

ANHANG

Anhang I Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1a,b</i> Mechanismen für den Transport durch Membranen für endogene Stoffe, Arznei- und Fremdstoffe	11
<i>Abbildung 2</i> Lokalisation von Transmembran-Transportern	13
<i>Abbildung 3</i> Lokalisation von ABCB1 in der Lipiddoppelschicht (nach Meibohm et al. und Higgins et al. [26])	17
<i>Abbildung 4</i> Mögliche ABCB1-Transportmechanismen (nach Meibohm et al.)	18
<i>Abbildung 5</i> ABCB1-Struktur und ABCB1-SNPs (nach Ambudkar et al, 2003 [52])	20
<i>Abbildung 6</i> Prinzip Site directed mutagenesis (nach „QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit, Instruction Manual“, Stratagene, Amsterdam, Niederlande)	29
<i>Abbildung 7</i> Übersicht über das Baculovirus-Expressionssystem (nach „Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, Instruction Manual“, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)	34
<i>Abbildung 8</i> Kontroll-PCR mit pUC/M13-Primern für rekombinante Bacmid-DNA	35
<i>Abbildung 9</i> Schema der durchgeführten Versuche	44
<i>Abbildung 10</i> Konzentrationsabhängigkeit des Gesamt-RNA-Gehalts von der Anzahl an Sf9-Zellen	46
<i>Abbildung 11</i> Vergleich der ABCB1-Expression in Sf9- und HighFive-Insektenzellen ..	48
<i>Abbildung 12</i> Western Blot zur Überprüfung der Quantifizierbarkeit mittels Auftrag steigender Gesamtproteinmengen	49
<i>Abbildung 13.</i> Immunoblot-Analyse des ABCB1-Wildtyps und der Mutanten 893Ser und 893Thr in Membranvesikelpräparationen	50
<i>Abbildung 14</i> Zeitprofile für ATP-abhängigen Vincristin-Aufnahmetransport in Membranvesikel, isoliert aus ABCB1-überexprimierenden (dunkelblau) oder nicht-infizierten (hellblau) HighFive-Insektenzellen.	52
<i>Abbildung 15</i> Osmolaritätsabhängigkeit des Vincristin-Transports in Membranvesikel, isoliert aus ABCB1-überexprimierenden HighFive-Insektenzellen.	54

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 16 ATP-abhängiger Vincristin-Transport in Membranvesikel, isoliert aus HighFive-Insektenzellen, die ABCB1-Wildtyp (893Ala) oder Mutanten 893Ser bzw. 893Thr exprimieren.....	56
Abbildung 17 Effekte verschiedener Inhibitoren (Verapamil, Digoxin, Didanosin, Fexofenadin) [% Kontrolle] auf den ATP-abhängigen [³ H]-Vincristin-Aufnahmeransport in Membranvesikel, isoliert aus HighFive-Insektenzellen, die ABCB1-Wildtyp oder Mutanten 893Ser bzw. 893Thr exprimieren.	59
Abbildung 18 Inhibitionskurven für die Inhibition des ATP-abhängigen [³ H]-Vincristin-Aufnahmetransports durch Verapamil.....	60
Abbildung 19 Schematische Darstellung: Passive Diffusion eines lipophilen, radioaktiv markierten Arzneistoffs (z.B. Vincristin) in die Vesikelmembran und aktiver Weitertransport über ABCB1 in das Innere von Inside-out-Vesikeln.....	66
Abbildung 20 Einfluß hoher Substratkonzentrationen auf den Transport über ABCB1 .	71
Abbildung 21 Einfluß niedriger Substratkonzentrationen auf den Transport über ABCB1	72

