

# **INAUGURAL - DISSERTATION**

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich- Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht- Karls- Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Apothekerin Tanja Richter  
aus Bremerhaven  
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 2005

**Untersuchungen zur inter- und  
intraindividuellen Variabilität der  
enzymatischen Funktion von Cytochrom P450  
CYP2B6**

Gutachter: Prof. Dr. Gert Fricker  
PD. Dr. Ulrich Zanger

---

INHALTSVERZEICHNIS .....	I
DANKSAGUNG .....	X
ABKÜRZUNGEN .....	XI
ZUSAMMENFASSUNG.....	XII
SUMMARY .....	XIII
1 ... EINLEITUNG .....	1
1.1 Arzneimittelstoffwechsel und die Cytochrom P450-Superfamilie.....	1
1.1.1 Arzneimittelstoffwechsel und Transport .....	1
1.1.2 Cytochrom-P450-Enzyme.....	3
1.1.3 Ursachen für inter- und intraindividuelle Unterschiede im Arzneimittelmetabolismus .....	6
1.1.4 Enzyminhibition.....	7
1.1.5 Enzyminduktion.....	7
1.1.6 Genetische Polymorphismen .....	8
1.2 Cytochrom P450 2B6 .....	10
1.3 Ziele der Arbeit .....	14
2 ... MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Chemikalien, Antikörper, rekombinante Proteine, Enzyme und Zellen .	15
2.1.2 Geräte und Hilfsmittel .....	17
2.1.3 Software.....	18
2.1.4 Lösungen, Puffer, Nährmedien .....	18
2.1.4.1 Puffer zur Präparation von Lebermikrosomen .....	18
2.1.4.2 Puffer und Lösungen für SDS-Page und Western Blot.....	18
2.1.4.3 Puffer zur Herstellung von Mikrosomen aus COS-1 Zellen .....	20
2.1.4.4 Nährmedien.....	20
2.1.4.5 Lösungen für die $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung .....	21
2.1.4.6 Puffer und Lösungen für Cytochrom-P450-Aktivitätsbestimmungen .. .....	21

2.1.4.7	Puffer und Lösungen zur Proteinaufarbeitung aus humanen Hepatozyten .....	21
2.2	Methoden .....	23
2.2.1	Gewebe aus der Leberbank.....	23
2.2.2	Präparation von Lebermikrosomen .....	23
2.2.3	Proteinanalytische Methoden.....	24
2.2.3.1	Bestimmung des Proteingehaltes.....	24
2.2.3.2	Probenaufarbeitung zur elektrophoretischen Trennung .....	24
2.2.3.3	Herstellung von Kalibrierlösungen aus rekombinanten Enzymen...	24
2.2.3.4	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese .....	26
2.2.3.5	Western Blot.....	26
2.2.3.6	Detektion von Proteinen .....	27
2.2.3.7	Quantifizierung von Proteinen .....	28
2.2.4	Analytische Methoden.....	28
2.2.4.1	Bestimmung der S-Mephenytoin-Metabolite Nirvanol und 4'-Hydroxymephenytoin.....	28
2.2.4.1.1	Reinsubstanzen .....	28
2.2.4.1.2	Lösungen .....	29
2.2.4.1.3	Kalibrierung.....	29
2.2.4.1.4	Chromatographie .....	30
2.2.4.1.5	Massenspektrometrie.....	31
2.2.4.2	Bestimmung des Bupropion-Metaboliten Hydroxybupropion.....	31
2.2.4.2.1	Reinsubstanzen .....	31
2.2.4.2.2	Lösungen .....	32
2.2.4.2.3	Kalibrierung.....	32
2.2.4.2.4	Chromatographie .....	33
2.2.4.2.5	Massenspektrometrie.....	34
2.2.4.3	Bestimmung der Verapamil-Metabolite D-617, D-620, Norverapamil, D-702 und D-703.....	34
2.2.4.3.1	Reinsubstanzen .....	34
2.2.4.3.2	Lösungen .....	35
2.2.4.3.3	Kalibrierung.....	35
2.2.4.3.4	Chromatographie .....	36
2.2.4.3.5	Massenspektrometrie.....	37

2.2.4.4	Bestimmung des Propafenon-Metaboliten 5-Hydroxypropafenon ..	37
2.2.4.4.1	Reinsubstanzen .....	37
2.2.4.4.2	Lösungen .....	38
2.2.4.4.3	Kalibrierung.....	38
2.2.4.4.4	Chromatographie .....	39
2.2.4.4.5	Massenspektrometrie.....	39
2.2.4.5	Bestimmung des Coumarin-Metaboliten Umbelliferon .....	40
2.2.4.5.1	Reinsubstanzen .....	40
2.2.4.5.2	Lösungen .....	40
2.2.4.5.3	Kalibrierung.....	41
2.2.4.5.4	Fluorometrie.....	41
2.2.4.6	Bestimmung des 7-Ethoxycoumarin-Metaboliten Umbelliferon .....	42
2.2.4.6.1	Reinsubstanzen .....	42
2.2.4.6.2	Lösungen .....	42
2.2.4.6.3	Kalibrierung.....	43
2.2.4.7	Messung des Clopidogrel-Abbaus.....	43
2.2.4.7.1	Reinsubstanzen .....	43
2.2.4.7.2	Lösungen .....	43
2.2.4.7.3	Kalibrierung.....	44
2.2.4.7.4	Chromatographie .....	44
2.2.4.7.5	Massenspektrometrie.....	45
2.2.5	In-vitro-Inkubationen zur Bestimmung der Cytochrom P450- Enzymaktivitäten.....	46
2.2.5.1	S-Mephenytoin-N-Demethylase- und 4'-Hydroxylase-Aktivität .....	46
2.2.5.2	Bupropion-Hydroxylase-Aktivität .....	47
2.2.5.3	Verapamil-O-Dealkylierung und N-Dealkylierung .....	48
2.2.5.4	Propafenon-5-Hydroxylierung.....	49
2.2.5.5	Coumarin-Hydroxylierung.....	50
2.2.5.6	7-Ethoxycoumarin-Deethylierung .....	50
2.2.5.7	Clopidogrel-Metabolismus .....	51
2.2.6	In-vitro- Inhibition der S-Mephenytoin-N-Demethylierung .....	52
2.2.6.1	Inhibition mit Sulfaphenazol.....	52
2.2.6.1.1	Substanzen, Lösungen .....	52
2.2.6.1.2	Durchführung .....	52

---

2.2.6.2	Inhibition mit anti-CYP3A4/3A5 .....	52
2.2.6.2.1	Durchführung .....	52
2.2.7	Untersuchungen der CYP- Inhibition durch Thiotepa, Clopidogrel und Ticlopidin .....	53
2.2.7.1	Einfluss von Thiotepa, Clopidogrel und Ticlopidin auf die CYP2B6-Aktivität .....	53
2.2.7.2	Untersuchungen zur irreversiblen CYP2B6-Inhibtion .....	53
2.2.7.2.1	Dialyse .....	53
2.2.7.2.2	CO-Differenz-Spektroskopie .....	53
2.2.7.2.2.1	Probeninkubation .....	54
2.2.7.2.2.2	Photometrie .....	54
2.2.7.2.2.3	Quantifizierung von P450 .....	54
2.2.7.2.3	Bestimmung inhibitorischer Parameter .....	54
2.2.7.2.3.1	Bestimmung der enzymatischen Restaktivität von CYP2B6 .	55
2.2.7.2.3.2	Datenanalyse .....	55
2.2.7.2.4	Einfluss von Radikalfängern und Abfangreagenzien auf die CYP2B6-Inhibition .....	56
2.2.7.2.4.1	Lösungen .....	56
2.2.7.2.4.2	Durchführung .....	56
2.2.7.2.5	Einfluss anderer CYP2B6-Substrate auf die CYP2B6-Inhibition .	56
2.2.7.2.5.1	Lösungen .....	56
2.2.7.2.5.2	Durchführung .....	57
2.2.7.3	Untersuchung zur Selektivität der CYP-Inhibition .....	57
2.2.8	Bestimmung der NADPH:P450-Oxidoreduktase-Aktivität .....	58
2.2.8.1	Lösungen .....	58
2.2.8.2	Photometrie .....	59
2.2.8.3	Berechnung der NADPH:P450-Oxidoredukatase-Aktivität .....	59
2.2.9	Untersuchungen zum Metabolismus und zur Expression von Cytochrom P450-Enzymen an humanen Hepatozyten .....	60
2.2.9.1	Kultivierung von humanen Hepatozyten .....	60
2.2.9.2	Inkubationen von humanen Hepatozyten mit Arzneistoffen .....	60
2.2.9.2.1	Lösungen .....	60
2.2.9.2.2	Durchführung .....	60
2.2.9.3	Induktion von humanen Hepatozyten mit Arzneistoffen .....	61

2.2.9.4	Lösungen.....	61
2.2.9.4.1	Durchführung .....	61
2.2.9.4.2	Aufarbeitung von primären Hepatozyten zur Proteinanalytik .....	61
2.2.10	Expression von rekombinanten Cytochrom P450 2B6-Varianten in COS-1 Zellen .....	61
2.2.10.1	Subkultivierung von COS-1 Zellen .....	62
2.2.10.2	Zellzahlbestimmung .....	62
2.2.10.3	Auftauen von kryokonservierten Zellen .....	62
2.2.10.4	Vorbereitung der Zellen zur Transfektion .....	62
2.2.10.5	Transfektion mit Lipofectamin <sup>TM</sup> 2000.....	63
2.2.10.6	Transfektion mit DEAE-Dextran .....	63
2.2.10.7	Ernte der COS-1 Zellen und Präparation von Mikrosomen .....	64
2.2.10.8	Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität .....	64
2.2.10.8.1	Präparationen der Zellextrakte .....	64
2.2.10.8.2	Messung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität.....	65
2.2.10.8.3	Normierung der Mikrosomenpräparationen auf $\beta$ - Galaktosidaseeinheiten .....	65
2.2.10.9	Bestimmung der Bupropion-Hydroxylase-Aktivität .....	65
2.2.11	Charakterisierung der in <i>Tn5</i> -Zellen exprimierten CYP2B6-Varianten..	66
2.2.11.1	CYP2B6-Varianten .....	66
2.2.11.2	Bestimmung des aktiven P450 .....	66
2.2.11.3	Probeninkubation und Photometrie .....	67
2.2.11.4	Bestimmung der Bupropionhydroxylaseaktivität.....	67
2.2.11.4.1	NADPH:P450-Oxidoreduktase (Ratte) .....	67
2.2.11.4.2	Probeninkubation .....	67
2.2.11.4.3	Probeninkubation mit Cytochrom b5 .....	68
2.2.11.4.4	Probeninkubationen mit Cumolhydroperoxid.....	68
2.2.11.4.4.1	Lösungen .....	68
2.2.11.4.4.2	Probeninkubation .....	68
2.2.12	Statistik .....	69
3 ...	ERGEBNISSE.....	70
3.1	Methodenvalidierung .....	70

3.1.1	Bestimmung der S-Mephenytoin-Metabolite Nirvanol und 4'-OH-Mephenytoin .....	70
3.1.1.1	Inter- und intra-Assay-Variabilität .....	71
3.1.2	Bestimmung des Bupropion-Metaboliten Hydroxybupropion .....	71
3.1.2.1	Inter- und intra-Assay-Variabilität .....	72
3.1.3	Bestimmung der Verapamil-Metabolite D-617, D-620, Norverapamil, D-702 und D-703 .....	73
3.1.3.1	Inter- und intra-Assay-Variabilität .....	74
3.1.4	Bestimmung des Propafenon-Metaboliten 5-Hydroxypropafenon .....	75
3.1.4.1	Inter- und intra-Assay-Variabilität .....	75
3.1.5	Bestimmung des 7-Ethoxycoumarin-Metaboliten Umbelliferon .....	76
3.1.5.1	Inter- und intra-Assay-Variabilität .....	76
3.1.6	Bestimmung des Coumarin-Metaboliten Umbelliferon .....	76
3.1.6.1	Inter- und intra-Assay-Variabilität .....	77
3.2	S-Mephenytoin als CYP2B6-Substrat .....	77
3.2.1	S-Mephenytoin-Metabolismus durch rekombinante Cytochrom P450 Enzyme .....	77
3.2.2	S-Mephenytoin-Metabolismus durch rekombinantes CYP2B6 .....	78
3.2.3	Umsatz in humanen Lebermikrosomen .....	79
3.2.4	Expression von CYP2B6- Apoprotein in humanen Lebermikrosomen ..	79
3.2.4.1	Korrelation zwischen CYP2B6 Proteinexpression und S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität .....	80
3.2.4.2	Inhibition der nicht CYP2B6-abhängigen Nirvanolbildung .....	80
3.2.4.3	Inhibition von CYP2C9 mit Sulfaphenazol: Korrelation zwischen Nirvanolbildung und CYP2B6 Proteinexpression .....	81
3.2.4.4	Inhibition von CYP3A4 mit einem spezifischen inhibitorischen Antikörper .....	82
3.3	Bupropion als CYP2B6-Substrat .....	83
3.3.1	Hydroxybupropionbildung durch rekombinante Cytochrom-P450-Enzyme .....	83
3.3.2	Umsatz mit humanen Lebermikrosomen .....	83
3.3.2.1	Korrelation zwischen Hydroxybupropionbildung und CYP2B6 Proteinexpression .....	84



3.4	Untersuchungen zum Einfluss des <i>CYP2B6</i> -Genotyps auf die Expression und Funktion von <i>CYP2B6</i> .....	85
3.4.1	Untersuchungen an humanen Lebermikrosomen .....	85
3.4.1.1	Einfluss des <i>CYP2B6</i> -Genotyps auf die <i>CYP2B6</i> Expression und Funktion.....	86
3.4.2	Expression in COS-1 Zellen.....	88
3.4.3	Expression in Insektenzellmikrosomen ( <i>Tn5</i> ).....	90
3.4.3.1	Einfluss des Genotyps auf <i>CYP2B6</i> -Apoprotein, funktionelles P450 und Bupropionhydroxylaseaktivität .....	90
3.5	Einfluss von Cytochrom b5 auf die <i>CYP2B6</i> - Enzymaktivität .....	93
3.5.1	Einfluss von Cytochrom b5 auf die S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität.....	93
3.5.2	Einfluss von Cytochrom b5 auf die Bupropionhydroxylaseaktivität .....	94
3.5.3	Expression von Cytochrom b5 in humanen Lebermikrosomen .....	94
3.5.4	Korrelation zwischen der <i>CYP2B6</i> - Enzymaktivität und der Cytochrom b5 Proteinexpression .....	95
3.5.5	Einfluss von Cytochrom b5 auf die <i>CYP2B6</i> - Aktivität verschiedener <i>CYP2B6</i> -Varianten.....	96
3.6	Untersuchungen zum Einfluss der NADPH:P450-Oxidoreduktase auf die Bupropionhydroxylaseaktivität .....	96
3.7	Untersuchungen zum Einfluss biologischer Faktoren auf die Expression und Funktion von <i>CYP2B6</i> .....	98
3.7.1	Einfluss von Alter und Geschlecht .....	98
3.8	Untersuchungen zum Einfluss von Umweltfaktoren auf die Expression und Funktion von <i>CYP2B6</i> .....	101
3.8.1	In- vitro Untersuchungen zur <i>CYP2B6</i> - Inhibition.....	101
3.8.1.1	Einfluss von Thiotepa auf die <i>CYP2B6</i> -Enzymaktivität.....	101
3.8.1.1.1	Einfluss von Thiotepa auf die <i>CYP2B6</i> -Aktivität in humanen Hepatozyten.....	102
3.8.1.1.2	Spezifität der Inhibition durch Thiotepa .....	102
3.8.1.1.3	Ermittlung des Inhibitions-Mechanismus durch Thiotepa .....	105
3.8.1.1.4	Bestimmung der Hemmkonstanten von Thiotepa .....	105
3.8.1.1.5	Einfluss von Nukleophilen und Radikalfängern .....	107
3.8.1.1.6	Einfluss anderer <i>CYP2B6</i> -Substrate .....	107

---

3.8.1.1.7	Einfluss auf funktionelles P450 .....	108
3.8.1.2	Einfluss von Clopidogrel und Ticlopidin auf die CYP2B6- Enzymaktivität .....	108
3.8.1.2.1	Inhibition von CYP2B6 durch Clopidogrel und Ticlopidin .....	109
3.8.1.2.2	Spezifität der CYP-Inhibition durch Clopidogrel und Ticlopidin .	110
3.8.1.2.3	Ermittlung des Inhibitionsmechanismus .....	111
3.8.1.2.4	Bestimmung der Hemmkonstanten .....	112
3.8.1.2.5	Einfluss von Nukleophilen und Radikalfängern .....	113
3.8.1.2.6	Einfluss auf funktionelles P450 .....	114
3.8.1.2.7	Einfluss anderer CYP2B6-Substrate .....	114
3.8.1.2.8	Metabolismus von Clopidogrel .....	116
3.8.2	Einfluss von Alkohol- und Tabakkonsum auf die CYP2B6- Expression und Funktion .....	117
3.8.3	Einfluss des Arzneimittelkonsums auf die CYP2B6- Expression und Funktion .....	117
4 ...	DISKUSSION .....	119
4.1	Expression und enzymatische Funktion von CYP2B6 in humanen Leberproben .....	119
4.2	Untersuchungen zum Einfluss des <i>CYP2B6</i> -Genotyps auf die Expression und Funktion.....	121
4.3	Einfluss von Cytochrom b5 auf die CYP2B6- Enzymaktivität .....	126
4.4	Untersuchungen zum Einfluss der NADPH:P450-Oxidoreduktase auf die Bupropionhydroxylaseaktivität .....	128
4.5	Untersuchungen zum Einfluss biologischer Faktoren auf die Expression und Funktion von CYP2B6 .....	128
4.6	Untersuchungen zum Einfluss von Umweltfaktoren auf die Expression und Funktion von CYP2B6 .....	132
4.6.1	Inhibitoren .....	132
4.7	Induktoren .....	138
5 ...	LITERATURVERZEICHNIS .....	141
6 ...	PUBLIKATIONEN .....	154
6.1	Posterpräsentationen .....	154

---

6.2	Originalarbeiten .....	154
-----	------------------------	-----

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Eichelbaum danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit meine Doktorarbeit am Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für klinische Pharmakologie durchführen zu können.

Bei Herrn Prof. Fricker bedanke ich mich herzlich für die Bereitschaft, diese Arbeit seitens des Instituts für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie in Heidelberg zu betreuen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter Dr. Uli Zanger, von dem ich während der letzten Jahre sehr viel lernen konnte und der durch seine wertvollen Anregungen und Diskussionen maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat.

Weiterhin danke ich meinem weiteren Arbeitsgruppenleiter Dr. Matthias Schwab für seine hilfreichen Tipps und seine Fähigkeit mich auch in schwierigen Zeiten immer wieder aufzumuntern.

Meiner Kollegin Dr. Kathrin Klein danke ich für die wertvollen Anregungen und ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen Kollegen des Dr. Margarete Fischer-Bosch Instituts für klinische Pharmakologie bedanken.

Besonders bedanke ich mich bei meinen Kollegen Britta Klumpp, Igor Liebermann, Claudia Toscano, Marco Hofmann, Jörg Zukunft, Dr. Elke Schäffeler und Gaby Vacun.

Ferner danke ich Dr. Thomas Mürdter, Dr. Ute Hofmann und Monika Seiler für ihre Hilfsbereitschaft in allen Fragen der Arzneistoffanalytik.

Herrn Dr. Nüssler danke ich für die gute Zusammenarbeit in Bezug auf die humane Leberbank und die humanen Hepatozytenkulturen, welche die Grundlage dieser Arbeit geliefert haben.

Schließlich danke ich Dirk Sauße für seinen Rückhalt und sein unendliches Verständnis, das er mir während dem Zeitraum dieser Arbeit entgegengebracht hat.

**ABKÜRZUNGEN**

ACN	Acetonitril
AUC	Area under the curve
BSA	Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin
C <sub>max</sub>	maximale Plasmaspiegelkonzentration
CYP	Cytochrom P450
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI	electronic spray ionization, Elektronensprühionisation
FCS	Fetal Calf Serum; Fötales Kälberserum
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'(2-ethansulfonsäure)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC <sub>50</sub>	Inhibitorkonzentration, bei der 50 % des Enzyms inhibiert ist
ISDN	Isosorbiddinitrat
LC-MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit massenspektrometrischer Detektion
NAD	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NADP <sup>+</sup>	Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NADPH-RS	NADPH- regenerierendes System
OR	NADPH:P450- Oxidoreduktase
P450	Cytochrom P450
pCMV $\beta$	Kontrollplasmid für die $\beta$ - Galaktosidase
RLU	Relative Lumineszenz- Einheit
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecylsulfate, Natriumdodecylsulfal
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<i>Tn5</i>	<i>Trichoplusia ni</i>
Tween	Polyoxyethylen-Sorbitanfettsäureester

## ZUSAMMENFASSUNG

Cytochrom P450 Enzyme stellen die wichtigsten am Arzneimittelmetabolismus beteiligten Enzyme in menschlicher Leber dar. Ihre Expression und Funktion kann von biologischen, genetischen und Umweltfaktoren abhängen. Der Einfluss dieser Parameter wurde in dieser Arbeit für das bisher wenig untersuchte Cytochrom P450 Enzym CYP2B6 analysiert. Die Expression und Funktion wurde an einer humanen Leberbank mit über 100 Proben untersucht. Die mittels Immunoblot quantifizierte CYP2B6 Proteinexpression variierte 191fach (0,5 bis 95,5 pmol/mg). Als Grundlage für funktionelle Untersuchungen wurden zunächst zwei postulierte Modellsubstrate für CYP2B6 untersucht und miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass Bupropion das spezifischere Substrat darstellt. Als eine Ursache der variablen Expression und Funktion dieses Enzyms waren verschiedene Mutationen im *CYP2B6*-Gen identifiziert worden. In Leberproben, als auch mit rekombinant exprimierten Proteinvarianten konnten die relativ häufig vorkommenden varianten Allele \*5, \*6 und \*15 mit einer signifikant verringerten Expression und Funktion von CYP2B6 im Vergleich zur Wildtypgruppe (\*1/\*1) in Zusammenhang gebracht werden. Für weitere, seltenere Mutationen im *CYP2B6*-Gen konnte gezeigt werden, dass diese sogar zu einer fehlenden Expression und Funktion von CYP2B6 führen. Zusätzlich konnte als Ursache für verringerte Enzymaktivitäten nicht nur eine verminderte Proteinexpression, sondern auch eine veränderte Interaktion mit der NADPH:P450-Oxidoreduktase oder Cytochrom b5 verantwortlich gemacht werden. Für das Zytostatikum Thiotepa und die Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel und Ticlopidin wurde eine irreversible und potente Inhibition von CYP2B6 nachgewiesen, welche durch Hemmung der CYP2B6- Aktivität zu klinisch relevanten Arzneimittelinteraktionen mit Substraten dieses Enzyms führen kann.

Als weitere signifikante Einflussfaktoren für die Expression und Funktion von CYP2B6 stellten sich das Alter und der Konsum bestimmter Arzneimittel dar. Das Alter der Patienten, von denen die Leberproben stammten, war umgekehrt proportional zur Apoproteinexpression und Bupropionhydroxylaseaktivität. Die präoperative Einnahme des Antiepileptikums und bekannten CYP2B6- Induktors Carbamazepin oder des Analgetikums Metamizol führte zu einer signifikant erhöhten Proteinexpression und Bupropionhydroxylaseaktivität bei diesen Patienten. An humanen Hepatozyten konnte eine Induktion von CYP2B6 durch diese Arzneistoffe nachgewiesen werden. Die Einnahme des Vasodilatators ISDN verursachte dagegen eine signifikante Reduzierung der Expression und Funktion von CYP2B6.

Andere Faktoren wie Geschlecht, Alkohol- und Tabakkonsum hatten keinen Einfluss. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CYP2B6 von genetischen, biologischen und Umwelteinflüssen reguliert wird. Diese Ergebnisse können für eine verbesserte Vorhersage der CYP2B6 Enzymaktivität beim Menschen genutzt werden.

## SUMMARY

Cytochrome P450 enzymes are the most important drug metabolizing enzymes in human liver. Their expression and function is regulated by biological, genetic and environmental factors. In this work, the influence of these parameters was analyzed for the poorly investigated cytochrome P450 enzyme CYP2B6. The expression and function was investigated in a human liver bank consisting of more than 100 samples. The CYP2B6 protein expression, which was quantified by immunoblot analysis, varied 191 fold (0.5 – 95.5 pmol/mg). For functional investigations two postulated model substrates for CYP2B6 were chosen and compared to each other. The results demonstrated that bupropion is a more specific substrate than S-mephenytoin. Different mutations in the *CYP2B6* gene were identified as one reason for the variable expression and function. In human liver samples and in recombinantly expressed CYP2B6 variants, the most frequent alleles \*5, \*6 and \*15 could be associated with a significantly reduced expression and function compared to the wild-type (\*1/\*1). Some further and rare occurring mutations in the *CYP2B6* gene even resulted in the absence of CYP2B6- expression and function. For some mutations it was shown that the reason for reduced enzyme activity is not only reduced protein expression but altered interaction with NADPH:P450- oxidoreductase or cytochrome b5. An irreversible and potent inhibition of CYP2B6 was shown for the cytostatic agent thioTEPA and the antiplatelet compounds clopidogrel and ticlopidine, which can result in clinically relevant drug interactions with substrates of CYP2B6 by inhibition.

Further significant factors influencing expression and function were age and the consumption of drugs. The age of the liver donors was inversely proportional to the expression of CYP2B6- apoprotein and bupropion hydroxylase activity. The intake of the antiepileptic drug and known inducer of CYP2B6, carbamazepine, before surgery resulted in significantly increased expression and function of CYP2B6. The analgetic metamizole was newly identified as a potent inducer of CYP2B6. Induction of CYP2B6 could be demonstrated using human hepatocytes. In contrast, taking the antianginal drug ISDN caused a significantly declined expression and function. Some other factors like gender and the consumption of alcohol and tobacco had no influence.

In summary, the results demonstrated, that CYP2B6 is regulated by genetic, biological and environmental factors. These results will allow a better prediction of CYP2B6 function in humans.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Arzneimittelstoffwechsel und die Cytochrom P450-Superfamilie

### 1.1.1 Arzneimittelstoffwechsel und Transport

Mit der Umwelt werden Fremdstoffe (sog. Xenobiotika) aufgenommen, zu denen Nahrungsbestandteile, Umweltgifte, Chemikalien und auch Arzneimittel gehören. Um diese Substanzen auszuschleiden, aber auch um endogene Stoffe wie Hormone abzubauen sind Organismen mit einem Biotransformationssystem ausgestattet. Dabei stehen hauptsächlich Reaktionen im Vordergrund, die die Lipophilie der Substanzen herabsetzen um das Ausscheiden über die Nieren und die Galle zu ermöglichen. Ein Großteil der Arzneimittel wird dadurch in pharmakologisch unwirksame Abbauprodukte umgewandelt, manche Verbindungen werden aber auch erst zur pharmakologisch aktiven Substanz metabolisiert. Die Ausgangssubstanz wird dann als sog. „Prodrug“ bezeichnet. Ein erheblicher Teil der Fremdstoffe wird bereits nach der oralen Aufnahme im Darm metabolisiert. Der Hauptteil des Fremdstoffmetabolismus findet jedoch in der Leber statt, bevor die Substanzen den systemischen Blutkreislauf erreichen.

Der Arzneimittelmetabolismus wird in zwei Phasen unterteilt. Zur Phase I gehören die sog. Funktionalisierungsreaktionen, bei denen durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse funktionelle Gruppen eingeführt oder freigelegt werden.

Zu diesen Enzymen gehören die cytosolisch vorkommenden Alkoholdehydrogenasen (ADH), die primäre und sekundäre Alkohole NAD- abhängig zu Aldehyden und Ketonen dehydrieren; die Aldehyddehydrogenasen (ALDH), die cytosolisch, mikrosomal und mitochondrial lokalisiert sind und Alkohole NAD- oder NADP- abhängig zu Carbonsäuren oxidieren; die Xanthinoxidase, die Xanthinderivate und auch Purin-Analoga wie die endogenen Purine zu den entsprechenden Harnsäurederivaten oxidieren, und die heterogene Gruppe der Aminoxygenasen. Zu dieser Enzymgruppe gehören die mitochondrialen Monoaminoxidasen, die Katecholamine, Serotonin und auch exogen zugeführte Amine wie Tyramin verstoffwechseln; die Diaminoxidase, die z.B. Histamin metabolisiert und die mikrosomalen flavinhaltigen Monooxygenasen (FMO), die hauptsächlich Amine und Thiole oxidieren.



Die zentrale Rolle des Phase-I-Metabolismus spielen jedoch die Cytochrom P450-Enzyme, welche 55 % aller Arzneimittel metabolisieren (Clarke et al., 2002) und für die in Abschnitt 1.1.2 eine detaillierte Beschreibung folgt.

Zur Phase II gehören die sog. Konjugationsreaktionen, bei denen an die in Phase I geschaffenen funktionellen Gruppen Reste gekoppelt werden, die aus dem Intermediärstoffwechsel zu Verfügung gestellt werden. Die Konjugation mit aktivierter Glucuronsäure (Uridin-5'-diphosphat-Glucuronsäure) wird durch Uridin-5'-diphosphat-Glucuronosyltransferasen (UGTs) katalysiert. Zu den Substraten dieser Enzym-Superfamilie gehören Bilirubin, Steroidhormone, Gallensäuren, biogene Amine, lipophile Vitamine, Umweltgifte und Arzneistoffe. Die UGTs werden in vielen Organen wie Leber, Darm, Niere, Lunge, Prostata, Haut und Gehirn exprimiert. Bisher sind 17 menschliche UGT-Isoformen identifiziert worden. Glutathion-S-Transferasen (GST) sind cytosolische Enzyme, welche die Konjugation mit dem Tripeptid Glutathion auf endogene und exogene Substrate katalysieren. Weitere Enzyme des Phase II- Metabolismus sind die cytosolisch vorkommenden N-Acetyltransferasen, die unter Verwendung von Acetyl-Coenzym A Acetylierungsreaktionen katalysieren. Beim Menschen sind die NAT I und NAT II bekannt, von der die NAT II, die das Tuberkulostatikum Isoniazid metabolisiert, das erste Beispiel eines Enzyms mit genetisch bedingten Unterschieden ist.

Die cytosolisch vorkommenden Sulfotransferasen (SULT) katalysieren die Konjugation eines Sulfat- Restes von 3'- Phosphoadenosin- 5'- phosphosulfat mit Alkoholen, Phenolen und Aminen. Bei einer hohen Exposition gegenüber Fremdstoffen kann die Sulfatierung von endogenen Substraten wie Steroidhormonen aufgrund des begrenzten Sulfat-Pools im Menschen eingeschränkt sein. Zu den cytosolischen oder membranständigen Methyltransferasen gehören die Catechol- O-Methyltransferase (COMT), die Histamin- N - Methyltransferase und die Thiopurin- S-Methyltransferase (TPMT). Diese Enzyme katalysieren N-, O- oder S-Methylierungen unter Verwendung einer aktivierten Methylgruppe in Form von S-Adenosylmethionin. Die Aminosäuren- N- Acyltransferasen katalysieren die Konjugation von Aminosäuren wie Glycin und Glutamin an Carbonsäuren, die durch Coenzym A aktiviert worden sind. Die Glycinkonjugation der Benzoesäure zur Hippursäure gilt als erstentdeckte Reaktion im Fremdstoffmetabolismus.

Zusätzlich zum Metabolismus kann die Bioverfügbarkeit der konjugierten und nicht-konjugierten Arzneimittel durch Transporterproteine, die Substanzen aktiv aus den Zellen schleusen, limitiert werden. Zu diesen Transportproteinen zählen die sog. uptake-Transporter wie das  $\text{Na}^+$ - dependent taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP) und die Familie der *organic anion transporting polypeptides* (OATPs), welche die Aufnahme von Verbindungen aus dem Pfortaderblut in den Hepatozyten ermöglichen.

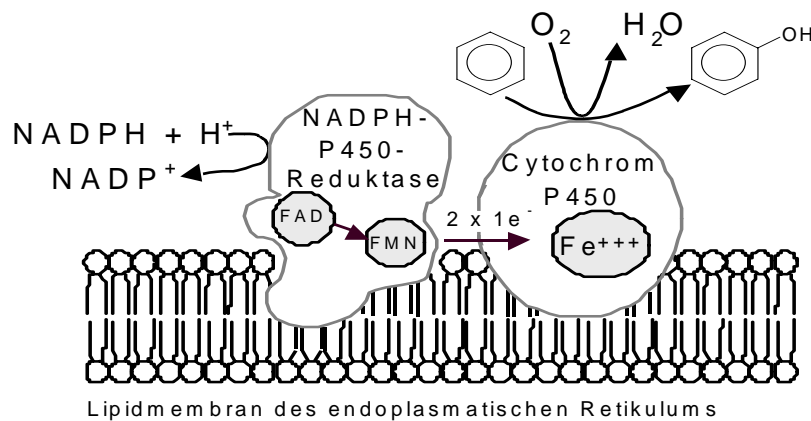
Die ATP-abhängigen ABC-Transporter (**A**T**P**-**b**inding **c**assette) wie **P**-Glykoprotein (P-gp), das Produkt des multidrug resistance Gens MDR1 und die multidrug resistance-associated proteins (MRP) gehören zu den Effluxtransportern, die Substanzen aktiv aus den Zellen in das Blut, den Darm oder den Nierentubulus transportieren. Als Beispiel sei hier der aktive Transport von Zytostatika aus den Tumorzellen genannt, der zur Tumoresistenz führt.

### 1.1.2 Cytochrom-P450-Enzyme

Die wichtigsten am Arzneimittelmetabolismus beteiligten Enzyme gehören zur Cytochrom-P450-Familie. Klingenberg und Garfinkel beschrieben 1958 erstmals ein „zellfärbendes Pigment“ in Schweine- und Rattenleber, das nach Bindung mit CO ein charakteristisches Differenzspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm zeigt (Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958), welches Omura und Sato sechs Jahre später als Cytochrom identifizieren konnten (Omura und Sato, 1964). Cytochrom P450-Enzyme (CYPs) sind ubiquitär verbreitet. In Prokaryonten sind sie im Cytosol lokalisiert, während in höheren Organismen alle Formen membrangebunden sind. Die am Arzneimittelmetabolismus beteiligten humanen Cytochrom P450- Enzyme sind mit ihrem N-Terminus in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert, wobei die katalytische Domäne ins Cytoplasma ragt. Die Proteine bestehen aus einem ca. 480 – 560 Aminosäuren großen Apoprotein mit einer prosthetischen Hämgruppe, deren Eisenatom an ein konserviertes Cystein koordiniert ist. Zu den durch Cytochrom P450- Enzyme katalysierten Reaktionen gehören Hydroxylierungen, Desaminierungen, Desulfatierungen, Dehalogenierungen, Epoxidierungen, N-, S- und O-Dealkylierungen, N- und S- Oxidationen und Peroxidationen.

Bei einer Hydroxylierungsreaktion wird ein Sauerstoffmolekül gespalten, wobei das eine Atom in das Substrat inkorporiert wird und das andere als Teil eines Wassermoleküls abgegeben wird. Während dieses Zyklus wird  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert, so dass molekularer Sauerstoff an das Hämprotein binden kann. Durch die Übertragung eines zweiten Elektrons kann der Sauerstoff auf das Substratmolekül übertragen werden und es entsteht ein Molekül Wasser. Die Reduktionsäquivalente

werden von NADPH bereitgestellt und von der ebenfalls im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierten Cytochrom P450:NADPH-Reduktase, die zu den Flavoproteinen gehört und als prosthetische Gruppe FAD und FMN besitzt, einzeln nacheinander auf das Cytochrom P450- Enzym übertragen (Abb. 1).



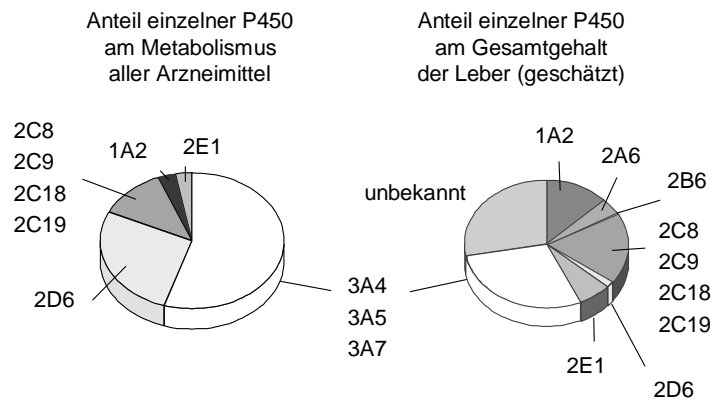
**Abb. 1:**  
Schematische Darstellung des  
Metabolismus durch Cytochrom P450

Cytochrom b5, ein ca. 17 kDa kleines Häm-Protein, welches ebenfalls im ER lokalisiert ist, kann durch Elektronenübertragung oder allosterisch die Aktivität einiger Cytochrom-P450-Enzyme erhöhen (Schenkman und Jansson, 2003).

Die verschiedenen Cytochrom P450-Enzyme werden aufgrund ihrer Sequenzhomologien in Familien und Subfamilien eingeteilt: Cytochrom P450 Enzyme, deren Aminosäuresequenz zu mehr als 40 % übereinstimmt, werden einer Familie zugeordnet (z. B. CYP2). Innerhalb einer Subfamilie bestehen Homologien von über 55 % (z.B. CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19). Inzwischen sind beim Menschen 27 Subfamilien mit insgesamt 57 Isoenzymen und 58 Pseudogenen identifiziert worden ([www.drnelson.utm.edu/cytochromP450-html](http://www.drnelson.utm.edu/cytochromP450-html)).

Die für den Fremdstoffmetabolismus relevanten Familien beschränken sich fast ausschließlich auf die Familien CYP1, CYP2 und CYP3, die neben Arzneimitteln auch Pflanzen- und Nahrungsmittelbestandteile, endogene Substanzen, Umweltgifte und Karzinogene abbauen. Die Cytochrom P450- Enzyme der anderen Familien metabolisieren hauptsächlich endogene Substanzen wie Fettsäuren, Gallensäuren, Prostaglandine, Steroidhormone, Vitamin D und Vitamin A. Die Leber nimmt mit einem Anteil von 90 – 95 % des gesamten P450 den größten Anteil ein, wobei 60 – 65 % davon auf arzneimittelmetabolisierende CYPs entfallen (Shimada et al., 1994). Die CYP3A Subfamilie stellt mit 30 % des hepatischen P450-Gehaltes den größten Anteil der humanen CYPs dar und metabolisiert etwa 50- 60 % aller Arzneimittel.

Weitere, für den Arzneimittelmetabolismus relevante Isoenzyme sind die Enzyme der 2C Subfamilie, zu denen CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 und CYP2C19 gehören, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2D6 und CYP2E1 (Abb. 2).



**Abb. 2:** Anteil einzelner P450 Enzyme am Metabolismus aller Arzneimittel und am Gesamtanteil der Leber (aus Shimada et al., 1994).

Die einzelnen Cytochrom P450 Enzyme weisen eine breite Substratspezifität auf und können somit jeweils eine sehr heterogene Gruppe von Substanzen metabolisieren. Da die Substratspezifität meist stark überlappend ist, gilt auch das Umgekehrte und fast alle Substanzen können von mehreren CYP450 gleichzeitig metabolisiert werden.

### **1.1.3 Ursachen für inter- und intraindividuelle Unterschiede im Arzneimittelmetabolismus**

Die Kinetik und Dynamik eines Arzneistoffes im menschlichen Körper wird von Umweltfaktoren wie Rauchen und Alkoholkonsum, Ernährung, physiologischen Veränderungen wie Krankheiten und Entzündungen, Alter, Geschlecht, Arzneimittelinteraktionen und genetischen Faktoren bestimmt. Pharmakodynamische Veränderungen beruhen meist auf Targetebene, wenn z. B. Rezeptoren oder Ionenkanäle betroffen sind und es zu keiner oder einer abgeschwächten Arzneimittelwirkung kommt, oder die Zielstrukturen erst gar nicht vorhanden sind, wie z. B. ein Fehlen der Östrogenrezeptorexpression, die zur Tamoxifenresistenz bei der Mammakarzinom- Behandlung führt.

Zu Veränderungen der Pharmakokinetik eines Arzneistoffes nach oraler Gabe kann es durch Unterschiede in der Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt, der Verteilung, dem hepatischen und extrahepatischen Arzneistoffwechsel, der renalen und biliären Exkretion und der Affinität zu arzneimitteltransportierenden Proteinen kommen.

Der Hauptort der Variation ist der Arzneimittelabbau in der Leber. Dieser variiert nicht nur mit dem Alter und Geschlecht, sondern kann auch durch Arzneimittelinteraktionen als Ursache von Enzyminhibition und Enzyminduktion oder genetischen Polymorphismen von arzneimittelabbauenden Enzymen und Transportern verändert sein.

#### 1.1.4 Enzyminhibition

Die gleichzeitige Gabe mehrerer Arzneimittel, die besonders bei geriatrischen Patienten oder Patienten mit Tumor- und Aids-Erkrankungen stattfindet, kann zu ernstesten Arzneimittelwechselwirkungen führen. So kann ein Arzneimittel den Transport des anderen zum Wirkungsort durch Verdrängung aus der Plasmaproteinbindung oder durch Konkurrenz oder Hemmung von Transportproteinen verringern bzw. hemmen. Genauso kann der Metabolismus eines Arzneimittels durch eine Hemmung der am Arzneimittelmetabolismus beteiligten Cytochrom P450 Enzyme beeinträchtigt werden. Hierbei unterscheidet man zwischen einer reversiblen Konkurrenz zweier Arzneimittel an der gleichen Substratbindungsstelle, einer nicht-kompetitiven Bindung eines Hemmstoffes an das Enzym und einer irreversiblen Inhibition durch kovalente Bindung des Inhibitors oder eines Metaboliten an das Enzym oder eine Zerstörung der Häm- Komponente. So kam es durch gleichzeitige Gabe des Antihistaminikums Terfenadin und dem CYP3A4- Inhibitor Ketokonazol zu lebensbedrohlichen Tachyarrhythmien (Honig et al., 1993). Nicht nur Arzneimittel, sondern auch die Nahrung kann den Arzneimittelmetabolismus beeinflussen. So ist seit einiger Zeit bekannt, dass Grapefruitsaft als Inhibitor von CYP3A4 in der Lage ist, den Metabolismus einer Reihe von CYP3A4-Substraten wie Cyclosporin zu inhibieren (Ameer et al., 1997).

#### 1.1.5 Enzyminduktion

Bei der Induktion von arzneimittelmetabolisierenden Enzymen werden diese durch Einwirkung von Chemikalien oder Arzneistoffen vermehrt exprimiert. Dieser Mechanismus kann als evolutionäre Anpassungsreaktion des Organismus gegenüber einer erhöhten Fremdstoffbelastung interpretiert werden. Hormone, Vitamine oder Arzneistoffe können als Liganden an Kernrezeptoren binden, welche dann als Monomere, Homodimere oder Heterodimere an sog. *response elements* des DNA-Promotors binden und dadurch die Transkription aktivieren.

Auf diese Weise kann die Expression vieler am Arzneimittelabbau beteiligter Enzyme wie CYP1A, CYP2B6, CYP2C, CYP3A oder MDR1 beeinflusst werden. So haben Raucher aufgrund der Bindung polyzyklischer Aromaten an den Ah-Rezeptor (Arylhydrocarbon-Rezeptor) und darauffolgende CYP1A2-Induktion erhöhte Enzymmengen und folglich eine erhöhte Metabolisierungsrate für viele Präkarzinogene, die durch CYP1A2 bioaktiviert werden. Im Gegensatz dazu ist die Induktion von CYP3A4 Ursache vieler Arzneimittelinteraktionen, da eine Reihe von Medikamenten wie Clotrimazol, Dexamethason, Ritonavir, Rifampicin oder

Johanniskraut CYP3A4 induzieren. Die Gabe von Johanniskraut kann so zum Beispiel zu einem Wirkungsverlust oraler Kontrazeptiva führen (Izzo, 2004).

### 1.1.6 Genetische Polymorphismen

Erblich bedingte Mutationen in arzneimittelmetabolisierenden Enzymgenen können zu bestimmten Krankheitsbildern führen, wie dem Gilbert-Syndrom, das mit einer Häufigkeit von 2 – 5 % in der Bevölkerung auftritt und durch eingeschränkte Bilirubinglucuronidierung durch Mutationen der UGT zu Hyperbilirubinämie führt. Das sog. Flush-Syndrom, das aufgrund einer Mutation im ALDH-Gen mit Schweißausbrüchen, Hautrötungen und Übelkeit nach Alkoholgenuss einhergeht, tritt bei 50 % der asiatischen Bevölkerung nach Genuss kleiner Mengen Alkohols auf. Ein genetischer Defekt bei der flavinhaltigen Monooxygenase FMO 3 kann Ursache für das sog. „Fish-Odor-Syndrom“ sein, bei dem das nach Fisch riechende Trimethylamin nicht in das geruchlose N-Oxid umgewandelt werden kann.

Der 1959 von dem Humangenetiker Friedrich Vogel geprägte Begriff der Pharmakogenetik umfasst genetische Defekte, die zu veränderten Arzneimittelreaktionen führen. Wenn diese Veränderungen bei mehr als 1 % der Bevölkerung auftreten, spricht man von Polymorphismen. Die Häufigkeit von Polymorphismen unterscheidet sich oft zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen.

Das erste arzneimittelmetabolisierende Enzym, für das genetisch bedingte Unterschiede gefunden wurden, war die N-Acetyltransferase NAT II. So gehören ca. 50 % der Kaukasier zu den sog. langsamen Acetylierern, die Arzneistoffe wie das Tuberkulostatikum Isoniazid nur verlangsamt abbauen können.

Werden arzneistoffabbauende Enzyme aufgrund einer Mutation nicht exprimiert oder haben sie eine verringerte katalytische Aktivität, kommt es bei den Patienten zu defizientem Metabolismus. Man bezeichnet dies im Unterschied zu normalem Metabolismus (*extensive metabolizers, EM*) als sog. defizienten Metabolismus (*poor metabolizer, PM*).

Bei Medikamenten mit einem engen therapeutischen Fenster kann es aufgrund von Mutationen in arzneimittelmetabolisierenden Enzymen zu ernststen Nebenwirkungen kommen.

Das bei der akuten lymphatischen Leukämie oder zur Behandlung des Morbus Crohn eingesetzte Azathioprin wird über die Thiopurin-S-Methyltransferase (TPMT) metabolisiert, für die 0,3 % der europäischen Bevölkerung zu den sog. PMs gehören und deshalb unter Therapie mit Standarddosen Azathioprin lebensbedrohliche Panzytopenien entwickeln (Krynetski et al., 2003). Die Bedeutung dieser Polymorphismen für die Arzneimitteltherapie zeigt eine systematische Studie von

Phillips et al. (2001) in der gezeigt werden konnte, dass 59 % der Arzneimittel, die am häufigsten unerwünschte Arzneimittelwirkungen verursachen, von mindestens einem polymorphen Enzym metabolisiert werden.

Zu den am besten untersuchten polymorphen arzneimittelmetabolisierenden Enzymen gehört CYP2D6, von dem mehr als 80 verschiedene Allele bekannt sind, welche zur Ausprägung verschiedener Phänotypen mit fehlender, stark verminderter oder erhöhter enzymatischer Funktion führen. 5 – 10 % der europäischen Bevölkerung gehören zu den sog. PMs für CYP2D6 und haben dadurch ein erhöhtes Risiko für das Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen (Zanger et al., 2004), denn sie können Substrate dieses Enzyms wie Antiarrhythmika, Antidepressiva und  $\beta$ -Blocker nicht metabolisieren. Das andere Extrem stellen die UMs (ultrarapid metabolizer) dar. Etwa 20 % dieses Phänotyps wird durch Genduplikationen des *CYP2D6* Gens und eine dadurch bedingte erhöhte Enzymaktivität verursacht. Für alle am Arzneimittelmetabolismus beteiligten humanen Cytochrom P450 Enzyme sind mittlerweile genetische Polymorphismen beschrieben worden. Eine Übersicht über die Cytochrom P450- Enzyme mit klinisch relevanten Polymorphismen ist in Tab. 1 zu sehen.

**Tab. 1:** Klinische Konsequenzen von polymorphen CYPs

<b>Polymorphes CYP</b>	<b>Substrate</b>	<b>Klinische Konsequenzen</b>
CYP2A6	Coumarin, Nikotin, Halothan	Möglicher Effekt auf Rauchverhalten (Rao et al., 2000)
CYP2C9	Tolbutamid, Warfarin, Phenytoin, Nichtsteroidale Antirheumatika	Antikoagulierender Effekt von Warfarin (Aithal et al., 1999)
CYP2C19	Mephenytoin, Omeprazol, Hexobarbital, Propranolol, Proguanil, Phenytoin	Heilungsraten bei Magengeschwüren unter Omeprazoltherapie (Furuta et al., 2001)
CYP2D6	$\beta$ -Blocker, Antidepressiva, Antiarrhythmika, Codein, Dextromethorphan	Nebenwirkungen bei Therapie mit Antiarrhythmika und Antidepressiva (Bertilsson et al., 2002)



## 1.2 Cytochrom P450 2B6

Zu den bisher am wenigsten untersuchten, am Arzneimittelmetabolismus beteiligten humanen Cytochrom P450 Enzymen gehört Cytochrom P450 2B6 (CYP2B6). Das 1988/89 identifizierte *CYP2B6* Gen (Miles et al., 1988; Yamano et al., 1989) liegt auf Chromosom 19 und besteht aus neun Exons und acht Introns. Es kodiert für ein ca. 50 kDa großes Protein. CYP2B6 wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, eine CYP2B6-Expression wurde aber auch in extrahepatischen Geweben wie Dünndarm, Niere, Lunge, Gehirn, Kolon- und Brusttumoren nachgewiesen (Gervot et al., 1999; Miksys et al., 2003; Wolf et al., 1992). Diese Daten erlauben jedoch bisher keine Abschätzung über die funktionelle Bedeutung der extrahepatischen Expression. Ebenso konnte CYP2B6 mRNA in Geweben der Leber, Niere, Lunge, Trachea, Dünndarm und der Haut nachgewiesen werden (Gervot et al., 1999). Dem CYP2B6 Isoenzym wurde bis vor kurzem keine große Bedeutung beigemessen, da erste Studien (Mimura et al., 1993; Shimada et al., 1994) berichteten, dass CYP2B6 nur weniger als 1 % des gesamten hepatischen Cytochrom P450 ausmacht. Aufgrund von spezifischeren Antikörpern und sensitiveren Detektionsmethoden haben Stresser und Kupfer 1999 jedoch eine höhere Expression und eine 20 – 250fache Variabilität der CYP2B6- Expression nachweisen können. Diese Variabilität wird auch auf Aktivitätsebene bestätigt, welche ebenfalls mehr als 100fach variiert (Yamano et al., 1989, Ekins et al., 1998). Mehr als 3 % aller auf dem Markt befindlichen und teils sehr relevanten Arzneimittel werden durch CYP2B6 verstoffwechselt (Lewis et al., 1998). Daneben werden Prokarziogene wie Aflatoxin B1 (Aoyama et al., 1990; Kirby et al., 1993) und Dibenzo-[a,h]-anthracen (Shou et al., 1996), die Designerdroge Ecstasy (MDMA; Kreth et al., 2000), Nikotin (Yamazaki et al., 1999) und das endogene Substrat Testosteron (Hanna et al., 2000) von CYP2B6 metabolisiert. In Tab. 2 ist eine Zusammenstellung relevanter CYP2B6 Substrate zu sehen.

