

### 3 Ergebnisse

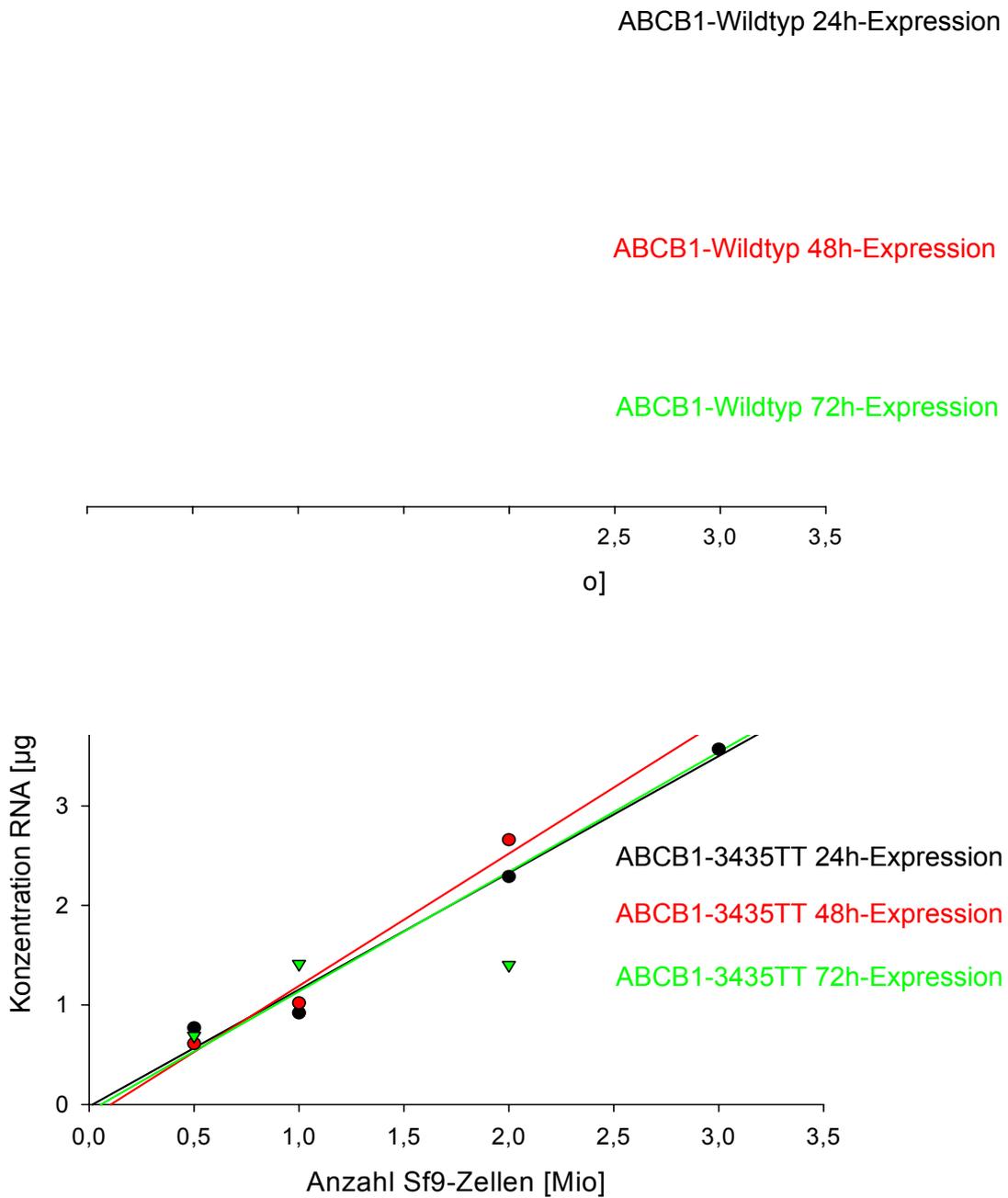
#### 3.1 Bestimmung des Gesamt-RNA-Gehalts von Sf9-Zellen, die mit rekombinanten ABCB1-Baculoviren infiziert wurden

Die maximale Transportgeschwindigkeit  $V_{\max}$ , die mittels ATP-abhängigem Aufnahmetransport von [ $^3\text{H}$ ]-Vincristin in Membranvesikel bestimmt werden sollte, ist abhängig von der Menge an gebildetem ABCB1 bzw. der Menge an ABCB1-RNA. Um eine Expression bei optimalen Bedingungen zu erhalten, wurde überprüft, ob die Gesamt-RNA-Konzentration in Membranvesikelpräparationen linear abhängig ist von der Anzahl an Sf9-Zellen. Ebenso wurde getestet, welche Expressionszeit für eine stabile Proteinexpression am günstigsten ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die Gesamt-RNA-Konzentration linear abhängig ist von der Anzahl an Sf9-Zellen (**Abbildung 10**). Eine Expressionszeit von 48h wurde als optimal bewertet und jeweils  $1,0 \times 10^6$  Zellen aus Vesikelpräparationen entnommen, um Gesamt-RNA zu isolieren.

#### 3.2 ABCB1-RNA-Konzentrationsbestimmung mittels quantitativer RealTime-PCR am LightCycler<sup>TM</sup>

Bei der Bestimmung der ABCB1-RNA in Insektenzellen, die mit rekombinanten Baculoviren beimpft wurden, konnten größere Abweichungen festgestellt werden. Dies ist möglicherweise auf die Instabilität von RNA in den Zellen zurückzuführen. Da sich Insektenzellen sehr schnell verdoppeln (18-24 h), hängt die RNA-Menge stark von der aktuellen Teilungsrate ab. Werden zu Ende der Expressionsdauer nach 48 h  $1 \times 10^6$  Zellen aus der Kultur entnommen, kann nichts darüber ausgesagt werden, welcher Anteil der Insektenzellen sich in welcher Phase des Zellzyklus befindet. Daher wurde beschlossen, zur Standardisierung der kinetischen Daten auf die Proteinexpression zurückzugreifen, da diese geringeren Schwankungen unterliegt.



