HOCHSCHULE MITTWEIDA
UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

BACHELORARBEIT

Frau

Vanessa Hänchen

Untersuchungen zur Interaktion von synthetischen Duftstoffverbindungen mit P-glykoprotein des Zebrabärblings

Mittweida, 2012

Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik

BACHELORARBEIT

Untersuchungen zur Interaktion von synthetischen Duftstoffverbindungen mit P-glykoprotein des Zebrabärblings

Autor:

Frau

Vanessa Hänchen

Studiengang:
Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:
BI09w1-B

Erstprüfer:
Frau Prof. Dr. Petra Radehaus

Zweitprüfer:
Herr Dr. Till Luckenbach

Einreichung:
Mittweida, 23.10.2012

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2012

Bibliographische Beschreibung:

Hänchen, Vanessa: Untersuchungen von synthetischen Duftstoffverbindungen auf Interaktion mit P-glykoprotein des Zebrabärblings. - 2012. - V, 60, 0 S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Bachelorarbeit, 2012

Englischer Titel

Analysis of the interaction of synthetic fragrances with p-glycoprotein of the zebrafish.

Kurzbeschreibung:

P-glykoprotein ist ein Vertreter der ABC-Transportproteine. Diese sind in der Lage, den Efflux zytotoxischer Substanzen aus dem Zellinneren zu gewährleisten. Einige Substanzen können das Protein aber auch hemmen, wodurch eine Akkumulation toxischer Substanzen in der Zelle ausgelöst wird (Chemosensitizer-Effekt).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss umweltrelevanter, synthetischer Duftstoffe auf P-glykoprotein des Zebrabärblings (*Danio rerio*) untersucht. Hierzu wurde rekombinantes P-glykoprotein des Zebrabärblings verwendet, das mit dem Baculovirus-System hergestellt wurde. Eine Interaktion der Testsubstanzen mit dem Protein wurde über die Stimulierung, bzw. die Hemmung der stimulierten ATPase-Aktivität des Proteins mittels ATPase-Assay festgestellt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mich während des Studiums und besonders bei der Bachelorarbeit unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Petra Radehaus und Dr. Till Luckenbach für die Betreuung meiner Bachelorarbeit und die Übernahme der Gutachten.

Zudem möchte ich mich bei Peggy, Kathleen, Anne, Dénise und Markus bedanken, welche mich als Ansprechpartner bei Problemen und Fragen unterstützt haben und immer weiterhelfen konnten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, welche in allen Lebenslagen für mich da sind.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis III

Tabellenverzeichnis IV

Abkürzungsverzeichnis V

1. Einleitung 1

1.1 Das Baculovirus-Expressionssystem 1

1.2 Synthetische Duftstoffe 3

1.3 Synthetische Moschusverbindungen 4

1.4 Multixenobiotic resistance 4

1.5 Untersuchte Duftstoffe 5

1.6 ATPase-Testsystem 10

2. Zielstellung 11

3. Material 12

3.1 Chemikalien 12

3.2 Medien und Zellkultur 13

3.3 Arbeitslösungen und Puffer 13

3.4 Kits 16

3.5 Geräte 16

3.6 Software 17

4. Methoden 18

4.1 Zellpräparation 18

4.1.1 Zellkultur 18

4.1.2 Bestimmung der Zellzahl 19

4.1.3 Infektion der Zellen 19

4.1.4 Zellernte 19

4.2 Membranpräparation 20

4.3 Bestimmung des Proteingehalts mittels Bicinchoninsäure (BCA) 21

4.4 Identifizierung des Proteins mittels Western Blot 22
4.5 ATPase-Test 24
4.5.1 Testsubstanzen 25
4.5.2 Durchführung des Assays 25
4.5.3 Kontrollen 28
4.6 Datenauswertung 29
5. Ergebnisse 31
5.1 BCA-Proteinbestimmung 31
5.2 Western Blot 32
5.3 ATPase-Tests 33
5.3.1 Phosphatbestimmung 34
5.3.2 Erläuterung der Kurvenverläufe für ATPase-Stimulation und -Inhibierung 34
5.3.3 Tests auf Aktivierung mit Verapamil 36
5.3.4 Ergebnisse der Tests mit synthetischen Duftstoffen 39
6. Diskussion 50
7. Zusammenfassung und Ausblick 52
8. Summary 54
Quellenverzeichnis 56
Literaturquellen 56
Internetquellen 57
Sicherheitsdatenblätter (SDB) 59
Selbstständigkeitserklärung 60

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Herstellung eines Baculovirus (Invitrogen 2002). 3
Abbildung 2: Spinner Flask (URL-14). 18
Abbildung 3: Cavitator-System. 21
Abbildung 4: Gelelektrophoresekammer (URL-15). 23
Abbildung 5: Anordnung der Bestandteile im Western Blot (URL-17). 24
Abbildung 6: Aufteilung der 96-Wellplatte. 27
Abbildung 7: Albumin-Kalibriergerade. 32
Abbildung 8: Nitrocellulosemembran nach Western Blot. 33
Abbildung 9: Phosphat-Kalibriergerade. 34
Abbildung 10: Aktivierung und Inhibierung der ATPase. 35
Abbildung 11: Ergebnisse der Versuche mit dem Modell-Substrat Verapamil. 37
Abbildung 12: Ergebnisse der Versuche mit synthetischen Duftstoffen. 42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Duftstoff-Verbindungen. 6
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller. 12
Tabelle 3: Verwendete Medien, Zellen sowie Lösungen für die Zellkultur. 13
Tabelle 4: Verwendete Arbeitslösungen und Puffer und deren Herstellung. 13
Tabelle 5: Verwendete Kits und deren Hersteller. 16
Tabelle 6: Genutzte Geräte und deren Herkunft. 16

Abkürzungsverzeichnis

ABC	ATP-bindende Kassette (ATP-binding-cassette)
AE	Aktivierungseinheit (nmol Pi/min/mg Protein)
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (bicinchoninic acid)
CsA	Cyclosporin A
GOI	Gene of interest
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
K_{OW}	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
MNPV	multiple nuclear polyhedrosis virus
MK	Moschus-Keton
MXR	Multixenobiotic resistance
Na_3VO_4	Natriumorthovanadat
OD	optische Dichte
Pi	anorganisches Phosphat
P-gp	P-glykoprotein
SDB	Sicherheitsdatenblatt
UBA	Umweltbundesamt Deutschland
VF	Verdünnungsfaktor

1. Einleitung

1.1 Das Baculovirus-Expressionssystem

Um Proteine in einem Upstream-Prozess herzustellen, existieren verschiedene Methoden. Proteine werden in Mikroorganismen sowie Pilz-, Pflanzen-, und Tierzellen exprimiert. Das macht diese Systeme zu geeigneten Wirten von Wunschproteinen. Insektenzellen dienen als Organismus der Wahl, wenn es darum geht, ein schnelles Wachstum und eine einfache Kultivierung bei robusten Zellkulturen zu realisieren. Das Baculovirus-Expressionssystem basiert auf der Infektion von Insektenzellen, um diese als Expressionsort des Wunschproteins zu nutzen (Thieman und Palladino, 2007). Baculoviren befallen lediglich Insekten und teilweise auch verwandte Wirbellose, was sie ungefährlich für Säugetiere macht. Die doppelsträngige DNA der Viren besitzt eine zirkuläre Struktur und ist 80 - 180 kbp lang (Invitrogen, 2002; Clark und Pazdernik, 2009). Baculoviren treten in Knospen- und Okklusionsform auf. Für das Erstellen rekombinanter Proteine wird die Okklusionsform eingesetzt. In ihrer natürlich vorkommenden Form enthält sie viele in eine Polyhedrin-Matrix eingehüllte Nukleokapside. Die Matrix besteht aus dem Protein Polyhedrin und dient dem Schutz der Viruspartikel außerhalb des Wirtsorganismus. Nach Aufnahme der Partikel durch Insekten wird die polyedrische Struktur des Matrixproteins im Verdauungsprozess des Organismus geschädigt und abgebaut, so dass die Nukleokapside freigesetzt werden und einen neuen Wirt befallen können. Da Polyhedrin für die Erhaltung der Kapside von enormer Bedeutung ist, verfügt sein Gen über einen besonders starken Promotor (Clark und Pazdernik, 2009). Die Genexpression von Baculoviren teilt sich in die frühe und späte Phase der Virusreplikation. In einigen Fällen wird auch von einer sehr späten Phase der Replikation gesprochen. Während der späteren Phasen der Virusinfektion kommt es zur Synthese immenser Mengen an Polyhedrin. Für eine Infektion kultivierter Insektenzellen ist die Polyhedrinmatrix der Nukleokapside jedoch nicht erforderlich und das Gen für Polyhedrin kann durch eine cDNA ersetzt werden, die für ein zu produzierendes Protein codiert. In den meisten Experimenten wird der am häufigsten untersuchte Baculovirus namens *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV) eingesetzt. Als Wirtsorganismus erweist sich eine Zelllinie des Eulenfalters *Spodoptera frugiperda* als nützlich, da hier die Erträge an rekombinantem Protein als besonders hoch beschrieben werden (Clark und Pazdernik, 2009; Invitrogen, 2002; Trometer und Falson, 2010). Das System der Baculovirus-Expression wurde im Jahre 1982 von Smith und Summers entwickelt. Seitdem ist es eines der effektivsten eukaryotischen Vektorsysteme, die für eine

Proteinexpression rekombinanter Gene genutzt werden. Ein Grund dafür ist vor allem die Sicherheit im System, da die Viren ausschließlich bestimmte Invertebraten-Spezies befallen und keine weiteren Helfer-Zelllinien oder Helfer-Viren benötigt werden. Zudem ist das Scale-up durch das Nutzen von gut wachsenden Suspensionszellkulturen gut reproduzierbar und die rekombinante Genexpression findet in hohen Maßen statt, sodass ein hoher Proteinertrag erhalten werden kann.

Um einen rekombinanten Virus herzustellen, existieren zwei Möglichkeiten. Einerseits ist es möglich, mit einem als Transfervektor dienenden Plasmid von *E.coli* zu arbeiten. Das Plasmid enthält die MNPV-Sequenz, in welcher sich das einstige Polyhedringen samt Promotor und flankierenden Sequenzen befinden. An der Stelle des Polyhedringens befindet sich nun eine multiple Klonierungsstelle (Multiple Cloning Site, MCS), in welche die gewünschte Protein-DNA (Gene of Interest, GOI) eingeschleust wird. Anschließend kann das Plasmid mit dem Baculovirus rekombiniert werden, sodass das Polyhedringen des Virus durch das GOI ersetzt wird. Die Insektenzellen werden mit dem Transfervektor und der MNPV-Virus-DNA transfiziert, sodass durch doppeltes Crossing-over der rekombinante Baculovirus entsteht (Invitrogen, 2002, Clark und Pazdernik, 2009).

Vorteilhafter ist aber das Prinzip der Site-spezifischen Transposition, da hier ein sehr viel schnelleres und effektiveres Verfahren angewandt wird. Dabei wird mit einem Bacmid gearbeitet, ein Shuttle-Vektor, welcher sich in *E. coli* als Plasmid und in Insektenzellen als Virus repliziert. Das GOI wird in einen Vektor kloniert und das rekombinante Plasmid in DH10Bac^{TM} kompetente Zellen transformiert. Die Zellen enthalten den Bacmid mit einer mini-attTn7-Target Site und einem Helfer-Plasmid, welcher die Herstellung eines rekombinanten Bacmids ermöglicht. Das Helfer-Plasmid vollführt die Transposition des mini-TN7-Elements auf dem Plasmid auf die mini-attTn7-Taget Site auf dem Bacmid. Das entstandene Bacmid kann nun zur Transfektion von Zelllinien dienen. In Abbildung 1 wird der beschriebene Prozess bildhaft beschrieben (Abb. 1) (Invitrogen, 2002).

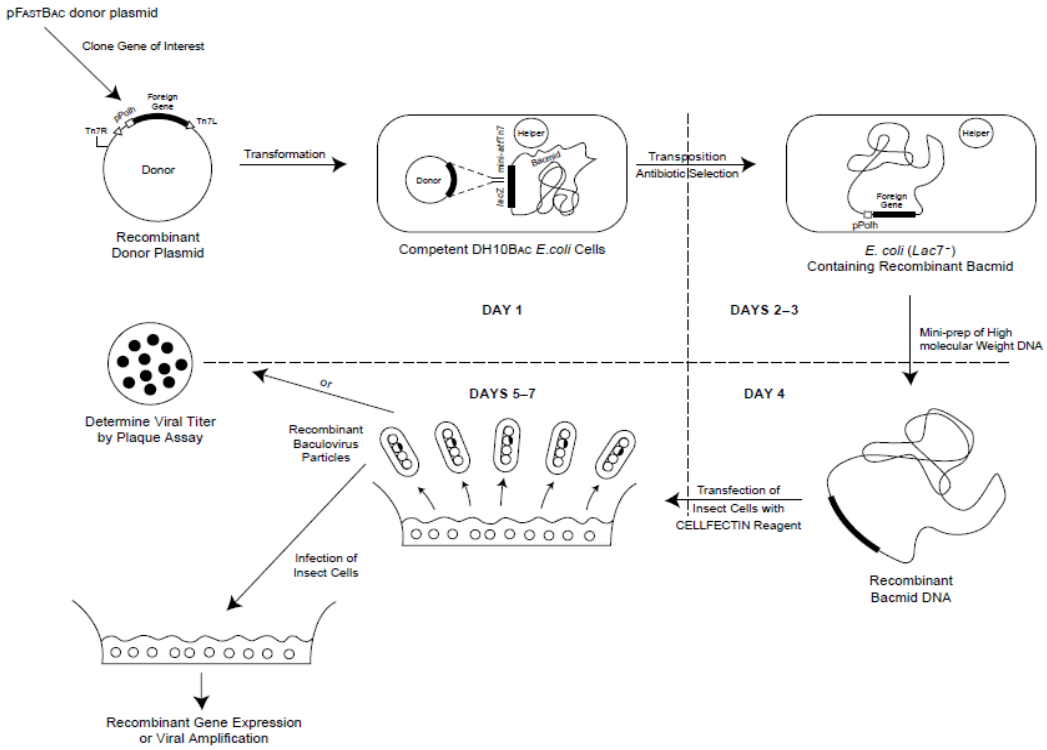


Abbildung 1: Herstellung eines Baculovirus (Invitrogen 2002).
Zu sehen ist eine schematische Darstellung der einzelnen Schritte zur Herstellung des rekombinanten Baculovirus mittels Site-spezifischer Transposition.

1.2 Synthetische Duftstoffe

Duftstoffe finden als Duftzusätze unter anderem Verwendung in Parfums, Kosmetika, Seifen und Shampoos, Lufterfrischern und Waschmitteldetergenzien. Vor allem wegen schnelllebigen Modetrends werden die verschiedensten Stoffe in nur geringen Produktionsmengen in genannten Produkten verarbeitet und in die Umwelt freigesetzt. Der industrielle Wirtschaftszweig setzt bis zu 3000 Substanzen ein, welche in verschiedenen Kombinationen aus bis zu mehreren hundert Substanzen in einzelnen Produkten enthalten sind. Duftstoffe können nicht nur für den Menschen eine von der Allgemeinheit bislang noch unterschätzte Gefahr darstellen, indem sie beispielsweise über die Atmung in den Organismus gelangen können und sich über die Blutbahn im gesamten Körper verteilen, wo sie eine Wirkung als Allergene inne haben. Die Resorption über die Riechschleimhaut kann auch dazu führen, dass diverse Stoffe direkt über Nervenfasern ins Gehirn geleitet werden (Umweltbundesamt Deutschland (UBA) 2006). Zunehmend wird auch die Gefahr von höheren Konzentrationen von Duftstoffen in der Umwelt erkannt. Die chemischen Eigenschaften synthetischer Duftstoffe sind zum Einen für die schnelle Wahrnehmung des Stoffes bereits in geringen Konzentrationen, zum Anderen für die schnelle Verbreitung im menschlichen Körper verantwortlich.

1.3 Synthetische Moschusverbindungen

Eine besondere Aufmerksamkeit im Rahmen des industriellen Nutzens gilt der Gruppe der synthetischen Moschusverbindungen, welche den Geruch des natürlichen, schwer zu gewinnenden und deswegen teuren, Moschus nachahmen sollen. Die erste synthetische Moschusverbindung wurde erschaffen, als Alfred Baur im Jahr 1888 versuchte, eine effektivere Form des Trinitrotoluols herzustellen. Synthetische Moschusverbindungen können in drei Klassen eingeteilt werden: aromatische Nitromoschusverbindungen, polyzyklische Moschusverbindungen und makrozyklische Moschusverbindungen. Dabei werden vor allem die ersten beiden Gruppen in der Industrie zum Zweck der Kosmetikherstellung eingesetzt (URL-1). Synthetische Moschusverbindungen zeichnen sich durch niedrige Polarität, geringe Wasserlöslichkeit, einen hohen Dampfdruck und eine hohe Oberflächenaktivität aus (URL-2). Die physikochemischen Eigenschaften dieser Stoffe sind für eine schlechte biologische Abbaubarkeit und einer damit verbundenen Anreicherung in der Umwelt (Bioakkumulation) verantwortlich. Auch deren hohe K_{OW}-Werte (Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient) indizieren eine schlechte Wasserlöslichkeit (Gooding *et* al. 2006). Obwohl die Gefahren und die Toxizität, die von den Einzelverbindungen ausgehen, als unbedenklich eingestuft wurden, bleiben deren hinterlassene Spuren, vor allem aufgrund zunehmenden Einsatzes als Kombinationen verschiedener Verbindungen nicht ohne Folgen. So fand man beispielsweise Anreicherungen der polyzyklischen Verbindungen Tonalid und Galaxolid in Muttermilch und menschlichem Fettgewebe oder Spuren von Moschus Xylol und Moschus-Keton (MK) in Abfläufen von Abwasseraufbereitungsanlagen, Oberflächenwasser, Sedimenten, Fischen und Bodenproben wieder (URL-3; Gooding *et* al. 2006; Giddings *et* al. 2000). Durch den weltweiten menschlichen Verbrauch einer enormen Menge an Kosmetikprodukten, die täglich verwendet werden, gelangen die Stoffe ins Abwasser, was zu einer weltweiten Belastung von Gewässern und aquatischen Organismen sowie Invertebraten mit diesen synthetischen Duftstoffen führt. Durch die Anreicherung der Verbindungen über die Nahrungskette gelangen die Verbindungen über eine Vielzahl an Organismen bis hin zum Menschen, wo sie auf Dauer karzinogen oder als endokrine Disruptoren wirken können (UBA 2006).

1.4 Multixenobiotic resistance

Ein sehr effektives System, um endogene und exogene Giftstoffe aus aquatischen Organismen herauszuschleusen, ist der Mechanismus der Multixenobiotic resistance (MXR). Dabei sind

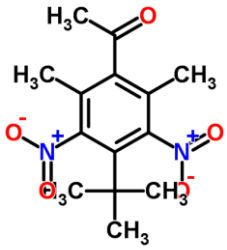
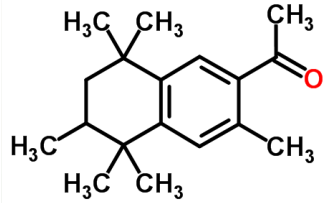
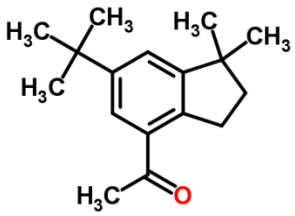
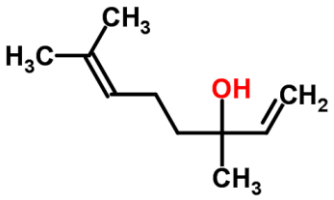
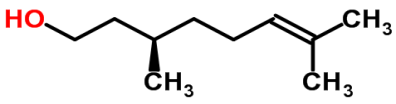
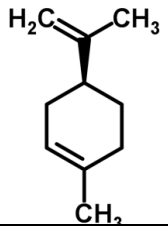
membranständige ATPasen unter ATP-Verbrauch (Adenosintriphosphat) für den schnellen, aktiven Export einer Vielzahl potentieller xenobiotischer Schadstoffen aus der Zelle zuständig. MXR-Proteine spielen dabei die Rolle des ersten Verteidigungssystems der Organismen gegen Schadstoffe. Ein bisher sehr gut erforschter Vertreter der MXR-vermittelnden Proteine ist das P-glykoprotein (P-gp) aus der Familie der ABC-Transportproteine (ATP-bindende Kassette, ATP-binding-cassette). Doch existieren Substanzen, die dieses Verteidigungssystem beeinflussen können, indem sie die Proteine hemmen. Dadurch wird eine Akkumulation von potentiellen Schadstoffen im Zellinneren hervorgerufen, was wiederum deren Toxizität erhöht und zur Zellschädigung führen kann. Stoffe, die als Inhibitoren wirken, werden als Chemosensitizer oder MXR-Inhibitoren bezeichnet. Chemosensitizer gelten auf Grund ihrer gewaltigen Bedeutung in der Umwelt als eine neue Klasse umweltgefährdender Chemikalien.

