durchmesser |
| d.h. | das heißt |
| Da | Dalton |
| d _A | Außendurchmesser |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| dCTP | Desoxycytosintriphosphat |
| ddH ₂ O | bidestilliertes Wasser |
| ddNTP | Didesoxynukleosidtriphosphat |
| dGTP | Desoxyguanosintriphosphat |
| DIV | day(s) in vitro |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMPC | Dimethylpyrocarbonat |

| | |
|----------------------|--|
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| ds | <i>doublestranded</i> (doppelsträngig) |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH |
| <i>DTT</i> | Dithiothreitol |
| dTTP | Desoxytyrosintriphosphat |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EC ₅₀ | halbmaximaler Dosis-Wirkungs-Wert |
| ECIS | <i>electric cell substrate sensing</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGFP | verbessertes grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>) |
| et al. | <i>et alii</i> (und andere) |
| EYFP | verbessertes gelb fluoreszierendes Protein (<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>) |
| FCS | <i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum) |
| <i>for</i> | <i>forward</i> |
| g | Fallbeschleunigung $\approx 9,8 \text{ m/s}^2$ |
| GAPDH | Glyceral-3-phosphat Dehydrogenase |
| GFP | <i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein |
| GR | Glucocorticoidrezeptor |
| <i>GRE</i> | <i>glucocorticoid response element</i> |
| gRNA | Gesamt-RNA |
| h | <i>hour(s)</i> , (Stunde(n)) |
| hABCG2 | siehe ABC* |
| HC | Hydrocortison |
| <i>HEK 293</i> | <i>human embryonic kidney - 293</i> |
| <i>HeLa</i> | Zelllinie eines epitheloiden Zervixkarzinom einer 31-Jahre alten schwarzen Frau |
| <i>Hoechst 33342</i> | ((2'-[4-Ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1Hbenzimidazol)) |
| <i>HUVEC</i> | <i>human umbilical vein endothelial cells</i> (humane Endothelzellen der Nabelschnur) |
| <i>IPTG</i> | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| Konfluenz | Adhärenz wachsende Zellen schließen sich als Monolayer zusammen |
| l | Liter |
| LB | <i>lysogeny broth</i> (Nährmedium für Bakterien) |
| M | Molar (mol/l) |
| <i>MDCK</i> | <i>Madin-Darby canine kidney cells</i> (Madin-Darby Hunde-Nierenzellen) |
| <i>MDR</i> | <i>multidrug resistance</i> (pleiotrope Resistenz gegen eine Vielzahl strukturell bzw. funktionell unterschiedlicher Agenzien) |
| MDR1 | <i>multidrug resistance protein 1</i> = humanes P-Gp Klasse 1 |
| MDR2 | <i>multidrug resistance protein 2</i> = humanes P-Gp Klasse 2 |
| min | Minute |
| MOI | Multiplizität der Infektion (Verhältnis der Zahl zugegebener infektiöser Viruspartikel zu der bekannten Zahl von Zellen in einer Kultur) |

| | |
|-----------------|--|
| MOPS | 3-(N-morpholino)propansulfonsäure |
| mRNA | <i>messenger ribonucleic acid</i> |
| MRP* (ABCC) | <i>multidrug resistance associated protein</i> * |
| * = 1,2,3,4,5,6 | In Fällen, in denen die Spezieszuordnung nicht eindeutig ist, wurde dem Protein- oder Gen-Namen speziesabhängig ein kleiner Buchstabe vorangestellt: h = Mensch, p = Schwein, m = Maus, r = Ratte (z.B. hMRP). Darüber hinaus wurde bei nicht menschlichen Spezies die Bezeichnung nach dem „M“ klein geschrieben (z.B. pMrp oder rMrp). MRP-Gene wurden kursiv geschrieben (z.B. <i>pMrp</i>). |
| n/v | nicht vorhanden |
| NADH | Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid |
| NADPH | Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotidphosphat |
| NCBI | <i>National Centre for Biotechnology Information</i> |
| NCS | <i>newborn calf serum</i> |
| NF-κB | nukleärer Faktor-κB |
| nt | Nukleotid(e) |
| OD | Optische Dichte |
| ORF | <i>open reading frame</i> (offenes Leseraster) |
| pAbcg2 | siehe ABC* |
| PAGE | Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese |
| PBCEC | <i>porcine brain capillary endothelial cells</i> (porcine Hirn-Kapillarendothelzellen) |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion) |
| P-Gp | P-Glykoprotein, Im Menschen Genprodukt des <i>MDR1</i> bzw. <i>MDR2</i> -Gens <i>MDR1</i> -P-Gp (ABCB1): gehört zu den <i>MDR</i> -Transportern <i>MDR2</i> -P-Gp (ABCB1): an Tranlozierung von Phosphatidylcholin beteiligt In Fällen in denen die Spezieszuordnung nicht eindeutig ist, wurde dem Protein- oder Gen-Namen speziesabhängig ein kleiner Buchstabe vorangestellt: h = Mensch, p = Schwein, m = Maus, r = Ratte (z.B. pP-Gp). |
| PMEA | 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenin |
| PP | Polypropylen |
| qRT-PCR | <i>quantitative real-time PCR</i> |
| Rev | revers |
| RFU | relative Fluoreszenzeinheit |
| RNA | ribonucleic acid (Ribonukleinsäure) |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| rRNA | <i>ribosomal ribonucleic acid</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| s | Sekunde |
| s.u. | siehe unten |
| SD | <i>standard deviation</i> (Standardabweichung) |
| SDS | <i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat) |
| SFM | Serumfreies Medium |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> (kleine interferierende RNA) |

| | |
|---------------|--|
| <i>SLC</i> | <i>solute carrier family</i> |
| <i>SLC22</i> | <i>solute carrier family 22</i> |
| <i>SLCO</i> | <i>solute carrier organic anion transporter family</i> (alte Bez. <i>SLC21</i>) |
| <i>SNP</i> | <i>single nucleotide polymorphism</i> |
| Tab. | Tabelle |
| TEER | <i>transendothelial/epithelial electrical resistance</i> (Transendothelialer/epithelialer elektrischer Widerstand) |
| <i>TEMED</i> | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamine |
| <i>TJ</i> | <i>tight junctions</i> |
| Tris | Tris-(hydroxy-methyl)-aminomethan |
| U | <i>unit</i> |
| UV | Ultraviolett |
| V | <i>voltage</i> (Spannung) |
| v/v | <i>volume per volume</i> |
| VIS | <i>visible</i> (sichtbar) |
| vol | Volumen |
| W | Watt |
| w/w | <i>weight per volume</i> |
| WWU | Westfälische Wilhelms-Universität |
| <i>X-Gal</i> | 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid |
| ZNS | Zentralnervensystem |
| ZO | zonula occludens |
| β -EtSH | β -Mercaptoethanol |
| μ g | Mikrogramm |
| μ l | Mikroliter |

Aminosäuren (AS)

Einbuchstaben und Dreibuchstabencode

| | | | | | |
|---|-----|--------------|---|-----|------------|
| A | Ala | Alanin | M | Met | Methionin |
| C | Cys | Cystein | N | Asn | Asparagin |
| D | Asp | Aspartat | P | Pro | Prolin |
| E | Glu | Glutamat | Q | Gln | Glutamin |
| F | Phe | Phenylalanin | R | Arg | Arginin |
| G | Gly | Glycin | S | Ser | Serin |
| H | His | Histidin | T | Thr | Threonin |
| I | Ile | Isoleucin | V | Val | Valin |
| K | Lys | Lysin | W | Trp | Tryptophan |
| L | Leu | Leucin | Y | Tyr | Tyrosin |

8.2. Material

8.2.1. Chemikalien / Kits

| Name | Firma |
|---|---|
| 1 kb DNA Leiter | <i>New England Biolabs</i> (Beverly/MA, U.S.A.) |
| 10 x Ligationspuffer | <i>New England Biolabs</i> (Beverly/MA, U.S.A.) |
| 100 bp DNA Leiter | <i>Life technologies</i> (Eggenstein, Deutschland) |
| <i>5x First-Strand-Puffer</i> | <i>Life technologies</i> (Eggenstein, Deutschland) |
| Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1) | <i>AppliChem</i> (Darmstadt, Deutschland) |
| Agar | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Agarose NEEO | <i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland) |
| Ampicillin | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| APS (Ammoniumperoxodisulfat) | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>Aqua-Poly/Mount Coverslipping Medium</i> | <i>Polysciences Europe</i> (Eppelheim, Deutschland) |
| Bromphenolblau | <i>Amersham Biosciences</i> (Freiburg, Deutschland) |
| BSA (bovines Serumalbumin) | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Calciumchloridhexahydrat (CaCl ₂ 6 H ₂ O) | <i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland) |
| <i>CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay</i> | <i>Promega</i> (Madison/Wisconsin, U.S.A.) |
| Collagen G | <i>Biochrom AG</i> (Berlin, Deutschland) |
| Collagenase/Dispase-II aus <i>Vibrio alginolyticus</i> und <i>Bacillus polymyxa</i> | <i>Roche</i> (Mannheim, Deutschland) |
| pCMV-EGFP | <i>Clontech Laboratories</i> (Palo Alto/CA, USA) |
| <i>Cyclosporin A</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| dATP, dCTP, dGTP, dTTP | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>DC Protein Assay</i> | <i>BioRad</i> (Hercules/Kalifornien, U.S.A.) |
| <i>Dextran</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>DMEM/Ham's F12-Medium</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| DMPC | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| DMSO | Riedel-de Haen, Seelze |
| <i>DTT</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>Dulbeccos MEM</i> (1x) | <i>Biochrom AG</i> (Berlin, Deutschland) |
| <i>Earle's Medium M199</i> (1x) | <i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland) |
| <i>ECL Western Blotting Detection Reagents</i> | <i>GE Healthcare Bio-Sciences</i> (Uppsala, Schweden) |
| EDTA | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Ethanol | Chemikalienkammer, WWU Münster |
| Ethidiumbromid | <i>Roth</i> (Karlsruhe, Deutschland) |
| <i>Etoposide</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin</i> | <i>Pierce</i> (Rockford/Illinois, U.S.A.) |
| <i>FCS (fetal calf serum)</i> | <i>Life technologies</i> (Eggenstein, Deutschland) |

