

Aus der
Abteilung Allgemeine Pharmakologie
des Institutes für Pharmakologie
(Leiter Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer)
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt Universität zu Greifswald

**P-Glykoprotein vermittelter Arzneimitteltransport:
Untersuchungen zur Interaktion mit Heparin und Beta-Amyloid
am epithelialen Zellmodell**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften in der Medizin
(Dr. rer. med.)
der Medizinischen Fakultät
der Ernst-Moritz-Arndt Universität zu Greifswald
2006

vorgelegt von:
Diana Kuhnke
geboren am 7. April 1976
in Rostock

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Martin Fromm

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Werner Weitschies

Tag der Disputation: 20. April 2007

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-Binding Cassette
AK	Antikörper
APP	Amyloid-Prekursor-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
A β	Beta-Amyloid
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
CMV	Zytomegalie-Virus
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Verstärkte chemische Lumineszenz (enhanced chemical luminescence)
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N`-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish-Peroxidase
MDR	Mehrfachresistenz (M ulti D rug R esistance)
<i>mdr</i>	<i>mdr</i> -Gen der Ratte/Maus
<i>MDR</i>	humanes <i>MDR</i> -Gen
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
P-gp	P-Glykoprotein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rh123	Rhodamin 123
RT	Raumtemperatur
SD	standard deviation, Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
TBST	Tween20-haltige Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N`-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
ZNS	Zentralnervensystem

Maße und Einheiten

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm = 10^{-6} Gramm
µl	Mikroliter = 10^{-6} Liter
cm ²	Quadratcentimeter
g	Normalbeschleunigung g_n (9,897 m/s ²)
h	Stunde
kB	Kilobasen = 10^3 Basenpaare
kDa	Kilodalton = 10^3 Dalton
mA	Milliampere = 10^{-3} Ampere
mg	Milligramm = 10^{-3} Gramm
min	Minute
ml	Milliliter = 10^{-3} Liter
mM	millimolar
ng	Nanogramm = 10^{-9} Gramm
nm	Nanometer = 10^{-9} Meter
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen

Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung.....	1
1.	P-Glykoprotein [MDR1/ABCB1]	1
1.1	Aufbau und Funktionsmodell von Pgp	3
1.2	Gewebeverteilung und Funktion von Pgp	6
1.3	Substratspektrum und Modulation von P-Glykoprotein	8
2.	Heparine: Struktur und Aktivität	10
2.1	Unfraktioniertes Heparin (UFH).....	10
2.2	Niedermolekulare Heparine (NMH).....	13
3.	Die Rolle des Beta-Amyloids in der Alzheimer Krankheit	14
3.1	Morbus Alzheimer – Klinische Symptome und Neuropathologie.....	14
3.2	Das Beta-Amyloid	15
4.	Aufgabenstellung	17
B.	Material und Methoden.....	19
1.	Materialien	19
1.1	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien.....	19
1.2	Allgemein verwendete Chemikalien.....	20
1.3	Puffer und Lösungen.....	22
1.4	Lösungen für die Zellkultur	23
1.5	Zelllinie	23
1.6	Antikörper, Zellmarker und fluoreszenzmarkierte Substrate	24
2.	Zellbiologische Methoden.....	24
2.1	Zellkultivierung und Passage adhärenter LLC-PK1/-MDR1-Zellen.....	24
2.2	Kryokonservierung von LLC-PK1/-MDR1	25
2.3	Bestimmung der Zellzahl.....	25
2.4	Steigerung der Expression rekombinanter Proteine durch Histon-Deacetylase-Inhibitoren.....	25
3.	Proteinanalytische Methoden	26
3.1	Isolierung von Gesamt-Membranfraktionen aus kultivierten Zellen.....	26
3.2	Präparation von inside-out-Membranvesikeln aus kultivierten Zellen.....	26
3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	27
3.4	Diskontinuierliche Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	28
3.5	Westernblotting und Detektion der Proteine mit spezifischen Antikörpern....	29
3.6	Immunfluoreszenz	30
3.7	Transportmessungen	31
a)	Rhodamin123-Akkumulation	31
b)	Rhodamin123-Efflux	31
c)	Leakage-Test.....	32
d)	Bestimmung des Permeationskoeffizienten.....	33
e)	Transportmessung an Plasmamembran-Vesikeln.....	33
3.8	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	35

C.	Ergebnisse.....	36
1.	Charakterisierung der Pgp-überexprimierenden Zelllinie.....	36
1.1	Expression und Lokalisation des rekombinanten Pgp in LLC-Zellen.....	36
1.2	Charakterisierung des Transportes der Modellsubstanz Rhodamin 123	38
a)	Transzellulärer Rh123-Transport.....	38
b)	ATP-abhängige Rh123-Aufnahme in Membranvesikel	40
2.	Heparine und Pgp-vermittelter Transport.....	42
2.1	Einfluss auf die zelluläre Rh123-Aufnahme.....	42
2.2	Einfluss auf den transzellulären Rh123-Transport	43
a)	Einfluss von Dextransulfat.....	47
2.3	Einfluss auf die ATP-abhängige Rh123-Aufnahme in Membranvesikel	47
2.4	Direkter Transport von Heparinen.....	48
a)	Transport von [³ H]-Heparin.....	48
b)	Transport von Fluorescein-konjugiertem Heparin (FITC-Heparin)	49
3.	Beta-Amyloide und Pgp-vermittelter Transport	51
3.1	Einfluss auf den transzellulären Rh123-Transport	51
3.2	Einfluss auf die ATP-abhängige Rh123-Aufnahme in Membranvesikel	53
3.3	Direkter Transport von Amyloid-Peptiden.....	54
a)	Transzellulärer Transport von Fluorescein-konjugiertem Aβ1-40 bzw. 1-42 (FITC-Aβ1-40 bzw. 1-42).....	54
b)	Transport von Fluorescein-konjugiertem Aβ1-40 bzw. 1-42 (FITC-Aβ1-40 bzw. 1-42) in Membranvesikel	57
4.	Zusammenfassung der untersuchten Pgp-Modulatoren.....	60
D.	Diskussion	61
1.	Charakterisierung des Zellmodells	62
2.	Heparine und P-Glykoprotein	65
3.	Transport von Aβ an der Blut-Hirn-Schranke	69
E.	Zusammenfassung	74
F.	Literaturverzeichnis	75

A. Einleitung

Die primäre Funktion der Membranen aller Zellen als hydrophobe Lipiddoppelschicht ist die einer physikalischen Barriere, d. h. der Abtrennung des Inneren der Zelle von der Umgebung. Ein regulierter, selektiver Transport von Molekülen über die Plasmamembran und die Membranen intrazellulärer Kompartimente ist für das Überleben der Zelle essentiell. Dabei ist die koordinierte Aufnahme, Abgabe und Verteilung von Substraten an das Vorhandensein spezifischer Transportproteine gebunden, deren Funktionsabläufe in passive (Diffusion) oder energieabhängige Prozesse unterschieden werden. Eine Gruppe von membranständigen Proteinen, die in ihrer Funktion auf die Hydrolyse von ATP angewiesen sind, Substrate gegen einen Konzentrationsgradienten auswärtsgerichtet transportieren und somit aktiv an der Barrierefunktion von Epithelien teilhaben, sind Mitglieder der ABC („*ATP-binding cassette*“)-Transporter-Superfamilie. Auf diese Transportproteine und speziell auf das für diese Arbeit relevante P-Glykoprotein (*permeability-glycoprotein*, Pgp) soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

1. P-Glykoprotein [MDR1/ABCB1]

Das P-Glykoprotein ist das als erstes identifizierte und am besten charakterisierte Mitglied der ABC-Transporter-Familie. Diese Gruppe umfasst inzwischen mehr als 200 verschiedene Proteine in Pro- und Eukaryonten, denen eine hochkonservierte Region von etwa 200 Aminosäuren um die ATP-Bindungsstelle (auch NBD, „*nucleotid binding domain*“) (Higgins, 1992) gemein ist. Sie nutzen die Energie aus der Hydrolyse von ATP für einen meist unidirektionalen Transport verschiedenster Substrate durch Zellmembranen. Die ABC-Familie ist entsprechend der Ähnlichkeiten in der Genstruktur und in der Nukleotidsequenz in sieben Subfamilien unterteilt (Tab. 1). Die Proteine sind an vielen lebenswichtigen Prozessen beteiligt und verschiedene genetisch bedingte Krankheiten werden auf fehlerhaft funktionierende Transportproteine zurückgeführt. Beispielsweise führt eine Fehllokalisierung des CFTR-Proteins („*cystic fibrosis transductance regulator*“) der ABCC-Unterfamilie aufgrund einer Punktmutation im Gen zu einer defekten exokrinen Aktivität der Lungen, des Pankreas, der Schweißdrüsengänge und des Darmes (Sarkadi *et al.*, 1992). Eine nicht Pgp-vermittelte Mehr-

fachresistenz wird durch die Überexpression des *MRP1* („*multidrug resistance protein*“)-Genprodukts sowie weiterer Isoformen der MRP-Familie verursacht (Borst *et al.*, 2002). Zur ABCG-Untergruppe gehört das „*breast cancer resistance protein*“ (BCRP/ABCG2), das ebenfalls Resistenzen gegenüber einer Reihe von Zytostatika (Mitoxantron, Doxorubicin) vermittelt (Borst *et al.*, 2002). Bei den Mitgliedern dieser Subfamilie handelt es sich um Halbtransporter, d. h. durch Zusammenlagerung muss ein Dimer gebildet werden, um ein funktionell aktives Protein zu bilden.

Tab. 1: Übersicht über wichtige Mitglieder der humanen ABC-Transporter-Familie und deren Charakteristika (Dean et al., 2001)

Familie	Mitglied	Alias	Funktion
A	ABCA1	ABC1	Cholesterin-Transport
	ABCA2	ABC2	Arzneimittel-Resistenz
	ABCA3	ABC3	
	ABCA4	ABCR	Transport von Vit. A-Derivaten
B	ABCB1	MDR1/Pgp	Arznei-/Xenobiotika-Efflux, Zytostatika-Multiresistenz
	ABCB2/3	TAP1/2	Peptid-Transport, Antigenpräsentation
	ABCB4	MDR3	Phosphatidylcholin-Transport
	ABCB6	MTABC3	} Fe-Haushalt, Fe/S-Protein-Precursor-Transport
	ABCB7	ABC7	
	ABCB8	MABC1	
ABCB11	SPGP	Gallensäuretransport	
C	ABCC1/3	MRP1/3	Arzneimittel-Resistenz
	ABCC2	MRP2	Biliärer Transport konj. organischer Anionen
	ABCC4/5	MRP4/5	Nukleotid-Transport
	ABCC7	CFTR	Chlorid-Kanal
	ABCC8	SUR	Sulfonylharnstoff-Rezeptor
	ABCC11	MRP8	Transport u. a. von Nukleotiden und Steroid-Konjugaten
D	ABCD1	ALD	Regulation des „Very light chain“-Fettsäuren-Transportes (Zell-Lipid-Metabolismus)
E	ABCE1	OABP, RNS4I	Oligoadenylat-Bindungsprotein
F	ABCF1	ABC50	Aktivierung der Kinaseaktivität
G	ABCG1	ABC8, White	Cholesterin-Transport?
	ABCG2	ABCP, MXR, BCRP	Toxin-Efflux, Arzneimittel-Resistenz
	ABCG5	White3	Sterol-Transport
	ABCG8		Sterol-Transport

Der wichtigste und klinisch relevanteste Vertreter der ABCB-Subfamilie ist das P-Glykoprotein (ABCB1). Seine Entdeckung geht auf Forschungsarbeiten zu Arzneistoff-Resistenz-Phänomenen zurück. Die Annahme einer verringerten Permeabilität der Zellmembran für die untersuchten Arzneistoffe an Stelle eines gerichteten Transportes veranlasste Juliano und Ling zur ursprünglichen Beschreibung des Proteins als Permeabilitäts-Glykoprotein (P-Glykoprotein, Pgp) (Juliano *et al.*, 1976). Mit der Entdeckung von Pgp konnte auch das Phänomen der *multidrug resistance* (MDR) in Tumoren erklärt werden. Erste Erkenntnisse, dass Pgp Zytostatika-Resistenzen bewirken kann, erlangten Kartner und Ling durch die Untersuchung von Colchicin-resistenten CHO-Zellen („Chinese Hamster Ovary“-Zellen) (Kartner *et al.*, 1989). Es wurde nachgewiesen, dass die Überexpression des Membranproteins zur Unempfindlichkeit der Zellen gegenüber Chemotherapeutika führte. 1981 entdeckten Tsuruo *et al.* die Pgp-hemmende Wirkung des Calciumkanal-Blockers Verapamil, mit dem das MDR-Phänomen sowohl in-vitro als auch in-vivo aufgehoben werden konnte (Tsuruo *et al.*, 1981). Auch in gesunden Geweben, wie dem Intestinaltrakt, der Leber, der Niere und der Blut-Hirn-Schranke, wurde das P-Glykoprotein nachgewiesen (Thiebaut *et al.*, 1989; Thiebaut *et al.*, 1987; Cordon-Cardo *et al.*, 1989).

1.1 Aufbau und Funktionsmodell von Pgp

Das humane P-Glykoprotein ist ein, aus 1280 Aminosäuren aufgebautes, integrales *single chain* Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 170 kDa. Es setzt sich aus zwei homologen Hälften zusammen, welche analog dem typischen Aufbau eines ABC-Transporters aus jeweils einer hydrophoben N-terminalen Transmembrandomäne (TMD) und einer hydrophilen C-terminalen Nukleotid-bindenden Domäne (NBD) bestehen (Abb. 1). Jede TMD enthält sechs α -Helices, die über extra- bzw. intrazelluläre *loops* miteinander verbunden sind. Die ATP-Bindungsdomänen sind durch drei hochkonservierte Struktursequenzen, das Walker A- und Walker B-Motiv sowie der *ABC-family-signature*, charakterisiert. Sie sind funktionell eng miteinander verknüpft und essentiell für die Transportaktivität des Pgps (Higgins *et al.*, 1992).

Über elektronenmikroskopische Untersuchungen und digitale Bildanalysen wurde die Tertiärstruktur von Pgp in Form eines Zylinders mit einem Gesamtdurchmesser von 10 nm und einer Gesamthöhe von 8 nm bestimmt (Abb. 2). Die Anordnung der extra-zellulären *loops* zu einem annähernd hexagonalen Proteinring bedingt die Bildung einer

5 nm-Zentralpore, die zur zytoplasmatischen Seite geschlossen ist, wodurch sich eine wassergefüllte Kammer in der Membran ergibt. Diese Kammer ist durch einen Spalt im Proteinring geöffnet und von der Lipidphase der Membran zugänglich. Auf der zytoplasmatischen Seite wird die Zentralpore vermutlich von den 3 nm großen Nukleotidbindenden Domänen und den intrazellulären Schleifen abgeschirmt bzw. verschlossen (Higgins *et al.*, 1997; Rosenberg *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2000).

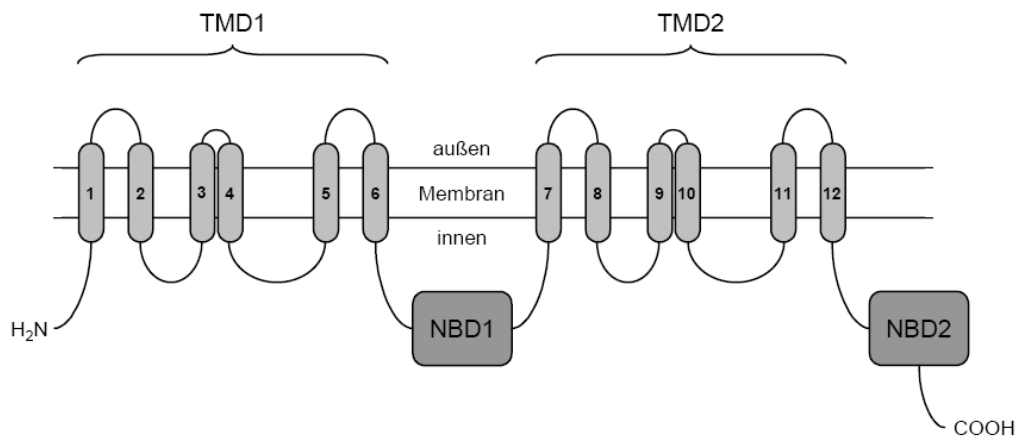


Abb. 1: 6+6-Helix-Modell von P-Glykoprotein (aus Jones *et al.*, 2000)

Für den Funktionsmechanismus von P-Glykoprotein wird angenommen, dass hydrophobe Pgp-Substrate wie Colchicin, Anthracycline, Digoxin, Cyclosporin A, die nur in ihrer ungeladenen Form die Zellmembran passieren können, bereits dort abgefangen werden und gar nicht in das Zytoplasma der Zelle gelangen. Das Flippase-Modell beschreibt, dass Pgp lipophile Substanzen, die sich in der Zellmembran verteilt haben, von der inneren Membranhälfte (*inner leaflet*) durch die infolge ATP-Hydrolyse ausgelöste Konformationsänderung in Form einer Dreh- oder Kippbewegung in die äußere Membranseite (*outer leaflet*) der Lipid-Doppelschicht „flipp“ und auf diese Weise deren Permeation in die Zelle verhindert (Abb. 2, 3) (Higgins *et al.*, 2001).

Die derzeit gültige Hypothese des komplizierten und bislang noch nicht vollständig geklärten molekularen Mechanismus des Substrattransportes ist in Abbildung 3 dargestellt. Im ersten Schritt (I) binden ATP und ein Substratmolekül an Pgp. Es folgt die Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i , was mit einer Konformationsänderung des Proteins einhergeht und die Translokation des gebundenen Substrates von einer hochaffinen zu einer niedrigaffinen Bindungsstelle bewirkt (II). Sowohl das transportierte Substratmolekül als auch P_i wird nach der ATP-Hydrolyse freigesetzt (IIIa). Wird dem System

anorganisches Vanadat V_i zugegeben, kommt es zur Bildung eines stabilen Pgp-ADP- V_i -Komplexes (*vanadate trapping*) (IIIb/c).

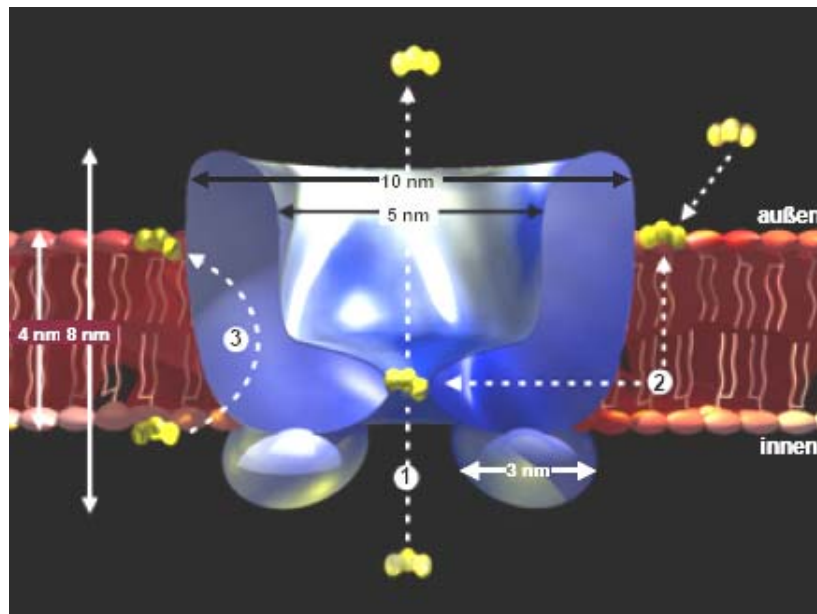


Abb. 2: 3D-Struktur von P-Glykoprotein (Querschnitt durch die Membran)
1: Porenmodell, 2: vacuum-cleaner-Modell, 3: Flippase-Modell
 [aus www.med.rug.nl/mdl/structure.htm]

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieses Zyklus ist die folgende ADP-Freisetzung unter Aufnahme eines weiteren ATP-Moleküls, die zur Regeneration von Pgp notwendig ist (IV). Durch anschließende ATP-Hydrolyse sowie Freisetzung von ADP und P_i geht P-Glykoprotein in den Ausgangszustand zurück (V+VI). Folglich sind für den Transport eines Substratmoleküls zwei Moleküle ATP notwendig (Senior *et al.*, 1997; Ueda *et al.*, 1999; Sauna *et al.*, 2000).

Zur Erkennung der strukturell variierenden Pgp-Substrate wurden mehrere Bindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten postuliert. Sie werden der Funktion nach in transportierende und regulatorische Einheiten unterteilt und durch Wechsel zwischen hoch- und niedrig-affinen Konformationen über allosterische Interaktionen positiv bzw. negativ kooperieren, was die bisherige Hypothese des Substrattransportes noch komplexer gestaltet (Shapiro *et al.*, 1999).

1.2 Gewebeverteilung und Funktion von Pgp

P-Glykoprotein wird in Tumorzellen verschiedener Krebserkrankungen exprimiert. Hierzu zählen v.a. Mamma-, Nieren-, Ovarial- und Kolonkarzinome, Gehirntumore sowie akute lymphatische und myeloische Leukämie. Eine Ursache für die klinisch bedeutende Mehrfach-Resistenz bei der Behandlung dieser Tumoren mit Chemotherapeutika ist eine Überexpression des vom *MDR1*-Gen kodierten P-Glykoproteins. Sie tritt nicht nur in sich aus Pgp-exprimierendem Gewebe entwickelten Tumoren auf, wo sie erst durch die einsetzende Chemotherapie induziert wird (erworbene MDR). Die Steigerung der Expression kann auch in Tumorzellen stattfinden, die sich aus nicht Pgp-exprimierendem Gewebe bilden bzw. keiner Therapie mit Zytostatika unterstanden (intrinsische MDR) (Goldstein *et al.*, 1989).

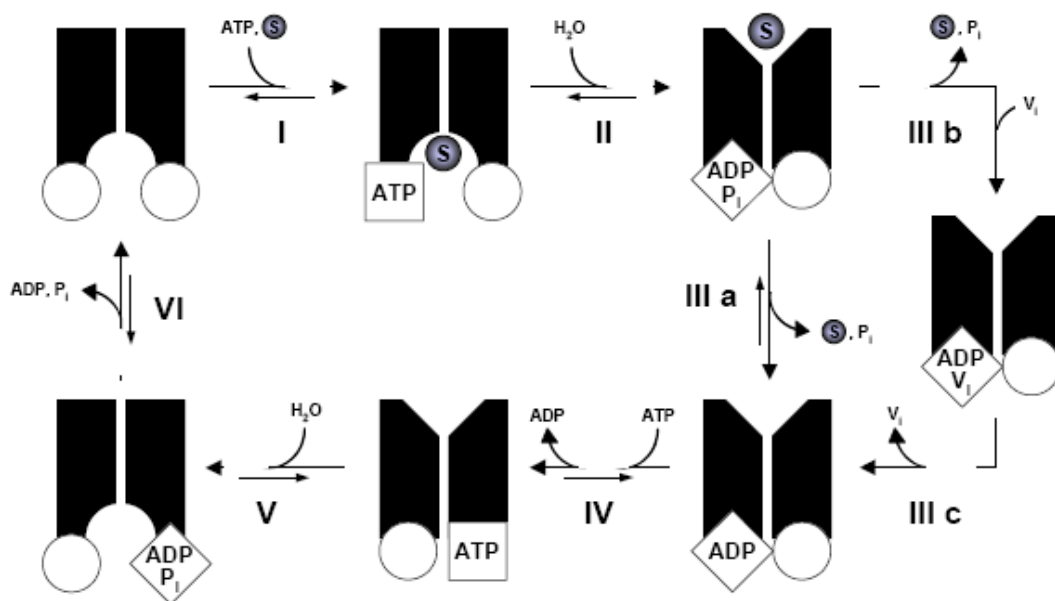


Abb. 3

- I: Bindung von ATP und Substrat an P-Glykoprotein
- II: Hydrolyse von ATP bewirkt eine Konformationsänderung und die Translokation des Substrates von einer hoch-affinen zu einer niedrig-affinen Bindungsstelle
- III: Substrat und P_i werden freigesetzt, durch Zugabe von V_i kommt es zum *vanadate trapping*
- IV: ADP wird zur Regeneration von P-Glykoprotein freigesetzt, ein zweites ATP-Molekül bindet
- V: Hydrolyse von ATP bewirkt eine Konformationsänderung
- VI: Freisetzung von ADP und P_i , P-Glykoprotein geht in den Ausgangszustand zurück

Die Expression von Pgp wurde auch in zahlreichen gesunden Geweben nachgewiesen. Die weite Verbreitung und die polare Expression im Epithel dieser Gewebe stehen im Zusammenhang mit dem Einfluss auf die Aufnahme, Verteilung und Elimination von Xenobiotika und lassen dem Protein eine physiologisch-protective Rolle zukommen. Die hohe intestinale Expression von Pgp vermindert die Aufnahme von Xenobiotika und verhindert deren Eintritt in den Blutkreislauf z. B. als Schutz- und Abwehrmechanismus gegen peroral aufgenommene Toxine (*first line of defense*). Neben Bio-transformationenzymen wie CYP 3A4 führt Pgp zu einer erheblichen Einschränkung der Bioverfügbarkeit von oral verabreichten Arzneimitteln, die gemeinsame Substrate darstellen (Borst *et al.*, 1993; Schinkel *et al.*, 1997a; Fromm, 2000). In der Leber ist Pgp in den apikalen Membranen der Hepatozyten lokalisiert. Es wird eine Beeinflussung des hepatischen Metabolismus und der hepatischen Clearance durch die Beteiligung des Proteins an der biliären Elimination von Arzneistoff-Metaboliten sowie von Giftstoffen und demnach eine detoxifizierende Funktion angenommen (Thiebaut *et al.*, 1989; Ishikawa, 1992; Kusuhara *et al.*, 1998; Chiou *et al.*, 2000; van Tellingen, 2001). Eine vergleichbare Wirkung wurde für Pgp auch in der Niere beschrieben. P-Glykoprotein ist in der apikalen Bürstensaummembran proximaler Tubuli lokalisiert und aktiv an der Elimination von Stoffwechselprodukten in der Niere beteiligt (Thiebaut *et al.*, 1989; Borst *et al.*, 1993; Schinkel, 1997; Miller *et al.*, 1997).

Durch die Lokalisation in den apikalen Membranen zerebraler Kapillarendothelzellen trägt Pgp aktiv zur Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke bei, indem es lipophile Substanzen durch auswärtsgerichteten Transport aus dem Kapillarendothel in das Gefäßlumen an der Permeation vom Blut in das Gehirn hindert (*second line of defense*) (Thiebaut *et al.*, 1987; Cordon-Cardo *et al.*, 1989; Huisman *et al.*, 2001). Eine weitere wichtige Blut-Gewebe-Barriere wird u. a. durch aktive Pgp-vermittelte Transportprozesse realisiert: Die nachgewiesene Expression und Lokalisation des Proteins in der Plazenta trägt zur effizienten protektiven Funktion der Plazenta-Schranke zwischen Mutter und Fötus bei (MacFarland *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 1997; Utoguchi *et al.*, 2000). Neben den genannten ist P-Glykoprotein in zahlreichen anderen Geweben des Körpers mit teilweise nicht bekannten Funktionen zu finden.

Aufgrund der Transportfunktion von Pgp wird die Arzneistoff-Pharmakokinetik deutlich beeinflusst. Hiervon betroffen sind zahlreiche Arzneistoffe unterschiedlicher pharmakologischer Indikationen (Tab. 2). Für die Pharmakotherapie ist das Verständnis Pgp-vermittelter Transportvorgänge außerordentlich wichtig, weil Plasmakonzentration

und -halbwertszeit und somit auch Wirksamkeit und Wirkungsdauer eines Arzneistoffs direkt von dessen pharmakokinetischem Verhalten abhängig sind. Dabei kann die gleichzeitige Gabe eines oder mehrerer anderer Arzneimittel, die ebenfalls eine Affinität zu Pgp haben, diese Faktoren wesentlich beeinflussen (Schinkel *et al.*, 1997b; Fromm, 2000; Tanigawara, 2000; Kusuhara *et al.*, 2002). Das bekannteste Beispiel für Interaktionen dieser Art ist die gleichzeitige Gabe von Arzneistoffen wie Chinidin, Cyclosporin A oder Verapamil mit dem Herzglykosid Digoxin. Hierbei kann es zu einer zwei- bis dreifachen Erhöhung des Digoxin-Plasmaspiegels kommen, was zu starken toxischen, u. U. auch letalen, Nebenwirkungen führt (Schinkel *et al.*, 1995; Sarkadi *et al.*, 1997; Fromm *et al.*, 1999; Paneitz *et al.*, 2000). Ein weiterer Mechanismus, der zu einer verminderten oralen Bioverfügbarkeit und eine somit subtherapeutische Plasmakonzentration eines koapplizierten Arzneistoffes führen kann, ist der Eingriff in die Regulation des Proteins z. B. die Induktion von Pgp durch das Antibiotikum Rifampicin (Romiti *et al.*, 1998; Schinkel *et al.*, 1995; Spahn-Langguth *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001).