So fand man bereits heraus, dass Nitromoschusverbindungen und polyzyklische Moschusverbindungen bei Muscheln zu einer Chemosensitivierung führen können. Zudem wurde gezeigt, dass eine Langzeitinhibition der Effluxaktivität durch Umweltgifte hervorgerufen werden kann. Diese Tatsache spielt eine wichtige Rolle, wenn es um die Abschätzung der Gefahren geht, die von Umweltschadstoffen ausgehen (Smital *et* al. 2004).

1.5 Untersuchte Duftstoffe

In dieser Arbeit wurden drei synthetische Moschusverbindungen und drei weitere Duftverbindungen auf ihr Potential zur Aktivierung der P-gp-ATPase getestet. Diese werden im Folgenden beschrieben. Die nachkommende Tabelle gibt einen Überblick über die IUPAC-Namen der Substanzen, deren Strukturformeln, Molekulargewichte und deren Wasser-Oktanol-Verteilungskoeffizienten (Tab. 1).

Tabelle 1: Duftstoff-Verbindungen.
Die aufgeführten synthetischen Duftstoffe sollen in dieser Arbeit auf ihre Wechselwirkung mit P-gp untersucht werden. In der Tabelle sind deren IUPAC-Namen, Strukturformeln, molare Massen und Log K_{OW}-Werte angegeben.

Name	**Systematische Bezeichnung**[URL-13]	**Strukturformel**[URL-13]	**M (g/mol)**	**Log K_{OW}**
Keton Moschus	1-[2,6-Dimethyl-4-(2-methyl-2-propanyl)-3,5-dinitrophenyl]-ethanon		294,3[SDB-1]	4,3[SDB-1]
Tonalid	1-(3,5,5,6,8,8-Hexamethyl-5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthalenyl)ethanon		258,4[URL-13]	5,4[SDB-2]
Celestolid	1-[1,1-Dimethyl-6-(2-methyl-2-propanyl)-2,3-dihydro-1H-inden-4-yl]ethanon		244,5[SDB-3]	5,51[URL-13]
Linalool	(+)3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol		154,25[SDB-4]	2,97[URL-12]
Citronellol	3,7-Dimethyloct-6-en-1-ol		156,27[SDB-5]	3,41[SDB-5]
(S)-(-)-Limonen	1-methyl-4-(1-methylethenyl)-cyclohexen		136,23[SDB-6]	4,5[URL-12]

Moschus-Keton ($C_{14}H_{18}N_2O_5$)

Moschus-Keton ist ein zur Gruppe der Nitromoschusverbindungen gehörendes Keton. Nitromoschusverbindungen sind aus struktureller Sicht Nitroderivate des Benzens. Diese Verbindungen besitzen dem natürlichen Moschus besonders ähnliche Dufteigenschaften. Aus diesem Grund finden sie eine weitgreifende Anwendung in Duftprodukten wie Seifen, Parfums, Lotionen und Cremen, wobei Moschus-Keton den am meisten genutzten künstlichen Moschusersatzstoff darstellt (Mersch-Sundermann *et* al. 2001). Wegen ihrer hohen Lipophilität sammeln sich Nitromoschusverbindungen in der Umwelt und in terrestrischen wie aquatischen Organismen an, ohne abgebaut zu werden. 1981 wurde erstmals von einem Auftreten von Nitromoschusverbindungen in aquatischen Systemen berichtet (Mottaleb et al. 2004). MK wurde bereits in Süßwasserfischen und -muscheln, Regenbogenforellen aus Aquakulturen, Krabben und in heranwachsenden wie erwachsenen Ratten gefunden. Zudem konnte man Verbindungen wie MK und Moschus Xylol in der Nordsee, verschiedenen Flüssen, häuslichen und industriellen Abwasserschlämmen, in Abläufen von Abwasserbehandlungsanlagen und sogar in norwegischen Luftproben nachweisen (Mersch-Sundermann *et al.* 2001; Mottaleb et *al*. 2004). MK steht in der Vermutung, komutagene Eigenschaften zu besitzen. Die akute Toxizität der Substanz ist gering, sie wird bei oraler Verabreichung bei Ratten und bei dermaler Anwendung bei Kaninchen mit einen LD_{50}-Wert von >10000 mg/kg Körpergewicht angegeben (Sicherheitsdatenblatt (SDB-1)).

Tonalid ($C_{18}H_{26}O$)

Die Verbindung Tonalid gehört zur Gruppe der polyzyklischen Moschusverbindungen. In der Literatur wird der chemische Name 6-Acetyl-1,1,2,4,4,7-hexamethyltetralin häufig mit AHTN abgekürzt. Gemeinsam mit Galaxolid gehört es zu den wichtigsten Vertretern dieser Gruppe. Noch in den neunziger Jahren stellten sie 95 % der verwendeten polyzyklischen Moschusverbindungen dar (Rimkus, 1999). Die Produktion anderer Duftstoffe lag im Jahr 2000 unter 20 t, während die von Galaxolid und Tonalid 1427 t bzw. 343 t betrug (Kupper et *al.* 2004). Tonalid steht gemeinsam mit Galaxolid auf der Liste von Stoffen, die unter Einwirkung von Sonnenlicht auf der Hautoberfläche allergen wirken, also Stoffe, die phototoxisch sind. In Tierversuchen fand man bereits heraus, dass Tonalid giftig für die Leber ist. Bereits bei einmaligen Verabreichungen der Substanz an Ratten folgten Entzündungen in der Leber und ein Zerfall von Leberzellen. Der LD_{50}-Wert für eine orale Einnahme liegt bei Ratten bei 570–1377 mg/kg Körpergewicht (URL-2; URL-4). Daneben fand man Metabolite von Galaxolid und Tonalid in Abwasser, Klärschlamm und Pflanzenabfällen. Wegen ihrer

schlechten Abbaubarkeit aufgrund lipophiler Eigenschaften sind vor allem in Abwasserschlämmen größere Vorkommen von polyzyklischen Moschusverbindungen zu vermuten (Kupper et *al.* 2004).

Celestolid ($C_{17}H_{24}O$)

Celestolid gehört ebenfalls zu den polyzyklischen Moschusverbindungen. Bei Raumtemperatur liegt Celestolid in Form von weißen Kristallen vor. In der Literatur wird die chemische Bezeichnung 4-Acetyl-6-tert-butyl-1,1-dimethylindan mit ABDI abgekürzt. Der Stoff besitzt einen LD_{50}-Wert, der für eine Ratte bei oraler Verabreichung und bei einem Kaninchen bei dermaler Anwendung bei über 5000 mg/kg Körpergewicht liegt (SDB-3). Eine Studie von Heberer et al. beschäftigte sich mit der Analyse von Oberflächenwasserproben verschiedener Seen, Flüsse und Kanäle in Berlin hinsichtlich ihrer Konzentrationen von Nitromoschus- und polyzyklischen Moschusverbindungen (Heberer et *al.* 1999). Es wurde festgestellt, dass die Stoffe Galaxolid, Tonalid und Celestolid in allen Proben enthalten waren. Dabei wiesen Proben, die direkt aus der Kanalisation von kommunalen Abwasserbehandlungsanlagen oder von deren Abläufen genommen wurden, die höchsten Konzentrationen dieser Substanzen auf (Rimkus, 1999). Celestolid kommt nicht natürlich in der Natur vor. In der Industrie gewinnt man es durch Reaktion von Isopren mit tert-Butylbenzol in Anwesenheit von Schwefelsäure und einer folgenden Acetylierung (Martinez und Hartwig, 1998).

Linalool ($C_{10}H_{18}O$)

Linalool ist ein natürlich vorkommender tertiärer Alkohol, welcher zu den acyclischen Monoterpenen gehört. Linalool kommt vor allem in Gewürzpflanzen, wie Koriander, Muskat, Thymian, Ingwer, Zimt, Basilikum, Oregano und schwarzem Pfeffer sowie Bergamotte und in Rosenholz, vor. Bei Raumtemperatur ist Linalool eine farblose Flüssigkeit. Sein Geruch wird als blumig-frisch mit einer leichten Zitrusnote beschrieben, daher ist er Bestandteil ätherischer Öle und wird für Aromen in Wein eingesetzt. Zusätzlich ist Linalool ein Zwischenprodukt in der Vitamin E-Synthese. Außerdem spielt der Stoff als Duftzusatz eine große Rolle bei der Herstellung von Hygieneprodukten und Waschmitteln wie Seife, Shampoos und Lotionen. Auf diesem Gebiet kommt Linalool in 60-80 % aller Produkte vor (URL-5; URL-6; SDB-4). Linalool besitzt bei einer Temperatur von 20 °C einen Dampfdruck von 0,1 mbar (URL-7). Seine akute Toxizität lässt sich mit dem LD_{50} für eine Ratte auf 2790 mg/kg Körpergewicht

bei oraler Verabreichung und für ein Kaninchen auf 561 mg/kg bei kutaner Verabreichung festlegen (SDB-4).

Citronellol ($C_{10}H_{20}O$)

Citronellol ist ein acyclischer Monoterpen-Alkohol. Bei Raumtemperatur ist der Stoff flüssig und farblos bis hellgelb gefärbt. Sein Geruch ist bei beiden auftretenden Enantiomeren verschieden, so kann es nach Geranienöl oder nach Zitronenöl riechen. (S)-Citronellol ist Bestandteil des Geranien- und Rosenöls, (R)-Citronellol ist in Zitronengras vorhanden. Die Industrie setzt Citronellol in Deo- und Mückensprays sowie Waschmitteln ein. Laut Gefahrstoffverordnung wird der Stoff als reizend und umweltgefährlich eingestuft. Oral verabreicht besitzt der Stoff bei einer Ratte einen LD_{50}-Wert von 3450 mg/kg Körpergewicht und für die kutane Verabreichung bei einem Kaninchen einen LD_{50}-Wert von 2650 mg/kg Körpergewicht (URL-8; URL-9).

(S)-(-)-Limonen ($C_{10}H_{16}$)

Limonen ist das Monoterpen, welches am häufigsten in Pflanzen vorkommt. Als Folge bildet es mit Isopren die zwei flüchtigen organischen Kohlenwasserstoffe, die weltweit zu den am häufigsten von der Vegetation der Erde in die Atmosphäre abgegebenen Spurengasen zählen (URL-10). Der Naturstoff existiert in zwei Enantiomeren. (R)-(+)-Limonen ist bis zu 65 % in Zitronenöl und bis über 90 % in Orangenöl enthalten. Des Weiteren ist es Bestandteil von Bitterorangen-, Kümmel-, Dill-, und Korianderöl. (S)-(–)-Limonen ist ein terpentin-artiger Geruch zuzuschreiben. Es ist in Edeltannen- und Pfefferminzöl enthalten. Das Racemat der beiden Formen ist in Kien-, Nerol-, Muskatnuss- und Campheröl vertreten. Die Gewinnung erfolgt größtenteils durch Naturstoffextraktion, wobei (R)-(+)-Limonen auch in erheblichen Mengen Nebenprodukt der Organgensaftherstellung ist. Limonen stellt einen recht preiswerten Duftzusatzstoff dar, kommt aber auch als Verdünnungsmittel und Reiniger in großen Mengen zum Einsatz. Zudem wird es als biogenes Lösungsmittel und pflanzliches Insektizid genutzt. Der LD_{50}-Wert der oralen Einnahme bei Ratten und der kutanen Anwendung bei Kaninchen beträgt 5000 mg/kg Körpergewicht Für Wasserorganismen wird dieser Stoff als sehr giftig beschrieben. Das Produkt wird als reizend und umweltgefährdend eingestuft (SDB-6, URL-11).

1.6 ATPase-Testsystem

Das ATPase-Testsystem dient der Quantifizierung der ATPase-Aktivität des rekombinanten Proteins bei Anwesenheit von Testsubstanzen. Durch die Spaltung von ATP wird Energie frei, die P-gp beim aktiven Transport von Substanzen gegen einen Konzentrationsgradienten aufwendet. Bei der ATPase-Aktivität des P-gp wird im Laufe eines katalytischen Zyklus ATP durch Hydrolyse zu Adenosindiphosphat (ADP) und einem anorganischem Phosphatrest (Pi) gespalten. Der Test beruht auf der Messung des freiwerdenden anorganischen Phosphates und weist somit die Hydrolyse von ATP nach. Dadurch ist es indirekt möglich, die Aktivität der ATPase quantitativ zu bestimmen. Gründe für den Einsatz dieses Testsystems zum Nachweis der Interaktion von Chemikalien mit rekombinantem P-gp sind vor allem eine einfache Testdurchführung mit der Möglichkeit zu hohem Durchsatz und eine gute Reproduzierbarkeit zu geringen Kosten (Sarkadi et *al*. 2006).

Die Vorbereitung des ATPase-Assays ist im Gegensatz zu Methoden, die auf Farbstoffefflux basieren (z.B. Calcein-AM-Assay) aufwendig. Lösungen und Verdünnungsreihen müssen exakt und in phosphatfreien Behältnissen hergestellt werden. Zudem muss darauf geachtet werden, dass Substanzen, die bei -20 °C gelagert werden, in möglichst kleinen Aliquoten abgefüllt werden, um eine Schädigung durch häufiges Auf- und Abtauen zu verhindern. Dafür können aber in einem Durchgang zwei Tests parallel durchgeführt werden. Der Effekt einer Substanz auf P-gp wird über Aktivierung und über Inhibierung der ATPase-Aktivität geprüft. Durch das Mitführen von Kontrollen kann erkannt werden, ob eine erhöhte Aktivität der ATPase erfolgt. Wird diese stimuliert, kann die getestete Substanz als Substrat angenommen werden, ein tatsächlicher Transport wird dadurch aber noch nicht bestätigt. Eine Stimulation des Enzyms deutet nur auf eine Bindung des Stoffes an den Transporter hin und zeigt eine stattgefundene Hydrolyse an. Um eine Inhibition festzustellen, wird die ATPase des P-gp durch ein Modell-Substrat stimuliert, das zusammen mit der Test-Substanz zugegeben wird. Ist durch Zugabe der Testsubstanz eine Verringerung der Enzymaktivität festzustellen, kann die Versuchssubstanz als Inhibitor betrachtet werden. Dabei ist es möglich, dass die Inhibitorsubstanz entweder die ATPase-Aktivität hemmt oder nur sehr langsam durch den Transportkanal geschleust wird, sodass keine weiteren Substanzen als Substrate angenommen werden können. Eine Aussage über die Art der Interaktion kann mit dem ATPase-Testsystem nicht festgestellt werden (Solvo, 2007) und muss mit einem anderen Testsystem, z.B. mittels Monolayer-Efflux-Assay (Polli et *al.* 2001), ermittelt werden.

2. Zielstellung

In dieser Arbeit soll das P-gp, ein bedeutender Vertreter der ABC-Proteinfamilie, auf seine Wechselwirkung mit synthetischen Duftstoffen untersucht werden. Da besonders aquatische Systeme zunehmend unter einer Verschmutzung mit Chemikalien leiden, ist es notwendig, Testsysteme zu finden und zu entwickeln, welche Aussagen über die Umweltgefährlichkeit chemischer Substanzen, vor allem anthropogener Herkunft, treffen. Diesem Zweck dient das ATPase-Testsystem, das eine hohe Durchsatzrate zu geringen Kosten liefert (Sarkadi et al. 2006). Als Zielorganismus soll in dieser Arbeit der Zebrabärbling (*Danio rerio*) dienen. In vorangegangenen Schritten wurde das Gen, das für sein P-gp kodiert, isoliert und in einem Baculovirus transformiert. Dieses Virus diente der Infektion von Sf9-Zellen, welche nun in der Lage waren, das *Danio*-P-gp zu überexprimieren. Nach Expression des P-gps soll die Zellmembran isoliert werden, sodass die Proteinaktivität im ATPase-Assay untersucht werden kann. Dabei soll geprüft werden, ob sich bestimmte Substanzen als Aktivatoren oder Inhibitoren des Proteins verhalten.

Es wurde bereits belegt, dass vor allem künstlich hergestellte Moschusverbindungen mit ABC-Transportproteinen interagieren (Smital *et* al. 2004). In dieser Arbeit sollen synthetische Duftstoffe auf Interaktion mit P-gp des Zebrabärblings untersucht werden. Dabei soll ein Vergleich zwischen den in der Industrie bereits seit langem eingesetzten Moschusduftstoffen und anderen in der Industrie in großen Mengen eingesetzten synthetischen Duftstoffen hinsichtlich deren Interaktionen mit P-gp erfolgen.

3. Material

3.1 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller.

Chemikalien	**Herkunft**
Ammoniummolybdat-Tetrahydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
L(+)-Ascorbinsäure, gepulvert	AppliChem, Darmstadt
MgCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Celestolid	The Perfumers Apprentice, Kalifornien, USA
Citronellol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
D-Mannitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
GTA	AppliChem, Darmstadt
EDTA	AppliChem, Darmstadt
Ethanol 70 %	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
HCL	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
HEPES	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
(S)-(-)-Limonen	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Linalool	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Methanol, 99 %	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
$MgCl_2$-Hexahydrate	Sigma Aldrich, Taufkirchen
MOPS	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Moschus-Keton	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Sodium-Orthovanadate	Sigma Aldrich, Taufkirchen
NaOH	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe

Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
SDS	Serva, Heidelberg
TEMED 99 %, p.a., für die Elektrophorese	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe
Tonalid	LGC Standards GmbH, Wesel
Tris	AppliChem, Darmstadt
Verapamilhydrochlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Zinc Acetate dihydrate	Sigma Aldrich, Taufkirchen

3.2 Medien und Zellkultur

Tabelle 3: Verwendete Medien, Zellen sowie Lösungen für die Zellkultur.

Produkt	**Herkunft**
Sf9-Zellen	Life technologies, Kalifornien, USA
Sf-900™ II SFM-Medium	Life technologies, Kalifornien, USA
Trypan Blau Lösung, 0,4 %	Sigma Aldrich, Taufkirchen

3.3 Arbeitslösungen und Puffer

Tabelle 4: Verwendete Arbeitslösungen und Puffer und deren Herstellung.

Lösungen	**Zusammensetzung/Herkunft**
Albumin-Standard 2 mg/ml	PIERCE, Illinois USA
35 mM Ammoniummolybdat in 15 mM Zinkacetat pH5	0,865 g Ammoniummolybdat in 15 ml Zinkacetat lösen und mit HCL auf pH 5 bringen. Lösung mit Zinkacetat auf 20 ml auffüllen.
20 % Ammoniumpersulfat (APS)	2 g Ammoniumpersulfat mit MQ-H_2O auf 10 ml auffüllen.
Ascorbinsäure	1,5 g Ascorbinsäure in 15 ml bidestilliertem Wasser lösen, pH 5 mit NaOH einstellen.

Assay-Mix	10 ml MOPS-Tris, 1 ml KCL, 1 ml Natriumazid, 20 µl EDTA-TRIS, 400 µl DTT, 7580 µl bidestillertes Wasser.
Biotinylated Protein Ladder	Cell Signaling Technology, Boston, USA
0,1 M DDT	0,3086 g DDT in 20 ml bidestilliertem Wasser lösen.
100 mM EGTA-TRIS pH 7,0	3,804 g EGTA in ca. 10 ml 1,7 M Tris lösen. 80 ml destilliertes Wasser hinzugeben und mit 1,7 M Tris bis pH 7 einstellen. Die Lösung mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen.
Goat-Anti-mouse AK,	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA
5x Homogenisierungspuffer	0,606 g TRIS-HCL, 1,19 g HEPES, 186 mg EDTA in 85 ml MQ-H_2O lösen, mit 2 N NaOH auf pH-Wert 7,4 bringen, 42,70 g Saccharose zugeben, mit MQ-H_2O auf 100 ml auffüllen.
HRP-conjugated Anti-Biotin Antibody	Cell Signaling Technology, Boston, Massachusetts, USA
1 M KCl	7,46 g KCl in bidestilliertem Wasser lösen, auf 100 ml auffüllen.
Laufpuffer 10x (Elektrophoresepuffer)	30,28 g Tris, 188 g Glycin in 800 ml MQ-H_2O unter Erwärmen lösen, 10 g SDS in 100 ml MQ-H_2O lösen, dazugeben, auf 1 l mit MQ-H_2O auffüllen

0,1 M MOPS-Tris, pH 7	2,09 g MOPS, 1,7 M Tris, bidestilliertes Wasser
0,1 M Natriumazid	0,65 g Natriumazid in 100 ml bidestilliertem Wasser lösen.
60 mM Natriumorthovanadat	Natriumorthovanadat in bidestilliertem Wasser lösen.
Prestained protein marker	New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA
2x Proben-Ladepuffer	0,606 g Tris in 90 ml MQ-H_2O lösen mit HCl pH-Wert auf 6,8 bringen, 2 g SDS, 10 g Saccharose, 4 mg Bromphenolblau zugeben, mit MQ- H_2O auf 100 ml auffüllen.
Sammelgelpuffer	6,05 g Tris, 0,4 g SDS in 70 ml MQ- H_2O lösen, mit HCl auf pH-Wert 6,8 bringen mit MQ- H_2O auf 100 ml auffüllen.
Transferpuffer	3,303 g Tris, 14,4 g Glycin in 700 ml MQ-H_2O lösen, 200 ml Methanol zugeben, mit MQ- H_2O auf 1 l auffüllen.
Trenngelpuffer	18,17 g Tris und 0,4 g SDS in 70 ml MQ-H_2O lösen, mit HCl pH-Wert auf 8,8 bringen. Auf 100 ml mit MQ- H_2O auffüllen.
TMEP-Puffer	5 ml Tris-HCl, 5 ml D-Mannitol, 5 ml EGTA, 2,79 µl 2-Mercaptoethanol, 100 µl Proteaseinhibitor-Cocktail, mit MQ- H_2O auf 25 ml auffüllen.
1,7 M Tris	20,587 g Tris in bidestilliertem Wasser lösen.