| | |
|---|--|
| <i>Ficoll 400</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>Fomitremorgin C</i> (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S. Bates & R. Robey) | <i>Center for research</i> (Bethesda, U.S.A.) |
| Gelatine, porcine skin, 300 bloom | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Gentamycin | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>GF 120918</i> | <i>Glaxo Welcome</i> (U.K.) |
| Glucose | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Glutardialdehyd | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Glycerol | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Glycin | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Hefe Extract | <i>Life technologies</i> (Eggenstein, Deutschland) |
| <i>Hoechst 33342</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Hydrocortison | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>IPTG</i> | <i>Biomol</i> (Hamburg, Deutschland) |
| Isopropanol | <i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland) |
| Kaliumacetat | <i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland) |
| Kaliumchlorid (KCl) | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | <i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland) |
| Kanamycin | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>KOD Hot Start DNA Polymerase</i> | <i>Novagen</i> (Madison/Wisconsin, U.S.A.) |
| L-Glutamin (200 mM) | <i>Biochrom AG</i> (Berlin, Deutschland) |
| <i>LipofectamineTM 2000</i> | <i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland) |
| LysoTrackerGreen | <i>Molecular ProbesTM, Invitrogen</i> (Karlsruhe) |
| <i>M 199 Earle</i> (1x) | <i>Seromed</i> , (Berlin, Deutschland) |
| Magermilchpulver | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>MEM Earle</i> (1x) | <i>Biochrom AG</i> (Berlin, Deutschland) |
| Methanol | <i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland) |
| <i>Methotrexat</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>Mifepriston</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>Mitoxantron</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Molekulargewichtsmarker (<i>prestained molekular weight marker</i>) | <i>New England Biolabs</i> (Beverly/MA, U.S.A.) |
| MOPS | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>Mucasol[®]</i> | <i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland) |
| Natriumacetat | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Natriumbutytrat | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Natriumchlorid (NaCl) | <i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland) |
| Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O) | <i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland) |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Natriumhydroxid | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |

| | |
|--|--|
| <i>NCS (newborn calf serum)</i> | <i>PAA</i> (Linz, Österreich) |
| <i>NEAA (Non-Essential Amino Acids)</i> | |
| <i>Novobiocin</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>Oligofectamine™ 2000</i> | <i>Invitrogen</i> (Karlsruhe, Deutschland) |
| Paraformaldehyd | <i>Merck</i> (Darmstadt, Deutschland) |
| Penicillin/Streptomycin | <i>Seromed</i> , (Berlin, Deutschland) |
| Peptone | <i>Life technologies</i> (Eggenstein, Deutschland) |
| <i>Percoll</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>PNGase F</i> (Peptid-N-Glykosidase) | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Poly-D-Lysin (Hydrobromid) | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Protease/Dispase II aus <i>Bacillus polymyxa</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Protease-Inhibitor-Cocktail „Complete EDTA-free“ | Roche (Basel, Schweiz) |
| <i>Protogold</i> | <i>British Biocell International</i> (Cardiff, UK) |
| <i>PSC 833</i> | <i>Novartis</i> (Basel, Schweiz) |
| <i>Puromycin</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>QIAGEN Maxi Prep Kit</i> | <i>QIAGEN</i> (Hilden, Deutschland) |
| <i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i> | <i>QIAGEN</i> (Hilden, Deutschland) |
| <i>QIAquick Gel Extraction Kit</i> | <i>QIAGEN</i> (Hilden, Deutschland) |
| <i>qPCR™ Core Kit for SYBR® Green I</i> | <i>Eurogentec</i> , Seraing (Belgien) |
| Rattenschwanz-Collagen | Eigenpräparation, Uni Münster |
| Restriktionsenzyme und Puffer | <i>New England Biolabs</i> (Beverly/MA, U.S.A.) |
| <i>RNase A</i> | <i>QIAGEN</i> (Hilden, Deutschland) |
| <i>RNeasy Mini Kit</i> | <i>QIAGEN</i> (Hilden, Deutschland) |
| Salzsäure | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>SmartLadder</i> | <i>Eurogentec</i> (Köln, Deutschland) |
| Streptomycin | <i>Seromed</i> , (Berlin, Deutschland) |
| <i>Superscript™ II RNase H reverse Transkriptase</i> | <i>Life technologies</i> (Eggenstein, Deutschland) |
| T4-DNA-Ligase | <i>New England Biolabs</i> (Beverly/MA, U.S.A.) |
| T4-Ligase-Puffer | <i>New England Biolabs</i> (Beverly/MA, U.S.A.) |
| <i>Taq Polymerase</i> | <i>New England Biolabs</i> (Beverly/MA, U.S.A.) |
| <i>TEMED</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>Tris (Base)</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>Triton-X 100</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| Trypsin, 0,25 % (w/v) in <i>PBS</i> | <i>Seromed</i> , (Berlin, Deutschland) |
| <i>Tween-20</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>UltraLink® Immobilized NeutrAvidin™</i> | <i>Pierce</i> (Rockford/Illinois, U.S.A.) |
| Verapamil | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>Vinblastin</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |
| <i>Vincristin</i> | <i>Sigma Aldrich</i> (Deisendorf, Deutschland) |

X-Gal β -Mercaptoethanol*Roth* (Karlsruhe, Deutschland)*Sigma Aldrich* (Deisendorf, Deutschland)

8.2.2. Verbrauchsmaterialien

Name

100 mm 60 mm Kulturschalen

12-well-Filterplatte (3401)

12-well-Mikroplatte

6-well-Mikroplatte

96-well-Mikroplatte

Einfrier-Cryo-Röhrchen

HybondTM ECLTM Nitrozellulose Membran*Hyperfilm MP**Lab-TekTM Chambered Coverglass 8-well**Nunc EasYFlasksTM NunclonTMA*(75cm²-Kulturflaschen)*Nunc EasYFlasksTM NunclonTMA*(25cm²-Kulturflaschen)

Petrischalen

PP-Röhrchen, 10 u. 50 ml

Zellkultur Mikroplatte, 96 well

Firma

Costar, Bodenheim*Costar® Corning Incorporated* (NY, U.S.A.)*Nunc* (Wiesbaden, Deutschland)*Nunc* (Wiesbaden, Deutschland)*Nunc* (Wiesbaden, Deutschland)*GE Healthcare Bio-Sciences* (Uppsala, Schweden)*GE Healthcare Bio-Sciences* (Uppsala, Schweden)*Nunc* (Wiesbaden, Deutschland)*Nunc* (Wiesbaden, Deutschland)*Nunc* (Wiesbaden, Deutschland)*Greiner Bio-One* (Frickenhausen, Deutschland)*Greiner Bio-One* (Frickenhausen, Deutschland)*Greiner Bio-One* (Frickenhausen, Deutschland)

8.2.3. Geräte und Software

Name

Densitometer und

Software *Phoretix Total Lab*, Version 2003*Fluoreszenz reader GENios*Haemocytometer (*Bürker*)

konfokales Laser-Scanning-Mikroskop TCS

*Mastercycler gradient**Mastercycler person*Mikroplattenphotometer *MPP4008*Phasenkontrastmikroskop *DC 300F*Software *Primer Express v 1.0*Sterilbank: *Type MS-2010 1.2/1.8*

Sterilisator: UT 6120

Thermocycler *GeneAMP[®] 5700*UV-VIS-Spektrometer *Shimadzu UV-1601 PC*UV-VIS-Spektrometer *Shimadzu UV-2100**Vertical Mini-Gel-System*

Firma

Biostep (Jahnsdorf, Deutschland)*Tecan* (Crailsheim, Deutschland)*Fischer* (Frankfurt, Deutschland)*Leika* (Wetzlar, Deutschland)*Eppendorf* (Hamburg, Deutschland)*Eppendorf* (Hamburg, Deutschland)*Mikrotek Laborsysteme* (Overath, Deutschland)*Leika* (Wetzlar, Deutschland)*Applied Biosystems* (Foster City, U.S.A.)*Holten* (Dänemark, Deutschland)*Heraeus* (Hanau, Deutschland)*PE Biosystems* (Foster City, U.S.A.)*Shimadzu* (Düsseldorf, Deutschland)*Shimadzu* (Düsseldorf, Deutschland)*Sigma Aldrich* (Deisendorf, Deutschland)

| | |
|---|---|
| Wärmeschrank | <i>Heraeus</i> (Hanau, Deutschland) |
| Wasserbad GFL 1004 | Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland) |
| Zentrifuge 5415 C | <i>Eppendorf</i> (Hamburg, Deutschland) |
| Zentrifuge 5804 R | <i>Eppendorf</i> (Hamburg, Deutschland) |
| Zentrifuge <i>Avanti 300</i> | <i>Beckman</i> (München, Deutschland) |
| Zentrifuge <i>J2-21</i> | <i>Beckman</i> (München, Deutschland) |
| Zentrifuge <i>Sepatech Megafuge 1.0</i> | <i>Heraeus</i> (Hanau, Deutschland) |

8.3. Genotyp des verwendeten *E. coli* K12 Stammes

TOP 10F` F' {*lacI^q* Tn10(Tet^R)} *mcrA* Δ (*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15
 Δ *lacX74recA1* *deoR* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (*StrR*) *endA1*
nupG

8.4. Primer/siRNA

Die verwendeten Primer wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma *Proligo* bestellt.