Aufgrund der zunehmenden Untersuchungen zu CYP2B6 wurden mittlerweile nicht nur Substrate, sondern auch Inhibitoren dieses Enzyms identifiziert. So gibt es Pflanzeninhaltsstoffe wie Glabridin (Kent et al., 2002), aber auch Arzneimittel, zu denen Tamoxifen (Sridar et al., 2002), Ethinylestradiol (Kent et al., 2001), verschiedene Antidepressiva (Hesse et al., 2000) und das Zytostatikum Thiotepa gehören, welche die in- vitro Enzymaktivität von CYP2B6 hemmen. Dass eine Inhibition der CYP2B6-Enzymaktivität auch in- vivo Auswirkungen hat, konnte bereits in zwei unterschiedlichen Studien demonstriert werden. Huitema et al. (2000) konnten zeigen, dass die Bioaktivierung des CYP2B6-Substrates Cyclophosphamid durch den CYP2B6- Inhibitor Thiotepa signifikant reduziert wird. Bei Patienten, die eine Hochdosischemotherapie mit Cyclophosphamid, Carboplatin und Thiotepa erhielten, waren die Plasmaspiegel von Hydroxycyclophosphamid signifikant

reduziert, wenn Thiotpea vor der Cyclophosphamidgabe appliziert wurde. Palovaara et al. (2003) konnten zeigen, dass der CYP2B6- Inhibitor Ethinylestradiol bei Patientinnen, die dieses Medikament zur Hormonsubstitution erhielten zu signifikant erniedrigten Plasmaspiegeln des Bupropionmetaboliten Hydroxybupropion führt.

**Tab. 2:** Klinisch relevante Substrate von CYP2B6

<b>CYP2B6 Substrat</b>	<b>Stoffklasse</b>	<b>Reaktion</b>	<b>Literaturreferenz</b>
Alfatoxin B1	Präkarzinogen	Aktivierung	Aoyama et al., 1990
Artemisinin	Antimalariamittel	unbekannt	Svensson and Ashton, 1999
Bupropion	Antidepressivum	Hydroxylierung	Hesse et al., 2000
Clopidogrel	Thrombozyten- aggregationshemmer	unbekannt	Clarke and Waskell, 2002
Cyclophosphamid	Zytostatikum	Hydroxylierung	Roy et al., 1999
Dibenzo-[a,h]- anthracen	Präkarzinogen	Aktivierung	Shou et al., 1996
Efavirenz	Reversetranskriptase- hemmer	Hydroxylierung	Ward et al., 2003
Ifosfamid	Zytostatikum	N-Dechloroethylierung	Granvil et al., 1999; Huang et al., 2000
Ketamin	Narkotikum	N-Demethylierung	Yanagihara et al., 2001
MDMA	Designerdroge	N-Demethylierung	Kreth et al., 2000
Methadon	Opioid	N-Demethylierung	Gerber et al., 2004
Meperidin	Opiod	N-Demethylierung	Ramirez et al., 2004
Nevirapin	Reversetranskriptase- hemmer	Hydroxylierung	Erickson et al., 1999
Nikotin	Genussmittel	C-Oxidation	Yamazaki et al., 1999
Propofol	Narkotikum	Hydroxylierung	Court et al., 2001
RP-73401	Phosphodiesterase- IV-Hememer	Cyclopentyl- hydroxylierung	Stevens et al., 1997
Selegelin	MAO-B Hemmer	N-Demethylierung	Hidstrand et al., 2001
S-Mephenytoin	Antikonvulsivum	N-Demethylierung	Heyn et al., 1996, Ko et al., 1998
Testosteron	Sexualhormon	16 $\beta$ -Hydroxylierung	Hanna et al., 2000

Bislang wurde die hohe Variabilität von CYP2B6 hauptsächlich der Enzyminduktion zugeschrieben, da es analog zum CYP2B1 der Ratte durch Phenobarbital induzierbar ist (Früh et al., 1997). Die nukleären Rezeptoren CAR (constitutive androstane receptor) und PXR (pregnane X receptor) binden jeweils als RXR-Heterodimer an sog. PBREM- (phenobarbital responsive element) und/ oder XREM- (xenobiotic responsive enhancer module) Elemente und auf diese Weise können Arzneistoffe wie Clotrimazol, Rifampicin und Phenytoin CYP2B6 induzieren (Wang und Negishi 2003).

2001 konnte durch Lang et al. gezeigt werden, dass eine weitere Ursache der variablen CYP2B6- Expression und -Enzymaktivität in vielfältigen und häufigen genetischen Polymorphismen im kodierenden Bereich des *CYP2B6*- Gens begründet liegt. Diese Mutationen können zu Varianten mit geringerer Expression und Aktivität führen oder sogar Ursache sog. Nullallele mit fehlender Proteinexpression und nicht vorhandener Enzymaktivität sein (Lamba et al., 2003; Lang et al., 2004; Hesse et al., 2004). Mittlerweile sind 37 verschiedene CYP2B6- Allele bekannt, die Mutationen im kodierenden Bereich, in Intronregionen oder im Promotor des *CYP2B6*- Gens tragen. In Tab. 3 sind Allele mit Mutationen im kodierenden Bereich, die zu Aminosäureaustauschen führen, aufgeführt.

**Tab. 3:** SNPs im kodierenden Bereich des *CYP2B6*- Gens

Allel	SNP-Position	SNP	Aminosäureaustausch	Referenz
*1		Wildtyp	Wildtyp	Yamano et al., 1989
*2	Exon 1	C64T	R22C	Lang et al., 2001
*3	Exon 5	C777A	S259R	Lang et al., 2001
*4	Exon 5	A785G	K262R	Lang et al., 2001
*5	Exon 9	C1459T	R487C	Lang et al., 2001
*6	Exon 4/5	G516T, A785G	Q172H, K262R	Lang et al., 2001
*7	Exon 4/5/9	G516T, A785G, C1459T	Q172H, K262R, R487C	Lang et al., 2001
*8	Exon 3	A415G	K139E	Lamba et al., 2003; Lang et al., 2004
*10	Exon 1	A62T, C64T, G216C	Q21L, R22C	Lang et al., 2004
*11	Exon 1	A136G	M46V	Lang et al., 2004
*12	Exon 2	G296A	G99E	Lang et al., 2004
*14	Exon 3	G419A	R140Q	Lang et al., 2004
*15	Exon 8	T1172A	I391N	Lang et al., 2004

Bei Patienten, die Träger bestimmter Mutationen im CYP2B6- Gen sind, die zu einer verminderten Enzymaktivität führen, kann es zu einer verringerten Metabolisierung von Arzneistoffen kommen, die Substrat für CYP2B6 sind. In einer Studie von Tsuchiya et al. (2004) konnte gezeigt werden, dass HIV- Patienten, die homozygote Träger des \*6- Allels waren, signifikant erhöhte Efavirenz- Plasmakonzentrationen und damit ein erhöhtes Nebenwirkungsrisiko haben. In einer anderen Studie von Takada et al. (2004) konnte bei Patienten mit einer Lupus Nephritis, die eine Cyclophosphamidtherapie erhielten gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit, am Ende der Therapie eine Nierenerkrankung auszubilden, bei homozygoten Trägern des \*5- Allels signifikant erhöht war und dass diese Patienten auch eine signifikant geringere Wahrscheinlichkeit einer kompletten renalen Ansprechrate aufwiesen.

### 1.3 Ziele der Arbeit

Bei der Therapie mit Arzneimitteln stellt das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen ein großes Problem dar. In einer Meta- Analyse prospektiver Studien wurde ermittelt, dass das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen an vierter bis sechster Stelle der Todesursachen bei hospitalisierten Patienten in den USA stand (Lazarou et al., 1998). Auf der anderen Seite sprechen bei einigen Arzneimitteln nur 50 – 75 % der Patienten auf eine Therapie an (Spear et al., 2001). Fast ein Drittel aller unerwünschten Arzneimittelwirkungen beruht auf Arzneimittelinteraktionen, die bei der Polypharmazie eine große Rolle spielen. Neben den Einflüssen von Alter, Geschlecht und Krankheiten können aber auch genetische Faktoren, die eine 20 - 95%ige Variabilität in der Verteilung und Wirkung von Arzneimitteln ausmachen können, einen entscheidenden Einfluss auf deren Effektivität und Toxizität ausüben (Evans et al., 2003).

Bei dem hochpolymorphen CYP2D6 kann durch Genotypisierung in der Zwischenzeit mit 99%iger Sicherheit auf den vorhandenen Phänotyp geschlossen werden.

Cytochrom P450 2B6 wurde bisher nicht mit Ansprechen oder Toxizität einer Arzneimitteltherapie in Verbindung gebracht. Dass dieses Enzym immer mehr an Bedeutung gewinnt, lässt sich schon daran erkennen, dass zunehmend mehr Substanzen als Substrate identifiziert werden. Ziel war es daher, die funktionelle Variabilität von CYP2B6 auf unterschiedlichen Ebenen zu untersuchen. Insbesondere sollten die Enzyminhibition, die Variabilität in der Population, sowie genetische Varianten charakterisiert werden.

In der Arbeitsgruppe Pharmakogenetik des IKP Stuttgart wurde im Rahmen eines BMBF Projektes mit dem Kurztitel „Pharmakogenetische Diagnostik“ eine Gewebesammlung bestehend aus 300 humanen Leberproben aufgebaut. Einer der Schwerpunkte dieser Arbeit wurde auf diese humane Lebergewebebank gelegt, an der verschiedene Einflüsse wie Alter, Geschlecht, Arzneimittelkonsum und genetische Polymorphismen auf die Expression und Funktion des CYP2B6- Enzyms untersucht werden sollten. Um Einflüsse von Arzneimitteln und Mutationen im *CYP2B6*- Gen im Detail analysieren zu können, sollten zusätzliche in-vitro Untersuchungen mit rekombinanten Proteinen durchgeführt werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Antikörper, rekombinante Proteine, Enzyme und Zellen

Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Acetylcystein	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid/Bis (30:0,8)	Bio-Rad, München
Ammoniumacetat	Fluka, Deisenhofen
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Anti-baculovirus gp64 (mouse)	eBioscience, Wien
Anti CYP3A4/5 Mab for inhibition (mouse)	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Cytochrom b5 (rabbit)	Oxford, Michigan, USA
Anti-human CYP2B6 (mouse)	BD Biosciences, Frankfurt a.M.
Bio-Rad-Assay	Bio-Rad, München
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Aldrich, Deisenhofen
BSA (bovine serum albumine)	Sigma, Deisenhofen
Chinidin	Sigma, Deisenhofen
Chloroquindiphosphat	Sigma, Deisenhofen
Clopidogrel	Sanofi-Synthelabo, Amboise, Frankreich
Complete mini, EDTA-free	Roche Diagnostics, Mannheim
Coumarin	Sigma, Deisenhofen
Cumolhydroperoxid (80 %)	Fluka, Deisenhofen
Cytochrom b5 aus <i>E. coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Cytochrom P450 2B6 aus Lymphoblasten	Gentest, Frankfurt a.M.
Cytochrom P450 2B6 aus Insektenzellmikrosomen (Verschiedene Varianten)	Kathrin Klein u. Britta Klumpp, IKP Stuttgart
Cytochrom c aus Pferdeherz	Fluka, Deisenhofen
DEAE-Dextran	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason	Sigma, Deisenhofen
Dichlormethan	Merck, Darmstadt
Diethyldithiocarbamat	Sigma, Deisenhofen
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dinatriumtetraborat	Merck, Darmstadt
Dithionit	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco's MEM-Medium (# 15140-122)	Gibco BRL, Karlsruhe
Emulgen 911	Kao-Atlas, Tokio, Japan
Essigsäure, konz.	Merck, Darmstadt
7-Ethoxycoumarin	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Emerald™	Tropix Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Fötale Kälberserum	Biochrom, Berlin

Furafyllin	Geschenk von U. Fuhr, Köln
Galacton <sup>R</sup>	Tropix, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Glucose-6-Phosphat	Roche Diagnostics, Mannheim
Glutathion	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Serva, Heidelberg
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Roche Diagnostics, Mannheim
Goat Anti-Mouse IgG, Peroxidase-konjugiert	Oncogene, Manhasset, N.Y., USA
Goat Anti-Sheep IgG, Peroxidase-konjugiert	Roche Diagnostics, Mannheim
HCl, rauchend	Merck, Darmstadt
HEPES Puffer 1 M	Gibco BRL, Karlsruhe
Hydrocortison	Sigma, Deisenhofen
Insulin (Insuman Rapid; 40 I.E./ml)	Aventis, Frankfurt a.M.
Insulin-Transferrin-Selenium	Gibco BRL, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
Ketokonazol	Ultrafine Chemicals, Manchester, England
Lipofectamin 2000 <sup>TM</sup>	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilch	Fluka, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Roth, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
NADPH	Fluka, Deisenhofen
NADP <sup>+</sup>	Fluka, Deisenhofen
NaF	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogenphosphat	Meck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyrosulfat	Sigma, Deisenhofen
Opti-MEM	Gibco BRL, Karlsruhe
Paroxetin	GlaxoSmithKline, München
Passive Lysis buffer	Promega, Madison, WI, USA
pCMV $\beta$ - $\beta$ - Galaktosidase- Expressionsvektor	Clontech, Palo Alto, CA, USA
Pefa Bloc	Roth, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Ponceau S-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Protein- Molekulargewichtsmarker (Rainbow)	Amersham, Buckinghamshire, England
Rattenreduktase	Uli Zanger, IKP Stuttgart
Restore Western Blot Stripping Puffer	Pierce, Rockford, USA
SDS (Natrium-Dodecylsulfat)	Sigma, Deisenhofen
Sucrose	Bio-Rad, München
Sulfaphenazol	Sigma, Deisenhofen
Superoxiddismutase	Sigma, Deisenhofen
SuperSignal Dura Chemolumineszenz Substrat	Pierce, Rockford, USA
TEMED	Gibco BRL, Karlsruhe
Thiotepa	Wyeth Pharma GmbH, Münster
Ticlopidin	Sigma, Deisenhofen

Trichloressigsäure  
Tris-Base  
Triton X-100  
Trypsin-EDTA (# 25200-056)  
Tween 20  
Umbelliferon  
Williams Medium E

Merck, Darmstadt  
Roth, Karlsruhe  
Aldrich, Deisenhofen  
Gibco BRL, Karlsruhe  
Merck, Darmstadt  
Sigma, Deisenhofen  
Gibco BRL, Karlsruhe

### 2.1.2 Geräte und Hilfsmittel

AutoLumat Plus

Berthold Technologies, Bad  
Wildbad

Blotapparaturen:

Trans-Blot SD Semi-dry transfer cell  
Fastblot B43

Bio-Rad, München  
Biometra, Göttingen  
Forma Scientific, Marietta, OH,  
USA

Brutschrank

Cellulosemembranen, regeneriert (12 kDa)  
Einmalküvetten  
Gel-Blotting-Papier  
Gelkammer SE 600  
Heizblock  
Homogenisator Fast-Prep FP120  
HPLC-Anlage HP 1100

Roth, Karlsruhe  
Sarstedt, Nümbrecht  
Schleicher & Schuell, Dassel  
Hoefer, San Francisco, USA  
CLF Laborgeräte, Emersacker  
Q-Biogene, Heidelberg  
Agilent Technologies,  
Waldbronn

HPLC-Säulen:

Lichrospher RP-18, endcapped  
(150x3 mm I.D., 5µm)  
LUNA C8 column (150x3 mm I.D., 5µm)  
Prontosil-C18 AQ (150x3 mm I.D., 3 µM)

Merck, Darmstadt

Penomenex, Aschaffenburg  
Bischoff, Leonberg

Vorsäule:

Eclipse XDB-C8 (2,1x12,5 I.D., 5 µm)

Agilent Technologies,  
Waldbronn

Luminescent Image Analyzer LAS-1000

Fuji Photo Film GmbH,  
Düsseldorf

Lysematrix D

Massenspektrometer HP 1100

Q-Biogene, Heidelberg  
Agilent Technologies,  
Waldbronn

Mikrodialysierkapseln QuixSep

Mikrotiterplatten, 96er

Millipore-Anlage Milli Q

Nitrocellulose

Novaspec II Visible Spectrophotometer

Roth, Karlsruhe  
Greiner, Frickenhausen  
Millipore, Molsheim, Frankreich  
Schleicher & Schuell, Dassel  
Pharmacia, Uppsala,  
Schweden

pH-Meter CG840

Schüttler

Sterilfilter 0,2 µm Porengröße

Teflonhomogenisator

Wasserbad WTE var 3185

Zellkulturschalen, 10 cm

Schott, Mainz  
GFL, Wunstorf  
Schleicher & Schuell, Dassel  
Roth, Karlsruhe  
Assistent, Sondheim  
Greiner, Frickenhausen



Zellkulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Zellzahlgerät Casy1	Schärfe System, Reutlingen
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugen:	
Biofuge 22 R	Heraeus, Hanau
Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Hettich Rotana/S, 23	Hettich, Tuttlingen
Ultrazentrifuge L5-65	Beckman, München
UV-Visible Spectroscopy System 8453	Agilent, Waldbronn
UV/Vis- Spektrophotometer	Thermo Nicolet, Cambridge
Victor 1420 Multilabel Counter	Wallac, Turku, Finnland

### 2.1.3 Software

AIDA Version 2.1	Raytest, Schraubenhardt
GaphPad Prism Version 3.03	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
GraphPad Instad Version 3.05	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
HPChem 4.06	Agilent, Waldbronn
PHASE Version 2.0	<a href="http://www.archimes.well.ox.ac.uk/pise/PHASE/license.html">www.archimes.well.ox.ac.uk/pise/ PHASE/license.html</a>

### 2.1.4 Lösungen, Puffer, Nährmedien

#### 2.1.4.1 Puffer zur Präparation von Lebermikrosomen

Homogenisierungspuffer (frisch hergestellt)	EDTA	1 mM
	DTT	1 mM
	Pefa Bloc	0,2 mM
	HEPES pH 7,4	10 mM
	KCl	0,15 M
Mikrosomenpuffer	Natriumphosphatpuffer pH 7,4	0,1 M
Waschpuffer für Mikrosomen	EDTA	1 mM
	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> pH 7,5	0,1 M

#### 2.1.4.2 Puffer und Lösungen für SDS-Page und Western Blot

Ammoniumpersulfat 10 % (m/v)	Ammoniumpersulfat Millipore-Wasser	1 g ad 10 ml
------------------------------	---------------------------------------	-----------------

Auftragspuffer für SDS-Page (5fach)	Tris-HCl pH 6,8	60 mM
	Glycerol	24 %
	SDS	2 %
	2- Mercaptoethanol	14,4 mM
	Bromphenolblau	1 %
	Lagerung bei RT und jeweils frische Zugabe von 2-Mercaptoethanol	
Chemolumineszenz-Lösung (Pierce)	Super Signal Dura Kit	
	Lumino/Enhancer	7 ml
	Peroxid-Lösung	7 ml
SDS 10 %	SDS	50 g
	Millipore-Wasser	ad 500 ml
Tankpuffer (10fach)	Tris-Base	150 g
	Glycin	720 g
	SDS	50 g
	Millipore-Wasser	ad 5000 ml
Tankpuffer (1fach)	Tankpuffer (10fach)	500 ml
	Millipore-Wasser	ad 5000 ml
Transferpuffer	Tris-Base	9 g
	Glycin	14,6 g
	10 % SDS	18,5 ml
	Millipore-Wasser	4000 ml
	Methanol	ad 5000 ml
Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	Tris-Base	30 g
	Millipore-Wasser	ad 500 ml
	pH 6,8 mit HCl (konz.) einstellen;	
	Lagerung bei 4°C	
Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	Tris-Base	90,75 g
	Millipore-Wasser	ad 500 ml
	pH 8,8 mit HCl (konz.) einstellen;	
	Lagerung bei 4°C	
TBS (10fach)	NaCl	400 g
	KCl	10 g
	Tris-Base	150 g
	Millipore-Wasser	ad 5000 ml
	pH 7,4 mit HCl (konz.) einstellen	

Waschpuffer TBST	TBS (10fach) 50 % Tween 20 (v/v) Millipore-Wasser	500 ml 10 ml ad 5000 ml
------------------	---	-------------------------------

#### 2.1.4.3 Puffer zur Herstellung von Mikrosomen aus COS-1 Zellen

Homogenisierungspuffer	1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 20 % ige Sucroselösung (m/V) Millipore-Wasser	5ml 21,75 ml ad 50 ml
------------------------	--	-----------------------------

Mikrosomenpuffer	1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 Glycerin Millipore-Wasser	4,5 ml 5 ml ad 50 ml
------------------	--	----------------------------

#### 2.1.4.4 Nährmedien

Kulturmedium für COS-1 Zellen	DMEM supplementiert mit: Fötale Kälberserum Penicillin Streptomycin	10 % (v/v) 100 U/ml 100 µg/ml
-------------------------------	--	-------------------------------------

Kulturmedium für humane Hepatozyten	Williams Medium E mit Optimax supplementiert mit: Fötale Kälberserum Penicillin Streptomycin Hydrocortison Insulin HEPES	10 % (v/v) 100 U/ml 100 µg/ml 0,025%(v/v) 0,032I.E./ml 15 mM
-------------------------------------	---	---

Kulturmedium für humane Hepatozyten für Induktionsversuche	Williams Medium E supplementiert mit: Insulin-Transferrin-Selenium Penicillin Streptomycin Glutamin Dexamethason	1 % (v/v) 100 U/ml 100 µg/ml 2 mM 0,1 µM
---	---	--

2.1.4.5 Lösungen für die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivitätsbestimmung

$\beta$ -Galaktosidase-Assay-Puffer	1 M Natriumphosphatpuffer pH 8	600 $\mu$ l
	1 M $MgCl_2$	6 $\mu$ l
	Galacton <sup>R</sup> (100x)	6 $\mu$ l
	Millipore-Wasser	ad 6 ml
	Frisch unter Lichtschutz ansetzen	
Galaktosidase-Stopplösung	1 M NaOH	2 ml
	Emerald <sup>TM</sup> (100 mg/ml)	250 $\mu$ l
	Millipore-Wasser	ad 10 ml
	Frisch unter Lichtschutz ansetzen	

## 2.1.4.6 Puffer und Lösungen für Cytochrom-P450-Aktivitätsbestimmungen

0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4	$Na_2HPO_4$	0,1 M
	mit 0,1 M $NaH_2PO_4$ auf pH 7,4 einstellen	
0,1 M Tris pH 7,5	Tris	0,1 M
	mit HCl konz. auf pH 7,5 einstellen	
10x NADPH-Regenerierendes System (NADPH-RS)	$NADP^+$	5 mM
	Glucose-6-Phosphat	40 mM
	$MgCl_2$	50 mM
	Glucose-6-Phosphat- Dehydrogenase	40 U/ml
	in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 lösen	
denaturiertes mikrosomales Protein	verschiedene humane Lebermikrosomen (mittlere Proteinkonzentration: 3,5 mg/ml) wurden vereint und bei 100 °C 5 min denaturiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C	

## 2.1.4.7 Puffer und Lösungen zur Proteinaufarbeitung aus humanen Hepatozyten

Complete-Stammlösung, EDTA- frei	1 Tablette complete mini, EDTA- frei wurde in 1,5 ml Millipore- Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte bei - 20 °C.
----------------------------------	---

## Lysepuffer

50 mM Tris-HCl  
0,25 M NaCl  
0,1 % Triton X-100 (v/v)  
5 mM EDTA  
15 % complete- Stammlösung, EDTA- frei  
(v/v)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Gewebe aus der Leberbank

Am IKP bestand eine Sammlung chirurgischer humaner Leberproben, die in Kooperation mit Prof. Dr. Neuhaus und Dr. Nüssler vom Virchow-Klinikum Charité in Berlin seit Juni 1999 aufgestellt wurde. Von den Patienten mit schriftlicher Einverständniserklärung wurde jeweils eine Blutprobe und mehrere Gramm Lebergewebe (überschüssiges, Tumor umgebendes, gesundes Gewebe) asserviert. Das Gewebe wurde in mehreren Teilstücken direkt in flüssigem Stickstoff bzw. in einem RNA-stabilisierenden Reagens (RNAlater, Ambion) bei Einhaltung sehr kurzer Ischämiezeiten (<10 min) eingefroren.

Mittels eines Fragebogens und klinischer Daten wurden ethnische Zugehörigkeit, Alter, Geschlecht, die zur Operation führende Diagnose, Art der Operation, frühere Diagnosen, eventuelle regelmässige Medikamenteneinnahme vor der Operation, Raucherstatus (Nichtraucher; < 3 Zigaretten pro Tag; Raucher, > 3 Zigaretten pro Tag), Alkoholkonsum (keiner, gelegentlich, täglich, Missbrauch) und Ernährungsgewohnheiten (Kaffee, Tee, vegetarische Kost, salzarme Kost, fettarme Kost) ermittelt. Patienten mit schweren Lebererkrankungen (virale Hepatitis, Zirrhose) wurden von den Analysen ausgeschlossen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin und von der Universität Tübingen genehmigt.

### 2.2.2 Präparation von Lebermikrosomen

Die Aufarbeitung des Lebergewebes erfolgte dadurch, dass ca. 1 g Lebergewebe in 4 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer im Kühllabor (4°C) mit dem Ultraturrax T25 (Kika Labortechnik) bei 9500 U/min 2 mal 30 Sekunden zerkleinert wurde. Das zerkleinerte Lebergewebe wurde dann mit dem Potter Elvehjem (Glas/Teflon) bei 1000 U/min homogenisiert. Das Homogenat wurde in Zentrifugengefäße überführt, mit Homogenisierungspuffer austariert und 30 min bei 15000 g zentrifugiert (Ultrazentrifuge L5-65, Beckman). Das Pellet wurde mit 2 ml Homogenisierungspuffer gewaschen und erneut bei 15000 g zentrifugiert, Die Überstände wurden vereint und in ein neues Zentrifugengefäß überführt und 60 min bei 105000 g zentrifugiert. Der nach dem Zentrifugationsschritt entstandene Überstand wurde als Cytosol aliquotiert und bei -80°C in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Das Pellet wurde mit 2 ml Waschpuffer resuspendiert und erneut 60 min bei 105000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2 ml Mikrosomenpuffer mit dem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Die Mikrosomen

wurden in entsprechende Portionen aliquotiert und analog dem Cytosol bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2.2.3 Proteinanalytische Methoden

### 2.2.3.1 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Bio-Rad-Protein-Assay (Bio-Rad). Die Probe wurde in einem der zu erwartenden Proteinkonzentration entsprechenden Volumen mit Millipore-Wasser auf  $800\ \mu\text{l}$  in einem Eppendorf-Gefäß verdünnt. Nach Zugabe von  $200\ \mu\text{l}$  Biorad-Reagenz wurde sofort manuell geschüttelt und ca. 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption des gebildeten Farbstoff-Protein-Komplexes wurde nach 10 min bei  $595\ \text{nm}$  gemessen. Zur Kalibrierung wurde bei jeder Messreihe eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (BSA) in Wasser verwendet ( $0,72 - 5,76\ \mu\text{g/ml}$ ). Die Kalibrierung und Messung der Proben erfolgte jeweils in Doppelbestimmung mit dem Novaspec II Visible Spektrophotometer (Pharmacia). Die Absorption des Probenpuffers wurde jeweils von der Absorption der Proben subtrahiert.

Bei einem größerem Probenaufkommen wurde die Proteinbestimmung im Mikrotitermaßstab ( $200\ \mu\text{l}$  je Probe) in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Die Proben wurden dann bei  $596\ \text{nm}$  mit einem Spektrophotometer (MultilabelCounter 1420, Victor) vermessen. Die Quantifizierung erfolgt bei beiden Methoden mittels linearer Regressionsanalyse gegen die Eichkurve.

### 2.2.3.2 Probenaufarbeitung zur elektrophoretischen Trennung

Humane Lebermikrosomen wurden jeweils mit  $0,1\ \text{M}$  Natriumphosphatpuffer pH 7,4 und  $1/5$  Volumen 5fach Auftragspuffer für die SDS-Gelelektrophorese zu  $1\ \text{mg/ml}$  verdünnt. Rekombinant exprimierte Proteine und Hepatozytenlysate wurden entsprechend der gewünschten Konzentration mit Millipore-Wasser und  $1/5$  Volumen 5fach Auftragspuffer verdünnt. Nach Einstellung der entsprechenden Verdünnungen wurden die Proben 5 min bei  $95\ ^{\circ}\text{C}$  denaturiert und erneut gemischt. Die Lösungen wurden bis zum Gebrauch auf Eis oder für späteren Gebrauch bei  $-20\ ^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.2.3.3 Herstellung von Kalibrierlösungen aus rekombinanten Enzymen

Für die Quantifizierung von Cytochrom P450 2B6 und Cytochrom b5 mittels Immunoblotanalyse wurden entsprechende Kalibrierlösungen hergestellt, die auf jedes SDS-Polyacrylamid-Gel mit aufgetragen wurden. Dafür wurde die mikrosomale

Fraktion von mit CYP2B6 transfizierten humanen Lymphoblasten (BD Biosciences) bzw. Cytochrom b5 aus damit transfizierten *E. coli* (Invitrogen) verwendet.

Zur Herstellung der höchsten Kalibrierlösung (2000 fmol/25 µl CYP2B6; 100 pmol/25 µl Cytochrom b5) wurden die rekombinanten Proteine mit Millipore-Wasser und Auftragspuffer für die SDS-Gelelektrophorese (5fach) auf das entsprechende Endvolumen eingestellt. Die Eichlösungen niedrigerer Konzentrationen wurden durch entsprechende Verdünnungen hergestellt. Folgende Eichlösungen wurden verwendet:

CYP2B6 (BD Biosciences):

Eichlösung 1 :	2000 fmol/25 µl
Eichlösung 2 :	1000 fmol/25 µl
Eichlösung 3 :	500 fmol/25 µl
Eichlösung 4 :	250 fmol/25 µl
Eichlösung 5 :	125 fmol/25 µl

Cytochrom b5 (Invitrogen):

Eichlösung 1 :	100 pmol/25 µl
Eichlösung 2 :	50 pmol/25 µl
Eichlösung 3 :	25 pmol/25 µl
Eichlösung 4 :	12,5 pmol/25 µl
Eichlösung 5 :	6,25 pmol /25 µl

Die weitere Aufarbeitung der Eichlösungen erfolgte analog der Probenaufarbeitung (2.2.3.2).



#### 2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (LKB, Hoefer).

Für CYP2B6 erfolgte die Trennung in 10%igen Polyacrylamidgelen von 1,5 mm Dicke, für Cytochrom b5 in 15%igen Polyacrylamidgelen von 1,5 mm Dicke. Trenn- und Sammelgele wurden nach folgenden Vorschriften hergestellt:

Stammlösung	Trenngel 10%	Trenngel 15%	Sammelgel 4%
Aqua bidest.	12,0 ml	7,0 ml	6,1 ml
Acrylamid/BIS (30:0,8)	10,0 ml	15,0 ml	1,35 ml
1,5 M Tris pH 8,8	7,5 ml	7,5 ml	-/-
0,5 M Tris pH 6,8	-/-	-/-	2,5 ml
10% SDS	0,3 ml	0,3 ml	0,1 ml
TEMED	30 µl	30 µl	10 µl
10% APS	0,3 ml	0,3 ml	0,1 ml

Das Trenngel wurde bis ca.  $\frac{3}{4}$  der Gelhöhe zwischen die Glasplatten (16 X 18 cm) gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach Auspolymerisieren des Gels wurde das Wasser möglichst vollständig abgenommen, der Probenauftragskamm eingesetzt und mit der Sammelgellösung überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurden die Proben und der Rainbow-Proteinmolekulargewichts-Marker (Amersham) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer bei 35 V über Nacht oder bei 170 V ca. 5 Stunden bei Raumtemperatur für 10%ige Gele bzw. bei 4°C für 15%ige Gele.

#### 2.2.3.5 Western Blot

Im Proteinblot wurden die aufgetrennten Proteine nach dem Gellauf mittels einer Semidry-Blotapparatur (Multiphor II) oder Fastblot Apparatur (Biometra) auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell) übertragen. Die Elektroden wurden mit Millipore-Wasser befeuchtet. Dann wurde die Anode mit zwei in Transferpuffer getränkten Filterpapieren, der Nitrocellulosemembran, dem in Transferpuffer äquilibrierten Gel und nochmals zwei in Transferpuffer getränkten Filterpapieren blasenfrei beladen. Nach Aufsetzen der Kathode erfolgte ein Transfer bei 1 mA/cm<sup>2</sup> für 1 h oder bei 2,7 mA/cm<sup>2</sup> für 15 min mit der Fastblot-Apparatur.

Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde durch Färben der Membran mit Ponceau-S und anschließendem Waschen mit Millipore-Wasser untersucht und dokumentiert.

### 2.2.3.6 Detektion von Proteinen

Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran mindestens 60 min in 5 % Magermilchpulver (Fluka) in TBST unter leichtem Schütteln (30/min) inkubiert. Anschließend wurde mindestens 3 Stunden mit den entsprechenden Primärantikörperlösungen inkubiert. Nach Entfernen der Primärantikörper wurde zweimal kurz und vier mal 15 min mit TBST gewaschen. Daraufhin folgte die Inkubation mit Meerrettichperoxidase (POD) konjugiertem Sekundärantikörper in 1 % Magermilch für 30 Minuten. Durch anschließendes Waschen mit TBST (2 mal kurz, 2 mal 15 min) wurde überschüssiger Sekundärantikörper entfernt. Die Inkubationsbedingungen im einzelnen:

#### **CYP2B6**

Blocken	1 h mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST
Primärantikörper-Lösung	Anti-human CYP2B6 (BD Biosciences) 1:2000 in 1 % (w/v) Magermilchpulver/TBST
Sekundärantikörper-Lösung	Goat-Anti-Mouse, 1:20000 (Oncogene) in 1 % (w/v) Magermilchpulver/TBST

#### **CYP2B6/gp 64**

Blocken	1 h mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST
Primärantikörper-Lösung	Anti-human CYP2B6 (BD Biosciences) 1:1000 + anti-baculovirus GP64 (1:2000) in 1 % (w/v) Magermilchpulver/TBST
Sekundärantikörper-Lösung	Goat-Anti-Mouse, 1:20000 (Oncogene) in 1 % (w/v) Magermilchpulver/TBST

#### **Cytochrom b5**

Blocken	1 h mit 5 % (w/v) Magermilchpulver/TBST
Primärantikörper-Lösung	Anti-Cytochrom b5 (Oxford) 1:1000 in 1 % (w/v) Magermilchpulver/TBST
Sekundärantikörper-Lösung	Anti-Sheep, 1:20000 (Roche Diagnostics) in 1 % (w/v) Magermilchpulver/TBST

Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur vorgenommen. Die Detektion der entsprechenden Antigene erfolgte durch 5-minütige Inkubation der Membranen mit 14 ml Supersignal Dura (Pierce, Substrat:Starter 1+1) in Dunkelheit. Die Detektion des durch die Chemolumineszenz entstehenden Lichts erfolgte mit einer hochempfindlichen Digitalkamera (LAS-1000, Fuji) mit Flat-Frame Korrektur und Abzug des Dunkelbilds.

#### 2.2.3.7 Quantifizierung von Proteinen

Die Auswertung der Western Blots erfolgte durch zweidimensionale Erfassung der Signalbanden mit der Software AIDA 2.1 (Raytest, Straubenhard). Je nach Form der Signalbanden wurden rechteckige oder elliptische Messfelder um diese gelegt. Als Messwerte wurde die Differenz aus dem Signal- und einem definierten Hintergrundfeld verwendet. Die Quantifizierung erfolgte über die auf jedem Blot mitgeführten Kalibrierproben.

### 2.2.4 Analytische Methoden

#### 2.2.4.1 Bestimmung der S-Mephenytoin-Metabolite Nirvanol und 4'-Hydroxymephenytoin

Die Messung der S-Mephenytoin-Metabolite Nirvanol und 4'-Hydroxymephenytoin aus Inkubationslösungen erfolgte analog einer Methode zur Bestimmung dieser Metabolite aus Leber- und Darm-Homogenaten (Läpple et al., 2003).

##### 2.2.4.1.1 Reinsubstanzen

S-Mephenytoin war ein Geschenk von Urs Mayer, Biozentrum Basel. Die Metabolite und deren deuterierten internen Standards wurden von Dr. Thomas Mürdter und Georg Heinkele am IKP Stuttgart synthetisiert (Henze und Isbell 1953, Bucherer und Lieb 1934).

Nirvanol:	M: 204,23 g/mol
[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-Nirvanol:	M: 209,25 g/mol
4'- Hydroxymephenytoin:	M: 234,25 g/mol
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-4'-Hydroxymephenytoin:	M: 237,27 g/mol
S-Mephenytoin:	M: 218,25 g/mol

#### 2.2.4.1.2 Lösungen

Mobile Phase A: Millipore-Wasser

Mobile Phase B: Acetonitril (ACN)

Stammlösungen: Auf einer Analysenwaage abgewogenes Nirvanol, [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-Nirvanol, 4'-Hydroxymephenytoin und [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-4'-Hydroxymephenytoin wurden in Methanol in einer Konzentration von 1 mg/ml oder 2 mg/ml gelöst und bei 4°C gelagert. S-Mephenytoin wurde als 50 mM Stammlösung in Methanol gelöst.

Arbeitslösungen: Die Arbeitslösungen wurden aus den Stammlösungen mit Millipore-Wasser verdünnt und bei 4°C gelagert.

#### 2.2.4.1.3 Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurde aus den Stammlösungen der Metabolite Nirvanol und 4'-Hydroxymephenytoin eine Lösung von 1000 pmol/25 µl mit Millipore-Wasser hergestellt. Aus dieser Lösung wurden durch weitere Verdünnungsschritte mit Millipore-Wasser folgende Kalibrierproben hergestellt:

Kalibrierprobe 6	1000 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 5	250 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 4	100 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 3	25 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 2	5 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 1	1 pmol/25 µl

Die Kalibrierproben wurden entsprechend den Inkubationsansätzen angesetzt:

25 µl der Kalibrierlösung wurden mit 25 µl NADPH-RS und 5 µl denaturiertem mikrosomalem Protein versetzt. Die Proben wurden mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 auf 250 µl aufgefüllt. Da S-Mephenytoin nur zu geringen Mengen zur Verfügung stand, wurde dieses den Kalibrier- und Qualitätskontrollproben nicht beigefügt. Nach Zugabe von 1,7 ml Ethanol (96 %) und 25 µl internem Standard (100 pmol [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-Nirvanol, [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-4'-OH-Mephenytoin) wurden die Proben gemischt und 5 min bei 16000 g zentrifugiert. 1,8 ml des Überstandes wurde unter Stickstoffbegasung getrocknet und in 150 µl Mobiler Phase (84 % Wasser/16 % ACN) aufgenommen. Entsprechend dieser Vorgehensweise wurden aus separaten Qualitätskontrollproben mit den Metabolitenkonzentrationen von 5 pmol 4'-OH-Mephenytoin/10 pmol Nirvanol, 100 pmol 4'-OH-Mephenytoin/Nirvanol und 500 pmol 4'-OH-Mephenytoin/Nirvanol drei Qualitätskontrollen hergestellt.

Die Quantifizierung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse mit Wichtung (1/x) des Peakflächenverhältnisses interner Standard/Analyt. Zur internen Standardisierung von Nirvanol wurde [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-Nirvanol und zur internen Standardisierung von 4'-Hydroxymephenytoin wurde [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-4'-Hydroxymephenytoin verwendet. Die Berechnung erfolgte durch die Software HPChem 4.06.

#### 2.2.4.1.4 Chromatographie

Gerät: HP1100 mit Entgaser, Binäre Pumpe, Säulenschaltung, Autosampler, UV-Detektor, Agilent Technologies, Waldbronn

UV-Detektor: 254 nm

Detektor: HP1100 einfach Quadropol Massenspektrometer mit LC-Kopplung und Electronic Spray (ESI) Ionisation, Agilent Technologies, Waldbronn

Säule: endcapped Lichrospher RP-18, 150x3 mm I.D., 5µm Partikelgröße (Merck, Darmstadt)

Säulentemperatur: 45 °C

Säulenschaltung: 4 bis 8 min

Gradient:

Zeit (min)	H <sub>2</sub> O (%)	Acetonitril (%)	Flußrate (ml/min)
0,0	85	15	0,50
5,0	40	60	0,50
7,0	40	60	0,50
7,1	30	70	0,75
8,5	30	70	0,75
8,6	85	15	0,75
9,9	85	15	0,75
10,0	85	15	0,50

Äquilibrierungszeit: 3 min

#### 2.2.4.1.5 Massenspektrometrie

Ionisation:	Electronic Spray Ionisation (ESI), positiv	
Gastemperatur:	350 °C	
Spühdruk:	40 psig	
N <sub>2</sub> Volumenstrom:	10 l/min	
Kapillarspannung:	3500 V	
Messmodus:	Single Ion Monitoring Mode (SIM)	
	4 min Fragmentor 60 V	
	Gain: 1	
	m/z 203,3	Nirvanol
	m/z 208,3	[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ]-Nirvanol
	m/z 233,4	4'-OH-Mephenytoin
	m/z 236,4	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-4'-Hydroxymephenytoin

#### 2.2.4.2 Bestimmung des Bupropion-Metaboliten Hydroxybupropion

Die Messung des Metaboliten Hydroxybupropion aus Inkubationslösungen und Zellkulturmedium erfolgte in Anlehnung einer Methode zur Bestimmung von Bupropion und seiner Metabolite aus Blutplasma.

##### 2.2.4.2.1 Reinsubstanzen

Bupropion, Hydroxybupropion und der interne Standard [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hydroxybupropion wurden von Dr. Thomas Mürdter und Georg Heinkele am IKP-Stuttgart synthetisiert (Mehta and Raleigh, 1974).

Bupropion-HCl:	M: 276,2 g/mol
Hydroxybupropion-HCl:	M: 292,2 g/mol
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Hydroxybupropion-HCl:	M: 295,2 g/mol

#### 2.2.4.2.2 Lösungen

Mobile Phase A:	Millipore-Wasser + 1 % Essigsäure (v/v)
Mobile Phase B:	Acetonitril + 1 % Essigsäure (v/v)
Stammlösungen:	Auf einer Analysenwaage abgewogenes Hydroxybupropion-HCl und [ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Hydroxybupropion-HCl wurden in Methanol in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und bei 4°C gelagert. Bupropion-HCl wurde als 50 mM Stammlösung in 10 % Methanol gelöst.
Arbeitslösungen:	Die Arbeitslösungen wurden aus den Stammlösungen mit Millipore-Wasser verdünnt und bei 4°C gelagert.

#### 2.2.4.2.3 Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurde aus der Hydroxybupropion- Stammlösung eine Lösung von 1000 pmol/25 µl mit Millipore-Wasser hergestellt. Aus dieser Lösung wurden durch weitere Verdünnungsschritte mit Millipore-Wasser folgende Kalibrierproben hergestellt:

Kalibrierprobe 8	500 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 7	250 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 6	100 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 5	50 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 4	25 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 3	10 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 2	5 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 1	1 pmol/25 µl

Die Kalibrierproben wurden entsprechend den Inkubationsansätzen angesetzt: 25 µl der Kalibrierlösung wurden mit 25 µl NADPH-RS, 5 µl denaturiertem mikrosomalem Protein und 25 µl 500 µM Bupropion-Lösung versetzt. Die Proben wurden mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 auf 250 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 50 µl 1 N HCl und 25 µl internem Standard (100 pmol [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Hydroxybupropion) wurden die Proben gemischt und 5 min bei 16000 g zentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurden direkt in das HPLC-System injiziert.

Entsprechend dieser Vorgehensweise wurden aus separaten Qualitätskontrollproben mit den Metabolitenkonzentrationen von 5 pmol, 50 pmol und 250 pmol drei

Qualitätskontrollen hergestellt. Die Quantifizierung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse mit Wichtung ( $1/x$ ) des Peakflächenverhältnisses [ $^2\text{H}_3$ ]-Hydroxybupropion/Hydroxybupropion. Die Berechnung erfolgte durch die Software HP Chem 4.06.

#### 2.2.4.2.4 Chromatographie

Gerät: HP1100 mit Entgaser, Binäre Pumpe, Säulenschaltung, Autosampler, UV-Detektor, Agilent Technologies, Waldbronn

UV-Detektor: 282 nm

Detektor: HP1100 einfach Quadropol Massenspektrometer mit LC-Kopplung und Electronic Spray (ESI) Ionisation, Agilent Technologies, Waldbronn

Säule: Prontosil-C18 AQ ,150x3 mm, 3  $\mu\text{M}$  Partikelgröße (Bischoff, Leonberg)

Säulentemperatur: 30 °C

Säulenschaltung: 4 bis 11,5 min

Gradient:

Zeit (min)	H <sub>2</sub> O + 1% HOAc (%)	Acetonitril + 1% HOAc (%)	Flußrate (ml/min)
0,0	84	16	0,5
2,0	84	16	0,5
7,0	55	45	0,5
11,0	55	45	0,5
11,5	84	16	0,5
14,0	84	16	0,5

Äquilibrierungszeit: 2 min



#### 2.2.4.2.5 Massenspektrometrie

Ionisation:	Electronic Spray Ionisation (ESI), positiv	
Gastemperatur:	350 °C	
Spühdruk:	30 psig	
N <sub>2</sub> Volumenstrom:	10 l/min	
Kapillarspannung:	1500 V	
Messmodus:	Single Ion Monitoring Mode (SIM)	
	4 min Fragmentor 50 V	
	Gain: 3	
	m/z 256	OH-Bupropion
	m/z 259	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-OH-Bupropion

#### 2.2.4.3 Bestimmung der Verapamil-Metabolite D-617, D-620, Norverapamil, D-702 und D-703

Die Bestimmung der Verapamil-Metabolite erfolgte in Anlehnung einer am IKP entwickelten Methode zur Bestimmung dieser Metabolite aus Blutplasma und Darmperfusionenlösung (von Richter et al., 2000).

##### 2.2.4.3.1 Reinsubstanzen

Alle Reinsubstanzen wurden von der Knoll AG, Ludwigshafen (jetzt Abbott) zur Verfügung gestellt.

Norverapamil-HCl:	M: 477,1 g/mol
[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Norverapamil-Oxalat:	M: 530,6 g/mol
D-702 HCl:	M: 477,1 g/mol
D-703 HCl:	M: 477,1 g/mol
D-617 HCl:	M: 326,9 g/mol
D-620 HCl:	M: 312,9 g/mol
D-832 HCl:	M: 356,9 g/mol

#### 2.2.4.3.2 Lösungen

- Mobile Phase A: 5 mM Ammoniumacetat pH 4,2  
38,5 g Ammoniumacetat wurden in 1 l Millipore-Wasser gelöst. 10 ml von der 0,5 M Ammoniumacetat-Lösung wurden mit Millipore-Wasser auf 1 l aufgefüllt und mit Eisessig auf pH 4,2 eingestellt.
- Mobile Phase B: Acetonitril
- Stammlösungen: Auf einer Analysenwaage abgewogenes D-620-HCl, D-617-HCl, D-702-HCl, D-703-HCl, Norverapamil-HCl und die internen Standards [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Norverapamil-Oxalat und D-832-HCl wurden in 2-Propanol 10 min im Ultraschallbad in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und bei 4°C gelagert.
- Arbeitslösungen: Die Arbeitslösungen wurden aus den Stammlösungen mit Millipore-Wasser/1 % Isoamylalkohol (v/v) verdünnt und bei – 20 °C gelagert.

#### 2.2.4.3.3 Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurde aus den Stammlösungen der Metabolite Norverapamil, D-617, D-620, D-702 und D-703 eine Lösung von je 1000 pmol/25 µl mit Millipore-Wasser hergestellt. Aus dieser Lösung wurden durch weitere Verdünnungsschritte mit Millipore-Wasser folgende Kalibrierproben hergestellt:

Kalibrierprobe 6	500 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 5	250 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 4	100 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 3	50 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 2	10 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 1	1 pmol/25 µl

Die Kalibrierproben wurden entsprechend den Inkubationsansätzen angesetzt: 25 µl der Kalibrierlösung wurden mit 25 µl NADPH (48 mM), 5 µl denaturiertem mikrosomalem Protein und 25 µl 1 mM Verapamillösung versetzt. Die Proben wurden mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 auf 250 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1,7 ml Ethanol (96 %) und 25 µl internem Standard (50 pmol [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Norverapamil und Gallopamil) wurden die Proben gemischt und 5 min bei 16000 g zentrifugiert. 1,8 ml des Überstandes wurden unter Stickstoffbegasung getrocknet und in 150 µl

Mobiler Phase (70 % 5 mM Ammoniumacetat pH 4,2/30 % ACN) aufgenommen. Entsprechend dieser Vorgehensweise wurden aus separaten Qualitätskontrollproben mit den Metabolitenkonzentrationen von 10 pmol, 100 pmol und 500 pmol entsprechende Qualitätskontrollen hergestellt. Die Quantifizierung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse mit Wichtung (1/x) des Peakflächenverhältnisses interner Standard/Analyt. Zur internen Standardisierung der N-Desalkylmetabolite D-620 und D-617 wurde der Gallopamilstandard D-832 genutzt. [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Norverapamil wurde zur Standardisierung von D-703, D-702 und Norverapamil verwendet. Die Berechnung erfolgte durch die Software HPChem 4.06.

#### 2.2.4.3.4 Chromatographie

Gerät: HP1100 mit Entgaser, Binäre Pumpe, Säulenschaltung, Autosampler, UV-Detektor, Agilent Technologies, Waldbronn

UV-Detektor: 254 nm

Detektor: HP1100 einfach Quadropol Massenspektrometer mit LC-Kopplung und Electronic Spray (ESI) Ionisation, Agilent Technologies, Waldbronn

Säule: Luna C8, 150x2 mm I.D., 5 µm Partikelgröße (Phenomenex, Aschaffenburg)

Vorsäule: Eclipse XDB-C8, 2,1x12,5 mm, 5 µm Partikelgröße (Agilent Technologies, Waldbronn)

Säulentemperatur: 35 °C

Säulenschaltung: 2 bis 16,5 min

Gradient:

Zeit (min)	5mM Ammoniumacetat pH 4,2 (%)	Acetonitril (%)	Flußrate (ml/min)
0,0	71	29	0,25
4,0	69	31	0,25
12,5	69	31	0,25
14,9	50	50	0,50
16,4	50	50	0,50
16,5	71	29	0,25

Äquilibrierungszeit: 5 Minuten

#### 2.2.4.3.5 Massenspektrometrie

Ionisation:	Electronic Spray Ionisation (ESI), positiv	
Gastemperatur:	350 °C	
Spühdruk:	60 psig	
N <sub>2</sub> Volumenstrom:	11 l/min	
Kapillarspannung:	2500 V	
Messmodus:	Single Ion Monitoring Mode (SIM)	
	2,1 min	Fragmentor 80 V
	Gain: 1	
	m/z 277,2	D-620
	m/z 291,2	D-617
	m/z 321,2	D-832, interner Standard
	8,5 min	Fragmentor 120 V
	Gain: 1	
	m/z 441,3	D-703, D-702, Norverapamil
	m/z 444,3	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ]-Norverapamil, interner Standard

#### 2.2.4.4 Bestimmung des Propafenon-Metaboliten 5-Hydroxypropafenon

Die Messung des Propafenon-Metaboliten 5-Hydroxypropafenon aus Inkubationslösungen erfolgte analog einer Methode zur Bestimmung dieser Metabolite aus Plasma- und Urin- Proben (Hofmann et al., 2000).