**Abbildung 10** Konzentrationsabhängigkeit des Gesamt-RNA-Gehalts von der Anzahl an Sf9-Zellen

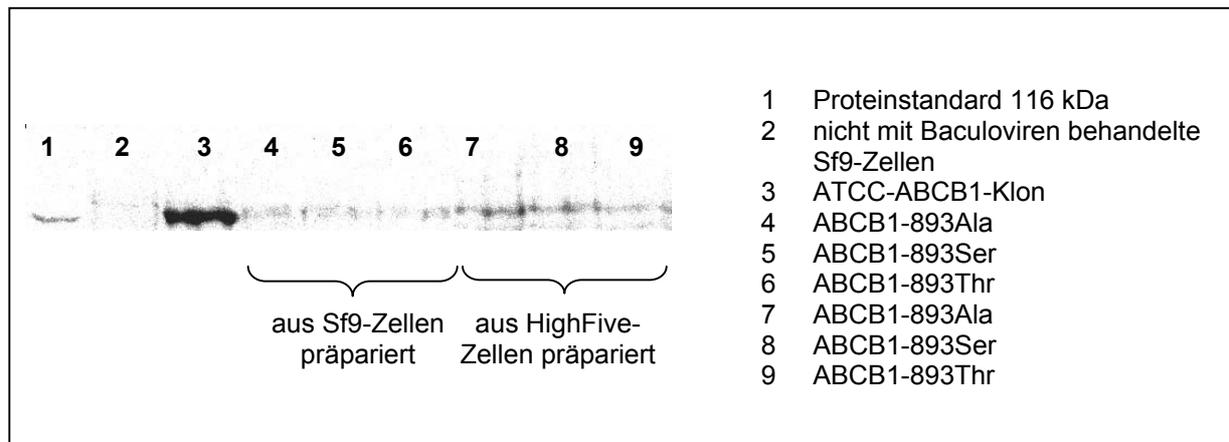
### **3.3 Analyse der Proteinexpression des ABCB1-Wildtyps und der genetischen Varianten 893Ser und 893Thr in Membranvesikeln mittels Immunoblot**

#### **3.3.1 Vergleich der ABCB1-Expression in Sf9- und HighFive™-Insektenzellen**

Zur Expression von Proteinen in Insektenzellen stehen verschiedene Zelllinien zur Verfügung. Aufgrund bereits vorhandener Daten zur Expression von Transmembrantransportern in Sf9-Zellen (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) [55;56], wurden im Rahmen unserer Studie ABCB1-893Ala (Wildtyp) und die genetischen Varianten 893Ser und 893Thr ebenfalls in Sf9-Zellen exprimiert. Es zeigte sich, dass die ABCB1-Expression in Sf9-Zellen zu gering war, um weitere Versuche, wie z.B. ATP-abhängigen Aufnahmetransport von radiativ markiertem Substrat in Membranvesikel, durchzuführen. Als Alternative zu Sf9-Insektenzellen steht eine weitere Insektenzelllinie zur Verfügung, sogenannte HighFive™-Zellen (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Diese entsprechen in ihren Eigenschaften Sf9-Zellen, jedoch wachsen sie wesentlich schneller (Verdopplungszeit Sf9 48-72h, HighFive < 24h), und die Expression rekombinanter Proteine ist um das 5- bis 10-fache erhöht.

Zum Vergleich der ABCB1-Expression in Sf9- und HighFive-Insektenzellen, wurden diese mit rekombinanten ABCB1-Baculoviren bei identischer MOI (1.5) und gleicher Expressionszeit infiziert. Im Western Blot konnte eine erhöhte ABCB1-Expression in HighFive-Zellen für alle 3 genetischen Varianten nachgewiesen werden (**Abbildung 11**). Alle weiteren Expressionen wurden daher in HighFive-Insektenzellen durchgeführt.

## Ergebnisse



**Abbildung 11** Vergleich der ABCB1-Expression in Sf9- und HighFive-Insektenzellen

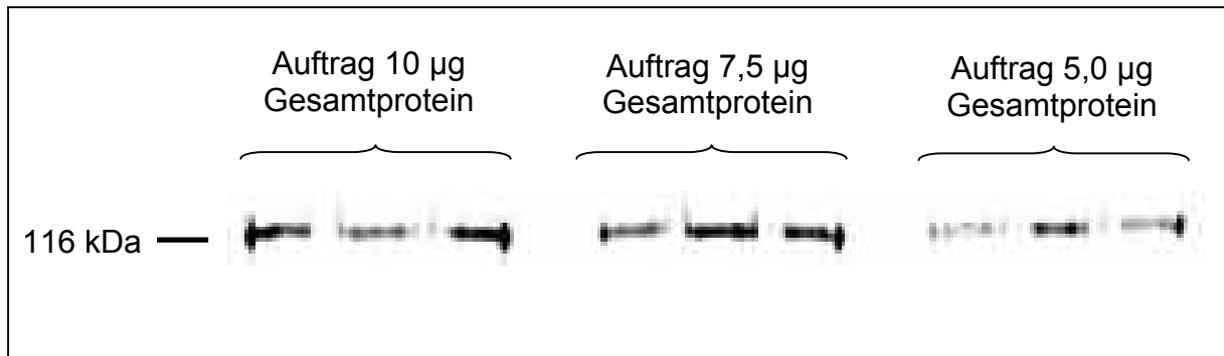
Membranvesikel wurden aus nicht mit Baculoviren infizierten bzw. aus mit rekombinanten Baculoviren infizierten Sf9- und HighFive-Insektenzellen isoliert (MOI 1.5, Expression 48 h). 5 µg Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Zur Identifizierung von ABCB1 diente der monoklonale Antikörper F4 (1:1000-Verdünnung). Als Positivkontrolle dienten Vesikel, die aus Sf9-Zellen isoliert wurden (Infektion mit Baculoviren, die aus einem pFastBac1-*ABCB1*-Klon (Acc.no. 14758) generiert wurden).

### **3.3.2 Überprüfung und Einstellung der Bedingungen zur Proteinexpressionsanalyse mittels Immunoblot**

Es sollte sichergestellt werden, dass die im Western Blot eingesetzten Protein- und Antikörpermengen, sowie die zur Detektion genutzten Belichtungszeiten für eine Quantifizierung geeignet sind. Hierfür wurden 5.0 + 7.5 + 10 µg Protein einer Vesikelpräparation jeweils 3-fach aufgetragen (**Abbildung 12**). In Zeitabständen von 5 min (0-30 min) wurden mittels des ChemiGenius Bioimaging Systems (Syngene, Gateway, Cambridge, UK, GLP-konform) Bilder erstellt und anhand der GeneSnap Software (Syngene) überprüft, ob die Intensität der Bandensignale im quantifizierbaren Bereich liegt. Eine Überbelichtung und damit der Verlust der Quantifizierbarkeit konnte durch das Programm ausgeschlossen werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Intensität des Signals mit steigender Proteinmenge bzw. steigender Belichtungszeit linear zunimmt. Die Quantifizierung fand nach einer Belichtungszeit von 10-15min mittels GeneTools (Syngene) statt.