15 mM Zinkacetat	330 mg Zinkacetat in 100 ml bidestilliertem Wasser lösen.

3.4 Kits

Tabelle 5: Verwendete Kits und deren Hersteller.

Kit	**Hersteller**
BCA ™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific	Rockford, Illinois, USA
ECL Advance ™ Western Blotting Detection Kit	General Electrics Healthcare, Freiburg

3.5 Geräte

Tabelle 6: Genutzte Geräte und deren Herkunft.

Gerät	**Herkunft**
Chemilumineszenz Abbildungssystem	FluorChem 8900, Alpha Innotech
Elektrophoresekammer	Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen
Elektrophorese Power Supply klein	Biometra, Göttingen
Elektrophorese Power Supply groß	Bio Rad, München
Magnetrührgerät	VWR, Darmstadt
Mikroskop, invers	Zeiss, Oberkochen
Milli-Q-Reinstanlage	Biocel, Billerica, Massachusetts, USA
Mini-Vac Vakuumpumpe	Axon Lab AG, Schweiz
Optima™ L-90 K Preparative Ultracentrifuge	Beckmann Coulter, Kalifornien, USA
Plate Reader Spectra Max250	MWG Biotech, Ebersberg
Semi Dry Blot-Gerät	Bio Rad, München
Spinner Flask	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Tecan GENios Microplate Reader	Tecan Group Ltd. , Schweiz
Wasserbad	Grant Instruments, Cambridgeshire, UK
Western-Blot-Roboter	BioLane™ HTI Hölle & Hüttner AG

Zellkulturbank, HeraSafe	Kendro, Langenselbold
Zentrifuge	Hermle, Wehingen

3.6 Software

FluorChem8900

SoftMaxPro 4.8

Xfluor 4.5

4. Methoden

Das folgende Kapitel unterteilt sich in sechs Abschnitte, welche den Ablauf der verwendeten Methoden verdeutlichen. Zunächst wurden die Zellen für den Versuch vorbereitet und die Zellmembran aufgeschlossen. Danach wurde der Bicinchoninsäure-Assay ausgeführt, um den Proteingehalt der Membransuspension zu bestimmen. Im nächsten Schritt wurde die Probe im Western Blot aufgetragen. Anschließend wurde der ATPase-Test durchgeführt. Die im Test erhaltenen Daten wurden genutzt, um die ATPase-Aktivitäten zu bestimmen.

4.1 Zellpräparation

4.1.1 Zellkultur

Gearbeitet wurde mit Sf9-Zellen. Die Zellen wurden nach dem Auftauen bei 28 °C mit Sf-900™ II SFM-Medium und bei 125-150 rpm in einem Schüttelkolben inkubiert. Eine stabil wachsende Kultur konnte für das Scale-up bei 27 °C und 80 rpm weiter in einer Spinner Flask herangezogen werden (Abb. 2). Die Sf9-Zellen wurden stets unter Lichtausschluss inkubiert. Das Arbeiten mit den Zellen erfolgte unter der Sterilbank, um Kontaminationen auszuschließen.

Abbildung 2: Spinner Flask (URL-14).
Die Spinnerflasche dient speziell dem Kultivieren der Insektenzellen in Suspensionskultur. Der eingebaute Magnetrührer macht ein homogenes Durchmengen der Suspension möglich, ohne dass die Zellen geschädigt werden oder sich absetzen.

4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Trypan Blau-Färbung. Dazu wurden der Kultur 1000 µl entnommen und mit 10 µl Trypan Blau versetzt. Eine Vermischung erfolgte mittels Resuspension in der Pipette. Anschließend wurden 10 µl unter die vorbereitete Neubauer-Zählkammer pipettiert. Hierbei war ein schnelles Arbeiten von Nöten, da der Farbstoff selbst zytotoxisch wirkt und vitale Zellen schädigen kann. Dies hätte eine Verfälschung des Ergebnisses zur Folge. Zur Zellzahlbestimmung wurde der Mittelwert der gezählten Zellen aller vier Quadrate der Zählkammer gebildet und mit dem Verdünnungsfaktor verrechnet.
Für die Vitalitätsbestimmung wurde der prozentuale Anteil der vitalen Zellen errechnet. Tote Zellen konnten durch eine hohe Aufnahme des Trypan Blau als solche identifiziert werden.

4.1.3 Infektion der Zellen

Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 1,5 $x10^6$–2 $x10^6$ Zellen/ml mit dem rekombinanten Baculovirus infiziert. Dazu wurde die Virussuspension vor der Infektion mit einer Filterporengröße von 22 µm sterilfiltriert. Je nach vorhandener Zellzahl wurden 5 - 7 ml Virusüberstand in die Zellsuspension gegeben. Anschließend wurde die Spinner Flask mit der infizierten Kultur wieder bei 27 °C und 80 rpm für 60-72 h inkubiert.
Nach dem Arbeiten mit Virussuspensionen wurde die Sterilbank für mindestens 30 min mit UV-Licht bestrahlt. Dies dient der Inaktivierung möglicherweise freigesetzter Viren. Der beim Arbeiten entstandene Abfall wurde gesondert in S1-Abfallbehälter gegeben.

4.1.4 Zellernte

Nach 60 – 72 h wurden die Zellen erneut ausgezählt und die Zellvitalität bestimmt, wobei diese hierbei nicht unter 80 % liegen durfte. Die Zellen hatten zur Ernte ein leicht aufgeblähtes Aussehen. Das diente der optischen Erkennung des richtigen Zeitpunktes der Ernte. Zunächst wurde der Virus entfernt. Dazu wurde die Zellsuspension in 50-ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 3300 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand enthielt das Virus und konnte abgenommen werden. Die Zellpellets wurden bei -80 °C für 2-3 h gelagert.

4.2 Membranpräparation

Die Membranpräparation dient der Isolierung der Zellmembran. Dabei wurden alle weiteren Zellbestandteile wie der Zellkern oder die Mitochondrien entfernt. Wichtig war, dass die Zellen und deren Bestandteile während des gesamten Vorgangs auf Eis gelagert wurden, um ein Denaturieren der Proteine zu verhindern.

Zu Beginn der Präparation war es nötig, den TMEP-Puffer (siehe 3.3 Arbeitslösungen und Puffer) frisch herzustellen. Die Zellpellets wurden durch Resuspension mit TMEP vom Boden der Zentrifugenröhrchen gelöst und gemeinsam in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Dieses wurde bis auf 10 ml mit TMEP-Puffer aufgefüllt. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss mittels Stickstoff-Kavitation. Dazu wurde die Zellsuspension in ein spezielles Glasgefäß gegeben, welches hohen Drücken standhält. Die Suspension wurde in den Korpus der Apparatur (Abb. 3) gestellt und der Deckel wurde aufgesetzt. Dabei war es wichtig, dass das der innere Abschnitt des Ablassrohrs in die Suspension taucht. Nachdem der Deckel durch Schellen befestigt und sicher versiegelt worden war, wurde ein Glaskolben unter den äußeren Abschnitt des Ablassrohres gestellt. Danach wurden alle Ventile auf Verschluss geprüft und Stickstoffgas bis zu einem Druck von 90 bar zugeführt. Nach 10 min der Stickstoffbegasung konnte das Ablassventil behutsam geöffnet werden, sodass die Lösung mit den aufgeschlossenen Zellen in den Messkolben fließen konnte. Die Zellen wurden nach dem Aufschluss wieder auf Eis gegeben. Die Apparatur wurde auseinandergebaut und mit 70 % Ethanol gereinigt. Nach dem Stickstoffaufschluss erfolgte eine zehnminütige Zentrifugation der Suspension bei 2000 rpm und 4 °C. Durch diese konnte die Zellmembran von den restlichen Zellbestandteilen getrennt werden. Der Überstand enthielt die Membranproteine und wurde für die anschließende Ultrazentrifugation vorbereitet. Dafür war es notwendig, dass die Zellsuspension vorher mit einer Genauigkeit von maximal 0,005 g in zwei Zentrifugenröhrchen eingewogen wurde. Die Ultrazentrifugation erfolgte für eine Stunde bei 27000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde vorsichtig mit einem Zellschaber vom Zentrifugenröhrchen gelöst und mittels Spritze und Kanüle (23 bis 27 Gauge) durch mehrfaches Aufziehen und Entleeren der Spritze in 200 µl TMEP resuspendiert. Dieser Vorgang wurde dann mit einer Kanüle, die um 90° gebogen war, wodurch die Scherkräfte erhöht wurden, mehrfach wiederholt, um eine homogenere Suspension zu erhalten. Anschließend wurde die Kanüle mit einem geringeren Durchmesser gewählt und das gleiche Prinzip angewandt. Die Suspension mit der Membranpräparation wurde bis zum erneuten Gebrauch bei -80 °C gelagert.

Abbildung 3: Cavitator-System.
Das Cavitator-System diente dem Zellaufschluss. Das rechte Ventil dient der Stickstoffzufuhr, das linke leitet nach dem Aufschluss die Membransuspension in einen Messkolben. Ein Manometer gibt den Druck im Innern des Gefäßes an.

4.3 Bestimmung des Proteingehalts mittels Bicinchoninsäure (BCA)

Zu Beginn des Assays wurde der TMEP-Puffer frisch hergestellt. Wenn die Proteinbestimmung direkt im Anschluss an die Membranpräparation erfolgte, war es möglich, auch den zuvor hergestellten Puffer zu benutzen. Aus diesem wurden 1200 µl einer 1:10 Verdünnung hergestellt. Verdünnt wurde mit bidestilliertem Wasser. Als nächstes wurde eine Verdünnungsreihe für den Protein-Standard erstellt. Dazu wurden 2 mg/ml des Albumin-Standards in sieben 1:2 Verdünnungsstufen bis auf 0,031255 mg/ml mit 1:10 TMEP-Puffer verdünnt.

Das Assay sollte eine vierfache Bestimmung der Messungen ergeben. Dazu wurden 25 µl jeder Albumin-Standard-Verdünnungsstufe in vier Wells einer 96-Mikrowellplatte pipettiert. In eine Viererreihe wurden 25 µl der 1:10 TMEP-Verdünnung als Blank gegeben. Aus dem BCA-Assay-Kit wurde aus 10 ml Lösung A und 200 µl Lösung B die Farbreaktionsmischung erstellt. Je vier Wells wurden mit 25 µl der Proteinprobe und vier Wells mit 25 µl einer 1:2 verdünnten Proteinprobe gefüllt. Für die Farbreaktion wurden 200 µl der hergestellten Kitmischung in jedes Well pipettiert. Anschließend erfolgte eine dreißigminütige Inkubation bei 37 °C. Mit einem Tecan-Fotometer wurde die Absorption bei 560 nm gemessen. Je nach Proteingehalt der Lösung wurde die Membranstammlösung so aliquotiert, dass in jedem ATPase Test ein Aliquot verwendet werden konnte. Dies ermöglichte die Schonung der Zellmembran, da vielfaches Auftauen und Einfrieren der Membran die Proteine negativ beeinflusst.

4.4 Identifizierung des Proteins mittels Western Blot

Gelelektrophorese

In Vorbereitung auf die Gelelektrophorese war es nötig, die Gelelektrophoresekammer aufzubauen. Dabei musste auf Reinheit der Glasscheiben geachtet werden. Die zusammengebaute Glaskammer wurde sorgfältig in die Apparatur geklemmt, sodass die Unterseite luftdicht verschlossen war (Abb. 4).

Im nächsten Schritt wurde unter Beachtung der Reihenfolge das Trenngel angesetzt. Durch leichtes Schwenken des Gefäßes und resuspendieren der Lösung wurde die Flüssigkeit vermischt. Fünf ml der hergestellten Flüssigkeit wurden in jede Kammer pipettiert. Anschließend wurde das Gel mit Isopropanol beschichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Das Gel polymerisierte für ca. 2 h.

In einem weiteren Schritt wurde das Sammelgel angesetzt. Auch dabei war es wichtig, die Reihenfolge der zugegebenen Substanzen zu beachten. Leichtes Schwenken und eine Resuspension mit der Pipette ermöglichten auch hier eine gute Durchmischung. Nachdem das Isopropanol vorsichtig vom Trenngel abgenommen worden war, wurde das Sammelgel in die Kammer gegossen. Um im Sammelgel die Proben auftragen zu können, wurde ein präparativer Kamm in das noch flüssige Gel eingesetzt. Die Trockenzeit für das Gel betrug ca. 1 h. Im Anschluss wurde der Zwischenraum der Glaskammern sowie die Wanne der Apparatur mit Elektrophoresepuffer befüllt. Nach der Entnahme des Kammes wurden die Proben aufgetragen. Um die Testsubstanzen vorzubereiten wurde 1 ml 2x Ladepuffer mit 2 µl ß-Mercaptoethanol versetzt. Die Proben wurden je nach gewünschter Proteinmenge 1:2 mit dem zubereiteten 2x Ladepuffer verdünnt. Im Anschluss wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Dabei war darauf zu achten, dass für die Elektrophorese maximal 40 µl in eine Geltasche aufgetragen werden können. In die linke und rechte Tasche des Gels wurde 12 µl des Prestained Protein Markers bzw. 10 µl des Biotinylated Ladders aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 150 V für 60-90 Minuten, bis die Farbfront vollständig durch das Gel gelaufen war.

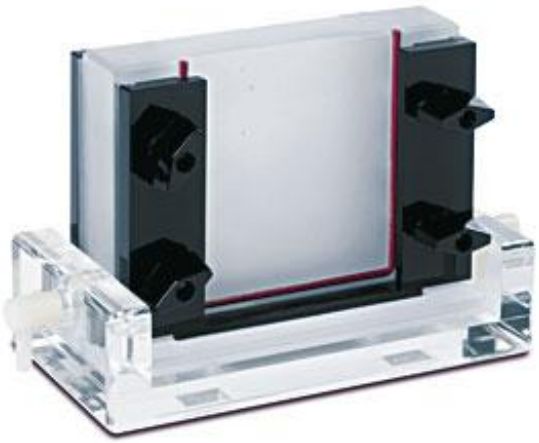


Abbildung 4: Gelelektrophoresekammer (URL-15).
An die Gelelektrophoresekammer wurde beidseitig eine Gelkammer geklemmt. Dabei musste besonders darauf geachtet werden, dass die Glasplatten der Gelkammer mit den an der Apparatur befindlichen Gummiriemen abschließen, um ein Auslaufen des anfangs flüssigen Trenngels zu verhindern. An den auf der Abbildung zu sehenden Schraubverschlüssen wurde die Gelkammer anschließend fest gespannt.

Western Blot

Pro Gel wurden vier Stück Blottingpapier und ein Stück Nitrocellulosemembran auf die Größe des Gels zugeschnitten und in 1x Transferpuffer in kühler Umgebung inkubiert.

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gelkammern ausgebaut und vorsichtig vom Gel gelöst. Das Sammelgel wurde mit dem Skalpell abgenommen. Das Trenngel wurde in kühlem Transferpuffer getränkt. Für den Proteintransfer vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran wurde ein „Sandwich“ bestehend aus zwei Stück Blottingpapier, der Nitrozellulosemembran, dem Gel und erneut zwei Stück Blottingpapier in genannter Reihenfolge auf die Anodenseite des Semi Dry Blot-Gerätes geschichtet (Abb. 5). Der Deckel mit der integrierten Kathode wurde aufgesetzt und der Blottinglauf wurde für 1,5 h bei 10 V durchgeführt. Durch die Anordnung des Blottingsandwiches erlaubt das senkrecht zum Blottingsandwich gerichtete elektrische Feld einen Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran.

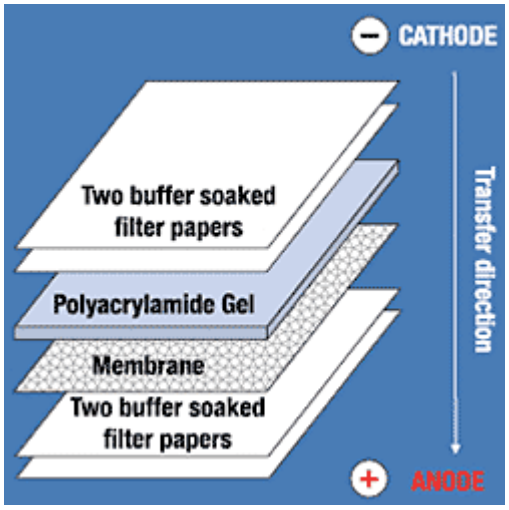


Abbildung 5: Anordnung der Bestandteile im Western Blot (URL-17).
Die Abbildung beschreibt die Reihenfolge des Blottingsandwiches im Western Blot. Der Strom läuft in Richtung der Anode, weswegen die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen werden können.

Untersuchung der Membran mittels Antikörper

Für die Antikörperdetektion wurden die Antikörper-Lösungen hergestellt. Je 11 ml TBS-T/blocking agent-Lösung wurden für die Primärantikörperlösung mit 22 µl des P-gp-spezifischen C219-Antikörpers (AK) (Verdünnungsfaktor (VF) 1:500) und für die Sekundärantikörperlösung mit 5,5 µl des Ziege-anti-Maus IgG-HRP-Antikörpers (VF 1:2000) und 3,3 µl Antibiotin AK (VF 1:333) versetzt. Über Nacht wurde die Membran in einen Western-Blot-Roboter gelegt und mit den Antikörpern inkubiert. Der Roboter funktionierte vollautomatisch und übernahm auch die Waschschritte mit TBS-T. Die Proteine wurden mit Hilfe des FluorChem 8900-Abbildungssystems visualisiert. Dazu wurde die Membran mit einer Pinzette auf eine Saranfolie gegeben und für fünf Minuten mit einer Lösung aus 500 µl Lösung A und 500 µl Lösung B des Western Blot-Kits im Dunkeln inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen und das Bild mit dem verwendeten Programm FluorChem 8900 erstellt.
Die Membran wurde im Anschluss in Saranfolie gepackt und bei -20 °C eingefroren. So war es möglich, sie für erneute Antikörperbehandlungen zu verwenden.

4.5 ATPase-Test

In den folgenden Abschnitten werden die Bestandteile des Tests erläutert. Dabei wird auf die Wahl der Testsubstanzen, die Durchführung des Assays und auf die Zusammensetzung der Kontrollen eingegangen.

4.5.1 Testsubstanzen

Gemäß dem Ziel der Arbeit stand eine Reihe von synthetischen Duftstoff-Verbindungen zur Verfügung. Um synthetische Moschusduftstoffe mit anderen synthetischen Duftstoffen zu vergleichen, wurden aus jeder Gruppe drei Verbindungen gewählt. Als Vertreter der Moschusduftstoffe wurde Moschus-Keton, Tonalid und Celestolid gewählt. (S)-(-)-Limonen, Citronellol und Linalool wurden als Vertreter der weiteren Duftstoffe ausgewählt. Die verwendeten Duftstoffe wurden bereits in Kapitel 1.5 „Untersuchte Duftstoffe“ genau beschrieben. Als Modell-Substrat diente Verapamil, als Modell-Inhibitor für die Inhibierungstests diente das Minipeptid Cyclosporin A (CsA).

4.5.2 Durchführung des Assays

Das Protokoll des ATPase-Assays entstammt dem PREDEASY™ ATPase Kit Assay Protocol von SOLVO Biotechnologie (Solvo, 2007). Dieses Protokoll dient als Standard für Untersuchungen von menschlichem P-gp und wurde für die Assays mit rekombinantem P-gp des Zebrabärblings abgeändert.