PCR-Primer für die Vektorkonstruktion:

| | |
|---------------------------|---|
| pAbcg2_For | 5'-CTG AGA TTG GAG CCC TTG GTT GA-3' |
| pAbcg2-Rev | 5'-TTC TCT TTA ATG GGG GGT AAG TGG TGT AAC-3' |
| pAbcg2_S_forw | 5'-GCC GGA ATT CCG GCA CTC CAG ATG TCC TCC AAT AGT TAC C-3' |
| pAbcg2_S_rev | 5'-GGC CGG AAT TCC GCT CGA GCA TGG GGG TAA GTG GTG TAA CCT AGA GG-3' |
| Schnitt_c1_fo2_por | 5'-GTG AGA CTC GAG GAG CAC TCC AGA TGT CCT-3' |
| Schnitt_c1_rev | 5'-GTG GTG GAT CCT AGA GGG GAA TTT AGG AGT-3' |

qRT-PCR-Primer:

| | |
|---------------------|-----------------------------|
| β-Actin forw | 5'-CCTGACGGACTACCTCATGAA-3' |
| β-Actin forw | 5'-TCACGCACGATTACCCTCTCA-3' |
| BMDP for | 5'-CCTTACTGGCTTCCGGGAAA-3' |
| BMDP rev | 5'-GTGGTAACCTGCTGATGCAA-3' |

Sequenzierungsprimer:

| | |
|------------------------|-------------------------------------|
| pEYFP-C forward | 5'-CAA GAC CCC AAC GAG AAG-3' |
| pEYFP-C reverse | 5'-AGC TGC AAT AAA CAA GTT-3' |
| 365MDP_for | 5'-GTT ACG TGG TAC AGG ATG AC-3' |
| 1033MDP_for | 5'-GAC ACG AAG GTT GAG TTA GA-3' |
| M13rev | 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' |
| T7 | 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3' |
| BGH rev | 5'- TAG AAG GCA CAG TCG AGG -3' |
| CMV for | 5'- CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG -3' |

siRNA-Sequenzen:

siRNA gegen Lamin A und C:

| | | |
|--------------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| siLamin A/C¹ | sense siRNA | 5'-CUG GAC UUC CAG AAG AAC AdTdT-3' |
| | antisense siRNA | 5'-UGU UCU UCU GGA AGU CCA GdTdT-3' |

siRNA gegen Abcg2:

| | | |
|--------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| siAbcg2-1e² | sense siRNA | 5'-AUC UUC GUU GUU AGA UGU CdTdT-3' |
| | antisense siRNA | 5'-GAC AUC UAA CAA CGA AGA UdTdT-3' |
| siAbcg2-2e² | sense siRNA | 5'-ACA AGG ACG GAC CAT CAT CdTdT-3' |
| | antisense siRNA | 5'-CAU GAU CCU CCG UCC UUG UdTdT-3' |
| siAbcg2-1³ | sense siRNA | 5'-CGA CCA CCA UGA CAA AUC AdTdT-3' |
| | antisense siRNA | 5'-UGA UGU GUC AUG GUG GUC GdTdT-3' |
| siAbcg2-2³ | sense siRNA | 5'-AGA GUU GGG UCU GGA UAA AdTdT-3' |
| | antisense siRNA | 5'-UUU AUC CAG ACC CAA CUC UdTdT-3' |
| siAbcg2-3³ | sense siRNA | 5'-GGA UUA ACA UGG UCA UUC AdTdT-3' |
| | antisense siRNA | 5'-UGA AUG ACC AUG UUA UAC CdTdT-3' |
| siAbcg2-4³ | sense siRNA | 5'-ACA CGA AGG UUG AGU UAG AdTdT-3' |
| | antisense siRNA | 5'-UCU AAC UCA ACC UUC GUG UdTdT-3' |
| siAbcg2-Kontrolle³ | sense siRNA | 5'-ACA AGA CGA UUG AGG UUG AdTdT-3' |
| | antisense siRNA | 5'-UCA ACC UCA AUC GUC UUG UdTdT-3' |

¹ gekauft von *Xeragon*

² gekauft von *Eurogentec*

³ gekauft von *Invitrogen*

8.5. Sequenzen der klonierten Transporter

pAbcg2 (657 AS)

a = ORF des *pAbcg2* im pAbcg2/pcDNA3- und pAbcg2/pcDNA4-Vektor

(entspricht bis auf 615t>c (neutrale Mutation) der codierenden Sequenz (CDS) von *BMDP* (*pAbcg2*) in der *NCBI*-Datenbank unter dem Eintrag NM_214010.1)

b = ORF des *pAbcg2* im pAbcg2/pEYFP-Vektor

(entspricht bis auf 615t>c (neutrale Mutation) und 1691c>t (bewirkt Aminosäureänderung Pro564Leu) der CDS von *BMDP* (*pAbcg2*) in der *NCBI*-Datenbank unter dem Eintrag NM_214010.1)

c = Aminosäuresequenz

Schwarz hinterlegte Buchstaben (■) zeigen *SNPs* gegenüber *NCBI*-Datenbankeintrag an, siRNA-Zielsequenzen sind **fett** und unterstrichen dargestellt

a atgtcctccaatagttaccaagtttcaatcccgatgtcaaaaaggaacaccaatggcctgcccggggtcca 70
b atgtcctccaatagttaccaagtttcaatcccgatgtcaaaaaggaacaccaatggcctgcccggggtcca
c M S S N S Y Q V S I P M S K R N T N G L P G S
a gctccaatgagctgaagacgtctgctgggggagctgtggttaagctttcatgacatctgctatcgagtgaa 140
b gctccaatgagctgaagacgtctgctgggggagctgtggttaagctttcatgacatctgctatcgagtgaa
c S S N E L K T S A G G A V L S F H D I C Y R V K
a agtgaagagtggtctttcttttttgtcggaaaacggttgagaaggaataactgacgaacatcaatggggtc 210
b agtgaagagtggtctttcttttttgtcggaaaacggttgagaaggaataactgacgaacatcaatggggtc
c V K S G F L F C R K T V E K E I L T N I N G I
a atgaaacctggcctcaatgccattctgggacccacaggtggaggcaaatcttcggttgtagatgtcttag 280
b atgaaacctggcctcaatgccattctgggacccacaggtggaggcaaatcttcggttgtagatgtcttag
c M K P G L N A I L G P T G G G K S S L L D V L
a ctgcaaggaagatccgcatggattatctggagatgttttgatcaatgggacacctcgacactgccaat 350
b ctgcaaggaagatccgcatggattatctggagatgttttgatcaatgggacacctcgacactgccaat
c A A R K D P H G L S G D V L I N G A P R P A N F
a taaatgtaactcaggttacgtggtacaggatgacgtcgtgatgggaacgctgacagtgaagaaaaactta 420
b taaatgtaactcaggttacgtggtacaggatgacgtcgtgatgggaacgctgacagtgaagaaaaactta
c K C N S G Y V V Q D D V V M G T L T V R E N L
a cagttctcggcagctcttcggcttccgaccaccatgacaaatcatgaaaaaatgagcggattaacatgg 490
b cagttctcggcagctcttcggcttccgaccaccatgacaaatcatgaaaaaatgagcggattaacatgg
c Q F S A A L R L P T T M T N H E K N E R I N M
a tcattcaagaggttggtctggtataaagtggccgattccaaggtgggaacccagtttatccggtggtgtgc 560
b tcattcaagaggttggtctggtataaagtggccgattccaaggtgggaacccagtttatccggtggtgtgc
c V I Q E L G L D K V A D S K V G T Q F I R G V S
a tggaggagaaaagaaaacggactagtattgcaatggagcttattactgaccgctcatcttggtcctggat 630
b tggaggagaaaagaaaacggactagtattgcaatggagcttattactgaccgctcatcttggtcctggat
c G G E A R K R T S I A M G E L I T D P S I L F L D
a gagcccacgactggttagactccagcacagcaaatgctgtccttttgctcctgaagaggatgtctaaac 700
b gagcccacgactggttagactccagcacagcaaatgctgtccttttgctcctgaagaggatgtctaaac
c E P T T G L D S S T A N A V L L L L K R M S K
a siAbcg2-2e
aaggacggaccatcatcttctccattcatcagcctcgttactccatctttaagttggttgatagcctcac 770
b aaggacggaccatccttctccattcatcagcctcgttactccatctttaagttggttgatagcctcac
c Q G R T I I F S I H Q P R Y S I F K L F D S L T
a ctgtgtggcctcaggaagactcatgttccatggacctgctcgggaggccttgggatactttgcctccatc 840
b ctgtgtggcctcaggaagactcatgttccatggacctgctcgggaggccttgggatactttgcctccatc
c L L A S G R L M F H G P A R E A L G Y F A S I
a ggttacaactgtgagccctacaacaaccccgagacttcttctgagcgtcattaacggcgactcctccg 910
b ggttacaactgtgagccctacaacaaccccgagacttcttctgagcgtcattaacggcgactcctccg
c G Y N C E P Y N N P A D F F L D V I N G D S S
a ctgtggtggttaagcagagcggacagagacgaggagcccaagagcccgaagagcctcccagaaaagatac 980
b ctgtggtggttaagcagagcggacagagacgaggagcccaagagcccgaagagcctcccagaaaagatac
c A V V L S R A D R D E G A Q E P E E P P E K D T
a tcccctcatagacaaaacttgctgctgttttataccaactcctccttcttcaaggacacgaaggttgagtta 1050
b tcccctcatagacaaaacttgctgctgttttataccaactcctccttcttcaaggacacgaaggttgagtta
c P L I D K L A A F Y T N S S F F K D T K V E L
a gatcagttctcagggggtcggagaagaagaagagctcgggtgtacaaggaggtcacctacaccacctcct 1120
b gatcagttctcagggggtcggagaagaagaagagctcgggtgtacaaggaggtcacctacaccacctcct
c D Q F S G G R K K K K S S V Y K E V T Y T T S
a tctgtcatcagctccgatggatttccaggcgttcttcaaaaacttactgggtaatccccaggcgtccgt 1190
b tctgtcatcagctccgatggatttccaggcgttcttcaaaaacttactgggtaatccccaggcgtccgt
c F C H Q L R W I S R R S F K N L L G N P Q A S V
a agcccagataattgtgacgatcatcctgggctggttataggtgccatcttctatgatctgaaaaatgat 1260
b agcccagataattgtgacgatcatcctgggctggttataggtgccatcttctatgatctgaaaaatgat
c A Q I I V T I I L G L V I G A I F Y D L K N D
a ccctcaggaatccagaacagagccggagtgctcttcttctgacaaccaaccagtgtttcagcagcgtct 1330
b ccctcaggaatccagaacagagccggagtgctcttcttctgacaaccaaccagtgtttcagcagcgtct
c P S G I Q N R A G V L F F L T T N Q C F S S V
a cgcccggtggagctccttgtggtggagaagaaactctttatacatgaatatatcagtgatactacagagt 1400
b cgcccggtggagctccttgtggtggagaagaaactctttatacatgaatatatcagtgatactacagagt
c S A V E L L V V E K K L F I H E Y I S G Y Y R V

```

a gtcacatcttattttcttcgaaaactgttatcggatttactacccatgaggatggtaccaagcattatcttt 1470
b gtcacatcttattttcttcgaaaactgttatcggatttactacccatgaggatggtaccaagcattatcttt
c S S Y F F G K L L S D L L P M R M L P S I I F

a acttgataacgtacttcttgtaggactgaagcccgcgggtggggtccttcttcatcatgatggtttacc 1540
b acttgataacgtacttcttgtaggactgaagcccgcgggtggggtccttcttcatcatgatggtttacc
c T C I T Y F L L G L K P A V G S F F I M M F T

a tgatgatgggtggcgtactcagccagttccatggccctggccatagccgcccggtcagagcgtgggtctcc 1610
b tgatgatgggtggcgtactcagccagttccatggccctggccatagccgcccggtcagagcgtgggtctcc
c L M M V A Y S A S S M A L A I A A G Q S V V S V

a ggcaacacttctcatgaccatctcgtttgtggttcatgatgatcttttcggggctggttggtgaatctcaa 1680
b ggcaacacttctcatgaccatctcgtttgtggttcatgatgatcttttcggggctggttggtgaatctcaa
c A T L L M T I S F V F M M I F S G L L V N L K

a acggtcgtgctttgggtctcgtgggttacagtacttcagcattcctcgatacggcttttcggctttgcagt 1750
b acggtcgtgctttgggtctcgtgggttacagtacttcagcattcctcgatacggcttttcggctttgcagt
c T V V P W L S W L Q Y F S I P R Y G F S A L Q
L

a ataatgagtttttgggacaaaacttctgcccgggactcaacgctcacaacaacaataacctgtagcttccgc 1820
b ataatgagtttttgggacaaaacttctgcccgggactcaacgctcacaacaacaataacctgtagcttccgc
c Y N E F L G Q N F C P G L N V T T N N T C S F A

a aatatgtactggcgccgagatatttggaaaaccagggcatcagtcctctccgcttggggcctgtggcagaat 1890
b aatatgtactggcgccgagatatttggaaaaccagggcatcagtcctctccgcttggggcctgtggcagaat
c I C T G A E Y L E N Q G I S L S A W G L W Q N

a cacgtggccttggcgtgcatgatggtcattttcctgacgatcgccctacctgaaactgctactcctcaaaa 1960
b cacgtggccttggcgtgcatgatggtcattttcctgacgatcgccctacctgaaactgctactcctcaaaa
c H V A L A C M M V I F L T I A Y L K L L L L K

a aatactcctaa 1971
b aatactcctaa
K Y S *