1.3 Substratspektrum und Modulation von P-Glykoprotein

Die Substratspezifität von P-Glykoprotein ist äußerst breit gefächert. Darunter fallen neben zahlreichen Zytostatika auch sehr viele Substanzen gänzlich anderer Wirkung und chemischer Struktur (Tab. 2). Bei den mit Pgp interagierenden Substanzen handelt es sich hauptsächlich um lipophile bis amphiphile Moleküle mit einem Molekulargewicht von etwa 250-2000 Da. Allerdings können auch relativ hydrophile Substanzen schwache Pgp-Substrate darstellen (Ueda *et al.*, 1997; Seelig, 1998; Seelig *et al.*, 2000). Die Entwicklung wirksamer und selektiver Pgp-Inhibitoren ist aufgrund der *multidrug resistance* von großer klinischer Bedeutung. Der *in vitro*- und *in vivo*-Einsatz des Calciumkanal-Antagonisten Verapamil in murinen Pgp-exprimierenden Tumorzellen gab aufgrund einer erhöhten Sensitivität der Zellen auf Vincristin erste Hinweise auf eine pharmakologische Reversion der MDR (TSURUO *ET AL.*, 1981). Desweiteren zählen zu den *MDR reversal agents* der 1. Generation Chinidin und Cyclosporin A, deren erforderlichen hohen Konzentrationen jedoch zahlreiche toxische Nebenwirkungen bedingen. Pgp-Modulatoren der 2. Generation wie das nicht-immunsuppressive Cyclosporin A-Derivat PSC-833 und das Acridoncarboxamid GF120918 haben eine hohe Affinität zu Pgp und bewirken eine spezifische, nichtkompetitive Hemmung. Es

resultiert zwar eine höhere Zytostatikakonzentration im Tumorgewebe, allerdings steigt auch die Konzentration im allgemeinen Kreislauf, wodurch sich die therapeutische Breite der Chemotherapeutika verringert.

Tab. 2: Substratspektrum von P-Glykoprotein (Auswahl aus *)

Substanzklasse	Beispiele
Zytostatika	
• Antibiotika	Actinomycin D, Mitomycin C, Puromycin
• Anthracycline	Doxorubicin, Daunorubicin, Epirubicin, Idarubicin
• Vinca-Alkaloide	Vinblastin, Vincristin, Vinorelbin
• Epipodophyllotoxine	Etoposid, Teniposid
• Sonstige	Colchicin, Methotrexat, Taxol
Antiarrhythmika	Amiodaron, Chinidin
Antibiotika	Erythromycin, Gramicidin D, lipophile Cephalosporine
Beta-Blocker	Acebutolol, Celiprolol, Talinolol
Ca ²⁺ -Kanalblocker	Bepriidil, Diltiazem, Verapamil, Nifedipin, Nifedipin
HIV-Therapeutika	Indinavir, Ritonavir, Saquinavir
Hormone	Aldosteron, Cortison, Cortisol, Dexamethason, Tamoxifen
Immunsuppressiva	Cyclosporin A, FK506, Rapamycin
Lipidsenker	Atorvastatin, Fluvastatin, Pravastatin
Opioide	Loperamid, Morphin
Psychopharmaka	Chlorpromazin, Promazin, Trifluoperazin
Sonstige	Calcein-AM, Cimetidin, Digoxin, Dipyridamol, Hoechst 33342, Ivermectin, Reserpin, Rhodamin123, Rifampicin, Yohimbin, kleine Peptide (3-15 Aminosäuren)

*(Ford *et al.*, 1996; Ueda *et al.*, 1999; Seelig *et al.*, 2000; Seelig, 1998; Wang *et al.*, 2001)

Die 3. Generation inhibiert Pgp mit hoher Selektivität im Tumorgewebe und hat nur einen geringen Einfluss auf die Pharmakokinetik applizierter Zytostatika (Bsp. Benzodiazepin-Derivat R101933, Anthranilsäure-Derivat XR9576) (Twentyman, 1992; Ford, 1996; Lemaire *et al.*, 1996; Arboix *et al.*, 1997; van Zuylen *et al.*, 2000).

Als potentieller MDR-Modulator und möglicher Kombinationspartner in der Chemotherapie wurde auch das bisher als Antikoagulans genutzte Heparin entdeckt. Die Anwesenheit von unfraktioniertem Heparin führte zu verstärkten intrazellulären Akkumulationen des Pgp-Modellsubstrates Rhodamin123 in Leukämie-Zellen und in Monozyten (Maia *et al.*, 1996) oder von Calcein-AM in humanen Brustkrebszellen MDA-MB231 (Angelini *et al.*, 2005), was schlussfolgernd als modulierende Effekte auf die Pgp-Funktion bedeutsam für das kinetische Verhalten von Zytostatika wäre.

2. Heparine: Struktur und Aktivität

Heparin ist eines der wirksamsten und am häufigsten angewandte Arzneimittel des letzten Jahrhunderts. Das sulfatierte Polysaccharid wird als wichtiges direkt wirkendes Antikoagulans genutzt, um die natürliche Gerinnungsneigung des Blutes zu unterdrücken. Bei Kontakt des Blutes mit beschädigtem Endothel in einer Operationswunde oder mit synthetischen Oberflächen von medizinischen Geräten wird die Koagulationskaskade aktiviert. Deshalb ist heutzutage der Einsatz von Heparin zur Thromboseprophylaxe bei chirurgischen Eingriffen oder extrakorporalen Therapien wie z.B. der Dialyse unerlässlicher Standard.

2.1 Unfraktioniertes Heparin (UFH)

Das natürliche Produkt Heparin ist das am stärksten sulfatierte Mitglied der Glukosaminoglykane (GAG). Es wird als Proteoglykan verbunden mit einem Serin-Glycin-Proteinkern synthetisiert und kommt nur intrazellulär in den Granula von Mastzellen vor. Die physiologische Funktion von endogenem Heparin in Mastzellen ist nicht bekannt; es ist eindeutig nicht in die Blutkoagulation involviert (Linhardt, 2003).

Heparin ist ein heterogenes Gemisch aus unterschiedlich langen Polysaccharidketten (MW ~ 12 kDa). Diese enthalten Pyranosyluronsäure (Uronsäure) und 2-Amino-2-deoxyglucopyranose (D-Glukosamin), die als Disaccharideinheiten miteinander 1,4-glykosidisch verknüpft sind (Abb. 4). Das in Deutschland im Handel befindliche Heparin wird ausschließlich aus Schweinedarm gewonnen. Die biologische Standardisierung erfolgt mit der Bestimmung der gerinnungshemmenden Wirkung an rekalfiziertem Schafplasma und wird in Internationalen Einheiten (I.E.) angegeben (1 mg Standardheparin entspricht 160 I.E.).

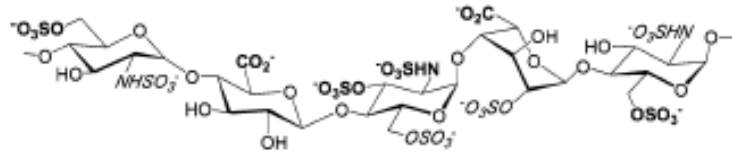


Abb. 4: Pentasaccharidsequenz von Heparin (Sequenz für die Bindung an AT III) (aus Linhardt, 2003)

Für die antikoagulatorische Aktivität des pharmazeutischen Heparins ist die Bindung von unregelmäßig verteilten Pentasaccharidsequenzen mit hochaffinen Lysinbindungsstellen am Antithrombin III (AT III) verantwortlich (Abb. 4/5). AT III ist ein in der Leber synthetisierter Serinproteaseinhibitor mit einer hohen Affinität zu Thrombin und Faktor Xa. Verschiedene Heparin-Fraktionen variieren stark in ihrer Bindung mit AT III. Etwa nur ein Drittel des Heparins zeichnet sich durch hohe antikoagulatorische Aktivität aus („*high AT III-affinity heparin*“, ~300 U/mg). Die anderen zwei Drittel weisen eine geringe Affinität zu AT III auf (<20 U/mg) (Lindahl *et al.*, 1979). Die gerinnungshemmende Wirkung von UFHs mit einer Kettenlänge von mindestens 18 Monosacchariden äußert sich in der Umwandlung von langsam wirkenden AT III in das schneller wirkende „Sofort-Antithrombin“. Aktiviertes AT III im Komplex mit Heparin kann den Faktor Xa direkt inaktivieren. Die Bildung eines ternären Komplexes von Heparin mit AT III und Thrombin führt zur Inaktivierung des Thrombins (Abb. 5). Nach Ablauf der Reaktion wird Heparin wieder freigesetzt und ist erneut für die Bindung an AT III verfügbar.

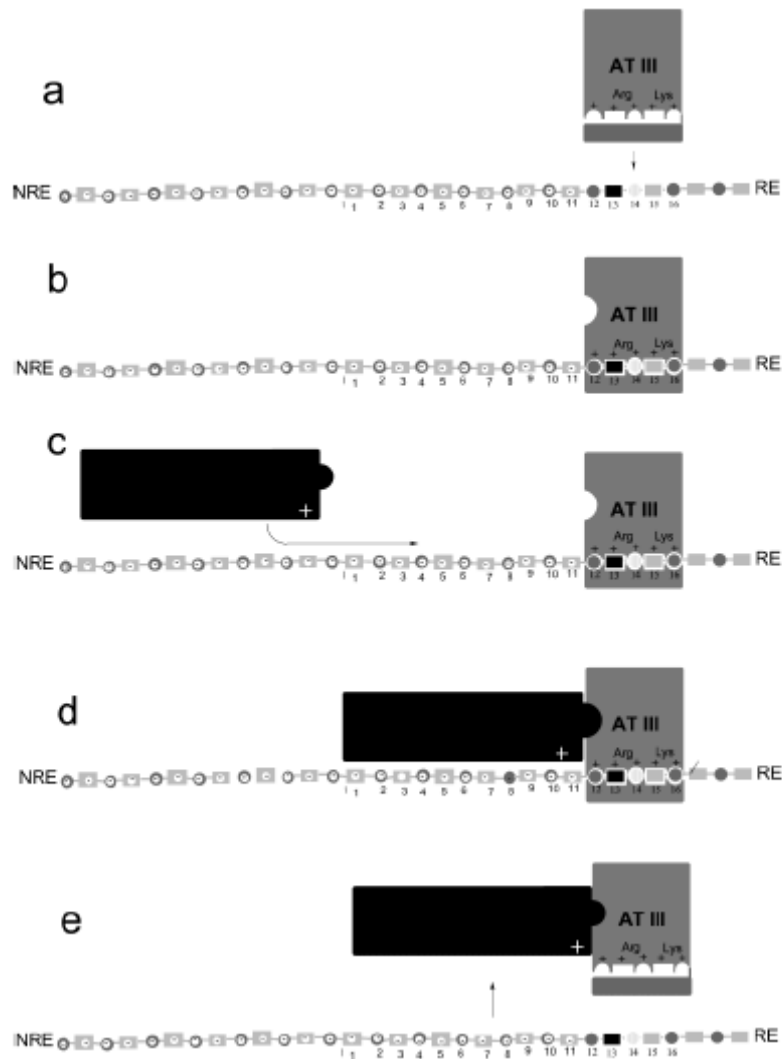


Abb. 5: Antikoagulatorische/antithrombotische Aktivität von Heparin. (a) AT III bindet an spezifische Pentasaccharidsequenz im Heparin; (b) binärer Komplex aus AT III und Heparin, aktiviertes AT III durch Konformationsänderung; (c) Thrombin (schwarz) bindet an Heparin, gleitet entlang der Kette Richtung AT III; (d) ternärer Komplex aus Thrombin, Heparin und AT III, Inaktivierung von Thrombin; (e) Thrombin an AT III kovalent gebunden, Abdissoziation vom Heparin (aus Linhardt, 2003)

Bedingt durch seine stark negative Ladung und sein hohes Molekulargewicht wird Heparin nur in sehr geringen Mengen intestinal resorbiert und kann nur parenteral appliziert werden. Nach Subcutangabe beträgt die Bioverfügbarkeit etwa 30 %. Soweit bekannt erfolgt die Metabolisierung über Heparinabbauende Enzyme wie Heparinase, Heparinsulfamidase und depolymerisierende Enzyme, die in der Leber und im Plasma vorkommen. Der größere Anteil wird renal als desulfatierte Verbindung ausgeschieden. Aufgrund seiner polyanionischen Struktur erzielt Heparin vielfältige biologische Effekte auch außerhalb des Gerinnungssystems. Beispielsweise stimuliert es die endotheliale Synthese des antikoagulatorisch wirksamen Heparansulfates und bewirkt die

Freisetzung des TFPI (*Tissue factor pathway inhibitor*). Die Freisetzung des Zellaktivators t-PA aus dem Endothel bedingt eine erhöhte fibrinolytische Aktivität. Der Einfluss von Heparin erstreckt sich auf eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen wie Migration von Immunzellen, Inflammation, Wundheilung, Virusbindung-/Zelleintritt, Tumorzell-Metastasierung oder Zellproliferation (Smorenburg *et al.*, 2001; Linhardt, 2003; Munoz *et al.*, 2004).

2.2 Niedermolekulare Heparine (NMH)

Ein besseres Verständnis der Gerinnungskaskade war mit der Entwicklung der niedermolekularen Heparine (*low molecular weight heparins*, LMWH) verknüpft. Die Regulation des Faktors Xa als Schnittstelle zwischen intrinsischem und extrinsischem Weg erwies sich als therapeutischer Angriffspunkt, um Substanzen zu entwickeln, die spezifischer als Heparin agieren und geringere hämorrhagische Nebenwirkungen hervorrufen.

Nachdem Heparin enzymatisch oder chemisch in kleinere Fraktionen mit einem mittleren Molekulargewicht von 3000-7000 Da gespalten wurde, war die Thrombin-inhibierende Aktivität stärker vermindert als die gegen Faktor Xa (Langer *et al.*, 1984). LMWH binden auch über spezifische Pentasaccharidstrukturen an AT III. Heparinmoleküle mit einer Kettenlänge von 8-14 Monosacchariden beschleunigen aber fast ausschließlich die Inaktivierung von Faktor Xa, da aufgrund der Molekülgröße kein ternärer Komplex mit AT III und Thrombin gebildet wird. Folglich ist die Antithrombinwirkung von LMWH niedriger als die von UFH. Niedermolekulare Heparine haben gegenüber den UFH den Vorteil der verbesserten Pharmakokinetik und -dynamik. Die Affinität zu Plasmaproteinen, Blutplättchen und Endothelzellen ist geringer, was in der längeren Halbwertszeit, der gesteigerten subcutanen Bioverfügbarkeit (90 %) und der überwiegend renalen Clearance resultiert. LMWH weisen im Vergleich zu UFH bei einer großen therapeutischen Breite ein günstigeres Nebenwirkungsprofil auf. Unter ihrer Gabe kommt es zu weniger hämorrhagischen Komplikationen wie der Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT). Eine wichtige neue Bedeutung kommt dem LMWH bei der Behandlung der venösen Thromboembolie in Krebspatienten zu. Sein Einfluss auf die Zellproliferation, die Adhärenz der Tumorzellen am vaskulären Endothel, die Regulation des Immunsystems und die sowohl inhibitorischen als auch stimulierenden Effekte auf die Angiogenese hatte eine gesteigerte Überlebenswahr-

scheinlichkeit der mit LMWH-behandelten Patienten im Vergleich mit der Anwendung von UFH zur Folge (Smorenburg *et al.*, 2001).

3. Die Rolle des Beta-Amyloids in der Alzheimer Krankheit

Es ist bekannt, dass Pgp im zerebralen Kapillarendothel lokalisiert ist und durch die Minderung der zellulären Aufnahme von Xenobiotika aus dem Blutkreislauf an der Aufrechterhaltung der Barriere- und Schutzfunktion der Blut-Hirn-Schranke beteiligt ist. Dennoch müssen selektive Transportprozesse zur Sicherung der zerebralen Homöostase stattfinden. Störungen dieses Gleichgewichtes, denen unzureichende Aufnahme- oder Eliminationsmechanismen für physiologische Substrate zu Grunde liegen, können mit Erkrankungen des ZNS assoziiert sein. So sprechen Untersuchungen der letzten Jahre für eine Beteiligung von Transportproteinen an der Clearance des mit dem Auftreten der Alzheimer-Erkrankung im Zusammenhang stehenden Beta-Amyloids, dessen Erforschung zu einem besseren Verständnis der neurodegenerativen Veränderungen und zur Entwicklung von Therapieansätzen beitragen soll.

3.1 Morbus Alzheimer – Klinische Symptome und Neuropathologie

Morbus Alzheimer ist eine fortschreitende Demenz-Erkrankung (von lat. *demens*, „verwirrt“) des Gehirns, die vorwiegend im Alter auftritt und im Verlauf von einer anfänglichen Gedächtnisschwäche bis zum Totalverlust der Urteilsfähigkeit und der Persönlichkeit führen kann. Die Kernsymptomatik der Alzheimer-Demenz ist durch Defizite in neuropsychologischen Bereichen geprägt, die zu den sogenannten höheren kortikalen Leistungen gezählt werden. Bei den meisten Patienten treten im Verlauf der schleichend beginnenden Erkrankung Symptome wie Passivität, emotionaler Rückzug, Stimmungslabilität und psychiatrische Begleiterscheinungen wie Depression, Apathie, visuelle Halluzinationen auf (Burns *et al.*, 1990; Chatterjee *et al.*, 1992; Cohen *et al.*, 1993). Neurologische Auffälligkeiten beim Morbus Alzheimer sind Enthemmungszeichen (Primitivreflexe), Pyramidenbahnzeichen (gesteigerte Muskeleigenreflexe) und extrapyramidalmotorische Symptome (Bradykinese) (Franssen *et al.*, 1993; Reisberg *et al.*, 1999). In etwa einem Drittel aller Fälle entwickelt sich im Verlauf der Erkrankung ein Parkinson-Syndrom.

Zahlreiche neurobiologische Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass eine Abnahme der kortikalen Synapsendichte vor allem in Kortexarealen, die für assoziative kognitive Funktionen von Bedeutung sind, eng mit dem Auftreten der Demenz und ihrem Schweregrad korreliert (Clinton *et al.*, 1994; Scheff *et al.*, 2003). Zu den hirnpathologischen Veränderungen zählt auf makroskopischer Ebene die Hirnatrophie, von der der Frontal- und Temporallappen der Hirnrinde, der Hippocampus und die Regio entorhinalis am stärksten betroffen sind (Brun *et al.*, 1981). Als Kompensation für das atrophiierte Hirngewebe findet sich eine Vergrößerung der Hirnventrikel und des äußeren Liquorraumes (Abb. 6). Mikroskopisch sind besonders zwei Veränderungen auffällig: die neurofibrillären Bündel und die neuritischen Plaques. Die von Alzheimer entdeckte „neurofibrilläre Degeneration“ als eine besondere Art der Schädigung kortikaler Nervenzellen ist durch das Auftreten intrazellulärer Faserbündel charakterisiert, die aus degenerierten Neurofilamenten und Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAP) aufgebaut sind (Matsuyama *et al.*, 1989).

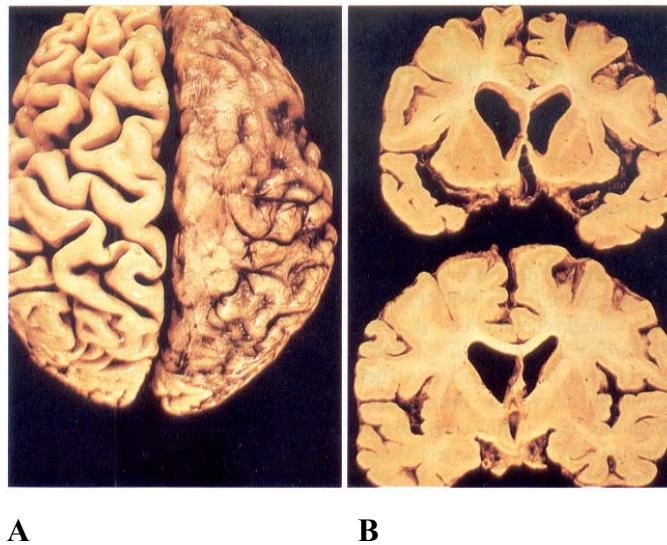


Abb. 6: (A) Äußere Atrophie: links gesundes, rechts Alzheimer-Gehirn; (B) innere Atrophie: unten gesundes, oben bei einem Alzheimer-Gehirn (aus K. Maurer „Alzheimer“, 1993)

3.2 Das Beta-Amyloid

Die neuritischen (senilen) Plaques bilden die zweite wesentliche histopathologische Auffälligkeit beim Morbus Alzheimer. Sie sind diffus insbesondere im frontalen und temporalen Assoziationskortex sowie in Amygdala und Hippocampus verteilte Herdchen mit einem Durchmesser von 5-200 μm . Die senilen Plaques bestehen aus

einem Rand von vergrößerten Axonen, Gliafortsätzen, Astrozyten sowie einem zentralen Amyloidkern.

Die Reinigung und Sequenzierung des aus 39-43 Aminosäuren bestehenden Amyloid-Proteins mit einem Molekulargewicht von 4 kDa gelang erstmals 1985 (Masters *et al.*, 1985). Wegen seiner β -Faltblattstruktur wurde es Beta-Amyloid genannt (A β). Es folgte die rekombinante Klonierung und Charakterisierung des natürlichen Vorläufers des A β s, des sog. Amyloid-Prekursor-Proteins (APP), das im ZNS von Neuronen, Astrozyten und Mikroglia gebildet wird (Kang *et al.*, 1987). Das APP unterliegt der Spaltung durch Proteasen (Sekretasen), wodurch es zur Freisetzung des A β -Peptids aus dem Vorläuferprotein kommen kann. Der nicht-amyloidogene Weg ist charakterisiert durch die enzymatische Aktivität der α -Sekretase, die in einer Position innerhalb der A β -Protein-Teilsequenz gespalten, was die Bildung von Beta-Amyloid verhindert (Sisodia, 1992). Neben dem α -Sekretase-Weg existiert ein amyloidogener β -Sekretase-Weg, bei welchem das APP-Molekül in einer Position N-terminal der A β -Sequenz gespalten wird. Eine nachfolgende hydrolytische Spaltung durch die γ -Sekretase innerhalb der Transmembrandomäne führt zur Freisetzung von A β (Chyung *et al.*, 2005). Die variierenden Längen des Beta-Amyloid-Proteins entstehen wahrscheinlich durch unterschiedliche γ -Sekretase-Schnittstellen.

Das Beta-Amyloid-Protein kommt als physiologisches, lösliches Produkt im zellulären Stoffwechsel vor. Die β -Faltblattstruktur und die zunehmende Länge des Proteins sind für eine leichte Aggregation und Bildung unlöslicher Polymere verantwortlich. In Kernen seniler Plaques findet man A β , das 41-43 Aminosäuren umfasst, wogegen das Beta-Amyloid im Blutplasma und im Liquor nur 40 Aminosäuren lang ist.

Ein zentraler Punkt von Untersuchungen ist, wie Beta-Amyloid-Aggregate zur Neurodegeneration führen. Wahrscheinlich wirken spezifische (A β) und unspezifische (Alterungsprozesse) Mechanismen zusammen. Die Neurotoxizität der Amyloid-Peptide beruht auf der Störung der Membranfluidität (Eckert *et al.*, 2001), der Entgleisung der zellulären Kalzium-Homöostase (Kruman *et al.*, 1999) und der Bildung von toxischen freien Radikalen (Markesbery, 1997), welche zum nekrotischen oder apoptotischen Zelluntergang führen (Cotman, 1998).

Die Alzheimer-Erkrankung ist durch pathologische Anhäufungen von unlöslichen A β -Peptiden im Gehirn gekennzeichnet. Bei einer kontinuierlichen Synthese des Beta-Amyloids wird die Akkumulation auf eine ungenügende Clearance des Peptids an der Blut-Hirn-Schranke zurückgeführt. Es wurden bisher einige Proteine identifiziert, die

diesen aktiven Transport realisieren. Die cerebrale Amyloid-Konzentration wird beispielsweise durch einen schnellen RAGE (*receptor for advanced glycation end products*)-vermittelten Influx und den LRP (*low-density lipoprotein receptor related protein*)-vermittelten Efflux reguliert (Deane *et al.*, 2004; Shibata *et al.*, 2000). Auch eine Beteiligung des Cholesterol-Transporters ABCA1 konnte anhand von vermehrten A β -Ablagerungen in Gehirnen von ABCA1-defizienten Mäusen (Koldamova *et al.*, 2005) und einer aus der Induktion des Proteins resultierenden erhöhten A β -Sekretion in Neuroblastom-Zellen gezeigt werden (Fukumoto *et al.*, 2002). Mit dem P-Glykoprotein scheint ein weiterer ABC-Transporter eine wichtige Rolle in der Amyloid-Clearance zu spielen. Von Lam *et al.* wurde gezeigt, dass Pgp ATP-abhängig in MDR1-Membranvesikel transportiert wird (Lam *et al.*, 2001). Anhand immunhistochemischer Untersuchungen an Gehirnen Verstorbener wurde eine Korrelation der niedrigen Pgp-Expression mit verstärkten Amyloid-Ablagerungen im Neurophil der Hirnrinde und den Gefäßen der Hirnhäute und des Gehirns ermittelt (Vogelgesang *et al.*, 2002). Unterstützt wurde dieses Ergebnis durch Studien an Pgp-knockout-Mäusen, bei denen es zu vermehrten cerebralen A β -Ablagerungen kam (Cirrito *et al.*, 2005). Zusammenfassend könnten diese Daten erste Möglichkeiten einer effektiven Prävention und einer sinnvollen Therapie der AD eröffnen.

4. Aufgabenstellung

Die weitere Charakterisierung des humanen P-Glykoproteins hinsichtlich seiner Funktionsweise und Interaktion mit physiologischen oder pharmazeutisch relevanten Substanzen ist von großem medizinischem Interesse. In der vorliegenden Arbeit sollten in einem etablierten Zellmodell die Effekte von unfraktioniertem bzw. niedermolekularem Heparin und von Beta-Amyloid 1-40 und 1-42 auf den Pgp-vermittelten Transport untersucht werden.

Zunächst erfolgt die Charakterisierung der parentalen und MDR1-transfizierten LLC-Zellen hinsichtlich der Expression und Lokalisation von Pgp mit Hilfe der Western Blot-Analyse sowie der konfokalen Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Anschließend wird die Funktionalität des Pgp anhand des apikalen Effluxes der Modellsubstanz Rhodamin123 am polarisierten Zellmonolayer sowie der ATP-abhängigen Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes in isolierte Membranvesikel überprüft.

Im nächsten Schritt werden die Effekte der Heparine und der Beta-Amyloide auf den Pgp-vermittelten Rh123-Transport mit denen von Pgp-Inhibitoren z. B. Verapamil und Cyclosporin A verglichen. Dabei ist u. a. von Interesse, ob die Wirkungen in Abhängigkeit von der Konzentration und der Molekulargewichtsfraction bzw. der Peptidkettenlänge erfolgen.

Desweiteren soll in den genannten Zellsystemen geklärt werden, ob die untersuchten Modulatoren selbst Substrate des P-Glykoproteins darstellen und dieser Transport durch Inhibitoren beeinflussbar ist.

