

2 Material und Methoden

2.1 Umklonierung des MDR1.1[pGEM3Zf(-)Xba-MDR1.1]-Vektors in den pFastBac1-Vektor

Um ABCB1 im Insektenzellensystem zu exprimieren, mußte die *ABCB1*-DNA (Acc.no. M14758) aus dem MDR1.1[pGEM3Zf(-)Xba-MDR1.1]-Vektor (ATCC, Manassas, VA, USA) in den pFastBac1-Vektor (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) umkloniert werden. Nach Enzymverdau mit *PmeI* (NEB, Frankfurt, Deutschland) wurde mittels Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland) ein *SphI*-Linker (NEB, Frankfurt, Deutschland) in den die *ABCB1*-DNA enthaltenden pGEM3Zf-Vektor inseriert. Das Produkt wurde in kompetente XL1 Blue Zellen (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) transformiert und anschließend DNA präpariert. Sowohl der die *ABCB1*-DNA enthaltende pGEM3Zf- als auch der pFastBac1-Vektor wurden mit *XbaI* (NEB, Frankfurt, Deutschland) und *SphI* (NEB, Frankfurt, Deutschland) verdaut. Mittels Ligation wurde die *ABCB1*-DNA in den pFastBac1-Vektor inseriert.

2.2 Komplettssequenzierung des pFastBac1- ABCB1-Wildtyp-Klons (M14758)

Da sich die Ergebnisse auf die von Hoffmeyer et al. in Proc. Nat. Acad. Sci. 2000;97:3473-3478 veröffentlichte *ABCB1*-Wildtyp-Sequenz beziehen (Acc.no. AC002457/AC005068), wurde untersucht, ob die Sequenz des klonierten pFastBac1-*ABCB1*-Wildtyp-Klons (Acc.no. M14758) mit der publizierten *ABCB1*-Wildtyp-Sequenz übereinstimmt. Dies geschah anhand einer Komplettssequenzierung der komplementären DNA-Stränge des pFastBac1-*ABCB1*-Wildtyp-Klons. Die Sequenzierungen wurden mittels spezifischer Primer (**Tabelle 3**) durchgeführt (InViTeK, Berlin-Buch, Deutschland).

Material und Methoden

Tabelle 3 Sequenzierprimer zur Kompletsequenzierung des *ABCB1*-Inserts

cDNA-Position des Primers	Primersequenz
237-256	5' - tgcaaatgcaggaaatttag
897-916	5' - aggtgctgct ttctgctga
1897-1916	5' - aatgaagtg aattagaaaa
2557-2576	5' - tatggttggc aactaacact
3747-3766	5' - cagagtcaag gagcatggca
pFastBac14170-4151	5' - ctgattatg atcctctagt
3206-3187	5' - accagagcca gcgtctggcc
2476-2457	5' - taactgagc agcatcattg
1716-1697	5' - agccacctga accactgctt
966-947	5' - gaggaccaag gtggtcccat
226-207	5' - tcatttctcc aaacaccagc

Es konnten folgende Abweichungen festgestellt werden:

Tabelle 4 Sequenzunterschiede pFastBac1-*ABCB1*-Wildtyp-Klon (Acc.no. M14758) und *ABCB1*-Wildtyp-Sequenz nach Hoffmeyer et al. (Acc. no. AC002457/AC05068)

cDNA-Position	pFastBac1- <i>ABCB1</i> -Wildtyp-Klon (Acc.no. M14758)	AC002457/AC05068-Sequenz
1236	c	T
1727	c	T
3083	c	A

2.3 Rückmutation der DNA-Basen des pFastBac1-ABCB1-Wildtyp-Klons, die nicht mit der ABCB1-Wildtyp-Sequenz AC002457 / AC005068 übereinstimmen

Im Anschluss an die Komplettssequenzierung des pFastBac1-ABCB1-Wildtyp-Klons, wurden die Sequenzabschnitte, die nicht der AC002457/AC005068-Sequenz entsprachen, nacheinander zurückmutiert. Dies geschah mithilfe des QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) (**Abbildung 6**).

Methode: Mithilfe des QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kits können Punktmutationen in DNA-Stränge eingefügt werden. Hierzu wird *PfuTurbo*[®] DNA Polymerase und ein Thermocycler benötigt. *PfuTurbo*[®] DNA Polymerase repliziert beide komplementären DNA-Stränge mit hoher Genauigkeit, ohne die zur Mutation benötigten Primer zu entfernen. Das Verfahren benötigt einen doppelsträngigen DNA-Vektor (dsDNA) mit dem zu untersuchenden Insert (pFastBac1-Vektor + MDR1-Gen). Zusätzlich werden zwei Primer benötigt, die komplementär zu den beiden DNA-Strängen sind und die einzufügende Mutation enthalten (**Tabelle 5, Tabelle 7**). Während der Reaktion im Thermocycler findet eine Verlängerung dieser Primer statt. Anschliessend wird das Produkt mit dem Enzym *DpnI* verdaut. Die *DpnI*-Endonuklease ist spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA und wird genutzt, um die Ausgangs-DNA-Template zu verdauen und die synthetisierte, die Mutation enthaltende DNA zu selektieren. Dies ist möglich, da DNA aus fast allen *E.coli*-Stämmen methyliert und daher einem *DpnI*-Verdau zugänglich ist. Die mutierte DNA wird nun in XL1-Blue superkompetente Zellen transformiert und auf Ampicillin-Agar-Platten ausplattiert. Anschließend werden einzelne Kolonien gepickt und in Mini Präparationen die DNA isoliert.