```

hABCG2 (656 AS)

a = ORF des *hABCG2* im *hABCG2/pEYFP*-Vektor VON T. ENGEL

(entspricht bis auf c69a>g (neutrale Mutation) der CDS von *ABCG2* in der *NCBI*-Datenbank unter dem Eintrag NM_004827.2)

b = ORF des *hABCG2* im *hABCG2/pcDNA3.1*-Vektor von J. WEGENER

(entspricht der CDS von *ABCG2* in der *NCBI*-Datenbank unter dem Eintrag NM_004827.2)

c = Aminosäuresequenz

schwarz hinterlegter Buchstabe zeigt *SNP* gegenüber *NCBI*-Datenbankeintrag

```

a atgtcttccagtaatgtcgaagtttttatcccagtggtcacaaggaaacaccaatggcttccccgcgacgg 70
b atgtcttccagtaatgtcgaagtttttatcccagtggtcacaaggaaacaccaatggcttccccgcgacag
c M S S S N V E V F I P V S Q G N T N G F P A T

a cttccaatgacctgaaggcatttactgaaggagctgtgtaagttttcataacatctgctatcgagtaaa 140
b cttccaatgacctgaaggcatttactgaaggagctgtgtaagttttcataacatctgctatcgagtaaa
c A S N D L K A F T E G A V L S F H N I C Y R V K

a actgaagagtggcctttctaccttgtcgaaaaaccagtttgaaaagaatattatcgaatatcaatgggatc 210
b actgaagagtggcctttctaccttgtcgaaaaaccagtttgaaaagaatattatcgaatatcaatgggatc
c L K S G F L P C R K P V E K E I L S N I N G I

a atgaaacctggtctcaacgccatcctgggacccacaggtggaggcaaactcttcggttattagatgtcttag 280
b atgaaacctggtctcaacgccatcctgggacccacaggtggaggcaaactcttcggttattagatgtcttag
c M K P G L N A I L G P T G G G K S S L L D V L

```

a ctgcaaggaaagatccaagtggattatctggagatggttctgataaatggagcaccgacacctgccaattt 350
b ctgcaaggaaagatccaagtggattatctggagatggttctgataaatggagcaccgacacctgccaattt
c A A R K D P S G L S G D V L I N G A P R P A N F

a caaatgtaattcaggttacgtgggtacaagatgatggttgatgggactctgacggtgagagaaaaactta 420
b caaatgtaattcaggttacgtgggtacaagatgatggttgatgggactctgacggtgagagaaaaactta
c K C N S G Y V V Q D D V V M G T L T V R E N L

a cagttctcagcagctcttcggcttgaacaactatgacgaatcatgaaaaaacgaacggattaacaggg 490
b cagttctcagcagctcttcggcttgaacaactatgacgaatcatgaaaaaacgaacggattaacaggg
c Q F S A A L R L A T T M T N H E K N E R I N R

a tcattcaagagtttaggtctggataaagtggcagactccaaggttgaactcagtttatccgtggtgtgtc 560
b tcattcaagagtttaggtctggataaagtggcagactccaaggttgaactcagtttatccgtggtgtgtc
c V I Q E L G L D K V A D S K V G T Q F I R G V S

a tggaggagaaaaaaggactagtaggaatggagcttatcactgatccttccatcttgttcttggat 630
b tggaggagaaaaaaggactagtaggaatggagcttatcactgatccttccatcttgttcttggat
c G G E R K R T S I G M E L I T D P S I L F L D

a gagcctacaactggcttagactcaagcacagcaaatgctgtccttttgctcctgaaaaggatgtctaagc 700
b gagcctacaactggcttagactcaagcacagcaaatgctgtccttttgctcctgaaaaggatgtctaagc
c E P T T G L D S S T A N A V L L L L K R M S K

a agggacgaacaatcatcttctccattcatcagcctcgatattccatcttcaagttggttgatagcctcac 770
b agggacgaacaatcatcttctccattcatcagcctcgatattccatcttcaagttggttgatagcctcac
c Q G R T I I F S I H Q P R Y S I F K L F D S L T

a cttattggcctcaggaagacttatgttccacgggcctgctcaggaggccttgggatactttgaaatcagct 840
b cttattggcctcaggaagacttatgttccacgggcctgctcaggaggccttgggatactttgaaatcagct
c L L A S G R L M F H G P A Q E A L G Y F E S A

a ggttatcactgtgaggcctataataaccctgcagacttcttcttggacatcattaatggagattccactg 910
b ggttatcactgtgaggcctataataaccctgcagacttcttcttggacatcattaatggagattccactg
c G Y H C E A Y N A N P A D F F L D I I N G D S T

a ctgtggcattaaacagagaagaagactttaagccacagagatcatagagccttccaagcaggataagcc 980
b ctgtggcattaaacagagaagaagactttaagccacagagatcatagagccttccaagcaggataagcc
c A V A L N R E E D F K A T E I I E P S K Q D K P

a actcatagaaaaattagcggagatttatgtcaactcctccttctacaagagacaaaagctgaattacat 1050
b actcatagaaaaattagcggagatttatgtcaactcctccttctacaagagacaaaagctgaattacat
c L I E K L A E I Y V N S S F Y K E T K A E L H

a caactttccgggggtgagaagaagaagaagatcacagcttcaaggagatcagctacaccacctccttct 1120
b caactttccgggggtgagaagaagaagaagatcacagcttcaaggagatcagctacaccacctccttct
c Q L S G G E K K K K I T V F K E I S Y T T S F

a gtcacaaactcagatggggttccaagcggttcattcaaaaacttgctgggtaatcccaggcctctatagc 1190
b gtcacaaactcagatggggttccaagcggttcattcaaaaacttgctgggtaatcccaggcctctatagc
c C H Q L R W V S K R S F K N L L G N P Q A S I A

a tcagatcattgtcacagtcgactgggactgggtataggtgccatttactttgggctaaaaaatgattct 1260
b tcagatcattgtcacagtcgactgggactgggtataggtgccatttactttgggctaaaaaatgattct
c Q I I V T V V L G L V I G A I Y F G L K N D S