B. Material und Methoden

1. Materialien

1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte/Verbrauchsmittel	Hersteller
Brutschrank BBD 6220	Heraeus Instruments, Hanau
CASY [®] 1 Modell TT	Schärfe System, Reutlingen
Chromatographie-Papier	VWR, Hamburg
Dounce Gewebehomogenisator	Wheaton Science/VWR, Darmstadt
Elektrophoresekammer	Serva, Heidelberg/Biometra, Göttingen
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Heizblock	Grant QBT
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Chromaphor Analysen-Technik GmbH, Duisburg (Confocal Scanning Unit, Visotech; Mikroskop Nikon TE300, Nikon GmbH; Laser Innova 70C, Coherent)
Magnetrührgerät MR 3001	Heidolph, Schwabach
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Nalgene [™] Cryo Freezing Container	
Nick [™] columns	Amersham Biosciences, Freiburg
Photometer Viktor ² 1420 multilabel counter	Wallac, Freiburg
Polyclear-Zentrifugenröhrchen	Herolab, Wiesloch
	Sorvall/Thermo Electron, Langenselbold
Potter S	B. Braun Biotech international, Melsungen
Röntgenfilme	Agfa, Fellbach
Rotor 70.I/TI	Sorvall/Thermo Electron, Langenselbold
Rotor Swing-out TH-641	Sorvall/Thermo Electron, Langenselbold
Standard Power Pack 25	Biometra, Göttingen
Sterilbank Herasafe	Heraeus Instruments, Hanau
Trans-Blot [™] Cell	BioRad, München
Transfermembran	Schleicher & Schuell, Dassel

Transwell [®] Polyester Membrane Inserts	Corning, Schiphol-Rijk/Niederlande
Vortexer Reax top	Heidolph, Schwabach
Wasserbad, Typ 5A	Julabo, Seelbach
Zellkulturartikel	BD Falcon, Heidelberg
Zentrifugen	Optima [™] TL Ultracentrifuge, Beckmann, München
	Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments, Hanau
	LZ Ultracentrifuge, Beckman, München
	Biofuge, Heraeus Instruments, Hanau
	Centrikon T-1170/Centrikon H401
	Kendro/Thermo Electron, Langenselbold

1.2 Allgemein verwendete Chemikalien

Hersteller	Chemikalien
<i>Acros Organics, Belgien</i>	D(+)-Sucrose
<i>Alexis, Grünberg</i>	Cyclosporin A
<i>Amersham Biosciences, Freiburg</i>	Beta Amyloid 1-40/42 Biotrak ELISA ECL [™] Western Blotting Detection Reagents
<i>Dako Corporation, USA</i>	DAKO [®] Fluorescent Mounting Medium
<i>Merck, Darmstadt</i>	Dinatriumhydrogenphosphat Methanol Natriumdihydrogenphosphat
<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>	Bovines Serumalbumin (BSA)
<i>Roth, Karlsruhe</i>	Ammoniumperoxodisulfat (APS) Bromphenolblau Dimethylsulfoxid (DMSO) Ethanol Rotiphorese [®] Gel 30 Tetramethyl-ethylen-diamin (TEMED) Tris Ultra β -Mercaptoethanol
<i>rPeptide, USA</i>	Beta Amyloid 1-40/42

Schärfe System, Reutlingen

Sigma, Deisenhofen

CASY[®] ton

Adenosinmonophosphat

Adenosintriphosphat

Aprotinin

Bicinchoninic Acid Solution (BCA)

Borsäure

Bromphenolblau

Calciumchlorid

Ethidiumbromid

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Glucose

Glycerin

Glycin

Heparin sodium salt

Heparin sodium salt, low molecular weight

Hepes

Kaliumchlorid

Kaliumdihydrogenphosphat

Kreatinkinase

Kupfer-II-sulfat

Leupeptin

Magnesiumsulfat

Natriumchlorid

Paraformaldehyd

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

Ponceau S

Prestained SDS Molekular weight marker

Rhodamin 123

Saccharose

Sephadex[®] G50

Sodiumdodecylsulfat (SDS)

Triton-X 100

Trypton

Tween 20

	Verapamil
	Yeast extract
<i>Töpfer, Dietmannsried</i>	Magermilchpulver

1.3 Puffer und Lösungen

4x SDS-Probenpuffer (Lämmli)		3,125 ml 1 g 5,8 ml 0,005 g 2,5 ml	1M Tris pH 6,8 SDS 87% Glycerin Bromphenolblau β -Mercaptoethanol
10x SDS-PAGE-Laufpuffer (Tankpuffer)		30 g 144 g 10 g ad 1 l	Tris Glycin SDS Aqua dest.
10x Transferpuffer (Towbin)		30,3 g 144 g ad 1 l	Tris Glycin Aqua dest.
10x TBS		80 g 2 g 30 g ad 1 l	NaCl KCl Tris Aqua dest. ad pH 7,4
1x TBST		500 μ l ad 1 l	Tween 20 1x TBS
Tris/Sucrose		10 mM 250 mM ad 1 l	Tris D(+) Sucrose Aqua dest. ad pH 7,4
10x PBS		1,44 g 90,0 g 5,28 g ad 1 l	KH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₄ /2xH ₂ O Aqua dest. ad pH 7,4
10x Hypotoner Puffer	Lsg. A.	26,7 mg 11,4 mg ad 300 ml	Na ₂ HPO ₄ /2xH ₂ O EDTA Aqua dest.
	Lsg. B.	13,8 mg 7,6 mg ad 200 ml	NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O EDTA Aqua dest.
	Lsg. A. + B.		ad pH 7,0

38%ige Sucrose-Lösung	38 g ad 100 ml	D(+) Sucrose 5 mM Hepes pH 7,4
Inkubationspuffer	142 mM 5 mM 1 mM 1,5 mM 1,2 mM 5 mM 12,5 mM ad 500 ml	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ CaCl ₂ MgSO ₄ Glucose Hepes Aqua dest. ad pH 7,3
4%ige Paraformaldehyd-Lösung	4 g ad 50 ml 10 min 10 N	Paraformaldehyd PBS pH 7,2 60 °C rühren NaOH bis Lsg. klar ad pH 7,2

1.4 Lösungen für die Zellkultur

Hersteller	Lösungen
<i>Seromed-Biochrom KG, Berlin</i>	Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) Fötale Kälberserum (FCS) L-Glutamin nichtessentielle Aminosäuren Penicillin/Streptomycin Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)

1.5 Zelllinie

Als Epithelzellmodell zur Untersuchung der Transportvorgänge wurden LLC-PK1 bzw. die *MDR1*-transfizierten LLC-MDR1-Zellen, die uns von der Arbeitsgruppe Piet Borst, The Netherlands Cancer Institut Amsterdam, zur Verfügung gestellt wurden, verwendet. Die LLC-PK1 bzw. -MDR1-Zellen wurden in DMEM mit folgenden Zusätzen kultiviert:

Zusätze	Menge
FCS	10 % (v/v)
Penicillin/Streptomycin	1,7 % (v/v)
L-Glutamin	5 % (v/v)
Nichtessentielle Aminosäuren	1 % (v/v)

1.6 Antikörper, Zellmarker und fluoreszenzmarkierte Substrate

Hersteller	Substanzen
<i>Alexis, Grünberg</i>	Monoklonaler anti-Pgp-AK C219 Monoklonaler anti-Pgp-AK JSB1
<i>BioRad, München</i>	Goat anti-mouse IgG HRP-conjugate
<i>Molecularprobes/Mo Bi Tec, Göttingen</i>	Alexa Fluor [®] 488 goat anti-mouse IgG Heparin fluorescein conjugate Toto3 [®] -iodide
<i>rPeptide, USA</i>	Beta Amyloid 1-40/42 fluorescein conjugate

2. Zellbiologische Methoden

2.1 Zellkultivierung und Passage adhärenter LLC-PK1/-MDR1-Zellen

Die standardmäßige Kultivierung der LLC-PK1/-MDR1-Zellen erfolgte in 75 cm²-Kulturflaschen mit 20 ml Medium im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Das Zellkulturmedium *Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM)* enthielt 4,5 mM Glukose, 10 % FCS, 5 % L-Glutamin, 1,7 % Penicillin/Streptomycin und 1 % nichtessentielle Aminosäuren.

Zum Passagieren wurde das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und die konfluenten Zellen 1x mit 10 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der adhärenen Zellen wurden sie mit 3 ml einer Trypsin/EDTA-Lösung (0.05 %/0.02 %) für 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend in 7 ml Medium durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Von dieser Zellsuspension wurden je nach gewünschtem Verdünnungsgrad 1 ml (1:10), 0,5 ml (1:20) usw. in eine neue Kulturflasche mit entsprechendem Medium gegeben. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt. Unter diesen Bedingungen stellte sich bei den LLC-PK1/-MDR1-Zellen nach 5-7 Tagen die Konfluenz ein.

2.2 Kryokonservierung von LLC-PK1/-MDR1

Um Zellen dauerhaft aufzubewahren, wurden die abgelösten und vereinzelt LLC-PK1/-MDR1 für 5 min bei 1 400 rpm, RT, zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus). Das Zellpellet wurde in 2 ml FCS + 10 % (v/v) DMSO resuspendiert und je 1 ml in kältestabile Röhrchen (Cryovials, Nalgene) überführt. Die Röhrchen lagerten über Nacht in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox (Nalgene™ Cryo Freezing Container) im -80 °C-Gefrierschrank, so dass die Temperatur in der Box langsam um etwa 1 °C pro Minute sank. Nach 24 h wurden die Zellen in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Dauer-Dewar bei -196 °C gelagert.

Um die eingefrorenen Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde die zunächst in 37 °C-warmem Ethanol aufgetaute Zellsuspension in 10 ml DMEM überführt. Diese Lösung wurde 5 min bei 1400 rpm (Megafuge 1.0 R, Heraeus) zentrifugiert, um das auf kultivierte Zellen toxisch wirkende DMSO des Einfriermediums zu entfernen. Das Pellet wurde in DMEM resuspendiert und in eine 75 cm²-Zellkulturflasche mit 25 ml Kompletmedium überführt.

2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde das Gerät *CASY*[®]1 verwendet, das mit einem erweiterten Widerstandsmessprinzip arbeitet. Zur Messung werden die Zellen in einem schwachen Elektrolyten suspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare, an der eine Spannung anliegt, gesaugt. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Die auftretende Widerstandsänderung ist ein Maß für das Volumen der Zellen. Zur Messung wurden von den frisch geernteten und vereinzelt LLC-PK1/-MDR1-Zellen 50 µl Zellsuspension in 10 ml *CASY*[®] TON-Lösung aufgenommen.

2.4 Steigerung der Expression rekombinanter Proteine durch Histon-Deacetylase-Inhibitoren

Der Säugetier-Expressionsvektor pcDNA3.1/Neo besitzt Enhancer- und Promotor-Elemente des Zytomegalievirus für die konstitutive Expression von transfizierter cDNA in den meisten Zelllinien. Die Transkriptionsaktivität dieser Elemente kann durch Zugabe von Histon-Deacetylase-Inhibitoren wie Butyrat oder Trichostatin A gesteigert

werden. Der Mechanismus zur Aktivierung von „silenced“ Genen durch diese Inhibitoren beruht darauf, dass die Acetylierung der Histone zur Lockerung der Nukleosom-Struktur führt, was die Transkription erleichtert (Kruh, 1982). Für die Steigerung der Expression rekombinanter Proteine wurde das Kulturmedium durch frisches Medium ersetzt, das 5 mM Butyrat enthielt. Die Zellen wurden nach 24 h Inkubation im Brutschrank geerntet.

3. Proteinanalytische Methoden

3.1 Isolierung von Gesamt-Membranfraktionen aus kultivierten Zellen

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration und den Nachweis im Immunblot wurden grobe Zelllysate nach der folgenden Methode hergestellt: Die LLC-PK1/-MDR1-Zellen wurden aus einer 75 cm²-Zellkulturflasche in konfluentem Zustand geerntet und anschließend für 5 min bei 1400 rpm, RT zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde nach zweimaligem Waschen mit je 5 ml PBS in 200 µl 5 mM Tris-Puffer pH 7,4 und den Protease-Inhibitoren Aprotinin, Leupeptin und 10 mM PMSF in der Verdünnung 1:1000 resuspendiert. Danach wurde ein nicht-mechanisches Aufschlussverfahren in Form von 4 Zyklen von Einfrieren und Auftauen durchgeführt. Dafür wurden die in Eppendorf-Gefäßen befindlichen Proben zuerst in -196 °C kalten, flüssigen Stickstoff und anschließend in 37 °C warmes Wasser getaucht. Nach dieser Prozedur wurden 50 µl zur Gesamtproteinbestimmung abgenommen.

In der verbliebenen Menge an Probe wurde in einer Ultrazentrifuge (OptimaTMTL, Beckman) bei 100 000 x g (Rotor TLA 100.3, Beckman) für 30 min die Membranfraktion (100 000 x g Pellet) von der zytosolischen Fraktion getrennt und je nach Pelletgröße in 50-75 µl 5 mM Tris pH 7,4 aufgenommen. Die Lagerung der Suspensionen erfolgte bei -20 °C.

3.2 Präparation von inside-out-Membranvesikeln aus kultivierten Zellen

Die Präparation von Membranvesikeln erfolgte nach der Methode von Keppler et al. [1998]. Für eine ausreichende Zellzahl wurden 45-50 konfluente Kulturschalen (175 cm²/Platte) benötigt. Für eine Induktion mit Butyrat wurde dem Zellkulturmedium 24 h vor der Präparation 5 mM Butyrat zugesetzt.

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit einem Zellschaber und unter Spülen mit PBS geerntet und in der Kühlzentrifuge für 10 min bei 3 000 rpm und 4 °C (Megafuge 1.0 R, Heraeus) pelletiert. Die vereinigten Zellpellets wurden in 200 ml hypotonem Puffer resuspendiert, der die Proteaseinhibitoren Aprotinin, Leupeptin, PMSF (1:1 000) enthielt, und 1,5 h auf einem Magnetrührer gerührt. Das Lysat wurde bei 100 000 g für 45 min zentrifugiert (LZ Ultracentrifuge, Beckman; 70.I / TI, Sorvall). Anschließend wurde das Pellet in 20 ml hypotonen Puffers (mit Proteaseinhibitoren) resuspendiert und mit einem Braun-Potter S homogenisiert (500 rpm, 3x5 min, 2 Hübe/min). Zur Isolierung der Plasmamembran wurde das Homogenat mit Tris/Sucrose verdünnt und 10 min bei 10 000 rpm zentrifugiert (Centrikon H401, Kendro). Der Überstand wurde auf Eis aufbewahrt. Mit dem Pellet wurde der Homogenisierungs- und Zentrifugationsschritt wiederholt, nachdem es in Tris/Sucrose resuspendiert worden war. Die vereinten Überstände wurden 45 min bei 35 000 rpm zentrifugiert (LZ Ultracentrifuge, Beckman; 70.I / TI, Sorvall) und das entstandene Zellpellet in Tris/Sucrose aufgenommen. Mit Hilfe eines *tight fitting* Dounce-Homogenisators (Glas/Glas, 50 Hübe) wurde diese Suspension homogenisiert, anschließend vorsichtig auf einen in Zentrifugationsröhrchen vorgelegten 38 % (w/v) Sucrose-Gradienten überschichtet und im swing-out-Rotor (TH-641, Sorvall) 1,5 h bei 40 000 x g zentrifugiert. Die Interphase wurde mit einer Pasteur-Pipette abgenommen, mit Tris/Sucrose 20 ml aufgefüllt und erneut im *tight fitting* Dounce-Homogenisator (Glas/Glas, 20 Hübe) homogenisiert. In der Ultrazentrifuge (LZ Ultracentrifuge, Beckman; 70.I / TI, Sorvall) wurde anschließend die Membranfraktion pelletiert. Das Pellet wurde in einem geeigneten Volumen in Tris/Sucrose aufgenommen. Die Bildung der Vesikel erfolgte durch 20maliges Aufziehen der Suspension durch eine 27G-Nadel. Die Membranvesikel wurden anschließend in 50 µl-Fraktionen aliquotiert und bei -196 °C gelagert.

3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Ermittlung der Proteinkonzentration von Zellhomogenaten (Gesamtprotein) und Membranfraktionen nach der BCA-Methode basiert auf der Reduktion von Cu^{2+} durch Proteine in alkalischer Lösung zu Cu^+ , das anschließend mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten, photometrisch messbaren Farbkomplex bildet. Je 2 x 10 µl (Doppelbestimmung) der mit Aqua dest. 1:10 verdünnten Probe wurden in eine Mikrotiterplatte

pipettiert, mit 200 µl frisch angesetztem Färbereagenz aus 1 Teil 4 % CuSO₄-Lösung und 50 Teilen 1 % BCA-Lösung versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Extinktion bei 562 nm mit der photometrischen Auswerteeinheit *Viktor² 1420 multilabel counter* gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Standardkurve aus Rinderserumalbumin (BSA) [die Stammlösung enthielt 1 mg BSA/ml in 5 mM Tris/HCL].

3.4 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine unabhängig von ihren Eigenschaften wie Ladung und Struktur nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Eine wichtige Voraussetzung für diese Art der elektrophoretischen Trennung ist die Denaturierung und gleichmäßige Solubilisierung der Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS). Weitere Komponenten des vertikalen Geles sind Ammoniumperoxodisulfat (APS), das die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid initiiert, und TEMED (Tetramethyl-ethylen-diamin), welches als Katalysator seine tertiären Aminogruppen zur Radikalfreisetzung zur Verfügung stellt. Die Acrylamidkonzentration im Polymerisationsansatz bestimmt die Länge der Polyacrylamidketten, die Bisacrylamidkonzentration den Vernetzungsgrad. Beide zusammen bestimmen die Eigenschaften des Gels, insbesondere die Porengröße, Elastizität und Dichte. Die hohe Trennschärfe und Nachweisempfindlichkeit beruht auf der Diskontinuität der Gelstruktur. Das Sammelgel, in dem die Probe konzentriert wird, ist großporig, so dass ein Siebeffekt nicht zum Tragen kommt. Das Trenngel, in dem die Komponenten der Probe nach der Größe aufgetrennt werden, ist engporig, weshalb ein Siebeffekt eintritt. Nach dieser Methode wurden ein 7,5%iges Trenngel und ein 4%iges Sammelgel mit folgender Zusammensetzung verwendet:

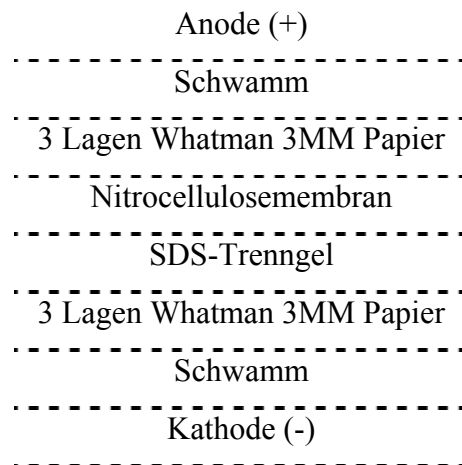
Trenngel 7,5 % :	7,28 ml	Aqua dest.
	3,75 ml	1,5 M Tris pH 8,8
	150 µl	10 % SDS
	3,75 ml	rotiphorese [®] Gel 30
	7,5 µl	0,05 % TEMED
	75 µl	10 % APS

Sammelgel 4 %:	6,1 ml	Aqua dest.
	2,5 ml	0,5 M Tris pH 6,8
	100 µl	10 % SDS
	1,3 ml	rotiphorese® Gel 30
	7,5 µl	0,05 % TEMED
	75 µl	10 % APS

Von jeder Probe wurde eine definierte Proteinmenge eingesetzt (50 µg Protein), mit $\frac{1}{4}$ des Endvolumens 4x SDS-Probenpuffer versetzt, auf 25 µl mit 5 mM Tris pH 7,4 ergänzt und diese Ansätze für 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Beladung der Gel-taschen mit Proteinproben betrug die Spannung für die Fokussierung im Sammelgel 80-100 V, zur elektrophoretischen Trennung der Proteine wurde die Spannung auf 120-150 V erhöht. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurden mit den Proben 10 µl eines Proteingrößenstandards aufgetragen. Es wurde für den Bereich zwischen 26 und 180 kDa der *Prestained SDS Molekular weight marker* (Sigma) verwendet.

3.5 Westernblotting und Detektion der Proteine mit spezifischen Antikörpern

Nach der elektrophoretischen Auftrennung und für eine anschließende Detektion der Proteine mit spezifischen Antikörpern wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran mit hoher Proteinbindungskapazität transferiert und immobilisiert (Western Blot). Der Transfer wurde im „Nass-Blot“-Verfahren auf Eis bei 370 mA für 1,5 h in der folgenden Anordnung durchgeführt:



Der Transfer konnte nachfolgend durch eine unspezifische Ponceau-S-Färbung überprüft werden. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran mit 10 % Magermilchpulver in TBST über Nacht bei 4 °C auf einem Taumelschüttler inkubiert. Nach dem Blockieren wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen, bevor der Blot für 1-1,5 h mit dem Maus-anti-Pgp-AK C219 in der Verdünnung 1:500 in 1 % BSA/TBST inkubiert wurde. Danach schlossen sich weitere Waschschriffe an, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Der mit Meerrettich-Peroxidase markierte Ziege-anti-Maus-AK wurde in der Verdünnung 1:2 000 in 1 % BSA/TBST auf die Membran gegeben und für 1 h inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mit TBST entfernt. Die Membran wurde anschließend mit 2 ml ECLTM-Reagenz (Amersham) benetzt, für 5 min inkubiert und in einer Kassette 5-15 min auf einem Röntgenfilm exponiert. Das ECL-System (*enhanced chemiluminescence*) beruht auf der durch peroxidase markierte Antikörper katalysierten Oxidation von Luminol, einem zyklischen Diacylhydrazid, und der dabei entstehenden Chemilumineszenz.

3.6 Immunfluoreszenz

Das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz basiert auf dem Nachweis eines an zelluläre Antigene gebundenen Primärantikörpers durch einen spezifischen zweiten Anti-Immunglobulin-Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Dadurch ist eine Lokalisation von Proteinen in Zellen möglich.

Durch ihre adhärenen Eigenschaften können LLC-PK1/-MDR1-Zellen auf Deckgläschen kultiviert werden. Dafür wurden Zellen auf in Petrischalen liegenden Gläschen ausgesät und bis zur Konfluenz belassen. Die Zellen auf den Deckgläschen wurden in Ethanol für 15 min fixiert, anschließend 3x 5 min in PBS pH 7,2 gewaschen und nachfolgend 10 min mit 0,01 %iger Triton-X 100-Lösung bei RT permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS wurden alle unspezifischen AK-Bindungsstellen durch Zugabe von 5 % FCS/PBS für 30 min blockiert. Mit je 50 µl einer 1:50 Verdünnung des monoklonalen anti-Pgp-AKs C219 in 5 % FCS/PBS wurden die Zellen in einer feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch drei Waschgänge mit PBS pH 7,2 entfernt. Der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper *Alexa Fluor[®]488 goat anti-mouse IgG*, in 5 % FCS/PBS 1:100 verdünnt, wurde auf den Zellen für 1 h bei RT ohne Lichteinwirkung inkubiert. Danach

wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und die Deckgläschen mit *DAKO*[®] *Fluorescent Mounting Medium* auf Objektträger gebracht. Für eine Kernfärbung war dem Mounting Medium *Toto3*[®]-*iodide* in einer Verdünnung von 1:1 000 zugesetzt. Dieser Farbstoff interkaliert mit der DNA und emittiert bei einer Anregung mit 647 nm eine blaue Fluoreszenz. Der Nachweis der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop bei 40facher Vergrößerung.

3.7 Transportmessungen

Die Untersuchungen zur funktionellen Charakterisierung des P-Glykoproteins wurden sowohl an den Pgp-überexprimierenden Zellen als auch an den Membranvesikeln durchgeführt.

a) Rhodamin123-Akkumulation

Für den Akkumulationstest wurden LLC-PK1/-MDR1-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und kultiviert. Die zu 70-80 % konfluenten Zellen wurden 24 h vor Testbeginn mit 5 mM Butyrat behandelt. Zuerst wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen 1x mit PBS gewaschen und anschließend mit 10 µM Rhodamin123 (Rh123) und den zu untersuchenden Substanzen inkubiert. Die jeweiligen Substanzen waren hierzu in Inkubationspuffer (B.1.3) gelöst. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und zur Solubilisierung der Membranproteine mit 0,2 %igem SDS benetzt. In 100 µl dieser Suspension wurde die Rhodaminkonzentration mit Hilfe des *Viktor*² *1420 multilabel counter* bestimmt. Die Messung erfolgt bei einer Extinktion von 530 nm und einer Emission von 485 nm unter Zuhilfenahme einer Rhodamin-Eichkurve. Die erhaltenen Rhodaminkonzentrationswerte wurden auf die in den gleichen Proben gemessenen Proteinkonzentrationen (siehe B.3.3) bezogen (µg Rhodamin/mg Protein).

b) Rhodamin123-Efflux

Im *Transwell*[®]-System werden durch den Membranfilter ein apikales und ein basales Kompartiment abgeteilt, was die Untersuchung des vektoriellen, transepithelialen Substrattransportes ermöglicht (Abb. 7). Für den Rhodamin123-Effluxtest wurden LLC-PK1/-MDR1-Zellen auf *Transwell*[®] *Polyester Membrane Inserts* ausgesät, auf denen sie

zu einem polarisierten Monolayer mit physiologischen Transporteigenschaften differenzieren. Vor Erreichen der Konfluenz wurde dem Kulturmedium für 24 h 5 mM Butyrat zugesetzt. Zu Beginn des Tests wurde das Medium aus dem basalen und dem apikalen Kompartiment entfernt und die Zellen 1x mit PBS gewaschen. Folgend wurden in das basale Reservoir 10 μ M Rh123 gegeben, die zu untersuchenden Substrate je nach Transportrichtung - basal zu apikal (B-A) oder apikal zu basal (A-B) - ebenso auf die basale oder die apikale Seite pipettiert. Alle Substanzen wurden in Inkubationspuffer (B.1.3) gelöst. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils aus dem entgegengesetzten Reservoir 100 μ l Lösung entnommen und die Rhodaminkonzentration bestimmt. Für die Proteinbestimmung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 100 μ l 0,2 %igem SDS lysiert. Die Rhodaminkonzentrationsbestimmung im Überstand und die Proteinbestimmung in der Zellproteinsuspension erfolgten am *Viktor² 1420 multilabel counter*.

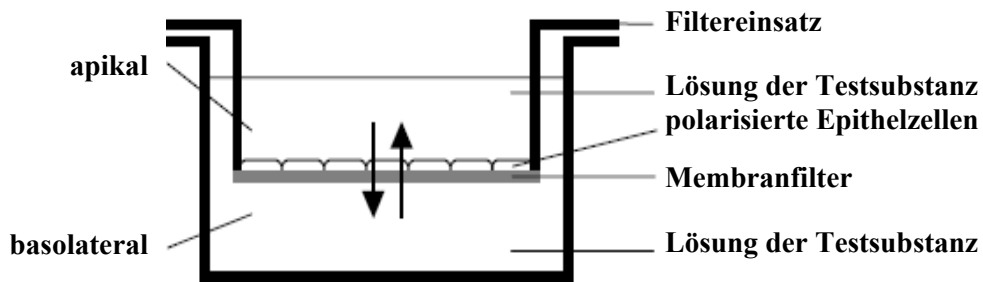


Abb. 7: Prinzip des transepithelialen Transportassays

c) Leakage-Test

Zur Untersuchung des transzellulären Substrattransportes durch einen polar wachsenden Zellmonolayer im Transwell[®]-System ist es von Bedeutung, die Zellschicht hinsichtlich ihrer 100 %igen Konfluenz zu überprüfen. Hierfür wurden 50 μ M [¹⁴C]-Inulin in das basale Reservoir pipettiert, 1 h bei 37 °C inkubiert und apikal bestimmt. Bei einer konfluenten Zellschicht mit ausgebildeten tight junctions darf die passiv durch den Monolayer diffundierte Rate an Inulin 1 % der eingesetzten Konzentration nicht überschreiten.

d) Bestimmung des Permeationskoeffizienten

Zur Bestimmung der Permeation einer Testsubstanz durch einen Zellmonolayer kann der Permeationskoeffizient (*apparent permeability coefficient*, P_{app}) berechnet werden. Der P_{app} wird durch Auswertung der Daten aus Transportstudien mittels folgender Gleichung bestimmt:

$$P_{app} = dc/dt * 1/A * V * 1/c_0 \text{ [cm/sec]}$$

Dabei entspricht dc/dt dem Substanzfluss über den Monolayer ($\mu\text{mol/sec}$), A der Oberfläche des Monolayers (cm^2), V dem Akzeptorvolumen (ml) und c_0 der Ausgangskonzentration im Donorkompartiment ($\mu\text{mol/ml}$).

e) Transportmessung an Plasmamembran-Vesikeln

Die Überprüfung der funktionellen ATPase-Aktivität des Pgp erfolgte an den unter 3.2 isolierten *inside-out*-Membranvesikeln, deren zytoplasmatische Membranseite nach außen gekehrt ist, was die Untersuchung der ATP-abhängigen Aufnahme erlaubt. Dieser Transport von Pgp-Substraten in Vesikeln wurde mit Hilfe der Säulchen-Filtrationsmethode über eine Gel-Matrix durchgeführt. Dabei wird das Prinzip der Gelpermeationschromatographie angewendet, wobei nach Zentrifugation ungebundenes Substrat im Gelbett verbleibt, während die vesikulären Strukturen im Durchflussvolumen erscheinen (Abb. 8).

Zur Vorbereitung der Säulchen wurden 12 g Sephadex G50 in 300 ml Tris/Sucrose-Lösung 1 h bei 95 °C unter ständigem Rühren gelöst, diese Suspension unter Rühren auf Eis abgekühlt und je 3,3 ml in die verschlossenen Säulen pipettiert, nachdem diese mit Tris/Sucrose gespült worden waren. Die Verdichtung der Matrix erfolgte durch 30minütiges Schütteln. Direkt vor dem Transportexperiment wurden die Säulchen für 3 min bei 1 500 rpm und 4 °C zentrifugiert, um überschüssige Flüssigkeit aus der Gelmatrix zu entfernen. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Membranvesikel wurden vor Versuchsbeginn rasch bei 37 °C aufgetaut und auf Eis gelagert. Für die Transportmessung wurden die Membranen mit Tris/Sucrose auf 100 μg je Ansatz (55 μl) verdünnt und 1 min bei 37 °C vorinkubiert. In einem zweiten Schritt wurden vorbereitete und ebenfalls bei 37 °C vorinkubierte Aliquots zu 20 μl mit 4 mM ATP, 10 $\mu\text{g/ml}$ Kreatinkinase, 100 μM Fluoreszenz-Substrat Rh123 und gegebenenfalls Pgp-Inhibitoren in den

entsprechenden Konzentrationen zupipettiert und somit der Transport gestartet. In den Kontrollansätzen wurde an Stelle von ATP AMP zugegeben.