Es ist notwendig, in jedem Test Kontrollen mitzuführen, welche eine Aussage über die Baseline-Aktivität der ATPase ohne Testsubstanz ermöglichen können. Neben Proben der Gesamtaktivität, der Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)-insensitiven ATPase-Aktivität und der Baseline-Aktivität, wurde in jedem Test eine Reihe an Phosphatkonzentrationen für eine Kalibriergerade mitgeführt. Getestet wurde mit 5 µg Protein pro Well. Jeder Batch einer Membranpräparation wurde zuvor mit Verapamil verifiziert. Die P-gp-ATPase wurde auf die bei den Grundlagen erläuterten Duftstoffe Moschus-Keton, Tonalid und Celestolid sowie Linalool, (S)-(-)-Limonen und Citronellol getestet. In den Versuchen wurde stets Membran des selben Membranbatches, verwendet, wodurch in jedem Test gleiche Bedingungen hinsichtlich der Membran gewährleistet werden konnten.

Die Experimente wurden unter Verwendung einer 96-Well-Platte durchgeführt. Es war nötig, die 96-Wellplatte während der gesamten Bearbeitungszeit auf Eis zu lagern, um das Protein nicht durch Denaturierungsprozesse zu zerstören.

<u>Vorbereitung der Proben</u>

In Vorbereitung auf den Test wurden Verdünnungsreihen der zu testenden Substanzen hergestellt. Dabei wurde Methanol als Lösungsmittel verwendet. Acht Stufen einer dreifachen

Verdünnung wurden angesetzt, so konnte ein breites Konzentrationsspektrum von 200 µM bis 0,09 µM im Well erreicht werden.

Pipettierung der Substanzen in die Wells

Zu Beginn wurden 10 ml Assaymix hergestellt. 40 µl des Assaymixes wurden in die Wells für die Phosphatkalibrierung pipettiert (B-F 1-3). Anschließend wurden 10 µl der Phosphatstandards verschiedener Konzentrationen in die dafür vorgesehenen Wells gegeben. In die Blankowells, die Wells mit einer Phosphatkonzentration von 0 nmol/µl, wurde 10 µl bidestilliertes Wasser pipettiert. Für die Herstellung der MgATP-Lösung wurde 1750 µl Assaymix und 250 µl 0,2 molares MgATP in ein 2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert. Die entstandenen 2000 µl der Mg-ATP-Lösung wurden dann auf einen 8-er Strip verteilt. Für die Herstellung der Membranlösung war es nötig, einen Mix aus Assaymix und Membranprotein-stammlösung zu erstellen. Die hergestellte Membranlösung entsprach einer Proteinkonzentration von 0,125 µg/µl. Dafür wurde vor dem Versuch die einzusetzende Menge an Proteinlösung errechnet, um den gewünschten Proteingehalt von 5 µg im Well zu erhalten. Jeweils 2000 µl der Membranproteinlösung wurden in zwei Eppendorfgefäße pipettiert. Um die aktivierte Membranlösung herzustellen, wurden 5 µl 20 mM Verapamil in das erste Eppendorfgefäß pipettiert. In das zweite Eppendorfgefäß wurden dagegen 5 µl Methanol gegeben, um die nicht aktivierte Membranlösung herzustellen. Die entstandene nicht aktivierte Membranlösung wurde nun auf zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt. Kontrolle 1 enthielt 1000 µl der Basislösung und 2,5 µl bidestilliertes Wasser, Kontrolle 2 enthielt 100 µl der Basislösung und 2,5 µl 60 mM Na_3VO_4. Auch die aktivierte Membranlösung wurde aufgeteilt. Für Kontrolle 3 wurden zu 1000 µl aktivierter Membranlösung auch hier 2,5 µl bidestilliertes Wasser gegeben und für Kontrolle 4 wurden zu 1000 µl aktivierter Membranlösung 2,5 µl 60 mM Na_3VO_4 pipettiert. Im Anschluss wurden 40 µl der hergestellten Kontrollen in die entsprechenden Wells pipettiert. Die Wells A-H 5-6 und G 1-3 sollten Kontrolle 1 enthalten. Well A-H 7-8 und H 1-3 sollte Kontrolle 2 enthalten (Abb. 6). Die Wells A-H 9-10, A-C 4 und G-H 4 sollten Kontrolle 3 enthalten und die Wells A-H 11-12 sowie D-F 4 waren für Kontrolle 4 bestimmt. Im nächsten Schritt wurde in die Wells A-H 9-12 1 µl Testsubstanz in verschiedenen Konzentrationen pipettiert. Die Aufteilung erfolgte so, dass je Konzentration und Membranlösung eine Zweifachbestimmung erfolgte. In die Wells, die für die Kontrollen 1-4 vorgesehen waren (G-H 1-3 und A-F 4) wurde 1 µl Methanol gegeben. Zudem wurde in den Wells G-H 4 Kontrolle 5 angelegt, dort wurde 1 µl CsA hinzu pipettiert. In allen Wells war so ein gleiches Reaktionsvolumen vorhanden. Nach der

Pipettierung der Testsubstanzen und der Kontrollen wurde die gesamte 96-Well-Platte für 1 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert. So wurde sichergestellt, dass alle Substanzen und die Membran am Boden der Wells aufeinandertreffen. Im Anschluss erfolgte eine fünfminütige Vorinkubation der Wellplatte und des hergestellten MgATP-Mixes im Wasserbad bei 27 °C. Durch Zugabe von 10 µl der MgATP-Lösung pro Well wurde die Reaktion gestartet. Zu beachten war, dass den Wells der Phosphatkalibrierung kein MgATP mehr zugefügt wurde. Der Einsatz einer Mehrkanalpipette beschleunigte den Vorgang der Pipettierung. Danach erfolgte eine 40 minütige Inkubation im Wasserbad bei 27 °C. Das Detektionsreagens wurde bei jedem Versuch frisch hergestellt. Dieses bestand aus 15 ml einer ebenso frisch hergestellten 10 % Ascorbinsäurelösung mit dem pH-Wert von 5,0 und 5 ml 35 mM Ammoniummolybdat-Tetrahydrat in 15 mM Zinkacetat. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 µl 5 % SDS pro Well gestoppt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl des hergestellten Detektionsreagens. Durch die hervorgerufene Farbreaktion wurde das anorganische Phosphat in den Wells quantitativ bestimmt. Nach 25 min der Farbentwicklung bei 37 °C wurde die Phosphatmenge bei einer Wellenlänge von 750 nm photometrisch bestimmt. Alle Versuche mit verschiedenen Testsubstanzen wurden drei Mal durchgeführt, dabei wurde jeweils eine Zweifachbestimmung der Daten erhalten.

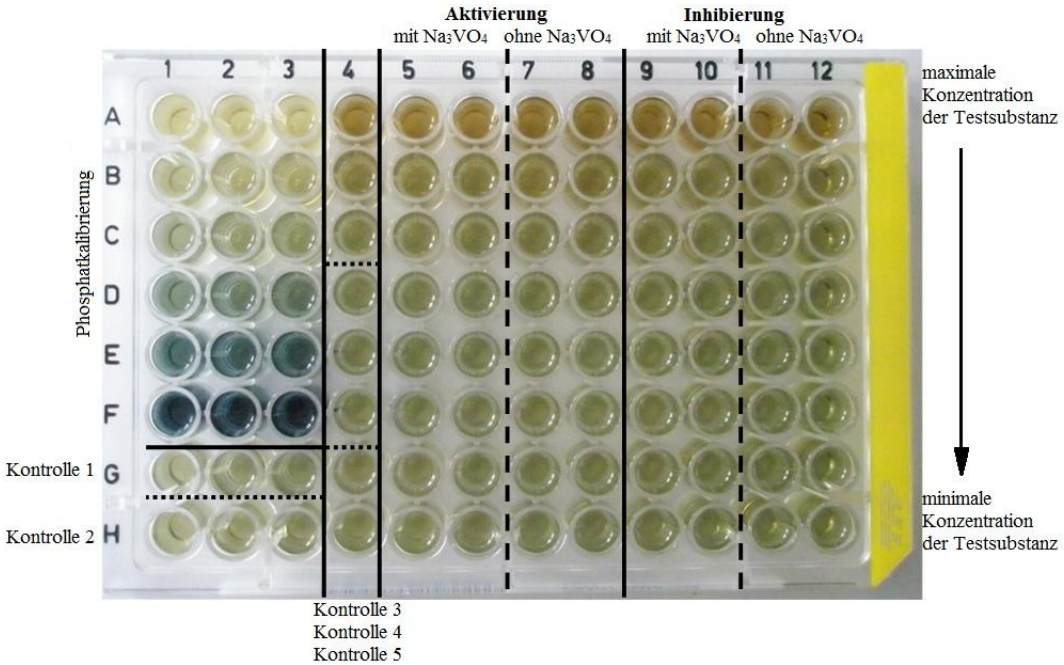


Abbildung 6: Aufteilung der 96-Wellplatte.

Die Wells A-F 1-3 wurden für die Kalibrierkurve der Phosphatstandards genutzt. G 1-3 enthielt Kontrolle 1, H 1-3 Kontrolle 2, A-C 4 Kontrolle 3, D-F 4 Kontrolle 4 und G-H 4 enthielt Kontrolllösung 5. In die Kontrollen 1-4 wurde an Stelle der Testsubstanz Methanol pipettiert, in Kontrolle 5 1 µl CsA. Die Wells A-H 5-8 enthielten die inaktivierte Membran, Wells A-H 9-12 enthielt die mit Verapamil stimulierte Membran. Die Konzentration der zugegebenen Testsubstanz, nahm von Zeile A bis Zeile H ab.

4.5.3 Kontrollen

Im Folgenden sind die Bestandteile der Kontrollen nochmals einzeln aufgeführt. In allen fünf Kontrollen befanden sich 10 µl MgATP-Lösung, 40 µl SDS und 200 µl Detektionsreagens.

Kontrolle 1: Kontrolle 1 bestand zudem aus 40 µl Membranmix ohne Na_3VO_4 und 1 µl Methanol. Anorganisches Phosphat, was hier gemessen wird, besteht aus den Komponenten Phosphatkontaminationen, nicht transporterspezifische Phosphatfreisetzung und der Hintergrundaktivität des Enzyms.

Kontrolle 2: Diese bestand aus 40 µl Membranmix, dem Na_3VO_4 zugesetzt wurde, sowie 1 µl Methanol. Das Na_3VO_4 ist ein spezifischer Inhibitor der P-gp-ATPase. Durch das Vorhandensein von Na_3VO_4 in dieser Kontrolle werden die Na_3VO_4-insensitive ATPase Enzymaktivität und eine mögliche Phosphatkontamination angegeben.

Kontrolle 3: Hier wurde der Membranmix zusätzlich mit Verapamil angereichert. Zu 40 µl Membranmix wurde 1 µl Methanol pipettiert. Der Referenzstimulator Verapamil aktiviert die Membran in der Lösung, so kann diese Kontrolle zur Berechnung der Positivkontrolle einer stimulierten Membran dienen.

Kontrolle 4: Auch hier wurde eine mit Verapamil angereicherte Membranlösung verwendet. Dieser wurde zudem der Inhibitor Na_3VO_4 zugesetzt, sodass wieder Phosphatkontaminationen und nicht transporterspezifische ATPase-Aktivität gemessen werden. In den Wells dieser Kontrolle befinden sich 40 µl Membranmix und 1 µl Methanol. Diese Kontrolle bestimmt die Na_3VO_4-insensitive ATPase-Aktivität einer stimulierten Membran und wird für die Untersuchung der Inhibition genutzt.

Kontrolle 5: Zu 40 µl einer mit Verapamil aktivierten Membranlösung wurde 1 µl CsA pipettiert. Das Minipeptid Cyclosporin A dient hier als Referenzinhibitor. Die Kontrolle zeigt, inwieweit die voll aktivierte ATPase-Aktivität von einem bekannten Inhibitor tatsächlich gehemmt wird.

Die Baseline-Aktivität wurde durch Subtraktion der Kontrolle 2 von Kontrolle 1 errechnet.
Die maximale ATPase-Aktivität, die durch eine Substanz stimuliert werden kann, wurde durch Subtraktion der Kontrolle 4 von Kontrolle 3 abzüglich der Baseline-Aktivität berechnet.

Der erhaltene Wert diente als Positivkontrolle einer stimulierten Membran. Die gehemmte Na_3VO_4–sensitive ATPase-Aktivität, also die Positivkontrollen einer Inhibition berechnete sich durch die Subtraktion der Kontrolle 4 von Kontrolle 5.

4.6 Datenauswertung

BCA-Assay

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mittels Microsoft Excel. Um die Proteinkonzentration in der Probe bestimmen zu können, war es zunächst nötig, eine Standardkurve für den Albumin-Standard zu erstellen. Die aus der Regression erhaltene Gleichung wurde genutzt, um die Proteinkonzentration der unbekannten Probe zu bestimmen.

ATPase-Assay

Eine Ermittlung der P-gp-ATPase-Aktivität in den Membranpräparationen ist nicht direkt möglich, weil neben P-gp andere aktive ATPasen in den Membranen enthalten sind. Um die durch die P-gp-ATPase-Aktivität entstandene Phosphatmenge zu bestimmen, wurde die Aktivität aller ATPasen (Ansatz ohne Natriumorthovanadat) und die der ATPasen außer P-gp (Ansätze mit Natriumorthovanadat) quantifiziert. Die Differenz der Pi-Mengen aus den Ansätzen ohne und mit Natriumorthovanadat ergibt dann die P- gp-ATPase-Aktivität.

Zunächst wurden für alle auf der 96-Wellplatte enthaltenen Duplikate und Triplikate die Mittelwerte bestimmt. Aus den Konzentrationen der Phosphatstandards wurde eine Regressionsgleichung ermittelt. Diese diente im nächsten Schritt der Phosphatbestimmung in den Membranlösungen und den Kontrollen 1-5.

Um die Menge des freigesetzten anorganischen Phosphats für die Na_3VO_4-sensitive ATPase-Aktivität zu erhalten, wurde die berechnete Phosphatmenge der Na_3VO_4-insensitiven ATPase-Aktivität von der Menge der Gesamtaktivität abgezogen, dies gilt auch für die ermittelten Phosphatmengen der aktivierten Membranlösungen.

Der folgende Schritt lag in der Berechnung der ATPase-Aktivität. Diese besteht aus der freigesetzten Phosphatmenge des P-gps pro Milligramm eingesetzter Proteinprobe und Reaktionszeit. Die Berechnung erfolgte anhand der folgenden Formel:

$$\text{ATPase} - \text{Aktivität} = \frac{\frac{n}{t}}{m} \cdot \text{VF} \ .$$

Dabei ist n die Stoffmenge, t die Zeit, m die verwendete Proteinmasse und VF die Abkürzung für Verdünnungsfaktor. Die ATPase–Aktivität wird in nmol anorganischem Phosphat pro

Minute pro Milligramm eingesetztem Protein angegeben (nmol Pi/min/mg Protein). Die Auswertung des ATPase-Assays erfolgte mit Microsoft-Excel.

5. Ergebnisse

Das folgende Kapitel gliedert sich in drei Abschnitte. Zunächst wird das Ergebnis der im BCA-Assay erhaltenen Proteinbestimmung beschrieben. Im zweiten Abschnitt werden die Ergebnisse des Western Blots dargestellt. Anschließend folgt eine Beschreibung der im ATPase-Test gewonnenen Resultate. Dabei wird zuerst auf die Phosphatkalibrierung eingegangen, dann werden die Kurvenverläufe für eine Aktivierung und eine Inhibierung der ATPase-Aktivität erläutert. Anschließend erfolgt die Beschreibung der Ergebnisse der Aktivierungstests mit dem Modell-Substrat Verapamil und schließlich werden die Ergebnisse beschrieben, die mit den Testsubstanzen erhalten wurden.

5.1 BCA-Proteinbestimmung

Abbildung 7 stellt die im BCA-Proteinbestimmungsverfahren erhaltene Proteinkalibriergerade dar. Die durch das Fotometer bei 560 nm ermittelte optische Dichte (OD) ist in Abhängigkeit der Proteinmenge des Albumin-Standards aufgetragen. Mit Hilfe der dazu bestimmten Geradengleichung $y = mx + n$ lässt sich die Proteinmenge in der Membranlösung feststellen. Das Bestimmtheitsmaß R^2 trifft dabei eine Aussage über die Beschreibung der Messwerte durch die erhaltene Gleichung. Ein Bestimmtheitsmaß von eins trifft die Aussage, dass die Geradengleichung die Messwerte sehr exakt beschreibt, die Werte also eine geringe Abweichung von der Geraden aufweisen. Die in diesem BCA-Assay erhaltene Geradengleichung lautet $y = 0{,}8083x + 0{,}2535$ bei einem Bestimmtheitsmaß von R^2= 0,991. Die in der Probe enthaltene Proteinkonzentration wurde durch Einsetzten der erhaltenen optischen Dichte auf 1,81 µg/µl bestimmt.

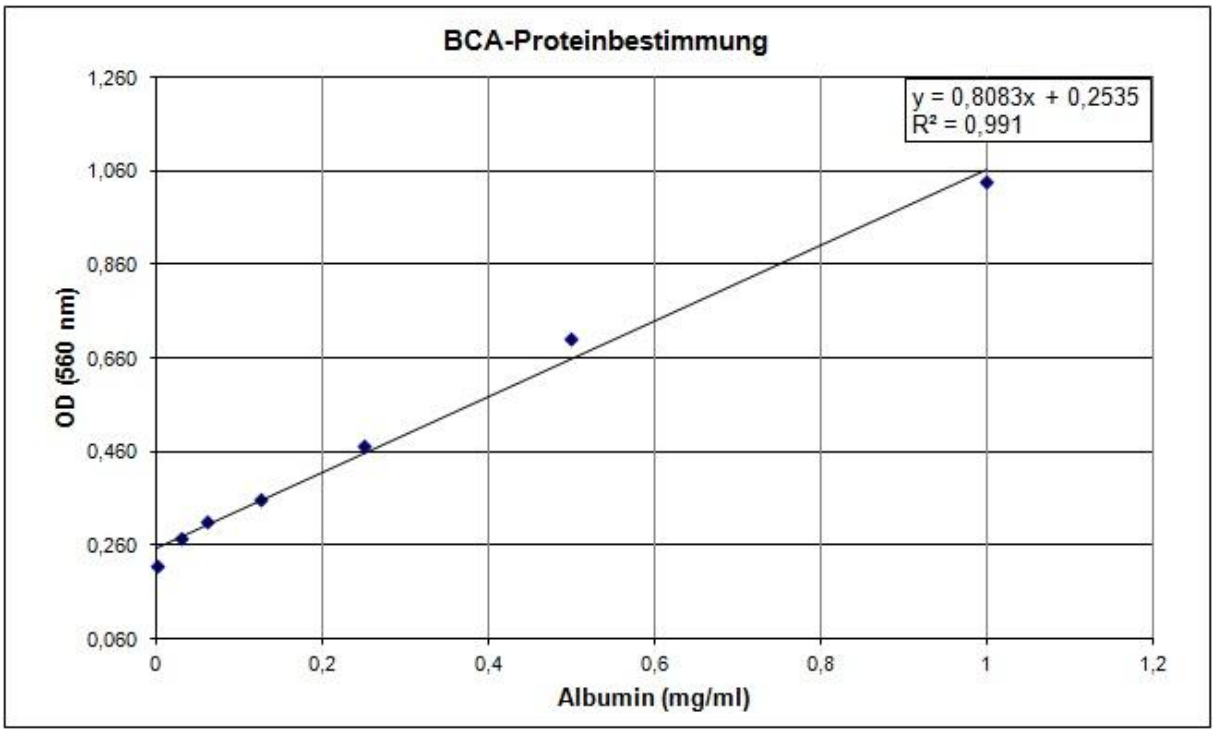


Abbildung 7: Albumin-Kalibriergerade.
Die gemessene optische Dichte in Abhängigkeit des bekannten Albumingehalts der Proben ergibt diejenige Gleichung, welche zur Bestimmung des Proteingehalts in der hergestellten Membranlösung genutzt wird.

5.2 Western Blot

In nachfolgender Abbildung sind die beim Western Blot entstandenen Proteinbanden auf der Nitrocellulosemembran zu sehen (Abb. 8). Von links nach rechts wurden verschiedene Membranbatches aufgetragen, die mit dem jeweiligen Präparationsdatum beschriftet sind. In den durchgeführten Experimenten wurde der letzte aufgetragene Batch, vom 13.08.2012, verwendet. In allen drei Banden ist das P-gp mit einer Größe von 140 kDa deutlich zu erkennen. In der Bande des Batches vom 02.07.2012 wurde eine zu große Menge an Membranprobe aufgetragen, weswegen die Banden überaus kräftig aussehen. In dieser und in der Bande vom Batch am 13.08.2012 sind neben den P-gp-Banden auch noch Proteinbanden zwischen 40 kDa und 50 kDa zu erkennen. Die Bande der Membranpräparation vom 26.07.2012 zeigt eine einzelne Bande bei ca. 140 kDa. Dies zeigt, dass die Probe keine kleineren Proteinfraktionen enthält, die das Antikörper-Epitop enthalten, sondern ausschließlich intaktes Protein.