a actggaatccagaacagagctggggttcttcttctcctgacgaccaaccagtggttcagcagtggttcag 1330
b actggaatccagaacagagctggggttcttcttctcctgacgaccaaccagtggttcagcagtggttcag
c T G I Q N R A G V L F F L T T N Q C F S S V S

a ccgtggaactcttctgtggttagagaagaagctcttcatacatgaatacatcagcggatactacagagtgtc 1400
b ccgtggaactcttctgtggttagagaagaagctcttcatacatgaatacatcagcggatactacagagtgtc
c A V E L F V V E K K L F I H E Y I S G Y Y R V S

a atcttatttcttggaaaactgttatctgatttattaccatgaggatggttaccagttattatatttacc 1470
b atcttatttcttggaaaactgttatctgatttattaccatgaggatggttaccagttattatatttacc
c S Y F L G K L L S D L L P M R M L P S I I F T

a tgtatagtgtacttcatggttaggattgaagccaaaggcagatgccttcttctggttatgatggttaccctta 1540
b tgtatagtgtacttcatggttaggattgaagccaaaggcagatgccttcttctggttatgatggttaccctta
c C I V Y F M L G L K P K A D A F F V M M F T L

a tgatgggtggttattcagccagttccatggcactggccatagcagcagggtcagagtggtggttctgtagc 1610
b tgatgggtggttattcagccagttccatggcactggccatagcagcagggtcagagtggtggttctgtagc
c M M V A Y S A S S M A L A I A A G Q S V V S V A

a aacacttctcatgaccatctgttttgggttattgatgattttttcaggctctgttgggtcaatctcacaacc 1680
b aacacttctcatgaccatctgttttgggttattgatgattttttcaggctctgttgggtcaatctcacaacc
c T L L M T I C F V F M M I F S G L L V N L T T

a attgcatcttggctgtcatggcttcagtacttcagcattccacgatatggatttacggctttgcagcata 1750
b attgcatcttggctgtcatggcttcagtacttcagcattccacgatatggatttacggctttgcagcata
c I A S W L S W L Q Y F S I P R Y G F T A L Q H

a atgaatTTTTGGGACAAAacttctgccaggactcaatgcaacaggaacaatccttGtaactatgcaac 1820
b atgaatTTTTGGGACAAAacttctgccaggactcaatgcaacaggaacaatccttGtaactatgcaac
c N E F L G Q N F C P G L N A T G N N P C N Y A T

a atgtactggcgaagaatatttggtaaagcagggcatcgatctctcacctggggcttGtgaagaatcac 1890
b atgtactggcgaagaatatttggtaaagcagggcatcgatctctcacctggggcttGtgaagaatcac
c C T G E E Y L V K Q G I D L S P W G L W K N H

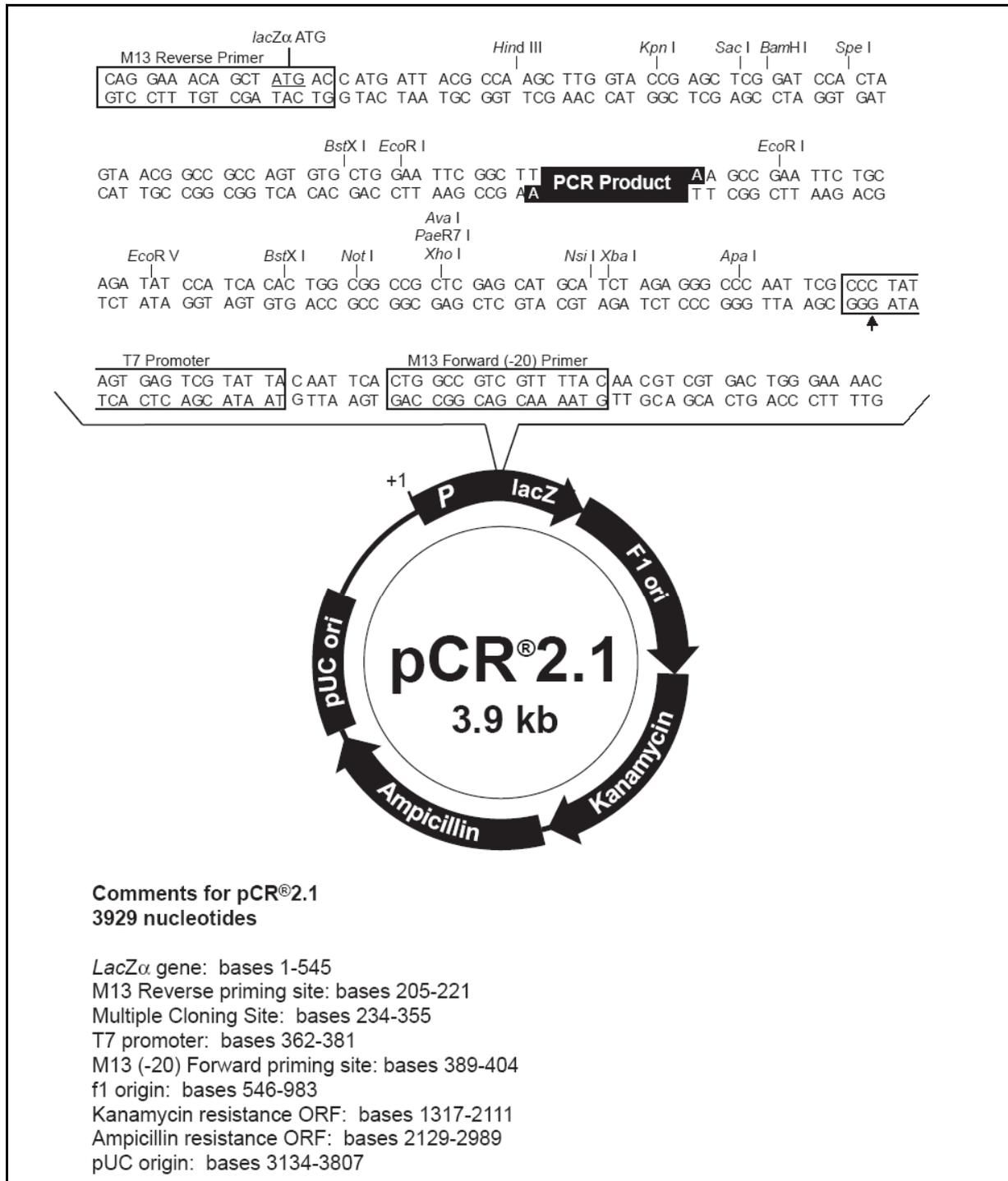
a gtggccttggcttGtatgattgTtattttcctcacaattgcctacctgaaattgTtatttcttaaaaaat 1960
b gtggccttggcttGtatgattgTtattttcctcacaattgcctacctgaaattgTtatttcttaaaaaat
c V A L A C M I V I F L T I A Y L K L L F L K K

a attcttaa 1968
b attcttaa
c Y S *

8.6. Vektoren

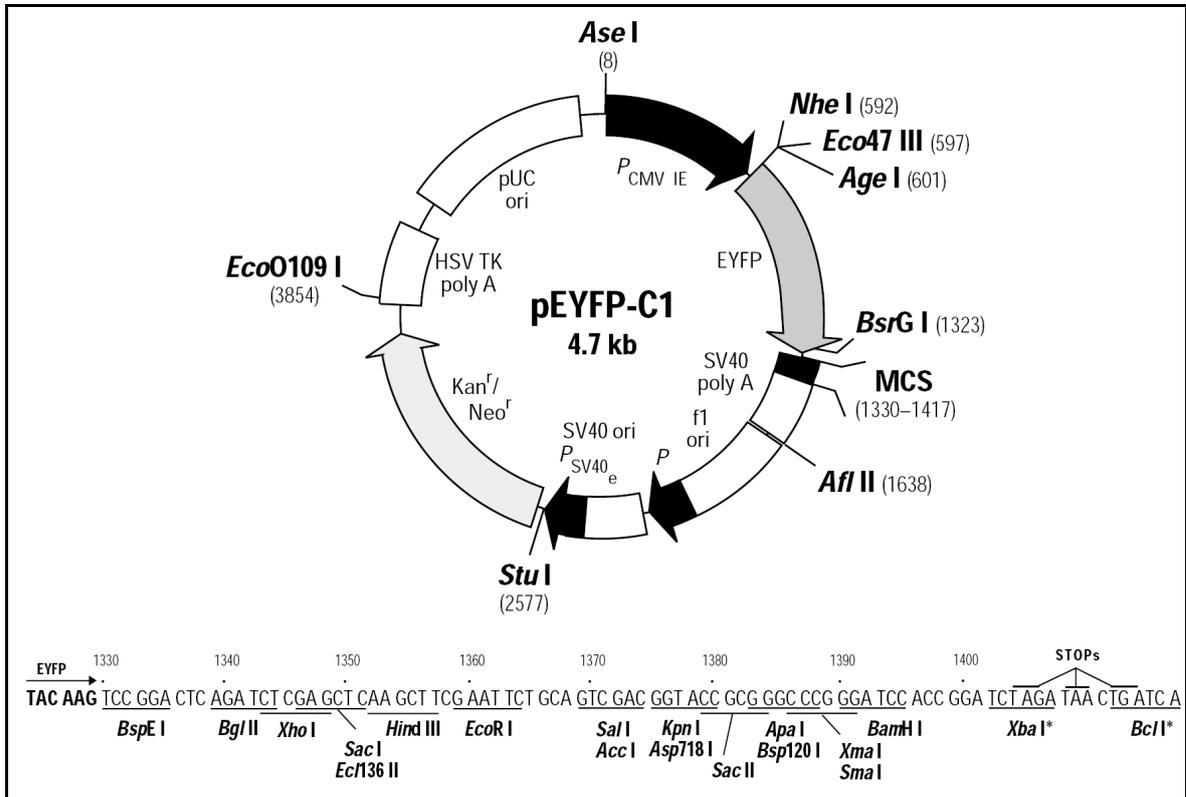
8.6.1. Klonierungsvektor

pCR.2.1 (*Invitrogen*)

