

**Metabolismus und pharmakodynamische Effekte
des Zytostatikums Busulfan
als Ursache unerwünschter Arzneimittelwirkungen:
molekulare und klinische Untersuchungen**

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Christoph Ritter
aus Backnang



Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Leukämien	1
1.1.1	Akute lymphatische Leukämie	2
1.1.2	Akute myeloische Leukämie	3
1.1.3	Chronische lymphatische Leukämie	4
1.1.4	Chronische myeloische Leukämie	5
1.2	Busulfan	6
1.3	Venöse Verschlusskrankung	7
1.4	Biotransformation und Glutathion-S-Transferasen	8
1.5	Aufgabenstellung	9
2	Ergebnisse	10
2.1	Bestimmung der Aktivität von Glutathion-S-Transferasen	10
2.1.1	GC-MS-Analytik	10
2.1.1.1	Vorbemerkung	10
2.1.1.2	Chromatogramme	11
2.1.1.3	Validierung	12
2.1.2	In vitro-Inkubationen	14
2.1.2.1	Proteinabhängigkeit	14
2.1.2.2	Zeitabhängigkeit	15
2.1.2.3	GSH-Abhängigkeit	16
2.1.2.4	pH-Abhängigkeit	17
2.1.2.5	Enzymkinetik	17
2.1.2.6	Inkubation rekombinanter Glutathion-S-Transferasen	18
2.2	Untersuchungen am Zellmodell	19
2.2.1	Etablierung des Zellmodells	19
2.2.1.1	Auswahl der Zelllinie	20
2.2.1.2	Transfektionsvektor	21
2.2.1.3	Klonierung der cDNA	22
2.2.1.4	Transfektion	23
2.2.1.5	Nachweis der transfizierten Proteine	25
2.2.1.6	Nachweis der Proteinaktivität	27
2.2.2	Untersuchungen zur Zytotoxizität von Busulfan	28
2.2.2.1	Zellzahl und Viabilität	28
2.2.2.2	Zellzyklusanalyse	31
2.2.2.3	Bestimmung der Cdc2-Kinaseaktivität	34

2.2.3	Untersuchung endothelspezifischer Proteine	35
2.2.3.1	Tissue Faktor	36
2.2.3.2	Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI)-1	36
2.3	Untersuchungen im Rahmen einer klinischen Studie	38
2.3.1	Zielstellung	38
2.3.2	Studiendesign und Patientencharakteristik	38
2.3.3	LC-MS-Analytik	39
2.3.3.1	Vorbemerkung	39
2.3.3.2	Validierung	40
2.3.4	Pharmakokinetik	42
3	Diskussion	45
4	Zusammenfassung	59
5	Material und Methoden	61
5.1	Material	61
5.1.1	Bakterien und Zelllinien	61
5.1.2	Primer	61
5.1.3	cDNA	61
5.1.4	Allgemein verwendete Chemikalien, Enzyme und Medien	62
5.1.5	Lösungen, Puffer und Medien	64
5.1.6	Geräte und Hilfsmittel	67
5.2	Methoden	68
5.2.1	Analytische Methoden	68
5.2.1.1	Bestimmung von Enzymaktivitäten	68
5.2.1.1.1	Präparation von Leberzytosol	68
5.2.1.1.2	Inkubation von Leberzytosol mit Busulfan	68
5.2.1.1.3	Inkubation von rekombinanten GSTs	68
5.2.1.1.4	Kalibrierung und Standardisierung	69
5.2.1.1.5	Instrumente und Bedingungen	69
5.2.1.1.6	Validierung der Methode	70
5.2.1.2	Bestimmung von Plasmaspiegeln	70
5.2.1.2.1	Probenaufbereitung	70
5.2.1.2.2	Kalibrierung und Standardisierung	71
5.2.1.2.3	Instrumente und Bedingungen	71
5.2.1.2.4	Validierung der Methode	72
5.2.2	Molekularbiologische Methoden	72
5.2.2.1	Transformation von Bakterien mit Plasmiden	72
5.2.2.2	Isolierung von Plasmiden aus Bakterien	72
5.2.2.3	Quantifizierung von Nucleinsäuren	73
5.2.2.4	Präparativer Verdau von Plasmid-DNA	73
5.2.2.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	74

5.2.2.6	Isolierung von cDNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	74
5.2.2.7	Ethanolpräzipitation	74
5.2.2.8	Dephosphorylierung von linearisierten Vektoren	74
5.2.2.9	Phenol/Chloroform-Extraktion	75
5.2.2.10	Ligasereaktion	75
5.2.2.11	Nukleotidsequenzanalyse	75
5.2.3	Zellbiologische Methoden	77
5.2.3.1	Zellkultivierung	77
5.2.3.2	Bestimmung der Zellzahl	78
5.2.3.2.1	Lebendzellzahl mit der Neubauerzählkammer	78
5.2.3.2.2	Lebendzellzahl mit der MIT-Reaktion	78
5.2.3.2.3	Elektrische Zellzahlbestimmung	78
5.2.3.3	Kultivierung von Zellen unter Substanzeinwirkung	79
5.2.3.4	Kryokonservierung von Zellen	79
5.2.3.5	Transfektion von Zellen mit Plasmiden	80
5.2.3.6	Isolierung einzelner Zellklone	80
5.2.3.7	Herstellung von Zelllysaten	80
5.2.3.8	Fixierung von Zellen	81
5.2.4	Proteinanalytische Methoden	81
5.2.4.1	Quantifizierung des Proteingehalts	81
5.2.4.2	Vorbereitung der Proben zur elektrophoretischen Trennung	81
5.2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	82
5.2.4.4	Transfer und Immundetektion	83
5.2.4.5	Immunfluoreszenz	85
5.2.5	Durchflusszytometrische Methoden	85
5.2.5.1	Ermittlung der Transfektionseffizienz	86
5.2.5.2	DNA-Gehaltsmessung mit Propidiumiodid	86
5.2.6	ELISAs	87
5.2.6.1	Bestimmung der Cdc2-Aktivität	87
5.2.6.2	Bestimmung der Konzentration von PAI-1	87
5.2.7	RNA-analytische Methoden	88
5.2.7.1	Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen	88
5.2.7.2	Untersuchung der RNA-Integrität mittels Gelelektrophorese	89
5.2.7.3	Herstellung der cRNA-Sonde zur Northern Blot-Hybridisierung	89
5.2.7.4	Northern Blot	90
5.2.8	Klinische Studie	90
5.2.8.1	Patientencharakteristik	91
5.2.8.2	Studiendesign	91
5.2.9	Statistische und mathematische Methoden	92
6	Literaturverzeichnis	93