

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungen	IV
1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1.	Mehrfachresistenz gegenüber Zytostatika	3
2.2.	Mechanismen der Mehrfachresistenz gegenüber Zytostatika	3
2.3.	Die ABC-Transporter-Superfamilie	4
2.3.1.	Die MDR-P-Glykoproteine	6
2.3.2.	Das Multidrug Resistance-Protein MRP1	7
2.3.3.	MRP2, die apikale Isoform von MRP1	11
2.3.4.	Die MRP-Familie	13
2.3.5.	Die Detoxifikation von körpereigenen und körperfremden Substanzen und deren Ausscheidung in die Galle	17
2.4.	Zielsetzungen dieser Arbeit	18
3.	Material und Methoden	20
3.1.	Chemikalien, Enzyme und Arbeitsmaterialien	20
3.2.	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	21
3.2.1.	<i>E. coli</i> -Stämme, ihre Nährmedien und Kultivierung	21
3.2.2.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	22
3.2.3.	Reinigung von Plasmid-DNA	23
3.2.4.	Sequenzspezifische Hydrolyse der DNA (Restriktion)	24
3.2.5.	Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese	24
3.2.6.	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	25
3.2.7.	Ligation von DNA-Fragmenten	25
3.2.8.	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i> -Bakterien	25
3.2.9.	Isolierung von Gesamt-RNA aus Kultivierten Zellen	26
3.2.10.	Northernblot-Analyse der RNA	27

3.2.11. Sequenzierung von DNA nach Sanger	29
3.3. Zellbiologische Arbeitsmethoden	30
3.3.1. Zelllinien, Medien und Kultivierung von Zellen	30
3.3.2. Transfektion von eukaryontischen Zellen	31
3.3.3. Steigerung der Expression rekombinanter Proteine durch Histon-Deacetylase-Inhibitoren	32
3.3.4. Immunfluoreszenz-Mikroskopie	32
3.3.5. Zytotoxizitätstest	33
3.4. Biochemische Arbeitsmethoden	34
3.4.1. Antikörper	34
3.4.2. Deglykosylierung	35
3.4.3. Präparation von Membranvesikeln aus kultivierten Zellen	36
3.4.4. Isolierung von Gesamt-Membranfraktionen aus kultivierten Zellen	37
3.4.5. Immunblot-Analyse	38
3.4.6. Transport-Messungen	39
4. Ergebnisse	40
4.1. Umklonierung der cDNA von <i>MRP2</i> in den Expressionsvektor pcDNA3 bzw. pcDNA3.1(+)	40
4.2. Expression des rekombinanten <i>MRP2</i> in eukaryontischen Zelllinien	42
4.2.1. Auswahl geeigneter Zelllinien	42
4.2.2. Optimierung des Einsatzes von Natriumbutyrat und Trichostatin A in der Zellkultur	43
4.2.3. Expression des rekombinanten humanen <i>MRP2</i>	44
4.2.4. Einfluß von Butyrat auf die endogene Expression von <i>MRP</i> - Isoformen	45
4.2.5. Northernblot-Analyse	46
4.3. Charakterisierung des rekombinanten <i>MRP2</i>	48
4.3.1. Deglykosylierung	48
4.3.2. Zelluläre Lokalisation des rekombinanten <i>MRP2</i>	49
4.3.3. Die Lokalisation des Amino-Terminus von <i>MRP2</i> der Ratte	49

4.3.4.	Funktionelle Untersuchungen an rekombinantem MRP2	51
4.3.5.	Zytotoxizitätstests	55
4.4.	Charakterisierung von MRP3- und MRP6-spezifischen Antikörpern	59
5.	Diskussion	62
5.1.	Herstellung stabil-transfizierter Zelllinien	62
5.2.	Zelluläre Lokalisation von MRP2	63
5.3.	Die Membran-Topologie von MRP2	65
5.4.	Kinetische Konstanten von MRP2	65
5.5.	MRP2-vermittelte Zytostatika-Resistenz	66
6.	Literaturverzeichnis	69