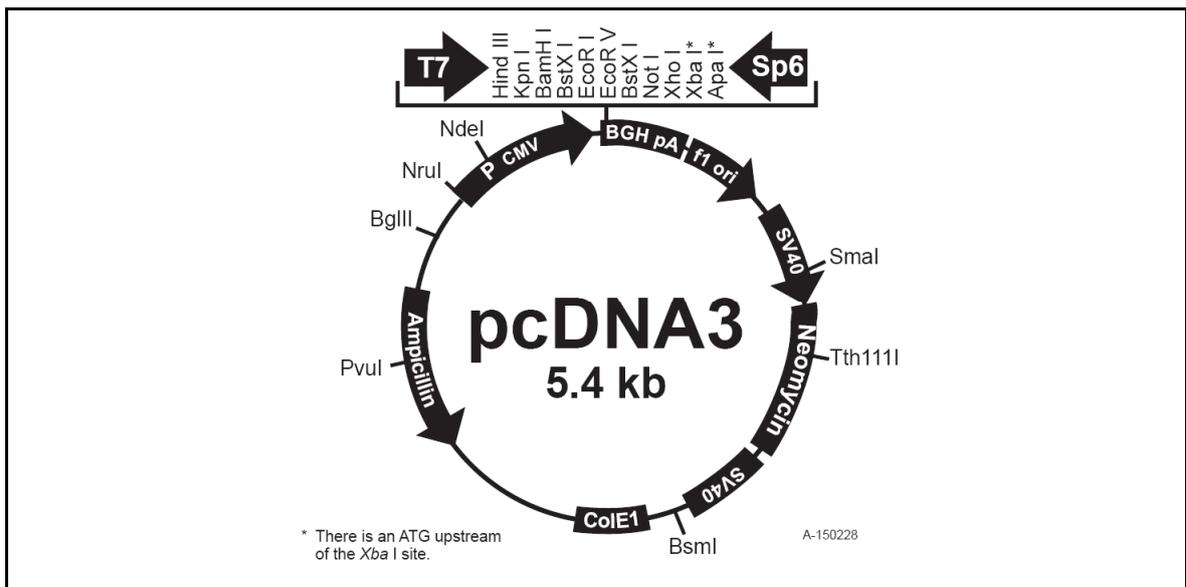


8.6.2. Eukaryotische Expressions-Vektoren/Systeme

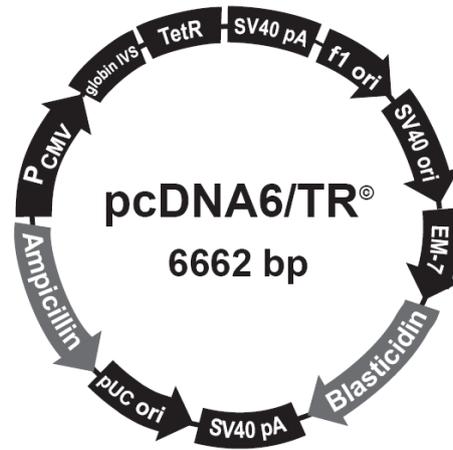
pEYFP-C1 (*BD Biosciences Clontech*)



pcDNA3 (*Invitrogen*)

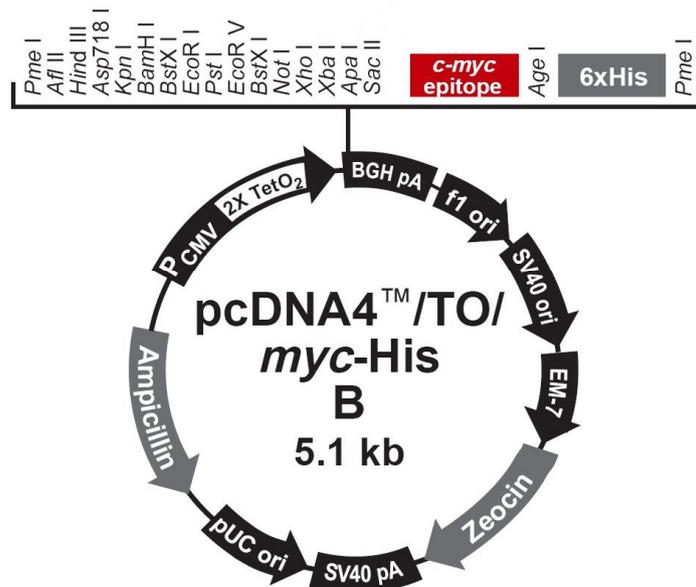


T-REx™-System (Invitrogen, bestehend aus pcDNA6/TR und pcDNA4™/TO/myc-His B)