Material und Methoden

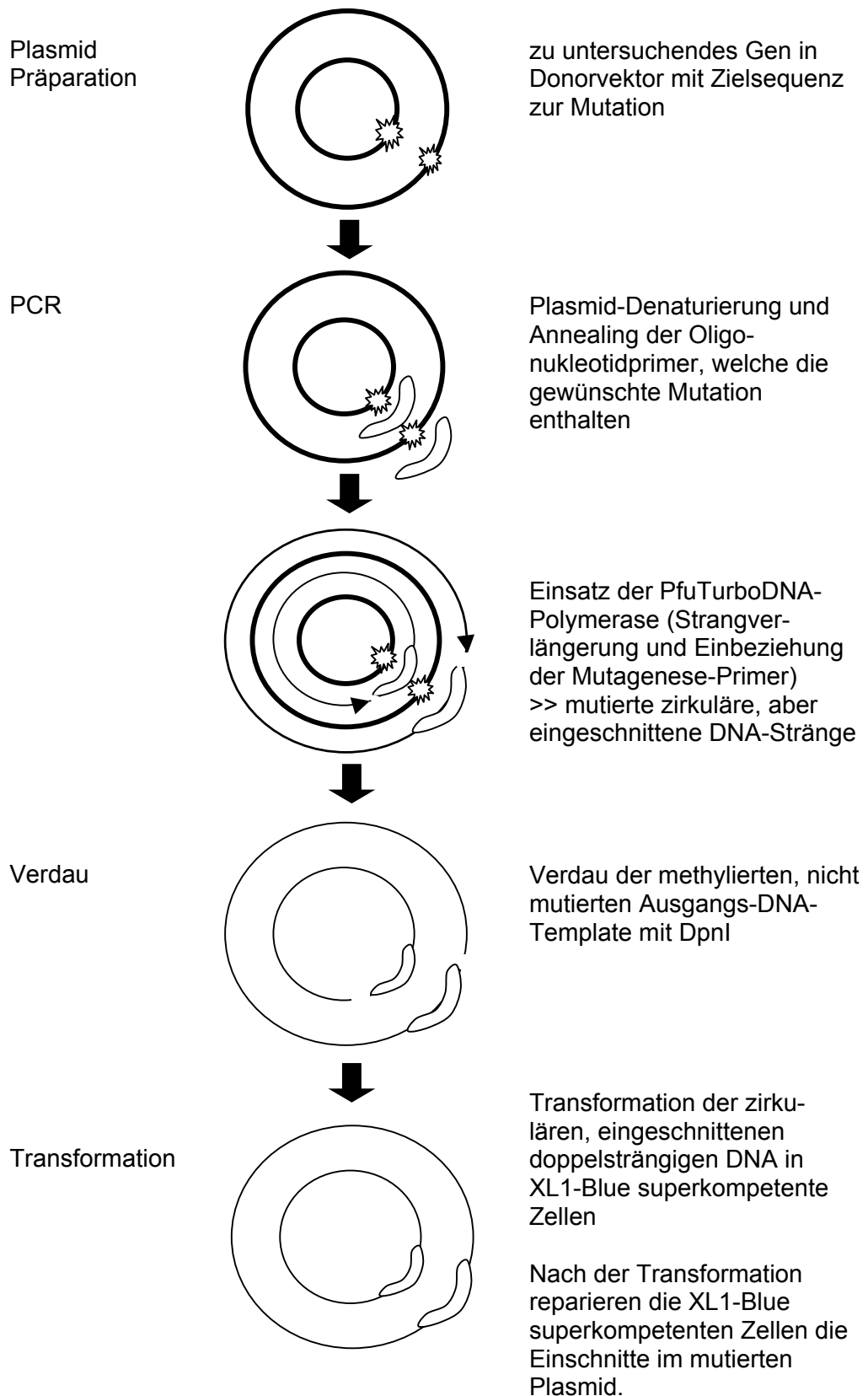


Abbildung 6 Prinzip Site directed mutagenesis (nach „QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, Instruction Manual“, Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

Material und Methoden

Tabelle 5 Mismatch-Primer zur Rückmutation des pFastBac1-*ABCB1*-Klons M14758 zum Erhalt der AC002457/ AC005068-Sequenz

SNP	Aminosäure- austausch	Primernamen	Primesequenz
G1236T	Gly412Gly	fGly412Gly rGly412Gly	5'- gttaagatct tgaaggg <u>t</u> ct gaacctgaag gtgc 5'- gcac cttcaggttcagacccttca agatcttaac
C1727T	Ala579Val	fAla579Val rAla579Val	5'- ggtggctctggat aagg <u>t</u> cagaa aaggtcggac c 5'- g gtccgacctt ttctgacctt atccagagccacc
C3083A	Pro1028Gln	fPro1028Gln rPro1028Gln	5'- gcacggaagg cctaattg <u>c</u> ag aacacattgg aaggaaatg 5'- catttcctt ccaatgtgtt ctgcattagg ccttccgtgc

DNA-Mini Präparation:

- 1,5 ml der Über-Nacht-Kultur zentrifugieren (8000 rpm; 10 min)
- Überstand verwerfen
- Pellet in 200 µl Qiagen Puffer 1 resuspendieren
- 250 µl Qiagen Puffer 2 zugeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
- 250 µl Qiagen Puffer 3 zugeben und 10 min auf Eis inkubieren
- zentrifugieren (14-18 000 x g , 10 min)
- Überstand in neues Gefäß überführen und 600 µl Isopropanol zugeben
- zentrifugieren (> 10 000 x g, 15 min)
- Überstand verwerfen und 600 µl 70% Ethanol zugeben
- zentrifugieren (> 10 000 x g, 5 min)
- Pellets trocknen und in 30 µl Wasser resuspendieren
- Konzentrationsbestimmung bei 280/260 nm

Zuerst wurde der Austausch an cDNA-Position 1236C>T durchgeführt. Zur Überprüfung der Mutagenese, wurde die durch Mini-Präparation erhaltene DNA einem Kontrollverdau mit dem Enzym *MluI* unterzogen und mittels spezifischer Primer (**Tabelle 6**) sequenziert (InViTeK, Berlin-Buch, Deutschland). Anschließend wurde der 2. Austausch an cDNA-Position 1727C>T durchgeführt und das Produkt wie die zuvor erhaltene DNA

Material und Methoden

behandelt. Auch für den dritten Austausch 3083C>A wurde nach der selben Methode vorgegangen.