## Ergebnisse

---



**Abbildung 12** Western Blot zur Überprüfung der Quantifizierbarkeit mittels Auftrag steigender Gesamtproteinmengen

Membranvesikel wurden aus mit rekombinanten Baculoviren infizierten HighFive-Insektenzellen isoliert (MOI 1.5, Expression 48 h). 5.0 + 7.5 + 10 µg Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Zur Identifizierung von ABCB1 diente der monoklonale Antikörper F4 (1:1000-Verdünnung).

### **3.3.3 ABCB1-Expression in HighFive-Vesikelpräparationen, die zur Bestimmung des ATP-abhängigen [<sup>3</sup>H]-Vincristin-Aufnahmetransports eingesetzt wurden**

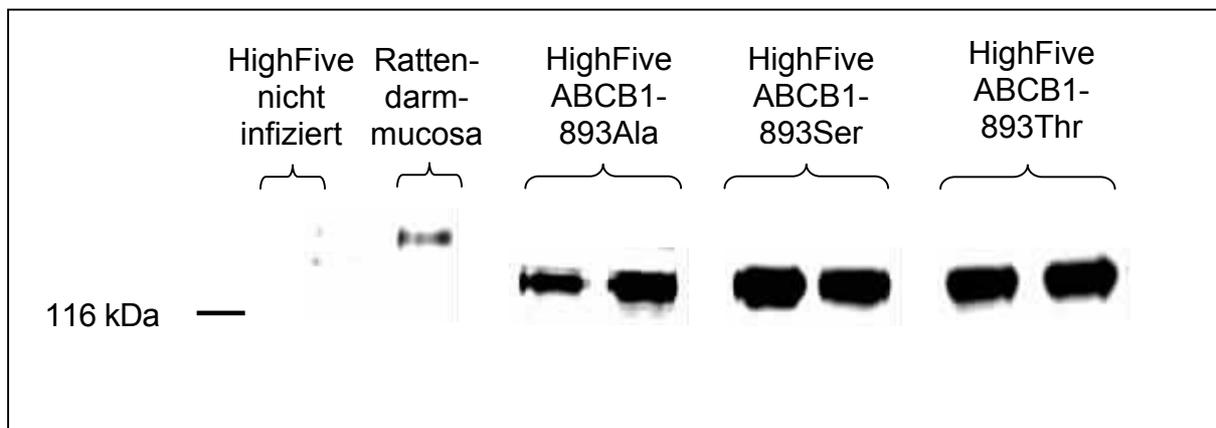
Die ABCB1-Expression wurde in Membranvesikeln untersucht, die aus Insektenzellen präpariert wurden, die mit rekombinanten Baculoviren (ABCB1-893Ala (Wildtyp) und Mutanten 893Ser und 893Thr) infiziert wurden. Es wurden die Präparationen auf den Western Blot aufgetragen, die auch zur Bestimmung des ATP-abhängigen [<sup>3</sup>H]-Vincristin-Transports eingesetzt wurden [siehe Kapitel 3.4. ATP-abhängiger Aufnahmetransport von [<sup>3</sup>H]-Vincristin in Membranvesikeln isoliert aus Insektenzellen, die ABCB1-Wildtyp oder die Mutanten 893Ser bzw. 893Thr exprimieren]. Die ABCB1-Expression wurde mittels des monoklonalen Antikörpers F4 (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) bestimmt. Als Positivkontrolle wurden aus Rattendarmmucosa isolierte Vesikel verwendet, die zur Verwendung überlassen wurden. Vesikel aus nicht-infizierten HighFive-Insektenzellen dienten als Negativkontrolle. Um nachzuweisen, dass Unterschiede in der Expression des zu untersuchenden Proteins nicht auf einer grundsätzlichen Expressionsveränderung aller exprimierter Proteine zurückzuführen sind, werden in Western Blots sogenannte Housekeeping-Gene verwendet. Die Expression

## Ergebnisse

---

dieser Proteine ist stets konstant. Für Insektenzellen sind jedoch keine Proteine bzw. Housekeeping-Gene bekannt bzw. in der Literatur publiziert. Daher ist es allgemeine Praxis, Western Blots für Proteinexpression in Insektenzellen ohne Kontrollproteine zu präsentieren.

Nach Behandlung mit dem ABCB1-spezifischen Antikörper F4, zeigten die Positivkontrolle und die Präparationen aus infizierten HighFive-Zellen Expression von humanem ABCB1, während die Negativkontrolle kein immunreaktives Signal aufwies. Das Molekulargewicht von in HighFive-Insektenzellen exprimiertem ABCB1 war geringer als in Rattendarmmucosa-Vesikeln (ca. 120 kDa versus 170 kDa). Dies kann auf Unterschiede in post-translationalen Modifikationen zurückgeführt werden, hauptsächlich auf Glykosylierung [57]. Die ABCB1-Expression in HighFive-Zellen war 1.83 mal höher als in Rattendarmmucosa. Die relative Expression der genetischen ABCB1-Varianten 893Ser und 893Thr wich kaum von der des ABCB1-Wildtyps ab (Wildtyp 1.0 – 893Ser 1.26 – 893Thr 1.04).



**Abbildung 13.** Immunoblot-Analyse des ABCB1-Wildtyps und der Mutanten 893Ser und 893Thr in Membranvesikelpräparationen.