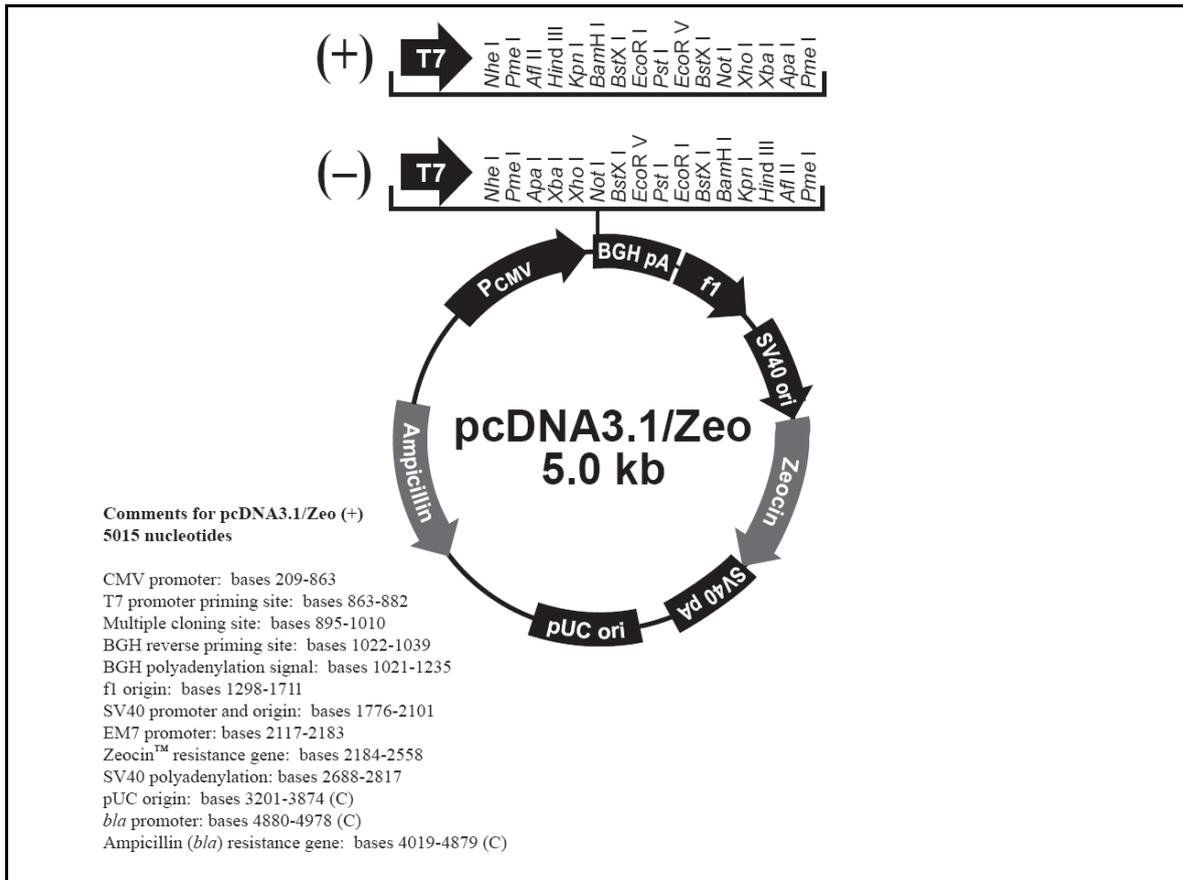


Comments for pcDNA6/TR®
6662 nucleotides

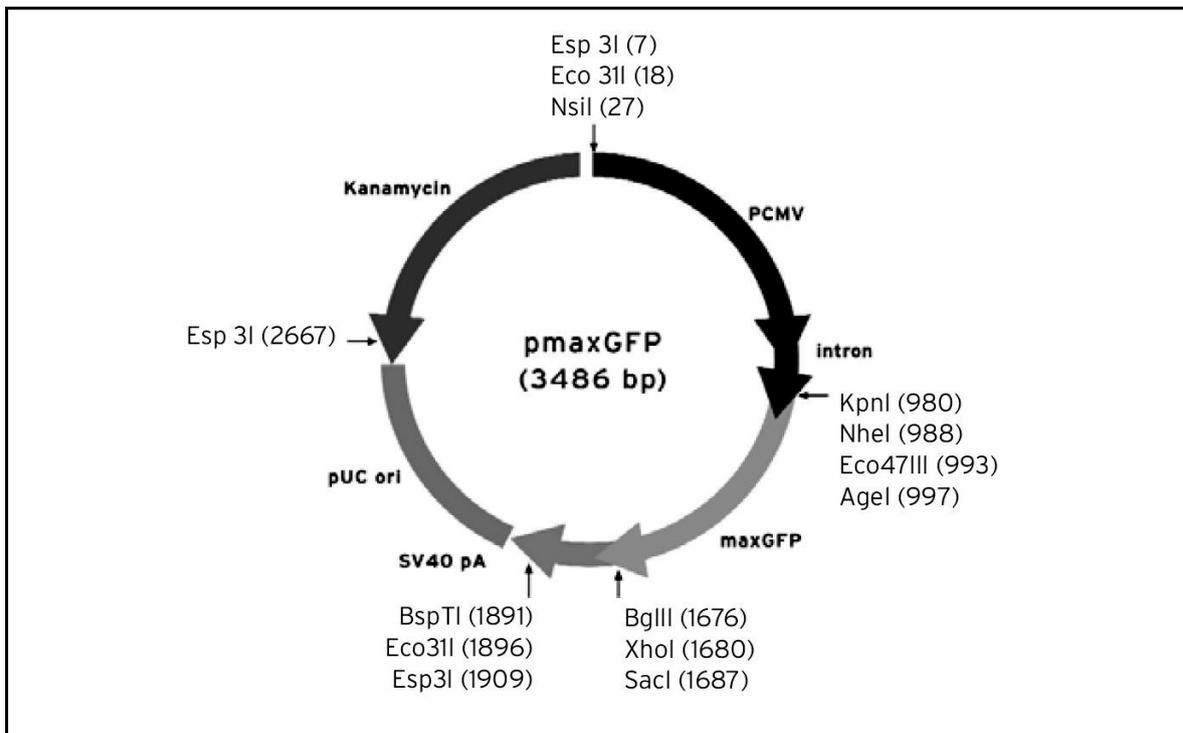
CMV promoter: bases 232-819
 Rabbit β-globin intron II (IVS): bases 1028-1600
TetR gene: bases 1684-2340
 SV40 early polyadenylation sequence: bases 2346-2477
 f1 origin: bases 2897-3325
 SV40 promoter and origin: bases 3335-3675
 EM-7 promoter: bases 3715-3781
 Blastidicin resistance gene: bases 3782-4180
 SV40 early polyadenylation sequence: bases 4338-4468
 pUC origin: bases 4851-5521
bla promoter: bases 6521-6625 (complementary strand)
 Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 5666-6526 (complementary strand)



pcDNA3.1/Zeo (+) (*Invitrogen*)

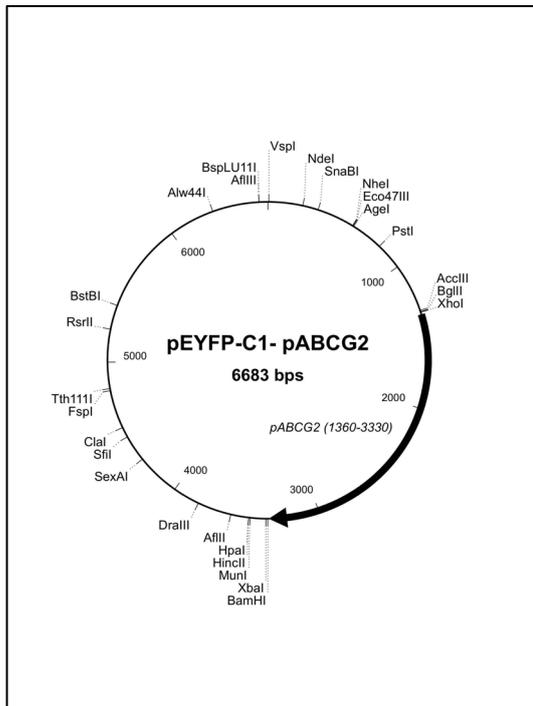


pmaxGFP (*Amara biosystems*)

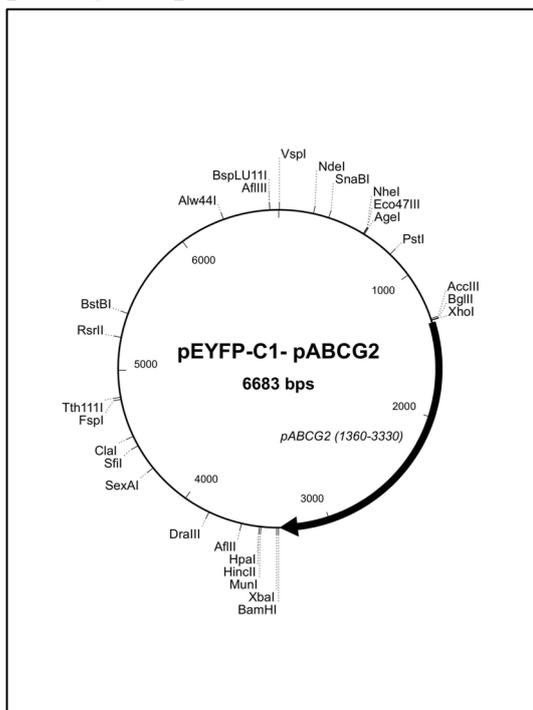


8.6.3. generierte ABCG2-Expressionsvektoren

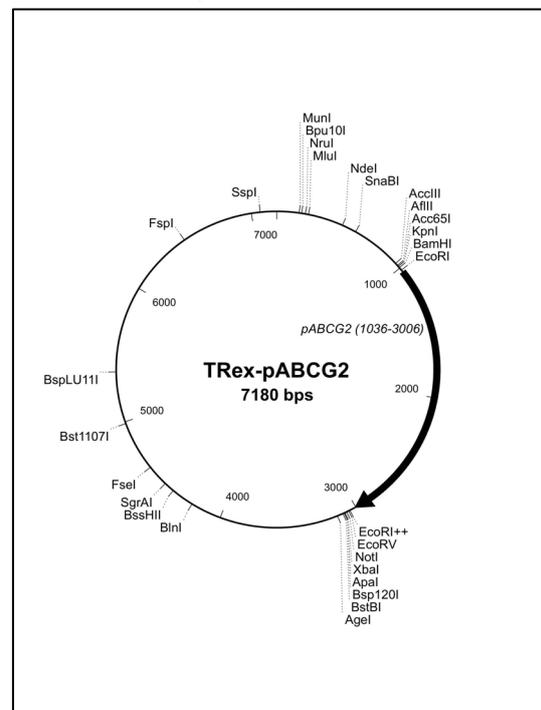
pAbcg2 in pcEYFP-C1



pAbcg2 in pEYFP-C1



pAbcg2 in pcDNA4TM/TO/myc-His B (T-RExTM-System)



