



# **VERGLEICH DER IN-VITRO- TRANSPORTCHARAKTERISTIK GENETISCHER VARIANTEN DES ABC- TRANSMEMBRANTRANSPORTERS MDR1 (ABCB1)**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

MELANIE WOHLFARTH  
aus Waiblingen

März 2006

1. Gutachter: PD Dr. Thomas Gerloff
2. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Hubert Borchert

Disputation am 19.01.2007

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>10</b>
1.1 Bedeutung des Arzneistofftransports für die Pharmakokinetik .....	10
1.2 Transmembrantransporter .....	12
1.2.1 ABC-Transporter .....	13
1.3 Problemstellung .....	24
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>26</b>
2.1 Umklonierung des MDR1.1[pGEM3Zf(-)Xba-MDR1.1]-Vektors in den pFastBac1-Vektor 26	
2.2 Kompletsequenzierung des pFastBac1- ABCB1-Wildtyp-Klons (M14758) .....	26
2.3 Rückmutation der DNA-Basen des pFastBac1-ABCB1-Wildtyp-Klons, die nicht mit der ABCB1-Wildtyp-Sequenz AC002457 / AC005068 übereinstimmen .....	28
2.4 Einfügung der zu untersuchenden Mutationen in den pFastBac1-ABCB1-Wildtyp-Klon (Acc. no. AC002457/AC005068) .....	32
2.5 Übersicht über das Baculovirus-Expressionssystem .....	34
2.5.1 Herstellung rekombinanter Baculoviren .....	35
2.5.2 Virentiterbestimmung .....	36
2.5.3 Herstellung von Viren-Arbeitslösungen .....	38
2.5.4 Expression von ABCB1 auf HighFive-Insektenzellen und Vesikelpräparation nach Behandlung der Zellen mit rekombinanten Viren .....	38
2.5.5 Bestimmung des Gesamt-RNA-Gehalts von Sf9-Zellen, die mit rekombinanten ABCB1-Baculoviren infiziert wurden .....	39
2.5.6 ABCB1-RNA-Konzentrationsbestimmung mittels quantitativer RealTime-PCR am LightCycler™ .....	40
2.5.7 Western Blots .....	41
2.5.8 Transport Assays .....	42
2.6 Schema der durchgeführten Versuche .....	44
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>3.1</b>	<b>Bestimmung des Gesamt-RNA-Gehalts von Sf9-Zellen, die mit rekombinanten ABCB1-Baculoviren infiziert wurden</b> .....	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>ABCB1-RNA-Konzentrationsbestimmung mittels quantitativer RealTime-PCR am LightCycler™</b> .....	<b>45</b>
<b>3.3</b>	<b>Analyse der Proteinexpression des ABCB1-Wildtyps und der genetischen Varianten 893Ser und 893Thr in Membranvesikeln mittels Immunoblot</b> .....	<b>47</b>
3.3.1	Vergleich der ABCB1-Expression in Sf9- und HighFive™-Insektenzellen .....	47
3.3.2	Überprüfung und Einstellung der Bedingungen zur Proteinexpressions-analyse mittels Immunoblot .....	48
3.3.3	ABCB1-Expression in HighFive-Vesikelpräparationen, die zur Bestimmung des ATP-abhängigen [ <sup>3</sup> H]-Vincristin-Aufnahmetransports eingesetzt wurden .....	49
<b>3.4</b>	<b>ATP-abhängiger Aufnahmetransport von [<sup>3</sup>H]-Vincristin in Membranvesikeln isoliert aus Insektenzellen, die ABCB1-Wildtyp oder die Mutanten 893Ser bzw. 893Thr exprimieren</b> .....	<b>51</b>
3.4.1	Zeitabhängigkeit .....	51
3.4.2	Osmolaritätsabhängigkeit .....	53
3.4.3	Transportkinetiken .....	55
3.4.4	Inhibition des ATP-abhängigen [ <sup>3</sup> H]-Vincristin-Transports durch verschiedene ABCB1-Substrate .....	57
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>62</b>
<b>4.1</b>	<b>Allgemeines</b> .....	<b>62</b>
<b>4.2</b>	<b>ABCB1-Expression</b> .....	<b>64</b>
<b>4.3</b>	<b>Transportkinetiken</b> .....	<b>65</b>
4.3.1	Ergebnisse.....	65
4.3.2	Einordnung in den aktuellen Forschungskontext: <i>IN VITRO</i> -Studien .....	67
4.3.3	Einordnung in den aktuellen Forschungskontext : <i>IN VIVO</i> -Studien .....	68
4.3.4	Übersicht über den Zusammenhang unserer Ergebnisse mit anderen <i>In vitro</i> - und <i>In vivo</i> -Studien	71
<b>4.4</b>	<b>cis-Inhibitionsstudien</b> .....	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>78</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>ANHANG .....</b>	<b>87</b>
<i>ANHANG I Abbildungsverzeichnis.....</i>	<i>87</i>
<i>ANHANG II Tabellenverzeichnis.....</i>	<i>89</i>
<i>ANHANG III Publikationsliste.....</i>	<i>90</i>
<i>ANHANG IV Lebenslauf.....</i>	<i>91</i>
<i>ANHANG V Danksagung.....</i>	<i>92</i>