##### 2.2.4.4.1 Reinsubstanzen

Alle Reinsubstanzen wurden von der Knoll AG, Ludwigshafen (jetzt Abbott) zur Verfügung gestellt.

Propafenon-HCl (racem.):	M: 377 g/mol
5-Hydroxy-Propafenon-HCl:	M: 393,9 g/mol
[ <sup>2</sup> H <sub>7</sub> ]-5-Hydroxy-Propafenon-HCl:	M: 400,9 g/mol

#### 2.2.4.4.2 Lösungen

Mobile Phase A: 12 mM Ammoniumacetat

9,25 g Ammoniumacetat wurden in 1 l Millipore-Wasser gelöst. Von dieser 120 mM Ammoniumacetat-Lösung wurden 100 ml mit Millipore-Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Mobile Phase B: Acetonitril

Stammlösungen: Auf einer Analysenwaage abgewogenes 5-OH-Propafenon und [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-5-OH-Propafenon wurden in Methanol in einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst und bei -20 °C gelagert.

Arbeitslösungen: Die Arbeitslösungen wurden aus den Stammlösungen mit Millipore-Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.4.4.3 Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurde aus der Stammlösung des Metaboliten 5-OH-Propafenon eine Lösung von 1000 pmol/25 µl mit Millipore-Wasser hergestellt. Aus dieser Lösung wurden durch weitere Verdünnungsschritte mit Millipore-Wasser folgende Kalibrierproben hergestellt:

Kalibrierprobe 6	500 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 5	250 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 4	100 pmol/10 µl
Kalibrierprobe 3	50 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 2	25 pmol/12,5 µl
Kalibrierprobe 1	5 pmol/25 µl

Die Kalibrierproben wurden entsprechend den Inkubationsansätzen angesetzt: Entsprechende Mengen der Kalibrierlösung wurden mit 25 µl NADPH-RS, 5 µl denaturiertem mikrosomalem Protein und 25 µl 20 µM Propafenonlösung versetzt. Die Proben wurden mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 auf 250 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1,7 ml Ethanol (96 %) und 10 µl internem Standard (200 pmol [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-5-OH-Propafenon) wurden die Proben gemischt und 5 min bei 16000 g zentrifugiert. 1,8 ml des Überstandes wurden unter Stickstoffbegasung getrocknet und in 150 µl Mobiler Phase (70 % 12 mM Ammoniumacetat/30 % ACN) aufgenommen. Entsprechend dieser Vorgehensweise wurden aus separaten Qualitätskontrollproben mit den Metabolitenkonzentrationen von 5 pmol, 100 pmol und 500 pmol drei Qualitätskontrollen hergestellt. Die Quantifizierung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse mit Wichtung (1/x) des Peakflächenverhältnisses [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-

5-OH-Propafenon/5-OH-Propafenon. Die Berechnung erfolgte durch die Software HPChem 4.06.

#### 2.2.4.4.4 Chromatographie

Gerät: HP1100 mit Entgaser, Binäre Pumpe, Säulenschaltung, Autosampler, UV-Detektor, Agilent Technologies, Waldbronn

UV-Detektor: 209 nm

Detektor: HP1100 einfach Quadropol Massenspektrometer mit LC-Kopplung und Electronic Spray (ESI) Ionisation, Agilent Technologies, Waldbronn

Säule: Liquospher RP18, endcapped (150x3 mm), 5 µm Partikelgröße (Merck, Darmstadt)

Säulentemperatur: 40 °C

Säulenschaltung: 1,5 bis 12 min

Gradient:

Zeit (min)	12mM Ammoniumacetat (%)	Acetonitril (%)	Flußrate (ml/min)
0,0	70	30	0,50
9,0	20	80	0,50
10,0	20	80	0,75
11,0	20	80	0,75
12,0	70	30	0,50

Äquilibrierungszeit: 4 Minuten

#### 2.2.4.4.5 Massenspektrometrie

Ionisation: Electronic Spray Ionisation (ESI), positiv

Gastemperatur: 350 °C

Spühdruk: 60 psig

N<sub>2</sub> Volumenstrom: 11 l/min

Kapillarspannung: 3500 V

Messmodus:	Single Ion Monitoring Mode (SIM)	
	1,5 min	Fragmentor 110 V
	Gain: 2	
	m/z 258	5-OH-Propafenon
	m/z 265	[ <sup>2</sup> H <sub>7</sub> ]-5-OH-Propafenon

#### 2.2.4.5 Bestimmung des Coumarin-Metaboliten Umbelliferon

Die Bestimmung des Coumarin-Metaboliten Umbelliferon wurde mit einigen Änderungen in Anlehnung der von Gentest beschriebenen Methode zur Produktspezifikation von CYP2A6 Supersomes<sup>TM</sup> ([http://www.gentest.com/products/tissue\\_frac/prod\\_inserts/hlm\\_meth.shtm](http://www.gentest.com/products/tissue_frac/prod_inserts/hlm_meth.shtm)) durchgeführt.

##### 2.2.4.5.1 Reinsubstanzen

Coumarin und Umbelliferon wurden von Sigma-Adrich, Deisenhofen bezogen.

Coumarin:	M: 146,15 g/mol
Umbelliferon:	M: 162,15 g/mol

##### 2.2.4.5.2 Lösungen

Stammlösungen: Coumarin und Umbelliferon wurden auf einer Analysenwaage abgewogen und als 2 mM bzw. 10 mM Stammlösungen in DMSO gelöst und bei 4°C gelagert.

Arbeitslösungen: Die Arbeitslösungen wurden aus den Stammlösungen mit Millipore-Wasser verdünnt und bei 4 °C gelagert.

Fluoreszenzpuffer: 100 mM Tris pH 9,0  
6,06 g Tris-Base wurden in 300 ml Millipore-Wasser gelöst und mit HCl konz. auf pH 9,0 eingestellt. Die Lösung wurde mit Millipore-Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

### 2.2.4.5.3 Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurde aus der Stammlösung des Metaboliten Umbelliferon eine Lösung von 2500 pmol/25 µl mit Millipore-Wasser hergestellt. Aus dieser Lösung wurden durch weitere Verdünnungsschritte mit Millipore-Wasser folgende Kalibrierproben hergestellt:

Kalibrierprobe 9	2500 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 8	1000 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 7	500 pmol/10 µl
Kalibrierprobe 6	250 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 5	100 pmol/12,5 µl
Kalibrierprobe 4	50 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 3	25 pmol/12,5 µl
Kalibrierprobe 2	10 pmol/12,5 µl
Kalibrierprobe 1	5 pmol/12,5 µl

Die Kalibrierproben wurden entsprechend den Inkubationsansätzen angesetzt: Entsprechende Mengen der Kalibrierlösung wurden mit 25 µl NADPH-RS, 5 µl denaturiertem mikrosomalem Protein und 25 µl 2 mM Coumarinlösung versetzt. Die Proben wurden mit 0,1 M Tris-Puffer pH 7,5 auf 250 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 100 µl Trichloressigsäure (20 %, m/V) wurden die Proben gemischt und 5 min bei 16000 g zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden mit 1,9 ml 0,1M Tris pH 9 verdünnt. Davon wurden 100 µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend wie unter 2.2.4.5.4 beschrieben, vermessen. Entsprechend dieser Vorgehensweise wurden aus separaten Qualitätskontrollproben mit den Umbelliferonkonzentrationen von 10 pmol, 50 pmol und 250 pmol drei Qualitätskontrollen hergestellt. Die Quantifizierung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse.

### 2.2.4.5.4 Fluorometrie

Gerät:	1420 Victor Spektrophotometer, PerkinElmer Wallac Turku, Finnland
Emissionswellenlänge:	460 nm
Extinktionswellenlänge:	355 nm



#### 2.2.4.6 Bestimmung des 7-Ethoxycoumarin-Metaboliten Umbelliferon

Die Methode zur Bestimmung des 7-Ethoxycoumarin-Metaboliten Umbelliferon wurde in Anlehnung an eine von Yamazaki et al. (1999) beschriebene Methode durchgeführt.

##### 2.2.4.6.1 Reinsubstanzen

7-Ethoxycoumarin und Umbelliferon wurden ebenfalls wie das unter 2.2.4.5.1 erwähnte Umbelliferon von Sigma-Aldrich, Deisenhofen bezogen.

7-Ethoxycoumarin:	M: 190,2 g/mol
Umbelliferon:	M: 162,15 g/mol

##### 2.2.4.6.2 Lösungen

Stammlösungen: Auf einer Analysenwaage abgewogenes 7-Ethoxycoumarin wurde in 50%igem Methanol als 20 mM Stammlösung gelöst und bei 4°C gelagert. Umbelliferon wurde als 10 mM Stammlösung in DMSO gelöst und ebenfalls bei 4°C gelagert.

Arbeitslösungen: Die Arbeitslösungen wurden aus den Stammlösungen mit Millipore-Wasser verdünnt und bei 4 °C gelagert.

Fluoreszenzpuffer: 30 mM Boratpuffer pH 9,0  
2,86 g  $B_4O_7Na_2 \cdot 10H_2O$  wurde in 250 ml Millipore-Wasser gelöst.  
0,46 g Borsäure wurde ebenfalls in 250 ml Milliporewasser gelöst. Die beiden Lösungen wurden vereinigt und mit HCl konz. auf pH 9,0 eingestellt.

#### 2.2.4.6.3 Kalibrierung

Die Kalibrierlösungen mit Umbelliferon wurden wie unter 2.2.4.5.3 beschrieben, hergestellt.

Die Kalibrierproben wurden entsprechend den Inkubationsansätzen angesetzt: Entsprechende Mengen der Kalibrierlösung wurden mit 25 µl NADPH-RS, 5 µl denaturiertem mikrosomalem Protein und 25 µl 2 mM 7-Ethoxycoumarinlösung versetzt. Die Proben wurden mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 auf 250 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 25 µl Trichloressigsäure (10 %, m/V) wurden die Proben mit 250 µl Dichlormethan versetzt, gemischt und 5 min bei 16000 g zentrifugiert. 100 µl der organischen Phase wurden mit 600 µl 30 mM Boratpuffer pH 9,0 verdünnt und gemischt. Davon wurden 100 µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend wie unter 2.2.4.5.4 beschrieben vermessen. Entsprechend dieser Vorgehensweise wurden aus separaten Qualitätskontrollproben mit den Umbelliferonkonzentrationen von 10 pmol, 50 pmol und 250 pmol drei Qualitätskontrollen hergestellt. Die Quantifizierung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse.

#### 2.2.4.7 Messung des Clopidogrel-Abbaus

##### 2.2.4.7.1 Reinsubstanzen

Clopidogrel wurde vom Sanofi Research Center, Montpellier Frankreich bezogen.

Clopidogrel-HSO<sub>4</sub>: M: 418,9 g/mol

##### 2.2.4.7.2 Lösungen

Mobile Phase A: Millipore-Wasser + 1 % Essigsäure (v/v)

Mobile Phase B: Acetonitril + 1 % Essigsäure (v/v)

Stammlösungen: Clopidogrel wurde auf einer Analysenwaage abgewogen und als 10 mM Stammlösung in Millipore-Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

Arbeitslösungen: Die Arbeitslösungen wurden aus den Stammlösungen mit Millipore-Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.4.7.3 Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurde aus der Clopidogrelstammlösung eine Lösung von 1mM Clopidogrel mit Millipore-Wasser hergestellt. Aus dieser Lösung wurden durch weitere Verdünnungsschritte mit Millipore-Wasser folgende Kalibrierproben hergestellt:

Kalibrierprobe 5	6250 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 4	2500 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 3	1250 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 2	250 pmol/25 µl
Kalibrierprobe 1	25 pmol/25 µl

Die Kalibrierproben wurden entsprechend den Inkubationsansätzen angesetzt: 25 µl der Kalibrierlösung wurden mit 25 µl NADPH-RS und 5 µl denaturiertem mikrosomalem Protein versetzt. Die Proben wurden mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 auf 250 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 250 µl 1 % Essigsäure in ACN (v/v) wurden die Proben gemischt und 5 min bei 16000 g zentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurden direkt in das HPLC-System injiziert. Die Auswertung erfolgte über eine lineare Regressionsanalyse der Peakflächen.

### 2.2.4.7.4 Chromatographie

Gerät:	HP1100 mit Entgaser, Binäre Pumpe, Säulenschaltung, Autosampler, UV-Detektor, Agilent Technologies, Waldbronn
UV-Detektor:	254 nm
Detektor:	HP1100 einfach Quadropol Massenspektrometer mit LC-Kopplung und Electronic Spray (ESI) Ionisation, Agilent Technologies, Waldbronn
Säule:	Prontosil-C18 AQ ,150x3 mm, 3 µM Partikelgröße (Bischoff, Leonberg)
Säulentemperatur:	30 °C
Säulenschaltung:	3,5 bis 8 min

Gradient:

Zeit (min)	H <sub>2</sub> O + 1% HOAc (%)	Acetonitril + 1% HOAc (%)	Flußrate (ml/min)
0,0	35	65	0,5
4,0	35	65	0,5
6,0	20	80	0,5
8,0	20	80	0,5
8,1	20	80	0,7
8,5	35	65	0,7
11,0	35	65	0,7

Äquilibrierungszeit: 2 Minuten

#### 2.2.4.7.5 Massenspektrometrie

Ionisation: Electronic Spray Ionisation (ESI), positiv  
Gastemperatur: 350 °C  
Spühdruk: 60 psig  
N<sub>2</sub> Volumenstrom: 13 l/min  
Kapillarspannung: 1500 V  
Messmodus: Single Ion Monitoring Mode (SIM)  
4 min      Fragmentor 80 V  
Gain: 3  
m/z 322      Clopidogrel

## 2.2.5 In-vitro-Inkubationen zur Bestimmung der Cytochrom P450-Enzymaktivitäten

### 2.2.5.1 S-Mephenytoin-N-Demethylase- und 4'-Hydroxylase-Aktivität

Zur in-vitro-Aktivitätsbestimmung von CYP2B6, CYP2C9 und CYP2C19 wurde das ehemals als Antikonvulsivum und bereits vom Markt genommene S-Mephenytoin verwendet. S-Mephenytoin wird hauptsächlich durch CYP2B6 zu Nirvanol N-demethyliert, wobei CYP2C9 auch einen geringen Anteil zur S-Mephenytoin-N-Demethylierung beiträgt. S-Mephenytoin wird durch CYP2C19 zu 4'-OH-Mephenytoin hydroxyliert (Ko et al., 1998, Heyn et al., 1996). Die Strukturen von S-Mephenytoin und der Metabolite sind in Abb. 3 dargestellt.

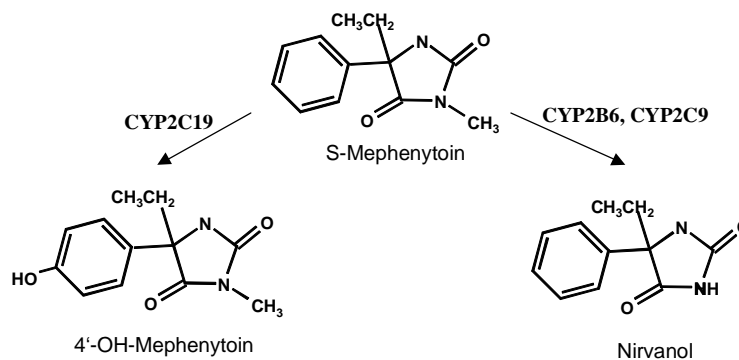
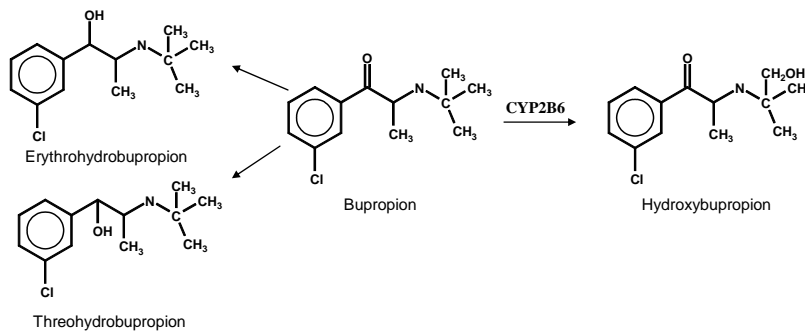


Abb. 3: Metabolismus von S-Mephenytoin

Die Enzymreaktion erfolgte jeweils in 250 µl Ansätzen. Humane Lebermikrosomen oder eine Präparation aus rekombinantem Protein wurden mit der entsprechenden S-Mephenytoin-Konzentration in 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 3 min bei 37 °C vorinkubiert. Durch Zugabe von 25 µl NADPH-RS wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,7 ml Ethanol (96 %) gestoppt. Nach Zugabe von 25 µl internem Standard (100 pmol [<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]-Nirvanol und 100 pmol [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-4'-Hydroxymephenytoin) wurde gemischt. Zur Abtrennung der denaturierten Proteine wurde 5 min bei 16000 g zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus). 1,8 ml Überstand wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und unter Stickstoff-Begasung bei 37°C bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 150 µl Wasser/Acetonitril (84:16, v/v) aufgenommen. 40 µl wurden in das HPLC-System injiziert und wie unter 2.2.4.1 beschrieben, analysiert.

### 2.2.5.2 Bupropion-Hydroxylase-Aktivität

Bupropion, ein Antidepressivum und als Raucherentwöhnungsmittel eingesetztes Arzneimittel, wurde von Hesse et al. (2000) als Substrat von CYP2B6 beschrieben. Aus dem chiralen Molekül Bupropion entsteht neben Threohydrobupropion und Erythrohydrobupropion das durch CYP2B6 gebildete Hydroxybupropion (Abb. 4).



**Abb. 4:** Metabolismus von Bupropion

Die Enzymreaktion erfolgte jeweils in 250  $\mu$ l Ansätzen. Humane Lebermikrosomen oder eine Präparation aus rekombinantem Protein wurden mit der entsprechenden Bupropion-Konzentration in 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 3 min bzw. 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Durch Zugabe von 25  $\mu$ l NADPH-RS wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ l 1 N HCl gestoppt. Nach Zugabe von 25  $\mu$ l internem Standard (100 pmol [ $^2$ H $_3$ ]-Hydroxybupropion) wurde gemischt. Zur Abtrennung der denaturierten Proteine wurde 5 min bei 16000 g zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus). 250  $\mu$ l des Überstandes wurden in ein LC-MS-Gläschen pipettiert. 10  $\mu$ l wurden in das HPLC-System injiziert und wie unter 2.2.4.2 beschrieben, analysiert.

Die bei den Untersuchungen zum Metabolismus in humanen Hepatozyten entnommenen Medienüberstände (87,5  $\mu$ l) wurden mit 12,5  $\mu$ l internem Standard (50 pmol [ $^2$ H $_3$ ]-Hydroxybupropion) und 100  $\mu$ l Wasser + 1 % Essigsäure/Acetonitril + 1 % Essigsäure (84:16, v/v) versetzt und gemischt. Davon wurden 10  $\mu$ l direkt in das HPLC-System injiziert.

### 2.2.5.3 Verapamil-O-Dealkylierung und N-Dealkylierung

Der Calciumkanalblocker Verapamil wird durch verschiedene Cytochrom P450-Enzyme metabolisiert (Abb. 5). Die zwei N-Desalkyl-Hauptmetabolite D-617 und Norverapamil (Kroemer et al., 1992; Kroemer et al., 1993) werden hauptsächlich durch CYP3A4 gebildet. Die Verapamil-O-Demethylierung zu D-703 wurde zur Charakterisierung der CYP2C8-Enzymaktivität herangezogen.

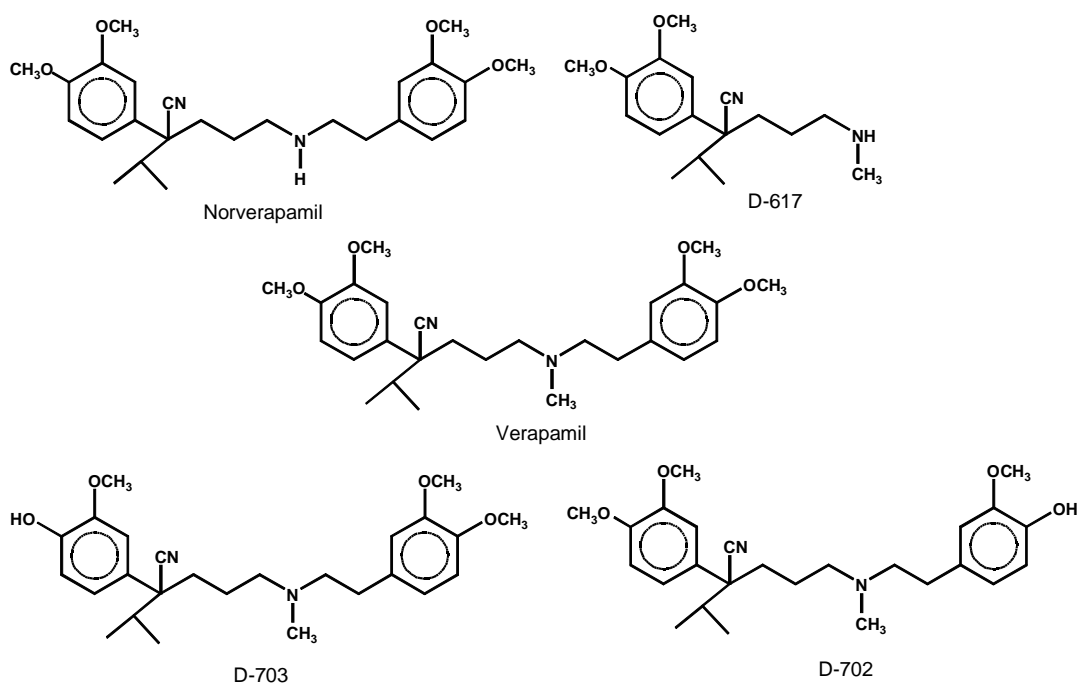


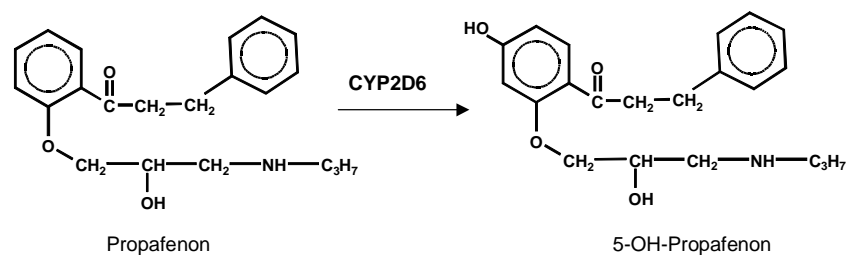
Abb. 5: Verapamil und Metabolite

Die Enzymreaktion erfolgte jeweils in 250  $\mu$ l Ansätzen. CYP3A4 exprimierende Insektenzellmikrosomen (Supersomes<sup>TM</sup>) wurden mit der entsprechenden Verapamil-Konzentration in 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 3 min bei 37 °C vorinkubiert. Durch Zugabe von 25  $\mu$ l NADPH (48 mM) wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,7 ml Ethanol (96 %) gestoppt. Nach Zugabe von 25  $\mu$ l internem Standard (50 pmol [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]Norverapamil und D-832) wurde auf dem Universalschüttler gemischt. Zur Abtrennung der denaturierten Proteine wurde 5 min bei 16000 g zentrifugiert. 1,8 ml des Überstandes wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und unter Stickstoff-Begasung bei 37°C bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 150  $\mu$ l Ammoniumacetat pH 4,2/Acetonitril (70:30, v/v) aufgenommen. 20  $\mu$ l wurden in das HPLC-System injiziert und wie unter 2.2.4.3 beschrieben, analysiert.

Die bei den Untersuchungen zum Metabolismus in humanen Hepatozyten entnommenen Medienüberstände (87,5 µl) wurden mit 12,5 µl internem Standard (50 pmol [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]-Norverapamil, D-832), 100 µl Ammoniumacetat pH 4,2/Acetonitril (70:30, v/v) versetzt und gemischt. Davon wurden 20 µl direkt in das HPLC-System injiziert.

#### 2.2.5.4 Propafenon-5-Hydroxylierung

Das Antiarrhythmikum Propafenon wird durch CYP2D6 zu 5-Hydroxypropafenon metabolisiert (Hofmann et al., 2000). Der CYP2D6-abhängige Metabolismus von Propafenon ist in Abb. 6 dargestellt.



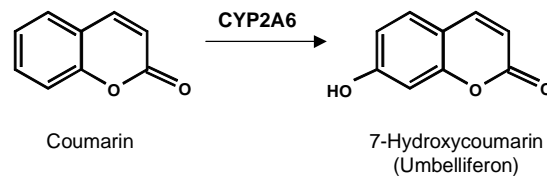
**Abb. 6:** Metabolismus von Propafenon

Die Enzymreaktion erfolgte jeweils in 250 µl Ansätzen. Humane Lebermikrosomen oder eine Präparation aus rekombinantem CYP-Protein wurden mit der entsprechenden Propafenon-Konzentration in 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 3 min bei 37 °C vorinkubiert. Durch Zugabe von 25 µl NADPH-RS wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 1,7 ml Ethanol (96 %) gestoppt. Nach Zugabe von 10 µl internem Standard (200 pmol [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>]-5-OH-Propafenon) wurde gemischt. Zur Abtrennung der denaturierten Proteine wurde 5 min bei 16000 g zentrifugiert. 1,8 ml des Überstandes wurden in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und unter Stickstoff-Begasung bei 37°C bis zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 150 µl 12 mM Ammoniumacetat/Acetonitril (70:30, v/v) aufgenommen. 20 µl wurden in das HPLC-System injiziert und wie unter 2.2.4.4 beschrieben, analysiert.



### 2.2.5.5 Coumarin-Hydroxylierung

Coumarin ist ein Substrat von CYP2A6 (Shimada et al., 1994) und wird durch dieses zu Hydroxycoumarin (Umbelliferon) metabolisiert (Abb. 7).

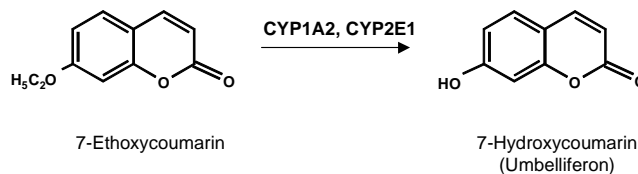


**Abb. 7:** Metabolismus von Coumarin zu Umbelliferon

Die Enzymreaktionen wurden jeweils in 250  $\mu$ l Ansätzen durchgeführt. Eine Präparation aus rekombinantem CYP- Protein (Supersomes™) wurden mit der entsprechenden Coumarin-Konzentration in 0.1 M Tris pH 7,5 3 min bei 37 °C vorinkubiert. Durch Zugabe von 25  $\mu$ l NADPH-RS wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 100  $\mu$ l Trichloressigsäure (20 %, m/V) beendet. Die Inkubationslösungen wurden 5 min bei 16000 g zentrifugiert. 100  $\mu$ l des Überstandes wurden mit 1,9 ml 0,1M Tris pH 9 verdünnt. Davon wurden 100  $\mu$ l in eine Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend, wie unter 2.2.4.5 beschrieben, vermessen.

### 2.2.5.6 7-Ethoxycoumarin-Deethylierung

7-Ethoxycoumarin wird durch verschiedene Cytochrom P450-Enzyme zu Umbelliferon metabolisiert (Abb. 8). An der Deethylierung zu Umbelliferon sind vor allem die Enzyme CYP1A2, CYP2E1 und CYP2B6 beteiligt (Yamazaki et al., 1999). Die Reaktion wurde unter Verwendung unterschiedlicher Substratkonzentrationen zur Charakterisierung der CYP1A2- und 2E1-Enzymaktivität verwendet.

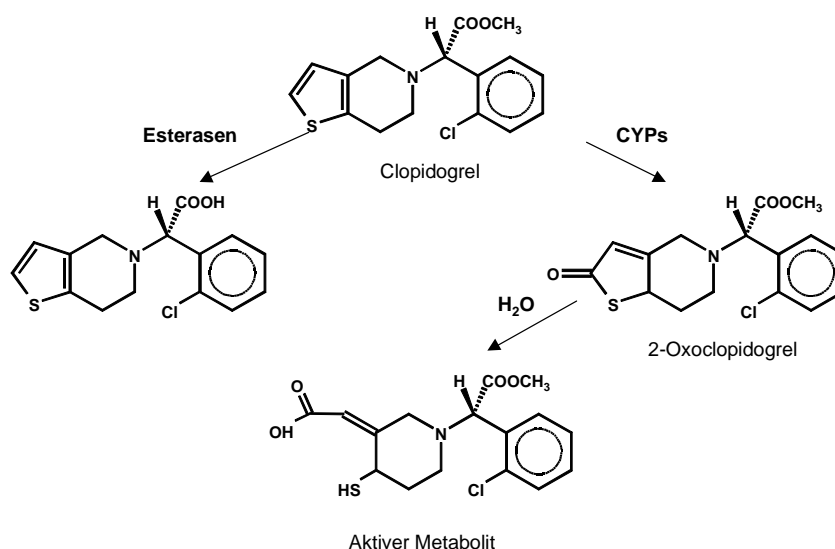


**Abb. 8:** Metabolismus von 7-Ethoxycoumarin zu Umbelliferon

Die Enzymreaktionen erfolgten jeweils in 250 µl Ansätzen. CYP1A2 bzw. CYP1E1-Supersomes<sup>TM</sup> (je 5 pmol) wurden mit 10 µM bzw. 200 µM 7-Ethoxycoumarin in 0.1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 3 min bei 37 °C vorinkubiert. Durch Zugabe von 25 µl NADPH-RS wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach 15 min Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl Trichloressigsäure (10 %, m/V) beendet. Die Proben wurden mit 250 µl Dichlormethan versetzt und 5 min bei 16000 g zentrifugiert. 100 µl der organischen Phase wurden mit 600 µl 30 mM Boratpuffer pH 9,0 verdünnt und gemischt. Davon wurden 100 µl in eine Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend wie unter 2.2.4.6 beschrieben, vermessen.

### 2.2.5.7 Clopidogrel-Metabolismus

Das Thienopyridinderivat Clopidogrel wird durch Cytochrom P450-Enzyme zum 2-Oxoclopidogrel metabolisiert. Dieser instabile Metabolit wird anschließend zum aktiven Metaboliten hydrolysiert. Daneben wird ein Großteil des Moleküls durch Esterasen zu einem inaktiven Carboxylsäurederivat hydrolysiert (Savi et al., 2000; Abb. 9). Da keiner der Metabolite zur Verfügung stand, wurde die Clopidogrelabnahme bei der Enzymreaktion bestimmt.



**Abb. 9:** Metabolismus von Clopidogrel

Der Anteil an Cytochrom P450-abhängigem Clopidogrelmetabolismus wurde in 250 µl Ansätzen bestimmt. Die zu untersuchenden rekombinanten Supersomes<sup>TM</sup> (5 pmol) wurden mit 10 µM Clopidogrel und 80 mM NaF in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 3 min bei 37 °C vorinkubiert. Die Enzymreaktionen wurden durch Zugabe von 25 µl NADPH-RS gestartet und nach 10 min durch die Zugabe von 250 µl eiskalter 1%iger Essigsäure in ACN (v/v) beendet. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 16000 g wurden 5 µl des Überstandes in das HPLC-System injiziert und wie unter 2.2.4.7 beschrieben, analysiert.

## 2.2.6 In-vitro- Inhibition der S-Mephenytoin-N-Demethylierung

### 2.2.6.1 Inhibition mit Sulfaphenazol

#### 2.2.6.1.1 Substanzen, Lösungen

Sulfaphenazolstocklösung: 1,56 mg Sulfaphenazol wurde auf der Analysenwaage abgewogen und in 6 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 im Ultraschall gelöst. Die Lösung wurde bei –20 °C gelagert.

#### 2.2.6.1.2 Durchführung

Die Inhibition der CYP2C9-Enzymaktivität mit Sulfaphenazol wurde im rekombinanten System mit 5 pmol CYP2C9 Supersomes<sup>TM</sup> und einer S-Mephenytoin-Konzentration von 200 µM durchgeführt. Verschiedene Sulfaphenazolkonzentrationen wurden dem unter 2.2.5.1 beschriebenen Assay zugegeben. Die CYP2B6-Phänotypisierung der Leberbank erfolgte mit einer S-Mephenytoin-Konzentration von 200 µM und einer Sulfaphenazolkonzentration von 10 µM.

### 2.2.6.2 Inhibition mit anti-CYP3A4/3A5

#### 2.2.6.2.1 Durchführung

Die Inhibition der CYP3A4-Enzymaktivität mit einem inhibitorischem CYP3A4/3A5-Antikörper (Invitrogen) wurde im rekombinanten System mit 5 pmol CYP3A4 Supersomes<sup>TM</sup> und einer S-Mephenytoin-Konzentration von 200 µM durchgeführt. Verschiedene Antikörpermengen wurden mit CYP3A4 Supersomes<sup>TM</sup> für 5 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden die übrigen Bestandteile zugegeben und die Enzymaktivität wie unter 2.2.4.1 beschrieben, bestimmt.

## 2.2.7 Untersuchungen der CYP- Inhibition durch Thiotepa, Clopidogrel und Ticlopidin

### 2.2.7.1 Einfluss von Thiotepa, Clopidogrel und Ticlopidin auf die CYP2B6-Aktivität

Um den Einfluss von Thiotepa, Clopidogrel und Ticlopidin auf die CYP2B6-Aktivität zu untersuchen, wurde eine der Substanzen in verschiedenen Konzentrationen mit 50 µg mikrosomalem Protein und 50 µM Bupropion koinkubiert. Die Bupropionhydroxylaseaktivität wurde wie unter 2.2.4.2 beschrieben, bestimmt.

### 2.2.7.2 Untersuchungen zur irreversiblen CYP2B6-Inhibition

#### 2.2.7.2.1 Dialyse

100 µg Lebermikrosomen oder 25 pmol CYP2B6 Supersomes<sup>TM</sup> wurden mit oder ohne NADPH-RS und mit oder ohne Inhibitoren (Thiotepa, 50 µM; Clopidogrel, 10 µM; Ticlopidin, 10 µM) für 15 min bei 37 °C in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 inkubiert (Gesamtvolumen: 250 µl). Anschließend wurden die Proben 3 mal gegen 2 l 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 für jeweils zwei Stunden bei 4 °C in QuixSep Mikrodialysierkapseln (Roth) mit einer regenerierten Cellulosemembranen (Porengröße: 12 kDa, Roth) dialysiert. Dann wurde die Bupropionhydroxylaseaktivität wie unter 2.2.4.2 beschrieben mit einer Bupropionkonzentration von 500 µM und einer Inkubationszeit von 15 min bestimmt.

#### 2.2.7.2.2 CO-Differenz-Spektroskopie

Die CO-Differenzspektroskopie dient der Quantifizierung von funktionellem P450-Enzym, welches die chromophore Häm-Gruppe enthält. Reduziertes Cytochrom P450 (Fe II) ist in der Lage mit CO einen Komplex zu bilden und hat in diesem Zustand ein Absorptionsmaximum bei 450 nm (Omura und Sato 1964).

#### 2.2.7.2.2.1 Probeninkubation

Rekombinantes CYP2B6 (0,6  $\mu\text{M}$ , durch Expression von Wildtyp *CYP2B6* cDNA in Insektenzellen) und gereinigte Ratten- Oxidoreduktase (0,6  $\mu\text{M}$ ) wurden in An- oder Abwesenheit von Thiotepa (100  $\mu\text{M}$ ), Clopidogrel (10  $\mu\text{M}$ ) oder Ticlopidin (10  $\mu\text{M}$ ) in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 3 min vorinkubiert. Die Inhibitionen wurden durch Zugabe von NADPH-RS gestartet. Kontrollen wurden ohne NADPH-RS inkubiert. Die Reaktionen wurden nach 15 min durch die Zugabe von 0,75 ml Spektrenpuffer (0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 10 % Glycerin, 0,5 % Emulgen 911) beendet.

#### 2.2.7.2.2.2 Photometrie

Die mit Spektrenpuffer versetzten Proben wurden 15 min auf Eis inkubiert. Jede Probe wurde mit einer Spatelspitze Dithionit reduziert und gemischt. Das Leerspektrum wurde mit dem 8453 UV-Visible Spektrophotometer (Agilent) zwischen 400 und 500 nm aufgenommen. Anschließend wurde die Probe vorsichtig 15 Sekunden mit CO begast und das CO-Spektrum-Differenzspektrum zwischen 400 und 500 nm aufgenommen.

#### 2.2.7.2.2.3 Quantifizierung von P450

Zur Quantifizierung von P450 wurde die Differenz der Absorption bei 450 nm und 490 nm gebildet.

$$\text{P450 (pmol/ml)} = \frac{\Delta A (450-490) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 1000}{\varepsilon \times d}$$

$$\varepsilon (450 \text{ nm}) = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$\text{Schichtdicke } d \text{ der Küvette} = 1 \text{ cm}$$

#### 2.2.7.2.3 Bestimmung inhibitorischer Parameter

Um detaillierte kinetische Untersuchungen eines irreversiblen Inhibitors durchzuführen, muss der Inaktivierungsschritt von der Beobachtung des Substratmetabolismus getrennt werden. Dieses wird durch Verdünnen des Inkubationsansatzes erreicht.

#### 2.2.7.2.3.1 Bestimmung der enzymatischen Restaktivität von CYP2B6

Alle Inkubationen wurden bei 37 °C mit 5 pmol rekombinanten CYP2B6 + OR Supersomes<sup>TM</sup> oder 100 µg Lebermikrosomen durchgeführt. Die Proben wurden mit verschiedenen Thiotepakonzentrationen (0,5 – 10 µM) oder Clopidogrel- bzw. Ticlopidinkonzentrationen (0,05 – 1 µM) bei 37 °C für drei Minuten vorinkubiert. Nach der Zugabe von NADPH-RS wurden die Proben 0 bis 15 min inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden 25 µl aus dem Inkubationsansatz entnommen und zu 225 µl eines auf 37 °C vorgewärmten Reaktionsansatzes gegeben, der aus 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 500 µM Bupropion und dem NADPH-RS bestand. Nach sechs Minuten Inkubation wurden die Reaktionen durch Zugabe von 50 µl 1 N HCl gestoppt. Die Proben wurden dann wie unter 2.2.4.2 beschrieben behandelt und analysiert.

#### 2.2.7.2.3.2 Datenanalyse

Die enzymkinetischen Daten wurden nach einer Methode von Silverman (1995) ausgewertet.

Für jede eingesetzte Inhibitorkonzentration wurden die prozentualen Restaktivitäten im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

Die Halbwertszeiten der Enzyminaktivierung wurden durch die Anfangssteigungen der Restenzymaktivitäten, die halblogarithmisch gegen die Vorinkubationszeit aufgetragen wurden, berechnet. Die so erhaltenen Halbwertszeiten der Enzyminaktivierung wurden gegen die reziproken Werte der jeweiligen Inhibitorkonzentrationen aufgetragen.  $K_i$ , die Konzentration für halb-maximale Inaktivierung und  $k_{inact}$ , die Inaktivierungskonstante für maximale Inaktivierung wurden durch die Schnittpunkte mit der Abszisse bzw. Ordinate bestimmt.

#### 2.2.7.2.4 Einfluss von Radikalfängern und Abfangreagenzien auf die CYP2B6-Inhibition

##### 2.2.7.2.4.1 Lösungen

Glutathion:	Die Substanz wurde in einer Konzentration von 50 mM in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 gelöst. Die Lösung wurde bei – 20 °C gelagert.
N-Acetylcystein:	Die Substanz wurde in einer Konzentration von 50 mM in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 gelöst. Die Lösung wurde bei – 20 °C gelagert.
DMSO:	DMSO wurde als 10%ige Lösung (v/v) mit Millipore-Wasser verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.
Superoxiddismutase:	15000 Einheiten Superoxiddismutase wurden in 750 µl gelöst und bei – 20 °C gelagert.

##### 2.2.7.2.4.2 Durchführung

Die Proben wurden wie unter 2.2.7.1 beschrieben mit dem zu untersuchenden Inhibitor (10 µM), dem Substrat Bupropion (500 µM) und Glutathion (10mM), N-Acetylcystein (10 mM), DMSO (0,1 %) oder Superoxiddismutase (1000 Einheiten) in den angegebenen Konzentrationen koinkubiert. Nach 15 min Inkubation bei 37 °C wurden die Reaktionen beendet und die Bupropionhydroxylaseaktivität wie unter 2.2.4.1 beschrieben, bestimmt.

#### 2.2.7.2.5 Einfluss anderer CYP2B6-Substrate auf die CYP2B6-Inhibition

##### 2.2.7.2.5.1 Lösungen

7-Ethoxycoumarin :	Die Stammlösung wurde wie unter 2.2.4.6.2 beschrieben hergestellt.
Paroxetin:	Paroxetin wurde als 500 µM Stammlösung in Millipore-Wasser gelöst und bei –20 °C gelagert.

#### 2.2.7.2.5.2 Durchführung

Humane Lebermikrosomen (100 µg) wurden mit Thiotepa (5 µM), Clopidogrel (0,5 µM) oder Ticlopidin (0,5 µM) für 3 min bei 37 °C in der An- oder Abwesenheit von 7-Ethoxycoumarin (1 mM) bzw. Paroxetin (50 µM) inkubiert. Nach der Zugabe von 25 µl NADPH-RS wurden die Proben für 15 min bei 37 °C inkubiert. Bei den mit 7-Ethoxycoumarin inkubierten Proben wurde die Restbupropionhydroxylaseaktivität wie unter 2.2.7.2.3.1 beschrieben durch Entnahme von 25 µl des Reaktionsansatzes und 6 minütiger Inkubation mit Bupropion und NADPH-RS bestimmt. Die mit dem kompetitiven CYP2B6-Inhibitor Paroxetin inkubierten Proben wurden, wie unter 2.2.7.2.1 beschrieben, dialysiert und analysiert.

#### 2.2.7.3 Untersuchung zur Selektivität der CYP-Inhibition

Um den Einfluss von Thiotepa, Clopidogrel und Ticlopidin auf die Funktion anderer, am Arzneimittelmetabolismus beteiligten Cytochrom P450-Enzyme zu untersuchen, wurden jeweils 5 pmol Supersomes<sup>TM</sup> + OR mit den zu untersuchenden Inhibitoren oder Kontrollinhibitoren für das entsprechende CYP und dem NADPH-RS (bzw. NADPH bei der Bestimmung der CYP3A4 und CYP2C8-Aktivität) 5 min bei 37 °C koinkubiert. Anschließend wurde das entsprechende Substrat zur Charakterisierung der jeweiligen CYP-Aktivität zugegeben. Die einzelnen Parameter sind in Tab. 4 zusammengefasst. Die Enzymaktivität nach Inkubationen mit den entsprechenden Inhibitoren wurde im Vergleich zu der Kontrollaktivität ohne Inhibitor in Prozent angegeben.



**Tab. 4:** Zusammenfassung der Inkubationsbedingungen für verschiedene Cytochrom P450-Enzymaktivitätsassays

P450	Reaktion	Substrat-konzentration	Inkubations-zeit	Inhibitor	Inhibitor-konzentration
1A2	7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung	10	15	Furafyllin	10
2A6	Coumarin-7-Hydroxylierung	200	15	DTC <sup>1</sup>	100
2B6	Bupropion-Hydroxylierung	50	15	Thiotepa	10
2C8	Verapamil-O-Demethylierung	100	30	Clopidogrel Ticlopidin Ketokonazol	1, 10 1, 10 100
2C9	S-Mephenytoin-N-Demethylierung	1000	30	Sulfaphenazol	10
2C19	S-Mephenytoin-4'-Hydroxylierung	200	15	Ketokonazol	100
2D6	Propafenon-5-Hydroxylierung	2	20	Chinidin	5
2E1	7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung	200	15	DTC	1
3A4	Verapamil-N-Demethylierung	100	10	Ketokonazol	100

<sup>1</sup> Diethyldithiocarbamat

## 2.2.8 Bestimmung der NADPH:P450-Oxidoreduktase-Aktivität

Cytochrom P450 wird durch die NADPH:P450-Oxidoreduktase reduziert. Statt P450 kann auch Cytochrom c durch die Reduktase reduziert werden, was man bei einer Wellenlänge von 550 nm messen kann (Tamura et al., 1992).

### 2.2.8.1 Lösungen

0,3 M Natriumphosphatpuffer pH 7,7:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,3 M  
mit  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,3 M

auf pH 7,7 einstellen.

Der Puffer wurde im Wasserbad auf 25 °C temperiert.

Cytochrom c:

Cytochrom c wurde in einer Konzentration von 4 mM in Millipore-Wasser gelöst. Die Lösung wurde an jedem Versuchstag frisch angesetzt.

NADPH: NADPH wurde in einer Konzentration von 10 mM in Millipore-Wasser gelöst. Die Lösung wurde an jedem Versuchstag frisch angesetzt.

#### 2.2.8.2 Photometrie

50 µg mikrosomales Protein und 10 µl Cytochrom c (4 mM) wurden mit 0,3 M Natriumphosphatpuffer pH 7,7 auf 1 ml aufgefüllt, bei 25 °C im Wasserbad temperiert und in eine 1 ml Küvette überführt. Nach Aufnahme des Leerwertes bei 550 nm wurden 10 µl NADPH (10 mM) zugegeben und durch Auf- und Abziehen mit einer 1ml-Pipettenspitze gemischt. Dann wurde für 60 sec die Absorptionzunahme bei 550 nm aufgenommen.

#### 2.2.8.3 Berechnung der NADPH:P450-Oxidoreduktase-Aktivität

Volumen- Aktivität (Units/ml) =  $\frac{\text{Absorptionzunahme/min} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\epsilon \times d}$

$\epsilon$  (550 nm) = 21 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

Schichtdicke d der Küvette = 1 cm

spezifische Aktivität (Units/mg) =  $\frac{\text{Aktivität (Units/ml)}}{\text{Proteinkonz. (mg/ml)}}$

## 2.2.9 Untersuchungen zum Metabolismus und zur Expression von Cytochrom P450-Enzymen an humanen Hepatozyten

### 2.2.9.1 Kultivierung von humanen Hepatozyten

Die humanen Hepatozyten wurden in Berlin (Charité) isoliert und auf einer Kollagenmatrix in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/Well einer 6-Well-Platte kultiviert. Nach einem Tag Kultivierung wurden diese nach Stuttgart versendet. Nach Erhalt der Hepatozyten wurden diese zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS je Well einer 6-Well-Platte gewaschen. Anschließend wurde jedes Well mit 2 ml Hepatozyten- Kulturmedium versetzt. Die Zellen erhielten 24-stündlich einen Mediumwechsel.

### 2.2.9.2 Inkubationen von humanen Hepatozyten mit Arzneistoffen

#### 2.2.9.2.1 Lösungen

Verapamil: 10 mM Stammlösung in H<sub>2</sub>O

Bupropion: 5 mM Stammlösung in 5 % Methanol

Thiotepa: 1 mM Stammlösung in H<sub>2</sub>O

#### 2.2.9.2.2 Durchführung

Die Inkubationen mit Arzneistoffen erfolgten am Tag nach Erhalt der Zellen aus Berlin.

Zur Inkubation wurde das Kulturmedium gewechselt und Medium, welches die entsprechende Substanz in der jeweiligen Konzentration enthielt, zugegeben. Die Zellen wurden für eine Stunde mit den Substanzen inkubiert. Innerhalb dieser Stunde wurde zu verschiedenen Zeitpunkten 87,5 µl Mediumüberstand entnommen und sofort auf Eis gestellt. Die weitere Aufarbeitung der Proben ist unter 2.2.5.2 bzw. 2.2.5.3 beschrieben. Anschließend erfolgte ein erneuter Mediumwechsel.

Bei den Untersuchungen mit Thiotepa wurde dieses in einer Endkonzentration von 10 µM auf die Zellen gegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde sofort ein Mediumwechsel durchgeführt und mit der jeweiligen Substanzlösung für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel.

### 2.2.9.3 Induktion von humanen Hepatozyten mit Arzneistoffen

#### 2.2.9.4 Lösungen

Carbamazepin:	50 mM Stammlösung in DMSO
Metamizol:	30 mM Stammlösung in Induktionsmedium 3 mM Stammlösung in Induktionsmedium

##### 2.2.9.4.1 Durchführung

Die Inkubationen mit Arzneistoffen erfolgten am Tag nach Erhalt der Zellen aus Berlin.

Zur Inkubation wurde das Medium gewechselt und frisches Induktions- Kulturmedium mit der jeweiligen Substanzlösung und 0,1 % DMSO zugegeben. Die Zellen wurden 72 Stunden mit den Induktoren inkubiert. Alle 24 h erfolgte ein Mediumwechsel mit den entsprechenden Substanzen. Nach Ablauf von 72 Stunden wurde das Medium entfernt und 2 ml Induktionsmedium mit Bupropion (100  $\mu$ M) zugegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurde der Mediumüberstand abgenommen und wie unter 2.2.5.2 beschrieben, analysiert.

##### 2.2.9.4.2 Aufarbeitung von primären Hepatozyten zur Proteinanalytik

Die Zellen wurden nach verschiedenen Tagen geerntet. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS/Well gewaschen. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und in 400  $\mu$ l PBS/Well aufgenommen. Nach einer 3 minütigen Zentrifugation bei 2000 rpm (Biofuge 13, Heraeus, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100  $\mu$ l Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus, 4°C). Der Überstand wurde zur Proteinanalytik verwendet.

## **2.2.10 Expression von rekombinanten Cytochrom P450 2B6-Varianten in COS-1 Zellen**

Um die einzelnen CYP2B6-Varianten genauer zu charakterisieren wurden diese in COS-1 Zellen exprimiert. Diese Affennierenepithelzellen haben den Vorteil, dass sie eine ausreichende Menge an NADPH:P450-Oxidoreduktase besitzen, um die Enzymaktivitäten der exprimierten Proteine direkt im Zellextrakt bestimmen zu können.