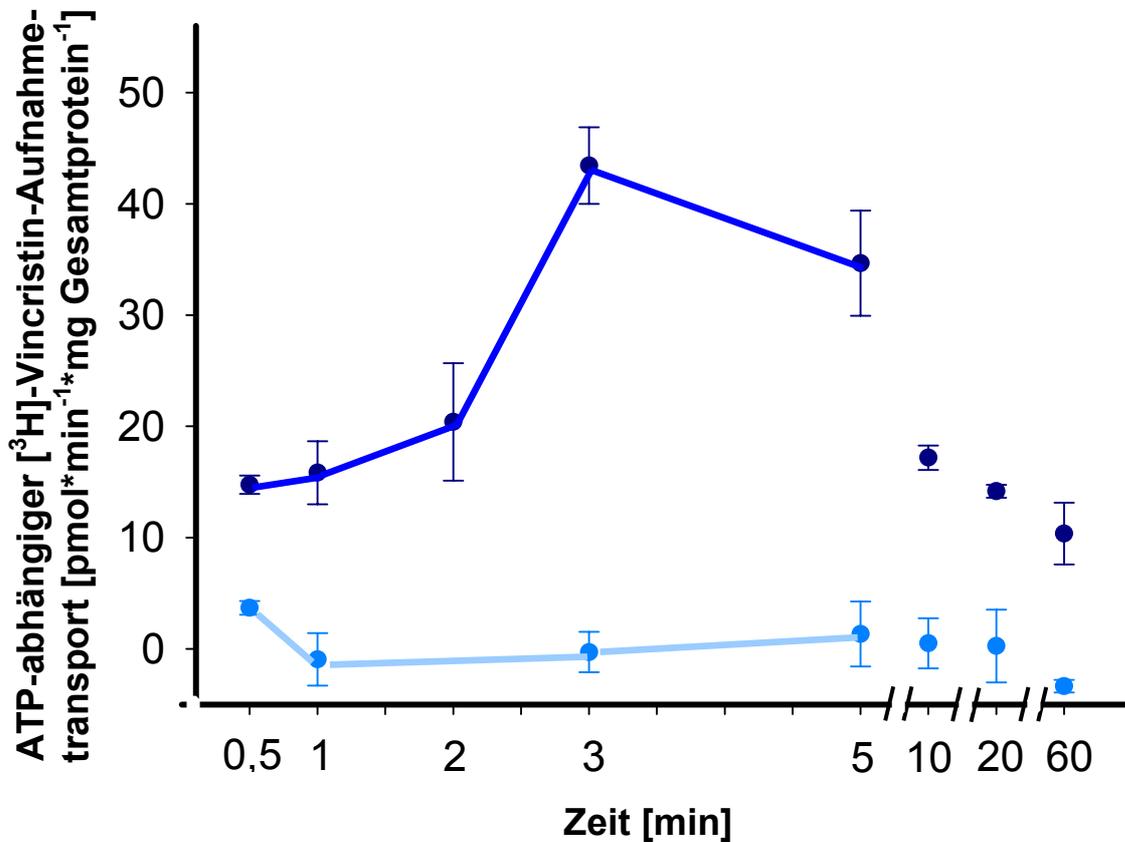
Membranvesikel wurden aus nicht-infizierten bzw. mit rekombinanten Baculoviren infizierten HighFive-Insektenzellen isoliert (MOI 1.5, Expression 48 h). 5 µg Protein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Zur Identifizierung von ABCB1 diente der monoklonale Antikörper F4 (1:1000-Verdünnung). Aus Rattendarmmucosa isolierte Vesikel wurden als Positivkontrolle eingesetzt.

### **3.4 ATP-abhängiger Aufnahmetransport von [<sup>3</sup>H]-Vincristin in Membranvesikeln isoliert aus Insektenzellen, die ABCB1-Wildtyp oder die Mutanten 893Ser bzw. 893Thr exprimieren**

#### **3.4.1 Zeitabhängigkeit**

In dieser Studie wurde Vincristin, welches über ABCB1 transportiert wird, als Modells substrat eingesetzt. Um festzustellen, ob das von uns etablierte System ABCB1-vermittelten Transport messen kann, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Aufnahmetransport in Gegenwart von ATP oder AMP-PNP bestimmt. In **Abbildung 14** sind die Zeitprofile für den Aufnahmetransport von 3  $\mu\text{M}$  [<sup>3</sup>H]-Vincristin in Membranvesikel dargestellt, die aus nicht mit Baculoviren behandelten Insektenzellen isoliert wurden bzw. aus Zellen, die den ABCB1-Wildtyp exprimieren. Die einzelnen Kurvenpunkte des ATP-abhängigen Aufnahmetransports wurden durch Subtraktion der Werte in Gegenwart von 4 mM AMP-PNP von den Werten in Gegenwart von 4 mM ATP berechnet.

Es konnte gezeigt werden, dass Membranvesikel, die ABCB1 überexprimierten, radioaktiv markiertes Vincristin transportierten. Anhand des Kurvenverlaufs wird deutlich, dass zu Beginn der Messung (0-2 min) die Zunahme der Transportrate geringer war als in der 2. Phase, was sich in einer geringen Kurvensteigung widerspiegelt. Zwischen 2 und 3 min kam es zu einem steilen Kurvenanstieg, bei 3 min wurde ein Transportmaximum erreicht [ $47.5 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  Gesamtprotein]. Anschließend fiel die Transportrate wieder ab, was auf eine Auslastung des Systems zurückzuführen ist. Nicht mit Baculoviren behandelte Insektenzellen zeigten keinen spezifischen Vincristin-Aufnahmetransport, es konnten keine Unterschiede zwischen ATP- und AMP-PNP-Werten gemessen werden.



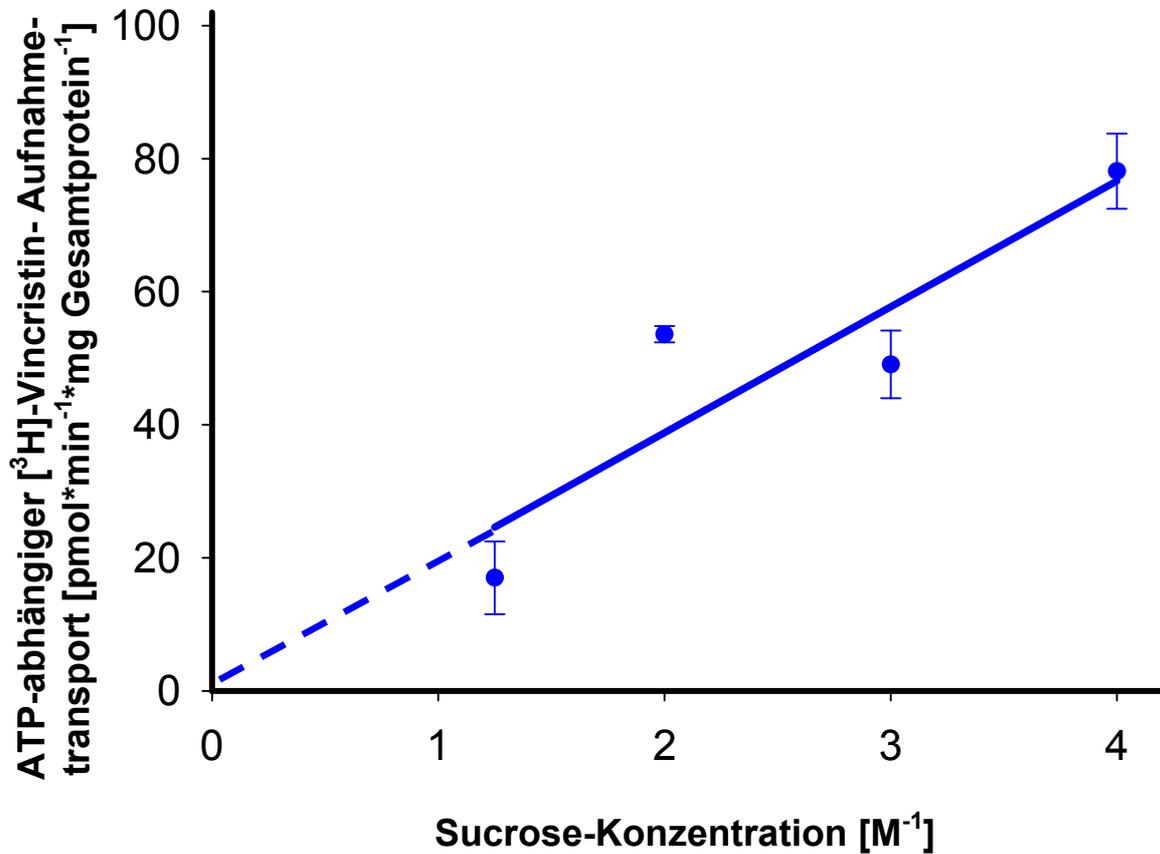
**Abbildung 14** Zeitprofile für ATP-abhängigen Vincristin-Aufnahmetransport in Membranvesikel, isoliert aus ABCB1-überexprimierenden (dunkelblau) oder nicht-infizierten (hellblau) HighFive-Insektenzellen.