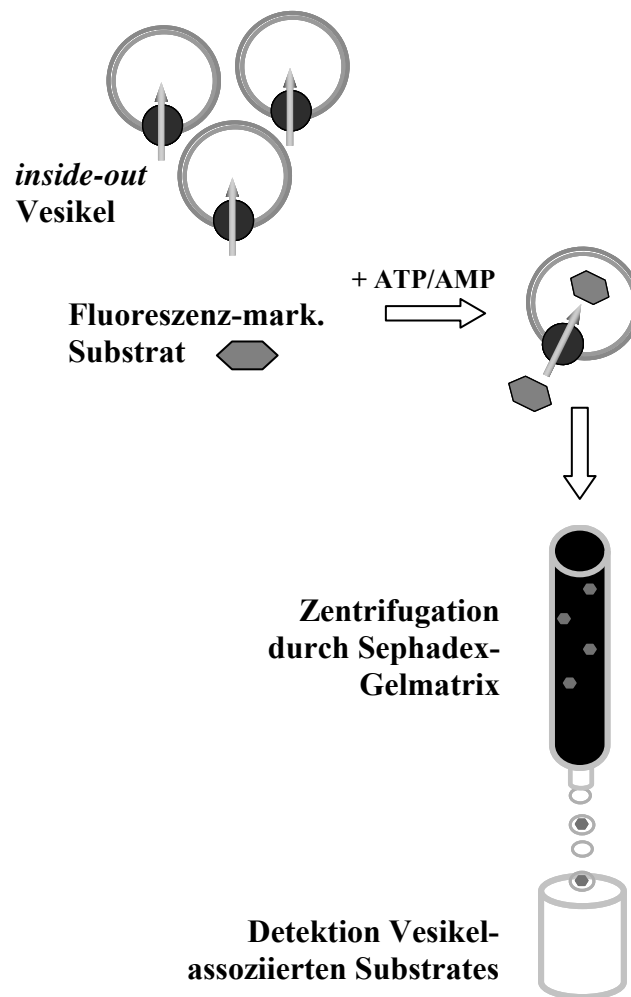


Abb. 8: schematische Darstellung des Vesikeltransport-Assays

Über einen Verlauf von 30 min wurde den Ansätzen entsprechend nach den Zeitpunkten 1, 10 und 20 min jeweils 20 μ l entnommen, in 80 μ l eiskalter Tris/Sucrose-Lösung abgestoppt, auf die Sephadex G50-Säulchenoberfläche pipettiert und mit 100 μ l Tris/Sucrose nachgespült. Die Säulchen wurden für 3 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Eluat wurde in Eppendorfgefäßen, die 20 μ l 2 %iges SDS in Tris/HCl enthielten, aufgefangen. Die mit den Membranvesikeln assoziierte Fluoreszenz wurde im *Viktor² 1420 multilabel counter* vermessen. Der netto-ATP-abhängige Transport wurde berechnet, indem die Werte unter Anwesenheit von AMP von den entsprechenden ATP-Werten subtrahiert wurden.

3.8 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Der *Beta Amyloid 1-40/42 Biotrak™ ELISA* beruht auf dem klassischen Sandwich-Prinzip und wurde dazu verwendet, A β im apikalen Überstand nach einem Efflux-Transportexperiment an einem LLC-PK1/-MDR1-Zellmonolayer nachzuweisen. Nach dem Herstellerprotokoll wurden folgende Schritte durchgeführt (Abb. 9): Die Proben sowie das als Standardreihe verwendete humane Beta Amyloid 1-40/42 (39-5 000 pg/ml) wurden in einer mit monoklonalem anti-Beta-Amyloid 1-40/42-AK beschichteten Mikrotiterplatte inkubiert. Ungebundenes A β wurde mittels Waschpuffer entfernt. Nach der Inkubation mit einem zweiten, polyklonalen anti-Beta-Amyloid 1-40/42-AK wurde diese Bindung mit Hilfe der donkey anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP), die das zugegebene 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat umsetzte, detektiert. Durch Zugabe von 1 M H₂SO₄ wurde diese Farbreaktion gestoppt und die optische Dichte anhand des Farbumschlages am *Viktor² 1420 multilabel counter* bei 450 nm gemessen. Die A β -Konzentrationen wurden anhand der Standardkurve ermittelt.

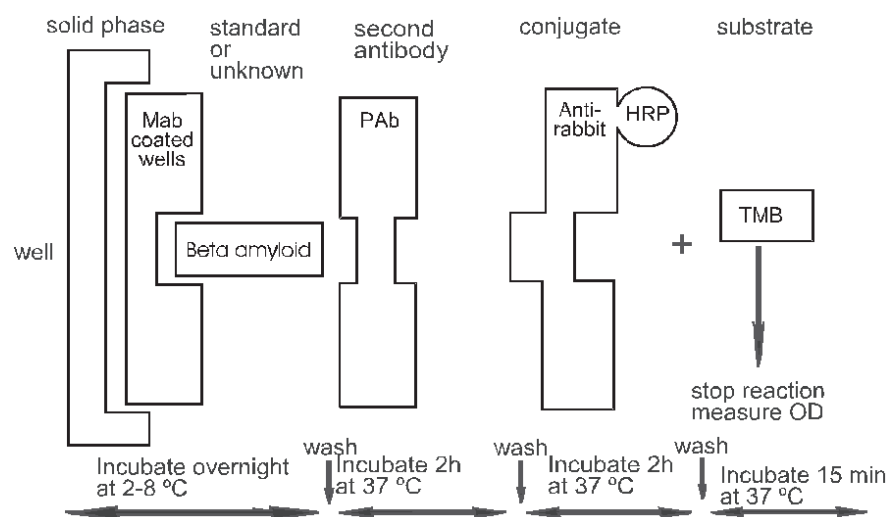


Abb. 9: Schematische Darstellung des Beta-Amyloid ELISA Assay Designs

C. Ergebnisse

1. Charakterisierung der Pgp-überexprimierenden Zelllinie

1.1 Expression und Lokalisation des rekombinanten Pgp in LLC-Zellen

Zur Charakterisierung kultivierter LLC-PK1/-MDR1-Zellen auch im Hinblick auf die Funktionalität des Zellmodells zur Bestimmung von Interaktionen mit P-Glykoprotein wurde die Proteinexpression in Präparationen von Membranfraktionen und Membranvesikeln untersucht. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das P-Glykoprotein mit dem MAb anti-Pgp Alexis[®]-C219 in den Präparationen aus den Pgp-transfizierten LLC-Zellen detektiert (Abb. 10, Bande 3 und 5). Die vollständig glykosylierte Form des humanen Pgp hat ein Molekulargewicht von 170 kDa. In den Membranfraktionen und -vesikeln der parentalen Kontrollzellen LLC-PK1 konnte Pgp entsprechend der mangelnden Kreuzreaktion des AK mit dem Schweine-Pgp-Ortholog nicht nachgewiesen werden (Abb. 10, Bande 2 und 4).

Die zelluläre Lokalisation des rekombinanten P-Glykoproteins wurde mit der Immunfluoreszenzmikroskopie unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers Alexis[®]-C219 untersucht. In der Aufnahme des Zellverbandes zeigte sich eine intensive Anfärbung der Zellmembranen. Die unterschiedlichen Farbintensitäten können in unterschiedlichen Pgp-Expressionsniveaus begründet sein (Abb. 11A). Die vertikalen Aufnahmen bestätigen Pgp als apikales Transportprotein durch die intensive Grünfluoreszenz im Bereich der apikalen Membranen (Abb. 11B). Nicht-transfizierte parentale Kontrollzellen LLC-PK1 wurden unter den gleichen Bedingungen gefärbt und zeigen eine schwache diffuse, nicht-spezifische Fluoreszenz (Abb. 11C).

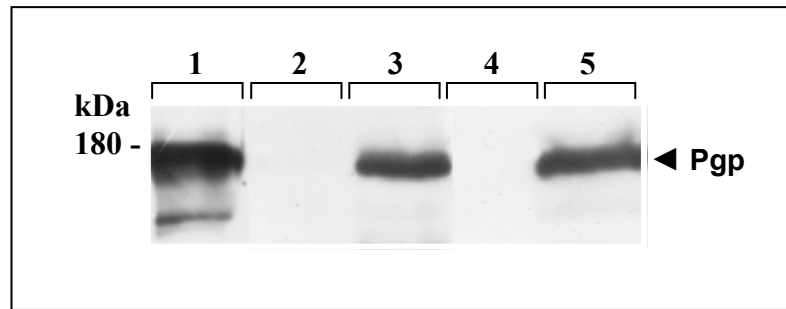


Abb. 10: Western Blot Analyse von P-Glykoprotein in Präparationen transfizierter LLC-MDR1 und parentaler Kontrollzellen LLC-PK1, Auftrennung der Proteinextrakte mit SDS-PAGE, Detektion mit MAb anti-Pgp Alexis[®]-C219

Bande 1: Positivkontrolle (Membranvesikel Pgp-überexpr. Zellen)

Bande 2: Membranfraktion aus LLC-PK1

Bande 3: Membranfraktion aus LLC-MDR1

Bande 4: Membranvesikel aus LLC-PK1

Bande 5: Membranvesikel aus LLC-MDR1

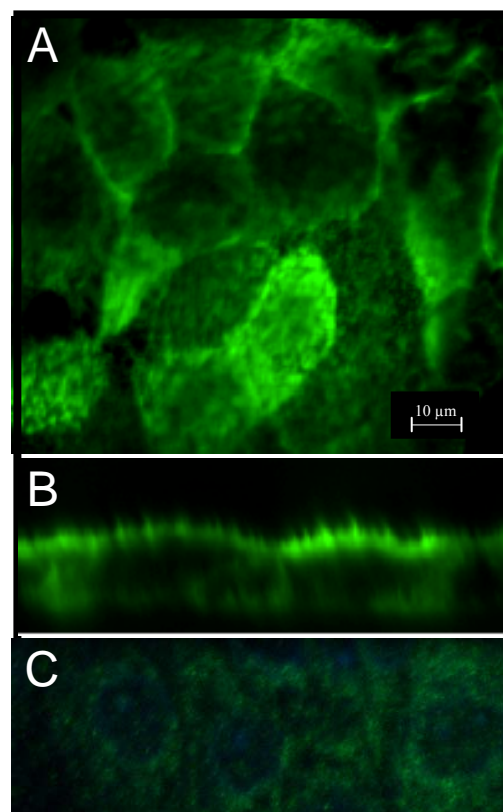


Abb. 11: Immunlokalisation des humanen Pgps in stabil transfizierten LLC-Zellen und parentalen Kontrollzellen. Pgp (grüne Fluoreszenz) wurde in LLC-MDR1 (A und B) und Kontrollzellen (C) mit dem Primärantikörper C219 (1:50) angefärbt. A und C, Schnitte in xy-Ebene. B, vertikaler Schnitt in xz-Ebene. Charakterisierung der Pgp-Transportfunktion

1.2 Charakterisierung des Transportes der Modells substanz Rhodamin 123

a) Transzellulärer Rh123-Transport

Die funktionelle Aktivität des apikal exprimierten, humanen P-Glykoproteins in transfizierten Zellen wurde anhand des transzellulären Transportes des etablierten Modells substrates Rhodamin 123 (Rh123) bestimmt. Hierbei handelt es sich als hydrophiler, kationischer Fluoreszenzfarbstoff um ein bekanntes Pgp-Substrat, dessen Efflux als MDR1-Funktionsparameter herangezogen wurde.

Zur Überprüfung der Transportaktivität wurden *MDR1*-transfizierte LLC-MDR1 und LLC-PK1 als Negativ-Kontrollzellen auf Transwell®-Membranen kultiviert, die die Ausbildung eines Monolayers begünstigen. Desweiteren ermöglicht die Unterteilung in ein basales sowie apikales Kompartiment die Untersuchung des vektoriellen, trans-epithelialen Substrattransportes. Die Zellen wurden mit 10 µM Rh123 entweder auf der basalen oder der apikalen Seite inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde die Fluoreszenz im jeweils gegenüberliegenden Kompartiment und in den Zelllysaten gemessen. In LLC-MDR1-Zellen zeigte sich entsprechend der zellulären Lokalisation von Pgp und der Unidirektionalität des Pgp-vermittelten Transportes ein signifikanter basolateral zu apikal-Transport (B→A) von Rh123 ($162 \pm 14 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$) der 5fach höher gegenüber dem apikal zu basolateral-Transport (A→B) ($31 \pm 6 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$) war (Abb. 12A). Die Permeabilität für Rh123 in den LLC-PK1-Kontrollzellen ist für beide Transportrichtungen ähnlich (Abb. 12A). Die Abb. 12B zeigt die in den Zelllysaten bestimmte und auf die Proteinmenge normalisierte Rh123-Konzentration. In den parentalen Kontrollzellen konnte eine signifikant höhere Akkumulation von Rh123 ($74 \pm 4 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$) als in den MDR1-Transfektanten ($13 \pm 0.2 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$) nachgewiesen werden. Nach einer Inkubationszeit von 60 min betrug die Anreicherung von Rh123 in den LLC-PK1 das 5,7-fache der Akkumulation in den LLC-MDR1. Die aus intrazellulärer Akkumulation und transzellulärem Transport zusammengesetzte Gesamt-Rh123-Aufnahme in den Pgp-Transfektanten war um das zweifache höher als in den Kontrollzellen (Abb. 12C).

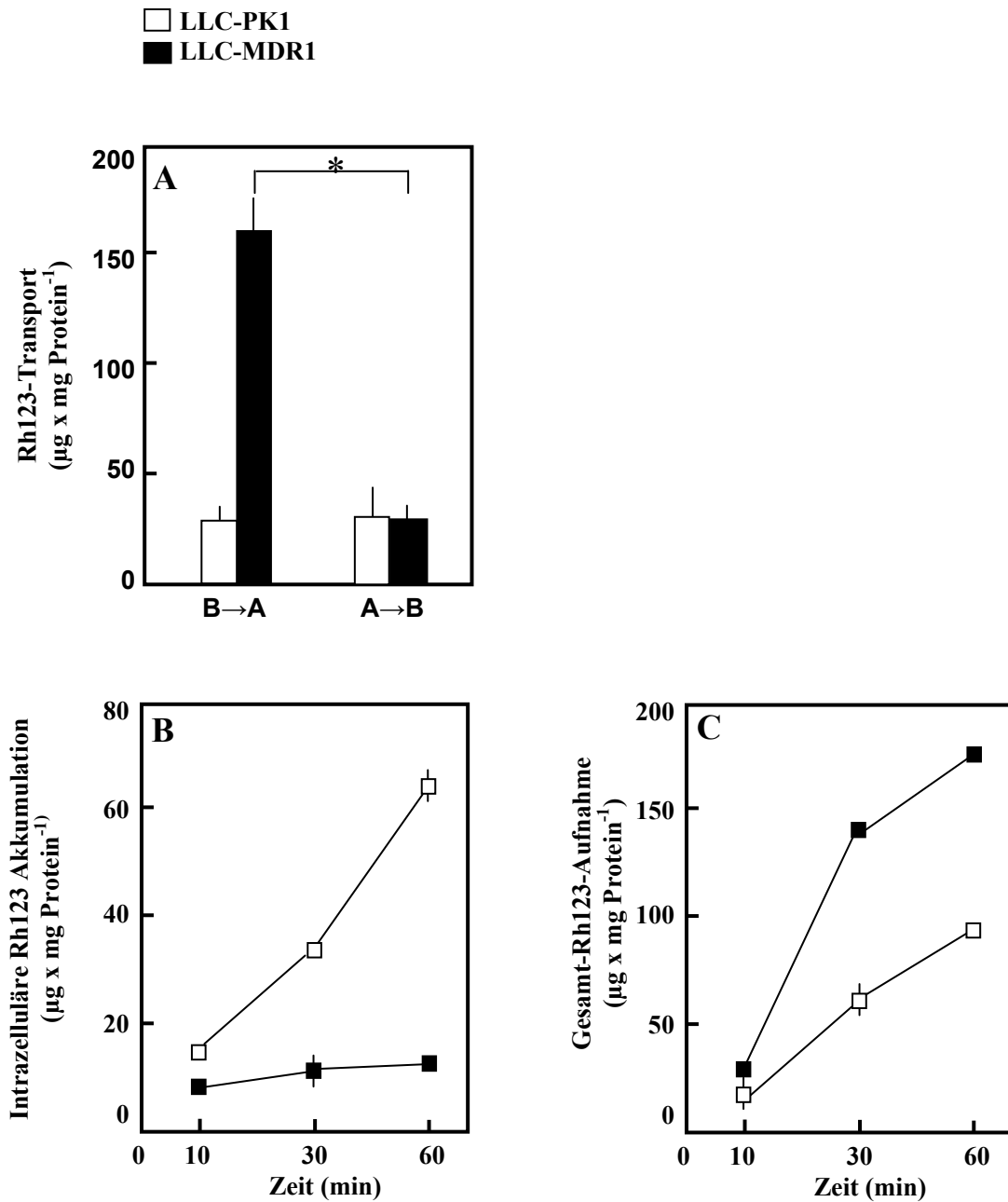


Abb. 12: Transzellulärer Transport von Rhodamin123. LLC-PK1- (□) und LLC-MDR1-Zellen (■) wurden auf Transwell®-Membranen kultiviert. A, vektorieller Transport von Rh123. Rh123 (10 μM) wurde entweder ins basale (B→A) oder ins apikale Kompartiment (A→B) pipettiert. Nach 60 min bei 37 °C wurde die Fluoreszenz im jeweils entgegengesetzten Kompartiment bestimmt (transzellulärer Rh123-Transport). B, basale Gabe von Rh123 (10 μM), Bestimmung der intrazellulären Rh123-Akkumulation. C, Gesamt-Rh123-Aufnahme als Summe von intrazellulärer und apikaler Fluoreszenz. (Mittelwerte \pm SD, n = 6; * signifikante Differenz mit $P < 0,05$ nach Student's *t*-Test)

b) ATP-abhängige Rh123-Aufnahme in Membranvesikel

Zur Überprüfung der ATP-Abhängigkeit des Pgp-Transportmechanismus wurden *inside-out*-Vesikel verwendet, bei denen die Innenseite der zellulären Membran nach außen orientiert ist. In Gegenwart von ATP konnte so ein Pgp-vermittelter, einwärtsgerichteter Transport gemessen werden.

Die Aufnahme von Rh123 (10 μM) in die LLC-MDR1-Vesikel wurde mit der Aufnahme in die Kontrollvesikel und durch Ersetzen des ATP durch AMP verglichen. Wie in Abb. 13A gezeigt, wurde ein zeit- und ATP-abhängiger Transport von Rh123 mit einer Netto-Rate von $5,6 \pm 0,61 \text{ ng} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in LLC-MDR1-Zellmembranen beobachtet. Die Werte errechneten sich durch die Subtraktion der auf die Zeit und die Proteinmenge normalisierten Vesikel-assoziierten Fluoreszenz in Gegenwart von 5'-AMP von der in Gegenwart von ATP. Diese Transportrate war nach einer Inkubationsdauer von 20 min ungefähr 4,5mal höher als die der LLC-PK1-Kontrollmembranen ($1,2 \pm 0,34 \text{ ng} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) (Abb. 13B). Der Einfluss des Pgp-Inhibitors CsA auf die Rh123-Aufnahme in die Membranvesikel ist in Abb. 13C und D gezeigt. Der ATP-abhängige Transport in LLC-MDR1-Vesikel ist bei einer Konzentration von 10 μM CsA auf $\sim 20\%$ ($22 \pm 4 \text{ ng} \times \text{mg Protein}^{-1}$) im Vergleich zur Kontrolle reduziert (Abb. 13C). Dagegen hatte CsA keinen Effekt auf die insgesamt geringe Rh123-Aufnahme in LLC-PK1-Vesikel (Abb. 13D).

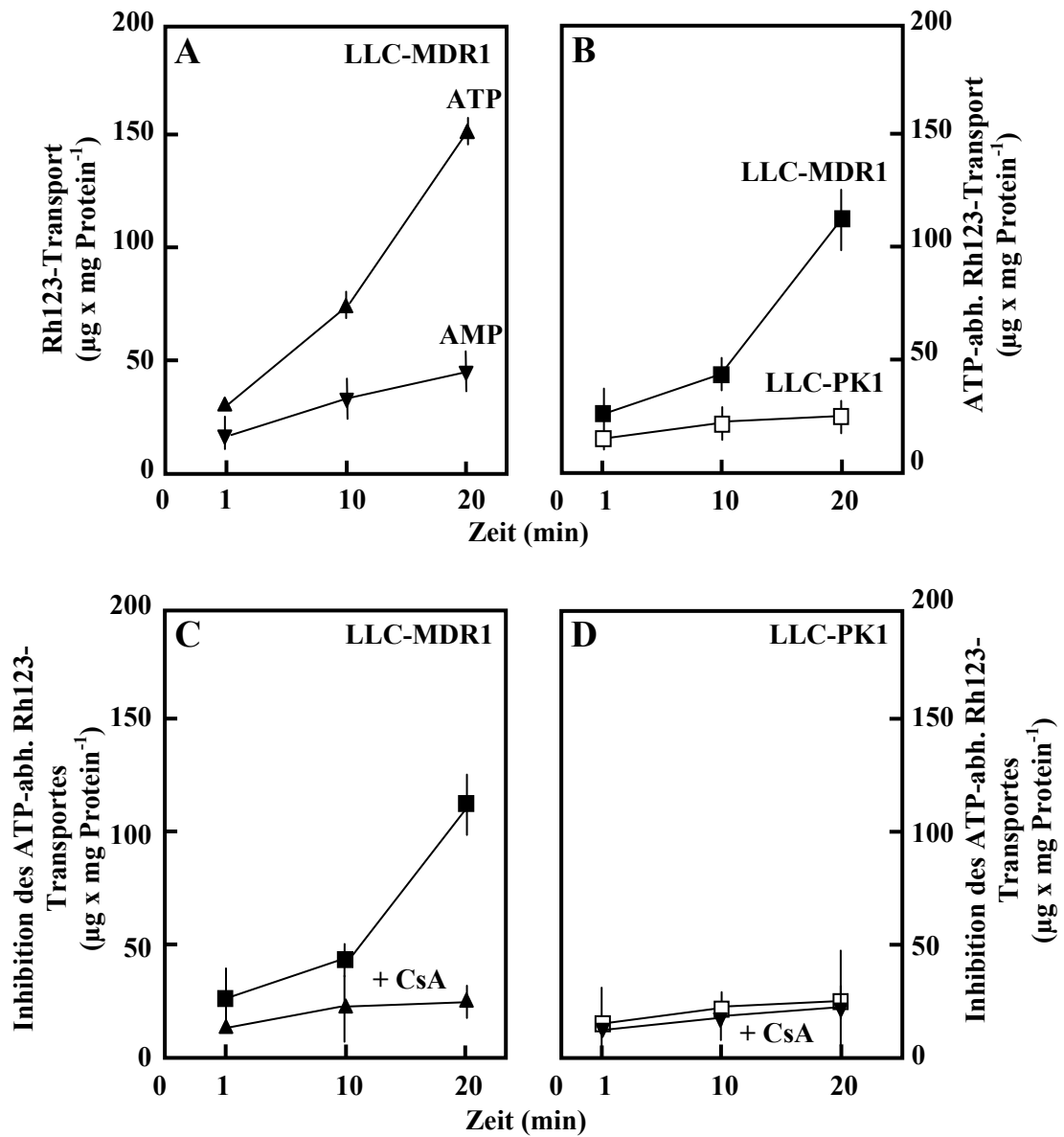


Abb. 13: Rh123-Transport in LLC-PK1- bzw. LLC-MDR1-Membranvesikel und Hemmung der ATP-abhängigen Rh123-Aufnahme. A, Inkubation der Membranvesikel mit Rh123 (10 µM) in Anwesenheit von 4 mM ATP (▲) oder 5'-AMP (▼). B, Netto-ATP-abhängiger Transport in LLC-MDR1-Vesikel (■) und LLC-PK1-Vesikel (□). C und D, Hemmung der ATP-abhängigen Rh123-Aufnahme durch CsA (10 µM). (Mittelwerte ± SD, n = 4)

2. Heparine und Pgp-vermittelter Transport

Die Effekte von Heparinen auf die funktionelle Aktivität des Membrantransporters P-Glykoprotein wurden anhand der etablierten Transportassays näher charakterisiert. Im Einzelnen wurde dabei neben einer möglichen Inhibition des Rh123-Transportes durch Heparine auch deren direkter Transport untersucht. Außer Rh123 kamen als weitere Substrate unfraktioniertes Heparin (UFH, MW 18 kDa), *Low molecular weight*-Heparin (LMWH, MW 5 kDa) und Fluorescein-konjugiertes Heparin (FITC-Heparin) zur Anwendung.

2.1 Einfluss auf die zelluläre Rh123-Aufnahme

Zur Bestimmung der apikalen Aufnahme von Rh123 (10 μM) in Gegenwart von Pgp-Modulatoren wurden die in 6-well-Platten kultivierten LLC-MDR1- und LLC-PK1-Zellen für 60 min unter Zugabe von Verapamil (100 μM), CsA (10 μM), Doxorubicin (3 μM), UFH (200 $\mu\text{g/ml}$ entspricht 32 U/ml) und LMWH (200 $\mu\text{g/ml}$ entspricht 14 U/ml) inkubiert.

Die normalisierten Werte der Rhodamin-Aufnahme in den Kontrollzellen LLC-PK1 bewegen sich nichtsignifikant in einem Bereich von $58 \pm 6 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$ (118 % der Kontrolle) unter CsA-Inkubation bis $42 \pm 0.2 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$ (86 % der Kontrolle) mit 200 $\mu\text{g/ml}$ UFH um den Rh123-Ausgangswert ($49 \pm 9 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$) (Abb. 14A).

Die Rhodamin-Akkumulation war in den LLC-MDR1-Zellen mit Verapamil um 150 % ($48 \pm 4 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$), mit 200 $\mu\text{g/ml}$ UFH um 66 % ($30 \pm 6 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$) und mit 200 $\mu\text{g/ml}$ LMWH um 94 % ($36 \pm 3 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$) signifikant erhöht (Abb. 14B). Die Werte für die Inkubationen mit Doxorubicin sind nur um 16 % ($21 \pm 7 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$) gesteigert, hingegen führte CsA zu einer signifikanten Erhöhung der Akkumulation um 370 % ($87 \pm 7 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$) (Abb. 14B).

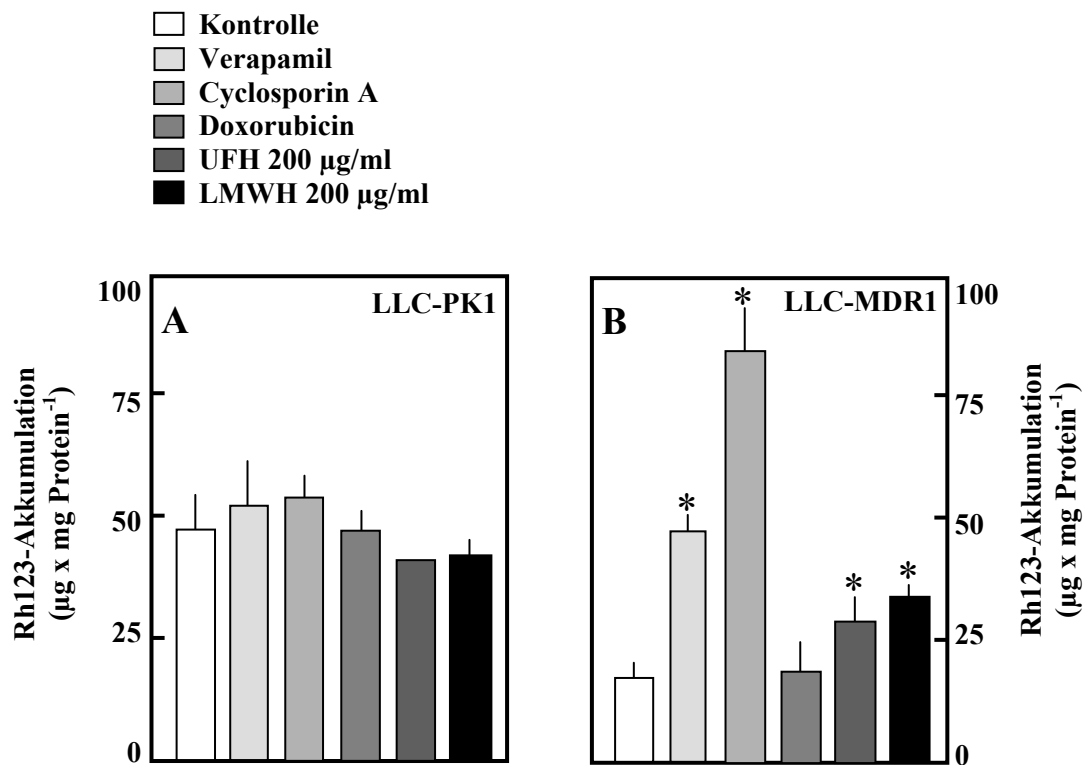


Abb. 14: Effekte auf die Rh123-Akkumulation in LLC-PK1 bzw. LLC-MDR1-Zellen. LLC-PK1- (A) bzw. LLC-MDR1-Zellen (B) wurden in 6-well-Platten kultiviert. Inkubation mit Rh123 (10 µM) unter Anwesenheit von 100 µM Verapamil, 10 µM CsA, 3 µM Doxorubicin, 200 µg/ml UFH bzw. LMWH. (Mittelwerte ± SD, n = 3; * signifikante Differenz zur Kontrolle, $P < 0,05$ nach Student's *t*-Test)

2.2 Einfluss auf den transzellulären Rh123-Transport

Die im Transwell[®]-Assay bestehende räumliche Trennung der Kompartimente erlaubte die Inkubation mit 200 µg/ml UFH bzw. LMWH auf der basalen oder der apikalen Seite über einen Zeitraum von 60 min. Die apikale Substanzgabe führte in den Pgp-Transfektanten zu einer Abnahme des B→A-Rh123-Transportes um 5 % ($161 \pm 28 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$) unter UFH und um 6 % ($159 \pm 5,7 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$) unter LMWH (Abb. 15A). Dagegen hatte die basale Zugabe von UFH eine signifikante Hemmung des Transportes auf 77 % ($131 \pm 25 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$) und die von LMWH auf 61 % ($103 \pm 5 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$) der Kontrolle ($169 \pm 15 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$) zur Folge (Abb. 15B).