#### 2.2.10.1 Subkultivierung von COS-1 Zellen

Die COS-1 Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) mit supplementiertem DMEM-Medium kultiviert und zweimal wöchentlich umgesetzt. Nach Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen und nach Absaugen des PBS wurden 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben, dieses durch Schwenken der Flasche gleichmäßig verteilt und wieder abgenommen. Die Zellen wurden ca. 7 min bei 37 °C inkubiert und der Verdau wurde durch Zugabe von 10 ml Medium gestoppt. Die Zellen wurden mit der Pipette vollständig resuspendiert. Je nach gewünschter Verdünnung wurde ein entsprechendes Volumen in eine neue Zellkulturplatte pipettiert und mit Kultivierungsmedium auf 20 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

#### 2.2.10.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden wie beim Subkultivieren behandelt und vor der Aussaat je nach Dichte der Zellen 1:200 oder 1:500 mit 10 ml Casyton-Lösung verdünnt. Dann wurde die Zellzahl mit dem Zellzahlgerät (Casy1, Schärfe System) bestimmt. Das Gerät führt jeweils zwei Messungen durch und gibt den Mittelwert Zellen/ml Zellsuspension unter Berücksichtigung der gewählten Verdünnung an.

#### 2.2.10.3 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden aus dem Flüssigstickstoffbehälter entnommen und sofort im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcontube überführt und mit Zellkulturmedium aufgefüllt und 5 min bei 1000 Upm (Hettich Rotana/S, 23) abzentrifugiert. Nach Absaugen des Mediums zur Entfernung des Einfriermediums wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in geeigneter Menge ausgesät.

#### 2.2.10.4 Vorbereitung der Zellen zur Transfektion

Die Aussaat der zu transfizierenden COS-1 Zellen erfolgte 1 Tag vor der Transfektion. Die Zellen wurden wie bei der Subkultivierung abgelöst und ein 50 µl Aliquot zur Zellzahlbestimmung entnommen. Für die Transfektion der COS-1 Zellen mit Lipofectamin2000<sup>TM</sup> wurden diese zu  $2 \times 10^6$  Zellen/10cm Schale ausgesät. Bei der Tansfektion mit DEAE-Dextran wurden die COS-1 Zellen in einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$ /10 cm Schale ausgesät.

#### 2.2.10.5 Transfektion mit Lipofectamin™ 2000

Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Kultivierungsmedium abgesaugt und durch 10 ml serum- und antibiotikafreies Opti-MEM-Medium ersetzt. Je nach gewünschtem Ansatz wurden entsprechend viele 10 cm-Schalen mit jeweils 3 ml DNA/Lipofectamin™ 2000 Gemisch transfiziert.

Pro 10 cm-Schale wurden 15 µg *CYP2B6* Plasmid-DNA und 3 µg pCMVβ-DNA (β-Galactosidase-Expressionsvektor) in 1,5 ml Opti-MEM-Medium und 50 µl Lipofectamin™ 2000 in 1,5 ml Opti-MEM-Medium jeweils 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden der DNA-Opti-MEM und Lipofectamin™ 2000/Opti-MEM Ansatz vereint und zur Ausbildung der DNA-Lipofectamin-Komplexe 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Opti-MEM-Medium wurde nach einer Stunde abgesaugt und durch 7 ml Opti-MEM-Medium ersetzt. Dann wurde jeweils 3 ml des DNA-Lipofectamin™ 2000-Komplexes gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Nach 5 Stunden bei 37 °C im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt und durch 10 ml serum- und antibiotikahaltiges Kulturmedium für COS-1 Zellen ersetzt. Die COS-1 Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet.

#### 2.2.10.6 Transfektion mit DEAE-Dextran

Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch 10 ml serum- und antibiotikafreies Opti-MEM-Medium ersetzt. Je nach gewünschtem Ansatz wurden entsprechend viele 10 cm-Schalen mit jeweils 2,2 ml DNA/DEAE-Dextran - Gemisch (50 mg/ml, Lagerung bei Raumtemperatur) transfiziert. Pro 10 cm-Schale wurden 15 µg *CYP2B6* Plasmid-DNA, 3 µg pCMVβ-DNA und 11 µl DEAE-Stocklösung in 2,2 ml Opti-MEM-Medium gemischt. Das Gemisch wurde nach Absaugen des Opti-MEM-Mediums gleichmäßig auf die Zellen gegeben und eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 10 ml Opti-MEM-Medium gewaschen und das Medium erneut abgesaugt. Dann wurden jeweils 10 ml serum- und antibiotikahaltiges Kulturmedium auf die Zellen gegeben und sofort 10 µl einer 100 mM Chloroquinlösung (Lagerung bei -20 °C) gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurde das Medium abgesaugt, einmal mit Kulturmedium gewaschen und 10 ml serum- und antibiotikahaltiges Kulturmedium zugegeben. Ein erneuter Mediumwechsel fand 12 h nach der Transfektion statt. Die COS-1 Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet.

#### 2.2.10.7 Ernte der COS-1 Zellen und Präparation von Mikrosomen

48 h nach der Transfektion wurde das Kultivierungsmedium abgenommen und jede Platte zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt, pro Platte in 1 ml PBS aufgenommen und 10 min bei 2000 g zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus, 4°C). Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert.

Vom Zellhomogenat wurden 100 µl zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (siehe 2.2.10.8) und 50 µl zur Zellzahlbestimmung (siehe 2.2.10.2) abgenommen. Die restliche Zellsuspension wurde in Gefäße mit Lyse-Matrix D überführt und zweimal zehn Sekunden auf Stufe 6 mit dem Fast-Prep-Gerät (Q-Biogene) bei 4 °C homogenisiert. Das Homogenat wurde 20 min bei 10000 g mit einer Ultrazentrifuge (Beckmann) bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut bei 100000 g mit der Ultrazentrifuge (Beckmann) 60 min zentrifugiert.

Das Mikrosomenpellet wurde mit einem Teflonhomogenisator in jeweils 200 µl Mikrosomenpuffer resuspendiert und anschließend mit dem Dounce-Homogenisator homogenisiert. Die präparierten Mikrosomen wurden in 50 µl oder 100 µl Portionen aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.10.8 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität

Bei den Transfektionen von COS-1 Zellen mit *CYP2B6*-Plasmiden wurde pCMV $\beta$ -DNA zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und anschließender Normierung der *CYP2B6*-Expression auf die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität kotransfiziert. Dadurch wird eine Variation der Transfektionseffizienz zwischen verschiedenen Transfektionsansätzen ausgeglichen.

##### 2.2.10.8.1 Präparationen der Zellextrakte

Die COS-1 Zellsuspension wurde fünffach mit Passive Lysis Buffer (Promega) verdünnt, gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 2.2.10.8.2 Messung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität

Jeweils 10  $\mu$ l des Zellextraktes wurden in Messröhrchen (Sarstedt #55478, 4 ml) vorgelegt. Die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivitäten wurden im AutoLumat *Plus* (Berthold Technologies) bestimmt. Die Reaktion wurde jeweils mit 100  $\mu$ l  $\beta$ -Galaktosidase-Assay-Puffer gestartet, 30 min inkubiert und mit 300  $\mu$ l  $\beta$ -Galaktosidase-Stopplösung beendet. Die Reaktionen wurden 5 Sekunden lang als Doppelwert vermessen.

#### 2.2.10.8.3 Normierung der Mikrosomenpräparationen auf $\beta$ -Galaktosidaseeinheiten

Die relativen Lumineszenzeinheiten (RLUs), die vom AutoLumat *Plus* gemessen wurden bezogen sich auf 5  $\mu$ l der ursprünglichen Zellsuspension. Die Einheiten wurden dann für die Gesamtzellsuspension berechnet. Diese Gesamt- $\beta$ -Galaktosidaseeinheiten wurden auf die Gesamtmenge mikrosomales Protein bezogen.

$\beta$ -Galaktosidaseeinheiten (RLU)/mikrosomales Protein ( $\mu$ g)

= gesamte  $\beta$ -Gal-Einheiten (RLU)/gesamtes mikrosomales Protein ( $\mu$ g)

#### 2.2.10.9 Bestimmung der Bupropion-Hydroxylase-Aktivität

Die einzelnen in COS-1 Zellen exprimierten CYP2B6-Varianten wurden enzymkinetisch durch Bestimmung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte charakterisiert. Dazu wurden 50  $\mu$ g mikrosomales Protein in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 mit verschiedenen Bupropionkonzentrationen (0 – 1600  $\mu$ M) für drei Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von NADPH-RS gestartet und nach 15 min durch die Zugabe von 50  $\mu$ l 1 N HCl gestoppt. Die Probenanalyse erfolgte analog 2.2.4.2.

Die Enzymkinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  wurden nach Michaelis-Menten berechnet:

$$V = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]}$$

V: Reaktionsgeschwindigkeit

S: eingesetzte Substratkonzentration

$K_m$ : Substratkonzentration bei halb-maximaler Reaktionsgeschwindigkeit



Die Auswertung erfolgte durch nichtlineare Regression mit Hilfe des Programms GraphPadPrism 3.03.

### **2.2.11 Charakterisierung der in *Tn5*-Zellen exprimierten CYP2B6-Varianten**

Durch ein Baculovirus-Expressionssystem können Cytochrom-P450-Enzyme in großen Mengen hergestellt werden, wenn Hämin dem Kultivierungsmedium zugegeben wird. Das hat den großen Vorteil, dass neben dem Apoprotein auch der Holoproteingehalt bestimmt werden kann.

Da *Tn5*-Zellen (*Trichoplusia ni*) keine NADPH:P450-Oxidoreduktase exprimieren, muss diese entweder mit dem jeweiligen Cytochrom P450-Enzym koexprimiert oder nachträglich zugegeben und rekonstituiert werden. Der Vorteil an der nachträglichen Zugabe der NADPH:P450-Oxidoreduktase ist, dass man diese in genau definierten Mengen hinzufügen kann, während bei einer Koexpression das Verhältnis CYP/Oxidoreduktase nicht exakt einstellbar ist.

#### 2.2.11.1 CYP2B6-Varianten

Die in *Tn5*-Zellen exprimierten und zu Mikrosomen aufgearbeiteten CYP2B6-Varianten wurden durch Kathrin Klein und Britta Klumpp (IKP) zur Verfügung gestellt.

#### 2.2.11.2 Bestimmung des aktiven P450

Bei dem verwendeten Expressionssystem werden so große Mengen an CYP2B6-Protein exprimiert, dass man reduzierte CO-Differenzspektren zur Quantifizierung von aktivem P450 heranziehen kann, da mit Western Blot Analysen auch inaktives Apoprotein miterfasst wird.

### 2.2.11.3 Probeninkubation und Photometrie

100 µl der CYP2B6-exprimierenden Insektenzellmikrosomen wurden mit 900 µl Spektrenpuffer (0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4, 10 % Glycerin, 0,5 % Emulgen 911) 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Gehalt an P450, wie unter 2.2.7.2.2 beschrieben, bestimmt.

### 2.2.11.4 Bestimmung der Bupropionhydroxylaseaktivität

Die Bupropionhydroxylaseaktivitäten der verschiedenen CYP2B6-Varianten wurden durch eine Koinkubation mit gereinigter NADPH:P450-Oxidoreduktase aus der Ratte bestimmt.

#### 2.2.11.4.1 NADPH:P450-Oxidoreduktase (Ratte)

Die gereinigte Rattenreduktase wurde von Uli Zanger (IKP) zur Verfügung gestellt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch eine Bestimmung des Differenzspektrums zwischen 455 nm und 642 nm mit dem Unicam UV/Vis Spektrophotometer (Thermo Nicolet).

$$\text{Konzentration} = \frac{\Delta (A_{455} - A_{642})}{\varepsilon \times d}$$

$$\varepsilon (455 \text{ nm}) = 21,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$d = 1 \text{ cm}$$

#### 2.2.11.4.2 Probeninkubation

5 pmol mikrosomales Protein wurden mit 5 pmol gereinigter NADPH:P450-Oxidoreduktase (Ratte) in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 mit unterschiedlichen Bupropionkonzentrationen für zehn Minuten zur Rekonstitution der beiden Proteine bei 37 °C vorinkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von NADPH-RS gestartet und nach 15 min durch die Zugabe von 50 µl 1 N HCl gestoppt. Die Probenanalyse erfolgte analog 2.2.4.2.

#### 2.2.11.4.3 Probeninkubation mit Cytochrom b5

Untersuchungen zum Einfluss von Cytochrom b5 wurden durch eine Koninkubation mit in *E. coli* exprimiertem Cytochrom b5 (Invitrogen), CYP2B6-Mikrosomen aus TN5-Zellen und NADPH:P450-Oxidoreduktase (Ratte) durchgeführt und wie unter 2.2.11.4.2 beschrieben, inkubiert.

#### 2.2.11.4.4 Probeninkubationen mit Cumolhydroperoxid

Für die katalytische Funktion von Cytochrom P450- Enzymen bedarf es der NADPH:P450-Oxidoreduktase, die die Elektronen von NADPH auf das Cytochrom P450- Enzym überträgt. Um diese Elektronenübertragung durch die NADPH:P450-Oxidoreduktase zu ersetzen, kann ein künstlicher Elektronendonator wie Cumolhydroperoxid verwendet werden.

Dadurch kann untersucht werden, ob eine verminderte Enzymaktivität bei einigen CYP2B6-Varianten Ursache einer verminderten Interaktion zwischen CYP2B6 und der NADPH:P450-Oxidoreduktase ist.

##### 2.2.11.4.4.1 Lösungen

Cumolhydroperoxid-Stammlösung: 20 µl Cumolhydroperoxid (80 %) wurden in 1,35 ml Methanol gelöst und mit 1,35 ml Millipore-Wasser verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Für Versuche wurde die Stammlösung 1:32 mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 verdünnt.

##### 2.2.11.4.4.2 Probeninkubation

5 pmol mikrosomales Protein wurde in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,4 mit Bupropion (1000 µM) für zehn Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 25 µl Cumolhydroperoxid (1,25 mM) gestartet und nach 15 min durch die Zugabe von 50 µl 1 N HCl gestoppt. Die Probenanalyse erfolgte analog 2.2.4.2.

### 2.2.12 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm GraphPad Prism (Version 3.03) bzw. GraphPad Instad (Version 3.05) durchgeführt. Für Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde der „Student's *t*-test“ bzw. der Ranglistentest nach Mann-Whitney verwendet, je nachdem, ob die Werte normal oder nicht normal verteilt waren. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte nach Kolmogorov und Smirnov. Die Datensätze wurden als normalverteilt angesehen, wenn der *p*-Wert > 0,1 war. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der ANOVA-Test (one-way analysis of variance) mit dem Tukey post-test durchgeführt.

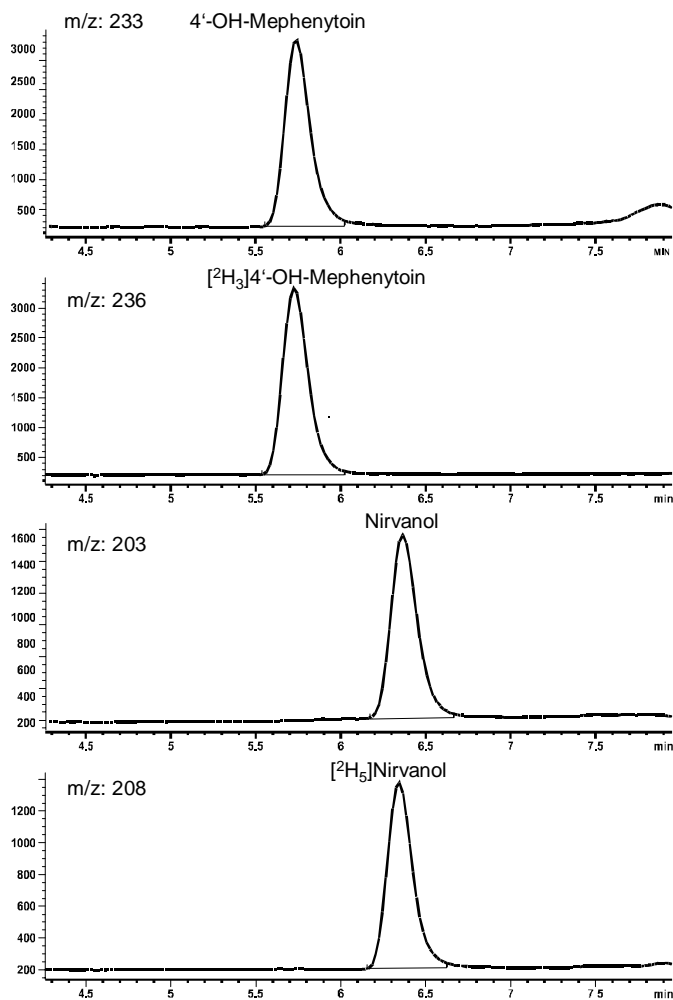
Daten wurden als signifikant verschieden betrachtet, wenn der *p*-Wert < 0,05 war. Für Untersuchungen, in denen ein Zusammenhang zwischen zwei Messgrößen betrachtet werden sollte, wurde bei normal verteilten Proben der Korrelationskoeffizient *r* nach Pearson und bei nicht normal verteilten Proben der Rang-Korrelationskoeffizient  $r_s$  nach Spearman berechnet.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Methodenvalidierung

##### 3.1.1 Bestimmung der S-Mephenytoin-Metabolite Nirvanol und 4'-OH-Mephenytoin

Die Bestimmung der S-Mephenytoin-Metabolite Nirvanol und 4'-OH-Mephenytoin aus Inkubationslösungen beruhte auf einer am IKP entwickelten LC-MS-Methode zur Bestimmung dieser Metabolite aus Inkubationen mit Leber- und Darmhomogenaten (Laepfle et al., 2003). Abb. 10 zeigt ein typisches Chromatogramm der Metabolite und deren internen Standards.



**Abb. 10:** Massenspektrometrisches Chromatogramm einer mit 100 pmol Nirvanol, [2H5]Nirvanol, 4'-OH-Mephenytoin und [2H3]OH-Mephenytoin versehenen Qualitätskontrolllösung.

### 3.1.1.1 Inter- und intra-Assay-Variabilität

Die Methode zur Quantifizierung der S-Mephenytoin-Metabolite Nirvanol und 4'-OH-Mephenytoin war für Nirvanol im Bereich zwischen 5 pmol und 1000 pmol und für 4'-OH-Mephenytoin im Bereich von 1 pmol und 1000 pmol linear. Angaben zur inter- und intra-Assay-Variabilität sind in Tab. 4 aufgeführt. Die Bestimmung der inter-Assay-Variabilität wurde an sechs verschiedenen Tagen durchgeführt.

**Tab. 4a:** Inter-Assay-Variabilität der Nirvanol- und 4'-OH-Mephenytoin-Bestimmung

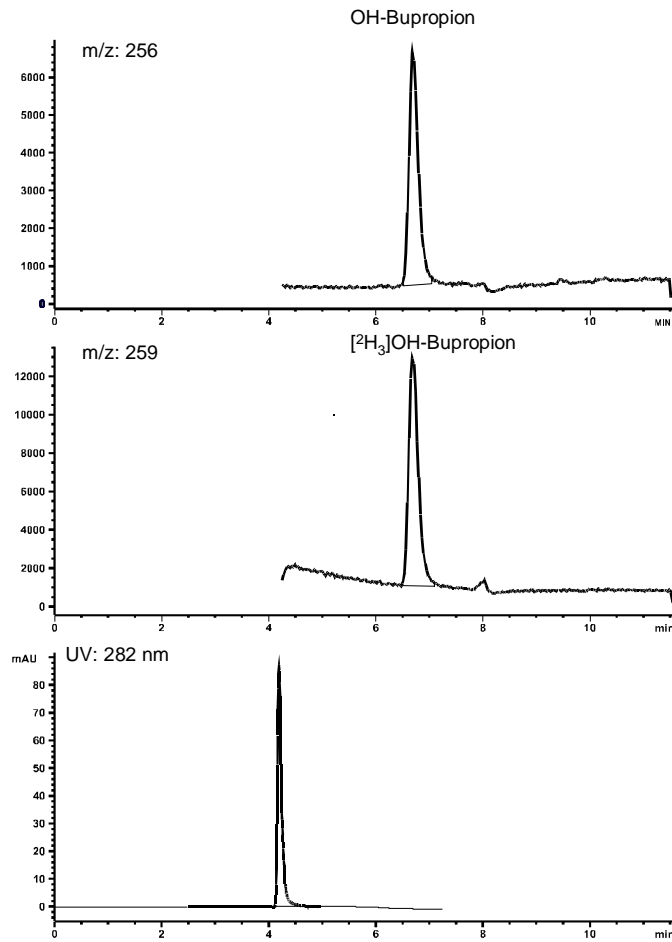
Metabolit	Sollwert [pmol]	n	Gemessener Mittelwert [pmol]	Standardabweichung [%]	Variationskoeffizient [%]
Nirvanol	10	6	10,8	0,6	5,1
	100	6	105,4	4,3	4,1
	500	6	538,9	14,5	2,7
4'-OH-Mephenytoin	5	6	4,6	0,2	5,1
	100	6	88,0	2,7	3,1
	500	6	477,1	28,7	6,0

**Tab. 4b:** Intra-Assay-Variabilität der Nirvanol- und 4'-OH-Mephenytoin-Bestimmung

Metabolit	Sollwert [pmol]	n	Gemessener Mittelwert [pmol]	Standardabweichung [%]	Variationskoeffizient [%]
Nirvanol	10	6	10,4	0,3	3,2
	100	6	103,8	8,6	8,3
	500	6	550,9	16,0	2,9
4'-OH-Mephenytoin	5	6	4,7	0,1	2,7
	100	6	86,8	8,5	9,7
	500	6	473,7	16,0	3,4

### 3.1.2 Bestimmung des Bupropion-Metaboliten Hydroxybupropion

Die Quantifizierung von Hydroxybupropion erfolgte nach einer Modifikation der Methode zur Messung von Bupropion und seiner Metabolite aus Blutplasma. Abb. 11 zeigt ein typisches Chromatogramm von Hydroxybupropion und des internen Standards [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]OH-Bupropion.



**Abb. 11:** Massenspektrometrisches Chromatogramm einer mit 50 pmol OH-Bupropion und [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]OH-Bupropion versehenen Qualitätskontrolllösung.

### 3.1.2.1 Inter- und intra-Assay-Variabilität

Der lineare Bereich der Methode zur Quantifizierung des Bupropion-Metaboliten Hydroxybupropion lag zwischen 1 pmol und 500 pmol Hydroxybupropion.

Angaben zur inter- und intra-Assay-Variabilität sind in Tab. 5a/b aufgeführt. Die Bestimmung der inter-Assay-Variabilität wurde an sechs verschiedenen Tagen durchgeführt.

**Tab. 5a:** Inter-Assay-Variabilität der OH-Bupropion-Bestimmung

Metabolit	Sollwert [pmol]	n	Gemessener Mittelwert [pmol]	Standardabweichung [%]	Variationskoeffizient [%]
OH-Bupropion	5	6	5,1	0,1	1,5
	50	6	51,6	3,7	7,1
	250	6	249,5	10,1	4,0

**Tab. 5b:** Intra-Assay-Variabilität der OH-Bupropion-Bestimmung

Metabolit	Sollwert [pmol]	n	Gemessener Mittelwert [pmol]	Standardabweichung [%]	Variationskoeffizient [%]
OH-Bupropion	5	6	5,4	0,3	4,5
	50	6	50,8	1,7	3,3
	250	6	254,8	6,0	2,3

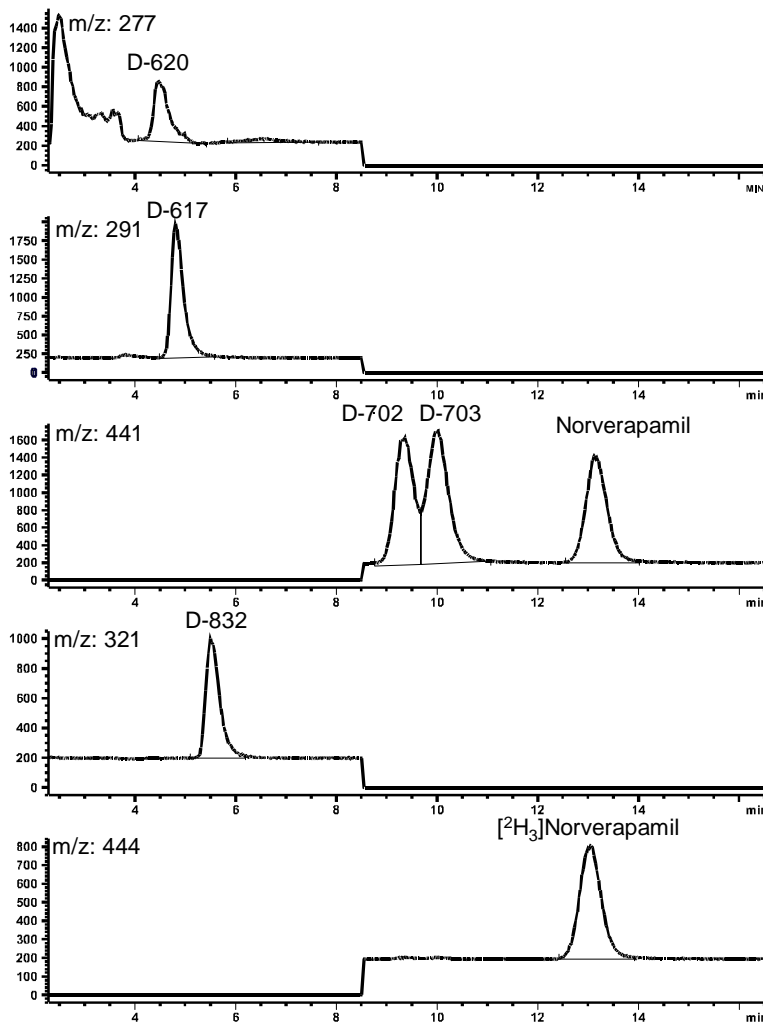
Da die LC-MS-Messungen nicht immer am gleichen Tag der in-vitro-Inkubationen durchgeführt werden konnten, wurde die Stabilität der Proben geprüft. Die Qualitätskontrolllösungen erwiesen sich nach 15 min Inkubation bei 37°C vor der Aufarbeitung oder nach Lagerung bei -20°C nach der Aufarbeitung als stabil (CV < 3 %).

### 3.1.3 Bestimmung der Verapamil-Metabolite D-617, D-620, Norverapamil, D-702 und D-703

Die Quantifizierung der Verapamil-Metabolite D-617, D-602, Norverapamil, D-702 und D-703 erfolgte nach einer Methode von von Richter et al. (2000). Da die Metabolite sehr unterschiedliche physikochemische Eigenschaften aufweisen, wurden zwei verschiedene interne Standards verwendet. D-832, das Gallopamil-Analogon zu D-617 wurde zur Standardisierung von D-617 und D-620 verwendet, während [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]Norverapamil zur Standardisierung der anderen Metabolite herangezogen wurde.

Abb. 12 zeigt ein typisches Chromatogramm der Verapamil-Metabolite D-617, D-620, D-702, D-703 und Norverapamil und deren internen Standards Gallopamil und [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]Norverapamil.





**Abb. 12:** Massenspektrometrisches Chromatogramm einer mit 50 pmol D-617, D-620, D-832, D-702, D-703, Norverapamil und [2H3]-Norverapamil versehenen Qualitätskontrolllösung.

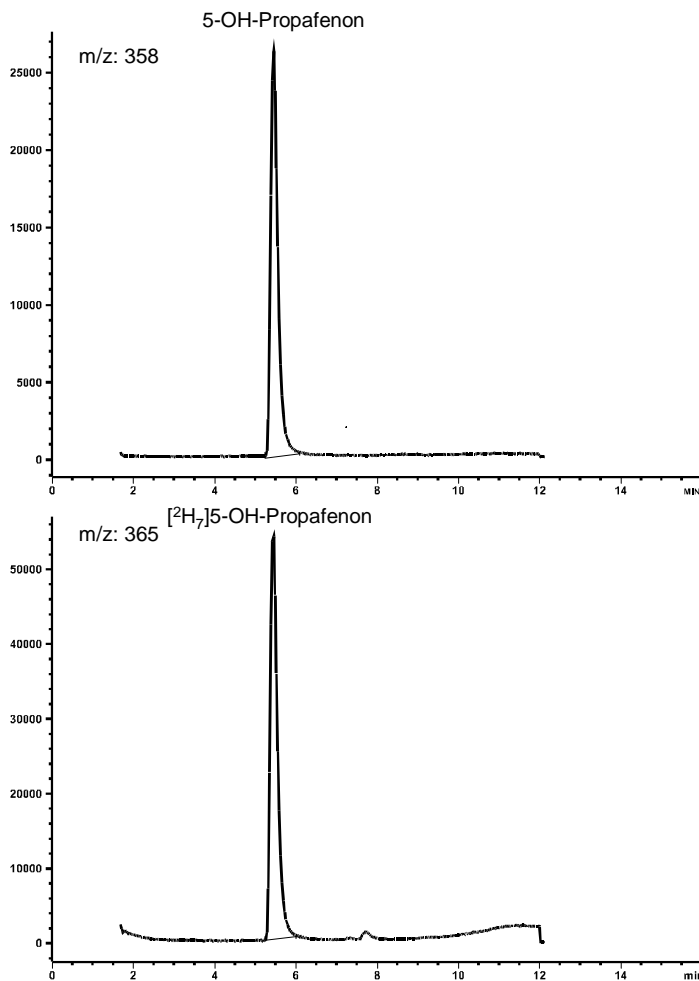
### 3.1.3.1 Inter- und intra-Assay-Variabilität

Die Methode zur Quantifizierung der Verapamilmetabolite D-617, D-620, D-702, D-703 und Norverapamil war für alle Metabolite im Bereich zwischen 1 und 500 pmol Metabolit linear. Die Methode zur Quantifizierung der Verapamil-Metabolite aus in-vitro-Inkubationen wurde bereits am IKP validiert und daher nicht erneut durchgeführt. Die jeweiligen Messungen wurden als valide angesehen, wenn die Qualitätskontrollen nicht mehr als 5 % vom Sollwert abwichen.

### 3.1.4 Bestimmung des Propafenon-Metaboliten 5-Hydroxypropafenon

Die Quantifizierung von 5-Hydroxypropafenon erfolgte modifiziert nach einer von Hofmann et al. (2000) etablierten Methode zur Erfassung von Propafenon und seiner Metabolite aus Plasma- und Urinproben.

Abb. 13 zeigt ein typisches Chromatogramm des Propafenon-Metaboliten 5-Hydroxy-Propafenon und des internen Standards [ $^2\text{H}_7$ ]5-OH-Propafenon.



**Abb. 13:**  
Massenspektrometrisches  
Chromatogramm einer mit 50  
pmol 5-OH-Propafenon und  
[ $^2\text{H}_7$ ]5-OH-Propafenon  
versehene  
Qualitätskontrolllösung.

#### 3.1.4.1 Inter- und intra-Assay-Variabilität

Die Quantifizierung von 5-Hydroxypropafenon war im Bereich von 5 pmol bis 500 pmol linear.

Die Methode zur Quantifizierung von 5-Hydroxypropafenon aus in-vitro-Inkubationen wurde bereits am IKP validiert und daher nicht erneut durchgeführt. Die jeweiligen Messungen wurden als valide angesehen, wenn die Qualitätskontrollen nicht mehr als 5 % vom Sollwert abwichen.

### 3.1.5 Bestimmung des 7-Ethoxycoumarin-Metaboliten Umbelliferon

Die Quantifizierung des 7-Ethoxycoumarin-Metaboliten 7-Hydroxycoumarin (Umbelliferon) erfolgte in Anlehnung an eine Methode zur fluorometrischen Detektion dieses Metaboliten aus in-vitro-Inkubationen (Yamazaki et al. 1999).

#### 3.1.5.1 Inter- und intra-Assay-Variabilität

Da die Fluoreszenzmessung erst nach Extraktion des Metaboliten erfolgte und im Gegensatz zu den chromatographischen Methoden keine Quantifizierung eines internen Standards ermöglichte, waren die Einzelbestimmungen höheren Schwankungen unterworfen. Daher wurde jede Probe mindestens vierfach angefertigt und zweifach vermessen.

Angaben zur intra-Assay-Variabilität sind in Tabelle 6 aufgeführt. Da die Bestimmung der Umbelliferon-Bildung nur an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt wurde, erfolgte keine Bestimmung der inter-Assay-Variabilität.

**Tab. 6:** Intra-Assay-Variabilität der Umbelliferon-Bestimmung

Metabolit	Sollwert [pmol]	n	Gemessener Mittelwert [pmol]	Standardabweichung [%]	Variationskoeffizient [%]
Umbelliferon	10	6	13	0,8	6,0
	50	6	59,6	5,6	9,4
	250	6	249,8	9,6	3,8

### 3.1.6 Bestimmung des Coumarin-Metaboliten Umbelliferon

Die fluorometrische Erfassung und Quantifizierung des Coumarin-Metaboliten 7-Hydroxycoumarin (Umbelliferon) erfolgte an Anlehnung einer von Gentest (Woburn, MA, USA) entwickelten Methode.

### 3.1.6.1 Inter- und intra-Assay-Variabilität

Ebenso wie bei der Bestimmung von Umbelliferon aus 7-Ethoxycoumarin war auch hier die Detektion eines internen Standards nicht möglich. Auch hier wurde jede Probe mindestens vierfach angefertigt und zweifach vermessen. Die Messungen von Umbelliferon waren im Bereich zwischen 10 pmol und 500 pmol linear.

Angaben zur intra-Assay-Variabilität sind in Tab. 7 aufgeführt. Da die Bestimmung der Umbelliferon-Bildung nur an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt wurde, erfolgte keine Bestimmung der inter-Assay-Variabilität.

**Tab. 7:** Intra-Assay-Variabilität der Umbelliferon-Bestimmung

Metabolit	Sollwert [pmol]	n	Gemessener Mittelwert [pmol]	Standardabweichung [%]	Variationskoeffizient [%]
Umbelliferon	50	6	58,2	7,3	12,5
	250	6	217,9	32,5	14,9

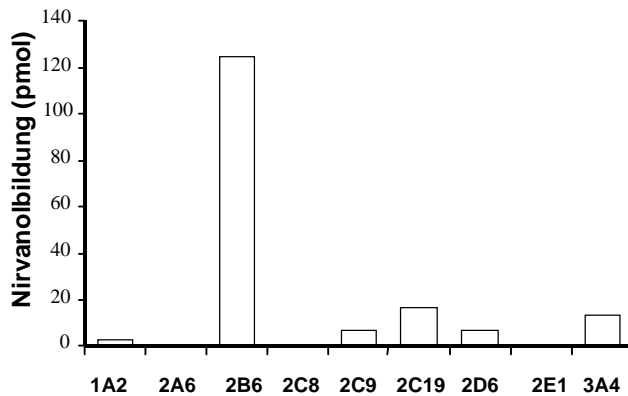
## 3.2 S-Mephenytoin als CYP2B6-Substrat

Um zu untersuchen, ob die N-Demethylierung von S-Mephenytoin geeignet ist, um die CYP2B6-Enzymaktivität von humanen Lebermikrosomen spezifisch zu charakterisieren, wurde die S-Mephenytoin-N-Demethylierung durch verschiedene rekombinante Cytochrom P450-Enzyme und humane Lebermikrosomen analysiert.

### 3.2.1 S-Mephenytoin-Metabolismus durch rekombinante Cytochrom P450 Enzyme

Um die spezifischen Enzymaktivitäten verschiedener Cytochrom P450-Enzyme für die S-Mephenytoin-N-Demethylierung zu untersuchen, wurden „Supersomes“ von BD Biosciences verwendet. Dabei handelt es sich um mikrosomale Präparationen des jeweiligen Cytochrom P450-Enzyms und der humanen NADPH: Cytochrom-P450-Oxidoreduktase, welche zusammen mit dem jeweiligem Cytochrom P450 in Insektenzellen koexprimiert wurde. Diese „Supersomes“ enthalten einen sehr hohen Gehalt an spektral messbarem und aktivem Cytochrom P450 und einem definierten NADPH: Cytochrom-P450-Oxidoreduktase-Gehalt.

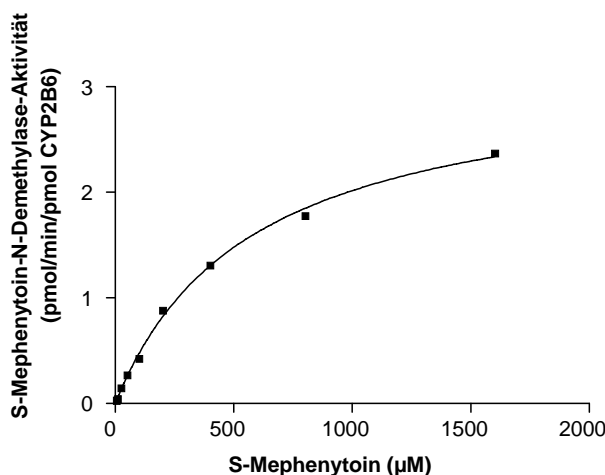
Unter den untersuchten Cytochrom P450 Isoenzymen hatte CYP2B6 die höchste spezifische Aktivität (Abb. 14). Daneben waren noch die Cytochrom P450 Enzyme CYP2C19, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 und CYP1A2, wenn auch mit geringeren Aktivitäten, an der Nirvanolbildung beteiligt.



**Abb. 14:** Nirvanolbildung durch verschiedene rekombinante CYPs. 5 pmol rekombinante Supersomes + OR wurden mit 200  $\mu$ M S-Mephenytoin und einem NADPH-RS 30 min bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.2 S-Mephenytoin-Metabolismus durch rekombinantes CYP2B6

Um die enzymkinetischen Parameter der Nirvanolbildung durch CYP2B6 näher zu charakterisieren, wurde dieses mit S-Mephenytoin umgesetzt. Abb. 15 zeigt die Michaelis-Menten-Kinetik der S-Mephenytoin-N-Demethylierung durch rekombinante, CYP2B6 exprimierende Supersomes. Der  $K_m$ -Wert lag bei eine S-Mephenytoin-Konzentration von 406  $\mu$ M und der  $V_{max}$ -Wert betrug 2,8 pmol Nirvanol/(min x pmol CYP2B6).



**Abb. 15:** Michaelis-Menten-Kinetik der S-Mephenytoin-N-Demethylierung durch CYP2B6 Supersomes. 5 pmol CYP2B6 Supersomes + OR wurden mit verschiedenen S-Mephenytoin-Konzentrationen und einem NADPH-RS 30 min inkubiert.

### 3.2.3 Umsatz in humanen Lebermikrosomen

Um den S-Mephenytoin-Metabolismus in humanen Lebermikrosomen näher zu charakterisieren wurde die Zeitlinearität und Proteinlinearität der Enzymreaktion bestimmt.

Die S-Mephenytoin-N-Demethylierung in humanen Lebermikrosomen war im Bereich von 1 bis 60 min für einen Proteinkonzentrationsbereich von 10 bis 100 µg Protein linear (Abb. 16).

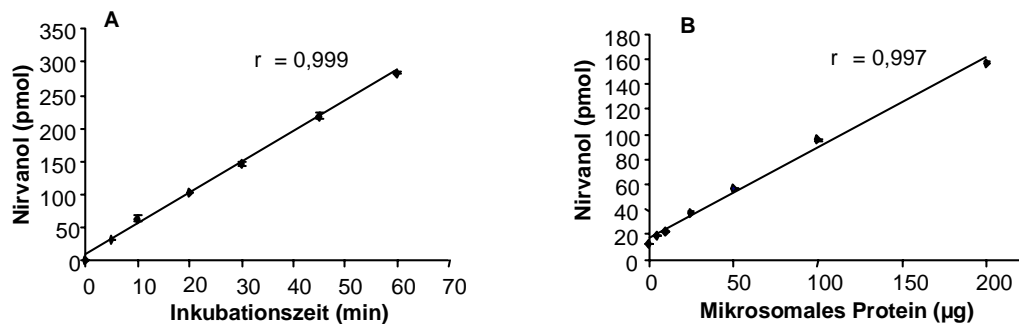


Abb. 16: Zeit- (A) und Proteinängigkeit (B) der S-Mephenytoin-N-Demethylierung in humanen Lebermikrosomen.

### 3.2.4 Expression von CYP2B6- Apoprotein in humanen Lebermikrosomen

Die Proteinexpression von CYP2B6 wurde ergänzend zu Lang et al. (2001) an mehr als 100 humanen Lebermikrosomen untersucht.

Sie variierte 191fach mit Werten von 0,5 pmol CYP2B6/mg mikrosomalem Protein bis 95,5 pmol CYP2B6/mg mikrosomales Protein. Die mediane Expression von CYP2B6 betrug 11,8 pmol/mg mikrosomales Protein. In Abb. 17 ist ein typischer Western Blot zu sehen, der die variable CYP2B6-Expression von humanen Lebermikrosomen zeigt.

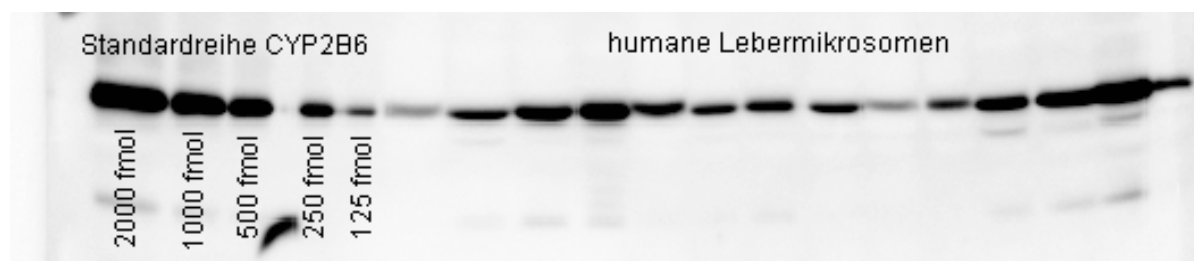
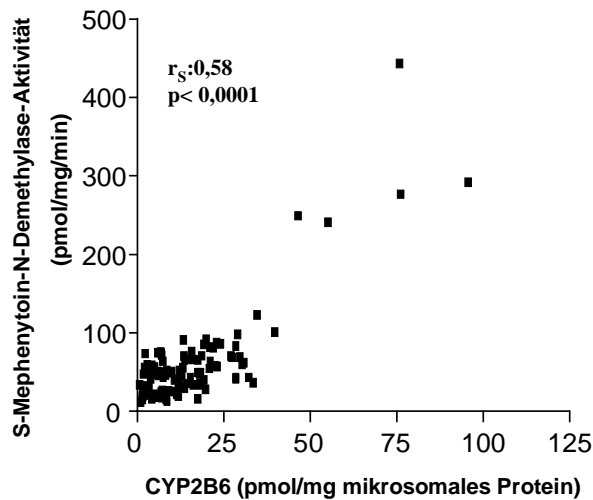


Abb. 17 : Variable CYP2B6-Expression in verschiedenen humanen Lebermikrosomen (pro Spur wurden 25 µg mikrosomales Protein aufgetragen).

### 3.2.4.1 Korrelation zwischen CYP2B6 Proteinexpression und S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität

Analog der CYP2B6- Proteinexpression war auch die CYP2B6- Enzymaktivität, charakterisiert durch die S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität in humanen Lebermikrosomen sehr variabel. Gemessen an 118 Proben variierte sie 37fach von 12,1 pmol Nirvanol/(mg Protein x min) bis 444 pmol Nirvanol/(mg Protein x min). Der CYP2B6 Proteingehalt korrelierte mit der jeweiligen S-Mephenytoin-N-Demethylase-Aktivität (Abb. 18) mit einem Korrelationskoeffizient von  $r_s = 0,58$  ( $p < 0,0001$ ).



**Abb. 18:**  
Korrelation zwischen CYP2B6 Protein und der S-Mephenytoin-N-Demethylase-Aktivität.

### 3.2.4.2 Inhibition der nicht CYP2B6-abhängigen Nirvanolbildung

Aufgrund der oben gezeigten nicht sehr hohen Abhängigkeit zwischen der Nirvanolbildung und dem CYP2B6- Apoproteingehalt in humanen Lebermikrosomen wurde der Einfluss von anderen, ebenfalls nirvanolbildenden CYPs auf die mikrosomale S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität im Detail untersucht.

Ko et al. haben schon 1998 berichtet, dass an der S-Mephenytoin- N-Demethylierung neben CYP2B6 auch CYP2C9 beteiligt ist. Wie unter 3.2.1 beschrieben, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass neben CYP2B6 und CYP2C9 noch weitere Cytochrom P450- Enzyme an der Nirvanolbildung beteiligt sind. Es lagen zu den in dieser Arbeit verwendeten Lebermikrosomen bereits zusätzliche Informationen zu Apoproteingehalten verschiedener Cytochrom P450 Enzyme vor, die mit Western Blot Analysen bestimmt wurden (Tab. 8).

**Tab. 8:** Korrelation der Nirvanolbildung mit unterschiedlichen CYP-Apoproteingehalten in humanen Lebermikrosomen.

CYP	Probenanzahl	Korrelation der Nirvanolbildung mit CYP-Apoprotein ( $r_s$ )
2A6	100	0,21
2C9	49	0,48
2D6	89	0,16
3A4	100	0,44

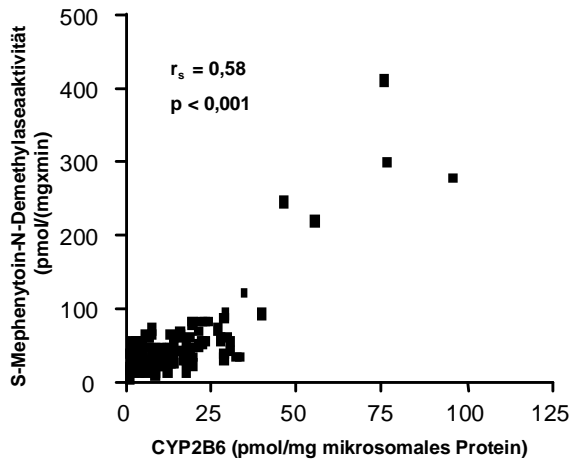
Auch wenn S-Mephenytoin durch CYP2C9 und CYP3A4 zu einem wesentlich geringeren Anteil als durch CYP2B6 zu Nirvanol metabolisiert wird, lässt sich noch ein Zusammenhang zwischen den Apoproteinanteilen von CYP2C9 und CYP3A4 und der S-Mephenytoin-N-Demethylierung erkennen.

Die CYP2C9- und CYP3A4-Proteingehalte korrelieren nach dem CYP2B6-Proteingehalt am stärksten mit der S-Mephenytoin-N-Demethylase-Aktivität ( $r_s= 0,48$  bzw.  $r_s=0,44$ ). Deshalb wurde der Einfluss von CYP2C9 und CYP3A4-Inhibitoren auf die S-Mephenytoin-N-Demethylase-Aktivität untersucht.

#### 3.2.4.3 Inhibition von CYP2C9 mit Sulfaphenazol: Korrelation zwischen Nirvanolbildung und CYP2B6 Proteinexpression

Der Beitrag von CYP2C9 an der mikrosomalen S-Mephenytoin-N-Demethylierung wurde durch Zugabe des CYP2C9-Inhibitors Sulfaphenazol (10  $\mu$ M) zu den Inkubationsansätzen untersucht. Durch Verwendung des CYP2C9 spezifischen Inhibitors Sulfaphenazol konnte keine Verbesserung der Korrelation zwischen dem CYP2B6-Apoproteingehalt und der S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität erzielt werden (Abb. 19).





**Abb. 19:**  
Korrelation zwischen CYP2B6 Protein und der S-Mephenytoin-N-Demethylase-Aktivität unter Verwendung des CYP2C9-Inhibitors Sulfaphenazol (10  $\mu$ M).

#### 3.2.4.4 Inhibition von CYP3A4 mit einem spezifischen inhibitorischen Antikörper

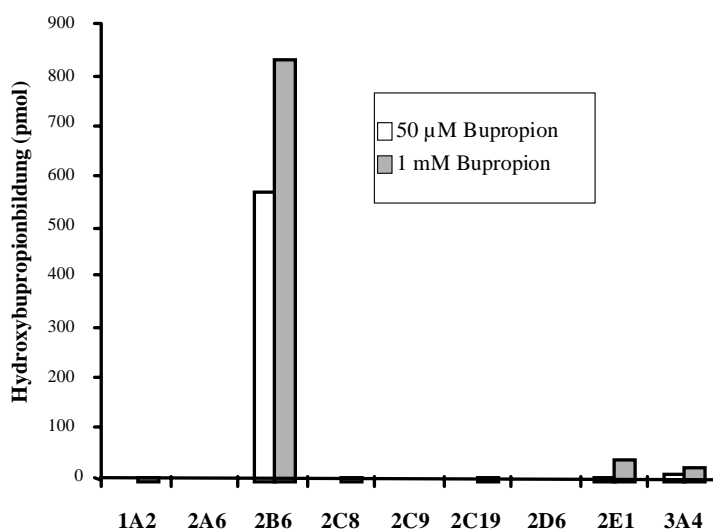
Da der klassische CYP3A4-Inhibitor Ketokonazol auch die Enzymaktivität von CYP2B6 inhibiert (Ono et al., 1996; Sai et al., 2000), wurde die Wirkung eines spezifischen inhibitorischen Antikörpers gegen CYP3A4/3A5 untersucht. Dieser erzielte unter Verwendung von rekombinantem CYP3A4 lediglich eine maximale Inhibition der S-Mephenytoin-N-Demethylase-Aktivität von 70 %. Da CYP3A4 zu einem erheblichen Anteil in der humanen Leber exprimiert wird (Shimada et al., 1994), kann der Beitrag von CYP3A4 an der S-Mephenytoin-N-Demethylierung nicht komplett inhibiert werden. Daher kann diese Reaktion für die mikrosomale Charakterisierung der CYP2B6-Enzymaktivität nicht herangezogen werden. S-Mephenytoin ist demnach kein geeignetes Substrat für CYP2B6 und daher wurde im folgenden untersucht, ob die mikrosomale Enzymaktivität mit einer anderen Substanz, welche eine ausreichenden Spezifität für dieses Enzym besitzt, bestimmt werden kann.

### 3.3 Bupropion als CYP2B6-Substrat

Die Hydroxylierung des Antidepressivums Bupropion wurde 2000 von Hesse et al. als eine spezifisch von CYP2B6 katalysierte Reaktion beschrieben. Diese beschriebene Spezifität sollte nun noch einmal überprüft und im Vergleich zu S-Mephenytoin an humanen Leberproben untersucht werden.

#### 3.3.1 Hydroxybupropionbildung durch rekombinante Cytochrom-P450-Enzyme

Unter allen untersuchten Cytochrom P450 Enzymen wurde Bupropion fast ausschließlich durch CYP2B6 metabolisiert. Bei einer Bupropionkonzentration von 1 mM machte kein untersuchtes Cytochrom P450 Enzym mehr als 5 % des durch CYP2B6 metabolisierten Anteils aus (Abb. 20).