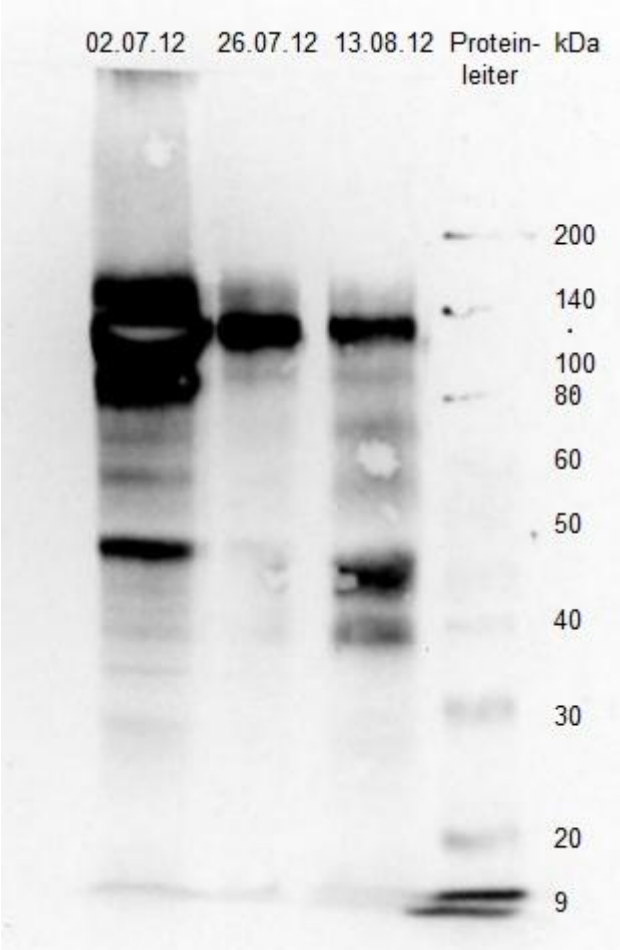


Abbildung 8: Nitrocellulosemembran nach Western Blot.
Rechts im Bild befindet sich die Proteinleiter, welche als Größenmarker dient. Aufgetragen sind verschiedene Membranbatches, welche jeweils mit dem Datum der Durchführung des Membranaufschlusses beschriftet wurden. Der Batch vom 13.08.2012 wurde für die ATPase-Tests verwendet. Die Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 140 kDa lässt sich P-gp zuordnen.

5.3 ATPase-Tests

Nachfolgend sind die in den ATPase-Tests erhaltenen Ergebnisse beschrieben. Die in jedem Test erhaltene Phosphatkalibrierung wurde dabei durch ein Beispiel repräsentiert. Anschließend werden simulierte Kurvenverläufe für eine Aktivierung und Inhibierung der ATPase-Aktivität dargestellt und erläutert. Die Ergebnisse der Versuche mit Verapamil und den synthetischen Duftstoffen konnten nicht für sich zusammengefasst werden, weswegen jedes erhaltene Diagramm dargestellt wird. Die Diagramme sind der Reihe nach beschrieben. Zur besseren Betrachtung der Daten in den niedrigeren Konzentrationsbereichen (2,46 µM – 0,09 µM) wurde in den Diagrammen die X-Achse logarithmiert. Die entstandene semilogarithmische Kurve stellt die Daten in einer gut erkennbaren Form dar. Die Aktivität der ATPase wird in der Einheit nmol Pi/min/mg Protein angegeben. In der Beschreibung der Ergebnisse wird diese mit Aktivitätseinheiten (AE) angegeben, wobei eine Einheit 1 nmol

Pi/min/mg Protein entspricht. Zudem werden in diesem Abschnitt die idealen Kurvenverläufe der ATPase-Aktivierung und Inhibierung beschrieben.

5.3.1 Phosphatbestimmung

In Abbildung 9 ist beispielhaft die erhaltene Standardkurve der Phosphatkalibrierung von einem Test mit Linalool zu sehen. Im Diagramm ist die mittels des Plattenlesegerätes bestimmte optische Dichte bei 750 nm in Abhängigkeit der Phosphatkonzentration in den jeweiligen Wells aufgetragen. Die erhaltene Geradengleichung lautet $y = 0{,}0198x + 0{,}2144$. Sie dient der Ermittlung des anorganischen Phosphatgehalts in den Wells. Das Bestimmtheitsmaß R^2 gibt an, wie gut die Gerade die Messdaten beschreibt. R^2 von eins ist dabei die bestmögliche Beschreibung.

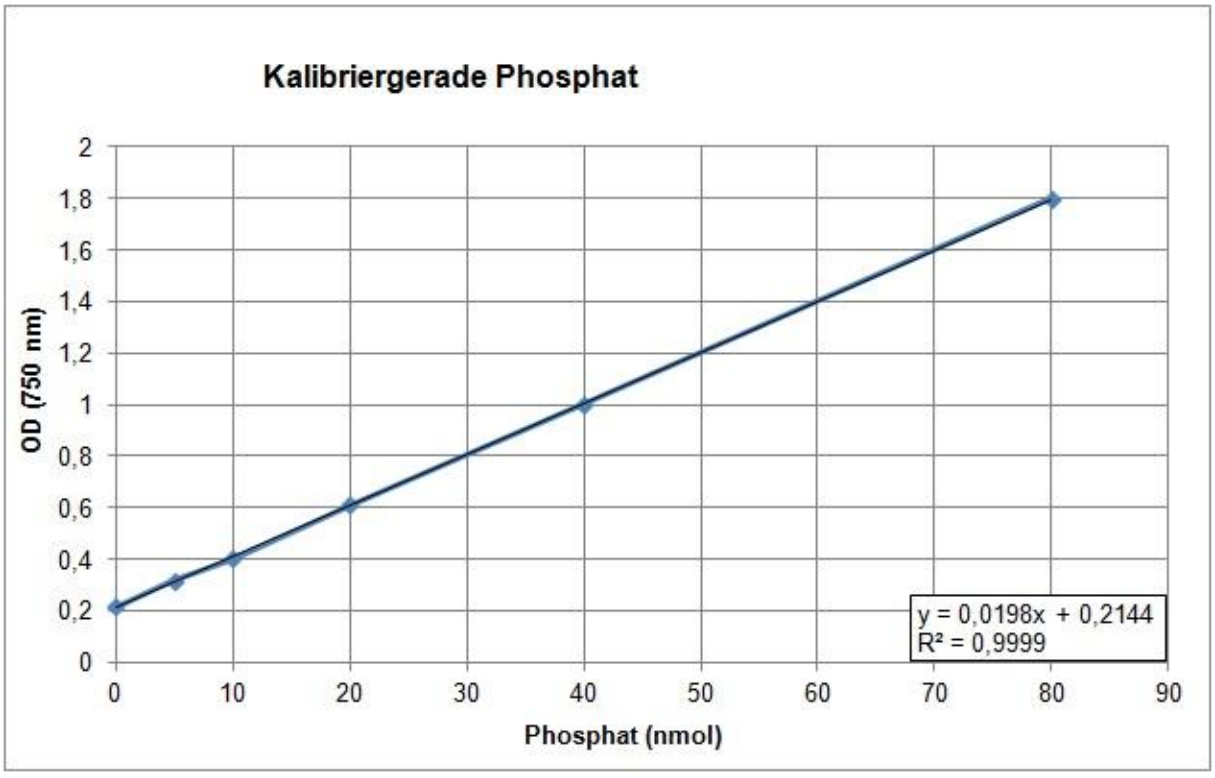


Abbildung 9: Phosphat-Kalibriergerade.
Die Abbildung zeigt beispielhaft eine der Phosphat-Regressionsgeraden, die in jedem Test durch die mitgeführte Phosphatkalibrierung neu ermittelt wurde.

5.3.2 Erläuterung der Kurvenverläufe für ATPase-Stimulation und -Inhibierung

Abbildung 10 zeigt ein Diagramm, in welchem die optimale Konstellation der Aktivitäten der ATPase simuliert wurde, wenn die ATPase eine Aktivierung bzw. Inhibierung erfährt. Im

Folgenden werden die in den Testergebnissen erhaltenen Plots hinsichtlich dieses Optimal-Graphen diskutiert und bewertet.

Zuvor wird die Konstellation der Kurven in diesem Plot begründet.

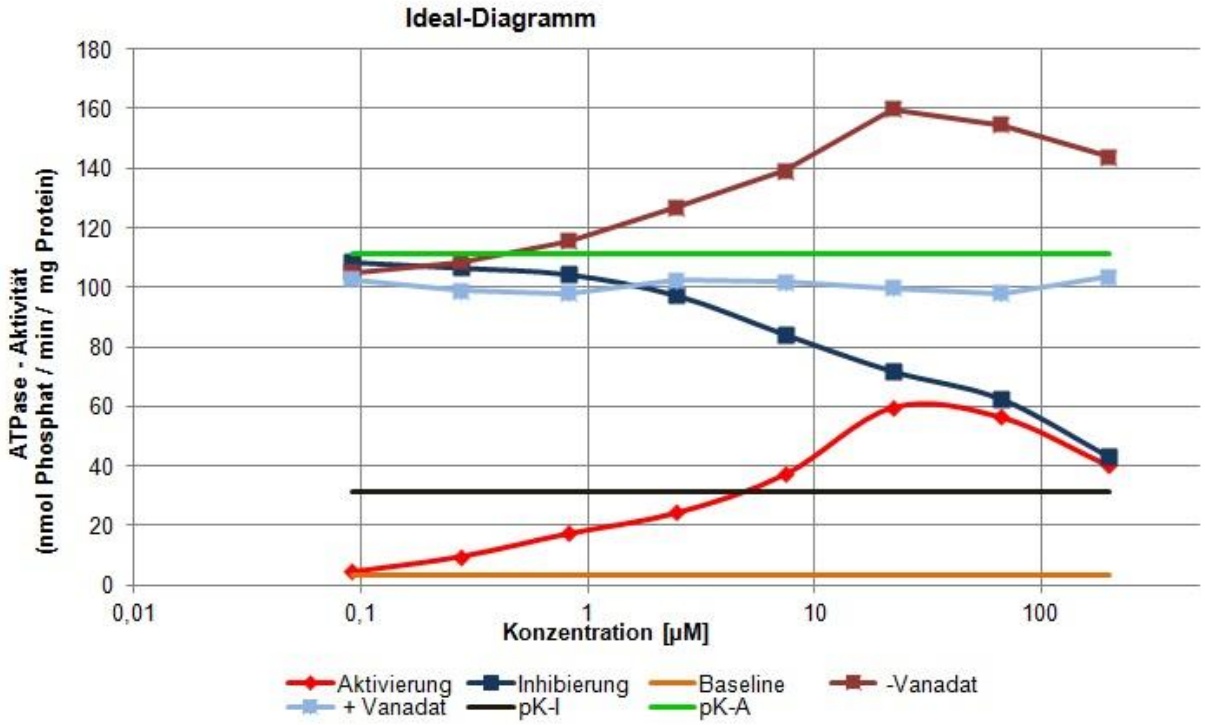


Abbildung 10: Aktivierung und Inhibierung der ATPase.
Das Diagramm zeigt den idealen Verlauf einer durch die Testsubstanz aktivierten, sowie den der inhibierten P-gp-ATPase. Dabei nimmt die ATPase-Aktivität mit steigender Substanzkonzentration zu bzw. ab. Zudem wird die Baseline-Aktivität, die Positivkontrolle für Aktivierung (pK-A) sowie diejenige für Inhibierung (pK-I) abgebildet. Die Kurve „-Vanadat" stellt die Aktivität aller ATPasen dar. Durch Zugabe von Natriumorthovanadat wurde die P-gp-ATPase gehemmt, sodass die Aktivität aller ATPasen ohne P-gp quantifiziert wurde. Dieser Verlauf wird mit der Kurve „+Vanadat" dargestellt. Die Kurve für die Aktivierung errechnet sich aus der Differenz der ATPase-Aktivitäten mit und ohne Vanadat. Für den Test auf Inhibierung wurden die ATPasen zuvor mit einem Modell-Substrat stimuliert. Der Kurvenverlauf der Inhibierung berechnet sich ebenfalls aus der Differenz der Werte mit und ohne Vanadat.

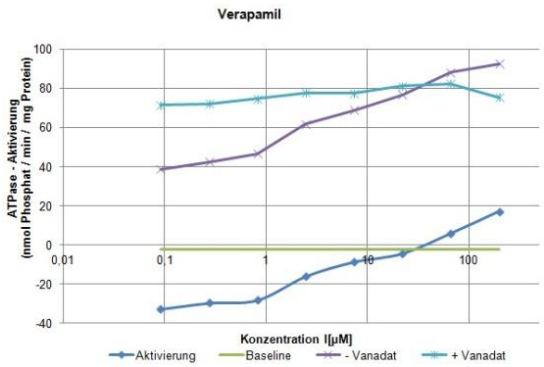
Das abgebildete Diagramm stellt den Idealverlauf der Kurven für Aktivierung und Inhibierung mitsamt der Kontrollen, der Baseline-Aktivität und der aufgesplitteten Aktivitätskurve dar. Das Zustandekommen der Werte für die Positivkontrollen und der Baseline-Aktivität wird im Abschnitt 4.5.3 Kontrollen beschrieben. Anzumerken ist, dass die hier verwendeten Werte beispielhaft gewählt wurden und in der Realität variieren können. Die im Plot dargestellten Kurven für Aktivierung und Inhibierung können im Test nicht gemeinsam einen solchen Verlauf einnehmen. Wirkt eine Substanz aktivierend auf die ATPase, dann ist im Ergebnis eine deutliche Aktivierungskurve zu erkennen, wirkt eine Substanz inhibierend auf die ATPase, so gleicht die Kurve für Inhibition der Gezeigten.

Die Baseline-Aktivität liegt in diesem Plot bei rund 4 AE. Die Kurve des Aktivierungstest zeigt einen klaren Anstieg mit steigender Konzentration an Testsubstanz. Ab einer bestimmten Konzentration, hier 22,22 µM Testsubstanz flacht die Kurve wieder ab, was mit einer Sättigung der ATPase zu begründen ist. So entsteht die typische Glockenförmige Aktivierungskurve. Die Auslenkung dieser Glockenkurve beträgt im Beispiel bis zu 60 AE.
Gut zu sehen ist, dass auch die „-Vanadat"-Kurve bis zu einer Konzentration von 22,22 µM ansteigt, bei noch höheren Konzentrationen wieder abflacht. Diese Kurve repräsentiert den gemessenen Gesamt-Phosphatgehalt im Well. Zu diesem gehören mögliche Phosphatkontaminationen, die Hintergrundaktivität der P-gp-ATPase, aber auch nicht P-gp-spezifische Phosphatfreisetzungen. Die „+Vanadat"-Kurve hingegen repräsentiert den Phosphatgehalt der im Well vorhanden ist, ohne dass P-gp aktiv ist. Das gemessene Phosphat ist hier nur auf Aktivitäten nicht P-gp-spezifischer ATPasen und auf mögliche Phosphatkontaminationen zurückzuführen. Diese Kurve verläuft entsprechend nahezu gerade, da davon ausgegangen wird, dass die Testsubstanz keine der anderen ATPasen stimuliert. Die Differenz dieser beiden Kurven führt zum Verlauf der Aktivitätskurve.
Im Diagramm ist sichtbar, dass die Positivkontrolle für Inhibierung (31 AE) über der Baseline-Aktivität, aber noch weit unter der Positivkontrolle für Aktivierung (111 AE) verläuft. Diese Werte repräsentieren die mit Verapamil maximal stimulierte ATPase und jene, die durch CsA gehemmt wurde. Die Inhibierungskurve sollte also zwischen diesen beiden Werten verlaufen. Wie im Diagramm ersichtlich, beginnt die Kurve der Inhibierung bei einem Wert, der fast der volle Aktivierung der ATPase entspricht (108 AE). Doch mit steigender Konzentration an Testsubstanz lässt auch die Aktivität des Enzyms stark nach. Bei der höchsten verwendeten Konzentration an Testsubstanz zeigt die ATPase eine so geringe Aktivität (43 AE), dass sie gerade über der Positivkontrolle für Inhibierung endet.

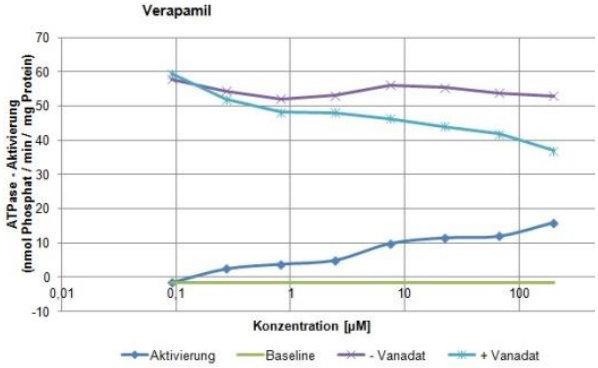
5.3.3 Tests auf Aktivierung mit Verapamil

In Abbildung 11 sind fünf Diagramme zu sehen, welche die Ergebnisse der Aktivierungstests der ATPase mit Verapamil darstellen. Dabei ist jeweils die ATPase-Aktivität in Abhängigkeit der eingesetzten Verapamil-Konzentration zu sehen. In den Tests zu den Graphen (A) und (B) wurde ein Konzentrationsspektrum von 0,09 µM bis 200 µM Verapamil, in den Tests zu den Graphen (C)-(E) wurde das Konzentrationsspektrum von 1,56 bis 400 µM Verapamil getestet. In den fünf Experimenten wurde die ATPase auf Aktivierung getestet. Dabei wurden die Kontrollen eins und zwei mitgeführt, welche für die Berechnung der Baseline-Aktivität benötigt werden.

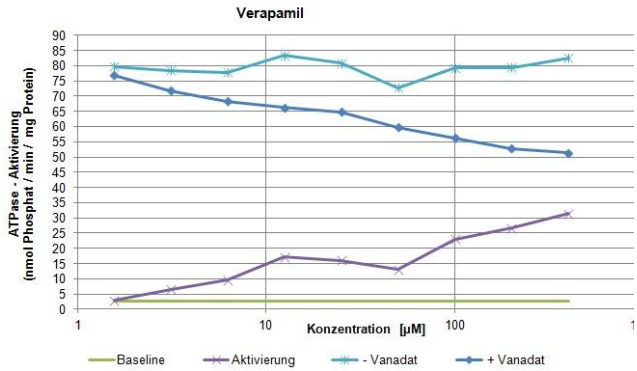
(A)



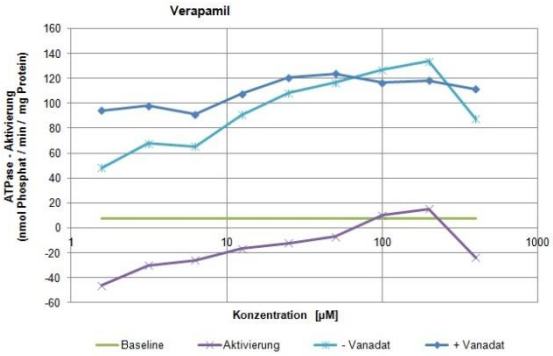
(B)



(C)



(D)



(E)

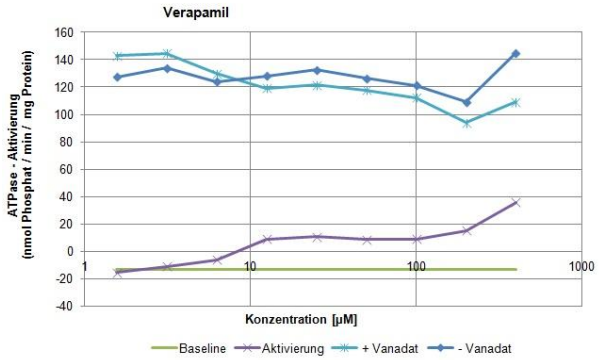


Abbildung 11: Ergebnisse der Versuche mit dem Modell-Substrat Verapamil.
Die fünf abgebildeten Graphen zeigen die Ergebnisse der Aktivierungstests mit dem Modell-Substrat Verapamil. In den Tests zu den Graphen (A) und (B) wurde versucht, bei Konzentrationen von 0,09 bis 200 µM, in den Tests der Graphen (C) bis (E) bei Konzentrationen von 1,56 µM bis 400 µM eine Stimulation der P-gp-ATPase-Aktivität zu erreichen.