In den Kontrollzellen hatte die basale im Vergleich zur apikalen Substanzgabe keinen signifikanten Effekt auf den insgesamt geringen Rh123-Efflux. Der Einfluss zeigte sich

lediglich in einer Minderung des Transportes um 11 % bzw. 1 % bei der apikalen und um 20 % bzw. 7 % bei der basalen Inkubation mit UFH bzw. LMWH.

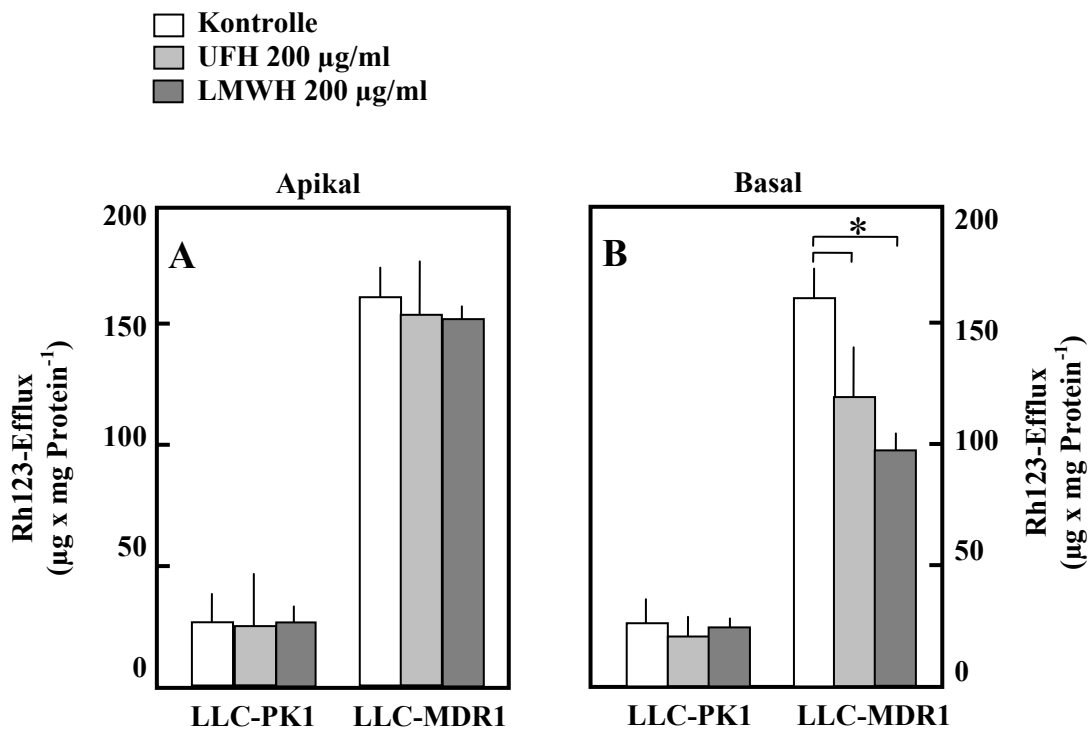


Abb. 15: Einfluss von UFH auf den Rh123-Efflux. LLC-PK1- und LLC-MDR1-Zellen wurden auf Transwell[®]Membranen kultiviert. Basale Inkubation mit Rh123 (10 µM) unter Anwesenheit von 200 µg/ml UFH bzw. LMWH im basalen (B→A) bzw. im apikalen Kompartiment (A→B). (Mittelwerte ± SD, n = 3; * signifikante Differenz mit $P < 0,05$ nach Student's *t*-Test)

In der vergleichenden Studie der apikalen Substanzgabe von UFH bzw. LMWH in der Konzentration von 500 µg/ml und bekannten Pgp-Modulatoren hinsichtlich deren Effekte auf den Rh123-Efflux zeigten sich nach 60minütiger Inkubationszeit sowohl in den LLC-MDR1-Zellen ($93 \pm 2,5$ % der Kontrolle) als auch in den parentalen Kontrollzellen ($87,6 \pm 9,4$ % der Kontrolle) keine signifikanten Unterschiede (Abb. 16A und C). Nach basaler Inkubation ergaben sich für die LLC-PK1-Zellen ähnliche nicht signifikante Werte ($86,2 \pm 8,2$ % der Kontrolle) (Abb. 16B). Bei den MDR1-Transfektanten zeigten sich jedoch Unterschiede (Abb. 16D). Bei Betrachtung des Effluxes in den LLC-MDR1 ließ sich in Anwesenheit von 10 µM CsA der größte Hemmeffekt (49 % der Kontrolle, 80 ± 15 µg x mg Protein⁻¹) feststellen, gefolgt von LMWH 500 µg/ml mit 50 % der Kontrolle ($85 \pm 8,6$ µg x mg Protein⁻¹), UFH

500 $\mu\text{g/ml}$ mit 58 % der Kontrolle ($97 \pm 16,4 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$), Doxorubicin mit 63 % und Verapamil mit 69 % der Kontrolle ($111 \pm 28 \mu\text{g} \times \text{mg Protein}^{-1}$).

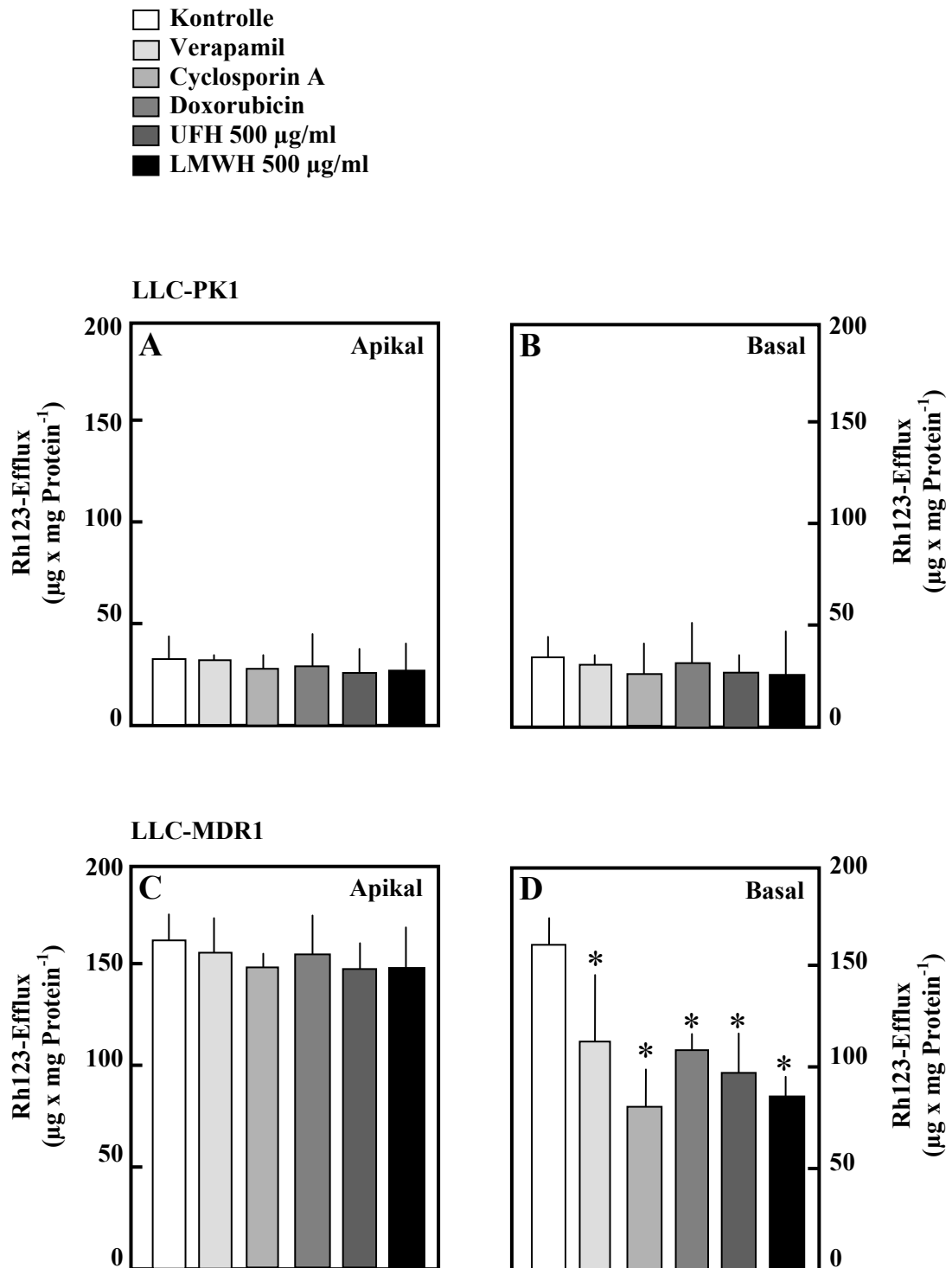


Abb. 16: Effekte auf den Rh123-Efflux in LLC-PK1 bzw. LLC-MDR1-Zellen. LLC-PK1- und LLC-MDR1-Zellen wurden auf Transwell®Membranen kultiviert. Basale Inkubation mit Rh123 (10 μM) in LLC-PK1 (A und B) bzw. in LLC-MDR1 (C und D) unter Anwesenheit von 100 μM Verapamil, 10 μM CsA, 3 μM Doxorubicin und 500 $\mu\text{g/ml}$ UFH bzw. LMWH jeweils im apikalen (A→B) bzw. im basalen (B→A) Kompartiment. (Mittelwerte \pm SD, n = 4; * signifikante Differenz zur Kontrolle, $P < 0,05$ nach Student's *t*-Test)

Anschließend wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung durch die Heparine untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Inhibition des Pgp-vermittelten Rhodamintransportes durch UFH über einen Inkubationszeitraum von 60 min in Abhängigkeit von der Konzentration erfolgte und eine halbmaximale Hemmwirkung bei einer Konzentration von 1 000 $\mu\text{g/ml}$ (160 U/ml) aufwies. Die maximale Hemmwirkung lag bei über 80 % und wird bei UFH-Konzentrationen von mehr als 5 000 $\mu\text{g/ml}$ (800 U/ml) erreicht (Abb. 17).

Die Hemmung des Pgp-vermittelten Rhodamintransportes durch LMWH erfolgte in einem Konzentrationsbereich von 10-200 $\mu\text{g/ml}$ (0,7-14 U/ml) konzentrationsabhängig (Abb. 23). Eine halbmaximale Hemmwirkung wurde mit 500 $\mu\text{g/ml}$ (35 U/ml) LMWH erreicht. Bei Konzentrationen $\geq 500 \mu\text{g/ml}$ bis 5 000 $\mu\text{g/ml}$ (350 U/ml) nimmt die hemmende Wirkung des LMWH ab ($32,4 \pm 8,5$ % der Kontrolle) (Abb. 17).

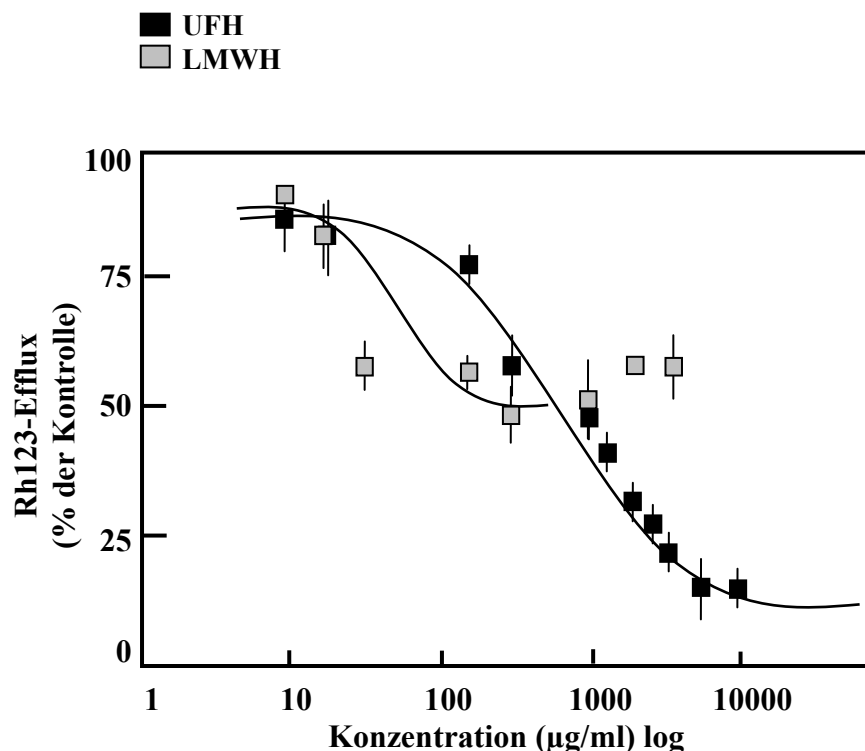


Abb. 17: Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition des Rh123-Effluxes durch UFH bzw. LMWH. LLC-MDR1-Zellen wurden auf Transwell[®] Membranen kultiviert. Basale Inkubation mit Rh123 (10 μM) unter Anwesenheit von UFH bzw. LMWH im Konzentrationsbereich von 10 μg -5000 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 10 μg -10000 $\mu\text{g/ml}$. (Mittelwerte \pm SD, n = 4)

a) Einfluss von Dextransulfat

Um die Heparinspezifität der Pgp-Hemmung zu verifizieren, wurde der Einfluss eines weiteren Polyanions, Dextransulfat, auf den Rh123-Transport untersucht. In einem Konzentrationsbereich von 10-500 $\mu\text{g/ml}$ lag die durchschnittliche konzentrationsunabhängige Hemmung des Rh-Effluxes im Transwell[®]-System bei $87,4 \pm 3,8 \%$ der Kontrolle (Abb. 18). Die größtmögliche, aber nicht signifikante Hemmung von $82 \pm 4,5 \%$ der Kontrolle wurde bei 50 $\mu\text{g/ml}$ Dextransulfat erreicht.

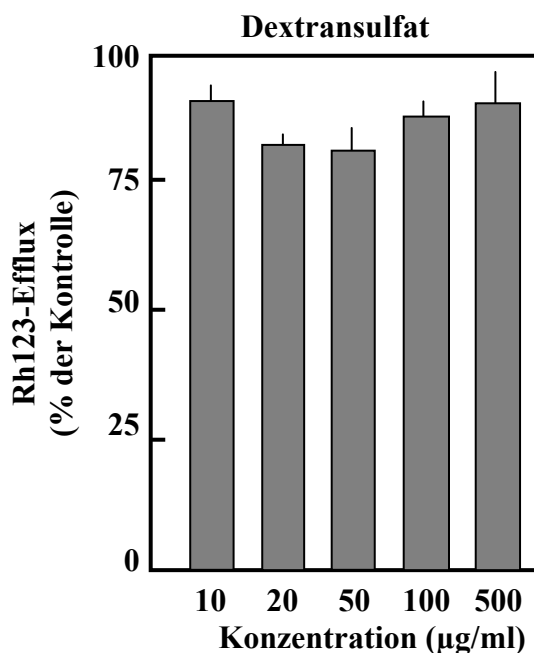


Abb. 18: Einfluss von Dextransulfat auf den Rh123-Efflux. LLC-PK1- und LLC-MDR1-Zellen wurden auf Transwell[®]Membranen kultiviert. Basale Inkubation mit Rh123 (10 μM) unter Anwesenheit von Dextransulfat (10-500 $\mu\text{g/ml}$). (Mittelwerte \pm SD, n = 3)

2.3 Einfluss auf die ATP-abhängige Rh123-Aufnahme in Membranvesikel

In der Hemmung der ATP-abhängigen Rhodaminaufnahme in Membranvesikel zeigten UFH und LMWH untereinander keine signifikanten Unterschiede (Abb. 19). Mit einer Konzentration von jeweils 500 $\mu\text{g/ml}$ wurde der Transport um etwa 40 % ($60 \pm 7 \%$ bzw. $58 \pm 10,5 \%$ der Kontrolle) vermindert. Deutlich größer war die Hemmung durch CsA mit $22 \pm 4,9 \%$ der Kontrolle.

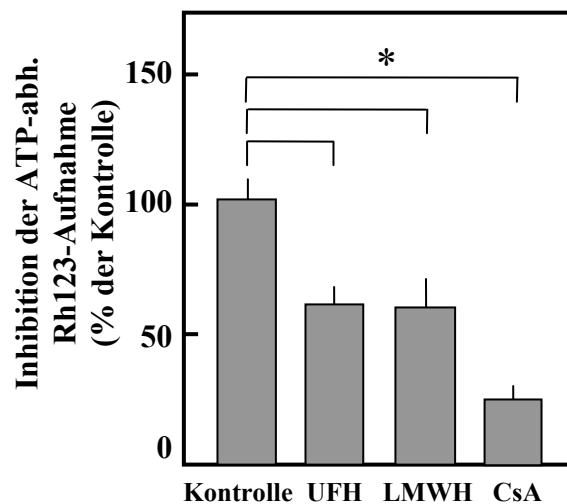


Abb. 19: Hemmung der ATP-abhängigen Netto-Rh123-Aufnahme in LLC-MDR1-Membranvesikeln durch UFH bzw. LMWH. Inkubation der Membranvesikel mit Rh123 (10 μ M) und 4 mM ATP in Anwesenheit von UFH bzw. LMWH (500 μ g/ml) und CsA (10 μ M). (Mittelwerte \pm SD, n = 3; * signifikante Differenz zur Kontrolle, $P < 0,05$ nach Student's t -Test)

2.4 Direkter Transport von Heparinen

Die Transportassays mit markierten Heparinen an LLC-MDR1-Zellen und den parentalen Kontrollzellen LLC-PK1 sowohl im Transwell[®]-System als auch in isolierten Membranvesikeln sollten Aufschluss über die Pgp-Inhibitor- und/oder die Pgp-Substrat-Aktivität der Heparine geben.

a) Transport von [³H]-Heparin

Der apikale Efflux von [³H]-Heparin in den MDR1-Transfektanten erfolgte zeitabhängig und war nach 90 min um 70 % höher ($121 \pm 0,5$ pmol x mg Protein⁻¹) als in den Kontrollzellen (71 ± 9 pmol x mg Protein⁻¹) (Abb. 20A). Der Unterschied zwischen LLC-MDR1- und LLC-PK1-Zellen fiel im Vesikelassay geringer aus. Die ATP-abhängige Aufnahmerate von [³H]-Heparin über einen Zeitverlauf von 15 min war in den MDR1-Membranvesikeln um 26 % höher ($1,9 \pm 1,3$ pmol x mg Protein⁻¹ x min⁻¹) als in den Kontrollvesikeln ($1,5 \pm 0,3$ pmol x mg Protein⁻¹ x min⁻¹) (Abb. 20B).

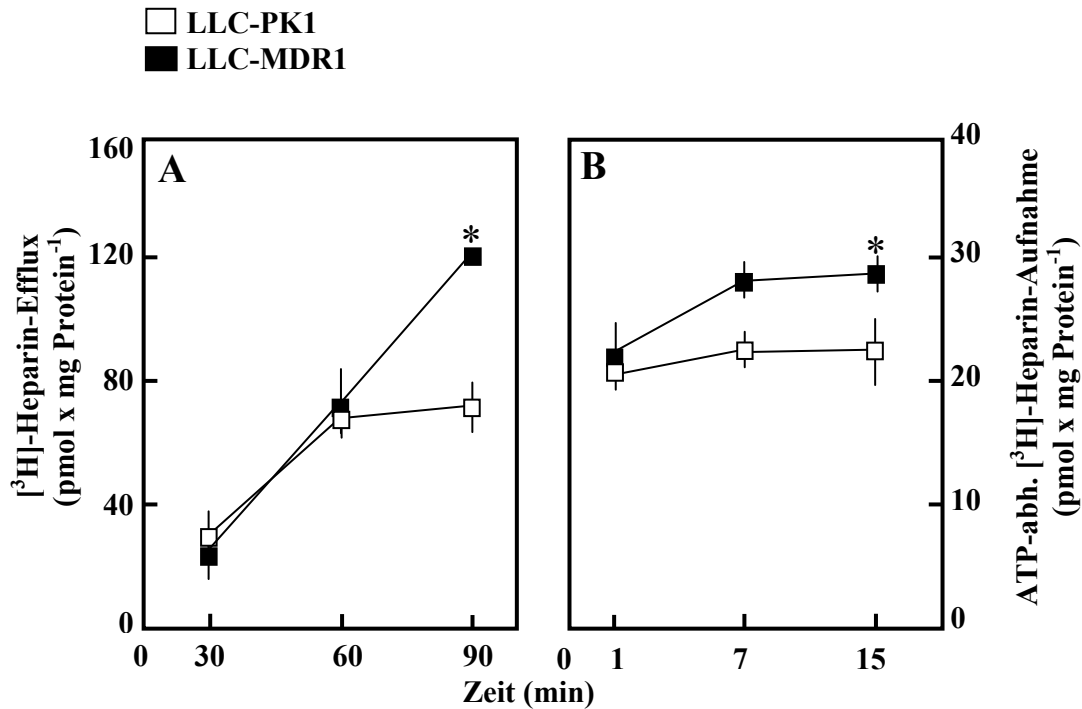


Abb. 20: Apikaler Efflux bzw. ATP-abhängige Aufnahme von [³H]-Heparin. A, LLC-PK1- und LLC-MDR1-Zellen wurden auf Transwell[®]Membranen kultiviert. Basale Inkubation mit [³H]-Heparin (0,5 μ M). B, netto ATP-abhängiger Transport von [³H]-Heparin (0,5 μ M) in LLC-MDR1-Vesikel (■) und LLC-PK1-Vesikel (□). (Mittelwerte \pm SD, n = 4; * signifikante Differenz zu Kontrollzellen, $P < 0,05$ nach Student's *t*-Test)

b) Transport von Fluorescein-konjugiertem Heparin (FITC-Heparin)

Die zelluläre Aufnahme von FITC-Heparin wurde gleichfalls in den beschriebenen Assays untersucht. Als zu vergleichender Transport wurde der apikale Efflux von Rh123 (10 μ M) über eine Dauer von 60 min herangezogen. In den MDR1-Transfektanten war der Rh123-Efflux um 56 % ($35 \pm 1,5 \mu\text{mol} \times \text{mg Protein}^{-1}$) signifikant höher als in den Kontrollzellen ($22,5 \pm 2,3 \mu\text{mol} \times \text{mg Protein}^{-1}$) (Abb. 21A). Demgegenüber war nach dem gleichen Zeitraum in den LLC-MDR1-Zellen der vektorielle Transport von FITC-Heparin (200 μ g/ml) signifikant um 125 % ($4,5 \pm 1 \mu\text{mol} \times \text{mg Protein}^{-1}$) zur Kontrolle ($2 \pm 0,8 \mu\text{mol} \times \text{mg Protein}^{-1}$) erhöht. Im Vesikelassay konnte neben der bekannten ATP-abhängigen Aufnahme von Rh123 ($5,5 \pm 0,65 \mu\text{mol} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) auch die von FITC-Heparin mit einer Transportrate von $2,0 \pm 0,33 \mu\text{mol} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ nachgewiesen werden (Abb. 21B).

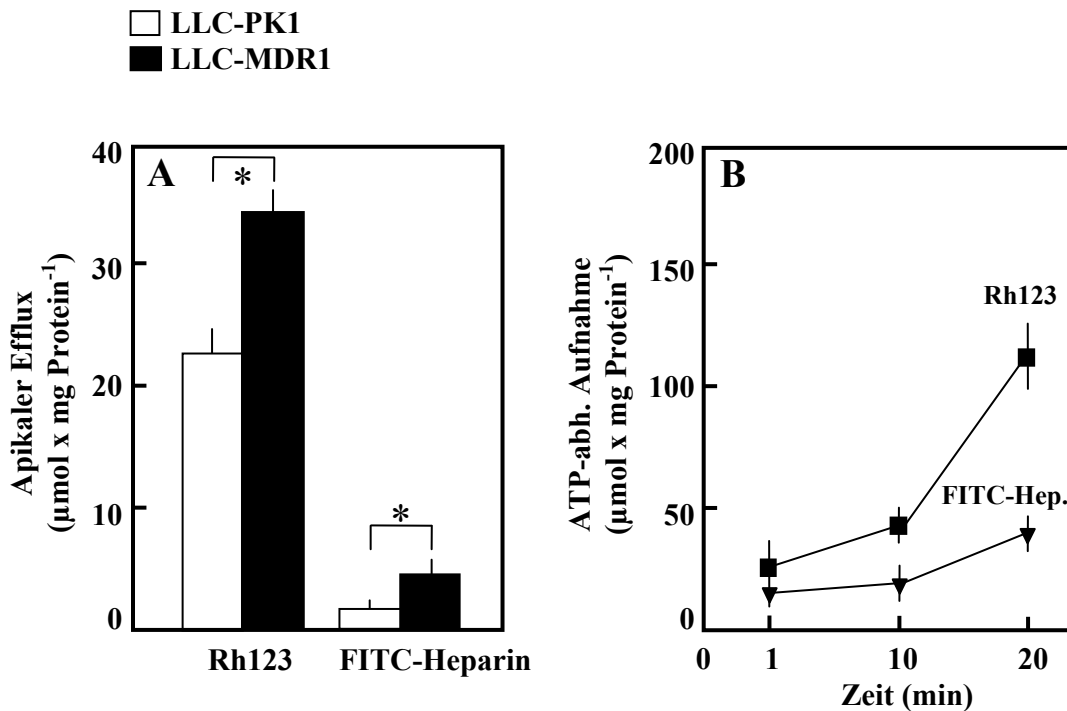


Abb. 21: Transport bzw. Netto-ATP-abhängige Aufnahme von Fluorescein-konjugiertem Heparin. A, LLC-PK1- und LLC-MDR1-Zellen wurden auf Transwell® Membranen kultiviert. Basale Inkubation mit Rh123 (10 μM) bzw. FITC-Heparin (200 $\mu\text{g/ml}$). B, Netto ATP-abhängiger Transport von Rh123 (10 μM) und FITC-Heparin (200 $\mu\text{g/ml}$) in LLC-MDR1-Vesikel. (Mittelwerte \pm SD, n = 3; * signifikante Differenz zu Kontrollzellen, $P < 0,05$ nach Student's *t*-Test)

Zur Charakterisierung des *in-vitro*-Permeationsmodells der epithelialen Barriere unter Beteiligung von P-Glykoprotein wurden Modellsubstrate verwendet. In Tabelle 3 sind die mit Hilfe der unter 3.7 c) angegebenen Gleichung errechneten Permeationskoeffizienten aufgelistet. In ihrer Berechnung wurden neben der Permeationsrate dc/dt auch das Akzeptorvolumen, die Fläche der Membran und die Ausgangskonzentration im Donorvolumen berücksichtigt. Rh123 war als kationischer Fluoreszenzfarbstoff im Vergleich zum Polyanion Heparin die besser permeierende Substanz. In LLC-MDR1-Zellen wurde unter Beteiligung von Pgp und in B→A-Transportrichtung für Rhodamin der größte P_{app} mit $27,2 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ ermittelt. Die P_{app} in den Kontrollzellen und in A→B-Richtung waren deutlich geringer. Anhand der für das FITC-Heparin berechneten P_{app} ließ sich eine deutlich schwächere Permeation erkennen. Aber auch hier war die Geschwindigkeit in den LLC-MDR1-Zellen in B→A-Richtung mit $0,02 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ am höchsten.

Tab. 3: Permeationskoeffizienten (P_{app}) der untersuchten Substrate

		P_{app} [10^{-4} cm/sec]	
		B→A	A→B
Rh123	LLC-MDR1	27,2	3,3
	LLC-PK1	3,7	4,0
FITC-Heparin	LLC-MDR1	0,02	0,001
	LLC-PK1	0,007	0,009

3. Beta-Amyloide und Pgp-vermittelter Transport

Die Effekte von Beta-Amyloid auf die funktionelle Aktivität des Membrantransporters P-Glykoprotein wurden anhand der bereits beschriebenen Transportassays näher charakterisiert. Neben Rh123 wurden als weitere mögliche Substrate A β 1-40 bzw. 1-42 und Fluorescein-konjugiertes A β 1-40 bzw. 1-42 (FITC- A β 1-40 bzw. 1-42) verwendet.

3.1 Einfluss auf den transzellulären Rh123-Transport

Um den Einfluss von A β 1-40 bzw. 1-42 auf den Pgp-vermittelten Rh123-Transport zu untersuchen, wurden die auf Transwell[®]-Membranen kultivierten LLC-MDR1- und parentalen Kontrollzellen LLC-PK1 nur mit Rhodamin (10 μ M) oder in Anwesenheit von 5 μ M A β 1-40 bzw. 1-42 im basalen Kompartiment inkubiert. Wie in Abbildung 22 gezeigt, wurde der Rh-Efflux in Gegenwart der A β -Peptide signifikant um etwa 25 % auf 74 ± 8 % bzw. 75 ± 4 % der Kontrolle vermindert.