Tabelle 6 Sequenzierprimer zur Überprüfung der zurückmutierten Positionen

SNP	Aminosäure- austausch	Primersequenz
G1236T	Gly416Gly	5'- gaagagtggg cacaaccag
C1727T	Ala579Val	5'- cgtgccctgg ttcgaaccc
C3083A	Pro1028Gln	5'- gctcctgact atgccaagc

Alle 3 Rückmutationen konnten erfolgreich durchgeführt werden.

Zur Absicherung des Ergebnisses wurde mittels des Qiagen Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) eine DNA-Maxi-Präparation durchgeführt und die erhaltene DNA zur Sequenzüberprüfung der drei mutierten Positionen mittels spezifischer Primer (**Tabelle 6**) sequenziert (InViTeK, Berlin-Buch, Deutschland).

DNA-Maxi-Präparation:

Aus dem während der Mini Präparation angelegten Glycerol-Stock wird Material entnommen und über Nacht in ca. 120 ml LB-Medium (+ Ampicillin) bei 37°C / 240 rpm inkubiert. Bei 6000 x g / 4°C wird 15 min zentrifugiert, um die Zellen zu ernten. Das Pellet wird in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und mit 10 ml Puffer P2 versetzt. Nach 5 min Inkubation bei RT werden 10 ml Puffer P3 zugesetzt und das Gemisch 20 min auf Eis stehen gelassen. Anschliessend wird 30 min bei 20 000 x g / 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthält, wird auf eine zuvor mit Puffer QBT equilibrierte Säule (QIAGEN-tip 500) gegeben. Ist die Flüssigkeit vollständig in die Säule eingedrungen, wird mit 2 x 30 ml Puffer QC gewaschen und die DNA anschliessend mit 15 ml Puffer QF eluiert. Mit 10,5 ml Isopropanol wird die DNA präzipitiert und bei 15 000 x g / 4°C 30 min zentrifugiert. Das Pellet wird mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und weitere 10 min bei 15 000 x g / 4°C zentrifugiert. Bei RT wird das Pellet ca. 10-15 min getrocknet

Material und Methoden

und in 50 µl Wasser resuspendiert.

FAZIT: Der nach Rückmutation des pFastBac-*ABCB1*-Wildtyp-Klones (Acc.no. M14758) erhaltene Wildtyp entspricht der von Hoffmeyer et al. publizierten *ABCB1*-Wildtyp-Sequenz (Acc. no. AC002457/AC005068).

2.4 Einfügung der zu untersuchenden Mutationen in den pFastBac1-*ABCB1*-Wildtyp-Klon (Acc. no. AC002457/AC005068)

Mithilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) und spezifischer Mismatch-Primer (MWG, Ebersberg, Deutschland) (**Tabelle 7**) wurden 5 verschiedene Mutanten des pFastBac1-*ABCB1*-Wildtyp-Klons (Acc. no. AC002457/AC005068) hergestellt.

Tabelle 7 Mismatch-Primer zur Einfügung der Mutationen in den pFastBac1-*ABCB1*-Wildtyp-Klon (Acc. no. AC002457/ AC005068)

Lokation	SNP	Aminosäure- austausch	Primernamen	Primersequenz
Exon 2	A61G	Asn21Asp	fAsn21Asp	5'- gaagaacttt ttaaactga acgataaaag tgaaaagat aag
			rAsn21Asp	5'- cttatctttt tcacttttat cgttcagttt aaaaaagttc ttc
Exon 11	G1199A	Ser400Asn	fSer400Asn	5'- gaattcagaa atgttcactt caattacca tctcgaaaag aag
			rSer400Asn	5'- ctt ctttcgaga tgggtaattg aagtgaacat ttctgaattc
Exon 21	G2677T	Ala893Ser	fAla893Ser	5'- gataagaag aactagaagg ttctgggaag atcgctactg aag
			rAla893Ser	5'- ctt cagtagcggat cttcccagaa ccttctagtt ctttcttatc

Material und Methoden

Tabelle 7 (Fortsetzung)

Exon 21	G2677A	Ala893Thr	fAla893Thr	5'- gataagaaag aactagaagg t <u>a</u> ctgggaag atcgctactg aag
			rAla893Thr	5'- ctt cagtagcggat cttcccagta ccttctagtt ctttcttatac
Exon 26	C3435T	Ile1115Ile	fIle1115Ile	5'- gtcacaggaa gagatt <u>g</u> tga gggcagcaaa g
			rIle1115Ile	5'- ctttgctgcc ctcaaatct cttcctgtga c

Nachdem die verschiedenen Klone hergestellt wurden, wurde jeweils eine DNA-Mini-Präparation durchgeführt und das Produkt zur Überprüfung der Sequenz mittels spezifischer Primer (**Tabelle 8**) sequenziert (InViTeK, Berlin-Buch, Deutschland). (Methoden siehe Kapitel 2.3 Rückmutation der DNA-Basen des pFastBac1-ABCB1-Wildtyp-Klons, die nicht mit der ABCB1-Wildtyp-Sequenz AC002457 / AC005068 *übereinstimmen*). Die mittels Maxi-Präparation erhaltene DNA wurde für nachfolgende Schritte eingesetzt.

Tabelle 8 Sequenzierprimer zur Überprüfung der eingefügten Punktmutationen

SNP	Aminosäure- austausch	cDNA-Position	Sequenz
A61G	Asn21Asp	pFastBac1 3996-4015	5'- tattccggat tattcatacc
G1199A	Ser400Asn	897-916	5'- aggtgctgct ttctgctga
G2677T	Ala893Ser	2557-2576	5'- tatggttggc aactaacact
G2677A	Ala893Thr		
C3435 T	Ile1115Ile	3316-3336	5'- gttcagtggc tccgagcacac