Anhang II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Arzneistoffe, die über ABCB1 transportiert werden [12;21]	15
Tabelle 2 Übersicht über bekannte ABCB1-Polymorphismen [13;14;44].....	21
Tabelle 3 Sequenzierprimer zur Komplettssequenzierung des ABCB1-Inserts.....	27
Tabelle 4 Sequenzunterschiede pFastBac1-ABCB1-Wildtyp-Klon (Acc.no. M14758) und ABCB1-Wildtyp-Sequenz nach Hoffmeyer et al. (Acc. no. AC002457/AC05068)	27
Tabelle 5 Mismatch-Primer zur Rückmutation des pFastBac1-ABCB1-Klons M14758 zum Erhalt der AC002457/ AC005068-Sequenz	30
Tabelle 6 Sequenzierprimer zur Überprüfung der zurückmutierten Positionen.....	31
Tabelle 7 Mismatch-Primer zur Einfügung der Mutationen in den pFastBac1-ABCB1-Wildtyp-Klon (Acc. no. AC002457/ AC005068)	32
Tabelle 8 Sequenzierprimer zur Überprüfung der eingefügten Punktmutationen	33
Tabelle 9 Kinetische Parameter für ATP-abhängigen [³ H]-Vincristin-Aufnahmetransport in Membranvesikel, isoliert aus Insektenzellen, die ABCB1-893Ala (Wildtyp) oder Mutanten 893Ser bzw. 893Thr überexprimieren [n = 6; X ± S].....	57
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.	58
Tabelle 11 Bestimmung der Inhibitorkonzentration (Verapamil, Digoxin, Didanosin, Fexofenadin), die den [³ H]-Vincristin-Aufnahmetransport auf die Hälfte reduziert (IC ₅₀ -Werte).....	61

Anhang III Publikationsliste

Originalarbeiten

Schaefer M.: Bedeutung genetischer Polymorphismen des MDR1-Gens für die Single-Dose-Kinetik von Digoxin. **Diplomarbeit**, Universität Greifswald, Dezember 2002

Gerloff T, **Schaefer M**, Johne A *et al.* MDR1 genotypes do not influence the absorption of a single oral dose of 1mg digoxin in healthy white males. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 2002;54:610-616

Gerloff T, **Schaefer M**, Mwinyi J *et al.*: Influence of *OATP1B1 (SLCO1B1)* *1b and *5 haplotypes on pravastatin's cholesterol lowering capabilities and basal sterol levels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacol.* 2005

Schaefer M, Roots I, Gerloff T: *In vitro* transport characteristics discriminate wildtype MDR1 (ABCB1) from Ala893Ser and Ala893Thr polymorphisms. *Pharmacogenetics Genomics* 2005, eingereicht, **Publikation zu Ergebnissen dieser Dissertation**

Mwinyi J, Köpke K, **Schaefer M**, Roots I, Gerloff T: Comparison of *OATP1B1 (SLCO1B1)* sequence variability between a German, Turkish, and African population, eingereicht

Abstracts

Gerloff T, Geier A, **Schaefer M**, Gartung C, Roots I: Initial adaptive gene regulation following estradiol-mediated liver injury can be differentiated from obstructive cholestasis. *Drug Metab. Rev.* 2003; 35:212 Abstract

Schaefer M, Roots I, Gerloff T: *In vitro* transport characteristics discriminate wildtype MDR1 (ABCB1) from Ala893Ser and Ala893Thr polymorphisms. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2005 ; 61(9) :718

Anhang IV Lebenslauf

Anhang V Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Pharmakologie der Charité, Humboldt-Universität Berlin angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Gerloff für die Bereitstellung des Themas und die intensive Betreuung der Dissertation. Durch eine gute und angenehme Arbeitsatmosphäre, stetige Hilfsbereitschaft und wissenschaftlichen Austausch, konnte diese Arbeit erfolgreich durchgeführt werden.

Besonders möchte ich mich bei Ulrike Ehlert bedanken, die durch ihr persönliches Engagement im Labor und ihre Freundschaft einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hat.

Prof. Dr. I. Roots danke ich für die Betreuung der Dissertation als Leiter des Instituts für Klinische Pharmakologie der Charité, Humboldt-Universität Berlin.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. H.-H. Borchert für seine Bereitschaft, die Dissertation am Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Biochemie, der Freien Universität Berlin zu betreuen.

Mein Dank gilt besonders auch meinen Laborkollegen und –nachbarn in der Ziegelstraße für die angenehme Zusammenarbeit – und so manch nettes Gespräch und aufmunternde Worte zwischendurch.

Ein herzlicher Dank geht an all meine Freunde, die mich während der vergangenen Jahre stets unterstützt und mir immer wieder Kraft gegeben haben.

Ohne meine Familie wäre all dies nicht möglich gewesen. Menschen zu haben, auf die man immer zählen kann, ist ein großes Geschenk. Besonders danke ich hier meinen Eltern Klaus und Marianne Schäfer, meinem Bruder Thomas und meinem Ehemann Sebastian.