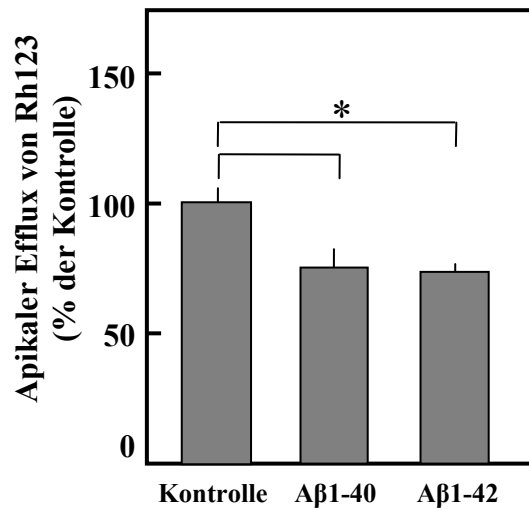


Abb. 22: Effekt der A β -Peptide auf den Pgp vermittelten Efflux von Rh123. LLC-MDR1-Zellen wurden auf Transwell[®] Membranen kultiviert. Basale Gabe von Rh123 (10 μ M), Inkubation ohne/mit Anwesenheit von 5 μ M A β 1-40 bzw. 1-42, Bestimmung der Fluoreszenz im apikalen Kompartiment. (Mittelwerte \pm SD, n = 4; * signifikante Differenz zur Kontrolle, $P < 0,05$ nach Student's t -Test)

Desweiteren war von Interesse, ob es einen messbaren transzellulären Transport von A β 1-40 bzw. 1-42 selbst gibt. Nach o. g. Transportassay konnten die A β -Peptide mit Hilfe des *Beta Amyloid 1-40/42 Biotrak ELISA* im apikalen Kompartiment quantitativ bestimmt werden (Abb. 23). Es ließen sich signifikant höhere Peptidkonzentrationen in den Überständen der MDR1-Zellen ($501 \pm 83,3 \text{ pg}_{\text{A}\beta 1-40} \times \text{ml}^{-1}$ bzw. $1\,450 \pm 100 \text{ pg}_{\text{A}\beta 1-42} \times \text{ml}^{-1}$) als in denen der Kontrollzellen ($120 \pm 50 \text{ pg}_{\text{A}\beta 1-40} \times \text{ml}^{-1}$ bzw. $150 \pm 20 \text{ pg}_{\text{A}\beta 1-42} \times \text{ml}^{-1}$) nachweisen.

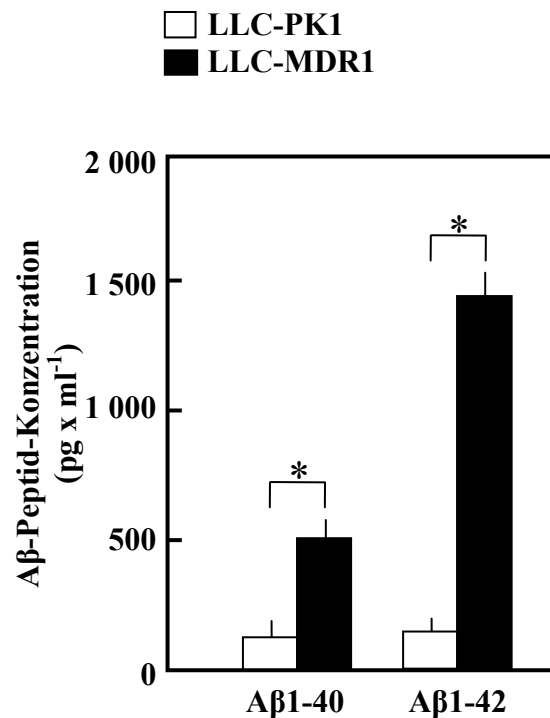


Abb. 23: Quantitative Bestimmung der Aβ-Peptide. LLC-MDR1- und LLC-PK1-Zellen wurden auf Transwell[®]Membranen kultiviert. Basale Inkubation mit Rh123 (10 μM) und Aβ1-40 bzw. 1-42 (5 μM), quantitative Bestimmung des Aβ-Peptids im apikalen Kompartiment mit dem *Beta Amyloid 1-40/42 Biotrak ELISA*. (Mittelwerte ± SD, n = 4; * signifikante Differenz zwischen beiden Zelllinien, P < 0,05 nach Student's *t*-Test)

3.2 Einfluss auf die ATP-abhängige Rh123-Aufnahme in Membranvesikel

Auf die ATP-abhängige Rhodaminaufnahme in *inside-out*-Membranvesikel im Zeitverlauf von 20 min zeigten 5 μM Aβ1-40 bzw. 1-42 eine ähnlich starke Hemmung wie 10 μM CsA (21 ± 5 % der Kontrolle) (Abb. 24). Mit einer Konzentration von 5 μM_{Aβ1-40/1-42} wurde der Transport um etwa 75 % (23 ± 7 % bzw. 24 ± 4 % der Kontrolle) signifikant vermindert.

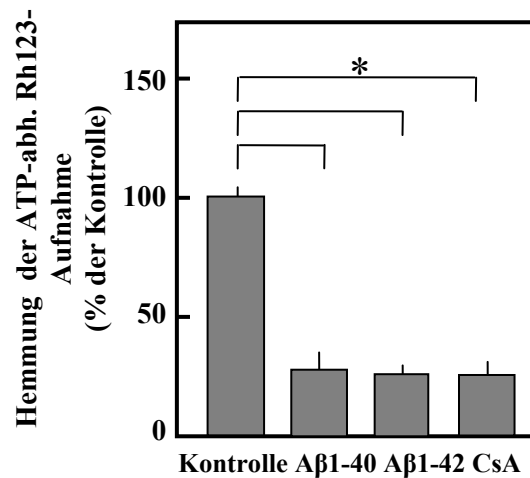


Abb. 24: Hemmung der ATP-abhängigen Rh123-Aufnahme in LLC-MDR1-Membranvesikel durch Aβ1-40 bzw. 1-42. Inkubation der Membranvesikel mit Rh123 (10 μM) und 4 mM ATP in Anwesenheit von Aβ1-40 bzw. 1-42 (5 μM) und CsA (10 μM). (Mittelwerte ± SD, n = 4; * signifikante Differenz zur Kontrolle, $P < 0,05$ nach Student's *t*-Test)

3.3 Direkter Transport von Amyloid-Peptiden

a) Transzellulärer Transport von Fluorescein-konjugiertem Aβ1-40 bzw. 1-42 (FITC-Aβ1-40 bzw. 1-42)

Der Transport markierter Aβ-Peptide sollte Hinweise darauf geben, ob sie nur Inhibitoren des Pgp-vermittelten Effluxes oder selbst auch affine Substrate des P-Glykoproteins sind. Die zelluläre Aufnahme von FITC-Aβ1-40 bzw. 1-42 wurde gleichfalls in den beschriebenen Assays untersucht. Der transzelluläre Transport der Peptide in LLC-MDR1- und LLC-PK1-Zellen war als vektorieller Prozess erkennbar (Abb. 25A und C). Nach der Inkubation der Zellen mit 5 μM FITC-Aβ1-40 bzw. 1-42 entweder im apikalen oder im basalen Kompartiment zeigte sich in den LLC-MDR1-Zellen ein signifikant höherer B→A-Transport von FITC-Aβ1-40 bzw. 1-42 ($39 \pm 2,2 \mu\text{mol}_{\text{A}\beta 1-40} \times \text{mg Protein}^{-1}$ bzw. $51 \pm 4,4 \mu\text{mol}_{\text{A}\beta 1-42} \times \text{mg Protein}^{-1}$) gegenüber dem A→B-Transport ($19 \pm 4,8 \mu\text{mol}_{\text{A}\beta 1-40} \times \text{mg Protein}^{-1}$ bzw. $20,5 \pm 7,9 \mu\text{mol}_{\text{A}\beta 1-42} \times \text{mg Protein}^{-1}$). Die Transportrate für FITC-Aβ1-40 bzw. 1-42 in den LLC-PK1-Kontrollzellen ist für beide Transportrichtungen ähnlich ($18 \pm 4,4 \mu\text{mol}_{\text{A}\beta 1-40} \times \text{mg Protein}^{-1}$ bzw. $16 \pm 5,3 \mu\text{mol}_{\text{A}\beta 1-42} \times \text{mg Protein}^{-1}$). Es konnte kein signifikanter A→B-

Transport festgestellt werden (Abb. 25A und C). In den LLC-MDR1-Zellen wurde durch CsA (10 μM) der Efflux von FITC-A β 1-40 auf $54,4 \pm 2,6$ % der Kontrolle und von FITC-A β 1-42 auf $40,2 \pm 0,4$ % der Kontrolle reduziert (Abb. 25B und D). In den Kontrollzellen lag die Hemmung jeweils bei nur etwa 94 % der Kontrolle.

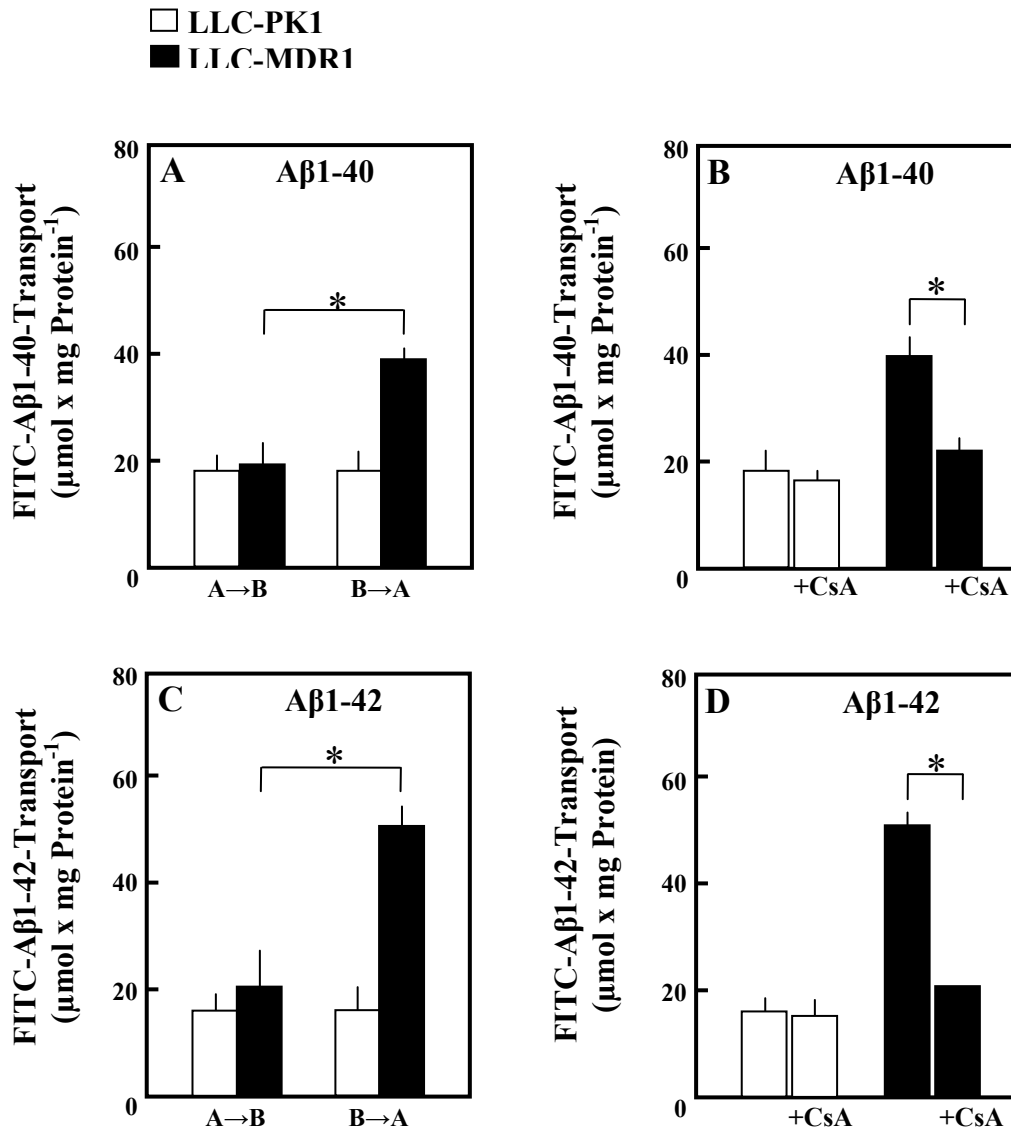


Abb. 25: Inhibition des vektoriiellen transzellulären Transportes von Flurescein-konjugiertem A β 1-40 bzw. 1-42. LLC-PK1- und LLC-MDR1-Zellen wurden auf Transwell[®]Membranen kultiviert. A und C, FITC-A β 1-40 bzw. 1-42 (5 μM) wurden entweder ins basale (B \rightarrow A) oder ins apikale Kompartiment (A \rightarrow B) pipettiert. Bestimmung der Fluoreszenz nach 60 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ im entgegengesetzten Kompartiment. B und D, Inkubation der Zellen mit FITC-A β 1-40 bzw. 1-42 (5 μM) im basalen Kompartiment unter Anwesenheit von CsA (10 μM). Bestimmung der Fluoreszenz im apikalen Kompartiment nach 60 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$. (Mittelwerte \pm SD, n = 4; * signifikante Differenz mit $P < 0,05$ nach Student's t -Test)

Zur Charakterisierung des *in-vitro*-Permeationsmodells der epithelialen Barriere unter Beteiligung von P-Glykoprotein hinsichtlich des FITC-A β 1-40- bzw. 1-42-Transportes wurden die entsprechenden Permeationskoeffizienten berechnet und den P_{app} des Rhodamins in Tabelle 4 gegenübergestellt. Rh123 war als kationischer Fluoreszenzfarbstoff im Vergleich zu den A β -Peptiden die besser permeierende Substanz. In LLC-MDR1-Zellen wurde unter Beteiligung von Pgp und in B \rightarrow A-Transportrichtung für Rhodamin der größte P_{app} mit $27,2 \times 10^{-4}$ cm/s ermittelt. Die P_{app} in den Kontrollzellen und in A \rightarrow B-Richtung waren deutlich geringer. Auch die P_{app} für die Peptide ließen einen ähnlich hohen B \rightarrow A-Transport im Gegensatz zur A \rightarrow B-Richtung in den transfizierten Zellen erkennen ($10,9 \times 10^{-4}$ cm/s bzw. $14,2 \times 10^{-4}$ cm/s). Allerdings war der Unterschied zum Rh123 um ein Vielfaches geringer als die Differenz des bereits beschriebenen FITC-Heparin und der Modellsubstanz (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Permeationskoeffizienten (P_{app}) der untersuchten Substrate

		P_{app} [10^{-4} cm/sec]	
		B \rightarrow A	A \rightarrow B
Rh123	LLC-MDR1	27,2	3,3
	LLC-PK1	3,7	4,0
FITC-Aβ40	LLC-MDR1	10,9	5,5
	LLC-PK1	5,5	5,8
FITC-Aβ42	LLC-MDR1	14,2	4,4
	LLC-PK1	5,0	1,8

b) Transport von Fluorescein-konjugiertem A β 1-40 bzw. 1-42 (FITC-A β 1-40 bzw. 1-42) in Membranvesikel

Für den Nachweis eines Pgp-vermittelten Transportes wurde die ATP-abhängige Aufnahme von FITC-A β 1-40 bzw. 1-42 in MDR1- und Kontrollmembranvesikel untersucht. Wie in Abb. 26A und C gezeigt, konnte ein ATP-abhängiger Transport von FITC-A β 1-40 ($1,2 \pm 0,17 \text{ nmol} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) und FITC-A β 1-42 ($2,0 \pm 0,18 \text{ nmol} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) in LLC-MDR1-Zellmembranen beobachtet werden. Die Werte errechneten sich durch die Subtraktion der auf die Proteinmenge normalisierten vesikelassoziierten Fluoreszenz in Gegenwart von 5'-AMP von denen in Gegenwart von ATP. Die Transportrate der MDR1-Vesikel war für das FITC-A β 1-40 nur 60 % höher als die der LLC-PK1-Kontrollmembranen ($0,75 \pm 0,3 \text{ ng} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) und für das FITC-A β 1-42 um 207 % höher als die Kontrolle ($0,65 \pm 0,31 \text{ ng} \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{min}^{-1}$) (Abb. 26B und D).

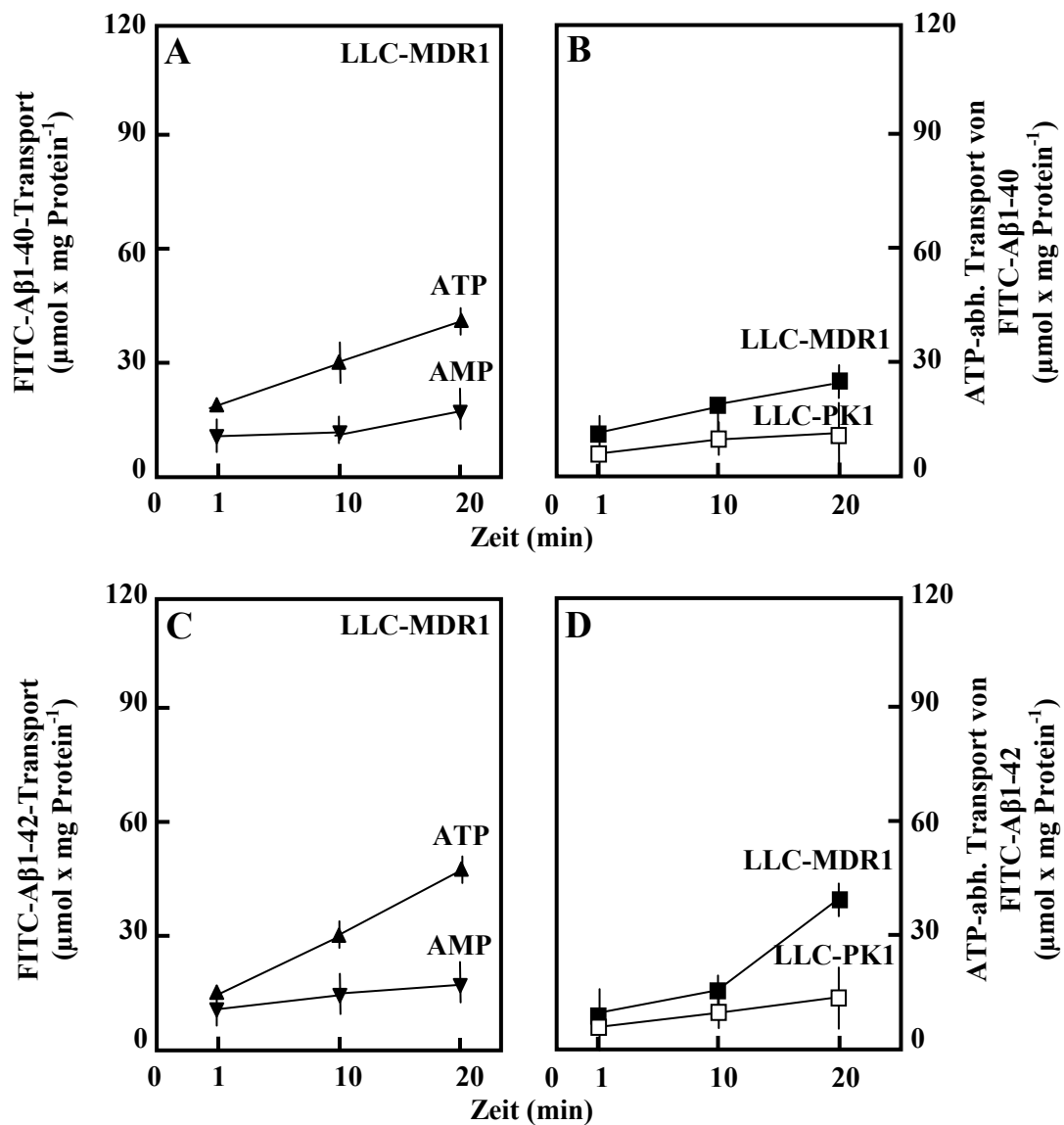


Abb. 26: Transport von FITC-Aβ1-40 bzw. 1-42 in LLC-MDR1- bzw. LLC-PK1-Membranvesikel. A und C, Inkubation von Membranvesikeln mit FITC-Aβ1-40 bzw. 1-42 (5 μM) in Anwesenheit von 4 mM ATP (▲) oder 4 mM 5'-AMP (▼). B und D, netto ATP-abhängiger Transport in LLC-MDR1-Vesikel (■) und LLC-PK1-Vesikel (□). (Mittelwerte ± SD, n = 4)

Die Aufnahme von FITC-A β 1-40/1-42 in die Membranvesikel konnte durch potente Pgp-Inhibitoren gehemmt werden (Abb. 27). In Gegenwart von 100 μ M Verapamil verringerte sich die Aufnahme der Fluoreszenzmarkierten Peptide auf 63 ± 9 % und $64 \pm 1,8$ % der Kontrolle. Nach der Inkubation mit 10 μ M CsA wurden nur $68 \pm 7,2$ % und $65 \pm 4,5$ % der Kontrolle erreicht.

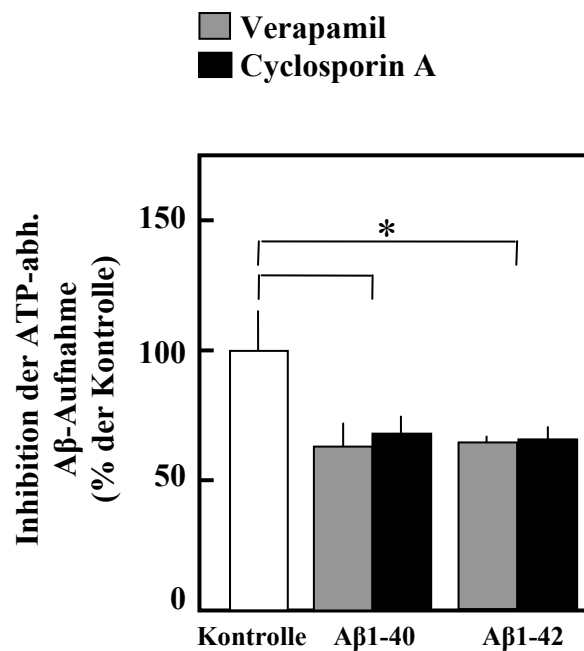


Abb. 27: Hemmung der ATP-abhängigen FITC-A β 1-40- bzw. 1-42-Aufnahme in LLC-MDR1-Membranvesikel. Inkubation der Vesikel mit FITC-A β 1-40 bzw. 1-42 (5 μ M) in Anwesenheit von 4 mM ATP, Verapamil (100 μ M) und CsA (10 μ M). (Mittelwerte \pm SD, n = 4; * signifikante Differenz zur Kontrolle, $P < 0,05$ nach Student's t -Test)

4. Zusammenfassung der untersuchten Pgp-Modulatoren

In Tabelle 5 sind die ATP-abhängigen Pgp-Transportraten in Membranvesikel in Anwesenheit der bisher untersuchten Pgp-Modulatoren zusammenfassend dargestellt.

Tab. 5: Zusammenfassung der Hemmung des ATP-abhängigen Rhodamin123-Transportes in Membranvesikel *MDRI*-transfizierter LLC-Zellen durch CsA, UFH, LMWH, A β 1-40 und A β 1-42. Die Messung wurde in Gegenwart der angegebenen Modulator-Konzentrationen wie beschrieben durchgeführt (siehe 3.7d). Der ATP-abhängige Transport wurde aus der Differenz der in die Vesikel inkorporierten Fluoreszenz in Gegenwart von ATP und 5'-AMP berechnet. (Mittelwerte \pm SD, n = 4)

ATP-abhängiger Rhodamin123-Transport			
	Konzentration	ng x mg protein ⁻¹ x min ⁻¹	%
Kontrolle (Membranvesikel <i>MDRI</i> -transfizierter LLC-Zellen)		5,6 \pm 0,6	100
Modulator:			
CsA	10 μ M	1,1 \pm 0,3	22 \pm 4,9
UFH	500 μ g/ml	2,9 \pm 0,3	60 \pm 7
LMWH	500 μ g/ml	2,8 \pm 0,5	58 \pm 10,5
A β 1-40	5 μ M	1,1 \pm 0,3	23 \pm 7
A β 1-42	5 μ M	1,2 \pm 0,2	24 \pm 4
Membranvesikel parentaler LLC- Zellen		1,2 \pm 0,3	21,4 \pm 6,8

D. Diskussion

Die pharmakologischen Effekte eines Arzneimittels sind stark von dessen Absorption, Metabolismus, Elimination und Verteilung abhängig. Dabei bestimmen vor allem die physikochemischen Eigenschaften wie Größe, Ladung und Lipidlöslichkeit den membranären Durchtritt sowie die Verteilung in den verschiedenen Geweben.

In den letzten Jahren erlangten Transmembran-Transportproteine zunehmende Aufmerksamkeit für ihre Rolle in dem pharmakokinetischen Verhalten von Arzneimitteln. Eine Vielzahl von wichtigen Aufnahme- und Effluxproteinen darunter die *organic cation transporter* (OCT), *organic anion transporter* (OAT), *MDR related transporters* (MRP) und das P-Glykoprotein wurden identifiziert und näher charakterisiert. All diese Proteine sind in der Zellmembran integriert und an der transmembranären Passage von physiologischen Substanzen, aber auch von Xenobiotika beteiligt. Die protektive Rolle des von den Transportern am besten charakterisierten und in der vorliegenden Arbeit untersuchten P-Glykoproteins wird anhand der Expression in wichtigen Organen und Blut-Gewebe-Schranken deutlich. Durch diese Lokalisation ist das Protein an der Aufrechterhaltung einer physiologischen Barrierefunktion beteiligt und schützt sensible Gewebe vor zirkulierenden Xenobiotika oder toxischen, endogenen Metaboliten (Fromm, 2004).

In den letzten Jahren hat die intensive Forschung an der Überwindung der *multidrug-resistance* von Tumoren unter Beteiligung von Pgp immer mehr an Bedeutung gewonnen. Das P-Glykoprotein schützt die Tumorzellen vor Zytostatika, indem es, ähnlich anderen Mitgliedern der ABC-Transporter-Familie, die Fähigkeit besitzt, diese Stoffe unter Hydrolyse von ATP aus der Zelle hinauszuschleusen und so die effektiven Wirkkonzentrationen in den Zellen zu verringern (Ambudkar *et al.*, 1992). Von großer pharmakologischer Bedeutung ist das Wissen um die Auswirkungen Pgp-vermittelter Transportvorgänge auf die Pharmakokinetik der jeweiligen Wirkstoffe. Dazu gehören die Verringerung der Bioverfügbarkeit oral applizierter Medikamente oder die Einschränkung der Passage von ZNS-Therapeutika durch die Blut-Hirn-Schranke. Zu den wichtigen pharmakologischen Komponenten zählen auftretende Arzneimittel-Interaktionen bei der Konkurrenz um das Pgp (Bsp. Digoxin und Verapamil).

Auch die Zusammenhänge zwischen der Expression von P-Glykoprotein in wichtigen Blut-Gewebe-Schranken und seiner physiologischen Funktionen sind als Ziele von Untersuchungen weiter in den Mittelpunkt gerückt.

Es ist von allgemeinem Interesse, die dem Pgp-vermittelten Transport zugrunde liegenden Mechanismen näher zu charakterisieren und fundiertere Kenntnisse über die Modulation dieser Funktion zu erlangen. Daher war es Ziel dieser Arbeit, die Interaktionen zweier unterschiedlicher Substanzen, des Beta-Amyloids und des Arzneistoffes Heparin, mit dem Pgp zu untersuchen und die modulatorischen Fähigkeiten auf die Aktivität des Effluxtransporters in einem geeigneten Zellsystem zu bewerten.

1. Charakterisierung des Zellmodells

In-vitro-Modelle zur Untersuchung von Pgp nutzen zum Einen subzelluläre Fraktionen wie Membranvesikel, zum Anderen werden polar wachsende Zelllinien epithelialen Ursprungs und/oder mit epithelialen Eigenschaften verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten Schweinenierenepithelzellen LLC-PK1 wachsen polar und bilden einen dichten, einschichtigen Zellrasen, so dass sie zur Untersuchung des transepithelialen Transportes geeignet sind. Die bereits mit humaner MDR1-cDNA transfizierten LLC-MDR1 (Arbeitsgruppe Borst, The Netherlands Cancer Institut, Amsterdam) überexprimieren das Transportprotein. Sie sind mit den parentalen Kontrollzellen genetisch identisch, unterscheiden sich lediglich durch die Expression des eingebrachten Gens und stehen damit als spezifisches Modell des Pgp-vermittelten Transportes zur Verfügung (Schinkel *et al.*, 1995; Evers *et al.*, 1996). Darüberhinaus haben diese Zellen gegenüber anderen Epithelzelllinien wie z. B. den Caco-2-Zellen aufgrund ihres Ursprungs den Vorteil, dass sie keinen humanen Hintergrund besitzen. Außerdem ist die Pgp-Expression in den MDR1-transfizierten LLC-Zellen bereits nach 3-4 Tagen mit der Konfluenz des Monolayers abgeschlossen.