2.5 Übersicht über das Baculovirus-Expressionssystem

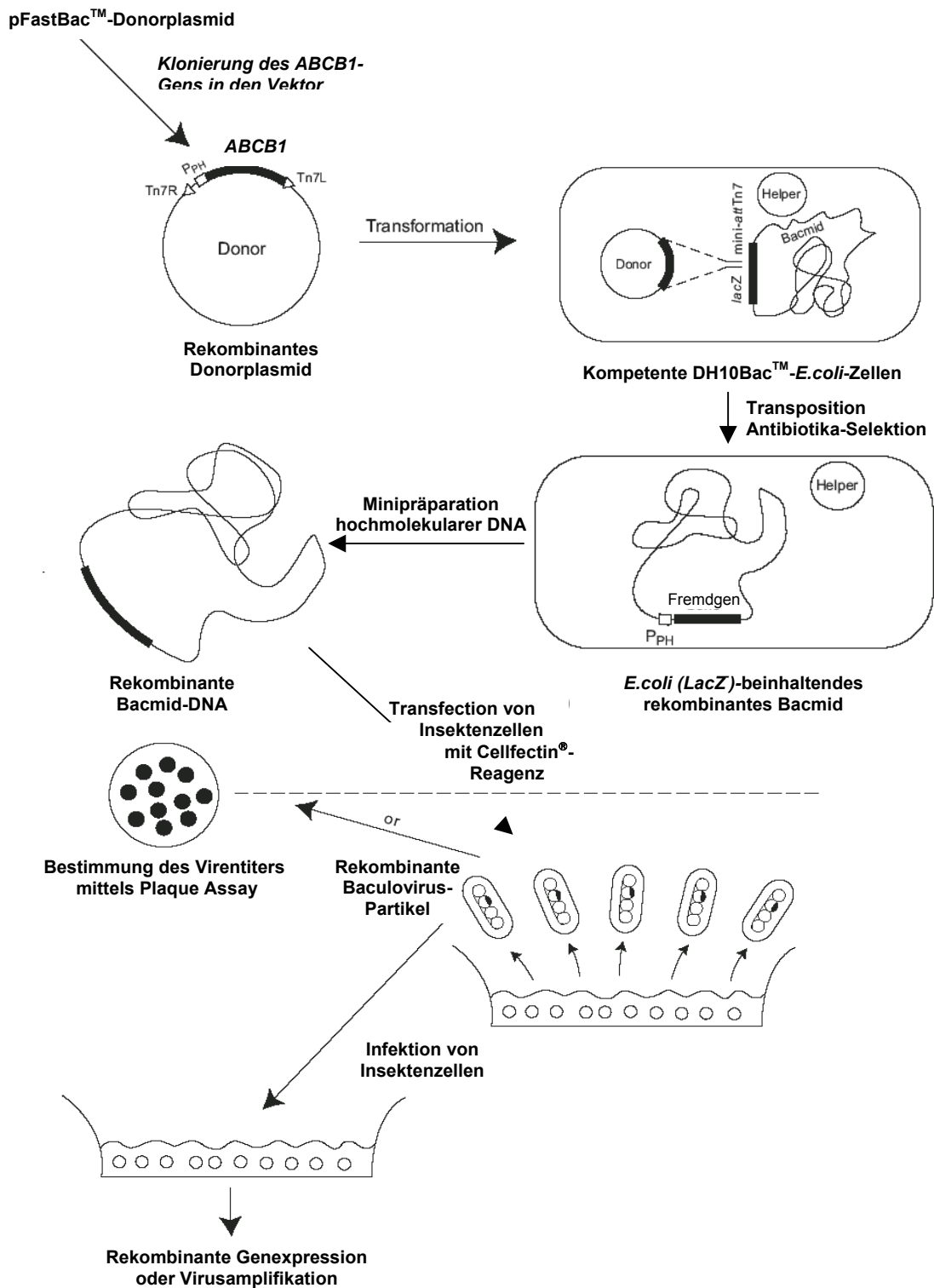


Abbildung 7 Übersicht über das Baculovirus-Expressionssystem (nach „Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, Instruction Manual“, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Material und Methoden

2.5.1 Herstellung rekombinanter Baculoviren

Die pFastBac1-*ABCB1*-Klone für den Wildtyp und die Varianten 893Ser und 893Thr werden mittels Transposition in MAX Efficiency DH10Bac-Zellen hergestellt. Hierfür werden ca. 2,5 ng DNA in 100 µl Zellsuspension überführt, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock bei 42°C über 45 s ausgesetzt. Nach weiteren 2 min auf Eis und Zugabe von 900 µl SOC-Medium, wird für 4 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Anschließend werden 100 µl auf Agar-Platten ausplattiert, die 50µg/ml Kanamycin, 7µg/ml Gentamicin, 10µg/ml Tetracyclin, 150µg/ml Bluo-gal und 40µg/ml IPTG enthalten. Nach 24-48h Inkubation bei 37°C können weiße von blauen Kolonien unterschieden werden. Weiße Kolonien enthalten hierbei das rekombinante Bacmid und können in 2 ml-Kulturen überführt werden, die über Nacht bei 37°C und 240 rpm inkubiert werden. Am darauffolgenden Tag wird die Bacmid-DNA präpariert und einer PCR-Kontrolle mit für das Bacmid spezifischen Primern unterzogen (**Abbildung 8**).