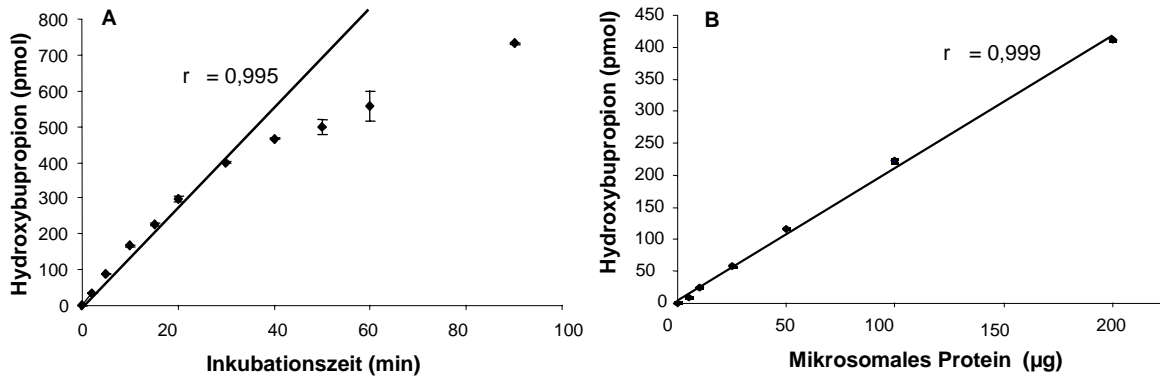


**Abb. 20:**

Hydroxybupropionbildung durch verschiedene rekombinante CYPs. 5 pmol Supersomes + OR wurden mit 50 µM bzw. 1 mM Bupropion und einem NADPH-RS 15 min bei 37 °C inkubiert (CYP3A4 und CYP2E1 Supersomes waren zusätzlich mit Cytochrom b5 koexprimiert).

#### 3.3.2 Umsatz mit humanen Lebermikrosomen

Die Überprüfung der Reaktionsbedingungen mit humanen Lebermikrosomen ergab einen linearen Zeitbereich von 1 bis 30 min und eine Proteinlinearität zwischen 5 bis 200 µg Protein (Abb. 21).

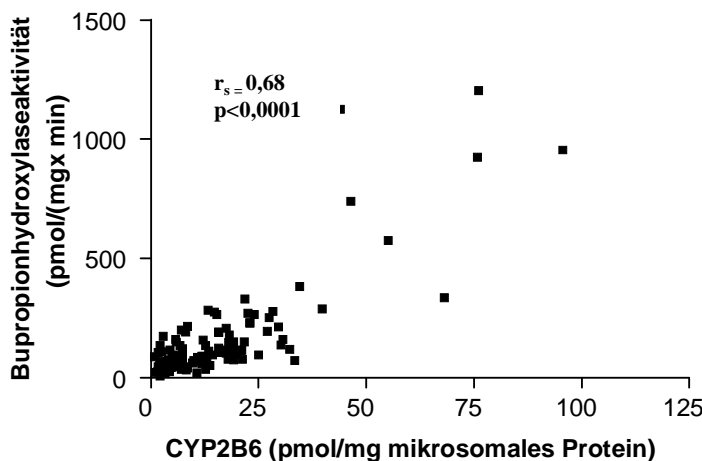


**Abb. 21:** Zeit- (A) und Proteinabhängigkeit (B) der Bupropionhydroxylierung in humanen Lebermikrosomen. Zur Linearitätsbestimmung wurden 50  $\mu\text{g}$  Protein (A) verwendet bzw. für 30 min inkubiert (B).

### 3.3.2.1 Korrelation zwischen Hydroxybupropionbildung und CYP2B6

#### Proteinexpression

Analog der CYP2B6-Expression und der S-Mephenytoin-N-Demethylierung war auch die Bupropionhydroxylierung in humanen Lebermikrosomen sehr variabel. Gemessen an 123 Proben variierte sie 115fach von 10,5 pmol Hydroxybupropion/(mg Protein x min) bis 1205 pmol Hydroxybupropion/(mg Protein x min). Der CYP2B6 Proteingehalt korrelierte mit der jeweiligen Bupropionhydroxylase-Aktivität (Abb. 22) mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r_s = 0,68$  ( $p < 0,0001$ ).



**Abb. 22:** Korrelation zwischen der CYP2B6-Apopteinexpression und der Bupropionhydroxylase-Aktivität humaner Lebermikrosomen.

Die hier beschriebene Bupropionhydroxylierung ist ein spezifischer CYP2B6-Aktivitätstest, der geeignet ist, um weitere Enzymcharakterisierungen von CYP2B6 an humanen Lebermikrosomen und rekombinanten Enzymen durchzuführen.

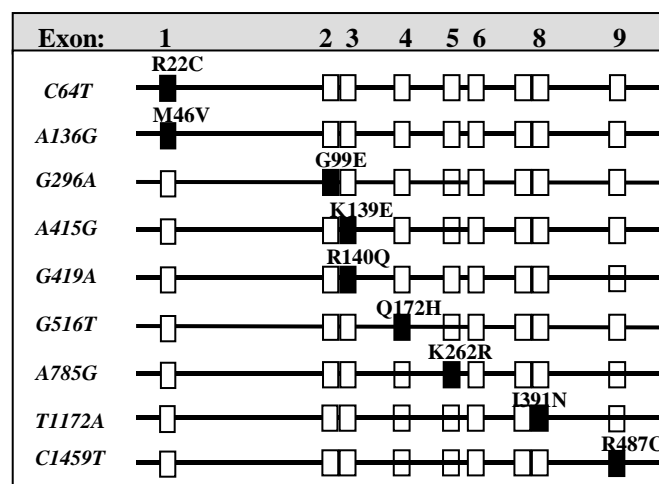
### 3.4 Untersuchungen zum Einfluss des *CYP2B6*-Genotyps auf die Expression und Funktion von *CYP2B6*

#### 3.4.1 Untersuchungen an humanen Lebermikrosomen

Bereits 2001 wurde von Lang et al. der kodierende Bereich des *CYP2B6* Gens an DNA- Proben von 35 Probanden kaukasischen Ursprungs sequenziert und fünf Mutationen entdeckt, die zu Aminosäureaustauschen führen. Daraufhin wurden 92 Leberproben auf das Vorhandensein dieser Mutationen genotypisiert. Proben mit der C1459T Mutation in Exon 9 hatten eine signifikant niedrigere *CYP2B6*-Apoproteinexpression und eine signifikant erniedrigte S-Mephenytoin-N-Demethylase-Aktivität als die Wildtyp- Gruppe.

Unter den analysierten Leberproben gab es einige Proben mit besonders erniedrigten *CYP2B6*- Apoproteinwerten und Enzymaktivitäten, die keine der von Lang et al. (2001) beschriebenen Mutationen trugen. Durch Sequenzierung weiterer DNA- Proben von der Firma Epidaurus (München) wurden fünf weitere ‚missense‘- Mutationen im *CYP2B6* Gen gefunden (Lang et al., 2004).

Insgesamt 114 humane Leberproben sind von der Arbeitsgruppe am IKP auf das Vorhandensein neun dieser in Abb. 23 dargestellten Mutationen genotypisiert worden.



**Abb. 23:** Mutationen im kodierenden Bereich des *CYP2B6*-Gens mit den entsprechenden Aminosäureaustauschen (Lang et al., 2001;2004). Die Positionen entsprechen der cDNA nach Yamano et al., 1989.

Ausgehend von diesen Mutationen wurde eine Haplotypanalyse für die 114 humanen Leberproben mit dem Programm Phase 2.0 (Stephens et al., 2001) durchgeführt. In Abb. 24 sind die vorausgesagten Haplotypen mit den dazugehörigen prozentualen Häufigkeiten zu sehen.

Allel	Haplotyp	C64T	A136G	G296A	A415G	G419A	G516T	A785G	T1172A	C1459T	Häufigkeit (%)
*2	1	■									7,9
	2			■							0,4
*5	3									■	10,1
*1	4										52,2
*8	5				■						0,4
*11	6		■								0,9
*15	7								■		1,3
*4	8							■			4,4
	9					■		■			0,4
	10				■			■			0,9
*6	11						■	■			21,1

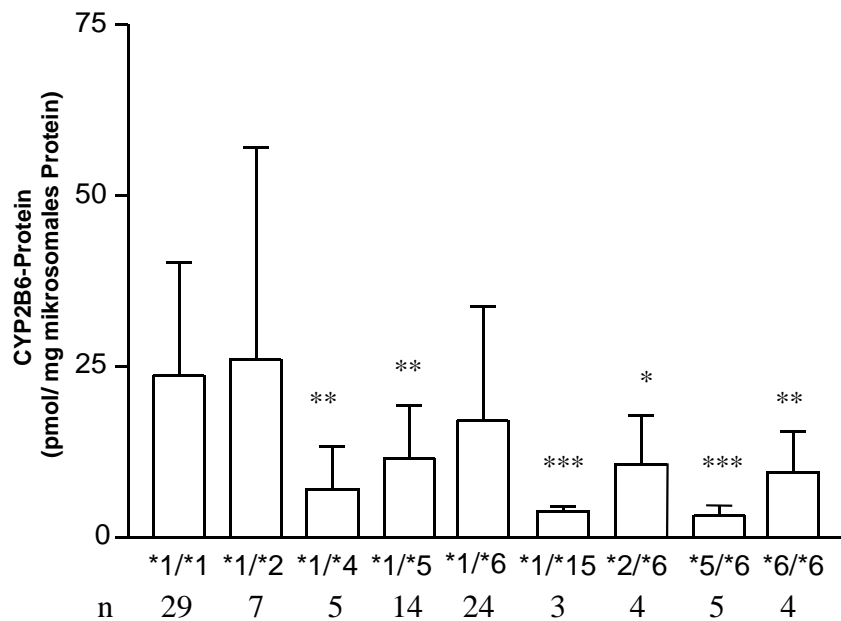
**Abb. 24:** Haplotypanalyse von 114 humanen Leberproben mit Häufigkeiten. (Das \*8-Allel wurde erstmals von Lamba et al., 2003 beschrieben).

Das Wildtyp- Allel (\*1) kam mit 52,2 % am häufigsten vor. Die bereits von Lang et al. (2001) erwähnten Allele \*6, \*5, \*2 und \*4 mit 21,1 %, 10,1 %, 7,9 % bzw. 4,4 % waren nach dem Wildtyp-Allel am häufigsten vertreten.

### 3.4.1.1 Einfluss des CYP2B6-Genotyps auf die CYP2B6 Expression und Funktion

Bei Lang et al. (2001) wurden die CYP2B6 Haplotypen \*1, \*3, \*4, \*5, \*6 und \*7 analysiert. Dort zeigten humane Lebermikrosomen mit der C1459T Mutation in Exon 9 des CYP2B6 Gens (\*5 und \*7) signifikant erniedrigte CYP2B6-Apoprotein- und S-Mephenytoin-N-Demethylase-Werte. In dieser Arbeit wurden die Proben, die sich mit denen von Lang et al. (2001) teilweise überlappen, auf das Vorhandensein eines bestimmten Genotyps ausgehend von 11 verschiedenen Haplotypen untersucht.

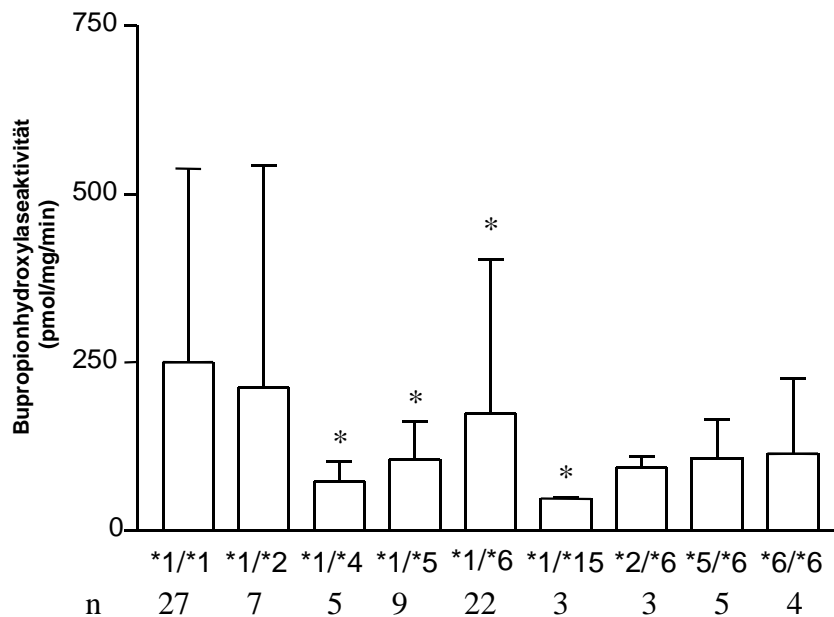
Von 11 möglichen CYP2B6-Haplotypen ergaben sich 19 mögliche Genotypen für die analysierten Leberproben. Nur Genotypen die mindestens dreimal vorkamen, wurden in die Expressions- und Funktionsanalysen eingeschlossen. Wie in Abb. 25 zu sehen ist, unterschied sich der CYP2B6-Apoproteingehalt bei Trägern bestimmter Mutationen signifikant von dem des homozygoten Wildtyp-Allels (\*1/\*1).



**Abb. 25:** CYP2B6- Apoproteinexpression in humanen Lebermikrosomen mit unterschiedlichen Genotypen. Die unterschiedlichen Genotypgruppen wurden mit dem Wildtyp (\*1/\*1) verglichen (t-Test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Leberproben, die Träger eines Wildtyp-Allels waren und zusätzlich die Allele \*4, \*5 oder \*15 trugen, hatten einen signifikant niedrigeren CYP2B6-Apoproteingehalt als die Träger von zwei Wildtyp-Allelen. Zusätzlich hatten die Proben mit den Allelen \*5/\*6 und \*6/\*6 einen signifikant erniedrigten CYP2B6- Apoproteingehalt. Wurden die übrigen zehn Genotypen, die seltener als dreimal vorkommen, gemeinsam als Gruppe analysiert, zeigten selbst diese eine signifikant erniedrigte CYP2B6-Expression ( $p < 0,01$ ).

Wie sich bei den vorhergehenden Untersuchungen in dieser Arbeit herausgestellt hat, ist Bupropion ein spezifisches Substrat für CYP2B6, dessen Enzymaktivität daher in den folgenden Untersuchungen durch Bupropion charakterisiert worden ist. Betrachtet man nun die in Abb. 26 dargestellte CYP2B6-Enzymaktivität humaner Lebermikrosomen bezogen auf verschiedene Genotypen, ist zu erkennen, dass die vier Genotypen \*1/\*4, \*1/\*5, \*1/\*6 und \*1/\*15 signifikant niedrigere Bupropionhydroxylaseaktivitäten ( $p < 0,05$ ) als die homozygoten Träger des Wildtyp-Allels hatten. Selbst die seltenen Genotypen ( $n < 3$ ) hatten als gemeinsame Gruppe betrachtet eine signifikant niedrigere CYP2B6- Enzymaktivität als die homozygoten Träger des Wildtyp- Allels ( $p < 0,01$ ).



**Abb. 26:** Bupropionhydroxylaseaktivitäten in humanen Lebermikrosomen mit unterschiedlichen Genotypen. Die unterschiedlichen Genotypgruppen wurden mit dem Wildtyp (\*1/\*1) verglichen (Mann-Whitney-Test: \* p<0,05).

Betrachtet man nun die spezifischen Bupropionhydroxylaseaktivitäten der Lebermikrosomen bezogen auf CYP2B6-Apoprotein, zeigten die Träger des Genotyps \*5/\*6 eine signifikant erhöhte spezifische Bupropionhydroxylaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp ( $p < 0,0001$ ), was ein Grund für die erniedrigten Apoproteinwerte, aber keiner signifikant erniedrigten Enzymaktivität sein kann. Die spezifischen CYP2B6-Enzymaktivitäten der anderen Genotypen unterschieden sich nicht signifikant vom Wildtyp.

Da die einzelnen Leberproben bestimmte Mutationen oft nur in heterozygoter Form trugen oder auch mehrere Mutationen gleichzeitig aufwiesen, konnte anhand der Genotypisierung der Leberproben nicht eindeutig auf die Auswirkung einer bestimmten Mutation geschlossen werden. Nicht alle Proben, die verglichen zu homozygoten Trägern des Wildtyp- Allels eine signifikant erniedrigte CYP2B6-Expression zeigten, hatten auch signifikant erniedrigte Enzymaktivitäten.

### 3.4.2 Expression in COS-1 Zellen

Die Mutationen im *CYP2B6*- Gen, die in den humanen Leberproben weniger häufig vorkamen, wurden in COS-1 Zellen exprimiert um sie hinsichtlich ihres Apoproteingehaltes und ihrer Bupropionhydroxylaseaktivitäten im Vergleich zum Wildtyp analysieren zu können.

**Tab. 9:** Charakterisierung von in COS-1 Zellen exprimierten CYP2B6-Varianten

Allel	SNP	AS-Austausch	CYP2B6-Apoprotein (%WT)	Km ( $\mu\text{M}$ )	Vmax (pmol/mg/min)
*1	Wildtyp	Wildtyp	100	65	215
*8	A415G	K139E	0	n.d.	n.d.
*10	A62T, C64T	Q21L, R22C	120,3	72	192
*11	A136G	M46V	16,2	n.a.	$\sim 4^1$
*12	G296A	G99E	7,5	n.d.	n.d.
*14	G419A	R140Q	82,5	117	48,7
*15	T1172A	I391N	18,1	n.d.	n.d.

n.d. nicht detektierbar

n.a. nicht analysierbar, da nur minimaler Substratumsatz

<sup>1</sup> bei einer Substratkonzentration von 1,6 mM

Die in COS-1 Zellen untersuchte CYP2B6.10-Variante, die eine Doppelmutation in Exon 1 trug, kam in den unter 3.4.1.1 analysierten Leberproben nicht vor, wurde aber in anderen Leberproben mit einer verringerten CYP2B6-Expression und Funktion in Verbindung gebracht und daher genauer untersucht.

Verglichen mit dem Wildtyp, der eine mittlere Expression von 40 pmol CYP2B6 Apoprotein/mg mikrosomales COS-1 Zellprotein aufwies, wurden die Varianten CYP2B6.10 und CYP2B6.14 mit etwas höheren bzw. niedrigeren Werten als der Wildtyp exprimiert. Im Gegensatz dazu exprimierten die Varianten CYP2B6.11, CYP2B6.12 und CYP2B6.15 wesentlich weniger Protein als der Wildtyp. Von der Variante CYP2B6.8 war kein CYP2B6 Apoprotein detektierbar.

Die kinetischen Parameter der Bupropionhydroxylierung ergaben einen Km-Wert von 65  $\mu\text{M}$  und ein Vmax von 215 pmol/(mg x min) für das Wildtypprotein, was in guter Übereinstimmung mit Daten aus der Literatur war (Faucette et al., 2000; Hesse et al., 2000). Während die Variante CYP2B6.10 dem Wildtyp in ihren funktionellen Eigenschaften sehr ähnlich war, hatte die CYP2B6.14-Variante einen ungefähr zweifach erhöhten Km-Wert und einen um ca. 80 % reduzierten Vmax- Wert verglichen mit dem Wildtyp. Bei der Variante CYP2B6.11 (M46V) konnte bis zu einer Bupropionkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  kein Metabolit detektiert werden. Bei höheren Substratkonzentrationen wurde Hydroxybupropion gebildet, welches aber weniger als 2 % vom Wildtyp ausmachte. Die Varianten CYP2B6.12 (G99E), CYP2B6.8 (K139E) und CYP2B6.15 (I391N) hatten keine detektierbare Enzymaktivität.



### 3.4.3 Expression in Insektenzellmikrosomen (*Tn5*)

Um die Auswirkungen der Mutationen im *CYP2B6*-Gen im Detail zu analysieren, wurden in Ergänzung zu den Mikrosomen aus COS-1-Zellen zusätzlich Insektenzellmikrosomen verschiedener *CYP2B6*-Varianten untersucht. Diese Präparationen exprimieren sehr viel *CYP2B6*, so dass nicht nur Apoprotein, sondern auch funktionelles P450 und damit die spezifische Enzymaktivität bestimmt werden kann. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass die Insektenzellen weder NADPH:Cytochrom P450-Oxidoreduktase noch Cytochrom b5 endogen exprimieren und der Einfluss dieser ebenfalls im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Enzyme auf die *CYP2B6*-Enzymaktivität untersucht werden kann.

In Tab. 10 ist eine Zusammenstellung der verschiedenen, in Insektenzellen exprimierten *CYP2B6*-Varianten zu sehen.

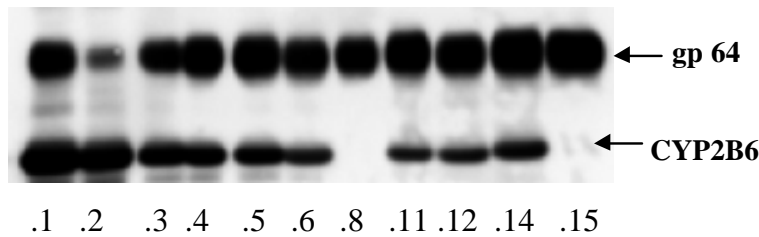
**Tab. 10:** *CYP2B6* Varianten in Insektenzellmikrosomen (*Tn5*)

Allel	SNP-Position	SNP	Aminosäureaustausch
*1		Wildtyp	Wildtyp
*2	Exon 1	C64T	R22C
*3	Exon 5	C777A	S259R
*4	Exon 5	A785G	K262R
*5	Exon 9	C1459T	R487C
*6	Exon 4/5	G516T, A785G	Q172H, K262R
*8	Exon 3	A415G	K139E
*11	Exon 1	A136G	M46V
*12	Exon 2	G296A	G99E
*14	Exon 3	G419A	R140Q
*15	Exon 8	T1172A	I391N

#### 3.4.3.1 Einfluss des Genotyps auf *CYP2B6*-Apoprotein, funktionelles P450 und Bupropionhydroxylaseaktivität

In Abb. 27 ist die mikrosomale *CYP2B6*-Apoproteinexpression aus Insektenzellmikrosomen verschiedener *CYP2B6*-Varianten zu sehen.

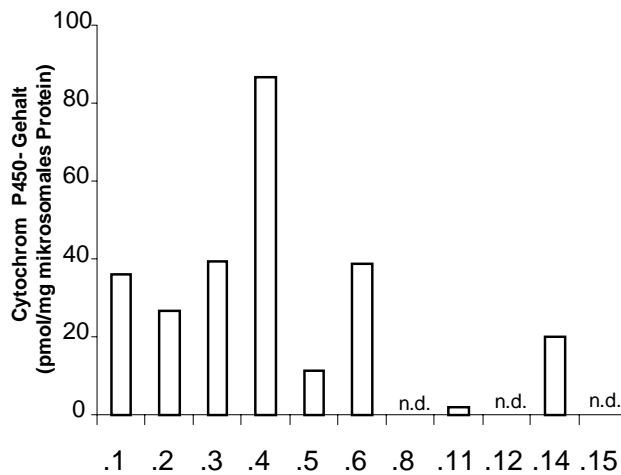
Die \*2-Mutante exprimierte eine mit dem Wildtyp (\*1) vergleichbare *CYP2B6*-Apoproteinmenge. Die Varianten *CYP2B6.3*, *CYP2B6.4*, *CYP2B6.5*, *CYP2B6.6*, *CYP2B6.11*, *CYP2B6.12* und *CYP2B6.14* exprimierten weniger Apoprotein als der Wildtyp und die Varianten *CYP2B6.8* und *CYP2B6.15* exprimierten kein *CYP2B6*.



**Abb. 27:** CYP2B6-Apoproteinexpression von CYP2B6-Varianten in Insektenzellmikrosomen (je 10 µg Protein). Zur Transfektionskontrolle wurde das virale Protein gp64 nachgewiesen.

Verglichen mit der Apoproteinexpression in COS-1 Zellen (3.4.2) wurden die Varianten CYP2B6.11 und CYP2B6.12 zu einem höheren Anteil exprimiert, der aber immer noch niedriger als beim Wildtyp war. Für die Varianten CYP2B6.15 konnte keine Expression in Insektenzellen beobachtet werden, welche in COS-1 Zellen noch 18 % des Wildtyps ausmachte. Die Variante CYP2B6.8 exprimiert auch in COS-1 Zellen kein CYP2B6- Apoprotein.

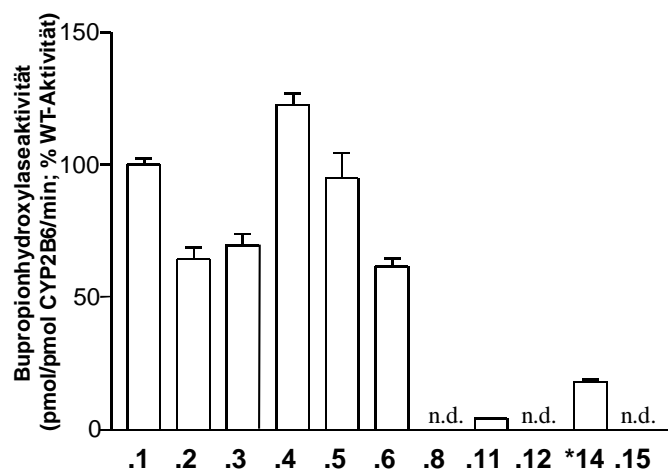
Bei allen in Tab. 10 aufgeführten CYP2B6-Varianten wurde der Anteil von funktionellem P450 und die spezifische Bupropionhydroxylaseaktivität bestimmt. Im Vergleich zur Apoproteinexpression ist in Abb. 28 der Anteil von funktionellem P450/mg mikrosomales Protein im Vergleich zum Wildtyp zu sehen.



**Abb. 28:** Cytochrom P450- Anteil von mikrosomalem Protein verschiedener CYP2B6-Varianten. Von jeweils 100 µl mikrosomalem Protein wurde das CO-Differenzspektrum zwischen 400 und 500 nm aufgenommen (n.d. CO-Differenzspektrum nicht messbar).

Die Varianten CYP2B6.2, CYP2B6.3 und CYP2B6.6 hatten einen mit dem CYP2B6-Wildtyp vergleichbaren Cytochrom P450-Anteil/mg mikrosomales Protein. Die CYP2B6.4-Variante exprimierte ca. die 2,4fache Menge von funktionellem CYP2B6, wobei der Anteil an funktionellem P450 bei den Varianten CYP2B6.5, CYP2B6.11 und CYP2B6.14 signifikant erniedrigt war. Bei den CYP2B6-Mutanten CYP2B6.8, CYP2B6.12 und CYP2B6.15 war kein P450 nachweisbar.

Untersuchungen der spezifischen Bupropionhydroxylaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp (CYP2B6.1) sind in Abb. 29 dargestellt und ergaben, dass außer der CYP2B6.5-Variante (C1459T Mutation in Exon 9) alle CYP2B6 Varianten eine signifikant veränderte spezifische Bupropionhydroxylaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp (CYP2B6.1) hatten. Von diesen Mutanten hatte die CYP2B6.4-Mutante eine um 23 % erhöhte spezifische CYP2B6-Aktivität als der Wildtyp. Die Mutanten CYP2B6.2, CYP2B6.3 und CYP2B6.6 hatten 64 %, 70 % bzw. 62 % der Wildtypaktivität, wobei die CYP2B6.11 und CYP2B6.14 Variante nur noch eine minimale CYP2B6-Aktivität aufwies (4 % bzw. 18 % der Wildtypaktivität). Für die Mutanten CYP2B6.8, CYP2B6.12 und CYP2B6.15 war kein Bupropionumsatz nachweisbar.



**Abb. 29:** Spezifische Bupropionhydroxylaseaktivitäten unterschiedlicher CYP2B6-Varianten (*Tn5*). 5 pmol Insektenzellmikrosomen wurden mit 5 pmol gereinigter Rattenreduktase und einem NADPH-RS mit Bupropion (1 mM) für 15 min inkubiert (n.d.: Aktivität nicht detektierbar).

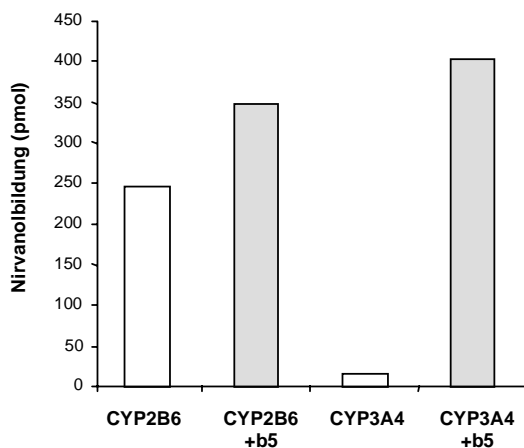
### 3.5 Einfluss von Cytochrom b5 auf die CYP2B6- Enzymaktivität

Das 17 kDa kleine, hämhaltige Protein Cytochrom b5 kann die Enzymaktivität einiger Cytochrom P450-Enzyme substratabhängig modulieren. Für CYP2B6 wurde eine Zunahme der Enzymaktivität für Substrate wie Testosteron und 7-Ethoxycoumarin durch Cytochrom b5 beschrieben (Yamazaki et al. 2001).

#### 3.5.1 Einfluss von Cytochrom b5 auf die S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität

Die in-vitro S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität von CYP2B6 wurde durch Inkubationen von CYP2B6 Supersomes, die mit Cytochrom b5 koexprimiert waren, um das 1,4fache erhöht (siehe Abb. 30).

Viele CYP3A4- abhängige Oxidationsreaktionen wie die Testosteron-6 $\beta$ -Hydroxylierung und die Nifedipinhydroxylierung werden durch Cytochrom b5 drastisch erhöht (Porter, 2002). So wurde die unter 3.2.1 beschriebene CYP3A4-abhängige S-Mephenytoin-N-Demethylierung, welche einen wesentlich geringeren Anteil als die von CYP2B6 katalysierte S-Mephenytoin-N-Demethylierung ausmachte, durch CYP3A4 Supersomes, die mit Cytochrom b5 koexprimiert waren, um das 20fache erhöht (Abb. 30).

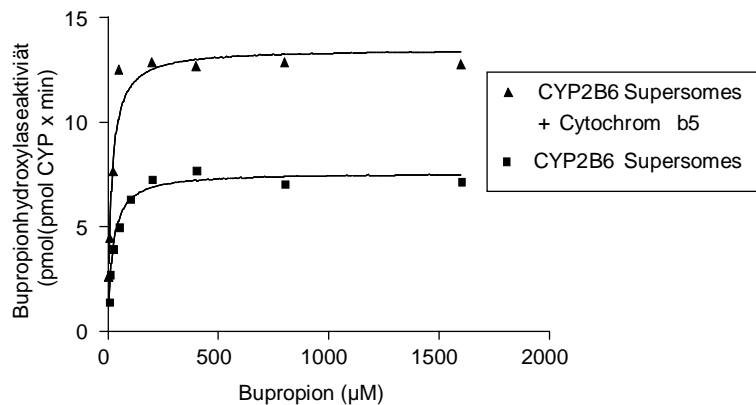


**Abb. 30:** Einfluss von Cytochrom b5 auf die CYP2B6 und CYP3A4 katalysierte S-Mephenytoin-N-Demethylierung. 5 pmol rekombinante Supersomes wurden mit oder ohne koexprimiertem Cytochrom b5 mit 200  $\mu$ M S-Mephenytoin und einem NADPH-RS 30 min bei 37 °C inkubiert.

Durch die Zugabe von Cytochrom b5 wurde der Einfluss von CYP3A4 auf die S-Mephenytoin-N-Demethylierung derart erhöht, dass diese Reaktion den durch CYP2B6 katalysierten Metabolismus überstieg.

### 3.5.2 Einfluss von Cytochrom b5 auf die Bupropionhydroxylaseaktivität

Die von CYP2B6 katalysierte Bupropionhydroxylierung wurde durch Cytochrom b5 ca. um das 1,8fache erhöht. Der Km-Wert verringerte sich durch Cytochrom b5 von 21,3  $\mu\text{M}$  auf 16  $\mu\text{M}$  (siehe Abb. 31).

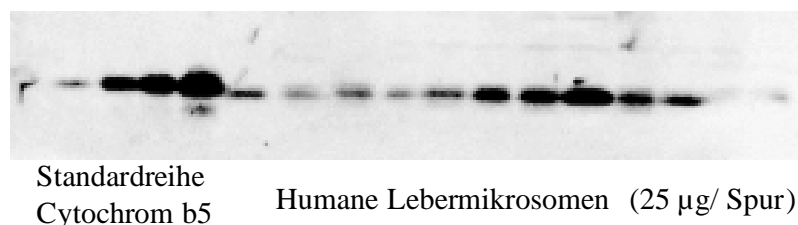


**Abb. 31:** Bupropionhydroxylaseaktivitäten von CYP2B6 Supersomes mit und ohne Cytochrom b5-Koexpression.

Die Bupropionhydroxylaseaktivität von CYP3A4 Supersomes wurde durch Cytochrom b5 nicht verändert.

### 3.5.3 Expression von Cytochrom b5 in humanen Lebermikrosomen

Die Proteinexpression von Cytochrom b5 wurde bei 78 humanen Lebermikrosomen untersucht. Sie variierte 36fach mit Werten von 111,2 pmol Cytochrom b5/mg mikrosomales Protein bis 4046 pmol Cytochrom b5/mg mikrosomales Protein. Die mediane Expression von Cytochrom b5 betrug 698 pmol/mg mikrosomales Protein. In Abbildung 32 ist ein typischer Western Blot zu sehen, der die Cytochrom b5 Proteinexpression verschiedener humaner Lebermikrosomen zeigt.



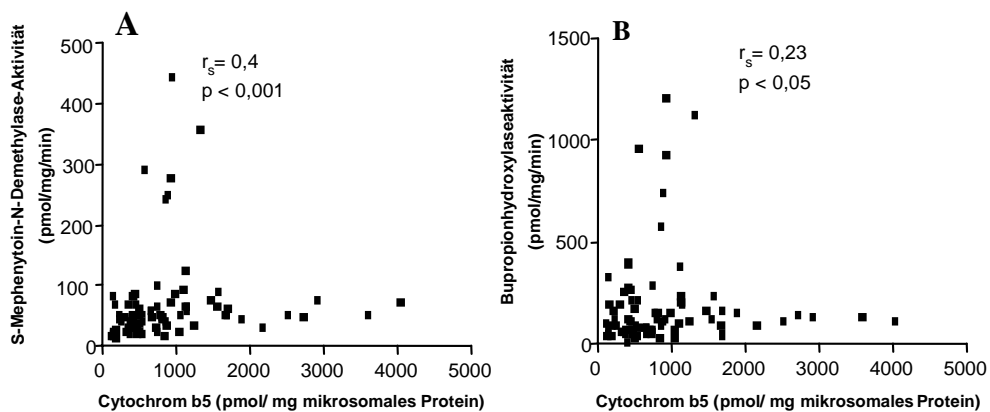
**Abb. 32:** Proteinexpression von Cytochrom b5 in verschiedenen humanen Lebermikrosomen.

Die Expression von Cytochrom b5 zeigte bei Männern und Frauen keinen signifikanten Unterschied. Auch war keine Altersabhängigkeit der Expression zu erkennen. Wurden jedoch die Patientenproben analysiert, die keine präoperative Medikation erhielten, fiel auf, dass die Alkoholkonsumenten eine um 55 % erniedrigte Cytochrom b5-Apoproteinexpression ( $p < 0,05$ ) hatten.

### 3.5.4 Korrelation zwischen der CYP2B6- Enzymaktivität und der Cytochrom b5 Proteinexpression

Wie bereits im letzten Kapitel gezeigt, wurde der CYP2B6- und CYP3A4-abhängige Substratumsatz von Bupropion und S-Mephenytoin durch Cytochrom b5 in einem rekombinanten System in unterschiedlichem Ausmaß erhöht.

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern der durch diese Cytochrom P450-Enzyme vermittelte Metabolismus in Lebermikrosomen von der Apoproteinexpression von Cytochrom b5 abhängt. Die Korrelation zwischen der Cytochrom b5- Expression und der S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität bzw. Bupropionhydroxylaseaktivität ist in Abb. 33 dargestellt.

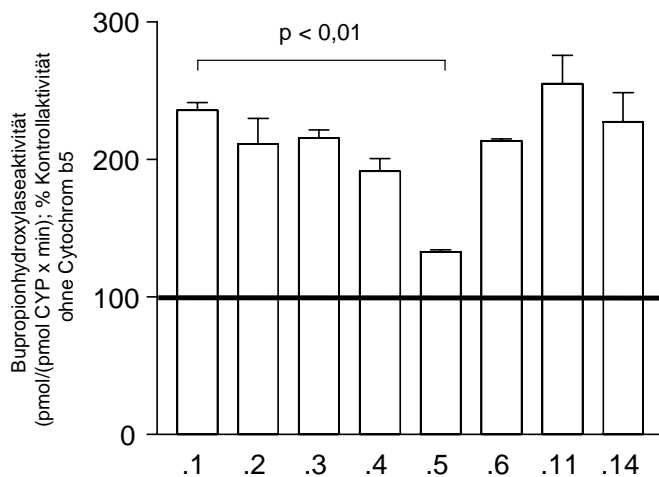


**Abb. 33:** Korrelation zwischen dem Cytochrom b5 Apoproteingehalt und der S-Mephenytoin-N-Demethylase-Aktivität (A) bzw. Bupropionhydroxylaseaktivität (B) bei 77 humanen Lebermikrosomen.

Die Cytochrom b5 Apoproteinexpression korrelierte mit der S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r_s = 0,4$  ( $p < 0,001$ ). Zwischen dem Cytochrom b5- Gehalt und der Bupropionhydroxylaseaktivität war jedoch eine geringere Abhängigkeit erkennbar ( $r_s = 0,23$ ;  $p < 0,05$ ).

### 3.5.5 Einfluss von Cytochrom b5 auf die CYP2B6- Aktivität verschiedener CYP2B6-Varianten

Ein äquimolares Verhältnis von Cytochrom b5 zu CYP2B6 bewirkte eine 136%ige Erhöhung der spezifischen Bupropionhydroxylaseaktivität beim Wildtyp (CYP2B6.1, Abb. 34). Diese Aktivitätszunahme unterschied sich signifikant ( $p < 0,01$ , Anova-Test) bei der Variante CYP2B6.5. Obwohl sich die spezifische Bupropionhydroxylaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp nicht unterschied, betrug die Aktivitätszunahme durch Cytochrom b5 bei dieser Variante nur 33 %. Der Effekt von Cytochrom b5 war bei den übrigen Varianten, die verringerte oder erhöhte Bupropionhydroxylaseaktivitäten hatten, nicht signifikant.



**Abb. 34:** Prozentuale Erhöhung der spezifischen Bupropionhydroxylaseaktivität durch Zugabe von Cytochrom b5. Der waagerechte Balken stellt die Kontrollaktivität ohne Cytochrom b5 (100 %) dar. 5 pmol Insektenzellmikrosomen wurden mit 5 pmol gereinigter Rattenreduktase und mit oder ohne 5 pmol Cytochrom b5 und einem NADPH-RS mit Bupropion (1 mM) für 15 min inkubiert (Statistik: Anova-Test).

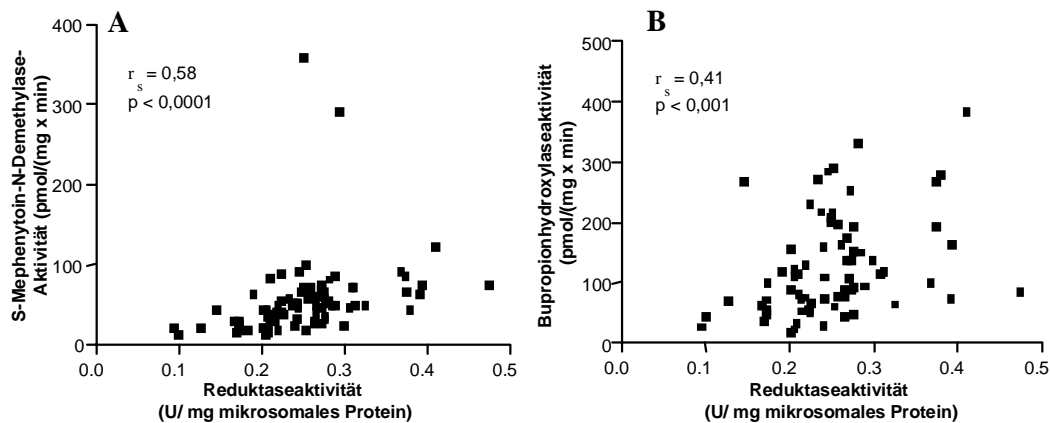
### 3.6 Untersuchungen zum Einfluss der NADPH:P450-Oxidoreduktase auf die Bupropionhydroxylaseaktivität

Für den Metabolismus von Substanzen durch die Cytochrom P450- Enzyme ist die NADPH:P450- Oxidoreduktase notwendig. Durch diese werden die Elektronen von NADPH auf das Cytochrom P450-Enzym übertragen.

Ob die Enzymaktivität der NADPH:P450- Oxidoreduktase, die durch photometrische Analyse der Reduktion von Cytochrom c bestimmt werden kann, einen Einfluss auf die Bupropionhydroxylaseaktivität in humanen Lebermikrosomen hat, wurde durch Aktivitätsbestimmungen der NADPH:P450- Oxidoreduktase an 101 humanen Lebermikrosomen untersucht.

Die Aktivität der NADPH:P450- Oxidoreduktase variierte 5fach von 0,09 U/mg mikrosomales Protein bis 0,47 U/mg mikrosomales Protein mit einer mittleren Enzymaktivität von 0,25 U/mg mikrosomales Protein.

Zwischen der NADPH:P450- Oxidoreduktase- Aktivität und der CYP2B6-Aktivität bestand eine Abhängigkeit. Diese war bei der S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität (Abb. 34a) stärker ausgeprägt als bei der Bupropionhydroxylierung (Abb. 35b).



**Abb. 35:** Korrelation der NADPH:P450- Oxidoreduktase- Aktivität mit der S-Mephenytoin-N-Demethylase-Aktivität (A) und Bupropionhydroxylyaseaktivität (B).

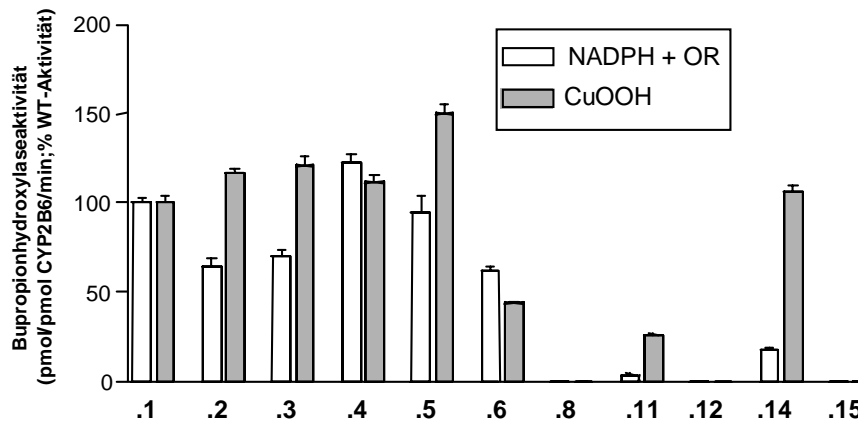
Eine Analyse der Patienten, die präoperativ keine Medikamente einnahmen ergab, dass Raucher (> 3 Zigaretten pro Tag) im Vergleich zu Nichtrauchern eine um 16 % verringerte NADPH:P450-Oxidoreduktase-Aktivität aufwiesen ( $p < 0,05$ ).

In mehreren Arbeiten konnte durch Mutageneseversuche gezeigt werden (Bridges et al., 1998; Yamaguchi et al., 2004), dass für die Elektronenübertragung durch die NADPH:P450- Oxidoreduktase eine Interaktion mit dem Cytochrom P450- Enzym notwendig ist. Dafür sind bestimmte Aminosäuresequenzen wichtig.

Ob eine verringerte Enzymaktivität einer Mutante Ursache einer verminderten oder nicht möglichen Interaktion mit der NADPH:P450- Oxidoreduktase ist, kann durch eine Elektronenübertragung mit Cumolhydroperoxid untersucht werden. Hierbei werden die Elektronen ohne NADPH und ohne die NADPH:P450- Oxidoreduktase auf das Cytochrom P450- Enzym übertragen, welches dann das Substrat metabolisieren kann.

Im folgenden sind die verschiedenen CYP2B6-Varianten auf eine Aktivitätsänderung mit Cumolhydroperoxid anstelle von NADPH:P450-Oxidoreduktase und NADPH im Vergleich zum CYP2B6 Wildtyp untersucht worden (Abb. 36).





**Abb. 36:** Bupropionhydroxylaseaktivitäten von CYP2B6-Varianten mit einem NADPH-RS (NADPH) und Rattenoxidoreduktase (offene Balken) oder Cumolhydroperoxid (CuOOH, graue Balken).

Die CYP2B6-Varianten CYP2B6.2, CYP2B6.3 und CYP2B6.14, die im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte Enzymaktivität hatten (siehe 3.4.3.1), erlangten durch die Elektronenübertragung mittels Cumolhydroperoxid Bupropionhydroxylaseaktivitäten, die vergleichbar mit dem Wildtyp waren. Bei der CYP2B6.5-Variante, die eine nahezu vergleichbare spezifische Enzymaktivität wie der Wildtyp hatte, stieg diese durch Cumolhydroperoxid auf das 1,5fache an. Die Bupropionhydroxylaseaktivitäten der Varianten CYP2B6.4 und CYP2B6.6 und der nichtfunktionellen CYP2B6 Mutanten CYP2B6.8, CYP2B6.12 und CYP2B6.15 stieg dagegen nicht an.

### 3.7 Untersuchungen zum Einfluss biologischer Faktoren auf die Expression und Funktion von CYP2B6

#### 3.7.1 Einfluss von Alter und Geschlecht

Die Bioverfügbarkeit von Arzneimitteln kann vom Alter abhängen. So ist bei Neugeborenen die Biotransformation und die renale Exkretion noch nicht ausgereift. Ältere Menschen haben ein verändertes Verteilungsvolumen und eine verminderte Nierenfunktion. Da die wenigsten Arzneimittel an Säuglingen und älteren Menschen geprüft werden, ist es wichtig zu untersuchen, ob die Expression und Funktion von arzneimittelmetabolisierenden Enzymen altersabhängig ist.

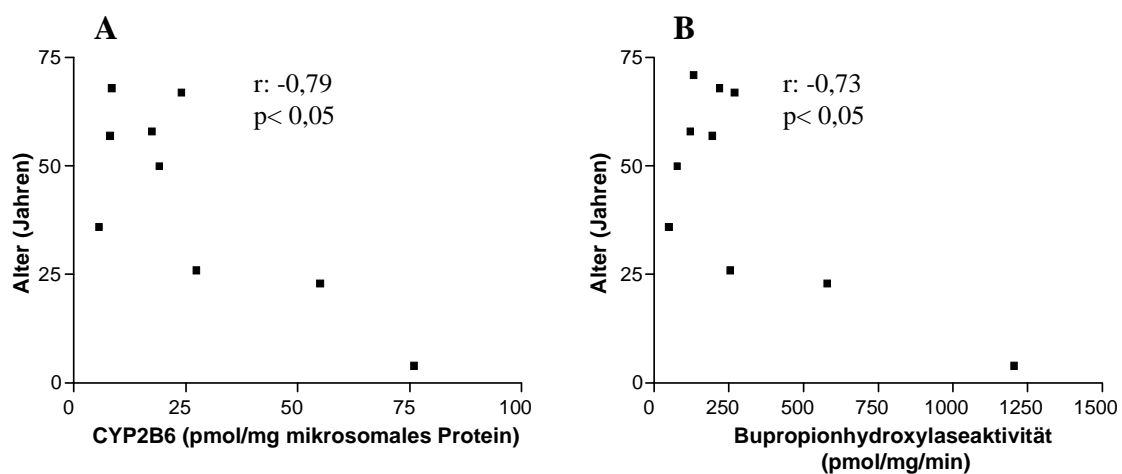
Die altersabhängige Betrachtung der CYP2B6-Expression und Funktion bei humanen Lebermikrosomen erwies sich als sehr schwierig, da ältere Patienten überrepräsentativ vertreten waren. Das mittlere Alter der Patienten betrug 58 Jahre. Beim Einschluss aller Patienten ergab sich keine altersabhängige Expression oder Aktivität von CYP2B6.

Wurden jedoch nur die Lebermikrosomen von Patienten analysiert, die keine Medikamente einnahmen, war eine negative Korrelation ( $r = -0,53$ ,  $p < 0,001$ )

zwischen Alter und der CYP2B6- Expression zu erkennen. Zwischen dem Alter und der Bupropionhydroxylaseaktivität bestand keine signifikante Korrelation.

Auffällig hierbei war, dass die Lebermikrosomen zweier junger Patienten die niedrigsten Apoprotein- und Aktivitätswerte hatten. Diese zwei Patienten hatten die Genotypen \*1/\*4 und \*1/\*5, welche wie unter 3.4.1.1 gezeigt, zu signifikant erniedrigter CYP2B6-Proteinexpression und Bupropionhydroxylaseaktivität führen.

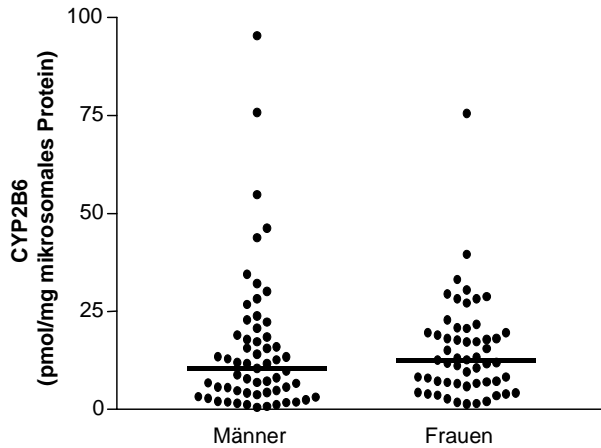
Wurden nur Proben mit *CYP2B6*-Genotyp \*1/\*1 und keiner Medikation analysiert (n=9), korrelierte der CYP2B6-Proteingehalt und die mikrosomale Bupropionhydroxylaseaktivität mit dem Alter mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r = -0,79$  bzw.  $r = -0,73$  ( $p < 0,05$ , Abb. 37).



**Abb. 37:** Analyse der altersabhängigen CYP2B6-Expression (A) und Bupropionhydroxylaseaktivität (B) bei Patienten des CYP2B6-Genotyps \*1/\*1, die präoperativ keine Medikamente eingenommen haben.

Die Clearance einiger Arzneistoffe wie Cyclosporin und Erythromycin unterscheidet sich zwischen Männern und Frauen. Wolbold et al. (2003) haben gezeigt, dass die Expression von CYP3A4 und der CYP3A4-abhängige Verapamilmetabolismus bei Frauen im Vergleich zu Männern signifikant erhöht ist.

In wiefern das Geschlecht eine Rolle für die Expression und Funktion von CYP2B6 in der Leber spielt, wurde anhand der vorliegenden Patientendaten analysiert (Abb. 38).