Graph (A)

Die Baseline-Aktivität beträgt -2,27 AE, sie wird von der Aktivierungskurve der ATPase sogar unterschritten. Diese beginnt bei einer Konzentration von 0,09 µM Verapamil mit -32,7 AE. Im weiteren Verlauf nimmt diese mit steigender Konzentration an Verapamil zu, sodass bei 200 µM eine Aktivität von 17,21 nmol Pi/min/mg Protein zu vernehmen ist. Die „- Vanadat"-Kurve gibt die gesamte ATPase-Aktivität an. Diese steigt im selben Maße wie die

Aktivierungskurve an. Dabei nimmt sie eine Amplitude von ca. 50 nmol Pi/min/mg Protein ein. Dennoch ist zu berücksichtigen, dass die Kurve im Großteil unter der Na_3VO_4-sensitiven Aktivitätskurve liegt, welche bei 71,56 – 82,35 AE im gesamten Konzentrationsbereich eher nahezu geradlinig verläuft.

Graph (B)

Die Kurve im Test für Aktivierung beginnt bei einer Konzentration von 0,09 µM Verapamil bei -1,6 AE, was dem Maße der Baseline-Aktivität mit -1,49 AE entspricht. Mit steigender Verapamil-Konzentration im Well nimmt auch die Aktivität der ATPase zu. Bei 200 µM nimmt die Kurve ihren Höhepunkt bei 15,91 AE ein. Die Kurve, welche den Verlauf der Gesamt-ATPase-Aktivität widerspiegelt verläuft im Aktivitätsbereich von 52 bis 57,9 Einheiten, was keine Auslenkungen anzeigt. Die Kurve der sensitivierten ATPase hingegen verläuft von der niedrigsten zur höchsten eingesetzten Konzentration stetig abfallend. Ihr Verlauf beginnt bei 59,49 AE und endet bei 36,97 AE.

(C)

Auch in Graph (C) ist gut zu erkennen, wie die ATPase-Aktivität bei der Baseline-Aktivität beginnend allmählich steigt und ihr Maximum bei 200 µM Verapamil und 31,42 AE einnimmt. Die Baseline-Aktivität liegt bei 2,66 AE. Die Aktivitätsmessung der ATPase ohne Natriumorthovanadat-Zugabe nimmt Ausmaße von 72,76 AE bis 83,44 AE ein, welche nicht als größere Auslenkungen erscheinen. Die ATPase-Aktivität, welche eine Sensitivierung erfahren hat, nimmt auch in diesem Diagramm beständig ab. Der Verlauf beginnt bei 1,56 µM Verapamil nahe der „-Vanadat“-Kurve bei 76,82 AE und endet mit der höchsten Konzentration von 400 µM Verapamil im Well bei 51,3 AE.

(D)

Die Baseline-Aktivität verläuft bei 7,66 AE. Die Kurve für Aktivierung beginnt bei der niedrigsten Konzentration bei -46,04 AE, steigt mit zunehmenden Konzentrationen bis auf 15,37 AE bei 200 µM Verapamil im Well. Bis zur höchsten Verapamil-Konzentration, 400 µM, ist wieder ein starker Abfall der Aktivität auf -23,99 AE zu verzeichnen. Auffällig dabei ist, dass die Aktivierungskurve nur nahe ihres Maximums über der Baseline-Aktivität verläuft. Die nicht mit Na_3VO_4 sensitivierte ATPase nimmt einen der Aktivierungskurve ähnlichen Verlauf ein, der bei 48,2 AE beginnt und bei 87,41 AE endet. Auch diese nimmt bei einer Konzentration von 200 µM Verapamil ihr Maximum mit 133,6 AE ein. Die Kurve der

sensitivierten ATPase-Aktivität liegt bei 1,56 µM bis 6,2,5 µM Verapamil bei 94,24 AE bis 91,21 AE und steigt anschließend auf ihr Aktivitätsmaximum bei 123,67 AE bei 50 µM Verapamil an. Mit weiter zunehmenden Konzentrationen deutet die Kurve ein leichtes Absinken der Aktivität an.

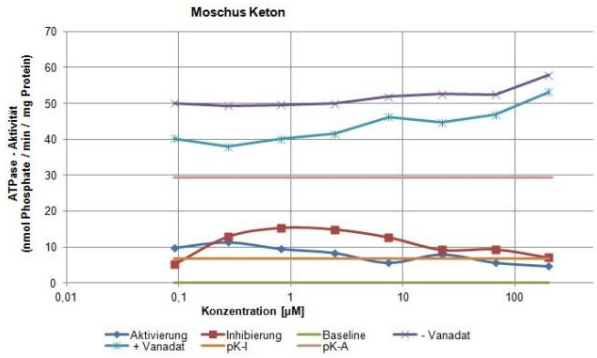
(E)

Die Baseline-Aktivität liegt bei -13,07 AE. Kurz darunter, bei -15, 53 AE beginnt die Kurve des Aktivierungstests. Diese zeigt bis zu einer Konzentration von 25 µM Verapamil einen Anstieg auf 10,86 AE und bleibt bei folgenden Konzentrationen relativ konstant. Erst ab 100 µM Verapamil setzt sich der Anstieg fort und erreicht eine maximale Aktivierung bei 35,86 AE und 400 µM Verapamil. Die Kurve, die den gesamten Phosphathaushalt im Well anzeigt schwankt fast während der gesamten Konzentrationsreihe zwischen Werten von 133,79 AE und 121,34 AE auf und ab. Bei 200 µM Verapamil im Well sinkt die Kurve bis auf ihr Minimum von 109,3 AE und steigt bis zur Konzentration von 400 µM Verapamil auf ihr Maximum von 144,89 AE an. Die Kurve, welche die mit Na_3VO_4 sensitivierte ATPase-Aktivität anzeigt sinkt bei Konzentrationen von 3,13 µM bis 200 µM Verapamil von 144,76 AE auf 94,17 AE ab.

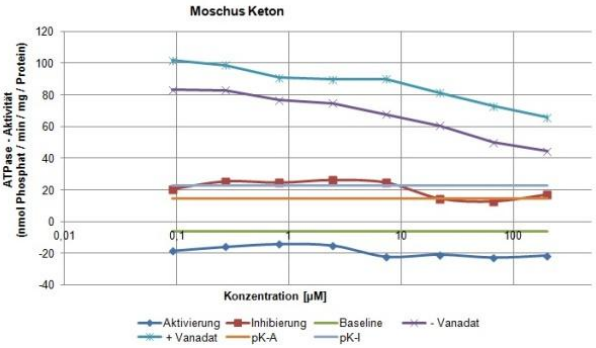
5.3.4 Ergebnisse der Tests mit synthetischen Duftstoffen

Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der durchgeführten Experimente mit den synthetischen Duftstoffen (Abb. 12). Dabei wurde stets die verwendete Konzentration der Testsubstanzen (0,09 µM – 200 µM) gegen die ATPase-Aktivität aufgetragen. Neben den Kurvenverläufen für die Tests auf Aktivierung und Inhibierung sind in den Graphen jeweils die Baseline-Aktivität, die Positivkontrolle für eine Aktivierung (pK-A), die Positivkontrolle einer Inhibierung (pK-I) sowie die Kurvenverläufe der gesamten ATPase-Aktivität (-Vanadat) und der Na_3VO_4-sensitiven ATPase-Aktivität (+Vanadat) aufgetragen. Die Diagramme sind nach Substanzen geordnet, sodass je Substanz alle drei durchgeführten Experimente nacheinander zu sehen sind (Graphen (F)-(W)). Die Graphen der Moschusduftstoffe sind zuerst dargestellt (Graph (F)-(N)), anschließend sind auch die der anderen synthetischen Duftstoffe zu sehen (Graphen (O)-(W)).

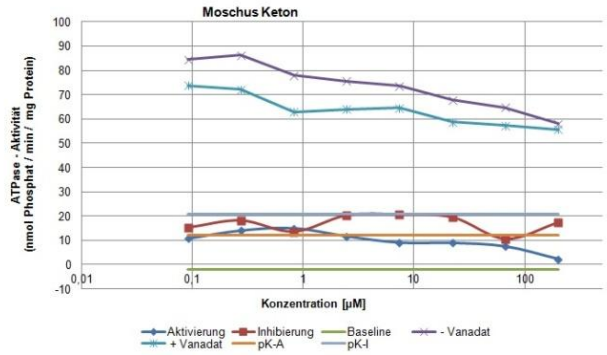
(F)


Moschus Keton
ATPase - Aktivität (nmol Phosphate / min / mg Protein)
Konzentration [µM]
Aktivierung
Inhibierung
Baseline
- Vanadat
+ Vanadat
pK-I
pK-A

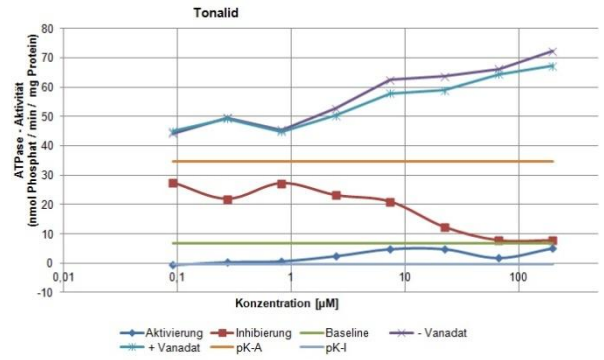
(G)


Moschus Keton
ATPase - Aktivität (nmol Phosphat / min / mg / Protein)
Konzentration [µM]
Aktivierung
Inhibierung
Baseline
- Vanadat
+ Vanadat
pK-A
pK-I

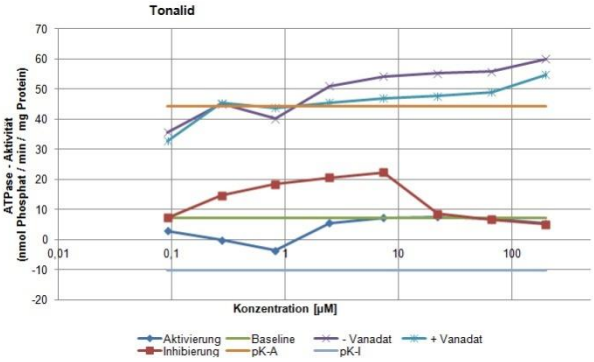
(H)


Moschus Keton
ATPase - Aktivität (nmol Phosphat / min / mg Protein)
Konzentration [µM]
Aktivierung
Inhibierung
Baseline
- Vanadat
+ Vanadat
pK-A
pK-I

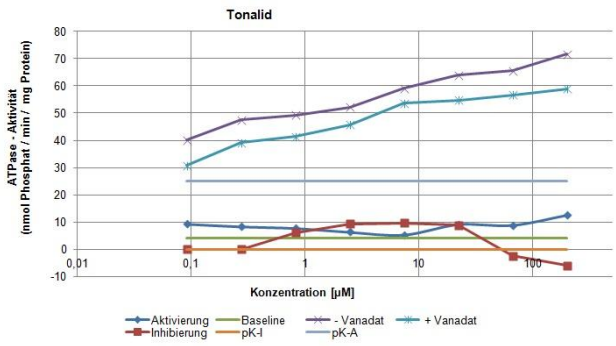
(I)


Tonalid
ATPase - Aktivität (nmol Phosphat / min / mg Protein)
Konzentration [µM]
Aktivierung
Inhibierung
Baseline
- Vanadat
+ Vanadat
pK-A
pK-I

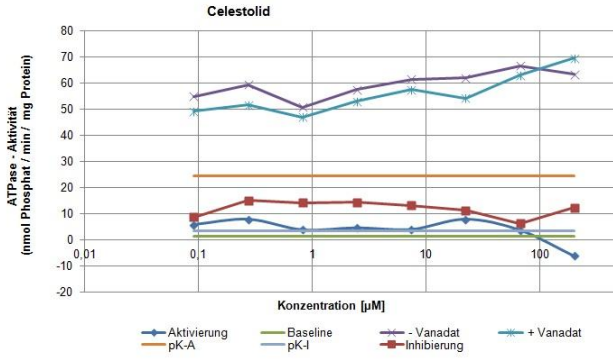
(J)


Tonalid
ATPase - Aktivität (nmol Phosphat / min / mg Protein)
Konzentration [µM]
Aktivierung
Inhibierung
Baseline
- Vanadat
+ Vanadat
pK-A
pK-I

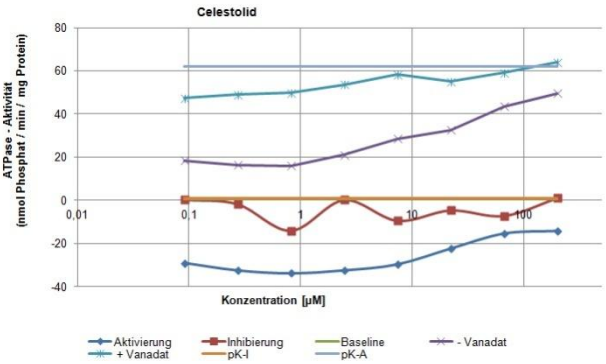
(K)


Tonalid
ATPase - Aktivität (nmol Phosphat / min / mg Protein)
Konzentration [µM]
Aktivierung
Inhibierung
Baseline
- Vanadat
+ Vanadat
pK-I
pK-A

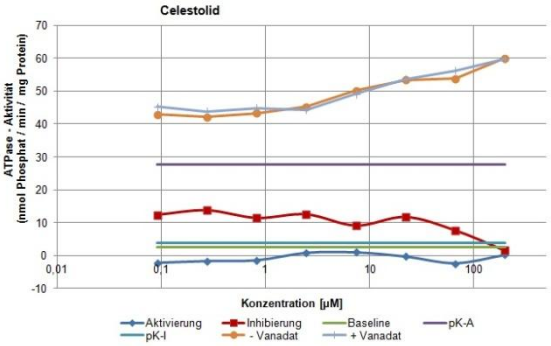
(L)


Celestolid
ATPase - Aktivität (nmol Phosphat / min / mg Protein)
Konzentration [µM]
Aktivierung
Baseline
- Vanadat
+ Vanadat
pK-A
pK-I
Inhibierung

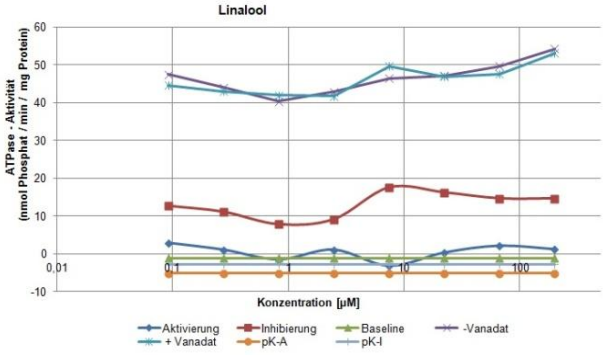
(M)


Celestolid
ATPase - Aktivität (nmol Phosphat / min / mg Protein)
Konzentration [µM]
Aktivierung
Inhibierung
Baseline
- Vanadat
+ Vanadat
pK-I
pK-A

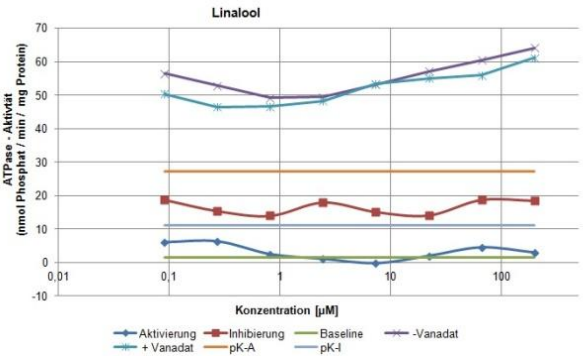
(N)


Celestolid
ATPase - Aktivität (nmol Phosphat / min / mg Protein)
Konzentration [µM]
Aktivierung
Inhibierung
Baseline
pK-A
pK-I
- Vanadat
+ Vanadat

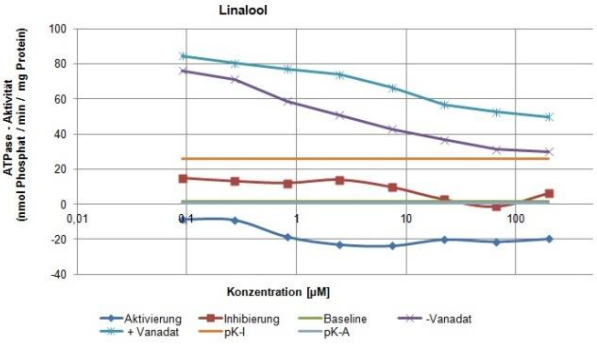
(O)


Linalool
ATPase - Aktivität (nmol Phosphat / min / mg Protein)
Konzentration [µM]
Aktivierung
Inhibierung
Baseline
-Vanadat
+ Vanadat
pK-A
pK-I

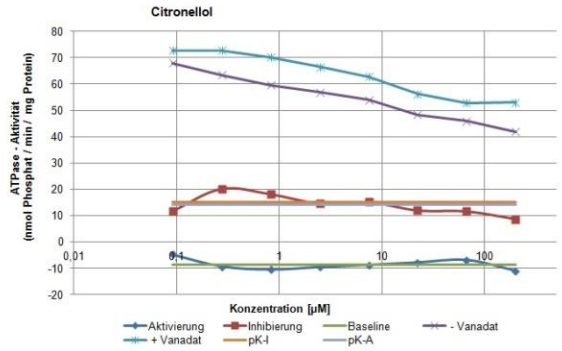
(P)


Linalool
ATPase - Aktivität (nmol Phosphat / min / mg Protein)
Konzentration [µM]
Aktivierung
Inhibierung
Baseline
-Vanadat
+ Vanadat
pK-A
pK-I

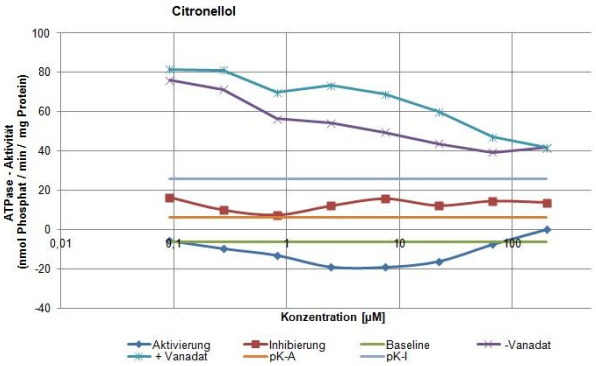
(Q)


Linalool
ATPase - Aktivität (nmol Phosphat / min / mg Protein)
Konzentration [µM]
Aktivierung
Inhibierung
Baseline
-Vanadat
+ Vanadat
pK-I
pK-A

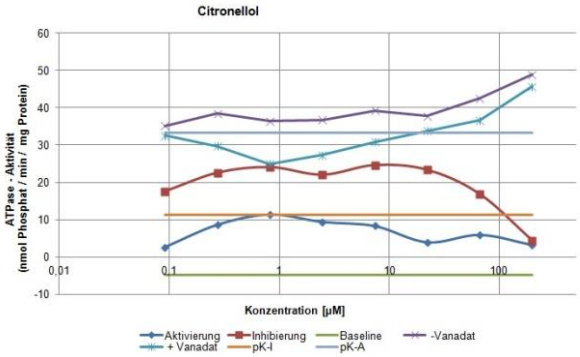
(R)



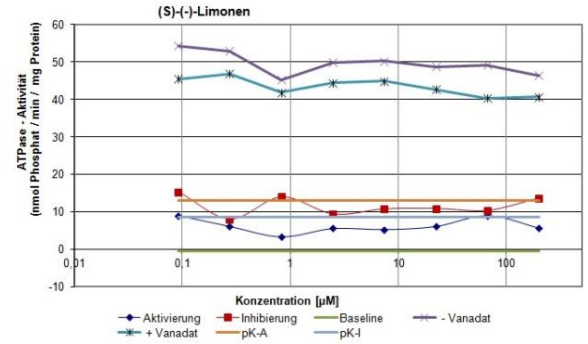
(S)



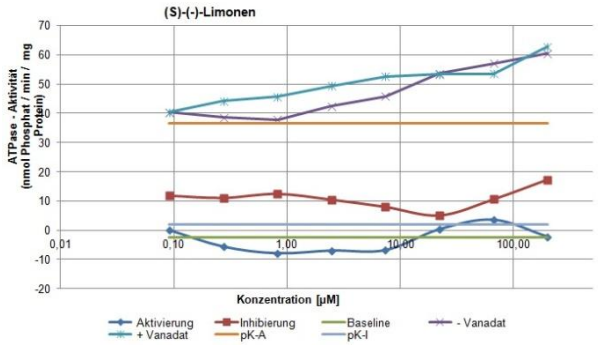
(T)



(U)



(V)



(W)

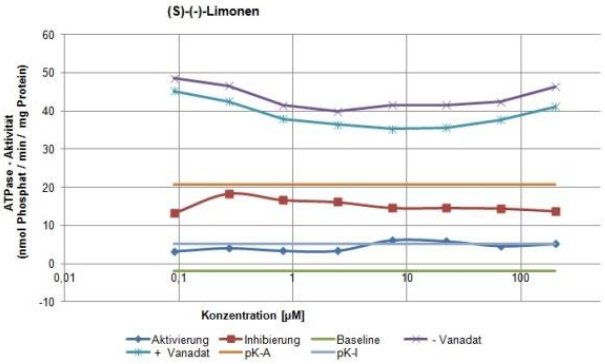


Abbildung 12: Ergebnisse der Versuche mit synthetischen Duftstoffen.
Die Abbildung zeigt die erhaltenen Ergebnisse der Versuche, eine Interaktion der P-gp-ATPase mit synthetischen Duftstoffen festzustellen.