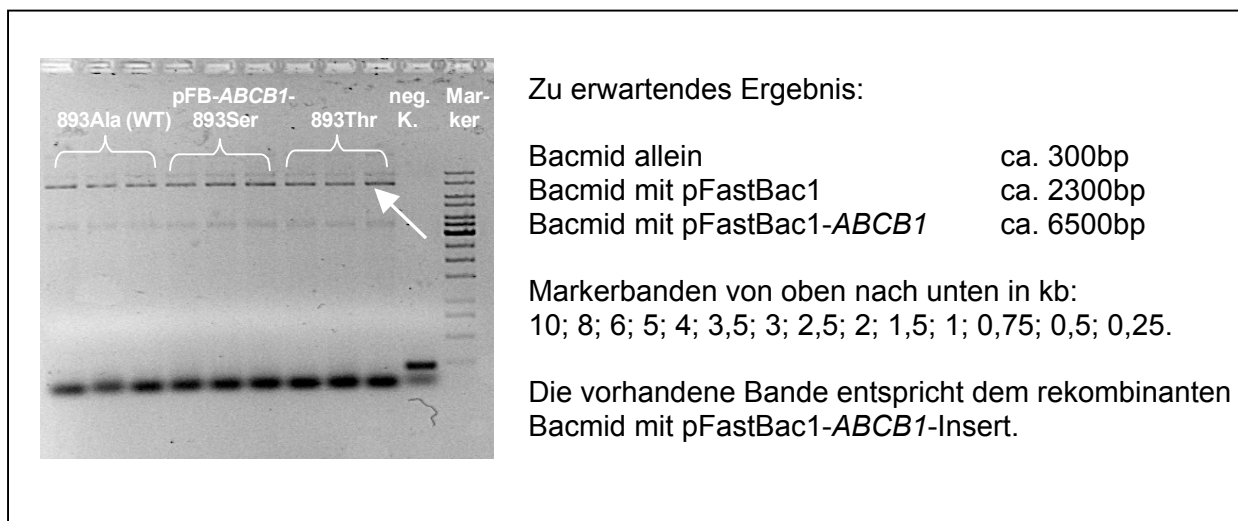


Abbildung 8 Kontroll-PCR mit pUC/M13-Primern für rekombinante Bacmid-DNA

Nun werden Sf9-Insektenzellen mithilfe von Cellfectin mit rekombinanter Bacmid-DNA transfiziert. Während 9×10^5 Zellen pro well auf einer 6-well-Platte für 1 h bei 27°C inkubiert werden, werden parallel 5 µl Bacmid-DNA mit 100µl Sf-900 II SFM-Medium ohne Zusätze verdünnt und als zweite Lösung 6 µl CellFECTIN zu 100µl des selben Mediums gegeben. Beide Lösungen werden gemischt und 45 min bei Raumtemperatur

Material und Methoden

inkubiert. Nachdem die Zellen mit Sf-900 II SFM-Medium gewaschen wurden, wird die obige Lösung (+ 800 µl Medium ohne Zusätze) auf die Zellen gegeben. Nach 5 h wird der Transfektionsmix entfernt und durch Medium mit Antibiotika ersetzt. Die Zellen werden 72 h bei 27°C inkubiert, um anschließend die sogenannten P1-Virenstocks zu ernten (Zentrifugation 5 min, 500 g).

2.5.2 Virentiterbestimmung

Die Virentiter können mittels Verdünnungsreihe oder Plaque Assay bestimmt werden.

Verdünnungsreihe

Auf einer 12-well-Platte werden pro Well 0,5 ml Medium vorgelegt. Anschließend werden je 5×10^5 Zellen pro Well zugegeben und die Zellen 1 h bei 27°C inkubiert. Der Überstand wird abgesaugt und 1 ml Medium pro Well zugegeben. Anschließend werden 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100 µl des Virusstocks in je 1 Well gegeben. Ist ein hoher Virentiter zu erwarten, kann eine 1:100-Verdünnung des Stocks eingesetzt werden. Der Verdünnungsfaktor ist bei der Titerberechnung zu berücksichtigen. Nach 72 h Inkubation bei 27°C kann der Titer bestimmt werden. Hierbei berechnet sich der Virentiter nach folgender Formel:

$$\text{Titer} = 5 \times 10^5 / x \text{ [pfu/}\mu\text{l]}$$

wobei 5×10^5 der Zellzahl pro Well entspricht und x die µl-Zahl des Wells angibt, in welchem alle Zellen mit Virus infiziert sind.

Die Infektion von Zellen mit Baculoviren gliedert sich in einen zweiphasigen Replikationszyklus: In den ersten 12-24 h nach Infektion kommt es zur Virusreplikation im Zellkern. Gleichzeitig wird extrazelluläres Virus gebildet und von den Zellmembranen abgekapselt. In einer zweiten Phase nach mehr als 24 h kommt es zur Überexpression von Viren. Ausgereifte Viruspartikel sind in eine protektive Polyhedrin-Hülle eingekapselt. Diese Viruspartikel sind als große kristalline Einschlusskörperchen im Zellkern infizierter Zellen sichtbar. Des Weiteren ist eine Infektion aller pro Well vorhandenen Zellen daran zu erkennen, dass alle Zellen die gleiche Größe haben und im Vergleich zur Kontrolle ohne Virus größer sind.

Plaque Assays

Für jeden zu bestimmenden Virentiter wird folgendes angesetzt:

In einem 50 ml-Plastikzentrifugenröhrchen wird eine 40 ml-Zellsuspension mit 1×10^6 Zellen/ml angesetzt. Jeweils 5 ml dieser Suspension werden auf 8 Zellkulturschalen ausgesät und diese 1 h bei 27°C inkubiert. Während der Inkubationsdauer werden 5,5 ml Medium in 8 15 ml-Plastikzentrifugenröhrchen vorgelegt. 30ml Medium werden in eine sterile 100 ml-Plastikflasche pipettiert und im Wasserbad bei 47°C inkubiert. Weiterhin werden 8 1,5 ml-Gefäße mit je 1 ml Medium gefüllt, die für das Ansetzen der Virus-Verdünnungen benötigt werden. Gefäß Nr. 1 dient als Kontrolle (ohne Virus). Zu Gefäß Nr. 2 werden 100 µl des Virenstocks hinzugefügt. Aus der entstehenden Lösung werden 100 µl in Gefäß Nr. 3 gegeben. Entsprechend wird bis zu Gefäß Nr. 8 fortgefahren. 1 h nach Zellaussaat werden von jeder Schale 3 ml Medium abgesaugt und 1 ml der entsprechenden Virusverdünnung zugegeben. Die Schalen werden bei Raumtemperatur 1 h auf einer Wippe inkubiert. Während der Inkubationszeit wird eine sterile 2,5%ige Agarose-Wasser-Lösung in der Mikrowelle aufgeköcht und im Wasserbad bei 47°C inkubiert. Nach ca. 15 min werden 30 ml der Agarose-Lösung zu den bereits im Wasserbad befindlichen 30 ml Medium gegeben und weiterhin bei 47°C inkubiert. Nachdem die Zellkulturschalen mit den Virusverdünnungen 1 h auf der Wippe inkubiert wurden, wird die Medium-Virus-Mischung gründlich abgesaugt. In die vorbereiteten 8 15ml-Plastikzentrifugenröhrchen wird zu den 5,5 ml Medium 5,5 ml Agarose-Medium-Mischung gegeben und gemischt. Nun werden die Zellkulturschalen mit der so entstandenen Mischung überschichtet und ca. 1 h unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Schalen werden mit Folie dicht verschlossen und mit der Agarose-beschichteten Seite nach oben bei 27°C inkubiert. Die Auswertung erfolgt nach ca. 3 Wochen nach folgendem Schema:

Material und Methoden

Aufgrund der Infektion von Zellen mit Virus werden in der Agaroseschicht sogenannte Plaques sichtbar. Nun wird eine Platte ausgewählt, auf der ca. 50-100 Plaques zu erkennen sind. Diese werden gezählt. Der Titer ergibt sich wie folgt:

Zellkulturschale	Verdünnung	Titer [pfu/ml]
0	Negativkontrolle (kein Virus)	-
1	100µl Virenstock + 1ml Medium	Anzahl der Plaques x 1×10^3
2	100µl auf Gefäß Nr. 1 + 1ml Medium	Anzahl der Plaques x 1×10^4
3	100µl auf Gefäß Nr. 2 + 1ml Medium	Anzahl der Plaques x 1×10^5
4	100µl auf Gefäß Nr. 3 + 1ml Medium	Anzahl der Plaques x 1×10^6
5	100µl auf Gefäß Nr. 4 + 1ml Medium	Anzahl der Plaques x 1×10^7
6	100µl auf Gefäß Nr. 5 + 1ml Medium	Anzahl der Plaques x 1×10^8
7	100µl auf Gefäß Nr. 6 + 1ml Medium	Anzahl der Plaques x 1×10^9

2.5.3 Herstellung von Viren-Arbeitslösungen

Um Viren-Arbeitslösungen, sogenannte Working-Stocks zu erhalten, wird eine 50 ml-Kultur mit 2×10^6 Sf9-Zellen / ml mit einer MOI (Multiplicity of infection) von 0,1 infiziert, 72 h bei 27°C inkubiert, die Viren geerntet und erneut eine Titerbestimmung durchgeführt. Die so erhaltenen Virenstocks stehen zur Expression von ABCB1 in Insektenzellen zur Verfügung.

2.5.4 Expression von ABCB1 auf HighFive-Insektenzellen und Vesikelpräparation nach Behandlung der Zellen mit rekombinanten Viren

Eine 100 ml-Kultur (2×10^6 HighFive-Zellen / ml HyQ-SFX-Medium (Perbio, Bonn, Deutschland)) wird mit einem rekombinanten Baculovirus und einer MOI (Multiplicity of infection) von 1,5 beimpft. Nach einer Inkubationsdauer von 48 h bei 27°C und 100 Umdrehungen / min, werden die Zellen wie folgt weiterbehandelt.

Material und Methoden

Präparation der Membranvesikel:

Die Zellsuspension wird in 50 ml-Plastikzentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 1400 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die Zellen werden in je 10 ml Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.0], 2 mM EDTA, 50 mM D-Mannitol) resuspendiert, welcher Proteaseinhibitoren enthält (Complete Mini Tabs, Roche, Mannheim, Deutschland). Mithilfe eines Glas/Teflon-Homogenisierers (B.Braun Biotech International, Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland) werden die Zellen homogenisiert (20 Strokes mit einem Potter bei 1400 U / min) und sogenannte Inside-out-Vesikel hergestellt, die für die folgenden Transportversuche benötigt werden. Zell- und Zellkernbestandteile, sowie Mitochondrien werden bei 500 x g 10 min abzentrifugiert. Der trübe Überstand, der aus den Membranproteinen besteht, wird 1 h und 10 min bei 100 000 x g ultrazentrifugiert. Die Pellets werden in 200 µl Transportpuffer (312.5 mM Sucrose, 12.5 mM Magnesiumchlorid, 12.5 mM HEPES) resuspendiert, gepoolt, homogenisiert und in Flüssigstickstoff gelagert.

Der Proteingehalt wird mittels BCA Protein Assay von PIERCE (Perbio, Bonn, Deutschland) bestimmt, welcher auf der Bildung eines Kupfer-Protein-Komplexes besteht, dessen Quantität photometrisch bei 562 nm bestimmt wird.

2.5.5 Bestimmung des Gesamt-RNA-Gehalts von Sf9-Zellen, die mit rekombinanten ABCB1-Baculoviren infiziert wurden

Der Gesamt-RNA-Gehalt von mit rekombinanten Baculoviren infizierten Sf9-Zellen sollte untersucht werden. Hierzu wurden Sf9-Zellen mit ABCB1-Wildtyp oder der genetischen Exon26-Variante 3436TT bei einer MOI von 1,5 infiziert. Nach 24, 48 und 72 h wurden aus den entsprechenden Präparationen 0,5; 1,0; 2,0 und 3,0 x 10⁶ Zellen entnommen. Die RNA wurde mittels eines QiaShredders (Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert und mithilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus den Zellen präpariert. Durch Absorptionsmessung bei 240/260 nm wurde die RNA-Konzentration bestimmt..

Für weitere RNA-Bestimmungen wurden 1,0 x 10⁶ Zellen aus Präparationen entnommen.