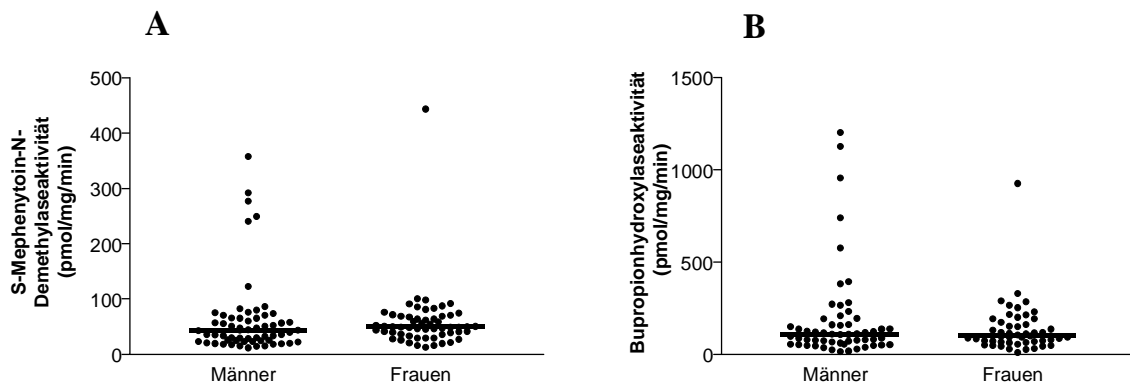


**Abb. 38:** Analyse der geschlechtsabhängigen CYP2B6-Apoproteinexpression in humanen Lebermikrosomen.

Die mediane CYP2B6-Expression betrug bei Männern 10,6 pmol/mg mikrosomales Protein und bei Frauen 12,7 pmol/mg mikrosomales Protein.

Der Unterschied zwischen den beiden Geschlechtern war jedoch nicht signifikant.

Die mediane S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität war bei Männern mit 43,4 pmol/(mg x min) niedriger als bei Frauen, die eine mediane S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität von 49,8 pmol/(mg x min) hatten (Abb. 39a). Die mediane Bupropionhydroxylaseaktivität war bei Männern mit 109,8 pmol/(mg x min) höher als bei Frauen, die eine mediane Bupropionhydroxylaseaktivität von 100,2 pmol/(mg x min) hatten (Abb. 39b). Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.



**Abb. 39:** Analyse der geschlechtsabhängigen S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität (A) und Bupropionhydroxylaseaktivität (B) in humanen Lebermikrosomen.

Wurden nur die Daten der Patienten analysiert, die keine präoperative Medikation erhielten, ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der CYP2B6-Expression und CYP2B6-Enzymaktivität bei Männern und Frauen. Auch ein Ausschluss der Patienten, die jünger als 30 Jahre waren ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen.

Für CYP2B6 konnten keine geschlechtsspezifischen Unterschiede der Expression und Funktion festgestellt werden, diese waren jedoch umgekehrt proportional zum Alter.

### **3.8 Untersuchungen zum Einfluss von Umweltfaktoren auf die Expression und Funktion von CYP2B6**

#### **3.8.1 In- vitro Untersuchungen zur CYP2B6- Inhibition**

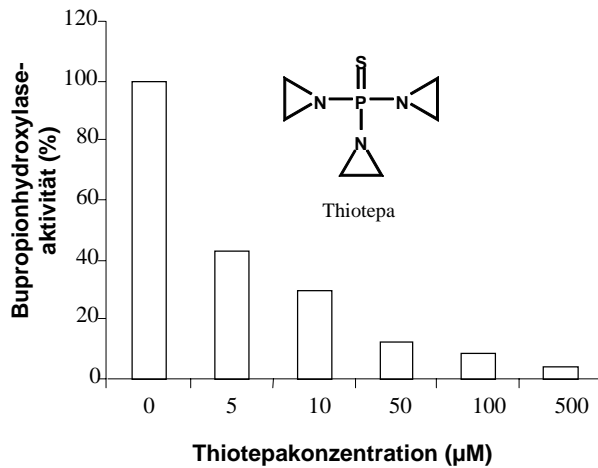
##### **3.8.1.1 Einfluss von Thiotepa auf die CYP2B6-Enzymaktivität**

Das CYP2B6 Substrat Cyclophosphamid ist ein Zytostatikum, welches seine alkylierende Aktivität erst nach Metabolismus zu 4-Hydroxycyclophosphamid erlangt. Dieser Schritt wird durch die Cytochrom P450-Enzyme CYP2B6, CYP2C9 und CYP3A4 katalysiert, wobei CYP2B6 die Hauptrolle spielt (Roy et al., 1999). Zusammen mit Thiotepa und Carboplatin wird Cyclophosphamid in der Hochdosischemotherapie bei Blasen- und Brusttumoren eingesetzt.

Huitema et al. (2000) fanden bei Patienten, die eine Hochdosischemotherapie mit Cyclophosphamid und Thiotepa bekamen, signifikant erniedrigte Plasmaspiegel von 4-Hydroxycyclophosphamid, wenn Thiotepa vor Cyclophosphamid verabreicht wurde. Zusätzlich konnte die Gruppe zeigen, dass Thiotepa bei einer Koinkubation von humanen Lebermikrosomen mit Cyclophosphamid dessen Metabolismus zu 4-Hydroxycyclophosphamid mit einem  $IC_{50}$ - Wert von 23  $\mu$ M inhibierte.

Im folgenden wurde daher untersucht, ob die Ursache für diese klinische Beobachtung möglicherweise auf eine Inhibition von CYP2B6 durch Thiotepa zurückzuführen sein könnte.

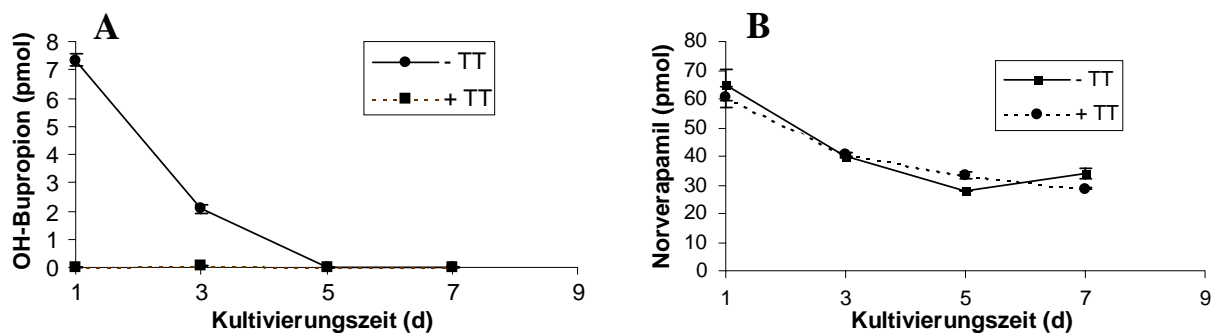
Dies wurde zunächst in-vitro an Mikrosomenpräparationen untersucht. Wie in Abb. 40 zu sehen ist, hatte das Zytostatikum Thiotepa einen potenten inhibitorischen Einfluss auf die mikrosomale CYP2B6-Enzymaktivität. Die Enzymaktivität war bei einer Thiotepakonzentration von 10  $\mu$ M schon mehr als zur Hälfte reduziert und erreichte bei höheren Konzentrationen eine Inhibition von über 95 %.



**Abb. 40:** Abnahme der Bupropionhydroxylase-aktivität in humanen Lebermikrosomen mit steigenden Thiotepakonzentrationen.

### 3.8.1.1.1 Einfluss von Thiotepa auf die CYP2B6-Aktivität in humanen Hepatozyten

Auch in humanen Hepatozyten konnte die CYP2B6-Aktivität bereits nach einer 30-minütigen Inkubation mit Thiotepa komplett inhibiert werden (Abb. 41a). Die Enzymaktivität von CYP3A4, charakterisiert durch den Verapamilmetabolismus zu Norverapamil, wurde durch Thiotepa dagegen nicht beeinflusst (Abb. 41b).

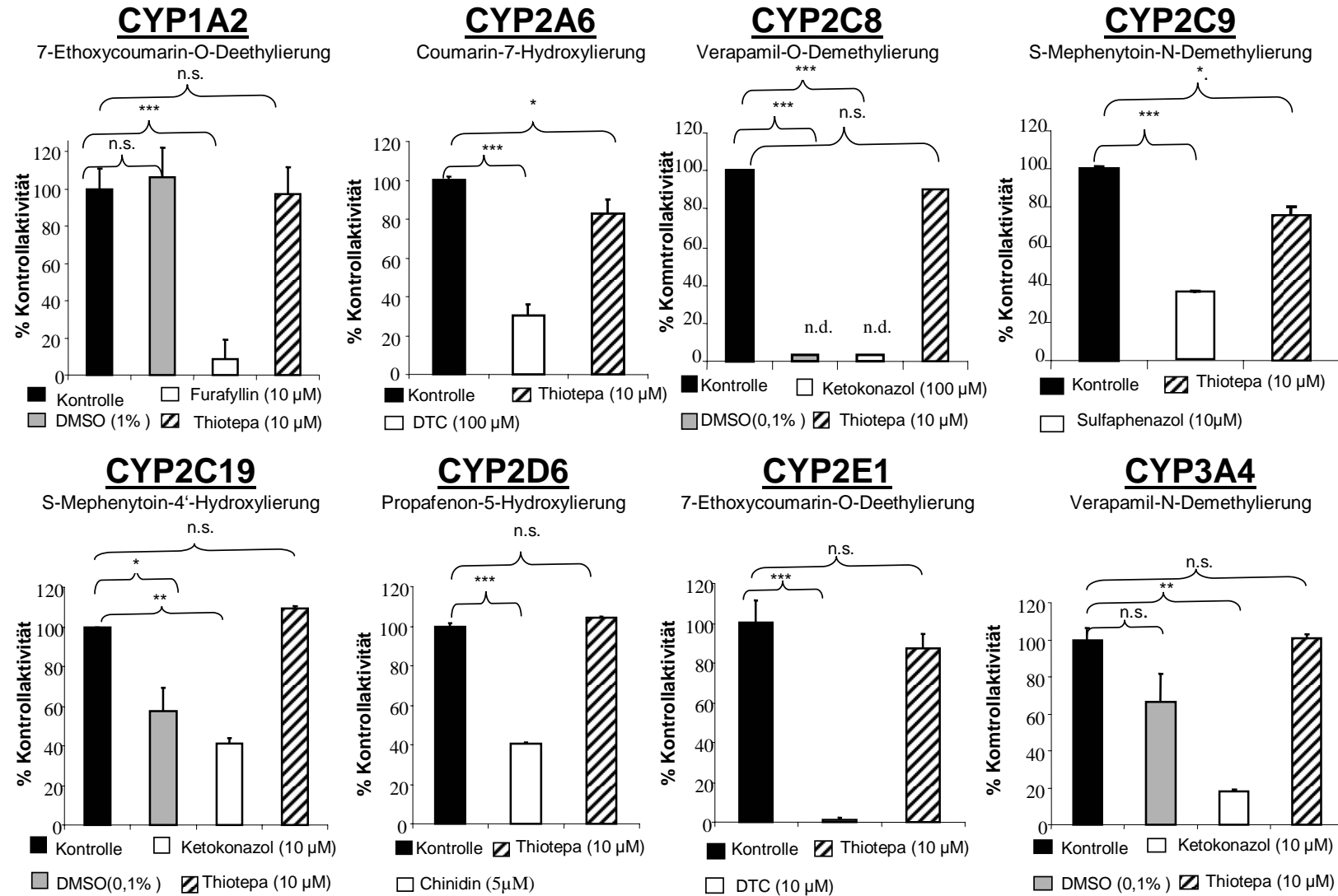


**Abb. 41:** Hydroxybupropionbildung (A) und Norverapamilbildung (B) in Kulturen humaner Hepatozyten nach 30-minütiger Inkubation mit (gestrichelte Linie) und ohne (durchgehende Linie) Thiotepa (10 µM).

### 3.8.1.1.2 Spezifität der Inhibition durch Thiotepa

Um zu untersuchen, ob weitere arzneimittelmetabolisierende Cytochrom-P450-Enzyme von der Inhibition durch Thiotepa betroffen sind, wurde der Einfluss von Thiotepa auf die Enzymaktivitäten von CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 und CYP3A4 bestimmt. In Abb. 42 ist die Auswirkung einer Koinkubation von Thiotepa (10 µM) mit dem zu untersuchenden Enzym zu sehen. Parallel dazu wurden spezifische CYP-Inhibitoren als Positivkontrollen verwendet.

Bei einer Thiotepakonzentration von 10  $\mu\text{M}$  war die CYP2B6-Enzymaktivität von CYP2B6-Supersomes um 87 % inhibiert. Des weiteren wurden die Enzymaktivitäten von CYP2C9 und CYP2A6 um 24 % und 17 % inhibiert. Die Aktivitäten der anderen untersuchten Cytochrom P450 Enzyme wurden durch Thiotepa nicht signifikant inhibiert (siehe Abb. 42).

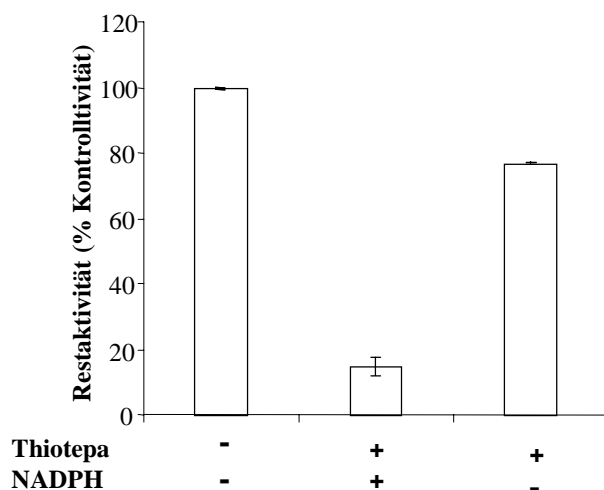


**Abb. 42:** Effekt von Thiotepa (10 µM) und spezifischen CYP-Inhibitoren auf verschiedene CYP-Aktivitäten die, wie unter 2.2.5 und 2.2.7 beschrieben, analysiert worden sind (Anova-Test: \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , n.s. nicht signifikant, DTC: Diethyldithiocarbamat).

### 3.8.1.1.3 Ermittlung des Inhibitions-Mechanismus durch Thiotepa

Da unterschiedliche Inhibitionsmechanismen verschiedene pharmakokinetische Konsequenzen haben können, ist es wichtig zu unterscheiden, ob die Inhibition reversibel oder irreversibel ist. Bei einer irreversiblen Hemmung eines Enzyms, bleibt diese im Gegensatz zu einer kompetitiven Inhibition auch nach dem Entfernen des Inhibitors z.B. durch eine Dialyse bestehen.

CYP2B6-exprimierende Insektenzellmembranen wurden mit und ohne Thiotepa bzw. NADPH-RS inkubiert und anschließend einer sechsständigen Dialyse unterzogen. Die Enzymaktivität der mit Thiotepa und NADPH-RS inkubierten Proben wurde im Vergleich zu einer ebenfalls dialysierten Kontrollprobe zu über 80 % gehemmt (Abb. 43). Eine nur mit Thiotepa inkubierte Probe erlangte dagegen 76,8 % der CYP2B6-Kontrollaktivität zurück. Dieses Resultat deutete stark darauf hin, dass die Inhibition irreversibel und „mechanism-based“ verläuft, d.h. dass der Inhibition ein NADPH-abhängiger Aktivierungsschritt vorausgeht.



**Abb. 43:**  
Bupropionhydroxylaseaktivitäten der mit Thiotepa und NADPH-RS inkubierten und anschließend dialysierten Proben.

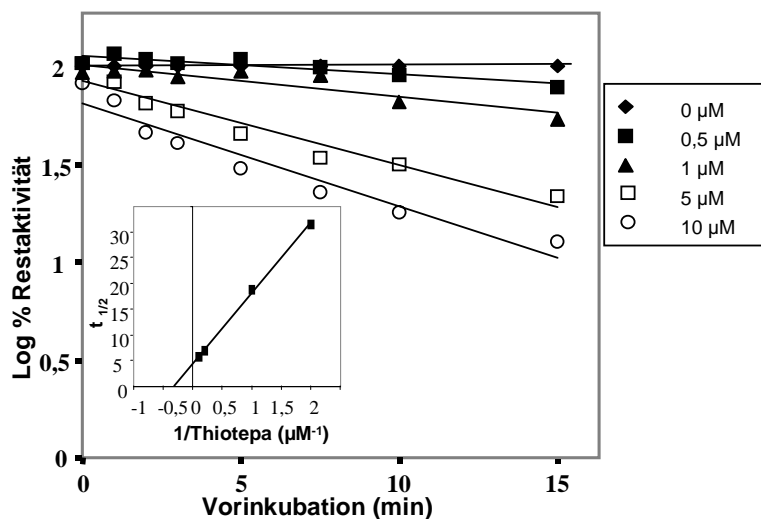
### 3.8.1.1.4 Bestimmung der Hemmkonstanten von Thiotepa

Die Inhibition der Bupropionhydroxylierung war sowohl in humanen Lebermikrosomen als auch in CYP2B6 exprimierenden Insektenzellmembranen konzentrations- und zeitabhängig. In humanen Lebermikrosomen betrug die Thiotepakonzentration für halb-maximale Inaktivierung ( $K_i$ ) 3,8  $\mu\text{M}$ . Der Inaktivierungsprozess war pseudo-erster Ordnung, was an dem linearen Abfall der Enzymaktivität über die Zeit zu erkennen war.

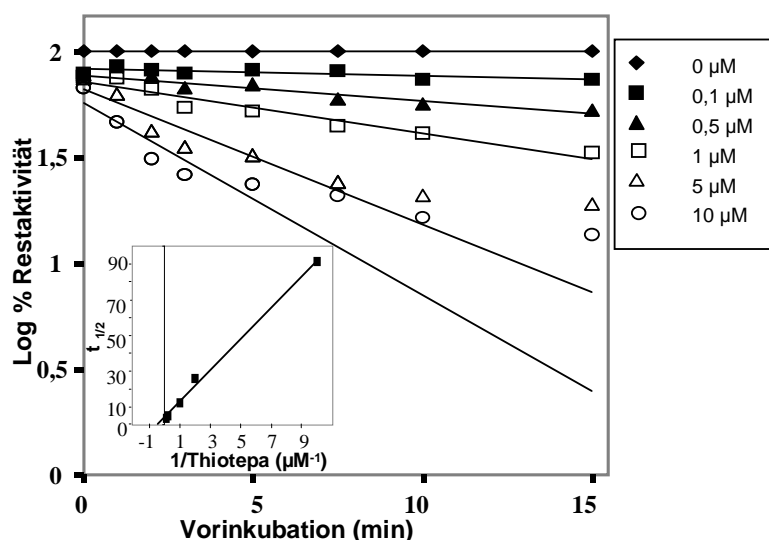


Die Inaktivierungskonstante  $k_{inact}$  für maximale Inaktivierung bei sättigender Thiotepakonzentration war  $0,16 \text{ min}^{-1}$  und die Zeit bis die Hälfte der Enzymmoleküle inaktiviert waren, betrug 4,3 min.

Die entsprechende Inaktivierung in CYP2B6 exprimierenden Insektenzellmembranen durch Thiotepa war sehr ähnlich zu der in humanen Lebermikrosomen ( $K_i$  2,2  $\mu\text{M}$ ;  $k_{inact}$   $0,17 \text{ min}^{-1}$ ). Die Halbwertszeit für die Inaktivierung betrug 4,1 min. Die entsprechenden Zeitverläufe des Inaktivierungsprozesses und die Kitz-Wilson-Plots zur Bestimmung der Hemmkonstanten sind in Abb. 44a und 44b dargestellt.



**Abb. 44a:** Inaktivierungskinetik der Bupropionhydroxylierung in humanen Lebermikrosomen mit verschiedenen Thiotepakonzentrationen. Humane Lebermikrosomen (100  $\mu\text{g}$ ) wurden für verschiedene Zeiten mit einem NADPH-RS und Thiotepa inkubiert. Die Restenzymaktivität wurde bestimmt. Die zusätzliche Grafik in der Abbildung stellt den dazugehörigen Kitz-Wilson Plot zur Bestimmung der Inhibitionsparameter dar.



**Abb. 44b:** Inaktivierungskinetik der Bupropionhydroxylierung in CYP2B6-Supersomes™ mit verschiedenen Thiotepakonzentrationen. Rekombinantes CYP2B6 (5 pmol) wurde für verschiedene Zeiten mit einem NADPH-RS und Thiotepa inkubiert. Die Restenzymaktivität wurde bestimmt. Die zusätzliche Grafik in der Abbildung stellt den dazugehörigen Kitz-Wilson Plot zur Bestimmung der Inhibitionsparameter dar.

### 3.8.1.1.5 Einfluss von Nukleophilen und Radikalfängern

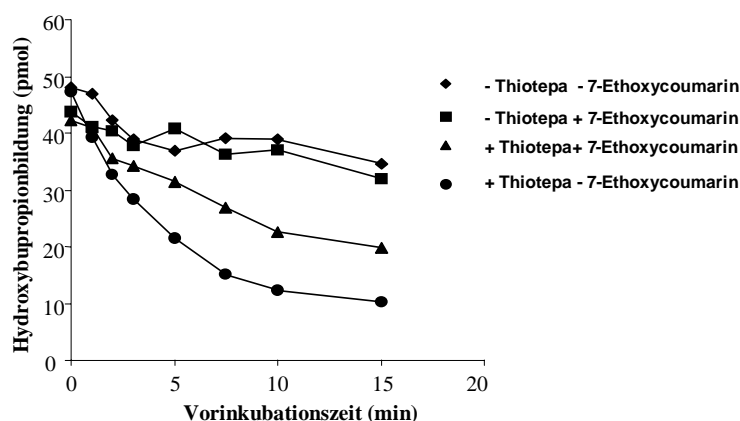
Um zu untersuchen, ob die Inaktivierung von CYP2B6 vor der Entlassung des Inaktivators aus dem aktiven Zentrum eintritt, wurden nukleophile Abfangreagenzien zu den Inkubationen zugegeben. Weder die Zugabe von Glutathion (10 mM) noch von Acetylcystein (10 mM) konnte die Inaktivierung unterbinden.

Um auszuschließen, dass die CYP2B6-Inhibition einer Autoinaktivierung durch Peroxide zugrunde liegt, wurden DMSO (0,1 %) und Superoxiddismutase (1000 Einheiten) als Radikalfänger zu den Inkubationen zugegeben. Diese Radikalfänger konnten die Inaktivierung von CYP2B6 durch Thiotepa nicht verringern.

Da die Inhibition der CYP2B6 Aktivität durch Thiotepa also weder durch nukleophile Abfangreagenzien noch durch Radikalfänger aufgehoben werden konnte, erfolgt die Inhibition vollständig nach den Kriterien eines „mechanism-based“ Enzyminktivators.

### 3.8.1.1.6 Einfluss anderer CYP2B6-Substrate

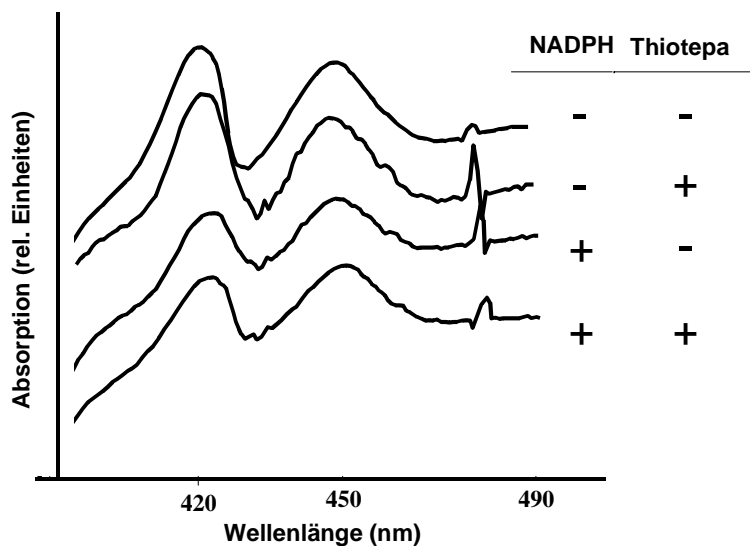
Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass Thiotepa durch CYP2B6 selbst zur inaktivierenden Substanz metabolisiert wird. Demzufolge sollte ein anderes CYP2B6 Substrat die Inaktivierung durch Thiotepa abschwächen, da dieses mit Thiotepa um das aktive Zentrum konkurrieren müsste. In Abb. 45 ist zu sehen, dass die Zugabe von 7-Ethoxycoumarin, einem CYP2B6-Substrat, die Inhibition durch Thiotepa reduziert.



**Abb. 45:** Substratschutz durch 7-Ethoxycoumarin. Humane Lebermikrosomen (100 µg) wurden mit Thiotepa und mit bzw. ohne 7-Ethoxycoumarin (500 µM) inkubiert. Kontrollen waren in Abwesenheit von Thiotepa mit und ohne 7-Ethoxycoumarin.

### 3.8.1.1.7 Einfluss auf funktionelles P450

Um zu untersuchen, ob die Inhibition der CYP2B6-Aktivität durch eine Zerstörung der Häm-Komponente oder durch Alkylierung des Apoproteins erfolgt, wurden reduzierte CO-Spektren von CYP2B6 aufgenommen. Inkubationen von CYP2B6 exprimierenden Insektenzellmikrosomen und Thiotepa führten zu keiner Zerstörung des Häms, wobei die Inkubation mit NADPH-RS und Thiotepa zu einer leichten Abnahme des reduzierten CO-Komplexes führte (Abb. 46). Diese Beobachtung wird auch durch die Tatsache bestätigt, dass die CYP2B6-Aktivität mit der Dauer der Inkubation leicht abnahm.



**Abb. 46:**  
Reduzierte CO-Differenzspektren von CYP2B6 exprimierenden Insektenzellmembranen nach Inkubation mit und ohne Thiotepa bzw. NADPH-RS.

Nur die Proben, die mit Thiotepa und NADPH-RS inkubiert worden sind, hatten eine signifikant erniedrigte Enzymaktivität verglichen zu den Kontrollproben. Folglich findet die Inhibition der CYP2B6-Aktivität nicht über eine Zerstörung der Häm-Komponente statt, sondern vermutlich durch eine Alkylierung des Apoproteins.

### 3.8.1.2 Einfluss von Clopidogrel und Ticlopidin auf die CYP2B6-Enzymaktivität

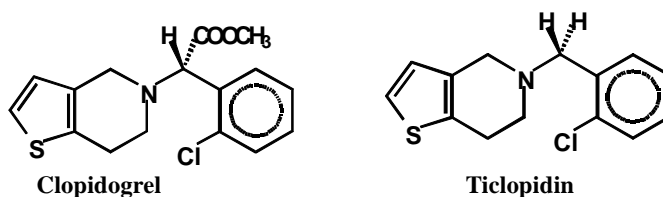
Da CYP2B6 zu den noch wenig untersuchten humanen P450 Enzymen gehört, ist die Suche nach klinisch relevanten Substraten von großem Interesse. In diesem Zusammenhang fielen Berichte auf, die auf den neueren und häufig verwendeten Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel als mögliches Substrat hindeuteten. Es wurde nämlich beobachtet, dass mit Phenobarbital behandelte Ratten eine Reduzierung des antiaggregatorischen Effektes von Clopidogrel aufwiesen (Savi et al., 1994).

Dieser Befund konnte dahingehend interpretiert werden, dass durch Phenobarbital induziertes CYP2B1/2 einen erhöhten Abbau von Clopidogrel und damit die beobachtete geringere Wirkung verursachte. Da CYP2B6 das humane Ortholog zum Phenobarbital induzierbaren CYP2B1 der Ratte darstellt, war daher Clopidogrel möglicherweise ein Substrat von CYP2B6. Die Untersuchung dieser Hypothese führte, wie im folgenden geschildert, zu der überraschenden Erkenntnis, dass Clopidogrel das Enzym ebenfalls sehr potent und irreversibel hemmt.

### 3.8.1.2.1 Inhibition von CYP2B6 durch Clopidogrel und Ticlopidin

Wenn Clopidogrel ein Substrat von CYP2B6 wäre, sollte es sich als kompetitiver Inhibitor zu Bupropion als Substrat verhalten. Bei initialen Experimenten mit humanen Lebermikrosomen, in denen Clopidogrel und Bupropion zusammen inkubiert wurden, stellte sich jedoch heraus, dass die Bupropionhydroxylaseaktivität durch den Thrombozytenaggregationshemmer extrem potent (bis zu 98 %) inhibiert wurde.

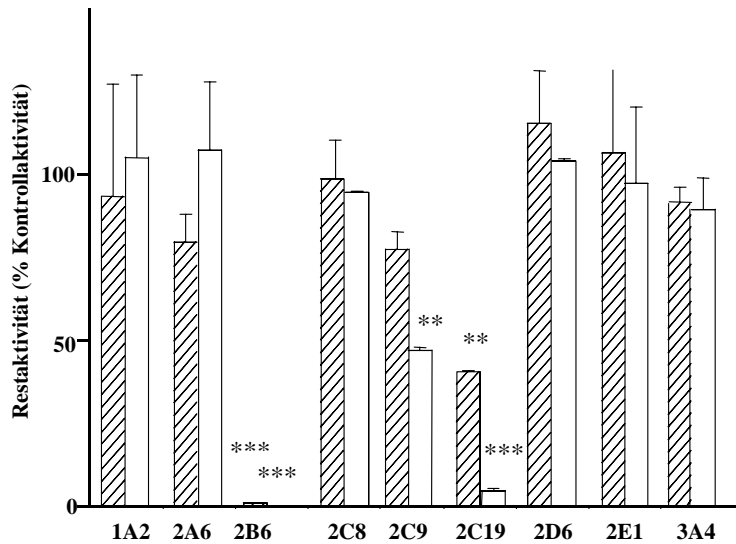
Untersuchungen zum Effekt von Clopidogrel auf die CYP2B6-Aktivität und die Aktivität der anderen arzneimittelmetabolisierenden Enzyme wurden daraufhin mit rekombinanten Enzymen analog den Untersuchungen zur Inhibition von CYP2B6 durch Thiotepa durchgeführt. Die ausführliche Darstellung der verwendeten Enzymaktivitätsassays ist unter 2.2.5 aufgeführt. Da Ticlopidin, welches mittlerweile wegen gravierender Nebenwirkungen größtenteils durch Clopidogrel ersetzt wird, strukturverwandt zu Clopidogrel ist (Abb. 47), wurde diese Substanz zusammen mit Clopidogrel untersucht.



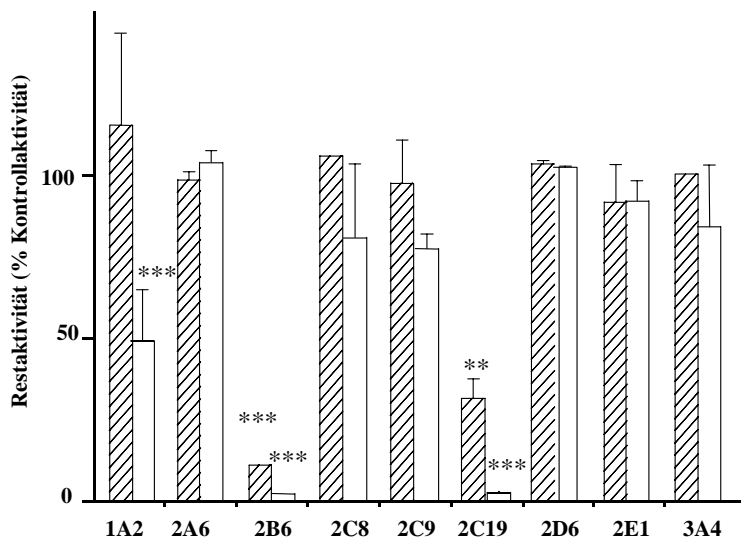
**Abb. 47:** Strukturformeln der beiden Thienopyridinderivate Clopidogrel und Ticlopidin.

3.8.1.2.2 Spezifität der CYP-Inhibition durch Clopidogrel und Ticlopidin

Der Einfluss von Clopidogrel und Ticlopidin auf die Enzymaktivitäten von CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 und CYP3A4 ist in den folgenden Abbildungen 48a und 48b dargestellt.



**Abb. 48a:** Selektivität der Inhibition rekombinant exprimierter P450 Enzyme durch Clopidogrel. Supersomes™ wurden mit 1µM (gestreifte Balken) oder 10 µM (weiße Balken) Clopidogrel inkubiert. Die Enzymaktivitäten wurden mit den entsprechenden Markerreaktionen bestimmt. Für jedes P450 wurde die Kontrollaktivität ohne Inhibitor auf 100 % gesetzt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (Anova-Test: \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001).

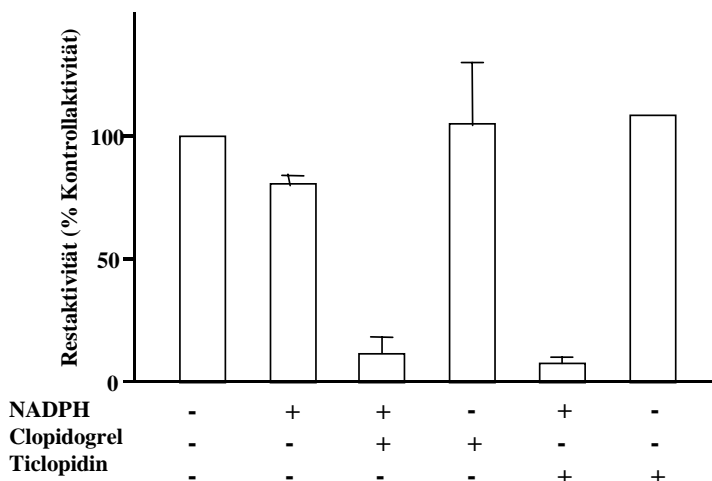


**Abb. 48b:** Selektivität der Inhibition rekombinant exprimierter P450 Enzyme durch Ticlopidin. Supersomes wurden mit 1µM (gestreifte Balken) oder 10 µM (weiße Balken) Ticlopidin inkubiert. Die Enzymaktivitäten wurden mit den entsprechenden Markerreaktionen bestimmt. Für jedes P450 wurde die Kontrollaktivität ohne Inhibitor auf 100 % gesetzt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (Anova-Test: \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001).

Clopidogrel und auch Ticlopidin inhibierten CYP2B6 am potentesten. Bei einer Inhibitorkonzentration von 1 µM wurden nur die Bupropionhydroxylierung durch CYP2B6 und die S-Mephenenytoin-4'-Hydroxylierung durch CYP2C19 signifikant gehemmt. Bei einer Inhibitorkonzentration von 10 µM war bei der Bupropionhydroxylierung und S-Mephenenytoin-4'-Hydroxylierung durch beide Thrombozytenaggregationshemmer fast keine Aktivität mehr nachweisbar. Bei dieser Konzentration war auch eine unterschiedliche Selektivität beider Substanzen zu beobachten, da CYP2C9 durch Clopidogrel zu 53 % inhibiert wurde und CYP1A2 durch Ticlopidin zu 51 %. Die anderen CYP- Aktivitäten wurden bei beiden Konzentration nicht signifikant beeinflusst.

3.8.1.2.3 Ermittlung des Inhibitionsmechanismus

Analog den Untersuchungen zu Thiotepa wurde auch für Clopidogrel und Ticlopidin der Mechanismus der Enzyminaktivierung untersucht. Humane Lebermikrosomen (100 µg) wurden mit und ohne Inhibitoren bzw. NADPH-RS inkubiert und anschließend einer sechsstündigen Dialyse unterzogen. Durch NADPH allein war eine Verringerung der Bupropionhydroxylaseaktivität von ca. 20 % zu beobachten. Die nur mit Clopidogrel oder Ticlopidin behandelten Proben erlangten nach der Dialyse die CYP2B6-Aktivität der nichtbehandelten Proben. Die Enzymaktivität der mit Clopidogrel oder Ticlopidin und NADPH-RS inkubierten Proben konnte durch die Dialyse nicht regeneriert werden (Abb. 49). Die Inhibition der Bupropionhydroxylaseaktivität durch Clopidogrel und Ticlopidin war also NADPH-abhängig und nicht reversibel.

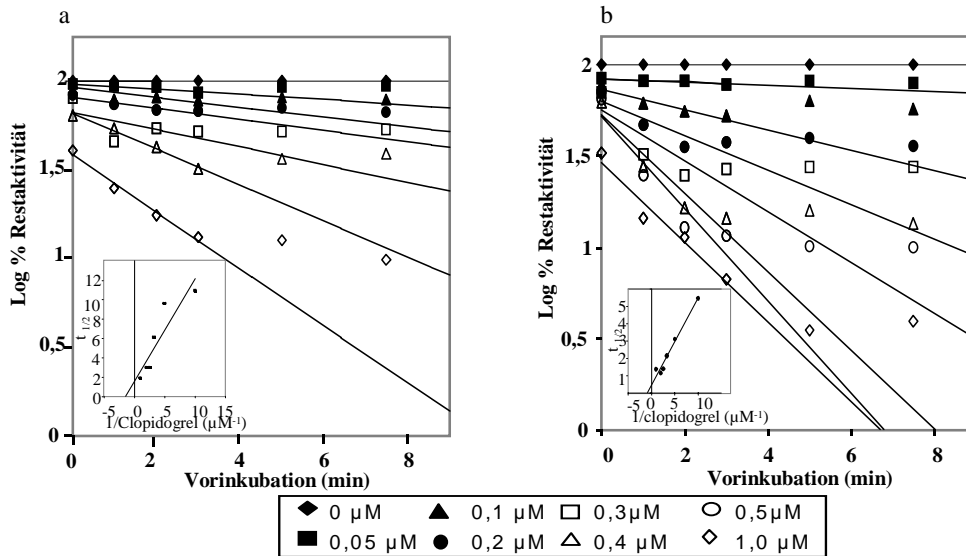


**Abb. 49:** Bupropionhydroxylaseaktivitäten der mit Clopidogrel bzw. Ticlopidin und NADPH-RS inkubierten und anschließend dialysierten Proben.

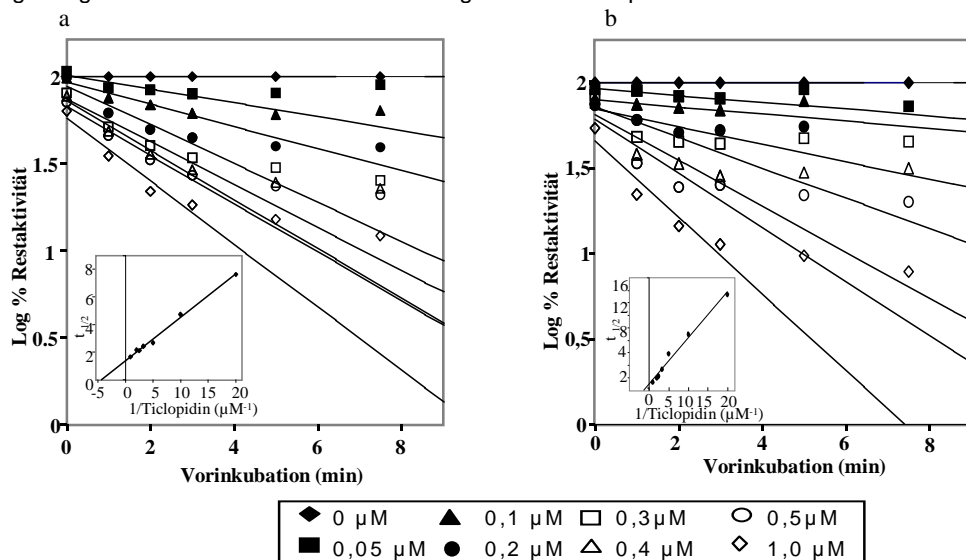
3.8.1.2.4 Bestimmung der Hemmkonstanten

Die Inhibition der Bupropionhydroxylierung durch Clopidogrel und Ticlopidin war in humanen Lebermikrosomen und in CYP2B6 exprimierenden Insektenzellmikrosomen konzentrations- und zeitabhängig.

Die entsprechenden Zeitverläufe des Inaktivierungsprozesses und die Kitz-Wilson-Plots zur Bestimmung der Hemmkonstanten sind in Abb. 50 a/b und 51 a/b dargestellt.



**Abb. 50a/b:** Inaktivierungskinetik der Bupropionhydroxylierung in humanen Lebermikrosomen (a) und in rekombinanten CYP2B6 (b) mit verschiedenen Clopidogrelkonzentrationen. Humane Lebermikrosomen (100 µg) bzw. rekombinantes CYP2B6 (5 pmol) wurden für verschiedene Zeiten mit einem NADPH-RS und Clopidogrel (0 bis 1 µM) inkubiert. Die Restenzymaktivität wurde bestimmt. Die zusätzliche Grafik in der Abbildung stellt den dazugehörigen Kitz-Wilson Plot zur Bestimmung der Inhibitionsparameter dar.



**Abb. 51a/b:** Inaktivierungskinetik der Bupropionhydroxylierung in humanen Lebermikrosomen (a) und in rekombinanten CYP2B6 (b) mit verschiedenen Ticlopidinkonzentrationen. Humane Lebermikrosomen (100 µg) bzw. rekombinantes CYP2B6 (5 pmol) wurden für verschiedene Zeiten mit einem NADPH-RS und Ticlopidin (0 bis 1 µM) inkubiert. Die Restenzymaktivität wurde bestimmt. Die zusätzliche Grafik in der Abbildung stellt den dazugehörigen Kitz-Wilson Plot zur Bestimmung der Inhibitionsparameter dar.

In Tab. 11 sind die kinetischen Parameter der irreversiblen Inaktivierung durch Clopidogrel und Ticlopidin in humanen Lebermikrosomen und in CYP2B6 exprimierenden Insektenzellmembranen dargestellt. Die sehr potente Inhibition durch Clopidogrel und Ticlopidin verlief in humanen Lebermikrosomen und in rekombinantem CYP2B6 sehr ähnlich.

**Tab. 11:** Inaktivierungsparameter der irreversiblen Inhibition durch Clopidogrel und Ticlopidin in humanen Lebermikrosomen und CYP2B6 exprimierenden Insektenzellmembranen ( $K_i$  = Inaktivatorkonzentration für halbmaximale Inaktivierung,  $k_{inact}$  = Maximalrate der Inaktivierung,  $t_{1/2}$  = Zeit, bis die Hälfte der Enzymmoleküle inaktiviert sind).

#### Humane Lebermikrosomen

	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{inact}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)
Clopidogrel	0,5	0,35	2
Ticlopidin	0,2	0,5	1,4

#### CYP2B6 exprimierende Insektenzellmembranen

	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{inact}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min)
Clopidogrel	1,1	1,5	0,5
Ticlopidin	0,8	0,8	0,9

#### 3.8.1.2.5 Einfluss von Nukleophilen und Radikalfängern

Um analog zu den Untersuchungen zur CYP2B6-Inhibition durch Thiotepa zu bestimmen, ob die Inaktivierung von CYP2B6 vor der Entlassung des Inaktivators aus dem aktiven Zentrum eintritt, wurden die nukleophilen Abfangreagenzien Glutathion (10 mM) und Acetylcystein (10 mM) zu den Inkubationen mit Clopidogrel und Ticlopidin hinzugegeben. Keines der Reagenzien konnte die Inaktivierung von CYP2B6 unterbinden.

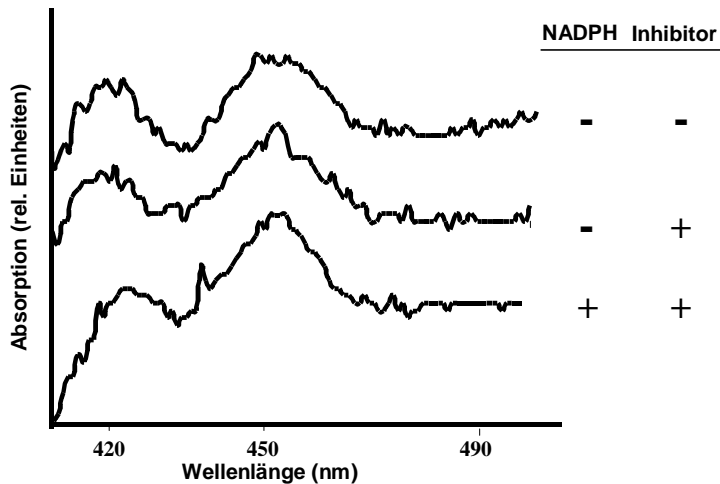
Um auszuschließen, dass die CYP2B6-Inhibition einer Autoinaktivierung durch Peroxide zugrundeliegt, wurden DMSO (0,1 %) und Superoxiddismutase (1000 Einheiten) als Radikalfänger zu den Inkubationen zugegeben. Diese Radikalfänger konnten die Inaktivierung von CYP2B6 nicht verringern.

Auch die Inhibition der CYP2B6 Aktivität durch Clopidogrel und Ticlopidin konnte also weder durch nukleophile Abfangreagenzien noch durch Radikalfänger aufgehoben werden und erfolgt daher ebenso wie bei Thiotepa nach den Kriterien eines „mechanism-based“ Enzyminkativators, der zuerst NADPH-abhängig metabolisiert werden muss, um dann als irreversibler Inhibitor zu fungieren.



### 3.8.1.2.6 Einfluss auf funktionelles P450

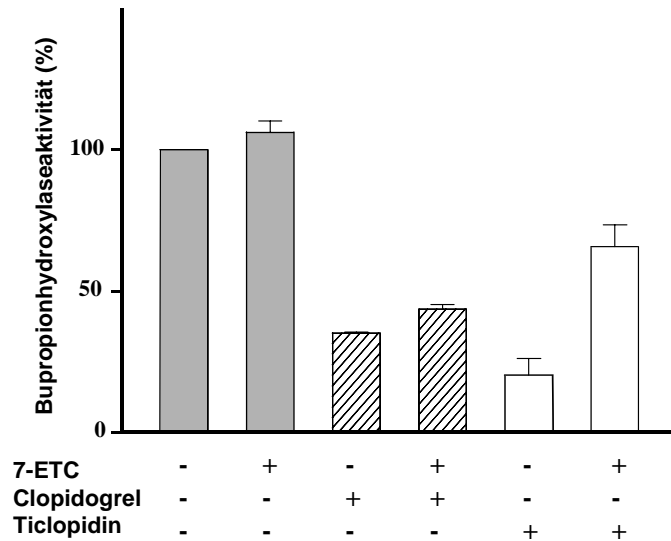
Durch die Quantifizierung von reduziertem, CO-bindendem Häm der mit Clopidogrel oder Ticlopidin und NADPH-RS inkubierten CYP2B6 exprimierenden Insektenzellmikrosomen konnte keine Zerstörung des Häms beobachtet werden (Abb. 52). Wie bei der CYP2B6-Inhibition durch Thiotepa erfolgt die Inhibition auch in diesem Fall vermutlich durch eine Alkylierung des Apoproteins.



**Abb. 52:**  
Reduzierte CO-Differenzspektren von CYP2B6 exprimierenden Insektenzellmembranen nach Inkubation mit und ohne Clopidogrel oder Ticlopidin bzw. NADPH-RS.

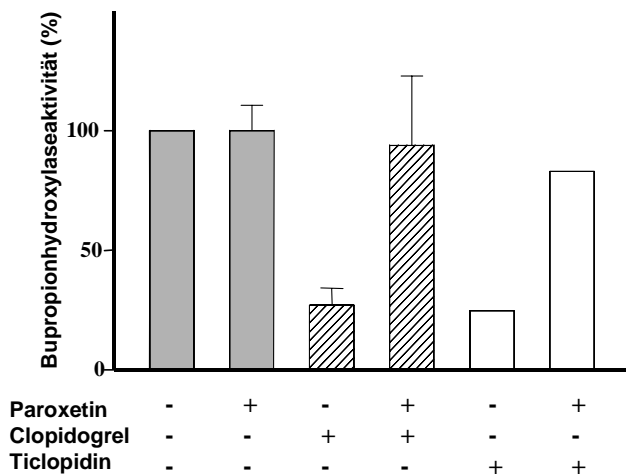
### 3.8.1.2.7 Einfluss anderer CYP2B6-Substrate

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass Clopidogrel und Ticlopidin wie das unter 3.8.1.1 untersuchte Thiotepa, selbst NADPH-abhängig durch CYP2B6 zu inaktivierenden Substanzen metabolisiert werden. Demzufolge sollte das CYP2B6-Substrat 7-Ethoxycoumarin auch die Inaktivierung durch Clopidogrel und Ticlopidin abschwächen, wie es für Thiotepa gezeigt werden konnte. In Abb. 53 ist zu sehen, dass die Zugabe von 7-Ethoxycoumarin die Inhibition verringern kann, jedoch nicht im gleichen Ausmaß für Clopidogrel und Ticlopidin. Die Inhibition durch Clopidogrel wurde nur um 7 % verringert, wobei die Hemmung durch Ticlopidin um 47 % verringert wurde.



**Abb. 53:**  
 Substratschutz durch 7-Ethoxycoumarin. Humane Lebermikrosomen (100 µg) wurden mit Clopidogrel bzw. Ticlopidin und mit bzw. ohne 7-Ethoxycoumarin (7-ETC, 1 mM) inkubiert. Die Kontrollen wurden in Abwesenheit von Inhibitor mit und ohne 7-Ethoxycoumarin inkubiert. Anschließend wurden die Bupropionhydroxylaseaktivitäten bestimmt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Da der Metabolismus der zwei Inhibitoren Clopidogrel und Ticlopidin offensichtlich nicht gleichermaßen durch das CYP2B6-Substrat 7-Ethoxycoumarin reduziert werden kann, wurde der Einfluss einer weiteren Substanz, dem kompetitiven CYP2B6-Inhibitor Paroxetin untersucht. Dieser kann, wie in Abb. 54 dargestellt ist, im Gegensatz zu 7-Ethoxycoumarin, die CYP2B6-Inaktivierung durch Clopidogrel nahezu komplett aufheben. Die Inaktivierung durch Ticlopidin wurde um 23 % verringert.



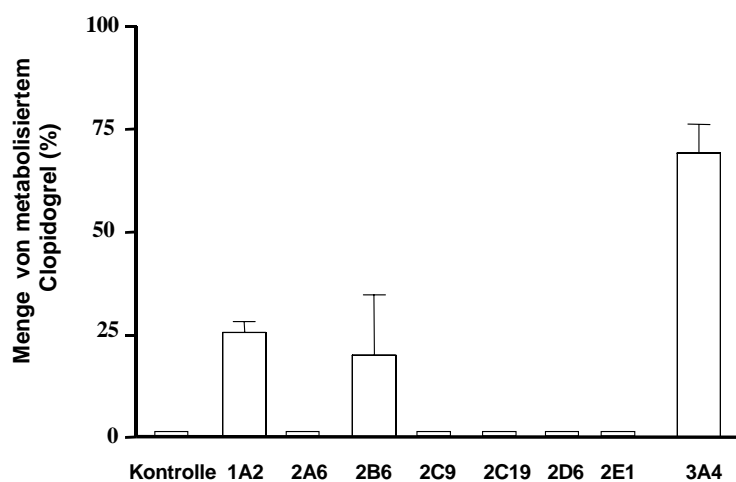
**Abb. 54:**  
 Substratschutz durch Paroxetin. Humane Lebermikrosomen (100 µg) wurden mit Clopidogrel bzw. Ticlopidin und mit bzw. ohne Paroxetin (50 µM) inkubiert und einer anschließenden Dialyse unterzogen. Die Kontrollen wurden in Abwesenheit von Inhibitor mit und ohne Paroxetin inkubiert. Anschließend wurden die Bupropionhydroxylaseaktivitäten bestimmt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten.