Zu den angegebenen Zeitpunkten, wurde der Transport von 3  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-Vincristin in Membranvesikel (50  $\mu\text{g}$  Protein) gemessen (siehe Methodenbeschreibung). ATP-abhängiger Aufnahmetransport wurde durch Subtraktion der Werte in Gegenwart von 4mM AMP-PNP von den Werten in Gegenwart von 4mM ATP berechnet. Die einzelnen Punkte repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung einer Dreifachbestimmung [ $n = 3$ ;  $X \pm S$ ].

### 3.4.2 Osmolaritätsabhängigkeit

Um zwischen nicht-spezifischer Bindung von radioaktiv-markiertem Substrat an Membranen und spezifischem Aufnahmetransport in das Innere der Vesikel zu differenzieren, wurde ein Experiment bei verschiedenen Osmolaritäten des Transportpuffers durchgeführt. 18  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-Vincristin wurden mit steigenden Sucrose-Konzentrationen inkubiert [0.25, 0.33, 0.5, 0.8 M]. Das Ansteigen der Sucrose-Konzentration führt dazu, dass die Membranvesikel schrumpfen und sich der spezifische Aufnahmetransport verringert. Bei Auftrag des ATP-abhängigen Transports gegen die Osmolarität, würde sich eine Gerade mit einer Steigung  $< 0$  ergeben. Favorisiert wird jedoch eine graphische Darstellung, bei der der ATP-abhängige Aufnahmetransport gegen die reziproke Osmolarität aufgetragen wird. Folglich ergibt sich eine Gerade mit einer Steigung  $> 0$ . Vorteil dieser Darstellung ist die Möglichkeit, dass durch Verlängerung der Gerade hin zur y-Achse, der prozentuale Anteil der an Membranen gebundenen Radioaktivität bei hohen Konzentrationen bzw. kleinem intravesikularem Volumen bestimmen werden kann.

Aufgrund der unter Abschnitt 3.4.1 erhaltenen Ergebnisse, wurde die akkumulierte Radioaktivität beim Transportoptimum von 3 min gemessen. Der ATP-abhängige Aufnahmetransport wurde gegen die reziproke Osmolarität aufgetragen (**Abbildung 15**). Durch Extrapolation der Gerade hin zur y-Achse, ergab sich ein nur geringer Anteil von etwa 2% gebundener Radioaktivität bei normaler Osmolarität (0.25 M).



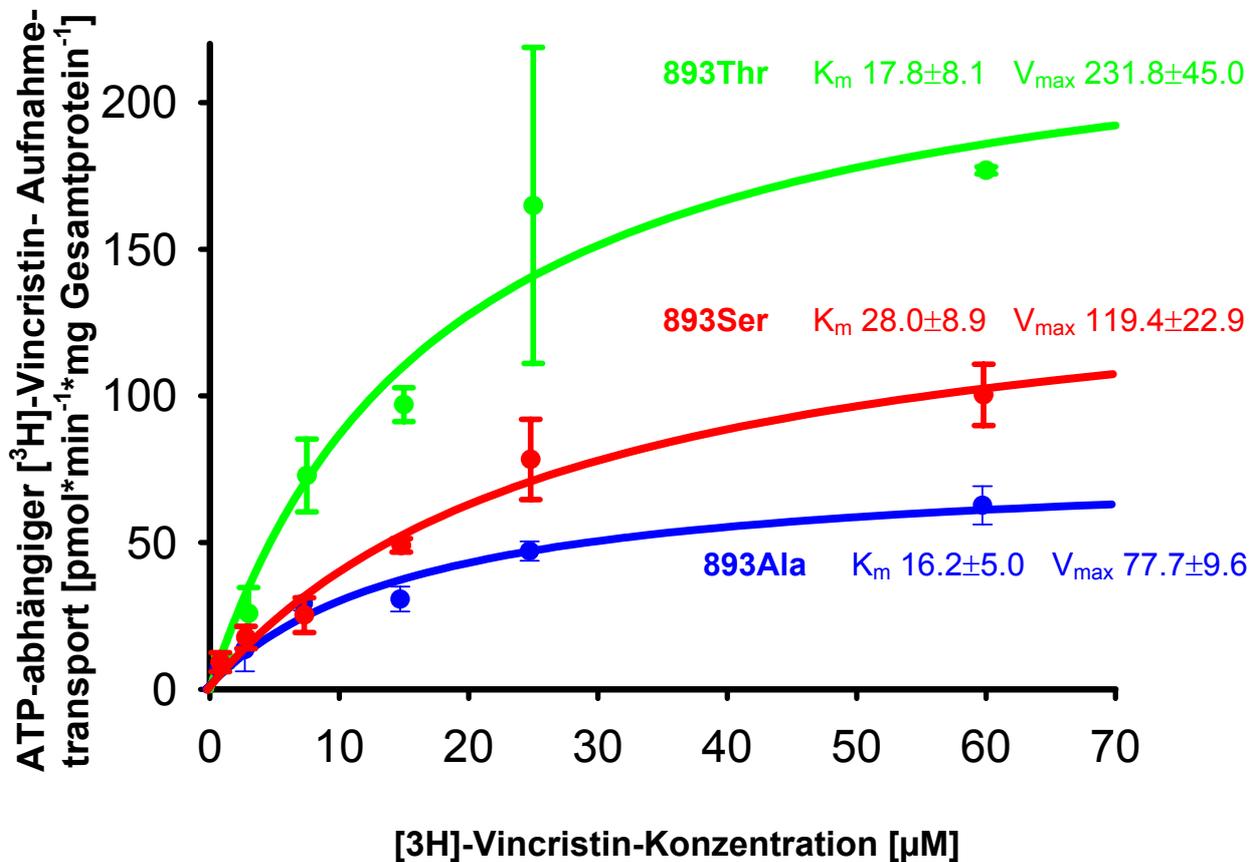
**Abbildung 15** Osmolaritätsabhängigkeit des Vincristin-Transports in Membranvesikel, isoliert aus ABCB1-überexprimierenden HighFive-Insektenzellen.