2.5.6 ABCB1-RNA-Konzentrationsbestimmung mittels quantitativer RealTime-PCR am LightCycler™

Um spezifische ABCB1-RNA in mit rekombinanten Baculoviren infizierten Insektenzellen nachzuweisen, wurde eine quantitative RealTime-PCR am LightCycler™ (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Aus der Gesamt-RNA wurde cDNA in einem Reaktionsansatz von 25 µl synthetisiert, welcher 50 ng RNA oder entsprechende Verdünnungen einer Standard-RNA, sowie 5 µl 5x MLV Buffer (Promega, Mannheim, Deutschland), 2,5 µl Dithiothreitol (0,1 M; Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1 µl dNTPs (je 2mM; Biozym, Deutschland), 0,2 µl (entsprechend 8 U) RNasin-Ribonucleaseinhibitor (Promega, Mannheim, Deutschland), 0,6 µl (entsprechend 120 U) M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Mannheim, Deutschland) und 2 µl oligo dT(15)-Primer (0,5 µg/µl; Promega, Mannheim, Deutschland) enthielt. Die Mischung wurde 10 min bei 26°C und anschließend 1 h bei 42°C inkubiert, gefolgt von einem 2 min-Heizschritt bei 95°C. Um die Kalibrations-Standardkurve zu erstellen, wurde externe Standard-RNA präpariert [53]. Quantitative PCR wurde mittels genspezifischer Primer im LightCycler™ (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Die PCR-Amplifikation fand in einem 16 µl-Reaktionsansatz statt, welcher 5 µl cDNA (aus insgesamt 25 µl Gesamt-cDNA), sowie 1,25 U *Taq*-Polymerase, 1,6 µl 10x Reaction Buffer, 0,7 µl MgCl₂ (50 mM), 0,7µl dNTPs (je 2 mM), 0,5 µl Forward-Primer (10 µM) 5'-CCATCATTGCAATAGCAGG (Position 3018-3036, Acc.no. NM_000927), 0,5 µl Reverse-Primer (10 µM) 5'-GAGCATACATATGTTCAAACCTTC (Position 3161-385), Hybridisierungssonden [je 0,2 µl (10 µM) Sensor 5'-TGGGAAGATC GCTACTGAAGCAAT-fluorescein (Position 3100-3123) und Anchor 5'-LC Red640-AACTTCCGAACCGTTGTTTCTTTGA –phosphate (Position 3128-3152)] und 0,6 µl BSA (1 mg/ml) enthielt (alle Primer und Hybridisierungssonden wurden bei TibMolbiol, Berlin, Deutschland bestellt). Nach einem initialen Denaturierungsschritt über 60 s bei 94°C, wurden 45 Zyklen (Amplifikation 95°C 0 s, Annealing 55°C 10 s, Elongation 72°C 10 s) durchgeführt. Die Daten wurden mittels LightCycler™ Software (Version 3.5) ausgewertet. C_T-Werte (sogenannter Threshold Cycle) wurden mittels sekundärer derivativer Maximum-Methode berechnet. Eine Kalibrationskurve wurde aus seriellen Verdünnungen der Standard-RNA erstellt, indem C_T-Werte gegen den Logarithmus der

Material und Methoden

Standard-RNA-Kopien aufgetragen wurden. Diese Gerade wurde genutzt, um die Anzahl an RNA-Kopien der zu untersuchenden Proben zu messen.

2.5.7 Western Blots

5 µg Membranprotein wurden mit einem reduzierenden Proteinauftragspuffer (Roti-Load 1, Roth, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt und mittels SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide (6%) gel electrophoresis) getrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL, Amersham pharmacia biotech, Amersham, England) transferiert. Hierzu wurde eine Elektrophorese-Blotting-Apparatur der Firma BioRad Laboratories (München, Deutschland) verwendet. Als Markerprotein wurde ein mehrfarbiger Proteinmarker, High Range (29.0-205 kDa, Perkin Elmer) eingesetzt. Das Polyacrylamidgel wurde mit Comassieblau-Lösung (rotiphorese blau R, Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt, die Nitrocellulosemembran mit Ponceau S-Lösung (0.1% Ponceau S in 5% Essigsäure, Roth, Karlsruhe, Deutschland), um einen gleichmäßigen Proteintransfer zu gewährleisten. Nach einer Laufzeit von ca. 75 min bei 100 V, wurde das Gel aus der Kammer entnommen und zwischen Filtermembranen auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (1vh, 1,2 mA / cm²). Nach 1 h Inkubation in Blocklösung (100 mM Tris-HCl [pH 7.5], 500 mM NaCl, 0.1% Tween 20 und 1% Pepton aus Casein (Serva, Heidelberg, Deutschland)), wurde über Nacht bei 4°C mit primärem Antikörper (Monoclonal mouse anti-P-glycoprotein, F4, 1:1000-Verdünnung in PBS, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in Blocklösung inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer (100 mM Tris-HCl [pH 7.5], 500 mM NaCl, 0.1% Tween 20), wurde 1 h bei Raumtemperatur mit sekundärem Antikörper (Anti Mouse IgG (Fab Specific) Peroxidase Conjugate, 1:2000-Verdünnung, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 7 min mit BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) (Roche, Mannheim, Deutschland) versetzt und nach 10, 20 und 30 min detektiert (ChemiGenius Bioimaging System, Syngene, Gateway, Cambridge, UK). Die Chemilumineszenz wurde mittels GeneSnap und GeneTools Software von Syngene ausgewertet.

2.5.8 Transport Assays

Prinzip:

Zur Durchführung von Transport-Assays, werden Vesikel benötigt, die wie in Abschnitt 2.5.4 beschrieben, hergestellt wurden. Nach Zugabe eines radioaktiv markierten Transportsubstrates, soll mittels Standard-Filterassays die Menge an Substrat gemessen werden, die aktiv in das Vesikelinnere transportiert wird. Da ABCB1 jedoch ein Transporter ist, der Fremd- und Arzneistoffe vom Inneren der Membran nach außen transportiert, werden bei der Vesikelpräparation sogenannte Inside-out-Vesikel mit umgekehrter Orientierung bzw. Transportrichtung hergestellt. Bei der angewandten Präparationsmethode wird sichergestellt, dass das Verhältnis von Inside-out-Vesikeln zu Right-side-out-Vesikeln (ohne Umkehr der Transportrichtung) konstant ist (ca. 1:1, Variabilität ca. 5-10%) [54]. Wird nun zu den Vesikelpräparationen radioaktiv markiertes Vincristin, ein bekanntes ABCB1-Substrat, gegeben, wird dieses ins Innere der Inside-out-Vesikel transportiert, und die akumulierte Radioaktivität kann gemessen werden. Da ABCB1 ein energieabhängiger Transporter ist, funktioniert dies allerdings nur, wenn ATP zur Verfügung gestellt wird. Bei Zugabe von AMP-PNP, einem AMP-Analogen, findet kein spezifischer Transport statt.