Der unterschiedliche Einfluss der CYP2B6-Liganden 7-Ethoxycoumarin und Paroxetin auf die durch Clopidogrel und Ticlopidin verursachte CYP2B6-Inhibition deutet auf Unterschiede in der sterischen Besetzung des aktiven Zentrums von CYP2B6 durch diese Substanzen hin.

### 3.8.1.2.8 Metabolismus von Clopidogrel

Da Clopidogrel die Enzymaktivität von CYP2B6 in humanen Lebermikrosomen und CYP2B6-exprimierenden Insektenzellmikrosomen NADPH-abhängig inhibiert, sollte auch ein CYP2B6-abhängiger Metabolismus von Clopidogrel vorhanden sein.

Der Metabolismus von Clopidogrel durch verschiedene Cytochrom P450-Enzyme wurde durch Inkubationen der in Insektenzellmembranen exprimierten jeweiligen Isoenzyme und der anschließenden Quantifizierung von Clopidogrel bestimmt. Wie in Abb. 55 zu sehen ist, wird Clopidogrel durch die Cytochrom P450 Isoenzyme CYP3A4, CYP1A2 und CYP2B6 metabolisiert.



**Abb. 55:** Metabolismus von Clopidogrel durch verschiedene Cytochrom P450 Isoenzyme. Die das entsprechende CYP exprimierenden Insektenzellmembranen (5 pmol) wurden mit Clopidogrel (10  $\mu$ M) inkubiert und daraufhin die Menge des metabolisierten Clopidogrels bestimmt.

Diese Daten bestätigen die zwischenzeitlich erschienenen Ergebnisse von Clarke und Waskell (2002), in deren Arbeit auch CYP3A4, CYP1A2 und CYP2B6 als die Clopidogrel metabolisierenden Enzyme identifiziert worden sind.

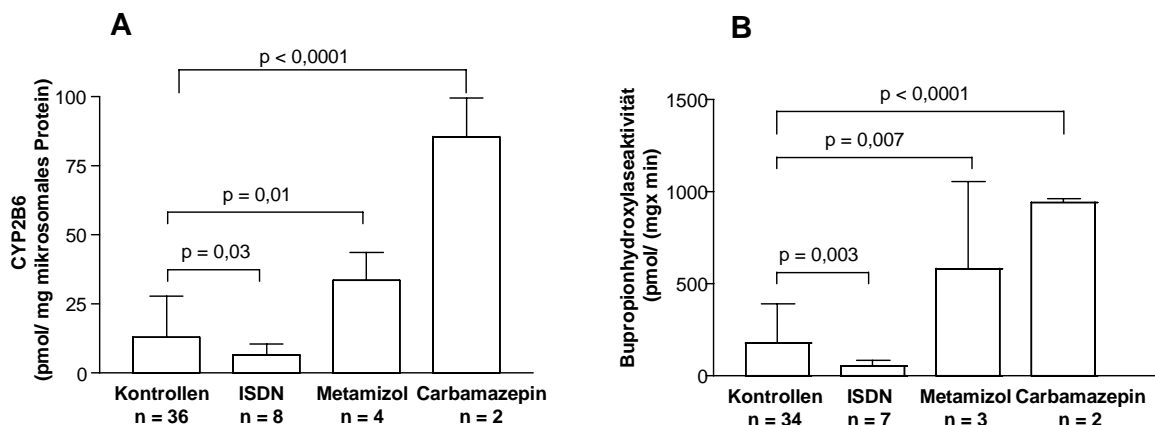
### 3.8.2 Einfluss von Alkohol- und Tabakkonsum auf die CYP2B6- Expression und Funktion

Miksys et al. (2003) haben gezeigt, dass der CYP2B6-Gehalt im Gehirn von Rauchern und Alkoholikern erhöht ist. Auch Hesse et al. (2004) haben den Einfluss von Tabakkonsum und Alkohol auf die Expression und Funktion von CYP2B6 in humanen Lebermikrosomen untersucht und einen signifikanten Einfluss gefunden. In den hier untersuchten Leberproben konnten diese Befunde weder bei Alkoholkonsum (mind. 1 alkoholisches Getränk pro Tag), noch bei Zigarettenkonsum (mehr als 3 Zigaretten pro Tag) bestätigt werden. Bei beiden Gruppen fand sich im Vergleich zu Proben von Patienten, die weder Alkohol noch Tabak konsumierten, keine veränderte CYP2B6-Expression und Bupropionhydroxylaseaktivität.

### 3.8.3 Einfluss des Arzneimittelkonsums auf die CYP2B6- Expression und Funktion

Die CYP2B6-Expression und Bupropionhydroxylaseaktivitäten humaner Lebermikrosomen wurden in Abhängigkeit des präoperativen Arzneimittelkonsums der Patienten analysiert. Die Arzneimittel, die mindestens von zwei Patienten eingenommen wurden, sind in die Auswertung eingegangen.

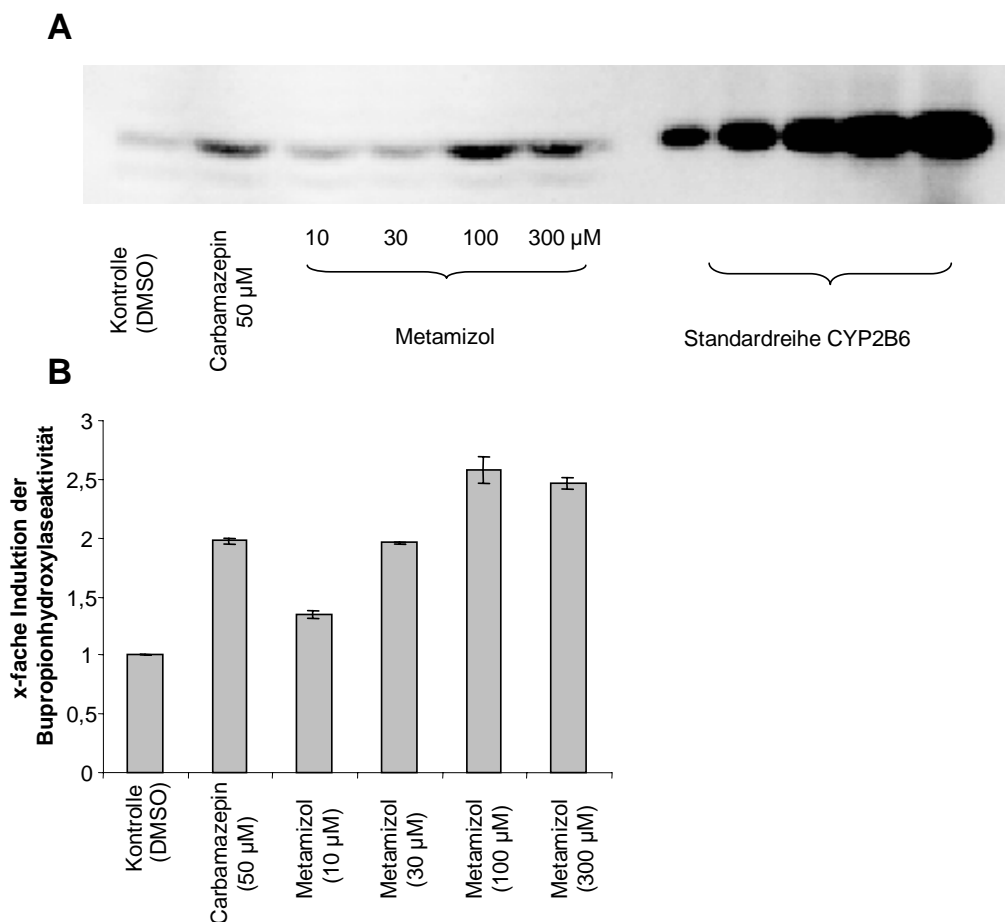
Die Patienten, die den Koronardilatator ISDN einnahmen, wiesen eine signifikant erniedrigte CYP2B6-Expression und Bupropionhydroxylaseaktivität auf. Die Patienten, die das Analgetikum Metamizol oder Antikonvulsivum Carbamazepin einnahmen, hatten dagegen eine 2,6fach bzw. 6,6fach erhöhte CYP2B6-Expression und 3,3fach bzw. 5,3fach erhöhte Bupropionhydroxylaseaktivität (siehe Abb. 56).



**Abb. 56:** Mikrosomaler CYP2B6-Apoproteingehalt (A) und mikrosomale Bupropionhydroxylaseaktivität (B) humaner Lebermikrosomen von Patienten, die präoperativ keine Medikamente (Kontrollen), Metamizol und Carbamazepin eingenommen haben (Statistik: t-Test).

Um zu untersuchen, ob diese Beobachtung in humanen Lebermikrosomen tatsächlich einer Enzyminduktion zugrunde liegt, wurde der Einfluss von Metamizol und des bereits als CYP2B6-Induktor bekannten Antiepileptikums Carbamazepin auf die CYP2B6-Expression und –Funktion humaner Hepatozyten untersucht. Dazu wurden humane Hepatozyten für jeweils drei Tage mit Carbamazepin bzw. steigenden Konzentrationen von Metamizol behandelt und die Expression und Funktion von CYP2B6 im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle analysiert.

Der in Abb. 57a exemplarisch dargestellte Western Blot zeigt eine durch Carbamazepin und Metamizol verursachte Erhöhung der CYP2B6-Apopteinexpression. Diese erhöhte Proteinexpression konnte auch auf Ebene der Bupropionhydroxylaseaktivität gezeigt werden (Abb. 57b). Der maximale induktive Effekt von Metamizol schien bei einer Konzentration von 100 µM erreicht zu sein.



**Abb. 57:** (A) CYP2B6-Apopteinexpression vom Lysat humaner Hepatozyten (40 µg) und (B) Bupropionhydroxylaseaktivität im Medienüberstand humaner Hepatozyten, die über 72 h mit den entsprechend gekennzeichneten Arzneistoffen behandelt wurden.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Expression und enzymatische Funktion von CYP2B6 in humanen Leberproben

Voraussetzung dieser Arbeit war zunächst die Auswahl eines geeigneten CYP2B6-Substrates, um die Enzymaktivität von CYP2B6 in humanen Lebermikrosomen bestimmen zu können. S-Mephenytoin war bereits 1996 von Heyn et al. als erstes selektives Substrat für CYP2B6 beschrieben worden, von Ko et al. (1998) war die Selektivität jedoch unter Hinweis auf eine Beteiligung des CYP2C9 bezweifelt worden. Zu Beginn dieser Arbeit hatten dann Hesse et al. (2000) die Bupropion-Hydroxylierung als eine für CYP2B6 sehr spezifische Biotransformation vorgeschlagen. Es war daher unumgänglich, die beiden Substrate hinsichtlich ihrer CYP-Selektivität zu vergleichen. Hierzu konnte einerseits die kommerziell erhältliche Batterie rekombinanter CYP-Enzyme eingesetzt werden, andererseits konnten die an Lebermikrosomen gemessenen Enzymaktivitäten mit der jeweiligen Proteinexpression durch Korrelationsanalyse verglichen werden.

Die von Lang et al. (2001) begonnene Western Blot Quantifizierung des mikrosomalen CYP2B6-Apopteingehalts in Proben der Leberbank wurde auf insgesamt 114 Proben erweitert. Insgesamt ergab sich eine 191fache Variabilität mit Werten von 0,5 bis 95,5 pmol CYP2B6/mg mikrosomales Protein. Der Durchschnittswert aller Proben lag bei  $15,3 \pm 7,7$  pmol/mg. Der durchschnittliche CYP-Gehalt der Leberproben war durch Aufnahme von CO-Differenzspektren an 48 Proben zu  $418 \pm 198$  pmol/mg bestimmt worden. Daraus ergibt sich ein prozentualer Anteil von CYP2B6 am hepatischen mikrosomalen P450 Gesamtgehalt von 3,7 %. Der in dieser bisher umfangreichsten Untersuchung bestimmte Wert liegt damit wesentlich höher als die von Shimada et al. (1994) und Gervot et al. (1999) angegebenen Werte (1 pmol/mg, n=30 bzw. 1,7 pmol/mg, n=48), er ist jedoch vergleichbar zu den Werten von Code et al. (1997; bis 74 pmol/mg, n=17), Ekins et al. (1998; 0,7 – 71,1 pmol/mg, n=19), und Stresser und Kupfer (1999; durchschnittlich 25 pmol/mg, n=28).

Unter den analysierten Leberproben konnte bei jeder Probe CYP2B6-Protein detektiert werden, was bei anderen Arbeiten (Code et al., 1997; Gervot et al., 1999), in denen im Gegensatz zu dieser Arbeit kein monoklonaler Antikörper gegen CYP2B6 oder eine weniger sensitive Detektionsmethode verwendet wurde, nicht der Fall war. Ein Grund für den in der Vergangenheit oder mitunter noch heute unterschätzten CYP2B6-Gehalt in humaner Leber könnten somit Detektionsmethoden mit nicht ausreichender Sensitivität sein.

Die mikrosomale S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität von 118 humanen Lebermikrosomen korrelierte mit dem mittels Western Blot quantifizierten mikrosomalen CYP2B6-Apoprotein mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r_s = 0,58$  (siehe Kapitel 3.2.4.1), einem zwar sehr signifikanten ( $p < 0.0001$ ), jedoch vergleichsweise niedrigen Wert. Die von Ko et al. (1998) vorgeschlagene Inhibition der mikrosomalen CYP2C9-Enzymaktivität mit Sulfaphenazol ergab jedoch keine Verbesserung in der Korrelation. Weitere Untersuchungen mit rekombinanten Cytochrom P450-Enzymen ergaben jedoch, dass nicht nur CYP2C9, sondern auch die Isoenzyme CYP2C19, CYP3A4, CYP2D6 und CYP1A2 die S-Mephenytoin-N-Demethylierung katalysieren. Nicht nur der CYP2C9-Apoproteingehalt, sondern auch der von CYP3A4, welcher in humaner Leber wesentlich höher als der von CYP2B6 ist (Shimada et al., 1994), korrelierte mit der mikrosomalen S-Mephenytoin-N-Demethylierung (Tab.8, Kapitel 3.2.4.2). Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Enzymaktivität von rekombinatem CYP2B6 mit der Substanz S-Mephenytoin charakterisiert werden kann, dieses Substrat aber für Untersuchungen der mikrosomalen CYP2B6-Enzymaktivität in der Leber keine ausreichende Spezifität aufweist.

Zur Untersuchung des von Hesse et al. (2000) als CYP2B6 Substrat vorgeschlagenen Bupropions, einem auch als Raucherentwöhnungsmittel verwendeten Antidepressivums, wurde auf der Basis stabil isopenmarkierter Standards eine LC-MS-Methode etabliert. Der Metabolit Hydroxybupropion konnte damit in mikrosomalen Inkubationen bis 1 ng/ml quantifiziert werden. Die Korrelation zwischen dem mikrosomalem CYP2B6-Apoproteingehalt und der Bupropionhydroxylaseaktivität war im Vergleich zur S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität besser und betrug  $r_s = 0,68$  (siehe Kapitel 3.3.2.1). Bei Inkubationen mit rekombinatem CYP3A4 und CYP2E1 wurde eine minimale Bupropionhydroxylaseaktivität gefunden, die bei einer Bupropionkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  jedoch 79 bzw. 218fach niedriger war als die von CYP2B6. Faucette et al. (2001) konnten eine CYP3A4-abhängige Bupropionhydroxylierung erst ab einer Substratkonzentration von 4 mM feststellen, was sich höchstwahrscheinlich durch die dort verwendete, 10fach weniger sensitive Methode erklären lässt. Zwischen dem in unserer Leberbank bestimmten CYP3A4-Apoproteingehalt (Wolbold et al., 2003) und der Bupropionhydroxylaseaktivität humaner Lebermikrosomen bestand wie bei Faucette et al. (2001) keine Korrelation. Bupropion stellte sich damit als selektives Substrat dar, anhand dessen die Enzymaktivität von CYP2B6 in humanen Lebermikrosomen zuverlässiger zu ermitteln ist als mit S-Mephenytoin.

95 % der Ausgangssubstanz Bupropion wird im Menschen in metabolisierter Form ausgeschieden. Nach der Gabe einer 150 mg Tablette Bupropion wurde eine maximale Plasmakonzentration  $C_{\text{max}}$  des Hauptmetaboliten Hydroxybupropion von

0,6 µM beschrieben (Hsyn et al., 1997). Bei dieser Konzentration würde CYP2B6 auch in-vivo das Enzym sein, das den größten Anteil an der Metabolisierung von Bupropion ausmacht.

#### **4.2 Untersuchungen zum Einfluss des CYP2B6-Genotyps auf die Expression und Funktion**

Der Einfluss der von Lang et al. (2001) entdeckten und häufig vorkommenden Mutationen \*2, \*4, \*5 und \*6 im *CYP2B6*-Gen auf die Expression und Enzymaktivität von CYP2B6 wurde an einer größeren Zahl von Leberproben und mit dem neu zur Verfügung stehenden Substrat Bupropion weiter untersucht (siehe Kapitel 3.4).

Die CYP2B6-Apoproteinexpression war bei Trägern des \*1/\*5-Genotyps signifikant erniedrigt. Unter den analysierten Leberproben kam die \*5-Variante nur einmal in homozygoter Form vor und wurde daher nicht in die weiteren Analysen eingeschlossen. Die *CYP2B6*-Genotypen \*1/\*4, \*2/\*6, \*5/\*6 und \*6/\*6 hatten ebenfalls eine signifikant erniedrigte Expression im Vergleich zum Wildtyp. Unter Ausschluss der beiden durch präoperative Einnahme von Carbamazepin induzierten Leberproben war auch bei den Genotypen \*1/\*2 und \*1/\*6 eine signifikante erniedrigte CYP2B6-Apoproteinexpression zu erkennen. Auf Ebene der Bupropionhydroxylaseaktivität zeigten die Genotypen \*1/\*4, \*1/\*5, \*1/\*6 signifikant erniedrigte Enzymaktivitäten. Die ebenfalls reduzierten Bupropionhydroxylaseaktivitäten der Lebermikrosomen mit den Genotypen \*1/\*2, \*5/\*6 und \*6/\*6 waren gegenüber der Wildtypgruppe nicht signifikant erniedrigt, was durch die teilweise geringen Probenzahlen bedingt sein könnte.

Die CYP2B6-Varianten wurden auch rekombinant nach Baculovirus/Insektenzell-Expression weiter charakterisiert. Die Varianten CYP2B6.3, CYP2B6.4, CYP2B6.5 und CYP2B6.6 exprimierten weniger CYP2B6-Apoprotein als der Wildtyp. Die CYP2B6.2-Variante exprimierte jedoch unter Berücksichtigung der Transfektionseffizienz mehr Apoprotein als der Wildtyp. Bezogen auf funktionelles P450 hatten die Varianten mit den Genotypen \*2, \*3 und \*6 eine geringere Enzymaktivität als der Wildtyp. Die spezifische Enzymaktivität der CYP2B6.4-Variante war hingegen um 23 % erhöht. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Aminosäureaustausche selbst für diese Effekte verantwortlich sind, d.h. eventuell im Kopplungsungleichgewicht vorliegende Promotorpolymorphismen nicht zur Erklärung herangezogen werden müssen.

Seit der durch Lang et al. (2001) erfolgten Erstbeschreibung der CYP2B6 Polymorphismen wurden diese auch von anderen Arbeitsgruppen im Hinblick auf ihre



Relevanz für die Biotransformation verschiedener klinisch relevanter Substrate untersucht, die im folgenden dargestellt seien:

Die verschiedenen CYP2B6-Varianten CYP2B6.2, CYP2B6.3, CYP2B6.4, CYP2B6.5, CYP2B6.6 und CYP2B6.7 wurden von Jinno et al. (2003) in COS-1 Zellen exprimiert und hatten im Vergleich zum Wildtyp (CYP2B6.1) eine erniedrigte CYP2B6-Apoproteinexpression. Im Gegensatz dazu waren aber die spezifischen CYP2B6-Enzymaktivitäten, welche durch die 7-Ethoxy-4-Trifluoromethylcoumarin-O-Deethylierung charakterisiert wurden, bei allen Varianten im Vergleich zum Wildtyp erhöht. Die Ergebnisse dieser Arbeit müssen jedoch kritisch betrachtet werden, da eine unterschiedliche Transfektionseffizienz der Varianten nicht ausgeschlossen werden kann und die spezifische CYP2B6-Enzymaktivität auf die CYP2B6-Apoproteinmenge und nicht auf funktionelles P450 normiert war.

Miksys et al. (2003) fanden in Gehirnen von Trägern des \*5-Genotyps eine signifikant erniedrigte CYP2B6-Apoproteinexpression. Die Autoren stellten in ihrer Arbeit die weitergehende Hypothese auf, dass CYP2B6 Mutationen mit einem geringeren Nikotinmetabolismus im Gehirn einhergehen und damit zu einer stärkeren Toleranzentwicklung führen könnten. In der Tat konnten Lerman et al. (2002) zeigen, dass Individuen, die Träger der \*5-Mutation waren, bei einer Nikotinentwöhnung stärkeres Verlangen nach Zigaretten hatten und eine geringere Abstinenzrate zeigten.

Xie et al. (2003) untersuchten den Einfluss der \*5 und \*6-Mutation an 67 humanen Lebermikrosomen und entdeckten einen Trend zu erniedrigter Expression und Cyclophosphamidhydroxylaseaktivität bei Trägern der \*6-Mutation. Sie stellten zwar erhöhte spezifische Cyclophosphamidhydroxylaseaktivitäten bei Trägern der \*6-Mutation fest, diese könnten allerdings ebenso das Ergebnis eines proportional höheren Anteils der Enzymaktivität von anderen Cytochrom P450 Enzymen sein, die an der Hydroxylierung von Cyclophosphamid bekanntermaßen beteiligt sind (Roy et al., 1999).

Hesse et al. (2004), untersuchten den Einfluss verschiedener Promotormutationen, die zusammen mit den in den Allelen \*4, \*5 und \*6 im kodierenden Bereich vorliegenden Mutationen gekoppelt vorkommen, auf die CYP2B6-Expression und Funktion und berücksichtigten außerdem andere Faktoren wie Geschlecht, Nikotin- oder Alkoholenuss. Sie stellten einen markanten Einfluss des \*6 Alleles speziell bei Individuen mit hohem Alkoholkonsum fest.

Kirchheiner et al. (2003) untersuchten die Pharmakokinetik von Bupropion und Hydroxybupropion in Abhängigkeit von genetischen Polymorphismen und konnten zeigen, dass Probanden, die Träger der \*4-Mutation waren, eine 1,66fach erhöhte Bupropionclearance im Vergleich zu den Trägern des Wildtypallels hatten. Entsprechend konnte für die CYP2B6.6-Variante von Tsuchiya et al. (2004) in einer

Studie bei 35 HIV-Patienten gezeigt werden, dass die homozygoten Träger der \*6-Mutation signifikant erhöhte Plasmaspiegel des Reverse-Transkriptase-Hemmers Efavirenz hatten, welcher durch CYP2B6 metabolisiert wird.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hier dargestellten Ergebnisse zu den CYP2B6 Varianten \*2 bis \*6 im Wesentlichen reproduziert wurden, dass sich aber in diesen Studien teils interessante Indizien auf zusätzliche Faktoren ergaben, die eine Rolle spielen könnten, insbesondere eine mögliche Interaktion zwischen Genotyp und Alkoholgenuss sowie eine eventuelle Substratabhängigkeit der funktionellen Konsequenzen der Polymorphismen.

Anhand einer strukturbezogenen Analyse der einzelnen betroffenen Aminosäure-Positionen soll im Folgenden versucht werden, die funktionellen Effekte der neu beobachteten Mutationen (Lang et al., 2004) zu rationalisieren. Die am weitesten N-terminal beobachteten Aminosäureaustausche Q21L und R22C hatten im Vergleich zum Wildtyp keine veränderten Eigenschaften. Position 22 ist wahrscheinlich in der Membran verankert (Williams et al., 2000) und von einigen positiv geladenen Aminosäuren am C-terminalen Ende der Transmembrandomäne wird angenommen, dass sie das Transfersignal stoppen können (Sakaguchi et al., 1987). Die beiden Aminosäuren an Position 21 und 22 sind bei den Cytochrom P450 Enzymen jedoch nicht stark konserviert und spielen in diesem Zusammenhang wahrscheinlich keine kritische Rolle. Der A136G Austausch in Exon 1 wurde mit einer Häufigkeit von 0,8 % beobachtet. In COS-1 Zellen wurde die entsprechende Proteinvariante CYP2B6.11 zu weniger als 20 % im Vergleich zum Wildtyp exprimiert, wobei das restliche Protein nahezu komplett enzymatisch inaktiv war. Diese Beobachtung war in Übereinstimmung mit den Messungen in humanen Lebermikrosomen, bei denen zwei heterozygote Träger des \*11-Allels eine um 50 % reduzierte Enzymaktivität im Vergleich zur Wildtypgruppe hatten. Strukturell ist Position 46 vermutlich einer Membranverankerungsregion zuzuordnen, welche zwischen einer prolinreichen Sequenz und der Helix A liegt (Williams et al., 2000). Es ist nicht ohne weiteres verständlich, wie dieser konservative Aminosäureaustausch die Expression und Funktion so dramatisch verändern konnte. Von spektralen Analysen in Insektenzellmembranen kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Variante noch gebundenes Häm enthält und möglicherweise eine Enzymaktivität mit anderen Substraten zeigt.

Die \*12-Mutation in Exon 2 führt zu dem nichtkonservativen Aminosäureaustausch G99E. Das Protein wurde zu weniger als 10 % verglichen mit dem Wildtyp exprimiert und zeigte weniger als 1 % Enzymaktivität. Obwohl in Insektenzellen eine höhere Expression erreicht wurde, waren weder funktionelles P450, noch Enzymaktivität detektierbar, was darauf hinweist, dass dieser Aminosäureaustausch mit einer nicht

korrekten Faltung einhergeht und den Einbau von Häm verhindert. Auch in humanen Lebermikrosomen waren Proteingehalt und Enzymaktivität sehr niedrig. Strukturell ist Position 99 inmitten des Loops zwischen Helices B und C lokalisiert, welcher die Substraterkennungssequenz beinhaltet.

Die Proteinvariante K139E wurde bereits von Lamba et al. (2003) als CYP2B6.8-Variante beschrieben. Rekombinante Expression führte zu keinem detektierbaren CYP2B6-Apoprotein. Auch die Lebermikrosomen mit dem \*8-Allel hatten eine viel niedrigere Enzymaktivität als der homozygote Wildtyp. Strukturell ist Position 139 in einem kurzem Loop zwischen den Helices C und D lokalisiert, wobei die Aminosäure K139 in der CYP2 Familie hoch konserviert ist. In den hier untersuchten Leberproben wurde K139E im Gegensatz zu Lamba et al. (2003) nur in Kombination mit Q172H/K262R beobachtet. Wegen des dramatischen Effektes der K139E Mutation kann angenommen werden, dass auch das Allel \*13 mit allen drei Mutationen nichtfunktionell ist.

In direkter Nachbarschaft zur K139E-Variante wurde der Aminosäureaustausch R140Q in einer Leberprobe mit einer sehr niedrigen Enzymaktivität gefunden. Diese Leberprobe war aber an verschiedenen Positionen für einige andere Mutationen heterozygot, und kann deshalb durchaus mit anderen gekoppelt sein.

Da CYP2B3 der Ratte und CYP2E1 in mehreren Spezies auch ein Glutamin enthalten, könnte diese Mutation funktionell tolerabel sein. Die Variante konnte in COS-1 Zellen und in Insektenzellen gut exprimiert werden und zeigte ein normales CO-Differenzspektrum. Die Enzymaktivität entsprach aber nur 20 % der Wildtyp-Enzymaktivität. In einigen Arbeiten wurde beschrieben, dass positiv geladene Aminosäuren für die Interaktion mit Cytochrom b5 und der NADPH:P450-Oxidoreduktase von Bedeutung sind. So wurde von Shen et al. (1992) beobachtet, dass eine chemische Modifikation der Aminosäure Lysin an vier Positionen bei CYP1A1 der Ratte zu einer drastisch reduzierten Interaktion von P450 mit der NADPH:P450-Oxidoreduktase führte. Für die CYP2B6 Variante R140Q konnte gezeigt werden, dass der Austausch der Aminosäure Arginin den Elektronentransfer durch die NADPH:P450-Oxidoreduktase beeinflusst, denn unter Umgehung dieser NADPH-vermittelten Katalyse durch Cumolhydroperoxid konnte eine normaler, mit dem Wildtyp vergleichbarer Substratumsatz beobachtet werden (siehe Kapitel 3.6). Eine ähnliche Beobachtung wurde auch von Crespi et al. (1997) bei der CYP2B6.2-Variante R144C des CYP2C9 gemacht, aus der auf eine verringerte Interaktion mit der NADPH:P450-Oxidoreduktase geschlossen wurde.

Die unter den seltenen Mutationen auftretende \*15-Mutation T1172A wurde mit einer Allelhäufigkeit von 1,3 % gefunden. In humanen Leberproben konnte der Genotyp \*1/\*15 mit einer signifikant verringerten CYP2B6-Proteinexpression und Enzymaktivität assoziiert werden. Diese Variante zeigte weder in COS-1 Zellen noch

in Insektenzellen eine Enzymaktivität, obwohl in COS-1 Zellen eine geringe Apoproteinmenge detektierbar war. Die Position I391N ist unter den P450 Enzymen nicht stark konserviert und liegt strukturell zwischen der Helix K und der Häm-bindenden Region. Bis heute konnte ihr aber noch keine kritische Funktion zugeordnet werden.

Für einige andere Cytochrom P450-Enzymgene sind sog. Null-Allele bekannt. Die am besten untersuchten Beispiele sind die polymorphen *CYP2D6* und *CYP2C19* Gene, bei denen homozygote Träger in der Bevölkerung mit einer Häufigkeit von 7 bis 10 bzw. 3 bis 5 % vorkommen (Meyer und Zanger, 1997). Auch für *CYP2A6* und *CYP1B1* wurden Nullallele beschrieben, welche beim *CYP1B1* zum Glaukom und in den anderen Fällen eher mit pharmakokinetischen als mit klinischen Phänotypen assoziiert sind.

Die hier untersuchten neuentdeckten Allele des *CYP2B6* Gens, die in rekombinanter Form zu einer fehlenden *CYP2B6*-Expression und/ oder einer sehr geringen Aktivität führten, kommen zusammen zu 5,2 % in der normalen kaukasischen Population vor (Lang et al., 2004). Um ihren Einfluss in klinischen Studien in- vivo zu untersuchen, wäre ein Probandenscreening von einigen hundert Personen notwendig. Dies ist zwar durchführbar, aber mit erheblichem Aufwand verbunden. Dennoch zeigen die Untersuchungen an humanen Lebermikrosomen, dass auch heterozygote Träger einer dieser seltenen Mutationen signifikant reduzierte Enzymaktivitäten haben.

### 4.3 Einfluss von Cytochrom b5 auf die CYP2B6- Enzymaktivität

Cytochrom b5 kann die Enzymaktivität einiger Cytochrom P450-Enzyme substratabhängig modulieren (Porter, 2002). Für S-Mephenytoin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Cytochrom b5 auf die CYP3A4-abhängige S-Mephenytoin-N-Demethylierung einen großen Einfluss hat. Die im Vergleich zu CYP2B6 fast zu vernachlässigende Aktivität von CYP3A4 wurde durch Cytochrom b5 um das 20fache erhöht und überstieg damit die des CYP2B6. Eine wichtige, aber bisher wenig untersuchte Fragestellung betrifft die Variabilität des Cytochroms b5 und den sich daraus ergebenden Einfluss auf die mikrosomale Biotransformationsaktivität der P450 Enzyme. Die Cytochrom b5-Expression variierte in humanen Lebermikrosomen 36fach. Die mittels Immunoblot quantifizierte mediane Expression lag mit 698 pmol/mg mikrosomales Protein etwa 70 % höher als der gesamte P450- Gehalt und überstieg z.B. den Apoproteingehalt von CYP2B6 um das 59fache.

Die beobachtete Korrelation der S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität mit dem Apoproteingehalt von CYP3A4 und Cytochrom b5 deutet auf eine b5-abhängige Beteiligung des CYP3A4 an der mikrosomalen S-Mephenytoin-N-Demethylierung hin (siehe Kapitel 3.5.4).

Wie die Expression von Cytochrom P450-Enzymen kann auch die von Cytochrom b5 durch Arzneistoffe wie Griseofulvin (Denk et al., 1977) sowie durch andere regulatorische Signale beeinflusst werden. So wurde schon 1980 von Hoch et al. beschrieben, dass der mikrosomale Cytochrom b5 Gehalt bei Hypothyreose erhöht ist. Da Patienten mit dieser Diagnose eine entsprechende Medikation bekamen, lies sich der Einfluss auf die mikrosomale CYP2B6- Aktivität in dieser Arbeit nicht analysieren. Eine Reduktion des mikrosomalen Cytochrom b5-Gehaltes durch Alkohol wurde im Hamster beobachtet (DeMarco et al., 1985; McCoy et al., 1985). Die Expression von Cytochrom b5 war bei Alkoholkonsumenten, die keine Medikamente einnahmen, tatsächlich um 55 % reduziert ( $p < 0,05$ ). Diese Reduktion der Cytochrom b5-Expression könnte sich daher auch auf Cytochrom b5-sensitive mikrosomale Enzymaktivitäten auswirken. So war die Bupropionhydroxylaseaktivität bei Alkoholkonsumenten gegenüber den Nicht-Alkoholkonsumenten um 43,1 % erniedrigt. Im Gegensatz dazu fanden Hesse et al. (2004) signifikant erhöhte mikrosomale CYP2B6-Apoproteingehalte und Bupropionhydroxylaseaktivitäten bei Alkoholikern. Diese gegenteiligen Erkenntnisse könnten darauf beruhen, dass bei Hesse et al. (2004) der Medikamentenkonsum nicht ausgeschlossen worden ist. Zum anderen war die Anzahl der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Patientenproben der Alkoholkonsumenten, die keine Medikamente einnahmen sehr niedrig ( $n=6$ ). Auch haben die Mutationen im *CYP2B6*- Gen dieser Patienten einen Einfluss, da die

Hälfte der Alkoholkonsumenten Träger des \*1/\*5-Genotyps waren, der wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, zu einer Reduktion der CYP2B6-Expression und Funktion führt. Daten eines größeren Patientenkollektivs oder in-vivo Studien an Patienten könnten daher aufschlussreichere Daten liefern.

Epstein et al. haben 1989 beschrieben, dass eine Proteinkinase-abhängige Phosphorylierung von Cytochrom P450 durch Cytochrom b5 gehemmt wird und die Substraterkennungssequenz für die Proteinkinase daher auch eine wichtige Sequenz für die Interaktion zwischen Cytochrom b5 und Cytochrom P450 sein muss. Einige Studien lassen vermuten, dass elektrostatische Kontakte bei der Cytochrom P450-Cytochrom b5-Interaktion durch basische Aminosäuren wichtig sind. So deuten Sequenzvergleiche von CYP2B1 und CYP2E1 der Ratte darauf hin, dass die Aminosäure Arginin bei der Interaktion mit Cytochrom b5 involviert ist (Omata et al., 1994). Yoshiaki et al. (1994) konnten durch Hemmung der Cytochrom b5-Interaktion mit CYP2B1 der Ratte durch synthetische Peptide zeigen, dass die Aminosäuren Lysin-122 und Arginin-125 entscheidend für die Cytochrom b5-Interaktion mit CYP2B1 sind. Bislang ist nicht bekannt, wie entscheidend die C-terminalen Aminosäuren von Cytochrom P450-Enzymen für die Interaktion mit Cytochrom b5 sind. Bei einem äquimolaren Verhältnis von CYP2B6 und Cytochrom b5 konnte hier gezeigt werden, dass die Bupropionhydroxylaseaktivität beim CYP2B6-Wildtyp um 135 % erhöht war. Bei der R487C Variante unterschied sich die Aktivierbarkeit durch Cytochrom b5 signifikant vom Wildtyp. Bei dieser Variante (CYP2B6.5) wurde die Bupropionhydroxylaseaktivität nur um 33 % erhöht. Bei einem Sequenzvergleich von CYP2B6 mit anderen Cytochrom P450-Enzymen (Abb. 58) fällt jedoch auf, dass bei anderen Cytochrom P450-Enzymen welche auch durch Cytochrom b5 aktivierbar sind, ein Cystein an der entsprechenden Position vorhanden ist. Da CYP2B6 aber das einzige Enzym ist, bei dem an dieser Position ein Arginin vorhanden ist, könnte dieses für die Interaktion zwischen Cytochrom b5 und CYP2B6 relevant sein.

```

2C9  LQNF-NLKSLVDPKNLDTTPVVNGFASVPPFYQLCFI-PV*-----
2C19 LQNF-NLKSLIDPKDLDTTFVVNGFASVPPFYQLCFI-PV*-----
2C18 LQNF-NLKSQVDPKDIDITPLPMHLVGVPPPLYQLCFI-PV*-----
2C8  LQNF-NLKSVDLKNLNTTAVTKGIVSLPPSYQICFI-PV*-----
2E1  LQHF-NLKPLVDPKDIDLSPIHIGFGCIPPRYKLCVI-PRS*-----
2B6  LQNF-SMASPVAPEDIDLTPQECGVGKIPPTYQIRFL-PR*-----
2A6  MQNF-RLKSSQSPKDIDVSPKHVGFATIPRNYTMSFL-PR*-----
2D6  LQHF-SFSVPTG-QPRPSHHGVFAFLVSPSPYELCAV-PR*-----
1A1  LQRV-EFSVPLG-VKVDMTPIYGLTMKHACCEHFQMQ-LRS*-----
1A2  LQQL-EFSVPPG-VKVDLTPYIYGLTMKHARCEHVQAR-LRFSIN*-----
3A4  LQNF-SFKPCKE-TQIPLKLSLGGLLQ-PEKPVVLKVESRDGTVSGA*-----
3A5  LQNF-SFKPCKE-TQIPLKLDLDTQGLLQ-PEKPIVLKVDSDGTVLSGE*-----

```

**Abb. 58:** Alignment des C-terminalen Endes einiger humanen Cytochrom P450 Enzyme (aus: <http://drnelson.utmem.edu/humP450.aln.html>).

#### **4.4 Untersuchungen zum Einfluss der NADPH:P450-Oxidoreduktase auf die Bupropionhydroxylaseaktivität**

Die Enzymaktivität der NADPH:P450-Oxidoreduktase in humanen Lebermikrosomen variierte fünffach. Diese im Vergleich zu den P450 Enzymen relative geringe Variabilität kann sowohl durch endogene Faktoren wie dem Thyroidhormonspiegel (Ram et al., 1992), als auch durch Arzneistoffe (Induktion) verursacht sein. Polymorphismen der Oxidoreduktase sind bis heute nicht bekannt. Die Enzymaktivität der NADPH:P450-Oxidoreduktase unterschied sich nicht zwischen Männern und Frauen. Auch der Konsum von Alkohol hatte keinen signifikanten Einfluss. Patienten, die keine Arzneimittel konsumierten und rauchten hatten jedoch eine um 16 % verringerte NADPH:P450-Oxidoreduktase-Aktivität gegenüber Nichtrauchern, die ebenfalls keine Arzneimittel einnahmen ( $p < 0,05$ ).

In humanen Lebermikrosomen werden die Cytochrom P450 Enzyme in einem ungefähr vierfach molaren Überschuss zur NADPH:P450-Oxidoreduktase exprimiert (Forrester et al., 1992). Da die NADPH:P450-Oxidoreduktase für die katalytische Aktivität der Cytochrom P450 Enzyme notwendig ist, kann diese durch eine limitierte NADPH:P450-Oxidoreduktase-Aktivität oder durch Konkurrenz einzelner Cytochrom P450 Enzyme um die NADPH:P450-Oxidoreduktase verringert sein (Miwa et al., 1978, Li et al., 1998).

CYP3A4 wird zu einem höheren Anteil in humaner Leber exprimiert als CYP2B6. Die durch CYP3A4 katalysierte Metabolisierung hängt damit zu einem größeren Ausmaß von der NADPH:P450-Oxidoreduktaseaktivität ab als z.B. durch CYP2B6 katalysierte Reaktionen. So ist zwischen der S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität und der NADPH:P450-Oxidoreduktase-Aktivität eine deutlichere Abhängigkeit zu erkennen, als zwischen der Bupropionhydroxylaseaktivität und der NADPH:P450-Oxidoreduktase-Aktivität (siehe Kapitel 3.6).

#### **4.5 Untersuchungen zum Einfluss biologischer Faktoren auf die Expression und Funktion von CYP2B6**

Die in die Analysen eingeschlossenen Proben stammten ausschließlich von histologisch normalem Lebergewebe aus der Umgebung von chirurgisch entferntem Gewebe, welches auf Grund von Lebertumoren, Metastasen oder anderen Gründen entfernt wurde. Krankheiten wie Leberzirrhose, virale Hepatitis und Hepatome reduzieren in der Regel die Fähigkeit der Leber, Arzneimittel zu metabolisieren. Die Ursachen dafür können eine verringerte Enzymaktivität in der Leber, ein veränderter hepatischer Blutfluss und Hypoalbuminämie mit einer niedrigeren Plasmabindung der

Arzneistoffe sein. Aus diesen Gründen sind Proben von Patienten mit einer viralen Hepatitis und Leberzirrhosen von den Analysen ausgeschlossen worden.

Die Clearance einiger Arzneistoffe wie Midazolam, Theophyllin, Phenytoin und Carbamazepin ist bei Kindern im Vergleich zu Erwachsenen erhöht (Hughes et al., 1996; Ellis et al., 1976; Summers and Summers 1989). Mögliche Ursachen einer erhöhten intrinsischen hepatischen Clearance bei Kindern könnte ein auf das Körpergewicht normalisiertes und erhöhtes Lebervolumen, oder eine höhere Konzentration an katalytisch aktiven Cytochrom P450 Enzymen sein.

Eine altersabhängige Analyse der CYP2B6-Expression und Enzymaktivität erwies sich als schwierig, da das mittlere Alter der Patienten, von denen die Leberproben stammten, 58 Jahre war und nur 1,6 % dieser Patienten unter 10 Jahre alt waren. Die Mehrzahl der Patienten war zwischen 60 und 70 Jahre alt. Unter Einschluss aller Proben war keine Altersabhängigkeit der Expression und Enzymaktivität von CYP2B6 zu beobachten. Da eine Medikamenteneinnahme die Expression und Funktion von CYP2B6 verändern kann, wurden zusätzlich Patientenproben ohne präoperative Medikation untersucht. In dieser Gruppe waren Patienten, die unter 10 Jahre alt waren mit 5,1 % zu einem höheren Anteil vertreten. Nun war zu erkennen, dass eine geringere CYP2B6- Expression mit einem höheren Alter einhergeht. Um zusätzlich genetische Einflüsse, die einen Einfluss auf die CYP2B6 Expression und Bupropionhydroxylaseaktivität haben, auszuschließen, wurden in einer weiteren Subgruppe nur Patientenproben ohne präoperative Medikation und ohne Mutation im kodierenden Bereich des CYP2B6-Gens analysiert. Nun war eine deutliche negative Korrelation zwischen dem Alter und der Expression und Funktion von CYP2B6 zu erkennen (siehe Kapitel 3.7.1).

In pharmakokinetischen Studien zum Bupropionmetabolismus (Sweet et al., 1995) war die Clearance von Bupropion bei älteren Patienten um ca. 20 % im Vergleich zu jüngeren Patienten verringert. Da Daten aus klinischen Studien bei Kindern sehr limitiert sind, gibt es in Bezug auf CYP2B6 keine Daten. Tateishi et al. (1997) haben eine Expression von CYP2B6 jedoch erst im frühen Kindesalter feststellen können. Dieser Befund könnte eine entscheidenden Rolle beim Metabolismus von Propofol spielen, welches ein sehr gebräuchliches Anästhetikum zur Sedierung im Rahmen einer Intensivbehandlung ist. 4,2 % aller unerwünschten Arzneimittelwirkungen unter Propofol waren im Jahre 2003 auf Rhamdomyolysen zurückzuführen, für die Kinder besonders anfällig sind (Wooltorton, 2002). Aus diesem Grunde ist Propofol in Deutschland zur Sedierung im Rahmen einer Intensivbehandlung erst für Kinder ab drei Jahren zugelassen.



9 % aller hospitalisierten Kinder hatten therapiebezogene unerwünschte Arzneimittelwirkungen (Impicciatore et al., 2001) und 11 bis 30 % aller Neugeborenen in der Intensivbetreuung erleiden eine arzneimittelbezogene Toxizität (Bonati et al., 1990; Banner et al., 1986). Aus diesen Gründen ist eine altersabhängige Analyse von arzneistoffmetabolisierenden Enzymen von hoher Relevanz.

Ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Wirkung von Arzneimitteln wurde bei Ratten bereits 1932 von Nicholas und Barron beobachtet. Männer und Frauen unterscheiden sich in physiologischen Parametern wie Körpergewicht, Muskelmasse und Fettanteil, was zu unterschiedlichen Verteilungsvolumina und damit zu einer veränderten Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Arzneimitteln führen kann. Aber selbst unter Berücksichtigung dieser Parameter bleiben die beobachteten Geschlechtsunterschiede bestehen. Beim Menschen ist bekannt, dass Frauen für viele Arzneistoffe wie Cyclosporin (Kahan et al., 1986) und Diazepam (Greenblatt et al., 1980) eine höhere Clearance als Männer haben. In dieser Arbeit konnte für die Expression und Enzymaktivität von CYP2B6 kein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen gefunden werden.

Wolbold et al. (2003) konnten kürzlich zeigen, dass die Expression und der CYP3A4-abhängige Metabolismus von Verapamil bei Frauen im Vergleich zu Männern signifikant erhöht ist. Die in dieser Arbeit untersuchten Lebermikrosomen waren teilweise mit denen von Wolbold et al. (2003) identisch und die geschlechtsabhängige Expression von CYP3A4 ließ sich auch mit in dieser Arbeit verwendeten Leberproben bestätigen. In einer Arbeit von Hesse et al. (2004), in der die Expression von CYP2B6 und die Bupropionhydroxylaseaktivität in humanen Lebermikrosomen untersucht wurde, konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen Männern und Frauen beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu haben Lamba et al. (2003) eine 1,6fach erhöhte CYP2B6-Expression und 1,7fach erhöhte S-Mephenytoin-N-Demethylaseaktivität bei Frauen im Vergleich zu Männern gefunden. Dort wurden verschiedene ethnische Gruppen analysiert und die höhere Expression bei Lebern hispanischen Ursprungs konnte auch von Parkinson et al. (2004) bestätigt werden, die eine zweifach erhöhte Expression von CYP2B6 bei dieser ethnischen Gruppe im Vergleich zu Kaukasiern und Afro- Amerikanern fanden. Wurden nur die Proben kaukasischen Ursprungs analysiert, war die Expression und Funktion von CYP2B6 bei Frauen nur 1,4fach erhöht.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, ist S-Mephenytoin nicht geeignet um die spezifische Enzymaktivität von CYP2B6 zu charakterisieren und die von Lamba et al. (2003) gefundene höhere Enzymaktivität könnte auch durch den bei Frauen erhöhten CYP3A4-Anteil bedingt sein. Zusätzlich wurde in der Arbeit von Lamba et al. eine Medikamenteneinnahme der Leberspender nicht berücksichtigt. Des weiteren stammten die Proben von Leberspendern, die häufig durch Unfälle, Drogenmissbrauch und Suizid zu Tode kamen. Diese Patienten sind in der Regel jünger als die Patienten in der hier vorliegenden Arbeit, bei denen Leberoperationen durchgeführt worden sind und es besteht die Möglichkeit, dass die Frauen im Durchschnitt jünger waren als die Männer.

Klinische Daten (Hsyu et al., 1997; DeVane et al., 1990), weisen bis dato auch auf keine Unterschiede des Metabolismus von Bupropion zwischen Männern und Frauen hin. Ausgehend von teilweise widersprüchlichen in-vitro Experimenten kann nicht allgemein für Arzneimittel, die Substrat von CYP2B6 sind, auf die in-vivo Situation geschlossen werden, da am Metabolismus eines Arzneimittels auch mehrere Isoenzyme beteiligt sein können. So ist es von besonderer Bedeutung, dass auch Frauen in die frühen Phasen der klinischen Prüfungen eingeschlossen werden, was die *Food and Drug Administration* (FDA) 1993 für frauenspezifische Themen wie Effekte des Menstruationszyklus, der Menopause, von Östrogenen und oralen Kontrazeptiva (Merkatz et al., 1993) berücksichtigt hat.

## **4.6 Untersuchungen zum Einfluss von Umweltfaktoren auf die Expression und Funktion von CYP2B6**

### **4.6.1 Inhibitoren**

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit betrifft die Entdeckung und ausführliche Charakterisierung irreversibler Inhibitoren des CYP2B6 Isoenzym. Die erste solche Beobachtung wurde mit Thiotepa gemacht, einem Zytostatikum, dem klinisch relevante Arzneimittelinteraktionen zugeschrieben werden. Von Huitema et al. (2000) wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Thiotepa eine signifikante Reduktion der Plasmaspiegel des aktiven Metaboliten des CYP2B6-Substrates Cyclophosphamid verursacht, wenn dieses zuerst appliziert wird. Erste Untersuchungen an Lebermikrosomen der Leberbank ergaben, dass es sich bei Thiotepa tatsächlich um einen spezifischen Inhibitor von CYP2B6 handelte, dessen Mechanismus offensichtlich nicht in einer einfachen kompetitiven Hemmung, sondern in komplizierteren irreversiblen Vorgängen bestand. Während die eigenen Arbeiten dazu im Gange waren, wurde von Rae et al. (2002) die spezifische Inhibition von CYP2B6 durch Thiotepa beschrieben. Die Autoren haben jedoch den Inhibitionsmechanismus nicht ausreichend und korrekt untersucht, sondern ihre Daten als kompetitiven Hemmtyp interpretiert (Rae et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde der irreversible Charakter der Thiotepa-Inhibition zweifelsfrei nachgewiesen (Richter et al., 2005). Es konnte demonstriert werden, dass Thiotepa ein potenter „mechanism-based“ Inhibitor von CYP2B6 ist. Zusätzlich wurden weitere Daten zum Inhibitionsprofil von Thiotepa generiert, z.B. dass zusätzlich zu CYP2B6 auch die Enzymaktivitäten von CYP2A6, CYP2C9 und CYP2E1 durch Thiotepa inhibiert werden. Diese Inhibition war jedoch geringer als 25 %. Im Gegensatz zu Rae et al. (2002) wurde eine 24%ige Inhibition der CYP2C9-Aktivität und eine 17%ige Inhibition der CYP2A6-Aktivität festgestellt. Eine Zerstörung des Häms konnte nicht festgestellt werden, was auf eine irreversible Modifikation des CYP2B6 Polypeptids hinweist. Dies könnte analog zum strukturanalogen Insektizid Parathion verlaufen, welches CYP2B1 der Ratte durch eine Bindung von elementarem Schwefel an ein Cystein des CYP2B1 inhibiert (Halpert et al., 1980). Ng et al. (1991) fanden, dass der Metabolismus von Thiotepa bei der Ratte nach einer Einzeldosis einer biphasischen Kinetik folgt. Beim Menschen sank die in-vivo Clearance von Thiotepa mit steigender Dosierung, was einen sättigbaren Schritt bei der Elimination nahe legen würde (Hussein et al., 1996; Przepiorka et al., 1994).