(1) Moschusduftstoffe

Moschus-Keton (Graph (F)-(H))

Graph (F)

Die Baseline-Aktivität liegt bei 0,0963 AE. Bei 29,48 AE liegt die Positivkontrolle der Aktivierung der ATPase und bei 6,69 AE zeigt die ATPase eine vollständige Inhibierung. Die Inhibierungskurve liegt mit Werten von 5,2 AE–15,31 AE zwischen den Positivkontrollen der Aktivierung und der Inhibierung. Ab 0,82 µM Moschus-Keton ist an der Kurve eine tatsächliche Inhibierung zu erkennen, da die ATPase-Aktivität ab dieser Konzentration abnimmt. Die Kurve des Tests auf Aktivierung zeigt ein Absinken mit steigender Konzentration an Testsubstanz an. Dabei wird die Baseline-Aktivität nicht unterschritten und die maximale Aktivierung nicht überschritten. Jedoch nähert sich die Kurve der Positivkontrolle auf Inhibierung stark an. Zu erkennen ist, dass der Kurvenverlauf der Gesamtaktivität, den die Kurve „- Vanadat“ darstellt, von 0,09 µM – 66,67 µM eingesetzter Testsubstanz eine Gerade bildet. Sie bewegt sich zwischen 49,33 AE und 52,66 AE, ab 66,67 µM Moschus-Keton ist ein Anstieg zu verzeichnen. Die Na_3VO_4-sensitive Kurve steigt bei einer Aktivität von 40, 23 AE bis 53, 23 AE mit steigender Konzentration stetig an.

Graph (G)

Die Baseline-Aktivität liegt bei -6,11 AE. Zu erkennen ist, dass die Positivkontrolle der Inhibierung bei 22,78 AE noch über der für die Aktivierung (14,54 AE) liegt. Die Aktivierungs-Kurve liegt unter der Baseline-Aktivität zwischen -22, 92 AE bis -14,17 AE und zeigt keinen Anstieg. Die Kurve des Inhibierungstests überschreitet die Kurve der maximalen Inhibierung und unterschreitet die der maximalen Aktivierung. Die Kurve liegt von 0,274 – 7,41 µM Moschus-Keton bei einer Aktivität um 25 AE, sinkt aber mit höheren Konzentrationen auf 12,64 AE – 16,94 AE ab. Es lässt sich eine leichte Inhibierung vermuten. Die Kurven der Hintergrund-Aktivität und der Na_3VO_4-sensitiven ATPase-Aktivität sinken beide von 83,08 AE bzw. 101,69 AE stetig bis auf 44,33 AE bzw. 65,86 AE.

Graph (H)

Die Baseline-Aktivität liegt im negativen Bereich bei -2,14 AE. Auch hier ist zu erkennen, dass die Kurve der Aktivitätshemmung (20,99 AE) über der maximalen Aktivität liegt (12,22 AE). Dennoch liegt die Kurve des Inhibierungs-Tests bis auf bei der Konzentration von 66,66 µM Moschus-Keton zwischen diesen beiden Verläufen. Der Verlauf der Aktivitätskurve

beginnt ab 0,82 µM Moschus-Keton von 15 AE auf 2,26 AE stetig zu sinken. Auch die Kurven von Moschus-Keton ohne und mit Vanadatzusatz unterliegen einem stetigen Abfall von 86, 24 AE bzw. 73, 71 AE bis 58 AE bzw. 55,74 AE.

Tonalid (Graph (I)-(K))

Graph (I)

In Graph (I) liegt die Baseline-Aktivität mit 6,71 AE zwischen der Hemmung (-0,42 AE) und der maximalen Stimulation (34,80 AE). Die Aktivierungskurve zeigt bis zu einer Tonalid-Konzentration von 22,22 µM einen Anstieg der ATPase-Aktivität von 0,63 AE bis 4,72 AE an, die Inhibierungskurve dagegen einen Abfall von 27,2 AE bei 0,823 µM Testsubstanz bis zu 7,7 AE bei 200 µM Tonalid. Sowohl die Hintergrund-ATPase-Aktivität als auch die Na_3VO_4-sensitive ATPase-Aktivität steigen von ca. 44 AE bis 67,26 AE bzw. 72,3 AE.

Graph (J)

Auch hier liegt die Baseline-Aktivität mit 7,17 AE über der maximalen Inhibierung von -10,21 AE und unter der maximalen Stimulation von 44,13 AE. Jedoch ist deutlich zu erkennen, dass die Aktivierungskurve noch unter der Baseline-Aktivität liegt, obwohl ab einer Tonalid-Konzentration von 0,82 µM ein Anstieg der Aktivität zu verzeichnen ist. Solange die Aktivierungskurve fällt, steigt die Kurve auf Inhibierung von 7,17 AE bis 22,37 AE an. Erst ab einer Tonalid-Konzentration von 7,4 µM sinkt diese. Der Verlauf der das Natriumorthovanadat betreffenden Kurven ist miteinander vergleichbar. Beide Kurven steigen von 32,79 AE und 35,67 AE auf 54,81 AE und 60,07 AE an, wobei die „- Vanadat“-Kurve bei einer Tonalidkonzentration von 0,82 µM auf 40,1 AE sinkt, im späteren Verlauf aber noch über der „+ Vanadat“-Kurve verläuft.

Graph (K)

Die Baseline-Aktivität beträgt 4,26 AE, die maximale Hemmung -0,14 AE und die maximal mögliche Stimulation 24,94 AE. Die Aktivität der ATPase liegt im Bereich von 5,4 AE bis 12,64 AE. Eine Aktivierung liegt nicht vor. Die Kurve für Inhibierung steigt bis zu einer Tonalid-Konzentration von 7,4 µM bis auf 9,66 AE an, zeigt aber in den höheren Konzentrationen eine Inhibierung bis zu -5,97 AE. Die Kurven, die der Untersuchung des Aktivitätsverlaufes mit und ohne Na_3VO_4 dienen, zeigen erneut einen Anstieg mit zunehmender Tonalid-Konzentration. Bei der geringsten eingesetzten Konzentration (0,09

µM) beginnt deren Verlauf bei 40,17 AE und 30,8 AE und bei der höchsten Tonalidkonzentration (200 µM) erreichen sie einen Wert von 71,51 AE und 58,91 AE.

Celestolid (Graph (L)-(N))

Graph (L)

Die Baseline-Aktivität der ATPase beträgt in diesem Experiment 1,41 AE. Über der Baseline-Aktivität liegen die Geraden der ATPase-Hemmung (3,36 AE) und der maximalen ATPase-Stimulation durch Celestolid (24,38 AE). Zwischen den Positivkontrollen für Aktivierung und Inhibierung befindet sich die Kurve der Inhibierung. Diese verläuft ab den Koordinaten (0,27 µM; 15,05 AE) sinkend, eine Inhibition lässt sich ableiten. Das Ergebnis des Aktivierungstests schwankt zwischen 3 AE und 8 AE. Bei einer Celestolid-Konzentration von 200 µM erreicht diese ihr Tief bei -6,22 AE, was noch unter der maximalen Inhibierungsgerade liegt. Die Verläufe der Kurven der Gesamt-ATPase-Aktivität und der Na_3VO_4-sensitiven ATPase-Aktivität ähneln sich sehr. Diese zeigen im Allgemeinen einen Anstieg von 54,88 AE und 49,15 AE bei 0,09 µM Celestolid bis zu 66,57 AE und 69,43 AE bei 66,66 µM bzw. 200 µM Celestolid.

Graph (M)

Die Baseline-Aktivität liegt mit einer Aktivität von 1,03 nmol Pi/min/mg Protein kurv über der maximalen Inhibierung von 0,86 nmol Pi/min/mg Protein. Ihre maximale Stimulation erreicht die ATPase bei 61,95 AE, was im Plot tatsächlich beinahe die höchste Aktivität darstellt. Die Kurve des Aktivierungstests zeigt mit steigender Konzentration ab 0,82 µM eingesetzter Substanz einen Anstieg von -33,79 AE bis zu -14,31 AE bei 200 µM. Dennoch liegt der Kurvenverlauf unter der Baseline-Aktivität. Auch die Kurve des Inhibierungstests liegt unter der Baseline-Aktivität. Der Verlauf schwankt dabei in einem Intervall von -14,14 AE bis 1,03 AE. Auffallend ist in diesem Graphen, dass die Kurven der Hintergrundaktivität und der Na_aVO_4-sensitiven ATPase-Aktivität in den Konzentrationen von 0,09 µM bis ca. 10 µM einen Abstand von ca. 30 AE einnehmen, aber einen wieder sehr ähnlichen Verlauf einnehmen. Ab 22 µM Celestolid nähern sich die Kurven einander leicht an. Ab ca. 5 µM ist ein Kurvenanstieg wahrzunehmen.

Graph (N)

Die Baseline-Aktivität liegt bei 2,6 AE, kurz darüber, bei einer Aktivität von 3,94 nmol Pi/min/mg Protein zeichnet sich die Gerade der maximalen Inhibierung ab. Das

Stimulationsmaximum liegt bei 27,6 AE. Zwischen diesen Kontrollen befindet sich die Kurve des Tests auf Inhibierung. Diese nimmt einen ungleichmäßigen Verlauf ein und schwankt dabei im Bereich von 1,61 AE bis 13,71 AE. Die Aktivierungskurve, welche noch unter der Baseline-Aktivität zu sehen ist, steigt in den Celestolid-Konzentrationen von 0,09 µM bis 7,4 µM von -2,28 AE bis 1,08 AE an, nimmt später aber in ähnlich geringem Maße wieder ab. Eine deutliche Aktivierung lässt sich nicht verzeichnen. Die Kurven der Gesamtaktivität und der Na_3VO_4-sensitiven Aktivität der ATPase nehmen einen gleichsamen Verlauf an, der in Konzentrationsbereichen von 0,27 µM bis 200 µM von rund 43 AE bis auf rund 60 AE steigt.

(2) Weitere Duftstoffe

Linalool (Graph (O)-(Q))

Graph (O)

In diesem Schaubild fällt auf, dass die Gerade, welche die maximal stimulierte ATPase beschreibt, die Positivkontrolle der Aktivierung, die niedrigste ist. Sie liegt bei einer Aktivität von -5,26 AE, gefolgt von der maximal gehemmten ATPase bei -2,85 AE und der Baseline-Aktivität bei -1,14 AE. Die Kurve der ATPase-Aktivierung befindet sich auf Höhe der Baseline-Aktivität, ohne eine Aktivierung anzuzeigen. Die Kurve bewegt sich zwischen -3,29 AE und 2,89 AE schwankend auf und ab. Auch die Inhibierungskurve zeigt keinen eindeutigen Verlauf. Nach einem Absinken bei einer Konzentration von 0,09 µM bis ca. 1 µM von 12,63 AE auf ca. 7 AE, erreicht die Kurve ihr Maximum bei 17,5 AE und sinkt im Anschluss wieder leicht ab. Die Kurven der gesamten und Na_3VO_4-sensitiven Aktivität nehmen einen vergleichbaren Verlauf ein. Dieser sinkt ab 0,09 µM Linalool von 47,42 AE bzw. 44,52 AE auf rund 40 AE ab, steigt aber bei höheren Konzentrationen auf 54 AE an.

Graph (P)

In Graph (P) bildet die Baseline-Aktivität die unterste Gerade bei 1,52 AE. Die Aktivierungskurve liegt mit Werten von 0,13 AE bis 6,31 AE nicht viel höher, sodass eine Aktivierung ausgeschlossen werden kann. Die ATPase besitzt ihre Aktivitätsgrenzen bei 11,02 und 27,27 AE. Dazwischen verläuft die Inhibierungskurve ungleichmäßig auf und ab. Ihre Extrempunkte liegen dabei bei (0,82 µM; 14,02 AE) und (0,09 µM/66,67µM; 18,69 AE). Die Kurve des gesamten Phosphatgehalts sinkt von 56,47 AE bei 0,09 µM auf 49,14 AE bei 0,82 µM Linalool ab, steigt aber mit zunehmender Konzentration bis auf 64,17 AE an. Die Na_3VO_4-sensitive ATPase-Aktivität beginnt bei 50,4 AE und 0,09 µM, nimmt geringfügig ab

und verzeichnet dann wieder einen Anstieg im ähnlichen Größenbereich wie die Kurve der Gesamtphosphatmenge.

Graph (Q)

Im dritten Experiment mit Linalool liegt die Baseline-Aktivität nahe dem Stimulationsmaximum. Die Werte betragen 1,36 AE bzw. 0,5 AE. Noch unter diesen Kurven liegt aber die Aktivierungs-Kurve. Diese sinkt von -8,62 AE bei 0,09 µM auf -23,71 AE bei einer Konzentration von 7,4 µM und bleibt in höheren Stoffkonzentrationen relativ konstant. Auch die Kurve des Inhibierungstests kann als konstant bezeichnet werden, da sie kaum von Aktivitäten von 13 nmol Pi/min/mg Protein abweicht. Die mit Verapamil stimulierte und mit CsA wieder gehemmte ATPase-Aktivität liegt bei 26,04 AE. Die „+"- und „-"-Vanadat-Kurven beginnen bei der niedrigsten Konzentration mit 84,63 AE bzw. 76,01 AE und sinken mit steigenden Linalool-Konzentrationen auf 49,72 AE bzw. 30 AE ab.

Citronellol (Graph (R)-(T))

Graph (R)

Eine Aktivierung des Enzyms ist nicht zu verzeichnen. Die Aktivitätskurve hierfür liegt nahe der Baseline-Aktivität mit -8,7 AE. Die Positivkontrollen der maximalen Stimulation und der Inhibition der ATPase liegen ebenfalls auf nahezu derselben Ebene bei 14,07 AE bzw. 15,16 AE. Die Kurve, die auf mögliche Inhibierung hinweisen soll, sinkt ab einer Konzentration von 0,27 µM mit 20,24 AE bis auf 8,66 AE bei der höchsten Konzentration ab. Auch die Kontrollkurven nehmen einen von 72,76 AE und 65 AE abnehmenden Verlauf ein, welcher bei 53 AE und 41,9 AE bei der höchsten Konzentration endet.

Graph (S)

Die Baseline-Aktivität liegt bei -6,48 AE. Die Aktivierungskurve nimmt einen umgekehrten Glockenförmigen Verlaub ein, dass heißt, sie ist nach oben geöffnet. Das Minimum dieser Kurve ist bei einer Citronellol-Konzentration von 2,47 µM mit -19,29 AE erreicht. Die Kurve auf Inhibierung der ATPase-Aktivität liegt zwischen dem Stimulationsmaximum und der gehemmten ATPase-Aktivität. Eine Inhibierung ist nicht zu verzeichnen. Die Stimulationskurve liegt mit 6,11 AE allerdings unter der Hemmkurve mit 25,56 AE. Sowohl die Kurve der Gesamt-ATPase-Aktivität, als auch die der mit Natriumorthovanadat sensitivierte ATPase nehmen stark rückläufige Werte ein. Der Aktivitätsverlauf beginnt dabei mit 75,79 AE bzw. 81,5 AE und 0,09 µM Testsubstanz und endet bei 41,62 AE und 200 µM

Testsubstanz. Dabei verläuft die Kurve der gesamten Phosphatfreisetzung unter der sensitivierten ATPase-Aktivität.

Graph (T)

Die Baseline-Aktivität liegt in Bereich von -4,14 AE. Die Kurve, die den Aktivierungstest darstellt, beginnt bei der geringsten Konzentration an Citronellol leicht anzusteigen, schwacht aber ab einer Konzentration von 0,82 µM bei 11,48 AE wieder in den Bereich von 3,89 AE ab. Die Auslenkung des Anstiegs ist nur gering, sodass nicht von einer offensichtlichen Aktivierung auszugehen ist. Über dieser Kurve befindet sich jene der größtmöglichen Inhibierung bei 11,36 AE. Die maximale Stimulation wurde in diesem Test bei 33,33 AE erreicht. Zwischen den zuletzt genannten beiden Geraden liegt die Kurve des Inhibitionstests. Diese Kurve beginnt bereits ab 0,09 µM Testsubstanz zu steigen, nimmt aber bei einer Konzentration von 7,4 µM und einer Aktivität von 24,62 nmol Pi/min/mg Protein wieder ab, sodass ihr Minimum bei einer Konzentration von 200 µM und 4,44 AE erreicht wird. Die Kurve des gesamten anorganischen Phosphats bewegt sich bei Konzentrationen bis 22,22 µM relativ konstant bei 35 – 39 AE. Im Anschluss ist ein Anstieg wahrzunehmen, der bei 200 µM und 48,82 AE sein Maximum einnimmt. Die hellblaue Kurve, welche die Na_3VO_4- sensitiven Phosphatfreisetzung anzeigt, beginnt ihren Lauf bei 0,09 µM mit 32,52 AE, sinkt bis zu einer Citronellol-Konzentration von 0,82 µM mit 24,53 AE ab und zeigt mit steigenden Konzentrationen einen Anstieg der Aktivität auf 45,67 AE an. Jedoch ist auch bei diesen beiden Kurven jeweils nur von geringen Auslenkungen zu sprechen.

(S)-(-)-Limonen (Graph (U)-(W))

Graph (U)

In Plot (U) befindet sich die Baseline-Aktivität bei -0,54 AE und die maximale Stimulation bei 13,03 AE. Über die Grenzen dieser beiden Geraden gehen die beiden Kurven der Tests kaum hinaus. Die Aktivitätskurve liegt zwischen 3,38 AE und 8,92 AE, womit keine Aktivität der ATPase erkennbar ist. An den oberen Grenzen dieser Kurve liegt die Gerade der gehemmten ATPase bei 8,46 AE. Zwischen der Stimulations- und der Hemmkurve schwankt die Inhibierungskurve zwischen Werten von 7,97 AE und 15,27 AE. Eine Inhibition im Verlauf steigender Konzentrationen wird nicht indiziert. Die Kurven ohne und mit Vanadatzusatz verlaufen mit einem ähnlich geringen Auslenkungsfaktor. Die Gesamtphosphatfreisetzung liegt während des getesteten Konzentrationsspektrums zwischen

46,4 und 54,38 AE. Die Kurve der sensitivierten ATPase liegt zwischen Aktivitätseinheiten von 40,32 und 46,8.

Graph (V)

Experiment zwei mit (S)-(-)-Limonen liefert folgende Ergebnisse. Die Baseline-Aktivität liegt bei -2,53 AE, darüber, bei 2,12 AE wird die stimulierte ATPase gehemmt und erst bei 36,57 AE erreicht sie ihr Stimulationsmaximum. Die Kurve der Aktivierung liegt in den Konzentrationsbereichen von 0,24 µM bis 7,4 µM noch unter der Baseline-Aktivität bei rund -7 AE, lässt aber in den folgenden Konzentrationen einen minimalen Anstieg auf 3,48 AE verzeichnen. Der Test auf Inhibierung fällt negativ aus. Die Werte liegen bis zu einer Limonen-Konzentration von 22,22 µM zwischen 5,15 und 12,42 AE, bis zur Konzentration von 200 µM auch bei bis zu 17,27 AE. Die Kurven der gesamten und der Na_3VO_4-sensitiven Phosphatfreisetzung nehmen einen ähnlichen Verlauf ein. Bei der niedrigsten Konzentration wird eine Aktivität bei 40 nmol Pi/min/mg Protein, bei der höchsten eingesetzten Konzentration eine Aktivität bei 60,48 AE bzw. 62,76 AE gemessen.

Graph (W)

Die Baseline-Aktivität der ATPase liegt bei -1,93 AE. Ihre maximale Stimulation wird bei 20,81 AE, ihre Hemmung bei 5,16 AE erreicht. Die Aktivierungskurve beginnt über der Baseline-Aktivität bei 3,31 AE. Bei 7,4 µM Limonen übersteigt sie die Gerade der gehemmten Aktivität mit 6,22 AE, sinkt aber in höheren Konzentrationsbereichen wieder auf rund 5 AE ab. Die Inhibitionskurve besitzt ihr Maximum bei einer Konzentration von 0,27 µM Limonen im Well, sinkt dann sanft auf 13,81 AE bei 200 µM eingesetzter Stoffkonzentration ab. Die Kurve der Na_3VO_4-sensitiven ATPase-Aktivität befindet sich ca. drei bis fünf Aktivitätseinheiten unter der nicht sensitivierten ATPase-Kurve, nimmt aber einen sehr ähnlichen, nach oben geöffneten Kurvenverlauf, an. Die sensitivierte ATPase-Aktivität sinkt bei der geringsten Konzentration von 45,3 AE auf 35,36 AE bei 7,4 µM Limonen, und steigt bei höheren Konzentrationen wieder auf 41,16 AE an.