Durchführung:

Zur Bestimmung der Transportcharakteristik des ABCB1-Wildtyps und der genetischen Varianten 893Ser und 893Thr wurde ein sogenannter Standard-Filterassay eingesetzt. Als Substrat diente radioaktiv markiertes Vincristin. 50 µg Protein aus Membranvesikeln, verdünnt in PBS (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurden im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut und bei der selben Temperatur vorinkubiert. Ein ATP-regenerierendes System wurde wie folgt vorbereitet: 10 mM MgCl₂ (Fluka, Buchs, Schweiz), 10 mM Kreatinphosphat (Roche, Mannheim, Deutschland), 100 µg*ml⁻¹ Kreatinkinase (Roche, Mannheim, Deutschland), 250 mM Sucrose (Roth, Karlsruhe, Deutschland), 10 mM Tris-HCl [pH 7.4] und 4 mM ATP (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) bzw. AMP-Analogen AMP-PNP (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Diese Lösung diente zur Verdünnung von [³H]-Vincristin (Amersham, Amersham, England) auf die Endkonzentration von 1, 3, 7.5, 15, 25, 35 oder 60 µM. Da es sich um ein ATP-

Material und Methoden

regenerierendes System handelt, wird für den Ansatz, bei dem kein aktiver Transport stattfinden soll, ein AMP-Analogon mit Schutzgruppe verwendet. Diese verhindert eine Phosphatierung des Analogons zu ATP, so dass kein aktiver Transport unter ATP-Verbrauch möglich ist. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 5 ml eiskalte Stoppsolution (PBS) zur die Vesikel enthaltenden Lösung gegeben. Diese Mischung wurde unverzüglich über mit PBS durchnässte Glasmikrofilter (0.7 μ M Porengröße, Whatman, England) gefiltert. Die Filter wurden mit 5 ml PBS + 1% BSA (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland) gewaschen, gefolgt von 5 ml PBS + 0.05% Tween 20 (Perbio, Bonn, Deutschland) und 5 ml PBS. 10 min nach Zugabe von 5 ml Rotiszint eco plus (Roth, Karlsruhe, Deutschland), wurde die Radioaktivität in einem Flüssigszintillationszähler gemessen.

2.6 Schema der durchgeführten Versuche

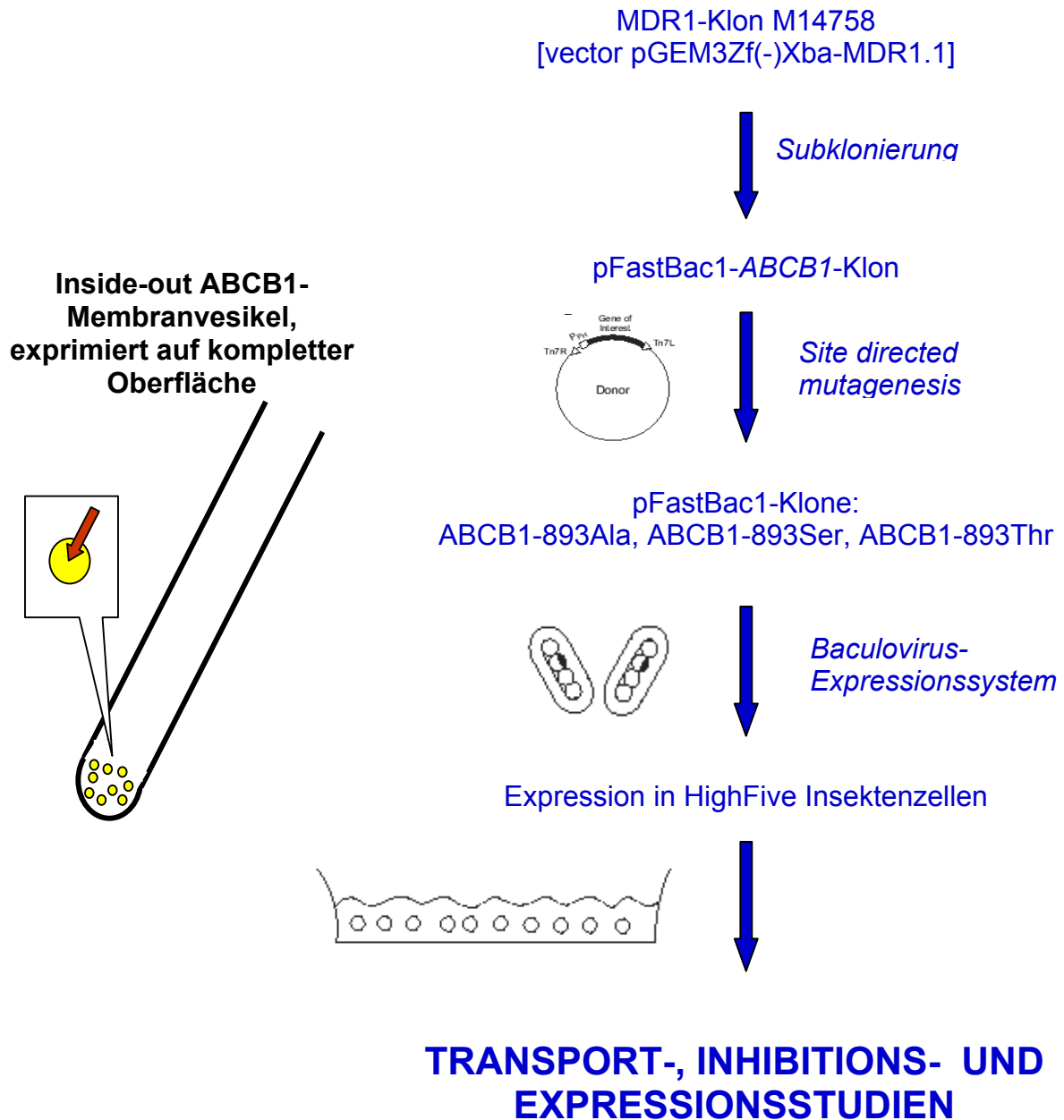


Abbildung 9 Schema der durchgeführten Versuche