

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungen	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Phase I und Phase II im Arzneistoffmetabolismus	1
1.2 Die Cytochrom-P450-Enzyme	2
1.3 Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen	5
1.4 Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes	8
1.4.1 CYP1A2.....	10
1.4.2 CYP2B11.....	13
1.4.3 CYP2C21 und CYP2C41	14
1.4.4 CYP2D15.....	15
1.4.5 CYP3A12.....	17
1.5 Funktionelle Messungen	18
1.6 Zielsetzung der Arbeit	20
2 MATERIAL	22
2.1 Molekularbiologisches Material	22
2.1.1 Allgemeines	22
2.1.2 Enzyme.....	22
2.1.3 Vektoren	23
2.1.4 Bakterienstämme	24
2.1.5 cDNA	24
2.1.6 Quantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR).....	24
2.1.7 Längenstandards	25
2.1.8 Kommerziell erhältliche Kits und Materialien	25
2.1.9 Puffer und Medien.....	26
2.2 Agarosegelektrophorese.....	26
2.2.1 Native Agarosegelektrophorese (DNA)	26
2.2.2 Denaturierende Agarosegelektrophorese (RNA).....	27
2.3 Chemische Substanzen und Reagenzien.....	28
2.4 Geräte	28
2.5 Verbrauchsmaterial	29
2.6 Bioinformatische Programme und Datenbanken	29
3 METHODEN	31
3.1 Allgemeine Methoden in der Molekularbiologie	31
3.1.1 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung.....	31
3.1.2 Native Agarosegelektrophorese	32
3.1.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	33

3.1.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab.....	33
3.2 Isolierung und Aufarbeitung von RNA	34
3.2.1 Probenmaterial	34
3.2.2 Isolierung von Total-RNA aus Geweben	36
3.2.3 Denaturierende Agarosegelektrophorese	37
3.2.4 DNase-Verdau.....	38
3.2.5 RNA-Aufreinigung	39
3.2.6 RNA-Quantifizierung mittels <i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i>	40
3.2.7 cDNA-Synthese aus Total-RNA	42
3.2.8 Isolierung von genomischer DNA aus Blut.....	43
3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	44
3.3.1 Allgemeine Regeln zur Primerauswahl.....	44
3.3.2 PCR-Reaktionsansatz.....	45
3.3.3 Standard-PCR	46
3.3.4 Quantitative <i>real-time</i> PCR	46
3.4 DNA-Klonierung	48
3.4.1 TOPO-Klonierung	49
3.4.2 Transformation.....	49
3.5 Sequenzierung und Auswertung von Sequenzspuren	50
3.6 Referenzsequenzen	53
3.6.1 CYP1A2.....	53
3.6.2 CYP2B11.....	53
3.6.3 CYP2C21.....	54
3.6.4 CYP2D15.....	54
3.6.5 CYP3A12.....	54
3.6.6 CYP2C41.....	54
4 ERGEBNISSE	55
4.1 Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes	55
4.1.1 CYP1A2-Sequenzpolymorphismen.....	55
4.1.2 CYP2B11-Sequenzpolymorphismen	57
4.1.3 CYP2C21-Sequenzpolymorphismen	57
4.1.4 CYP2D15-Sequenzpolymorphismen	58
4.1.5 CYP3A12-Sequenzpolymorphismen	62
4.1.6 Erstbeschreibung des CYP2C41-Gens	65
4.1.7 Zusammenfassung der Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes	77
4.2 Expressionsunterschiede in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes	78
4.2.1 RNA-Quantifizierung mittels <i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i>	78
4.2.2 Expression mit den Housekeeping-Genen B2M und ACTB.....	79
5 DISKUSSION.....	85
5.1 Polymorphismen in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes	86
5.1.1 CYP1A2.....	92
5.1.2 CYP2B11	92
5.1.3 CYP2C21.....	92

5.1.4 CYP2D15.....	93
5.1.5 CYP3A12.....	96
5.1.6 CYP2C41.....	96
5.2 Beurteilung der Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) mittels SIFT	98
5.2.1 Allgemeine Methodik.....	99
5.2.2 Wie funktioniert SIFT?	100
5.2.3 Aussagekraft von SIFT und funktionelle Relevanz	101
5.3 Expressionsunterschiede in den Cytochrom-P450-Enzymen des Hundes	103
6 ZUSAMMENFASSUNG	105
7 SUMMARY	107
8 LITERATURVERZEICHNIS.....	109
9 ANHANG	116
10 DANKSAGUNGEN	124