In dieser Arbeit wurde als initiales Screening die Proteinexpression in Zellpräparationen mittels Western Blot-Analyse untersucht. In Membranfraktionen und Membranvesikeln aus den MDR1-transfizierten LLC-Zellen konnte das humane Pgp mit einem Molekulargewicht von 170 kDa nachgewiesen werden, während in den Kontrollzellen keine Anfärbung erfolgte. Immunfluoreszenz-Untersuchungen an humanen Geweben mit Hilfe monoklonaler anti-Pgp-Antikörper ergaben, dass Pgp unter physiologischen Bedingungen in der apikalen (luminalen) Membran von polarisierten epithelialen Zellen exprimiert wird (Thiebaut *et al.*, 1987). Mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie

wurde die zelluläre Lokalisation des rekombinanten Proteins in den in dieser Arbeit verwendeten Transfektanten untersucht. Durch Aufnahme eines Bilderstapels konnte in den polar wachsenden MDR1-transfizierten LLC-MDR1-Zellen die Expression des Transporters in der apikalen Membran nachgewiesen werden. In gleicher Weise wurde auch in anderen epithelialen Zelllinien wie z. B. in Caco-2-Zellen die apikale Expression des endogenen Pgp gezeigt (Hunter *et al.*, 1993).

Der Substrattransport durch Epithelzellen besteht aus verschiedenen unabhängigen, funktional aber verbundenen Prozessen wie aktivem Transport und Diffusion. Als primär-aktives Transportprotein kann Pgp die Triebkraft für einen transepithelialen Transport liefern. Deshalb war es neben der Lokalisation relevant, die Funktionalität des Membranproteins zu untersuchen.

Zur Erkennung der strukturell variierenden Substrate wurden mehrere Bindungsstellen mit unterschiedlichen Affinitäten innerhalb des Proteins postuliert (Martin *et al.*, 2000), von denen eine u. a. selektiv für Rh123 [2-(6-amino-3-imino-3H-xanthen-9-yl)-benzoesäuremethylester] ist (Abb. 28) (Shapiro *et al.*, 1999). Rh123 ist ein kationischer Fluoreszenzfarbstoff, der als Modellsubstrat für Untersuchungen der Pgp-Transportaktivität genutzt wird.

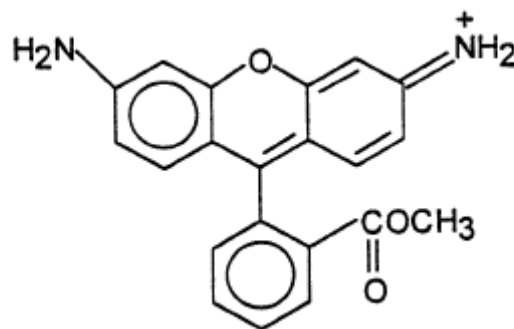


Abb. 28: Strukturformel des Rhodamin 123

Zunächst wurden der bidirektionale Transport und die zelluläre Aufnahme von Rh123 am polarisierten Monolayer von LLC-MDR1- und parentalen LLC-PK1-Zellen verglichen. Die Unidirektionalität des Pgp-vermittelten Transportes zeigte sich in einem signifikant höheren B→A-Efflux in den Pgp-überexprimierenden Zellen, wohingegen sich die Daten der Kontrollzellen hinsichtlich der Transportrichtung nicht unterschieden. Die höhere Gesamt-Rhodaminaufnahme der LLC-MDR1-Zellen, die die

intrazelluläre Akkumulation mit einschloss, ließ auf einen Pgp-abhängigen Prozess schließen.

Untersuchungen mit anderen Pgp-Substraten wie Digoxin und Vinblastin an Monolayern aus MDCK-Zellen (Mardin Darby Canine Kidney-Zellen), die ebenfalls Nierenepithelzellen darstellen, wurden dahingehend interpretiert, dass der Transport durch eine unidirektionale Pumpe in der apikalen Membran und aus Diffusions- oder Carrier-vermittelten Prozessen durch beide Membranen besteht (Ito *et al.*, 1999). Das hydrophile organische Kation Rh123 kann die Membranen nicht passiv überwinden, sondern nur den ineffizienten parazellulären Weg nutzen, der durch die Ausbildung von *tight junctions* zwischen den Epithelzellen begrenzt ist. Der nachgewiesene transzelluläre Transport besteht aus einem sättigbaren Aufnahmeprozess durch die basale Membran, der auf einen Aufnahmetransporter schließen lässt, und einem Pgp-vermittelten Efflux auf der apikalen Seite (Troutman *et al.*, 2003a; Troutman *et al.*, 2003b). Einige Untersuchungen ziehen eine mögliche Beteiligung der *organic cation transporter* (OCT) an der Rhodaminaufnahme in Betracht (Masereeuw *et al.*, 1997; van, I *et al.*, 2000).

Eine direkte Funktionsmessung unter Nachweis des ATP-abhängigen Transportes war an *inside-out*-orientierten Membranvesikeln möglich. In den LLC-MDR1-Vesikeln konnte eine um ein Vielfaches höhere zeitabhängige Netto-Rhodaminaufnahme als in den Kontrollvesikeln nachgewiesen werden, die in Gegenwart von Verapamil auf etwa 20 % vermindert war. Der Kalziumkanalblocker Verapamil ist ein Pgp-Substrat und seine Bindungsstelle befindet sich auf der extrazellulären Proteinoberfläche. Es ist jedoch möglich und eine Erklärung für den Effekt beim Vesikelassay, dass der Arzneistoff schnell durch die Membran diffundieren, sich in der zytoplasmatischen Membranhälfte anreichern und so auf beiden Membranseiten inhibierend wirken kann (Litman *et al.*, 2003). Als Mechanismus der Hemmung durch Verapamil wird die Blockierung des für die Stimulation der ATPase-Aktivität wichtigen *cross-linking* zwischen den transmembranären Segmenten 6 und 12 angenommen (Loo *et al.*, 1997). Insgesamt weisen die gezeigten Expressionslevel sowie der Pgp-vermittelte Rhodamin-Transport auf ein funktionell aktives P-Glykoprotein und ein geeignetes Zellmodell hin.

2. Heparine und P-Glykoprotein

Sowohl *in-vitro*- als auch *in-vivo*-Untersuchungen an Tieren und in klinischen Studien am Menschen haben gezeigt, dass Pgp eine entscheidende Rolle in der Pharmakokinetik einiger Arzneistoffe spielt und so die Arzneimitteltherapie maßgeblich beeinflusst (Tanigawara, 2000). Beispielsweise verursacht eine verstärkte Transportrate durch hochexprimiertes Pgp in Krebszellen eine Resistenz gegen diverse Zytostatika (Borst *et al.*, 2002).

Es wird angenommen, dass die *MDR1*-Expression während des Tumorwachstums stimuliert und von in die Tumorgenese involvierten Genen reguliert wird. Chin *et al.* konnten z. B. zeigen, dass der Promotor des humanen *MDR1*-Gens ein Ziel des *ras*-Onkogens und des p53-Tumorsuppressorgenprodukts ist (Chin *et al.*, 1992). Die Induktion des *MDR1*-Gens erfolgt aufgrund der Aktivierung von *ras* und der Inaktivierung des p53-Tumorsuppressorgens durch das Auftreten von Mutationen während der Tumorgenese. Auch in der Therapie eingesetzte Zytostatika wie z. B. das Anthrazyklin Doxorubicin können die Expression des Pgp steigern (Maitra *et al.*, 2001). Interessanterweise gibt es außerdem Hinweise darauf, dass ein interzellulärer Pgp-Transfer zwischen resistenten und sensitiven Krebszellen stattfinden kann, der in einer verstärkten Pgp-vermittelten MDR in vormals sensitiven Zellen resultiert (Levchenko *et al.*, 2005).

Zur Überwindung der *MDR1*-vermittelten Mehrfachresistenz ist es das Ziel der Forschung, Substanzen zu finden oder zu entwickeln, die die Aktivität des Pgp beeinflussen. Verbindungen, die mit der Substratbindungsstelle interagieren oder die ATP-Hydrolyse beeinträchtigen, sind in der Lage, die Sensitivität des Tumors gegenüber Chemotherapeutika zu erhalten. Verapamil, Cyclosporin A, Chinidin oder Amiodaron sind gut charakterisierte Resistenzmodulatoren (Ford *et al.*, 1996). Die relativ hohen Plasmakonzentrationen, die zur Reversion der MDR erforderlich sind, bedingen zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen. Der kardiovaskuläre Effekt von Verapamil verhinderte bei klinischen Studien an Tumorpatienten den erfolgreichen modulierenden Einsatz. Bereits bei einer Plasmakonzentration von 1 μM traten atrioventrikuläre Blockaden auf, doch erst in einer Konzentration von 10 μM bewirkte Verapamil die Umkehr der MDR (Pennock *et al.*, 1991). Auch der Pgp-spezifische Inhibitor CsA verursacht Nebenwirkungen wie nephrotoxische Effekte und intrahepatische Cholestasen. Durch den Einsatz des CsA-Derivates PSC 833 in der

Resistenzmodulation ist bereits eine erhöhte Selektivität erreicht worden (Boesch *et al.*, 1991).

Pgp-modulatorische Effekte mit großer klinischer Relevanz wurden auch für die in dieser Arbeit untersuchten Heparine beschrieben. Anhand verschiedener Leukämiezellen zeigten Maia *et al.*, dass Heparin den Rh123-Efflux um mehr als 50 % und damit ähnlich effektiv wie Verapamil zu inhibieren vermag (Maia *et al.*, 1996).

In unseren Untersuchungen wurde zunächst der Einfluss von UFH und LMWH auf die zelluläre Rhodaminaufnahme bestimmt. In den Kontrollzellen ließen sich weder in Gegenwart der Heparine noch in Gegenwart der mitgeführten Pgp-Modulatoren Verapamil, CsA und Doxorubicin signifikante Veränderungen feststellen. Die Rh123-Akkumulation war allein in den MDR1-transfizierten LLC beeinflusst. Unter Zugabe von UFH zeigte sich eine Erhöhung der akkumulierten Rhodaminmenge um 66 % zur Kontrolle, unter LMWH dagegen um 94 % und unter Verapamil um 150 % zur Kontrolle. Ein Anstieg der intrazellulären Rhodaminanreicherung um 370 % durch CsA ließ den Schluß einer potenten Wirkung auf den Pgp-Transport zu.

Der anschließend untersuchte vektorielle Rhodamintransport zeigte nach apikalen Substanzgaben keine signifikanten Unterschiede in beiden Zelllinien. Erst nach der basalen Inkubation konnte eine signifikante Hemmung des apikalen Rh123-Effluxes in LLC-MDR1-Zellen durch LMWH (50 % der Kontrolle) und UFH (58 % der Kontrolle) beobachtet werden. Vergleichend dazu wurde der Transport durch die mitgeführten Modulatoren CsA auf 49 %, durch Verapamil auf 69 % und durch Doxorubicin auf 63 % der Kontrolle gemindert. Folglich war der Effekt der Heparine auf den Rh123-Efflux nicht so stark wie der des spezifischen Inhibitors CsA, aber dennoch größer als die Hemmung durch Verapamil und lässt auf eine Interaktion der Polyanionen mit dem Pgp schließen.

Im Vesikelassay kann ATP, welches nicht durch Membranen permeiert, nur in *inside-out*-orientierten Vesikeln an die ATP-Bindungsstellen des Pgp gelangen. Die resultierende Pgp-Aktivität führt zur Akkumulation des markierten Substrates im Lumen der Vesikel. Auch bei dieser durchgeführten direkten Funktionsmessung hatten UFH (60 % der Kontrolle) und LMWH (58 % der Kontrolle) im Vergleich zu CsA (22 % der Kontrolle) einen hemmenden Effekt auf die ATP-abhängige Rh123-Aufnahme. Die Differenz zwischen beiden Heparinen war jedoch geringer als bei den vorherigen Transportassays.

UFH potenziert die antiproliferativen Effekte von Doxorubicin in resistenten Krebszellen. Eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration des Anthrazyklins wurde durch eine Verminderung der Effluxaktivität des Pgp erreicht (Angelini *et al.*, 2005). Dieses Ergebnis ist klinisch relevant, da bei einer kombinierten Therapie geringere Doxorubicin-Konzentrationen als bisher eingesetzt werden könnten, woraus weniger unerwünschte Nebenwirkungen wie z. B. eine reduzierte Kardiotoxizität resultierten.

Es scheint einen Zusammenhang zwischen Heparinen und der Pgp-Aktivität zu geben, dessen molekularer Mechanismus bislang nicht erklärt werden kann. Es ist möglich, dass Heparin allein oder in Kooperation mit zellulären Faktoren in ähnlicher Weise wie Pgp-Inhibitoren der 3. Generation eine Konformationsänderung des Proteins bewirkt, die eine verminderte Transportaktivität zur Folge hat (Ross, 2004).

Der in dieser Arbeit gezeigte Transport von markierten Heparinen an Kontroll- und MDR1-transfizierten Zellen sollte klären, ob der Rhodamintransport nur gehemmt wird oder Heparine selbst Substrat des Pgp sind und Aufschluss über die Art der Pgp-Inhibition geben. Es konnte ein direkter Transport von [³H]- und FITC-markiertem Heparin bestimmt werden. Der in den LLC-MDR1-Zellen beobachtete vektorielle Transport von [³H]-Heparin war um 70 %, der von FITC-Heparin um 125 % höher als in den jeweils mitgeführten LLC-PK1-Kontrollzellen. Nachdem auch im Vesikelassay eine zeit- und ATP-abhängige Aufnahme und damit ein direkter Transport der markierten Heparine nachgewiesen werden konnte, ließen die Ergebnisse auf eine kompetitive Inhibition der Pgp-Funktion schließen.

Eine *in-vitro*-Permeation ließ sich durch die Berechnung der Permeationskoeffizienten nachweisen. Unter Berücksichtigung verschiedener Parameter des epithelialen Modells und der Konzentration der Modellsubstrate wurde sowohl für Rh123 als auch für FITC-markiertes Heparin die größere Permeationsgeschwindigkeit in den LLC-MDR1-Zellen in B→A-Transportrichtung ermittelt.

Desweiteren konnte die Heparinspezifität der Hemmung des Pgp-vermittelten Rh123-Transportes durch die Verwendung von Dextransulfat als ein weiteres Polyanion unterstrichen werden. In einem Konzentrationsbereich von 10-500 µg/ml wurde die größtmögliche Hemmung mit 82 % der Kontrolle bestimmt, die nicht signifikant war.

Aufgrund seiner Struktur haben Heparine vielfältige biologische Wirkungen auch außerhalb des Gerinnungssystems durch Interaktionen mit vielen verschiedenen Proteinen wie Wachstumsfaktoren, Lipoproteinen, Chemokinen, extrazellulären Matrixproteinen, viralen Coat-Proteinen und anderen (Linhardt, 2003). Die

antiproliferativen Effekte können über Heparinrezeptoren (Bertolesi *et al.*, 1995) durch die Modulation der Bindung von Wachstumsfaktoren vermittelt werden (Gitay-Goren *et al.*, 1992). Außerdem greifen die Heparine in den zellulären Ca^{2+} -Haushalt ein. Die Zellproliferation kann durch die Blockierung der IP_3 -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung (Ghosh *et al.*, 1988), der Hemmung der Kalzium-ATPase des Endoplasmatischen Retikulums (de Meis *et al.*, 1997) und der Hemmung der Phosphorylierung der multifunktionalen Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (Mishra-Gorur *et al.*, 2002) inhibiert werden.

Sowohl UFH als auch LMWH hemmen die wachstumsfaktorinduzierte Proliferation von Endothelzellen, aber nur LMWH vermindert die für die Neovaskularisierung in Tumoren wichtige Formation von tubulären Fibrinstrukturen (Collen *et al.*, 2000). Auch Zacharski und Loynes beschreiben eine deutliche tumorsuppressive Wirkung des LMWH sowohl in Tiermodellen als auch in Studien an Krebspatienten (Zacharski *et al.*, 2003). LMWH > 2000 Da stimulieren die Freisetzung des *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI) aus dem Endothel (Mousa *et al.*, 2003) und machen eine Überlegenheit der LMWH gegenüber der UFH-Wirkung auf die Tumorgenese deutlich. TFPI inhibiert die durch den TF (*tissue factor*) geförderte Tumorangiogenese durch die *up*-Regulation des VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und der *down*-Regulation des Angiogeneseinhibitors Thrombospondin, woraus eine Reduktion der Metastasen und der tumorzellinduzierten Thrombozytopenie resultiert.

In dieser Arbeit konnte eine, zumindest für das UFH, konzentrationsabhängige Inhibition des Pgp-vermittelten Transportes dargestellt werden. In niedrigen Dosen verlief die Hemmung durch LMWH ebenfalls in Abhängigkeit von der Konzentration. Eine halbmaximale und gleichzeitig größtmögliche Inhibition des Transportes wurde bereits mit $500 \mu\text{g/ml}$ LMWH erreicht. Der gleiche Hemmeffekt konnte mit UFH erst bei einer Konzentration von $1\ 000 \mu\text{g/ml}$ erzielt werden, was die potentere Wirkung des niedermolekularen Heparins unterstreicht. Die unter den experimentellen Bedingungen eingesetzten Konzentrationen von mehr als $5\ 000 \mu\text{g/ml}$ UFH bewirkten eine maximale Hemmwirkung von 80 %.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass insbesondere das LMWH durch die in dieser Arbeit gezeigten Daten einen potenten Modulator der Pgp-Aktivität darstellt. Ein großer Vorteil gegenüber anderen Hemmstoffen wie z. B. Verapamil ist die geringe Toxizität bei klinisch relevanten Konzentrationen. So könnten Heparine in der Chemotherapie nicht nur als Antikoagulantien zur Prävention thromboembolischer

Komplikationen genutzt werden, sondern auch als Adjuvantien zur Überwindung Pgp-vermittelter Resistenzen und zur Sensitivierung von Tumoren für Zytostatika beitragen.

3. Transport von A β an der Blut-Hirn-Schranke

Eine besondere Bedeutung kommt der passiven Diffusion bzw. dem Gleichgewicht aus aktiver Aufnahme und Effluxtransport an einer epithelialen Barriere zu. Einen wesentlichen Anteil an der Blut-Hirn-Schranke hat das Pgp, das die zumeist lipophilen Substrate im zerebralen Kapillarendothel abfängt, somit das Gehirn vor Xenobiotika schützt und eine Akkumulation von neurotoxischen, endogenen Substanzen verhindert (Gaillard *et al.*, 2000; Terasaki *et al.*, 2005).

Es gibt neurodegenerative Erkrankungen, deren Initiation mit ungenügenden Clearance-mechanismen physiologischer Substrate an der Blut-Hirn-Schranke und den daraus resultierenden pathologischen Anhäufungen im Gehirn zusammenhängen. Die progressive Akkumulation des neurotoxischen A β im Assoziations- und limbischen Kortex als pathologisches Merkmal der Alzheimer Erkrankung initiiert eine komplexe Kaskade von biochemischen und zellulären Veränderungen, die in einer Beeinträchtigung der Gehirn- und Gedächtnisleistung endet.

Die frühen löslichen, präfibrillären Ansammlungen von A β werden als Mediatoren der Neurotoxizität gesehen (Walsh *et al.*, 2002; Piccini *et al.*, 2005). Begünstigend für die Aggregation des Proteins zu Fibrillen sind direkt oder indirekt gebildete Sauerstoffradikale (*Reactive Oxygen Species*, ROS). Gleichzeitig fördert A β selbst den neuronalen oxidativen Stress, der im alternden Gehirn zu einer Zunahme der Schädigungen von Membranen, der Zwischenzellmatrix und der Gerüststrukturen des synaptischen Spaltes führt (Pike *et al.*, 1997; Cotman *et al.*, 1992; Markesbery, 1997). Der tatsächliche klinische Nutzen antioxidativ wirksamer Substanzen ist derzeit noch nicht klar, aber einige Antioxidantien wie Vitamin C und Beta-Carotin zeigten über eine Inhibition der Zusammenlagerung von A β -Fibrillen einen neuroprotektiven Effekt (Tomiya *et al.*, 1996). Es besteht außerdem ein Zusammenhang zwischen dem Metabolismus von APP bzw. A β und der zerebralen Metallionen-Homöostase (z. B. Aluminium, Zink, Kupfer). Aluminium ließ sich in senilen Plaques und neurofibrillären Bündeln in Form von anorganischem Aluminiumsilikat als mögliche Ursache oder Folge der neuropathologischen Veränderungen nachweisen. Bei physiologischen A β -Konzentrationen

fördern Aluminium-, Eisen- und Zinkionen die Peptid-Aggregation (Mantyh *et al.*, 1993). In gleicher Weise besteht ein regulierender Mechanismus zwischen APP/A β und Kupfer. Sie können miteinander einen aggregationsfördernden, hochaffinen Komplex bilden. Eine Verminderung der Plaque-Formation bei steigenden und eine *down*-Regulation der APP-Transkription bei sinkenden Cu²⁺-Spiegeln repräsentieren die sensiblen Interaktionen als Teil der AD-Pathogenese (Fumentalba *et al.*, 2004; Maynard *et al.*, 2005).

Die pathologische Anhäufung von A β -Aggregaten ist ursächlich für die Neurotoxizität des Peptids und gibt über Störungen der Membranstruktur sowie über die Bildung von freien Radikalen selbst den Anstoß zum Zelltod. Es werden mehrere physiologisch aktive Transportmechanismen diskutiert, die A β durch die Blut-Hirn-Schranke vom ZNS ins Blut und umgekehrt schleusen und deren Funktionseinschränkung für die zerebrale Amyloid-Akkumulation verantwortlich sein könnten. Der Influx von zirkulierendem A β wird durch den RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End Products*) vermittelt, ist in der Folge mit oxidativem Stress, Apoptose oder einer inflammatorischen Immunantwort assoziiert und steht in Konkurrenz mit dem schnellen Effluxtransport durch den LRP (*Low-density Lipoprotein Receptor related Protein-1*) (Deane *et al.*, 2004). Dieser Multiligand-Lipoprotein-Rezeptor wird entsprechend eines altersabhängigen Expressionsniveaus im Kapillarendothel gebildet und vermittelt sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig den direkten Transport von A β über die Blut-Hirn-Schranke (Zlokovic, 2004). In der AD und in APP-transgenen AD-Modellen ist der Aufnahmetransporter RAGE signifikant erhöht, der Effluxtransporter LRP hingegen gering exprimiert (Shibata *et al.*, 2000). Daher ist eine Entwicklung von Arzneistoffen, die die Transporterexpression entsprechend regulieren, um das Gleichgewicht im A β -Transport wiederherzustellen, von großer Bedeutung.

Ein weiterer Zusammenhang besteht zwischen dem Auftreten der AD und dem zerebralen Cholesterinhaushalt. Die genetische Variante des Plasmaproteins Apolipoprotein E (ApoE), welches eine besondere Rolle als Trägermolekül von Lipiden und Cholesterin spielt, ist für familiär gehäufte Erkrankungen verantwortlich. Auch eine Hypercholesterinämie erhöht das Krankheitsrisiko. Es wurde entdeckt, dass der in Neuronen und Glia exprimierte Cholesterineffluxtransporter ABCA1 in den Amyloid-Transport involviert ist (Fukumoto *et al.*, 2002). Die Induktion des Proteins führte zu einer gesteigerten A β -Sekretion. Umgekehrt führte eine Transporterdefizienz zu

vermehrten Amyloidablagerungen und der These, dass ABCA1 eine Rolle in der Amyloidpathologie spielt (Koldamova *et al.*, 2005).

Eine ähnliche Korrelation wurde auch für das in dieser Arbeit untersuchte Pgp beschrieben. In normalen gealterten humanen Gehirnen fanden sich verstärkte A β -Ablagerungen neben sehr geringen Pgp-Leveln (Vogelgesang *et al.*, 2002). Eine Assoziation zu bekannten MDR1-Polymorphismen, die sich in veränderten Proteinaktivitäten äußern, wurde bisher nicht gefunden, kann aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Auch in einem Maus-Modell führte eine Pgp-Defizienz an der Blut-Hirn-Schranke zu vermehrten Amyloidablagerungen und war bisher der stärkste Beweis für eine Anteilnahme des Pgp am A β -Transport (Cirrito *et al.*, 2005).

Basierend auf den Ergebnissen von Lam *et al.*, der zeigte, dass A β *in-vitro* durch Pgp ATP-abhängig transportiert wird, konnten in dieser Arbeit weitere Hinweise für eine aktive Beteiligung des Membranproteins geliefert werden (Lam *et al.*, 2001). Die polar wachsenden, mit humaner MDR1-transfizierten LLC-Zellen dienten als *in-vitro*-Modell für das vaskuläre Endothel der Blut-Hirn-Schranke. An ihnen konnte gezeigt werden, dass nach einer basalen Zugabe von synthetischem A β 1-40 und A β 1-42 der apikale Rhodamin-efflux um 26 % (A β 1-40) bzw. 25 % (A β 1-42) gehemmt wurde.

Deutlicher war der inhibitorische Effekt bei der Messung der ATP-abhängigen Rh123-Aufnahme in MDR1-Membranvesikel. Die intravesikuläre Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffes war in den Ansätzen mit A β 1-40 und A β 1-42 im Vergleich zum Kontrollansatz um 77 % (A β 1-40) bzw. 76 % (A β 1-42) gemindert. Diese Inhibition war ähnlich stark wie die des mitgeführten Hemmstoffes CsA (79 %).

Die A β -Peptide 1-40 und 1-42 zeigten in den Transportassays ähnliche Bindungsaffinitäten und ATPase-stimulierende Effekte. Dennoch war eine tendenziell höhere Affinität des Pgp für A β 1-42 zu erkennen. Die hydrophobe Natur der Peptide kommt durch eine limitierte Löslichkeit in wässrigen Lösungen und der bevorzugten elektrostatischen Bindung an Membranen zum Ausdruck (Terzi *et al.*, 1997). Das Ablösen der A β -Peptide von membranären Strukturen stellt eine kritische Veränderung der biophysikalischen Eigenschaften dar und ist die Voraussetzung für eine pathologische Aggregation. Mit Hilfe eines Thioflavin T (THT)-Fibrillogeneseassay zeigte sich, dass man unter den bisherigen genutzten Versuchsbedingungen auf einen Transport der A β -Peptide hauptsächlich in gelöster Form als in polymerisierten Fibrillen schließen kann (Gabriele Jedlitschky, persönliche Mitteilung).

Andererseits ist für die physiologische Funktion von Nervenzellmembranen deren Fluidität unerlässlich. Mit zunehmendem Alter und bei der Alzheimer Erkrankung finden innerhalb der Flüssigmosaikstruktur Veränderungen statt. Die Fluidität der Hirnmembranen wird durch die Wirkung der aggregierten A β -Peptide deutlich vermindert (Eckert *et al.*, 2001). Dipolare Verbindungen (z. B. Phloretin, Exifone) können *in-vitro* die die Bindung begünstigende negative Ladung von Membranen senken. In der Folge ist die Assoziation von A β -Peptiden eingeschränkt und demnach die Toxizität vermindert (Hertel *et al.*, 1997). Das Steroid Cholesterin kann als wichtiger Membranbestandteil *in-vitro* vor der toxischen Amyloidwirkung schützen. In AD-Gehirnen liegt jedoch ein verringerter membranärer Cholesteringehalt vor (Eckert *et al.*, 2001).

Mit der quantitativen Bestimmung von A β mittels ELISA konnte ein Hinweis auf einen direkten Transport durch Pgp gegeben werden. Im apikalen Überstand der LLC-MDR1-Zellen ließen sich signifikant höhere Peptidkonzentrationen als im Überstand der Kontrollzellen nachweisen. Außerdem wurde A β 1-42 in dreifach höherer Konzentration als A β 1-40 bestimmt, was für eine höhere Affinität des Pgp sprechen würde.

In weiteren Assays konnte die Annahme durch einen direkten Transport markierter A β -Peptide bestätigt werden. Es wurde ein vektorieller B \rightarrow A-Flux von FITC-A β 1-40 und -A β 1-42 in den LLC-MDR1-Zellen beobachtet, der um 116 % (A β 1-40) und um 218 % (A β 1-42) höher als in den Kontrollzellen war. Die Hemmung dieses Transportes durch CsA auf 54 % (A β 1-40) und 40 % (A β 1-42) der Kontrolle spricht für die Beteiligung von Pgp. Außerdem konnte eine zeit- und ATP-abhängige Aufnahme von FITC-A β 1-40 (160 % der Kontrolle) und -A β 1-42 (307 % der Kontrolle) in Membranvesikel nachgewiesen werden. Diese intravesikuläre Akkumulation war durch CsA und Verapamil hemmbar. Damit stellen Beta-Amyloide nicht nur Inhibitoren des Pgp-vermittelten Transportes dar, sondern können selbst zum breiten Spektrum der affinen Pgp-Substrate gezählt werden, denen ein amphiphiler Charakter gemein ist.