Fasst man nun die Ergebnisse aller Tests zu einer Gesamtbewertung zusammen, muss die Schlussfolgerung gezogen werden, dass von keinem der sechs getesteten Substanzen ein übereinstimmendes Triplikat erzeugt wurde. Somit sind weder Moschusverbindungen noch alternative Duftstoffe als Substrat oder Inhibitoren des P-gps identifiziert worden.

6. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von synthetischen Duftstoffen mit P-gp des Zebrabärblings untersucht. Die Effekte der Chemikalien wurden auf die ATPase-Aktivität des rekombinanten P-gps quantifiziert. Es konnten keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Im Folgenden werden die Gründe hierfür diskutiert. Hierbei wird auf mögliche Fehlerquellen eingegangen.

Die Testergebnisse ließen keine Feststellung einer Interaktion des Proteins mit den getesteten Verbindungen zu. Verapamil gilt als bekannter P-gp-Aktivator (Sarkadi, 2006). Aus diesem Grund wurde der Stoff in den Experimenten als Modell-Substrat eingesetzt. Die Ergebnisse der Graphen (B), (C) und (E) zeigen tatsächlich eine Aktivierung der ATPase mit Verapamil an. Bei Betrachtung der Kurvenverläufe, welche die ATPase-Aktivität mit und ohne Natriumorthovanadat angeben ist aber festzustellen, dass der Anstieg der ATPase-Aktivität nicht von P-gp rühren kann, weil die unsensitivierte ATPase-Aktivität mit steigender Verapamil-Konzentration einen geraden Verlauf nimmt. Die sensitivierte ATPase-Aktivität fällt hingegen ab. Das bedeutet, dass die Aktivität der ATPasen ohne P-gp mit steigender Verapamil-Konzentration gehemmt wird.
Die Versuche mit den synthetischen Duftstoffen konnten in keinem Fall reproduziert werden. Einzelne Kurven nahmen einen theoretisch unmöglichen Verlauf an. So verläuft die Baseline-Aktivität beispielsweise in den Graphen (G), (R), (S) und (T) im negativen Bereich. Zudem ähnelt sich der Verlauf der Aktivitätskurven mit und ohne Natriumorthovanadat in den meisten Diagrammen einander sehr. Beispielhaft zu nennen sind die Graphen (G), (H), (I), (K) und (N). Bei den Positivkontrollen für Aktivierung und Inhibierung sind die Werte nicht vereinbar mit funktionell aktivem P-glykoprotein in den Membranpräparationen. Beispiele dafür sind die Plots (G), (H) und (O).
Es lässt sich schlussfolgern, dass in den Zellen kein funktionelles rekombinantes P-glykoprotein exprimiert worden ist. Hinweise darauf gibt auch das Ergebnis des Western Blots.
Zwar konnte die Antikörperdetektion im Western Blot das P-gp in der Membranpräparation nachweisen, jedoch wurden neben der Bande des P-gp auf der Nitrocellulosemembran auch zwei weitere Banden in Größenbereichen von 40-50 kDa mit AK markiert.

Das untersuchte Protein besteht aus zwei Transmembran-Domänen und zwei Nukleotid-Bindungsdomänen. Die Transmembran-Domänen bestehen wiederum aus jeweils sechs membrandurchspannenden Helices (Sarkadi et *al.* 2006). Das Molekulargewicht von P-gp liegt je nach Glykosylierungsgrad bei 140 bis 170 kDa. Da das durch die Sf9-Zellen exprimierte P-gp gering glykosyliert ist, ist das Molekulargewicht nur ca. 140 kDa. Die zwei zusätzlichen Banden auf der Membran, die durch den P-gp-spezifischen C219-AK angefärbt wurden, zeigen Proteine oder Proteinfragmente mit geringeren Molekulargewichten an, die ebenfalls C219-Epitope aufweisen, an welche die Antikörper binden konnten. Aufgrund der Größe des vollständigen Proteins ist es denkbar, dass die zusätzlich zu sehenden Proteinbanden kleinere Fragmente des P-gps sind. Ein Auftreten von Pgp-Fragmenten kann darin begründet liegen, dass die transfizierten Sf9-Zellen das Protein nur unvollständig exprimiert haben oder dass die Proteinfragmente bei der Membranpräparation aus intaktem Protein entstanden sind. Für eine fehlerhafte Membranpräparation gibt es jedoch keine Hinweise, da es auch Membranbatches gibt, bei denen ausschließlich vollständiges Protein enthalten ist.

So ist denkbar, dass die für das rekombinante P-gp kodierende DNA im Virus mutiert war, so dass der Leserahmen verschoben war und ein vorzeitiges Stop-Codon auftrat. So wurde verkürztes Protein exprimiert. Möglich ist, dass die Infektion mit dem Baculovirus fehlerhaft verlaufen ist. Der Baculovirus besitzt keine Reparaturmechanismen der DNA. Um Mutationen in der Virus-DNA zu verhindern, sollte die Passage des Virusüberstandes zur Infektion möglichst gering gehalten werden. Die in den Experimenten genutzten Zellen wurden mit Virus aus Überstand der Passage drei (P3) infiziert. Möglicherweise war diese Passage bereits zu hoch, sodass die Virus-DNA Mutationen ausbilden konnte. Eine andere Möglichkeit könnte sein, dass die Sf9-Zellen zu lange oder zu kurz mit dem Virus inkubiert wurden. Eine zu kurze Inkubationszeit lässt es zu, dass nicht alle Zellen vom Virus infiziert wurden und dadurch ungenügend P-gp des Zebrabärblings exprimiert wurde. Durch eine zu lange Inkubationszeit hingegen, könnte zu viel Protein exprimiert worden sein, welches nicht in die Membran eingebaut werden konnte.

7. Zusammenfassung und Ausblick

ABC-Transportproteine, wie P-gp, gehören zu den membranständigen ATPasen, welche den aktiven Transport strukturell verschiedener Substanzen, wie Xenobiotika und endogene Chemikalien, aus dem Zellinneren heraus vermitteln. Dadurch verhindern sie eine Akkumulation der Substanzen und eine damit einhergehende Zellschädigung. Sie vermitteln der Zelle eine Resistenz gegen diese Substanzen. Es existieren Stoffe, welche diesen Transportmechanismus beeinträchtigen. Das Ausschleusen von Xenobiotika wird blockiert, was eine Akkumulation dieser Stoffe in der Zelle zulässt. Solche Stoffe werden als Chemosensitizer bezeichnet und bilden eine Klasse hochrangig gefährlicher Wasserschadstoffe (Kurelec 1997). Eine Interaktion von Substanzen mit dem Protein stimuliert (Substrat) oder hemmt (Inhibitor) seine ATPase. Die Aktivität der ATPase kann über den Nachweis von Phosphat, welches durch die Bindung eines Substrates an die Substratbindungsstelle freigesetzt wird, festgestellt werden.

Ziel der Arbeit war, eine Interaktion von synthetischen Duftstoffen mit rekombinantem P-gp des Zebrabärblings über die ATPase-Aktivität des Proteins zu ermitteln. Dabei sollten synthetische Moschusverbindungen mit anderen synthetischen Duftstoffen hinsichtlich deren Art und Ausmaß der Interaktion mit dem P-gp verglichen werden. Für die Versuche wurden Sf9-Zellen mit einem Baculovirus infiziert, die dann das P-gp des Zebrabärblings überexprimierten. Die Zellmembranen der infizierten Zellen wurden anschließend isoliert und die Überexpression des P-gps mit Western Blot verifiziert. Für die Untersuchung von Interaktionen der Teststoffe mit dem P-gp wurde der ATPase-Assay angewandt. Die Versuche mit den ATPase-Tests lieferten keine Ergebnisse. Der Grund hierfür ist wohl, dass nur ein kleiner Anteil des rekombinant exprimierten P-gp funktionell war. Mittels Western Blot wurde gezeigt, dass neben Protein mit dem Molekulargewicht von P-gp (etwa 140 kDa) weitere Proteinfraktionen mit geringerem Molekulargewicht in der Membranpräparation enthalten waren, die von trunkiertem rekombinantem P-gp stammten. Die Ursache des Vorhandenseins von trunkiertem und damit wohl nicht funktionellen Proteins kann in der Verwendung von nicht intaktem Baculovirus für die Infektion liegen. So stammte das verwendete Baculovirus aus Überstand der Passage drei, wobei für die Infektion Virus aus Passage 2 empfohlen wird. Der Baculovirus ist durch fehlende DNA-Reparaturmechanismen nicht in der Lage, Mutationen im Erbgut zu beheben. Je höher die Viruspassage ist, desto mehr Mutationen können sich anhäufen. Es ist möglich, dass durch die Mutation der

Leserahmen verschoben war und ein Stop-Codon in die DNA eingefügt wurde. Dadurch wurde verkürztes Protein exprimiert.

Um einen erfolgreichen ATPase-Assay durchzuführen, sollte besonders auf die Unversehrtheit des Virus und der infizierten Zellen geachtet werden. Dazu gehört, dass Zellen nur mit einem Virus der Passage zwei infiziert werden. Infektionszeiten müssen unbedingt eingehalten werden und die infizierte Zellsuspension sollte unter definierten Bedingungen inkubiert werden. Dazu gehört die Inkubation bei 27 °C und 80 rpm unter Lichtausschluss. Nach jedem Membranaufschluss muss ein Western Blot zur Verifizierung der Membran erfolgen. Zeigen die Ergebnisse des Western Blots ausschließlich eine Bande bei 140–170 kDa, ist anzunehmen, dass das intakte P-gp exprimiert wurde. Tests mit dem Modell-Substrat Verapamil zeigen, ob das P-gp funktionell ist. Bei der Ergebnisbetrachtung sollten immer die Kurven der ATPase-Aktivität mit und ohne Na_3VO_4 ausgewertet werden, um die Entstehung der Aktivierungskurve nachvollziehen und bewerten zu können.

8. Summary

ABC-transport proteins, like the well-investigated p-glycoprotein (p-gp), belong to the transmembrane ATPases, which enable the transport of structurally diverse substances, such as xenotiotics and endogenic chemicals, out of the cell. Thus, they prevent the accumulation and the damage of the cell. Membrane transport proteins are responsible for resistance of the cell against these chemicals. Therefore, possibly non-toxic compounds inhibiting chemical efflux from the cell may lead to the bioaccumulation of other substances within the cell. These compounds are named chemosensitizers and they are considered as a class of hazardous water pollutants (Kurelec 1997). The interaction of substances with the transport protein stimulates (substrate) or inhibits (inhibitor) the ATPase activity. Hence, active transport can be detected indirectly by measuring the inorganic phosphate generated by the reduction of ATP to ADP. The goal of this study was to analyze the interaction between synthetic fragrances and the recombinant p-gp of the zebrafish. One aspect was comparison of synthetic musk compounds with other synthetic fragrance compounds to determine type and extent of interaction with the p-gp. In preparation for the experiments, Sf-9-cells were infected with a baculovirus to overexpress the zebrafish p-gp. In the next step, the cell membranes of the infected cells were isolated and the overexpression of the p-gp was verified using western blot analysis. For testing the interaction between test compounds and p-gp, the ATPase assay system was used. The experiments failed, because they did not yield any results. A possible reason is, that only a small part of the recombinant p-gp was functional. Results from the western blot analysis indicated not only protein with a molecular mass of p-gp (around 140 kDa), but also other protein fragments with lower molecular masses in the membrane, which originated from truncated recombinant protein. A cause for the occurrence of truncated and therefore nonfunctional protein could be the use of defective baculovirus for cell infection. The used baculovirus was from supernatant of passage three, although virus of passage two is recommended. The baculovirus does not contain any DNA repair mechanisms, so problems with mutations in the genotype cannot be solved. The higher a passage of a virus, the more mutations can appear and accumulate. Due to the mutations, it is possible that the reading frame is shifted and a stop-codon is inserted, so that the expressed protein is shortened.

To succeed with the ATPase assay, one should especially ensure the integrity of the virus and the infected cells. Therefore, cells should only be infected with virus of the second passage. It is essential to exactly follow the protocol with regard to infection times and cell culture

conditions. This includes incubation of sf9 cells at 27 °C and 80 rpm without light. Every membrane preparation should be validated with western blot analysis. The ATPase-assay should always be performed with a membrane, for which western blot analysis results display a single protein expressed at the expected molecular mass at 140-170 kDa. Only in this case, the membrane should be used in the test. Before testing some chemicals for interaction with p-gp, model substances should be used for testing activation and inhibition processes. This can be used as an indicator for a functional protein. By comparing the activity of the protein with and without vanadate, conclusions on the quality of the results can be drawn.

.

Quellenverzeichnis

Literaturquellen

Clark, D. P.; Pazdernik, N. J.(2009): *Molekulare Biotechnologie. Grundlagen und Anwendungen.* 1. Auflage: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg: S. 104-105.

Giddings, J. M.; Salvito, D.; Putt, A. E. (2000): *Acute toxicity od 4-amino musk xylene to Daphnia magna in laboratory water and natural water.* Water research. 34(14): 3686-89.

Gooding, M. P.; Newton, T. J.; Bartsch, M. R.; Hornbuckle, K. C. (2006): Toxicity of synthetic musks to early life stages of the freshwater mussel *Lampsilis cardium*. Archives of Environmental Contamination Toxicology. 51(4):549-58.

Heberer, T.; Gramer, S.; Stan, H.-J.: (1999): Occurrence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in Berlin. Acta hydrochimica et hydrobiologica. 27(3): 150–6.

Invitrogen life technologies (2002). *Guide to Baculovirus expression vector systems (BEVS) and insect cell culture techniques. Instruction Manual.* Kalifornien, USA. S. 1-4.

Kupper, T.; Berset, J. D.; Etter-Holzer, R.; Furrer, R.; Tarradellas, J. (2004):*Concentrations and specific loads of polycyclic musks in sewage sludge originating from a monitoring network in Switzerland.* Chemosphere. 54(8): 1111–20.

Kurelec B. (1997): *A new type of hazardous chemical: the chemosensitizers of multixenobiotic resistance.* Environmental Health Perspectives. 105(4): 855-60.

Linton, K. J. (2007): *Structure and function of ABC transporters.* Physiology (Bethesda, Md.). 22: 122-30.

Martinez, D.; Hartwig, R. (1998): *Taschenbuch der Riechstoffe. Ein Lexikon von A-Z.* 1 Auflage: Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main: S. 104-105.

Mersch-Sundermann, V.; Schneider, H.; Freywald, C.; Jenter, C.; Parzefall, W.; Knasmüller, S. (2001): *Musk ketone enhances benzo(a)pyrene induced mutagenicity in human derived Hep G2 cells.* Mutation Research. 495(1-2):89-96.

Mottaleb, M. A.; Zhao, X.; Curtis, L. R.; Sovocool, G. W. (2004): *Formation of nitro musk adducts of rainbow trout hemoglobin for potential use as biomarkers of exposure.* Aquatic Toxicology. 67(4): 315–324.

Polli, J.W.; Wring, S. A.; Humphreys, J. E.; Huang, L.; Morgan, J B.; Webster, L. O.;

Serabjit-Singh, C. S. (2001): *Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery.* The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. 299 (2):620–8

Rimkus, G. G. (1999): *Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment*. Toxicology Letters 111(1-2):37-56.

Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakacs, G.; Varadi, A. (2006): *Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system.* Physiological reviews. 86 (4): 1179-236.

Smital, T.; Luckenbach, T.; Sauerborn, R.; Hamdoun, A. M.; Vega, R. L.; Epel, D. (2004): *Emerging contaminants - pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms.* Mutation research. 552(1-2):101-17.

Solvo Biotechnology (2007): *Determination of the interaction of drugs with the human MDR1 transporter using the SB-MDR1 PREDEASYTM ATPase Kit.* Version 1.2

Thieman, W. J.; Palladino M., A. (2007): *Biotechnologie.* 1. Auflage: Pearson Studium, München: S. 129-131.

Trometer, C.; Falson, P.: *Mammalian Membrane Protein Expression in Baculovirus-Infected Insect Cells.* In: Mus-Veteau, I. (2010): *Heterologous Expression of Membrane Proteins*. 1. Auflage: Humana Press, New York, USA: S. 105-107.

Umweltbundesamt Deutschland (2006): *Duftstoffe: Wenn Angenehmes zu Last werden kann.* Hintergrundpapier.

Internetquellen

(URL-1)(12/09/2012)
Wikipedia: Synthetic musk. URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Synthetic_musk

(URL-2)(12/09/2012)
Umweltbundesamt: Fact Sheet Polymoschusverbindungen. URL: http:// www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/umweltthemen/gesundheit/fact_sheets/Fact_Sheet_Polymoschusverbindungen.pdf

(URL-3)(12/09/2012)
Silvia K. Müller: Nitromoschus- und polyzyklische Moschusverbindungen - Langzeithemmer für das zelluläre Fremdstoff-Abwehrsystem. URL: http://csn-deutschland.de/nmoschus.htm

(URL-4)(13/09/2012)
Greenpeace: Facts_Chemie. Künstliche Moschus-Duftstoffe. URL: http://gruppen.greenpeace.de/wuppertal/service_files/infoliste_files/chemie_hormonell_wirksame_chemikalien/kuenstliche_moschus_duftstoffe_gp_cee_2003.pdf

(URL-5)(14/09/2012)
Aaberg, Helena: Common fragrance ingredients in shampoos and conditioners are frequent causes of eczema. URL: http://www.innovations-report.de/html/berichte/medizin_gesundheit/common_fragrance_ingredients_shampoos_conditioners_130096.html

(URL-6)/14/09/2012)
Wikipedia: Linalool. URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Linalool

(URL-7)(14/09/2012)
IFA, GESTIS-Stoffdatenbank: Linalool. URL: http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/032370.xml?f=templates$fn=default.htm$3.0

(URL-8)(14/09/2012)
NCBI, PubChem: Citronellol - Compound Summary. URL: http://pubchem.ncbi.nlm.nih. gov/ summary/summary.cgi?cid=8842

(URL-9)(14/09/2012)
Wikipedia: Citronellol. URL: http://en.wikipedia.org/wiki/Citronellol

(URL-10)(17/09/2012)
CHEMIE.DE: Licht lässt Partikel wachsen. Forscher entdecken neuen Mechanismus in der Atmosphäre. URL: http://www.chemie.de/news/138122/licht-laesst-partikel-wachsen.html

(URL-11)(17/09/2012)
Wikipedia: Limonen. URL: http://de.wikipedia.org/wiki/Limonen

(URL-12) (17/09/2012)
IFA, Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung: GESTIS-Stoffdatenbank. URL: http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/000000.xml?f=templates$fn= default.htm$3.0.

(URL-13) (17/09/2012)
Royal Society of Chemistry: ChemSpider. The free chemical database. URL: http://www.chemspider.com/

(URL-14) (24/09/2012)
Dunn Labortechnik: Spinnerflaschen und Zubehör. URL: http://www.dunnlab.de/pdf/chemglass/CLS_spinnerflaschen.pdf

(URL-15) (24/09/2012)
Peqlab: Cast-It L Gelgießstand. URL: http://www.peqlab.de/wcms/de/produkte/index.php?do=getArticleDetails&which=45-2020-CU

(URL-16)(29/07/2012)
Fermentas Molecular Biology Tools. URL: http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/support_images/wblotting.gif

Sicherheitsdatenblätter (SDB)

(SDB-1)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen: Sicherheitsdatenblatt. Gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. Version 4.3 Überarbeitet am 01.10.2011. Keton-Moschus.

(SDB-2)
LGC Standards GmbH, Wesel: Safety Data Sheet. Version 2. Überarbeitet am 18.09.2009. Reference-Material Tonalide.

(SDB-3)
International Flavors & Fragrances, New York, USA : Osha Material Safety Data Sheet. Überarbeitet am 18.05.2005. Celestolide.

(SDB-4)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen: Sicherheitsdatenblatt. Gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. Version 4.3 Überarbeitet am 03.10.2011. Linalool.

(SDB-5)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen: Sicherheitsdatenblatt. Gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. Version 4.2 Überarbeitet am 20.04.2012. Citronellol.

(SDB-6)
Sigma-Aldrich, Taufkirchen: Sicherheitsdatenblatt. Gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. Version 4.2 Überarbeitet am 01.10.2011. (S)-(-)-Limonen.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst zu haben. Ich habe ausschließlich mit der im Quellenverzeichnis angegebenen Literatur und Hilfsmittel gearbeitet. Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Mittweida, den 23.10.2012 Vanessa Hänchen