Membranvesikel (50 µg Protein) wurden 3 min bei 37°C in Gegenwart von 18 µM [<sup>3</sup>H]-Vincristin und verschiedenen Sucrose-Konzentrationen (0.25, 0.33, 0.5, 0.8 M) inkubiert. Der [<sup>3</sup>H]-Vincristin-Transport wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. ATP-abhängiger Aufnahmetransport wurde berechnet durch Subtraktion der Werte in Gegenwart von 4 mM AMP-PNP von den Werten in Gegenwart von 4 mM ATP. Die einzelnen Punkte repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung einer Dreifachbestimmung [n = 3; X ± S].

### 3.4.3 Transportkinetiken

Um Unterschiede im Transportverhalten zwischen ABCB1-Wildtyp und den genetischen Mutanten 893Ser und 893Thr zu bestimmen, wurden Michaelis-Menten-Konstanten  $K_m$  und maximale Transportgeschwindigkeiten  $V_{max}$  für den ATP-abhängigen Aufnahmetransport von Vincristin in Membranvesikel bestimmt, die ABCB1-Varianten überexprimieren. Der vesikuläre Substrattransport aller drei Varianten war sättigbar. Datenpunkte repräsentieren den normalisierten Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung des Vincristin-Aufnahmetransports von zwei unabhängigen Membranvesikelpräparationen. Alle Datenpunkte wurden in die nicht-lineare Kurvendiskussion einbezogen. Die kinetischen Parameter sind in **Tabelle 9** zusammengefaßt. Um die kinetischen Parameter vergleichen zu können, wurden die Transportgeschwindigkeiten auf die ABCB1-Proteinmenge normalisiert.

Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Michaelis-Menten-Konstanten  $K_m$  des ABCB1-Wildtyps [16.2  $\mu\text{M}$ ] und der genetischen Varianten 893Ser [28.0  $\mu\text{M}$ ] und 893Thr [17.8  $\mu\text{M}$ ], jedoch konnte für die 893Ser-Variante eine Tendenz zu höheren  $K_m$ -Werten beobachtet werden. Signifikante Unterschiede bestehen zwischen den  $V_{max}$ -Werten ( $p = 0.01$ ), wo die geringsten Werte für die maximale Transportgeschwindigkeit für den ABCB1-Wildtyp gemessen werden konnten [78  $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg Gesamtprotein}^{-1}$ ].  $V_{max}$  stieg um etwa 50% für die 893Ser-Variante [151  $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg Gesamtprotein}^{-1}$ ] und um etwa das 3-fache für die 893Thr-Variante [241  $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg Gesamtprotein}^{-1}$ ]. Die intrinsische Clearance ( $V_{max} / K_m$ ) war am höchsten bei der 893Thr-Variante [13.5  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg Gesamtprotein}^{-1}$ ] im Vergleich zu ABCB1-Wildtyp [4.8  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg Gesamtprotein}^{-1}$ ] und 893Ser-Variante [5.4  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg Gesamtprotein}^{-1}$ ].



**Abbildung 16** ATP-abhängiger Vincristin-Transport in Membranvesikel, isoliert aus HighFive-Insektenzellen, die ABCB1-Wildtyp (893Ala) oder Mutanten 893Ser bzw. 893Thr exprimieren.

Membranvesikel (50 µg Protein) wurden 3 min inkubiert in Gegenwart steigender [<sup>3</sup>H]-Vincristin-Konzentrationen. Anhand der Datenpunkte wurden mittels SigmaPlot Michaelis-Menten-Kinetiken erstellt. ATP-abhängiger Aufnahmetransport wurde berechnet durch Subtraktion der Werte in Gegenwart von 4 mM AMP-PNP von den Werten in Gegenwart von 4 mM ATP. Die einzelnen Punkte repräsentieren den Mittelwert ± Standardabweichung einer Dreifachbestimmung von jeweils 2 unabhängigen Membranpräparationen. Alle Datenpunkte wurden in die nicht-lineare Kurvenanpassung einbezogen [n = 6; X ± S].

## Ergebnisse

**Tabelle 9** Kinetische Parameter für ATP-abhängigen [<sup>3</sup>H]-Vincristin-Aufnahmetransport in Membranvesikel, isoliert aus Insektenzellen, die ABCB1-893Ala (Wildtyp) oder Mutanten 893Ser bzw. 893Thr überexprimieren [n = 6; X ± S].

	<b>K<sub>m</sub></b> <b>[μM]</b>	<b>relative ABCB1- Protein- expression</b> <b>[Wildtyp = 1,00]</b>	<b>V<sub>max</sub> / rel. ABCB1- Protein- expression *</b> <b>[pmol*min<sup>-1</sup>*mg Gesamtprotein<sup>-1</sup>]</b>	<b>Clearance</b> <b>[V<sub>max</sub> / K<sub>m</sub>]</b> <b>[μl*min<sup>-1</sup>*mg Gesamt- protein<sup>-1</sup>]</b>
<b>ABCB1-893Ala (Wildtyp)</b>	16.2 ± 5.0	1.00 ± 0.19	77.7 ± 9.6	4.8
<b>ABCB1-893Ser</b>	28.0 ± 8.9	1.27 ± 0.12	119.4 ± 22.9	5.4
<b>ABCB1-893Thr</b>	17.8 ± 8.1	1.04 ± 0.02	231.8 ± 45.0	13.5

\* P=0.01 für Vergleich zwischen den Gruppen, bestimmt mittels Oneway ANOVA

Michaelis-Menten-Konstanten K<sub>m</sub> und maximale Transportgeschwindigkeit V<sub>max</sub> wurden mittels nicht-linearer Kurvenanpassung basierend auf den Daten aus **Abbildung 16** berechnet.

Proteinexpression wurde durch Immunoblot-Analyse bestimmt (siehe **Abbildung 13**). V<sub>max</sub> wurde auf die relative Proteinexpression normalisiert (ABCB1-893Ala (Wildtyp) = 1.0). Als Merkmal der Transporteffizienz wurden K<sub>m</sub> / V<sub>max</sub>-Ratios (Clearance) bestimmt.