Die Expression des Transportproteins im Gehirn im Zusammenhang mit Amyloidablagerungen hat die Möglichkeit einer effektiven Prävention eröffnet, da die Aktivität des Pgp durch eine Reihe von Medikamenten moduliert werden kann und sie zu einer gesteigerten zerebralen A β -Clearance beitragen. Beispielsweise führte die Behandlung von AD-Patienten mit Rifampin, einem der potentesten Pgp-Induktoren, zu einer deutlichen Verbesserung kognitiver Funktionen (Loeb *et al.*, 2004). Möglicherweise kann dieses Resultat auf eine verstärkte Pgp-vermittelte Amyloidclearance zurück-

zuführen sein. Auch HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine) scheinen die Pgp-Expression in der Blut-Hirn-Schranke zu erhöhen, was sich in reduzierten intra- und extrazellulären A β -Leveln äußert (Fassbender *et al.*, 2001; Eckert *et al.*, 2005).

Insgesamt stellt die pharmakologische Modulation der Pgp-Aktivität ein mögliches neues Ziel in der Prävention und Behandlung der Alzheimer Erkrankung dar. Die wahrscheinlich noch komplexeren Funktionen des Transportproteins im Gehirn bieten Anhaltspunkte für eine Weiterentwicklung von therapeutischen Strategien gegen AD und anderen neurodegenerativen Erkrankungen.

E. Zusammenfassung

Das P-Glykoprotein stellt ein wichtiges membranäres Transportprotein zum Schutz des Organismus vor Xenobiotika sowie toxischen endogenen Metaboliten dar und ist an der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion von Blut-Gewebe-Schranken beteiligt. Außerdem beeinflussen Pgp-vermittelte Transportvorgänge die Pharmakokinetik einiger Arzneimittel. Eine Modulation der Pgp-Funktion ist in vielerlei Hinsicht von Bedeutung. Daher war es Ziel dieser Arbeit, die Interaktionen zweier unterschiedlicher Substanzen, des mit der AD assoziierten Beta-Amyloids und des Arzneistoffes Heparin, mit dem Pgp zu untersuchen und die modulatorischen Fähigkeiten auf die Aktivität des Effluxtransporters in einem Zellsystem zu bewerten. Dafür stand eine polar wachsende, mit humanem MDR1-transfizierte Zelllinie zur Verfügung, die sich zur Untersuchung des transepithelialen Transportes eignete.

Bei der Durchführung der funktionellen *in-vitro*-Assays ließen sich eine signifikant verstärkte Akkumulation, ein signifikant inhibierter apikaler Efflux von Rh123 und die signifikant verminderte ATP-abhängige Rh123-Aufnahme in Membranvesikel in Gegenwart von UFH sowie LMWH im Pgp-überexprimierenden Epithelzellmodell nachweisen. Ein direkter Transport markierter Heparine konnte ebenso gezeigt werden. Als Kontrolle dienten zum Einen parentale LLC-PK1, zum Anderen zeigten vergleichende Betrachtungen bekannter Pgp-Modulatoren wie Verapamil oder CsA in diesen Transportversuchen ähnliche Ergebnisse.

Neben inhibitorischen Effekten der A β -Peptide auf die Pgp-Funktion konnte ein direkter aktiver Pgp-vermittelter Transport von synthetischem A β 1-40 und A β 1-42 gezeigt werden. Sowohl in polarisierten Zellmonolayern aus MDR1-transfizierten LLC-Zellen, die als *in-vitro*-Modell für das vaskuläre Endothel der Blut-Hirn-Schranke dienen, als auch in aus den Zellen isolierten Membranvesikeln konnte ein vektorieller bzw. ATP-abhängiger Transport der fluoreszenzmarkierten Peptide nachgewiesen werden. Eine Beteiligung des Pgp wurde anhand der Minderung des Transportes durch den spezifischen Inhibitor CsA verifiziert.

Damit stellen sowohl die Heparine als auch die Beta-Amyloide nicht nur Inhibitoren des Pgp-vermittelten Transportes dar, sondern können selbst zum breiten Spektrum der affinen Pgp-Substrate gezählt werden. Sie bewirken eine nachgewiesene pharmakologische Modulation der Pgp-Aktivität und bieten Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen der komplexen Funktionen des Transportproteins.

F. Literaturverzeichnis

- Ambudkar SV, Lelong IH, Zhang J, Cardarelli CO, Gottesman MM, Pastan I (1992): *Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 89:8472-8476.
- Angelini A, Di Febbo C, Ciofani G, Di Nisio M, Baccante G, Di Ilio C *et al.* (2005): *Inhibition of P-Glycoprotein-Mediated Multidrug Resistance by Unfractionated Heparin: A New Potential Chemosensitizer for Cancer Therapy*. Cancer Biol Ther. 4.
- Arboix M, Paz OG, Colombo T, D'Incalci M (1997): *Multidrug resistance-reversing agents increase vinblastine distribution in normal tissues expressing the P-glycoprotein but do not enhance drug penetration in brain and testis*. J Pharmacol Exp Ther. 281:1226-1230.
- Bertolesi GE, Trigoso CI, Espada J, Stockert JC (1995): *Cytochemical application of tris (2,2'-bipyridine) ruthenium (II): fluorescence reaction with sulfated polyanions of mast cell granules*. J Histochem Cytochem. 43:537-543.
- Boesch D, Gaveriaux C, Jachez B, Pourtier-Manzanedo A, Bollinger P, Loor F (1991): *In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833*. Cancer Res. 51:4226-4233.
- Borst P, Elferink RO (2002): *Mammalian ABC transporters in health and disease*. Annu Rev Biochem. 71:537-592.
- Borst P, Schinkel AH, Smit JJ, Wagenaar E, van Deemter L, Smith AJ *et al.* (1993): *Classical and novel forms of multidrug resistance and the physiological functions of P-glycoproteins in mammals*. Pharmacol Ther. 60:289-299.
- Brun A, Englund E (1981): *Regional pattern of degeneration in Alzheimer's disease: neuronal loss and histopathological grading*. Histopathology. 5:549-564.
- Burns A, Jacoby R, Levy R (1990): *Psychiatric phenomena in Alzheimer's disease. I: Disorders of thought content*. Br J Psychiatry. 157:72-74.
- Chatterjee A, Strauss ME, Smyth KA, Whitehouse PJ (1992): *Personality changes in Alzheimer's disease*. Arch Neurol. 49:486-491.
- Chin KV, Ueda K, Pastan I, Gottesman MM (1992): *Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53*. Science. 255:459-462.
- Chiou WL, Chung SM, Wu TC (2000): *Potential role of P-glycoprotein in affecting hepatic metabolism of drugs*. Pharm Res. 17:903-905.
- Chyung JH, Raper DM, Selkoe DJ (2005): *Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage*. J Biol Chem. 280:4383-4392.

- Cirrito JR, Deane R, Fagan AM, Spinner ML, Parsadanian M, Finn MB *et al.* (2005): *P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model.* J Clin Invest. 115:3285-3290.
- Clinton J, Blackman SE, Royston MC, Roberts GW (1994): *Differential synaptic loss in the cortex in Alzheimer's disease: a study using archival material.* Neuroreport. 5:497-500.
- Cohen D, Eisdorfer C, Gorelick P, Paveza G, Luchins DJ, Freels S *et al.* (1993): *Psychopathology associated with Alzheimer's disease and related disorders.* J Gerontol. 48:M255-M260.
- Collen A, Smorenburg SM, Peters E, Lupu F, Koolwijk P, Van Noorden C *et al.* (2000): *Unfractionated and low molecular weight heparin affect fibrin structure and angiogenesis in vitro.* Cancer Res. 60:6196-6200.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR *et al.* (1989): *Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites.* Proc Natl Acad Sci U S A. 86:695-698.
- Cotman CW (1998): *Apoptosis decision cascades and neuronal degeneration in Alzheimer's disease.* Neurobiol Aging. 19:S29-S32.
- Cotman CW, Pike CJ, Copani A (1992): *beta-Amyloid neurotoxicity: a discussion of in vitro findings.* Neurobiol Aging. 13:587-590.
- de Meis L, Bianconi ML, Suzano VA (1997): *Control of energy fluxes by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: ATP hydrolysis, ATP synthesis and heat production.* FEBS Lett. 406:201-204.
- Deane R, Wu Z, Zlokovic BV (2004): *RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier.* Stroke. 35:2628-2631.
- Eckert GP, Wood WG, Muller WE (2001): *Effects of aging and beta-amyloid on the properties of brain synaptic and mitochondrial membranes.* J Neural Transm. 108:1051-1064.
- Eckert GP, Wood WG, Muller WE (2005): *Statins: drugs for Alzheimer's disease?* J Neural Transm. 112:1057-1071.
- Evers R, Zaman GJ, van Deemter L, Jansen H, Calafat J, Oomen LC *et al.* (1996): *Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells.* J Clin Invest. 97:1211-1218.
- Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P *et al.* (2001): *Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A. 98:5856-5861.
- Ford JM (1996): *Experimental reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by pharmacological chemosensitisers.* Eur J Cancer. 32A:991-1001.

- Ford JM, Yang JM, Hait WN (1996): *P-glycoprotein-mediated multidrug resistance: experimental and clinical strategies for its reversal*. Cancer Treat Res. 87:3-38.
- Franssen EH, Kluger A, Torossian CL, Reisberg B (1993): *The neurologic syndrome of severe Alzheimer's disease. Relationship to functional decline*. Arch Neurol. 50:1029-1039.
- Fromm MF (2000): *P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs*. Int J Clin Pharmacol Ther. 38:69-74.
- Fromm MF (2004): *Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers*. Trends Pharmacol Sci. 25:423-429.
- Fromm MF, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR, Roden DM (1999): *Inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport: A unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine [seecomments]*. Circulation. 99:552-557.
- Fuentealba RA, Farias G, Scheu J, Bronfman M, Marzolo MP, Inestrosa NC (2004): *Signal transduction during amyloid-beta-peptide neurotoxicity: role in Alzheimer disease*. Brain Res Brain Res Rev. 47:275-289.
- Fukumoto H, Deng A, Irizarry MC, Fitzgerald ML, Rebeck GW (2002): *Induction of the cholesterol transporter ABCA1 in central nervous system cells by liver X receptor agonists increases secreted Abeta levels*. J Biol Chem. 277:48508-48513.
- Gaillard PJ, van dS, I, Voorwinden LH, Vu D, Nielsen JL, de Boer AG *et al.* (2000): *Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an in vitro model of the blood-brain barrier*. Pharm Res. 17:1198-1205.
- Ghosh TK, Eis PS, Mullaney JM, Ebert CL, Gill DL (1988): *Competitive, reversible, and potent antagonism of inositol 1,4,5-trisphosphate-activated calcium release by heparin*. J Biol Chem. 263:11075-11079.
- Gitay-Goren H, Soker S, Vlodavsky I, Neufeld G (1992): *The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules*. J Biol Chem. 267:6093-6098.
- Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A *et al.* (1989): *Expression of a multidrug resistance gene in human cancers*. J Natl Cancer Inst. 81:116-124.
- Hertel C, Terzi E, Hauser N, Jakob-Rotne R, Seelig J, Kemp JA (1997): *Inhibition of the electrostatic interaction between beta-amyloid peptide and membranes prevents beta-amyloid-induced toxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A. 94:9412-9416.
- Higgins CF (1992): *ABC transporters: from microorganisms to man*. Annu Rev Cell Biol. 8:67-113.
- Higgins CF, Callaghan R, Linton KJ, Rosenberg MF, Ford RC (1997): *Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein*. Semin Cancer Biol. 8:135-142.
- Higgins CF, Gottesman MM (1992): *Is the multidrug transporter a flippase?* Trends Biochem Sci. 17:18-21.

- Higgins CF, Linton KJ (2001): *Structural biology. The xyz of ABC transporters*. Science. 293:1782-1784.
- Huisman MT, Smit JW, Wiltshire HR, Hoetelmans RM, Beijnen JH, Schinkel AH (2001): *P-glycoprotein limits oral availability, brain, and fetal penetration of saquinavir even with high doses of ritonavir*. Mol Pharmacol. 59:806-813.
- Hunter J, Hirst BH, Simmons NL (1993): *Drug absorption limited by P-glycoprotein-mediated secretory drug transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers*. Pharm Res. 10:743-749.
- Ishikawa T (1992): *The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump*. Trends Biochem Sci. 17:463-468.
- Ito S, Woodland C, Sarkadi B, Hockmann G, Walker SE, Koren G (1999): *Modeling of P-glycoprotein-involved epithelial drug transport in MDCK cells*. Am J Physiol. 277:F84-F96.
- Jones PM, George AM (2000): *Symmetry and structure in P-glycoprotein and ABC transporters what goes around comes around*. Eur J Biochem. 267:5298-5305.
- Juliano RL, Ling V (1976): *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. Biochim Biophys Acta. 455:152-162.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH *et al.* (1987): *The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor*. Nature. 325:733-736.
- Kartner N, Ling V (1989): *Multidrug resistance in cancer*. Sci Am. 260:44-51.
- Koldamova R, Staufenbiel M, Lefterov I (2005): *Lack of ABCA1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice*. J Biol Chem. 280:43224-43235.
- Kruh J (1982): *Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture*. Mol Cell Biochem. 42:65-82.
- Kruman II, Mattson MP (1999): *Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis*. J Neurochem. 72:529-540.
- Kusuhara H, Sugiyama Y (2002): *Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney*. J Control Release. 78:43-54.
- Kusuhara H, Suzuki H, Sugiyama Y (1998): *The role of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter in the hepatobiliary excretion of drugs*. J Pharm Sci. 87:1025-1040.
- Lam FC, Liu R, Lu P, Shapiro AB, Renoir JM, Sharom FJ *et al.* (2001): *beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein*. J Neurochem. 76:1121-1128.

- Langer B, Muraco B, Manasterski J, Bechara MJ, Sitrangulo JC, Puech-Leao LE (1984): *[Laboratory control of the effect of anti-vitamins K on blood coagulation]*. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo. 39:12-17.
- Lemaire M, Bruelisauer A, Guntz P, Sato H (1996): *Dose-dependent brain penetration of SDZ PSC 833, a novel multidrug resistance-reversing cyclosporin, in rats*. Cancer Chemother Pharmacol. 38:481-486.
- Levchenko A, Mehta BM, Niu X, Kang G, Villafania L, Way D et al. (2005): *Intercellular transfer of P-glycoprotein mediates acquired multidrug resistance in tumor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 102:1933-1938.
- Lindhahl U, Backstrom G, Hook M, Thunberg L, Fransson LA, Linker A (1979): *Structure of the antithrombin-binding site in heparin*. Proc Natl Acad Sci U S A. 76:3198-3202.
- Linhardt RJ (2003): *2003 Claude S. Hudson Award address in carbohydrate chemistry. Heparin: structure and activity*. J Med Chem. 46:2551-2564.
- Litman T, Skovsgaard T, Stein WD (2003): *Pumping of drugs by P-glycoprotein: a two-step process?* J Pharmacol Exp Ther. 307:846-853.
- Loeb MB, Molloy DW, Smieja M, Standish T, Goldsmith CH, Mahony J et al. (2004): *A randomized, controlled trial of doxycycline and rifampin for patients with Alzheimer's disease*. J Am Geriatr Soc. 52:381-387.
- Loo TW, Clarke DM (1997): *Drug-stimulated ATPase activity of human P-glycoprotein requires movement between transmembrane segments 6 and 12*. J Biol Chem. 272:20986-20989.
- MacFarland A, Abramovich DR, Ewen SW, Pearson CK (1994): *Stage-specific distribution of P-glycoprotein in first-trimester and full-term human placenta*. Histochem J. 26:417-423.
- Maia RC, Wagner K, Cabral RH, Rumjanek VM (1996): *Heparin reverses Rhodamine 123 extrusion by multidrug resistant cells*. Cancer Lett. 106:101-108.
- Maitra R, Halpin PA, Karlson KH, Page RL, Paik DY, Leavitt MO et al. (2001): *Differential effects of mitomycin C and doxorubicin on P-glycoprotein expression*. Biochem J. 355:617-624.
- Mantyh PW, Ghilardi JR, Rogers S, DeMaster E, Allen CJ, Stimson ER et al. (1993): *Aluminum, iron, and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide*. J Neurochem. 61:1171-1174.
- Markesbery WR (1997): *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease*. Free Radic Biol Med. 23:134-147.
- Martin C, Berridge G, Higgins CF, Mistry P, Charlton P, Callaghan R (2000): *Communication between multiple drug binding sites on P-glycoprotein*. Mol Pharmacol. 58:624-632.

- Masereeuw R, Moons MM, Russel FG (1997): *Rhodamine 123 accumulates extensively in the isolated perfused rat kidney and is secreted by the organic cation system*. Eur J Pharmacol. 321:315-323.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K (1985): *Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome*. Proc Natl Acad Sci U S A. 82:4245-4249.
- Matsuyama SS, Jarvik LF (1989): *Hypothesis: microtubules, a key to Alzheimer disease*. Proc Natl Acad Sci U S A. 86:8152-8156.
- Maynard CJ, Bush AI, Masters CL, Cappai R, Li QX (2005): *Metals and amyloid-beta in Alzheimer's disease*. Int J Exp Pathol. 86:147-159.
- Miller DS, Fricker G, Drewe J (1997): *p-Glycoprotein-mediated transport of a fluorescent rapamycin derivative in renal proximal tubule*. J Pharmacol Exp Ther. 282:440-444.
- Mishra-Gorur K, Singer HA, Castellot JJ, Jr. (2002): *Heparin inhibits phosphorylation and autonomous activity of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II in vascular smooth muscle cells*. Am J Pathol. 161:1893-1901.
- Mousa SA, Bozarth J, Barrett JS (2003): *Pharmacodynamic properties of the low molecular weight heparin, tinzaparin: effect of molecular weight distribution on plasma tissue factor pathway inhibitor in healthy human subjects*. J Clin Pharmacol. 43:727-734.
- Munoz EM, Linhardt RJ (2004): *Heparin-binding domains in vascular biology*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24:1549-1557.
- Nakamura Y, Ikeda S, Furukawa T, Sumizawa T, Tani A, Akiyama S et al. (1997): *Function of P-glycoprotein expressed in placenta and mole*. Biochem Biophys Res Commun. 235:849-853.
- Paneitz A, Meissner K, Kroemer HK (2000): *[Drug interactions: new mechanisms and clinical relevance]*. Internist (Berl). 41:338-343.
- Pennock GD, Dalton WS, Roeske WR, Appleton CP, Mosley K, Plezia P et al. (1991): *Systemic toxic effects associated with high-dose verapamil infusion and chemotherapy administration*. J Natl Cancer Inst. 83:105-110.
- Piccini A, Russo C, Gliozzi A, Relini A, Vitali A, Borghi R et al. (2005): *Beta amyloid is different in normal aging and in Alzheimer's disease*. J Biol Chem.
- Pike CJ, Ramezan-Arab N, Cotman CW (1997): *Beta-amyloid neurotoxicity in vitro: evidence of oxidative stress but not protection by antioxidants*. J Neurochem. 69:1601-1611.
- Reisberg B, Franssen EH, Hasan SM, Monteiro I, Boksay I, Souren LE et al. (1999): *Retrogenesis: clinical, physiologic, and pathologic mechanisms in brain aging, Alzheimer's and other dementing processes*. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 249 Suppl 3:28-36.

- Romiti N, Tongiani R, Cervelli F, Chieli E (1998): *Effects of curcumin on P-glycoprotein in primary cultures of rat hepatocytes*. Life Sci. 62:2349-2358.
- Rosenberg MF, Callaghan R, Ford RC, Higgins CF (1997): *Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis*. J Biol Chem. 272:10685-10694.
- Ross DD (2004): *Modulation of drug resistance transporters as a strategy for treating myelodysplastic syndrome*. Best Pract Res Clin Haematol. 17:641-651.
- Sarkadi B, Bauzon D, Huckle WR, Earp HS, Berry A, Suchindran H *et al.* (1992): *Biochemical characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal and cystic fibrosis epithelial cells*. J Biol Chem. 267:2087-2095.
- Sarkadi B, Muller M (1997): *Search for specific inhibitors of multidrug resistance in cancer*. Semin Cancer Biol. 8:171-182.
- Sauna ZE, Ambudkar SV (2000): *Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A. 97:2515-2520.
- Scheff SW, Price DA (2003): *Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies*. Neurobiol Aging. 24:1029-1046.
- Schinkel AH (1997): *The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins*. Semin Cancer Biol. 8:161-170.
- Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ *et al.* (1997b): *Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A. 94:4028-4033.
- Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L, Smit JJ *et al.* (1997a): *Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking mdr1-type (drug-transporting) P-glycoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A. 94:4028-4033.
- Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, 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. 96:1698-1705.
- Seelig A (1998): *A general pattern for substrate recognition by P-glycoprotein*. Eur J Biochem. 251:252-261.
- Seelig A, Landwojtowicz E (2000): *Structure-activity relationship of P-glycoprotein substrates and modifiers*. Eur J Pharm Sci. 12:31-40.
- Senior AE, Gadsby DC (1997): *ATP hydrolysis cycles and mechanism in P-glycoprotein and CFTR*. Semin Cancer Biol. 8:143-150.
- Shapiro AB, Fox K, Lam P, Ling V (1999): *Stimulation of P-glycoprotein-mediated drug transport by prazosin and progesterone. Evidence for a third drug-binding site*. Eur J Biochem. 259:841-850.

- Shibata M, Yamada S, Kumar SR, Calero M, Bading J, Frangione B *et al.* (2000): *Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier.* J Clin Invest. 106:1489-1499.
- Sisodia SS (1992): *Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease.* Proc Natl Acad Sci U S A. 89:6075-6079.
- Smorenburg SM, Van Noorden CJ (2001): *The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies.* Pharmacol Rev. 53:93-105.
- Spahn-Langguth H, Langguth P (2001): *Grapefruit juice enhances intestinal absorption of the P-glycoprotein substrate talinolol.* Eur J Pharm Sci. 12:361-367.
- Tanigawara Y (2000): *Role of P-glycoprotein in drug disposition.* Ther Drug Monit. 22:137-140.
- Terasaki T, Ohtsuki S (2005): *Brain-to-blood transporters for endogenous substrates and xenobiotics at the blood-brain barrier: an overview of biology and methodology.* NeuroRx. 2:63-72.
- Terzi E, Holzemann G, Seelig J (1997): *Interaction of Alzheimer beta-amyloid peptide(1-40) with lipid membranes.* Biochemistry. 36:14845-14852.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC (1987): *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues.* Proc Natl Acad Sci U S A. 84:7735-7738.
- Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC (1989): *Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein.* J Histochem Cytochem. 37:159-164.
- Tomiyama T, Shoji A, Kataoka K, Suwa Y, Asano S, Kaneko H *et al.* (1996): *Inhibition of amyloid beta protein aggregation and neurotoxicity by rifampicin. Its possible function as a hydroxyl radical scavenger.* J Biol Chem. 271:6839-6844.
- Troutman MD, Thakker DR (2003a): *Novel experimental parameters to quantify the modulation of absorptive and secretory transport of compounds by P-glycoprotein in cell culture models of intestinal epithelium.* Pharm Res. 20:1210-1224.
- Troutman MD, Thakker DR (2003b): *Rhodamine 123 requires carrier-mediated influx for its activity as a P-glycoprotein substrate in Caco-2 cells.* Pharm Res. 20:1192-1199.
- Tsuruo T, Iida H, Tsukagoshi S, Sakurai Y (1981): *Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil.* Cancer Res. 41:1967-1972.
- Twentyman PR (1992): *Cyclosporins as drug resistance modifiers.* Biochem Pharmacol. 43:109-117.

- Ueda K, Taguchi Y, Morishima M (1997): *How does P-glycoprotein recognize its substrates?* Semin Cancer Biol. 8:151-159.
- Ueda K, Yoshida A, Amachi T (1999): *Recent progress in P-glycoprotein research.* Anticancer Drug Des. 14:115-121.
- Utoguchi N, Audus KL (2000): *Carrier-mediated transport of valproic acid in BeWo cells, a human trophoblast cell line.* Int J Pharm. 195:115-124.
- van Tellingen O (2001): *The importance of drug-transporting P-glycoproteins in toxicology.* Toxicol Lett. 120:31-41.
- van Zuylen L, Sparreboom A, van der GA, van der Burg ME, van B, V, Bol CJ *et al.* (2000): *The orally administered P-glycoprotein inhibitor R101933 does not alter the plasma pharmacokinetics of docetaxel.* Clin Cancer Res. 6:1365-1371.
- van dS, I, Blom-Roosemalen MC, de Boer AG, Breimer DD (2000): *Specificity of doxorubicin versus rhodamine-123 in assessing P-glycoprotein functionality in the LLC-PK1, LLC-PK1:MDR1 and Caco-2 cell lines.* Eur J Pharm Sci. 11:207-214.
- Vogelgesang S, Cascorbi I, Schroeder E, Pahnke J, Kroemer HK, Siegmund W *et al.* (2002): *Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans.* Pharmacogenetics. 12:535-541.
- Walsh DM, Klyubin I, Fadeeva JV, Rowan MJ, Selkoe DJ (2002): *Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition.* Biochem Soc Trans. 30:552-557.
- Wang EJ, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW (2001): *Inhibition of P-glycoprotein transport function by grapefruit juice psoralen.* Pharm Res. 18:432-438.
- Zacharski LR, Loynes JT (2003): *Low-molecular-weight heparin in oncology.* Anticancer Res. 23:2789-2793.
- Zlokovic BV (2004): *Clearing amyloid through the blood-brain barrier.* J Neurochem. 89:807-811.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, den 20. Juli 2006

Lebenslauf

Diana Kuhnke

07.04.1976

geboren in Rostock

Eltern: Dietrich und Bärbel Kuhnke geb. Langberg

Schule

1982 - 1990

Besuch der Polytechnischen Oberschule in Rostock

1990 - 1994

Besuch des Gymnasiums Evershagen in Rostock

Juli 1994

Abitur

Studium

1994 - 1998

Studium Pharmazie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

1998 - 2003

Studium Humanbiologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Diplomprüfungen im Hauptfach Pharmakologie/
Toxikologie und in den Nebenfächern Biochemie
und Humanökologie

Juli 2002 - April 2003

Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie unter
der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Thema: *Etablierung eines Zellsystems zur Über-
prüfung der Transportfunktion von humanem
MDR1*
Abschluss: Diplom-Humanbiologin

Praktika

September 2001

Vierwöchiges Praktikum bei der Firma Micromun/
Biotechnikum Greifswald, Arbeit an molekular-
biologischen Virus-Nachweisverfahren

Oktober 2001

Vierwöchiges Praktikum im Landesgesundheitsamt
M/V Greifswald, Untersuchungen in den Labor-
bereichen Krankenhaushygiene und Wasser-
mikrobiologie

November 2001

Vierwöchiges Projektpraktikum am Institut für
Pharmakologie, Projekt „Klonierung und
Mutagenese von Promotor-Fragmenten humaner
 β -Glukuronidase“

2003 - Promotion am Institut für Pharmakologie unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Thema: *P-Glykoprotein vermittelter Arzneimitteltransport: Untersuchungen zur Interaktion mit Heparin und Beta-Amyloid am epithelialen Zellmodell*

Veröffentlichungen:

- **Characterization of Heparin as Inhibitor and possible Substrat of MDR1-P-Glycoprotein (ABCB1)**
Kuhnke D, Jedlitschky G, Greinacher A, Kroemer HK
45. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie, Mainz, März 2004
- **Effects of β -Amyloid on MDR1-P-Glycoprotein (ABCB1)-mediated Drug Efflux**
Kuhnke D, Jedlitschky G, Vogelgesang S, Warzok RW, Kroemer HK
46. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie, Mainz, März 2005
- **MDR1-P-Glycoprotein (ABCB1) mediates Transport of Alzheimer's Amyloid- β -Peptides at the Blood-Brain-Barrier**
Kuhnke D, Grube M, Jedlitschky G, Jucker M, Mosyagin I, Pahnke J, Cascorbi I, Walker LC, Kroemer HK, Warzok RW, Vogelgesang S
Brain Pathology, April 2007, In Press

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Heyo K. Kroemer für die Vergabe des Themas aber auch für sein beständiges Interesse am Fortgang der Arbeit und seine hilfreichen Hinweise und Anregungen.

Für die fachliche Betreuung und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit gilt mein Dank Frau Dr. Gabriele Jedlitschky.

Bei Herrn Prof. Andreas Greinacher, Herrn Prof. Rolf Warzok und Frau OÄ Dr. Silke Vogelgesang möchte ich mich für die Anregungen und die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Ich möchte Herrn Piet Borst vom *Netherlands National Cancer Institut* in Amsterdam für die Bereitstellung der Zellen danken.

Ein großes Dankeschön für ihre stete Hilfsbereitschaft bei den großen und kleinen Problemen und die erheiternde Zusammenarbeit im Laboralltag sei an Frau Bärbel Uecker und Frau Tina Brüggmann gerichtet.

Ganz besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Markus Grube und Herrn Dr. Matthias Gratz für die allseits fachliche Unterstützung in allen erforderlichen Bereichen.

Weiterhin möchte ich mich bei dem gesamten Laborteam, im Besonderen bei Frau Katharina Schuster und Frau Janka „Janki“ Reimer, für die freundschaftliche Atmosphäre und die schöne Zeit bedanken.

Abschließend möchte ich meinen Eltern und meiner gesamten Familie für die uneingeschränkte liebevolle Unterstützung über die Jahre danken.