8.7. Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-----------|---|----|
| Abb. 1-1 | Schematischer Querschnitt einer Hirnkapillare mit angrenzendem Gewebe..... | 3 |
| Abb. 1-2 | Molekularer Aufbau der an der BHS gebildeten <i>tight junctions</i> ; | 4 |
| Abb. 1-3 | Transportwege über die BHS. | 5 |
| Abb. 1-4 | Voraussichtliche Membrantopologie des humanen (a) und porcinen (b) ABCG2. | 14 |
| Abb. 1-5 | RNA-Interferenz (RNAi) | 17 |
| Abb. 2-1 | Modell des RNAi-Mechanismus. Modifiziert nach (NYKANEN et al., 2001). | 31 |
| Abb. 2-2 | Struktur des MTS-Tetrazoliums und des reduzierten Formazan-Produkts..... | 34 |
| Abb. 2-3 | Vergleich zwischen (a) MTS-Assay, (b) Mediumfarbe und (c) dem für die Densitometrie verwendeten Graustufenbild (Magenta-Kanal) von in 96-wells kultivierten <i>HEK</i> -wt-Zellen..... | 36 |
| Abb. 2-4 | Anpassungsfunktion für die Bestimmung der EC ₅₀ -Werte des Zytotoxizitätstests | 36 |
| Abb. 2-5 | Exemplarisches Impedanzspektrum eines konfluenten <i>PBCEC</i> -Monolayers auf permeablem Kultursubstrat..... | 37 |
| Abb. 2-6 | Schematische Darstellung eines <i>CLSM</i> | 38 |
| Abb. 2-7 | Schemazeichnung der Western Blot-Apparatur | 54 |
| Abb. 2-8 | Biotinylierungsreaktion..... | 57 |
| Abb. 3-1 | Einfluss verschiedener Modulatoren auf die Expression von <i>Abcg2</i> und P-Gp in <i>PBCEC</i> | 61 |
| Abb. 3-2 | Western Blot zur immunologischen Detektion der Oberflächenexpression von pAbcg2 in <i>PBCEC</i> in An- und Abwesenheit von Hydrocortison | 62 |
| Abb. 3-3 | Einfluss verschiedener Hydrocortison-Konzentrationen auf die Expression von <i>Abcg2</i> in <i>PBCEC</i> unter serumfreien (SFM) und serumhaltigen (SFM + 10 % <i>NCS</i>) Bedingungen..... | 63 |
| Abb. 3-4 | Einfluss des Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten Mifepriston (5 µM) auf den TEER von <i>PBCEC</i> in An- oder Abwesenheit von Hydrocortison (550 nM) | 64 |
| Abb. 3-5 | Einfluss von Mifepriston (5 µM) auf die Expression von <i>Abcg2</i> in <i>PBCEC</i> in An- oder Abwesenheit von Hydrocortison (550 nM)..... | 65 |
| Abb. 3-6 | Proteinexpression von Lamin A/C in <i>Caco</i> -Zellen 48 h nach Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Mengen siRNA (<i>siLamin A/C</i>) | 67 |
| Abb. 3-7 | Real-Time-PCR von <i>PBCEC</i> , die mit zwei verschiedenen siRNAs (<i>siABCG2-1e</i> , <i>siABCG2-2e</i>) gegen <i>Abcg2</i> transfiziert wurden..... | 67 |
| Abb. 3-8 | Transfektion von <i>PBCEC</i> mit <i>BLOCK-iTTM Fluoreszenz-Oligonukleotide</i> | 68 |
| Abb. 3-9 | Relative Expression des porcinen <i>Abcg2</i> -Transporters in <i>Abcg2</i> -überexprimierenden <i>HEK 293</i> -Zellen nach Behandlung mit siRNA (<i>siAbcg2-4</i>)..... | 69 |
| Abb. 3-10 | Fluoreszenzaufnahme von <i>PBCEC</i> 1 Tag nach Transfektion von pCMV-EGFP mittels <i>Lipofectamin 2000</i> | 70 |
| Abb. 3-11 | Nukleofektion von 0,5*10 ⁶ <i>PBCEC</i> mit jeweils 2 µg pmaxGFP-Vektor (2 Tage nach Transfektion)..... | 72 |
| Abb. 3-12 | Gentransfer in <i>PBCEC</i> mittels GFP exprimierender Adenoviren (Ad-GFP) | 73 |
| Abb. 3-13 | Immunocytochemische Färbung von <i>Abcg2</i> in stabil transfizierten <i>HEK</i> -Zellen..... | 76 |
| Abb. 3-14 | <i>CLSM</i> -Fluoreszenz-Aufnahmen von stabil transfizierten YFP/ABCG2-Zelllinien | 77 |
| Abb. 3-15 | Immunodetektion von <i>Abcg2</i> in <i>PBCEC</i> unter Standardkulturbedingungen | 79 |
| Abb. 3-16 | Immunodetektion von ABCG2 in <i>HEK</i> -pAbcg2 und <i>HEK</i> -hABCG2-Zellen +/- Behandlung mit <i>PNGase F</i> | 80 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Abb. 3-17 | Immunodetektion von ABCG2 in <i>HEK</i> -pAbcg2 und <i>PBCEC</i> (6. <i>DIV</i>) unter reduzierenden Bedingungen +/- Behandlung mit <i>PNgase F</i> | 81 |
| Abb. 3-18 | Immunodetektion von pAbcg2 in <i>PBCEC</i> (6. <i>DIV</i>) und <i>HEK</i> -TREx/pAbcg2-Zellen (3-tägige <i>Doxycyclin</i> -Inkubation) +/- Behandlung mit <i>PNgase F</i> | 82 |
| Abb. 3-19 | Immunodetektion von Gesamt-Proteinlysaten aus <i>HEK</i> -YFP/pAbcg2 und <i>MDCK</i> -YFP/pAbcg2-Zellen unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen..... | 83 |
| Abb. 3-20 | Expression von pAbcg2 in <i>HEK</i> -TREx/pAbcg2-Zellen in zeitlicher Abhängigkeit zur <i>Doxycyclin</i> -Zugabe..... | 84 |
| Abb. 3-21 | Expression von pAbcg2 in <i>HEK</i> -TREx/pAbcg2-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen potentiellen Modulatoren..... | 85 |
| Abb. 3-22 | Zytotoxizität von <i>Hoechst 33342</i> gegenüber <i>HEK</i> -TREx/pAbcg2-Zellen (+/- <i>Doxy-cyclin</i>)..... | 87 |
| Abb. 3-23 | Einfluss von 10 μ M <i>Cyclosporin A</i> auf die Zytotoxizität von <i>Hoechst 33342</i> in <i>HEK</i> -TREx/pAbcg2-Zellen (+/- <i>Doxycyclin</i>)..... | 87 |
| Abb. 3-24 | Einfluss von 1 μ M <i>Fumitremorgin C</i> auf die Zytotoxizität von <i>Hoechst 33342</i> in <i>HEK</i> -TREx/pAbcg2-Zellen (+/- <i>Doxycyclin</i>)..... | 88 |
| Abb. 3-25 | Einfluss von 1 μ M <i>GF 120918</i> auf die Zytotoxizität von <i>Hoechst 33342</i> in <i>HEK</i> -TREx/pAbcg2-Zellen (+/- <i>Doxycyclin</i>)..... | 88 |
| Abb. 3-26 | Einfluss von 10 μ M <i>PSC 833</i> auf die Zytotoxizität von <i>Hoechst 33342</i> in <i>HEK</i> -TREx/pAbcg2-Zellen (+/- <i>Doxycyclin</i>)..... | 89 |
| Abb. 3-27 | Einfluss von 10 μ M <i>Cyclosporin A</i> auf die Zytotoxizität von <i>Hoechst 33342</i> in <i>HEK</i> -hABCG2-Zellen..... | 90 |
| Abb. 3-28 | Einfluss von 1 μ M <i>Fumitremorgin C</i> auf die Zytotoxizität von <i>Hoechst 33342</i> in <i>HEK</i> -hABCG2-Zellen..... | 90 |
| Abb. 3-29 | Einfluss von 1 μ M <i>GF 120918</i> auf die Zytotoxizität von <i>Hoechst 33342</i> in <i>HEK</i> -hABCG2-Zellen..... | 91 |
| Abb. 3-30 | Einfluss von 10 μ M <i>PSC 833</i> auf die Zytotoxizität von <i>Hoechst 33342</i> in <i>HEK</i> -hABCG2-Zellen..... | 91 |
| Abb. 3-31 | Zytotoxizität von <i>Hoechst 33342</i> gegenüber <i>HEK</i> -YFP/pAbcg2- und <i>HEK</i> -wt-Zellen..... | 92 |
| Abb. 3-32 | Einfluss von 10 μ M <i>Cyclosporin A</i> auf die Zytotoxizität von <i>Hoechst 33342</i> in <i>HEK</i> -YFP/pAbcg2-Zellen..... | 93 |
| Abb. 3-33 | Einfluss von 1 μ M <i>Fumitremorgin C</i> auf die Zytotoxizität von <i>Hoechst 33342</i> in <i>HEK</i> -YFP/pAbcg2-Zellen..... | 93 |
| Abb. 3-34 | Einfluss von 10 μ M <i>PSC 833</i> auf die Zytotoxizität von <i>Hoechst 33342</i> in <i>HEK</i> -YFP/pAbcg2-Zellen..... | 94 |
| Abb. 3-35 | Zytotoxizität von <i>Hoechst 33342</i> auf <i>MDCK</i> -YFP/pAbcg2-Zellen und <i>MDCK</i> -wt-Zellen in An- und Abwesenheit von 10 μ M <i>PSC 833</i> nach 3-tägiger Inkubation. | 95 |
| Abb. 3-36 | Zytotoxizität von <i>Hoechst 33342</i> auf <i>MDCK</i> -YFP/hABCG2-Zellen und <i>MDCK</i> -wt-Zellen in Anwesenheit von 10 μ M <i>PSC 833</i> nach 3-tägiger Inkubation..... | 96 |
| Abb. 3-37 | Relative Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes <i>Hoechst 33342</i> (10 μ M) in (1) <i>HEK</i> -YFP/pAbcg2-Zellen und (2) <i>MDCK</i> -YFP/pAbcg2-Zellen..... | 98 |

8.8. Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----------|--|----|
| Tab. 1-1 | ABC-Transporter in zerebralen mikrovaskulären Endothelzellen..... | 8 |
| Tab. 1-2 | Substrate und Inhibitoren/Modulatoren von ABC-Transportern..... | 9 |
| Tab. 2-1 | Übersicht der verwendeten ABCG2-Expressionssysteme..... | 30 |
| Tab. 2-2 | Verwendete Selektionsantibiotika..... | 30 |
| Tab. 2-3 | Mengenskalierung der Transfektionsreagenzien für unterschiedliche Zellkulturflächen..... | 30 |
| Tab. 2-4 | Kriterien für die Auswahl effektiver siRNA-Sequenzen..... | 32 |
| Tab. 2-5 | Konzentrationen der verwendeten Modulator-Stammlösungen..... | 35 |
| Tab. 2-6 | Auftrennungsbereich in Abhängigkeit von der Agarosegelkonzentration..... | 39 |
| Tab. 2-7 | qRT-PCR Pipettierschema und Temperaturprogramm..... | 46 |
| Tab. 2-8 | Komponenten des Sammel- und Trenngels für die DISK-SDS-PAGE..... | 53 |
| Tab. 2-9 | Liste der verwendeten Antikörper für die Immunodetektion..... | 55 |
| Tab. 2-10 | Verwendete Antikörper für die immunozytochemischen Anfärbungen..... | 56 |
| Tab. 3-1 | Tabellarische Zusammenfassung der Transfektionsexperimente an <i>PBCEC</i> mittels <i>Nukleofektion</i> | 73 |
| Tab. 3-2 | Eingesetzte ABCG2-Expressionssysteme..... | 74 |

Mein Dank gilt:

- Professor Galla für die von ihm gebotenen Möglichkeiten, seine Betreuung und sein geduldiges Verständnis
- Professor Klempnauer für die Übernahme des Zweitgutachtens
- Patrick für die mentale Unterstützung und unentbehrliche Hilfe beim Korrekturlesen
- Susanne und Rebecca für ihren großen Einsatz im Rahmen ihrer Diplomarbeiten und für die gute Zusammenarbeit
- Joe für die anregenden Gespräche und aufmunternden Worte an den Tiefpunkten der Promotion
- Sabine für ihre Kompetenz im Bereich der Zellkultur und ihre Unterstützung dieser Arbeit
- Freddy für die vielen interessanten und informativen Gespräche rund um die Biochemie und darüber hinaus
- Steffi für ihren Einsatz im Rahmen der Materialbeschaffung
- Walter für die Beantwortung aller finanziellen Fragen und seiner stets offenen Tür
- dem Labor 224 sowohl Ehemaligen als auch Jetzigen für die kollegiale, freundliche und oft lustige Zusammenarbeit
- Antje und Lydia für die angenehme Kooperation und die guten Gespräche
- dem Arbeitskreis und dem gesamten Institut für Biochemie
- Pia für ihren Spontaneinsatz des Korrekturlesens
- meinen Eltern, ohne deren Unterstützung ich diese Zeilen nicht schreiben könnte
- Gesine für ihre Liebe und emotionale Stärke und Johanna für ihr Lachen, das keinen Trübsinn zulässt.