### **3.4.4 Inhibition des ATP-abhängigen [<sup>3</sup>H]-Vincristin-Transports durch verschiedene ABCB1-Substrate**

Bei einer cis-Inhibitionsstudie werden Substrat und Inhibitor auf der gleichen Seite der (Vesikel-)Membran angeboten. Cis-Inhibitionsstudien wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob es Unterschiede in der Effizienz der Inhibition zwischen dem ABCB1-Wildtyp und seinen genetischen Varianten 893Ser und 893Thr gibt. Als Inhibitoren wurden Verapamil, Digoxin, Didanosin und Fexofenadin eingesetzt [10, 50, 100, 200 μM]. Es konnte gezeigt werden, dass die 893Ser-Variante im Vergleich zu ABCB1-Wildtyp und 893Thr-Variante schwächer auf Digoxin und Didanosin reagierte. Die Effekte für

## Ergebnisse

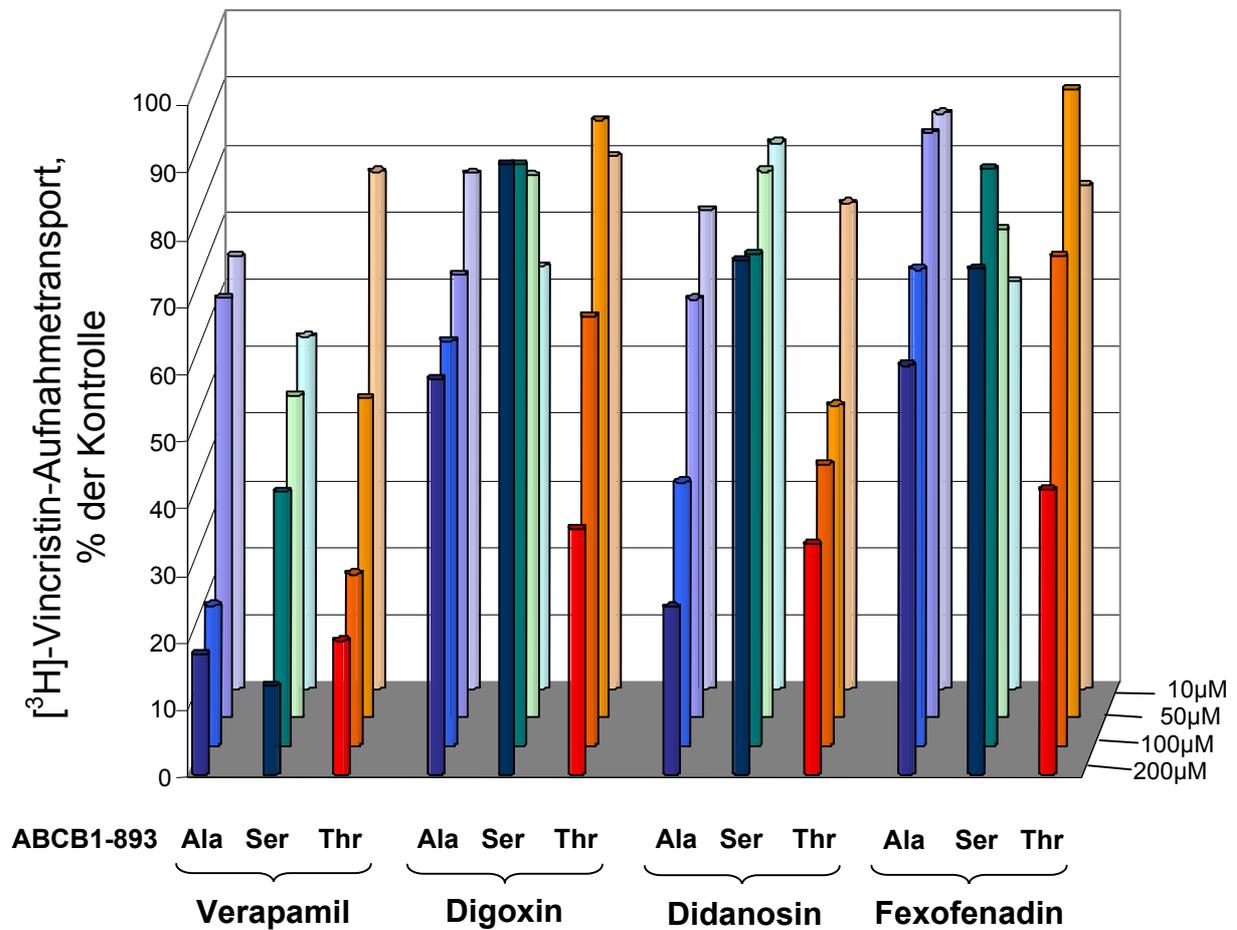
Verapamil und Fexofenadin waren für alle 3 Genotypen identisch, wobei Verapamil der wesentlich effektivere Inhibitor war. Die Effekte der verschiedenen Inhibitoren graphisch dargestellt (**Abbildung 17**). **Tabelle 10** faßt die erhaltenen Daten zusammen.

**Tabelle 10** Einfluß verschiedener Arzneistoffe auf die Effizienz des ATP-abhängigen Vincristin-Aufnahmetransports in Membranvesikel, isoliert aus HighFive-Insektenzellen, die ABCB1-893Ala (Wildtyp) oder Mutanten 893Ser bzw. 893Thr exprimieren.

		[ <sup>3</sup> H]-Vincristin-Aufnahmetransport (% Kontrolle)		
Arzneistoff	Konzentration [µM]	ABCB1-893Ala (Wildtyp)	ABCB1-893Ser	ABCB1-893Thr
Kontrolle	-	100	100	100
Verapamil	10	65 ± 12	53 ± 8	77 ± 22
	50	63 ± 6	48 ± 15	45 ± 14
	100	21 ± 12	38 ± 8	26 ± 13
	200	18 ± 4	13 ± 7	20 ± 7
Digoxin	10	47 ± 15	63 ± 8	79 ± 30
	50	66 ± 13	81 ± 17	89 ± 4
	100	60 ± 18	87 ± 15	64 ± 21
	200	59 ± 22	91 ± 6	37 ± 9
Didanosin	10	71 ± 8	81 ± 25	72 ± 5
	50	62 ± 10	81 ± 19	47 ± 11
	100	39 ± 17	73 ± 30	42 ± 7
	200	25 ± 16	77 ± 24	34 ± 21
Fexofenadin	10	52 ± 13	61 ± 23	75 ± 4
	50	87 ± 2	73 ± 7	94 ± 1
	100	71 ± 4	86 ± 13	73 ± 15
	200	61 ± 9	75 ± 25	43 ± 5

Membranvesikel (50 µg Protein) wurden 3 min bei 37°C in der Gegenwart von 15 µM [<sup>3</sup>H]-Vincristin (Kontrolle) bzw. Vincristin + Verapamil, Digoxin, Didanosin oder Fexofenadin inkubiert. ATP-abhängiger Aufnahmetransport wurde durch Subtraktion der Werte in Gegenwart von 4 mM AMP-PNP von den Werten in Gegenwart von 4 mM ATP berechnet. Transport ist angegeben als % der Kontrolle und repräsentiert den Mittelwert von mindestens 3 unabhängigen Experimenten [n = 9; X ± S].

## Ergebnisse

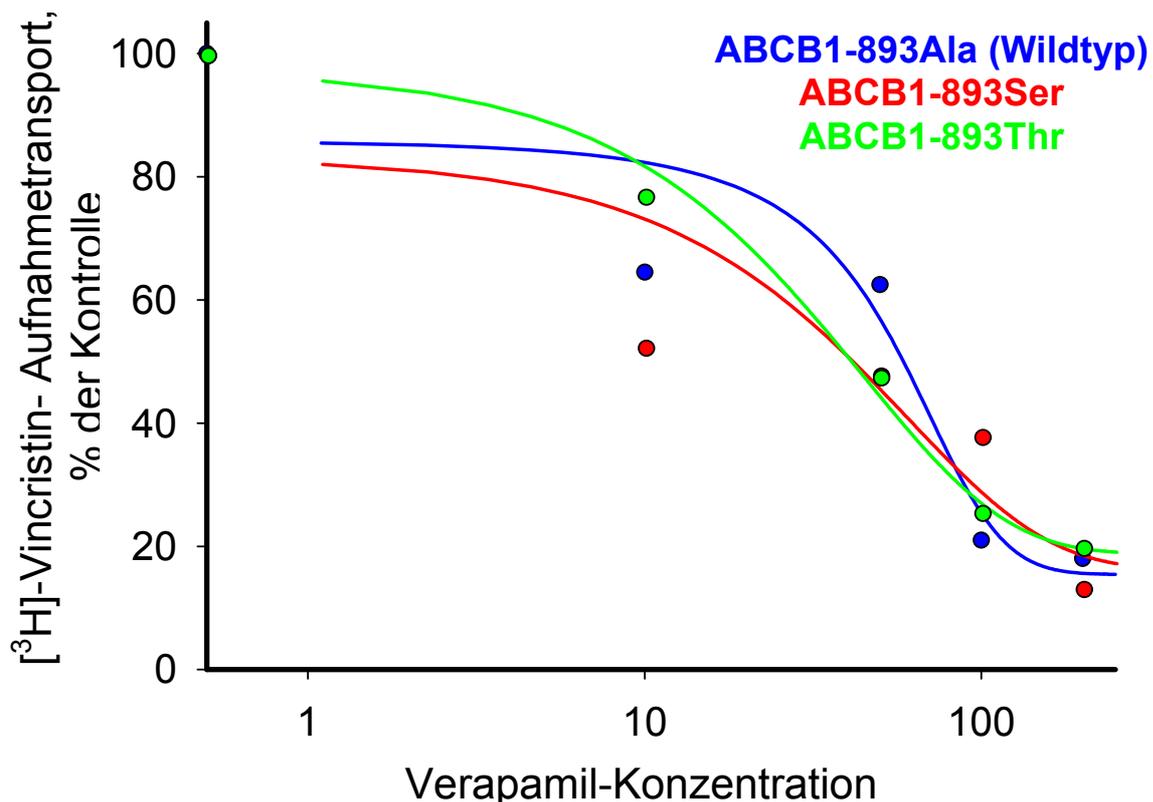


**Abbildung 17** Effekte verschiedener Inhibitoren (Verapamil, Digoxin, Didanosin, Fexofenadin) [% Kontrolle] auf den ATP-abhängigen [<sup>3</sup>H]-Vincristin-Aufnahmeransport in Membranvesikel, isoliert aus HighFive-Insektenzellen, die ABCB1-Wildtyp oder Mutanten 893Ser bzw. 893Thr exprimieren.

Membranvesikel (50 µg Protein) wurden in Gegenwart von 15 µM [<sup>3</sup>H]-Vincristin und steigenden Inhibitor-Konzentrationen [10, 50, 100, 200 µM] für 3 min bei 37°C inkubiert. Dargestellt ist die mittlere Inhibition von 3 unabhängigen Vesikelpräparationen, durchgeführt als Dreifachbestimmung [n = 9].

## Ergebnisse

Die Inhibitorenkonzentrationen, die nötig waren, um eine 50%ige Hemmung des [<sup>3</sup>H]-Vincristin-Aufnahmetransports zu erreichen [sog. IC<sub>50</sub>-Werte], wurden mittels sigmoidaler Kurvendiskussion der Mittelwerte von mindestens zwei unabhängigen Experimenten für jeden Kurvenpunkt bestimmt (**Abbildung 18**). IC<sub>50</sub>-Werte für Verapamil-Inhibition waren für 893Ser- und 893Thr-Variante identisch [41 µM], während der ABCB1-Wildtyp leicht erhöhte Werte zeigte [59 µM]. Für Digoxin- und Fexofenadin-Inhibition konnten IC<sub>50</sub>-Werte nur für die 893Thr-Variante bestimmt werden. Diese waren gegenüber den Werten der Verapamil-Inhibition 3-fach erhöht. Bei Inhibition durch Didanosin waren die IC<sub>50</sub>-Werte des ABCB1-Wildtyps im Vergleich zu Verapamil erhöht [68 versus 59 µM], während die Werte für 893Thr erniedrigt waren [3 versus 41 µM] (**Tabelle 11**).



**Abbildung 18** Inhibitionskurven für die Inhibition des ATP-abhängigen [<sup>3</sup>H]-Vincristin-Aufnahmetransports durch Verapamil

## Ergebnisse

---

**Tabelle 11** Bestimmung der InhibitorKonzentration (Verapamil, Digoxin, Didanosin, Fexofenadin), die den [<sup>3</sup>H]-Vincristin-Aufnahmetransport auf die Hälfte reduziert (IC<sub>50</sub>-Werte).

---

IC<sub>50</sub> -Werte für die Inhibition des [<sup>3</sup>H]-Vincristin-Transports [μM]

	ABCB1-893Ala (Wildtyp)	ABCB1-893Ser	ABCB1-893Thr
Verapamil	59	41	41
Digoxin	-	-	116
Didanosin	68	-	31
Fexofenadin	-	-	112

IC<sub>50</sub>-Werte wurden mittels sigmoidaler Funktionsanpassung der Mittelwerte von mindestens 2 unabhängigen Experimenten für jeden Kurvenpunkt (10, 50, 100, 200 μM) bestimmt [n = 6].