Da CYP2B6 eines der Thiotepa metabolisierenden Enzyme in humaner Leber darstellt (Jacobson et al., 2002) ist es plausibel, eine „Suizidinhibition“ von CYP2B6 für die sättigende Kinetik anzunehmen.

Aufgrund der irreversiblen Natur der CYP2B6 Inhibition muss erwartet werden, dass eine Wiedererlangung der Enzymaktivität von einer *de-novo* Synthese abhängt. Unterstützend für diese Hypothese ist eine Studie, in der eine simultane Verabreichung von Cyclophosphamid und Thiotepa bei einem Mehrfachinjektions-Plan zu einem subadditiven Effekt geführt hat und die besten Ergebnisse nach einem Verabreichungsintervall der zwei Zytostatika von acht Stunden erzielt wurden (Teicher et al., 1989). Nach derzeitigem Wissen ist die Halbwertszeit von CYP2B6 in humaner Leber nicht bekannt und kann in humanen Hepatozytenkulturen nicht bestimmt werden, da die Expression dieses Enzyms innerhalb weniger Tage drastisch abnimmt. Eine pharmakokinetische Modellierung von Hassan et al. (1999) hat jedoch eine Halbwertszeit von 24 Stunden vorausgesagt.

Cyclophosphamid ist ein bekannter Induktor für CYP2B6 (Martin et al., 2003). Das Ausmaß der CYP2B6 Induktion wurde in einigen Studien durch Messung der 4-Hydroxycyclophosphamid-Plasmaspiegel bestimmt. In zwei ähnlichen Studien konnte demonstriert werden, dass Thiotepa die durch Induktion verursachte Erhöhung der 4-Hydroxycyclophosphamid-Plasmaspiegel aufhebt. Patienten, die nur Cyclophosphamid erhalten haben, hatten eine 54,7%ige Zunahme der AUC-Werte von 4-Hydroxycyclophosphamid von Tag eins bis Tag zwei (Ren et al., 1998), wobei Patienten, die während einer Hochdosismotherapie in Kombination mit Thiotepa und Carboplatin keine Veränderungen der Plasmaspiegel von 4-Hydroxycyclophosphamid zeigten (Hassan et al., 1999).

Eine weitere klinische Auswirkung einer irreversiblen Cytochrom P450 Inhibition kann die Auslösung von immunoallergischen Reaktionen gegen Epitope sein, welche durch die Cytochrom P450-Alkylierung entstanden sind. Eine solche Reaktion konnte für den irreversiblen CYP2C9-Inhibitor Ticrynafen beschrieben werden (Beaune et al., 1987). Einige Patienten, die mit Thiotepa behandelt wurden, entwickelten toxische Hautreaktionen mit Pruritis und Dermatitis (Dimopoulos et al., 1993). Da gezeigt werden konnte, dass CYP2B6 in humaner Haut exprimiert wird (Janmohamed et al., 2001; Yengi et al., 2003), könnten Nebenwirkungen von Thiotepa, die die Haut betreffen, auf einer Alkylierung von CYP2B6 beruhen.

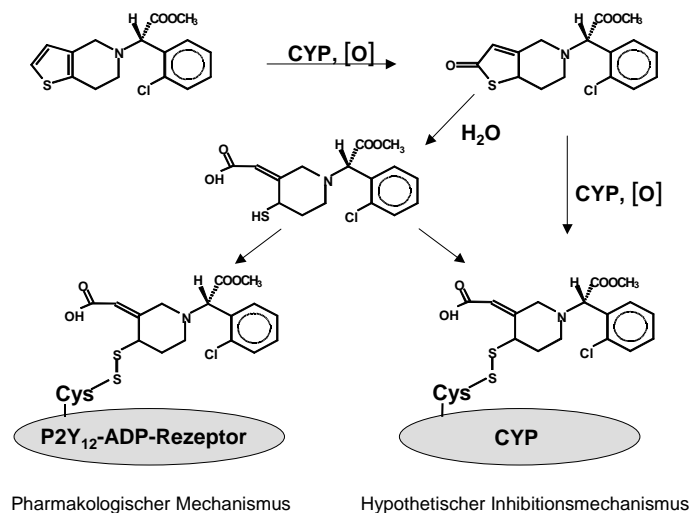
Eine weitere Neuentdeckung dieser Arbeit war die Beobachtung, dass die Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel und Ticlopidin ebenfalls potente irreversible Inhibitoren von CYP2B6 sind (siehe Kapitel 3.8.1.2).

Diese Ergebnisse basierten, ähnlich wie beim oben beschriebenen Thiotepa, auf Experimenten mit humanen Lebermikrosomen und rekombinanten Cytochrom P450 Enzymen. Die Inhibition der Bupropionhydroxylierung durch Clopidogrel und Ticlopidin war zeit- und konzentrationsabhängig, NADPH-abhängig, irreversibel, von Abfangreagenzien für reaktive Sauerstoffspezies und nukleophilen Abfangreagenzien nicht beeinflussbar, durch die Anwesenheit von CYP2B6-Substraten reduzierbar und nicht mit einer Abnahme von spektral detektierbarem P450 assoziiert. Untersuchungen der Inhibitionsprofile der zwei Arzneistoffe beinhalteten die neun Cytochrom P450 Enzyme 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 und 3A4, welche die wichtigsten arzneistoffmetabolisierenden Cytochrom P450 Enzyme in der humanen Leber darstellen. Zusätzlich zu CYP2B6 wurde auch CYP2C19, wenn auch mit geringerer Potenz, durch die zwei Substanzen inhibiert. Von Ha-Duong et al. (2001) wurde bereits die irreversible Hemmung von CYP2C19 beschrieben, aber die noch potentere Inhibition von CYP2B6 wurde nicht beschrieben, da dieses Cytochrom P450 Isoenzym in dieser Studie nicht in die Untersuchungen eingeschlossen wurde. Unterschiede zwischen Clopidogrel und Ticlopidin in Bezug auf die Inhibition wurden nur bei höheren Konzentrationen beobachtet, bei denen Clopidogrel zusätzlich die Enzymaktivität von CYP2C9 und Ticlopidin die von CYP1A2 inhibierte. Diese Inhibitionen waren aber mit unter 50 % weitaus geringer als die Inhibition der Enzymaktivität von CYP2B6, die bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Inhibitor schon zu mehr als 90 % reduziert war. Die zeit- und konzentrationsabhängige Hemmung der Bupropionhydroxylaseaktivität verlief in humanen Lebermikrosomen und CYP2B6 exprimierenden Insektenzellmembranen mit einer fast identischen Charakteristik. Die Inaktivierung erfolgte während der ersten Minuten und nahm danach ab, wahrscheinlich wegen des Verbrauchs des Inhibitors durch Metabolismus oder durch Hydrolyse. Die irreversible und NADPH-abhängige Inhibition konnte durch Dialyseexperimente demonstriert werden. Die Inhibition der Bupropionhydroxylierung war nur in der Gegenwart von NADPH während der Inkubation mit dem Inhibitor zu beobachten, was darauf hindeutet, dass ein katalytischer Umsatz für die Inhibition notwendig ist.

Obwohl diese Experimente mit mikrosomalem Protein durchgeführt worden sind, ist es unwahrscheinlich, dass ein anderes P450-Enzym als CYP2B6 an der Aktivierung des Inhibitors beteiligt ist, da rekombinantes CYP2B6 mit praktisch der gleichen Potenz wie mikrosomales Enzym inhibiert worden ist und die mikrosomale Inhibition nicht durch Abfangreagenzien für reaktive Sauerstoffspezies und nukleophile Abfangreagenzien beeinflusst wurde. Ein weiterer Anhaltspunkt für die Beteiligung

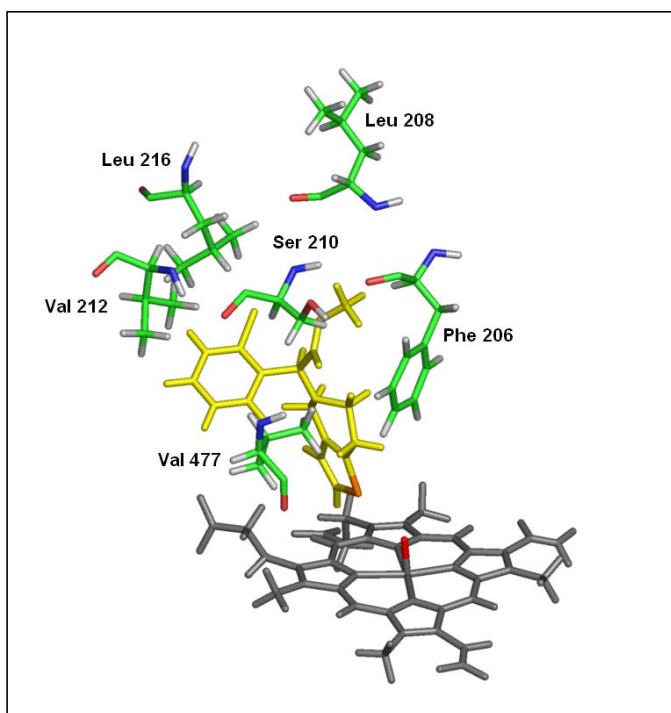
des aktiven Zentrums von CYP2B6 in der Aktivierung der Thienopyridine ist die Beobachtung, dass andere Liganden für das aktive Zentrum von CYP2B6 die Inaktivierung effektiv reduzieren konnten. Eine interessante Beobachtung dabei war, dass der kompetitive CYP2B6-Inhibitor Paroxetin die durch Clopidogrel verursachte CYP2B6-Inhibition weitaus potenter abschwächen konnte als 7-Ethoxycoumarin, wobei das CYP2B6-Substrat 7-Ethoxycoumarin einen stärkeren Einfluss auf die durch Ticlopidin verursachte CYP2B6-Inhibition hatte. Es ist denkbar, dass diese Unterschiede die Verschiedenheit zwischen den Substanzen in Bezug auf ihre sterische Besetzung des aktiven Zentrums des Enzyms widerspiegeln. Spektrale Analysen von CYP2B6 wiesen auf keinerlei Zerstörung der Häm-Komponente während der Inhibition hin, woraus zu schließen ist, dass eine Alkylierung des Apoproteins die Hauptursache der Inaktivierung sein muss. Obwohl der genaue Mechanismus noch untersucht werden müsste, sind angemessene Möglichkeiten auf der Basis der Hämproteininstabilität und in Analogie des bekannten Mechanismus der irreversiblen Inhibition des P2Y<sub>12</sub>-ADP-Rezeptors möglich. Savi et al. (2000) konnten zeigen, dass der initiierte Schritt bei der mikrosomalen Aktivierung von Clopidogrel die Cytochrom P450-abhängige Oxidation zu 2-Oxo-Clopidogrel ist. Die hauptsächliche Beteiligung an diesem Schritt scheint die durch CYP3A4 katalysierte Reaktion zu sein, obwohl in einer Studie von Clarke und Waskell (2002) und in dieser Arbeit nur indirekte Hinweise dafür geliefert werden konnten.

Obwohl 2-Oxoclopidogrel in-vitro pharmakologisch nicht aktiv ist, konnte die antiaggregatorische Aktivität ex-vivo demonstriert werden, was darauf hindeutet, dass ein Intermediat entsteht, welches zum aktiven Metaboliten konvertiert werden kann. Pereillo et al. (2002) konnten schließlich die Struktur des aktiven Metaboliten bestimmen, der ein hydrolysiertes Derivat mit einem geöffneten Thiophenring darstellt, welcher eine hoch reaktive Thiolfunktion trägt und den Rezeptor durch eine Disulfidbrückenbindung mit einem extrazellulären Cystein blockiert (Ding et al., 2003). In Analogie dazu könnte ein ähnlicher Mechanismus die Inhibition von Cytochrom P450 durch Thienopyridine erklären. Der erste Schritt könnte eine Umwandlung zum 2-Oxoderivat durch Cytochrom P450 sein. Dieses Zwischenprodukt könnte eine Disulfidbindung mit einem vorhandenen Cystein bilden, entweder nach der Hydrolyse zum 2-Oxoderivat, wie es im Falle der ADP-Rezeptoralkylierung erfolgt, oder alternativ nach einem weiteren Zyklus der P450-abhängigen Oxidation (Abb. 59).



**Abb. 59:** Möglicher Mechanismus der irreversiblen Inhibition von CYP2B6 durch Clopidogrel. Der hypothetische Mechanismus basiert auf der links dargestellten bekannten metabolischen Aktivierung und pharmakologischen Wirkung von Clopidogrel und der Beobachtung, dass die Inhibition nicht mit einer Hämzerstörung einherging. Der rechts dargestellte hypothetische Weg, der zur Inaktivierung von P450 führt, könnte über eine Hydrolyse oder einen zusätzlichen oxidativen Schritt, der durch P450 katalysiert wird, erfolgen.

Es konnte gezeigt werden, dass dieser Mechanismus mit Ergebnissen von „Protein homology modeling“ übereinstimmt. Das „Docking“ von Clopidogrel führte zu einer Reihe von Komplexen mit Energien zwischen  $-8$  und  $-9$  kcal/mol. Bei 1 % dieser Komplexe war Clopidogrel mit dem Wasserstoff in der 2-Position zum Thiophenring mit einer Distanz zwischen  $3,0$  und  $3,5$  Å zum reaktiven Sauerstoff des Häms orientiert (Abb. 60).

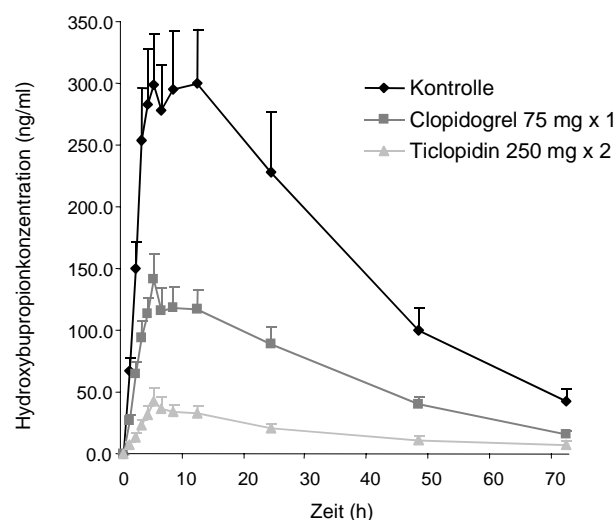


**Abb. 60:** Docking von Clopidogrel in das aktive Zentrum von CYP2B6 in einer bevorzugten Orientierung für die Oxidation in 2-Position des Thiophenrings. In der Abb. ist ein Stockmodell vom Substrat (gelb), Häm und den Aminosäuren, die die Substratbindungstasche formen, zu sehen (Modell aus Richter et al., 2004).

Weil diese Position chemisch hochreaktiv ist, würde ein kleiner Prozentsatz von richtig orientierten Spezies für eine regioselektive Oxidation ausreichen. Interessanterweise haben vergleichende Modellierungen zwischen unterschiedlichen Cytochrom P450- Enzymen ergeben, dass bei CYP2B6 und CYP2C19 der Metabolit in engen Kontakt mit einem Cystein (Position 475 bzw. 216), welches nahe am Substratkanal lokalisiert ist, gelangt. Bei CYP3A4, welches durch Clopidogrel und Ticlopidin nicht inhibiert wurde, ist ein solches Cystein nicht vorhanden.

Da disulfidbrückenspaltende Reagenzien die Enzymaktivität von CYP2B6 sehr stark inhibierten, konnte dieser Hypothese nicht weiter nachgegangen werden. Eine Mutagenese von potentiellen Aminosäuren wäre denkbar, könnte aber die basale Aktivität von CYP2B6 verändern. Andere Reaktionsmechanismen, welche eine Thiophen-S-Oxidation oder Epoxidierung beeinhalteln, können momentan nicht ausgeschlossen werden und sind auch eine denkbare Möglichkeit.

In Bezug auf Clopidogrel und Ticlopidin sind bislang keine klinisch relevanten Wechselwirkungen beschrieben worden, denen eine Inhibition von CYP2B6 zugrunde liegen könnte. In Abb. 61 sind jedoch die Auswirkungen auf die Plasmakonzentration von Hydroxybupropion durch die Einnahme der Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel und Ticlopidin zu sehen, welche in einer Studie von der Arbeitsgruppe von Prof. Pelkonen bei freiwilligen Probanden zusammen mit Bupropion verabreicht worden sind.



**Abb. 61:** Hydroxybupropion-Plasmaspiegel nach Gabe von Plazebo (Kontrolle), Clopidogrel (1 x 75 mg) oder Ticlopidin (2x250 mg). Die Abbildung wurde freundlicherweise von Prof. Olavi Pelkonen (Oulu, Finnland) zur Verfügung gestellt.



In einer mit Clopidogrel behandelten Ratte wurde eine durch Phenobarbital verringerte antiaggregatorische Aktivität von Clopidogrel beobachtet und mit einer Induktion von CYP2B1/B2 in Zusammenhang gebracht (Savi et al., 1994). Dadurch wurde auf einen CYP2B1/B2 abhängigen Metabolismus von Clopidogrel in der Ratte geschlossen, was einen CYP2B6- abhängigen Metabolismus im Menschen bedeuten könnte, da dieses Isoenzym das humane Ortholog von CYP2B1 der Ratte ist. Wie in dieser Arbeit und der von Clarke und Waskell (2002) gezeigt werden konnte, ist CYP2B6 nur zu einem geringen Anteil am Clopidogrelmetabolismus beteiligt und somit spielen Substrate dieses Enzyms im Hinblick auf Interaktionen mit Clopidogrel sehr wahrscheinlich keine Rolle.

Bislang sind andere potente „mechanism-based“ Inhibitoren von CYP2B6 wie eine Reihe von Xanthate (Yanev et al., 1999), Methyladamantanderivate (Stiborova et al., 2002), Phencyclidin (Jushchyshyn et al., 2002) und Ethinylestradiol (Kent et al., 2001) beschrieben worden. Palovaara et al. (2003) konnten in einer Studie mit 12 gesunden Frauen zeigen, dass ein orales Kontrazeptivum bestehend aus Ethinylestradiol und Desogestrel die AUC von Hydroxybupropion um 31 % und eine Hormonersatztherapie mit Estradiol und Levonorgestrel die AUC von Hydroxybupropion signifikant um 47 % reduziert haben.

Clopidogrel und Ticlopidin sind mit den in dieser Arbeit bestimmten  $K_i$ - Werten von 0,5 und 0,2  $\mu\text{M}$  bei der mikrosomalen Inhibition der Bupropionhydroxylierung die potentesten Inhibitoren von CYP2B6, die bis heute beschrieben worden sind. Da thrombolitische Arzneistoffe wie die Thienopyridine bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung eine breite Anwendung finden und diese Patienten oft verschiedene Medikamente einnehmen, muss auf eine etwaige Interaktion mit CYP2B6-Substraten zukünftig geachtet werden.

#### **4.7 Induktoren**

Dass polyzyklische Aromaten im Tabakrauch aber auch in gegrillten Speisen in der Lage sind, CYP1A2 zu induzieren, ist lange bekannt. Ein Einfluss von Tabakkonsum auf die Expression und Funktion von CYP2B6 wurde an humanen Lebermikrosomen nicht festgestellt. Miksys et al. (2003) fanden in verschiedenen Gehirnregionen eine erhöhte Expression von CYP2B6 bei Konsumenten von Zigaretten und Alkohol im Vergleich zur Kontrollgruppe, die weder Zigaretten noch Alkohol konsumierte. De Vane et al. (1990) fanden jedoch, dass die Halbwertszeit von Bupropion durch alkoholbedingte Leberkrankheiten nicht verändert war. Da der Konsum von Alkohol oft mit einem Konsum von Zigaretten einhergeht, ist eine getrennte Analyse sehr schwierig.

Hesse et al. (2004) fanden bei Alkoholkonsumenten eine signifikant erhöhte CYP2B6-Expression und Bupropionhydroxylaseaktivität. In dieser Arbeit zeigte der Konsum von Zigaretten und Alkohol keinen signifikanten Einfluss auf die Expression und Funktion von CYP2B6. Die Probandenzahl war jedoch so gering, dass weitere Einflüsse wie der *CYP2B6*- Genotyp nicht berücksichtigt werden konnten. So wurde bei Hesse et al. (2004) keine Rücksicht auf die Einnahme von Medikamenten genommen. Denn viele Arzneistoffe sind in der Lage die Expression und Funktion von arzneimittelabbauenden Enzymen zu verändern. So wurde bereits 1995 von Ketter et al. beschrieben, dass das Antiepileptikum Carbamazepin den Metabolismus von Bupropion induziert und die Spitzen- Plasmakonzentrationen von Bupropion um 87 % reduziert. In der vorliegenden Arbeit konnte der hinter dieser Wirkung von Carbamazepin stehende Mechanismus durch systematische Analyse der präoperativen Arzneimittlexposition mit einer starken Erhöhung der Expression von CYP2B6 in Verbindung gebracht werden (siehe Kapitel 3.8.3).

Diese Analyse lieferte auch Hinweise auf bisher unbekannte Induktoren. Insbesondere waren die CYP2B6-Expression und Bupropionhydroxylaseaktivität bei Lebermikrosomen von Patienten, die das Analgetikum Metamizol eingenommen hatten, signifikant um das 2,6fache bzw. 3,3fache erhöht. Experimente mit humanen Hepatozyten bestätigten diese Beobachtungen, indem durch Zugabe von Carbamazepin oder Metamizol eine deutlich erhöhte Expression von CYP2B6 herbeigeführt werden konnte. Die einzigen, bisherigen Indizien für eine solche Wirkung des Metamizols sind die von Kraul et al. (1996) gemachte Beobachtung einer Induktion von CYP2B1 der Ratte, sowie eine von Caraco et al. (1999) in einer klinischen Studie beobachtete Arzneimittelinteraktion, bei welcher die Plasmakonzentration von Cyclosporin durch Metamizol verringert wurde. Letzterer Beobachtung dürfte jedoch eine Induktion von CYP3A4, dem hauptsächlich für den Cyclosporin- Metabolismus verantwortlichen Enzym, zu Grunde liegen. Eine CYP3A4-Induktion konnte auch tatsächlich in dieser Arbeit an humanen Hepatozyten bestätigt werden (Daten nicht dargestellt). Für CYP2B6-Substrate sind bis dato keine klinisch relevanten Arzneimittelinteraktionen mit Metamizol beschrieben worden. Da dieses Medikament aber doch recht häufig und auch zur chronischen Schmerztherapie angewendet wird, muss mit einer Beeinflussung des Metabolismus von CYP2B6- und CYP3A4-Substraten durch Metamizol gerechnet werden.

Eine weitere Beobachtung aus der Analyse der Arzneimittelexpositionen betrifft Patienten, die auf Grund einer koronaren Herzkrankheit vasodilatative Medikamente wie Isosorbiddinitrat (ISDN) eingenommen hatten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe besaßen diese Patienten einen um 48 % verringerten CYP2B6-Apopteingehalt und eine um 69 % verringerte mittlere Bupropionhydroxylaseaktivität. Interessante Zusammenhänge gibt es hier wieder zu Untersuchungen bei der Ratte. Minamiyama et al. (2004) konnten demonstrieren, dass die kontinuierliche Gabe von organischen Nitraten zu einer Abnahme von hepatischem Cytochrom P450 führt, welche nach dem Absetzen der Arzneimittel reversibel war. Vuppugalla und Mehvar (2004) konnten daraufhin zeigen, dass die Enzymaktivität von CYP2B1 in der isolierten perfundierten Rattenleber durch ISDN konzentrationsabhängig abnimmt. Die Untersuchung des Einflusses von ISDN auf die Expression von CYP2B6 und auf die Bupropionhydroxylaseaktivität konnte leider bei humanen Hepatozyten nicht durchgeführt werden, da die Expression von CYP2B6 innerhalb weniger Tage kaum noch nachweisbar war.

Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, wie wichtig und wie wertvoll die zu den humanen Leberproben vorhandene klinische Dokumentation ist. Durch die Beobachtung bestimmter Zusammenhänge war es möglich Hypothesen zu generieren, die in-vitro bestätigt werden konnten. Besonders für CYP2B6, dessen Beteiligung am Metabolismus vieler bereits zugelassener Medikamente nicht untersucht worden ist, können diese Daten auch zukünftig eine wichtige Informationsquelle darstellen.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

Aithal GP, Day CP, Kesteven P, Daly AK: Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999;353:717-719

Ameer B, Weintraub RA: Drug interactions with grapefruit juice. *Clin Pharmacokinet* 1997;33:103-21

Aoyama T, Yamano S, Guzelian PS, Gelboin HV, Gonzalez FJ: Five of 12 forms of vaccinia virus-expressed human hepatic cytochrome P450 metabolically activate aflatoxin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:4790-3

Banner W Jr: Clinical toxicology in the neonatal intensive care unit. *Med Toxicol* 1986;1:225-35

Beaune P, Dansette PM, Mansuy D, Kiffel L, Finck M, Amar C, Leroux JP, Homberg JC. Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P-450 that hydroxylates the drug. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84:551-555

Bertilsson L, Dahl ML, Dalen P, Al-Shurbaji A: Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 2002;53:111-122

Bonati M, Marchetti F, Zullini MT, Pistotti V, Tognoni G: Adverse drug reactions in neonatal intensive care units. *Adverse Drug React Acute Poisoning Rev* 1990;9:103-18

Bridges A, Gruenke L, Chang YT, Vakser IA, Loew G, Waskell L: Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b5 and cytochrome P450 reductase. *J Biol Chem* 1998 3;273:17036-49

Bucherer, HT and Lieb VA: Über die Bildung substituierter Hydantoine aus Aldehyden und Ketonen 1934; *J prakt Chem* 141:5-43

Caraco Y, Zylber-Katz E, Fridlander M, Admon D, Levy M: The effect of short-term dipyron administration on cyclosporin pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol* 1999;55:475-478

Clarke SE, Jones BC: Human Cytochromes P450 and their role in metabolism-based drug-drug interactions. In: Rodrigues AD. *Drug-drug interactions*. New York: Marcel Dekker, Inc., 2002. Seite 55

Clarke TA and Waskell LA: The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab Dispos* 2002 31:53-59

Code EL, Crespi CL, Penman BW, Gonzalez FJ, Chang TK, Waxman DJ: Human cytochrome P4502B6: interindividual hepatic expression, substrate specificity, and role in procarcinogen activation. *Drug Metab Dispos* 1997;25:985-93

Court MH, Duan SX, Hesse LM, Venkatakrisnan K, Greenblatt DJ: Cytochrome P-450 2B6 is responsible for interindividual variability of propofol hydroxylation by human liver microsomes. *Anesthesiology* 2001;94:110-9

Crespi CL, Miller VP: The R144C change in the CYP2C9\*2 allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH:cytochrome P450 oxidoreductase. *Pharmacogenetics* 1997;7:203-10

DeMarco GJ, McCoy GD: Involvement of cytochrome b5 in the hepatic microsomal metabolism of benzo(a)pyrene. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;128:621-7

Denk H, Eckerstorfer R: Turnover of cytochrome P-450 and cytochrome b5 hemes in griseofulvin-induced murine porphyria. *FEBS Lett* 1977;76:67-70

DeVane CL, Laizure C, Stewart JT, Kolts BE, Ryerson EG, Miller R, Lai AA: Disposition of bupropion in healthy volunteers and subjects with alcoholic liver disease. *J Clin Psychopharmacol* 1990;10:328-332

Dimopoulos MA, Alexanian R, Przepiorka D, Hester J, Andersson B, Giralt S, Mehra R, van Besien K, Delasalle KB, Reading C, et al.: Thiotepa, busulfan, and cyclophosphamide: a new preparative regimen for autologous marrow or blood stem cell transplantation in high-risk multiple myeloma. *Blood* 1993;82:2324-8

Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP: Inactivation of the human P2Y12 receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* 2003;3908-3914

Ekins S, Vandenbranden M, Ring BJ, Gillespie JS, Yang TJ, Gelboin HV, Wrighton SA: Further characterization of the expression in liver and catalytic activity of CYP2B6. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286:1253-9

Ellis EF, Koysooko R, Levy G: Pharmacokinetics of theophylline in children with asthma. *Pediatrics* 1976;58:542-7

Epstein PM, Curti M, Jansson I, Huang CK, Schenkman JB: Phosphorylation of cytochrome P450: regulation by cytochrome b5. *Arch Biochem Biophys* 1989; 271:424-32

Erickson DA, Mather G, Trager WF, Levy RH, Keirns JJ: Characterization of the in vitro biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* 1999;27:1488-95

Evans WE, McLeod HL: Pharmacogenomics - drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med* 2003;348:538-49

Faucette SR, Hawke RL, Lecluyse EL, Shord SS, Yan B, Laethem RM, Lindley CM: Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug Metab Dispos* 2000;28:1222-30

Faucette SR, Hawke RL, Shord SS, Lecluyse EL, Lindley CM: Evaluation of the contribution of cytochrome P450 3A4 to human liver microsomal bupropion hydroxylation. *Drug Metab Dispos* 2001;29:1123-9

Forrester LM, Henderson CJ, Glancey MJ, Back DJ, Park BK, Ball SE, Kitteringham NR, McLaren AW, Miles JS, Skett P, et al: Relative expression of cytochrome P450 isoenzymes in human liver and association with the metabolism of drugs and xenobiotics. *Biochem J* 1992;281:359-68

Frueh FW, Zanger UM, Meyer UA: Extent and character of phenobarbital-mediated changes in gene expression in the liver. *Mol Pharmacol* 1997;51:363-9

Furuta T, Shirai N, Takashima M et al.: Effect of genotypic differences in CYP2C19 on cure rates for helicobacter pylori infection by triple therapy with a proton pump inhibitor, amoxicillin, and clarithromycin. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:158-168

Garfinkel D: Studies on pig liver microsomes. Enzyme and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys* 1958;77:493-509

Gerber JG, Rhodes RJ, Gal J: Stereoselective metabolism of methadone N-demethylation by cytochrome P4502B6 and 2C19. *Chirality* 2004;16:36-44

Gervot L, Rochat B, Gautier JC, Bohnenstengel F, Kroemer H, de Berardinis V, Martin H, Beaune P, de Waziers I: Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics* 1999;9:295-306

Granvil CP, Madan A, Sharkawi M, Parkinson A, Wainer IW: Role of CYP2B6 and CYP3A4 in the in vitro N-dechloroethylation of (R)- and (S)-ifosfamide in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1999;27:533-41

Greenblatt DJ, Allen MD, Harmatz JS, Shader RI: Diazepam disposition determinants. *Clin Pharmacol Ther* 1980;27:301-12

Ha-Duong NT, Dijols S, Macherey AC, Goldstein JA, Dansette PM, Mansuy D: Ticlopidine as a selective mechanism-based inhibitor of cytochrome P4502C19. *Biochemistry* 2001;40:12112-12122

Halpert J, Hammond D, Neal R. Inactivation of purified rat liver cytochrome P-450 during the metabolism of parathion (diethyl –nitrophenyl phosphothionate). *J Biol Chem* 1980;255:1080-1089

Hanna IH, Reed JR, Guengerich FP, Hollenberg PF: Expression of human cytochrome P450 2B6 in Escherichia coli: characterization of catalytic activity and expression levels in human liver. *Arch Biochem Biophys* 2000;376:206-16

Hassan M, Svensson US, Ljungman P, Bjorkstrand B, Olsson H, Bielenstein M, Abdel-Rehim M, Nilsson C, Johansson M, Karlsson MO: A mechanism-based pharmacokinetic-enzyme model for cyclophosphamide autoinduction in breast cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:669-77

Henze HR and Isbell AF: Researches on substituted 5-phenylhydantoins. *J Am Chem Soc* 1953;76: 4152-4156

Hesse LM, He P, Krishnaswamy S, Hao Q, Hogan K, von Moltke LL, Greenblatt DJ, Court MH: Pharmacogenetic determinants of interindividual variability in bupropion hydroxylation by cytochrome P450 2B6 in human liver microsomes. *Pharmacogenetics* 2004;14:225-38

Hesse LM, Venkatakrishnan K, Court MH, von Moltke LL, Duan SX, Shader RI, Greenblatt DJ: CYP2B6 mediates the in vitro hydroxylation of bupropion: potential drug interactions with other antidepressants. *Drug Metab Dispos* 2000;28:1176-83

Heyn H, White RB, Stevens JC: Catalytic role of cytochrome P4502B6 in the N-demethylation of S-mephenytoin. *Drug Metab Dispos* 1996;24:948-54

Hidestrand M, Oscarson M, Salonen JS, Nyman L, Pelkonen O, Turpeinen M, Ingelman-Sundberg M: CYP2B6 and CYP2C19 as the major enzymes responsible for the metabolism of selegiline, a drug used in the treatment of Parkinson's disease, as revealed from experiments with recombinant enzymes. *Drug Metab Dispos* 2001;29:1480-4

Hoch FL, Depierre JW, Ernster L: Thyroid control over biomembranes. Liver-microsomal cytochrome b5 in hypothyroidism. *Eur J Biochem* 1980;109:301-6

Hofmann U, Pecia M, Heinkele G, Dilger K, Kroemer HK, Eichelbaum M: Determination of propafenone and its phase I and phase II metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;748:113-123

Honig PK, Wortham DC, Zamani K, Conner DP, Mullin JC, Cantilena LR: Terfenadine-ketoconazole interaction. Pharmacokinetic and electrocardiographic consequences. *JAMA* 1993;269(12):1513-8

Hsyu PH, Singh A, Giargiari TD, Dunn JA, Ascher JA, Johnston JA: Pharmacokinetics of bupropion and its metabolites in cigarette smokers versus nonsmokers. *J Clin Pharmacol* 1997;37:737-43

Huang Z, Roy P, Waxman DJ: Role of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2B6 in catalyzing N-dechloroethylation of cyclophosphamide and ifosfamide. *Biochem Pharmacol* 2000; 59(8):961-72

Hughes J, Gill AM, Mulhearn H, Powell E, Choonara I: Steady-state plasma concentrations of midazolam in critically ill infants and children. *Ann Pharmacother* 1996;30:27-30

Huitema ADR, Kerbusch T, Tibben MM, Rodenhuis S, Beijnen JH. Reduction of cyclophosphamide bioactivation by thioTEPA: critical sequence-dependency in high-dose chemotherapy regimens. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;46:119-127

Hussein AM, Petros WP, Ross M, Vredenburgh JJ, Affrontil ML, Jones RB, Shpall EJ, Rubin P, Elkordy M, Gilbert C, Gupton C, Egorin MJ, Soper J, Berchuck A, Clarke-Person D, Berry DA, Peters WP. A phase I/II study of high-dose cyclophosphamide, cisplatin, and thioTEPA followed by autologous bone marrow and granulocyte colony-stimulating factor-primed peripheral-blood progenitor cells in patients with advanced malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996;37:561-8

Impicciatore P, Choonara I, Clarkson A, Provasi D, Pandolfini C, Bonati M: Incidence of adverse drug reactions in paediatric in/out-patients: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:77-83

Izzo AA: Drug interactions with St. John's Wort (*Hypericum perforatum*): a review of the clinical evidence. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42(3):139-48

Jacobson PA, Green K, Birnbaum A, Remmel RP. Cytochrome P450 isozymes 3A4 and 2B6 are involved in the in vitro human metabolism of thioTEPA to TEPA. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002;49:461-467

Janmohamed A, Dolphin CT, Phillips IR, Shephard EA. Quantification and cellular localization of expression in human skin of genes encoding flavin-containing monooxygenases and cytochromes P450. *Biochem Pharmacol* 2001;62:777-86

Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Ohno A, Makino Y, Matsushima E, Hanioka N, Ando M: Functional characterization of cytochrome P450 2B6 allelic variants. *Drug Metab Dispos* 2003;31:398-403

Jushchyshyn MI, Kent UM, Hollenberg PF: The mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 2B6 by phencyclidine. *Drug Metab Dispos* 2002;31:46-52

Kahan BD, Kramer WG, Wideman C, Flechner SM, Lorber MI, Van Buren CT: Demographic factors affecting the pharmacokinetics of cyclosporine estimated by radioimmunoassay. *Transplantation* 1986;41:459-64

Kent UM, Aviram M, Rosenblat M, Hollenberg PF: The licorice root derived isoflavan glabridin inhibits the activities of human cytochrome P450S 3A4, 2B6, and 2C9. *Drug Metab Dispos* 2002;30:709-15

Kent UM, Mills DE, Rajnarayanan RV, Alworth WL, Hollenberg PF: Effect of 17- $\alpha$ -ethynylestradiol on activities of cytochrome P450 2B (P450 2B) enzymes: characterization of inactivation of P450s 2B1 and 2B6 and identification of metabolites. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;300:549-558

Ketter TA, Jenkins JB, Schroeder DH, Pazzaglia PJ, Marangell LB, George MS, Callahan AM, Hinton ML, Chao J, Post RM: Carbamazepine but not valproate induces bupropion metabolism. *J Clin Psychopharmacol* 1995;15:327-33



- Kirby GM, Wolf CR, Neal GE, Judah DJ, Henderson CJ, Srivatanakul P, Wild CP: In vitro metabolism of aflatoxin B1 by normal and tumorous liver tissue from Thailand. *Carcinogenesis* 1993;14:2613-20
- Kirchheiner J, Klein C, Meineke I, Sasse J, Zanger UM, Mordt TE, Roots I, Brockmoller J: Bupropion and 4-OH-bupropion pharmacokinetics in relation to genetic polymorphisms in CYP2B6. *Pharmacogenetics* 2003;13:619-26
- Klingenberg M: Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 1958; 75:376-386
- Ko JW, Desta Z, Flockhart DA. Human N-demethylation of (S)-mephenytoin by cytochrome P450s 2C9 and 2B6. *Drug Metab Dispos* 1998;26:775-778
- Kraul H, Pasanen M, Sigusch H, Stenback F, Park SS, Gelboin HV, Pelkonen O: Immunohistochemical properties of dipyrone-induced cytochromes P450 in rats. *Hum Exp Toxicol* 1996;15:45-50
- Kreth K, Kovar K, Schwab M, Zanger UM: Identification of the human cytochromes P450 involved in the oxidative metabolism of "Ecstasy"-related designer drugs. *Biochem Pharmacol* 2000 ;59:1563-71
- Kroemer HK, Echizen H, Heidemann H, Eichelbaum M: Predictability of the in vivo metabolism of verapamil from in vitro data: contribution of individual metabolic pathways and stereoselective aspects. *J Pharmacol Exp Ther* 1992 Mar;260:1052-7
- Kroemer HK, Gautier JC, Beaune P, Henderson C, Wolf CR, Eichelbaum M: Identification of P450 enzymes involved in metabolism of verapamil in humans. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993;348:332-7
- Krynetski E and Evans WE: Drug methylation in cancer therapy: lessons from TPMT polymorphism. *Oncogene* 2003; 22:7403-7413
- Laepfle F, von Richter O, Fromm MF, Richter T, Thon KP, Wisser H, Griese EU, Eichelbaum M, Kivisto KT: Differential expression and function of CYP2C isoforms in human intestine and liver. *Pharmacogenetics* 2003;13:565-75
- Lamba V, Lamba J, Yasuda K, Strom S, Davila J, Hancock ML, Fackenthal JD, Rogan PK, Ring B, Wrighton SA, Schuetz EG: Hepatic CYP2B6 expression: gender and ethnic differences and relationship to CYP2B6 genotype and CAR (constitutive androstane receptor) expression. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307:906-22
- Lang T, Klein K, Fischer J, Nussler AK, Neuhaus P, Hofmann U, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM: Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics* 2001;11:399-415
- Lang T, Klein K, Richter T, Zibat A, Kerb R, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM: Multiple novel nonsynonymous CYP2B6 gene polymorphisms in Caucasians: demonstration of phenotypic null alleles. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;311:34-43

- Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN: Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998;279:1200-5
- Lerman C, Shields PG, Wileyto EP, Audrain J, Pinto A, Hawk L, Krishnan S, Niaura R, Epstein L: Pharmacogenetic investigation of smoking cessation treatment. *Pharmacogenetics* 2002;12:627-634
- Lewis DF, Watson E, Lake BG: Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutat Res* 1998;410:245-70
- Li DN, Pritchard MP, Hanlon SP, Burchell B, Wolf CR, Friedberg T: Competition between cytochrome P-450 isozymes for NADPH-Cytochrome P-450 Oxidoreductase affects drug metabolism. *JPET* 1999; 289:661-667
- Martin H, Sarsat JP, de Waziers I, Housset C, Balladur P, Beaune P, Albaladejo V, Lerche-Langrand C. Induction of cytochrome P450 2B6 and 3A4 expression by phenobarbital and cyclophosphamide in cultured human liver slices. *Pharm Res* 2003;20:557-68
- McCoy GD, DeMarco GJ, Biaglow JA: Influence of chronic ethanol consumption on hamster liver microsomal O-dealkylase activities and cytochrome b5 content. *Biochem Pharmacol* 1985 ;34:4263-7
- Mehta NB and Raleigh NC Meta chloro substituted-alpha-butylaminopropiophenones. *USP* 1974; 3,819,706. USA
- Merkatz RB, Temple R, Subel S, Feiden K, Kessler DA: Women in clinical trials of new drugs. A change in Food and Drug Administration policy. The Working Group on Women in Clinical Trials. *N Engl J Med* 1993;329:292-6
- Meyer UA, Zanger UM: Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997;37:269-96
- Miksysis S, Lerman C, Shields PG, Mash DC, Tyndale RF: Smoking, alcoholism and genetic polymorphisms alter CYP2B6 levels in human brain. *Neuropharmacology* 2003;45:122-32
- Miles JS, Spurr NK, Gough AC, Jowett T, McLaren AW, Brook JD, Wolf CR: A novel human cytochrome P450 gene (P450IIB): chromosomal localization and evidence for alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 1988;16:5783-95
- Mimura M, Baba T, Yamazaki H, Ohmori S, Inui Y, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Shimada T: Characterization of cytochrome P-450 2B6 in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1993;21:1048-56
- Minamiyama Y, Takemura S, Yamasaki K, Hai S, Hirohashi K, Funae Y, Okada S: Continuous administration of organic nitrate decreases hepatic cytochrome P450. *JPET* 2004;308:729-735

Miwa GT, West SB, Lu AY: Studies on the rate-limiting enzyme component in the microsomal monooxygenase system. Incorporation of purified NADPH-cytochrome c reductase and cytochrome P-450 into rat liver microsomes. *J Biol Chem* 1978;253:1921-9

Ng S, Waxman DJ. N, N', N''-triethylenethiophosphoramidate (thio-TEPA) oxygenation by constitutive hepatic P450 enzymes and modulation of drug metabolism and clearance in vivo by P450-inducing agents. *Cancer Res* 1991;51:2340-2345

Nicholas GS: *JPET* 1934;43:223-226

Omata Y, Robinson RC, Gelboin HV, Pincus MR, Friedman FK: Specificity of the cytochrome P-450 interaction with cytochrome b5. *FEBS Lett* 1994;346:241-5

Omata Y, Sakamoto H, Robinson RC, Pincus MR, Friedman FK: Interaction between cytochrome P450 2B1 and cytochrome b5: inhibition by synthetic peptides indicates a role for P450 residues Lys-122 and Arg-125. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 30;201:1090-5

Omura und Sato: The carbon-monoxide-binding pigment of liver microsomes. 1. evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 1964;239:2370-8

Ono S, Hatanaka T, Hotta H, Satoh T, Gonzalez FJ, Tsutsui M: Specificity of substrate and inhibitor probes for cytochrome P450s: evaluation of in vitro metabolism using cDNA-expressed human P450s and human liver microsomes. *Xenobiotica* 1996;26:681-93

Palovaara S, Pelkonen O, Uusitalo J, Lundgren S, Laine K: Inhibition of cytochrome P450 2B6 activity by hormone replacement therapy and oral contraceptive as measured by bupropion hydroxylation. *Clin Pharmacol Ther* 2003;74:326-33

Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A, Carroll KM: The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;199:193-209

Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, Uzabiaga MF, Fedeli O, Savi P, Pascal M, Herbert JM, Maffrand JP, Picard C: Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos* 2002;1288-1295

Phillips KA, Veenstra DL, Oren E, Lee JK, Sadee W: Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *JAMA* 2001;286:2270-9

Porter TD: The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions. *J Biochem Mol Toxicol* 2002;16:311-6

Przepiorka D, Ippoliti C, Giralt S, van Beisen K, Mehra R, Deisseroth AB, Andersson B, Luna M, Cork A, Lee M, et al. A phase I-II study of high-dose thiotepa, busulfan and cyclophosphamide as a preparative regimen for allogeneic marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994;14:449-53

Rae JM, Soukhova NV, Flockhart DA, Desta Z. Triethylenethiophosphoramidate is a specific inhibitor of cytochrome P450 2B6: implications for cyclophosphamide metabolism. *Drug Metab Dispos* 2002;30:525-530

Ram PA, Waxman DJ: Thyroid hormone stimulation of NADPH P450 reductase expression in liver and extrahepatic tissues. Regulation by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 1992;267:3294-301

Ramirez J, Innocenti F, Schuetz EG, Flockhart DA, Relling MV, Santucci R, Ratain MJ: CYP2B6, CYP3A4, and CYP2C19 are responsible for the in vitro N-demethylation of meperidine in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2004;32:930-6

Rao Y, Hoffmann E, Zia M et al.: Duplications and defects in the CYP2A6 gene. Identification, genotyping, and in vivo effects on smoking. *Mol. Pharmacol* 2000;58:747-755

Ren S, Kalhorn TF, McDonald GB, Anasetti C, Appelbaum FR, Slattery JT. Pharmacokinetics of cyclophosphamide and its metabolites in bone marrow transplantation patients. *Clin Pharmacol Ther* 1998;64:289-301

Richter T, Murdter TE, Heinkele G, Pleiss J, Tatzel S, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM: Potent mechanism-based inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:189-97

Richter T, Schwab M, Eichelbaum ME, Zanger, UM: Inhibition of human CYP2B6 by N, N', N''- triethylenephosphoramidate is irreversible and mechanism-based. *Biochem Pharmacol* 2005;69:517-24

Roy P, Yu LJ, Crespi CL, Waxman DJ: Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metab Dispos* 1999 Jun;27:655-66

Sai Y, Dai R, Yang TJ, Krausz KW, Gonzalez FJ, Gelboin HV, Shou M: Assessment of specificity of eight chemical inhibitors using cDNA-expressed cytochromes P450. *Xenobiotica* 2000;30:327-43

Sakaguchi M, Mihara K, Sato R: A short amino-terminal segment of microsomal cytochrome P-450 functions both as an insertion signal and as a stop-transfer sequence. *EMBO J* 1987;6:2425-31

Savi P, Combalbert J, Gaich C, Rouchon MC, Maffrand JP, Berger Y, Herbert JM: The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb Haemost* 1994;72:313-7

Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, Pascal M, Herbert JM: Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost* 2000;84:891-896

Schenkman JB, Jansson I: The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol Ther* 2003;97:139-52

Shen S, Strobel HW: The role of cytochrome P450 lysine residues in the interaction between cytochrome P450IA1 and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Arch Biochem Biophys* 1992;294:83-90

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP: Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasian. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;270:414-423

Shou M, Korzekwa KR, Krausz KW, Buters JT, Grogan J, Goldfarb I, Hardwick JP, Gonzalez FJ, Gelboin HV: Specificity of cDNA-expressed human and rodent cytochrome P450s in the oxidative metabolism of the potent carcinogen 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Mol Carcinog* 1996;17:241-9

Silverman RB: Mechanism-based enzyme inactivators. *Methods Enzymol* 1995 249:240-283

Spear BB: Pharmacogenetics and antiepileptic drugs. *Epilepsia* 2001;42 Suppl 5:31-4

Sridar C, Kent UM, Notley LM, Gillam EM, Hollenberg PF: Effect of tamoxifen on the enzymatic activity of human cytochrome CYP2B6. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:945-52

Stephens M, Smith NJ and Donnelly P: A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001;68: 978-989

Stevens JC, White RB, Hsu SH, Martinet M: Human liver CYP2B6-catalyzed hydroxylation of RP 73401. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:1389-95

Stiborova M, Borek-Dohalska L, Hodek P, Mraz J, Frei E: New selective inhibitors of cytochromes P450 2B and their application to antimutagenesis of tamoxifen. *Arch Biochem Biophys* 2002;403:41-49

Stresser DM, Kupfer D: Monospecific antipeptide antibody to cytochrome P-450 2B6. *Drug Metab Dispos* 1999;27:517-25

Summers B, Summers RS: Carbamazepine clearance in paediatric epilepsy patients. Influence of body mass, dose, sex and co-medication. *Clin Pharmacokinet* 1989;17:208-16

Svensson US, Ashton M: Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the in vitro metabolism of artemisinin. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:528-35

Sweet RA, Pollock BG, Kirshner M, Wright B, Altieri LP, DeVane CL: Pharmacokinetics of single- and multiple-dose bupropion in elderly patients with depression. *J Clin Pharmacol* 1995;35:876-884

Takada K, Arefayene M, Desta Z, Yarboro CH, Boumpas DT, Balow JE, Flockhart DA, Illei GG: Cytochrome P450 pharmacogenetics as a predictor of toxicity and clinical response to pulse cyclophosphamide in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2202-10

Tamura S, Korzekwa KR, Kimura S, Gelboin HV, Gonzalez FJ: Baculovirus-mediated expression and functional characterization of human NADPH-P450 oxidoreductase. *Arch Biochem Biophys* 1992;293:219-23

Tateishi T, Nakura H, Asoh M, Watanabe M, Tanaka M, Kumai T, Takashima S, Imaoka S, Funae Y, Yabusaki Y, Kamataki T, Kobayashi S: A comparison of hepatic cytochrome P450 protein expression between infancy and postinfancy. *Life Sci* 1997;61:2567-74

Teicher SA, Holden SA, Jones SM, Eder JP, Herman TS. Influence of scheduling on two-drug combinations of alkylating agents in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 1989;25:161-66

Tsuchiya K, Gatanaga H, Tachikawa N, Teruya K, Kikuchi Y, Yoshino M, Kuwahara T, Shirasaka T, Kimura S, Oka S: Homozygous CYP2B6 \*6 (Q172H and K262R) correlates with high plasma efavirenz concentrations in HIV-1 patients treated with standard efavirenz-containing regimens. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:1322-6

von Richter O, Eichelbaum M, Schonberger F, Hofmann U: Rapid and highly sensitive method for the determination of verapamil, [2H7]verapamil and metabolites in biological fluids by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;738:137-147

Vuppugalla R, Mehvar R: Hepatic disposition and effects of nitric oxide donors: rapid and concentration-dependent reduction in the cytochrome P450-mediated drug metabolism in isolated perfused rat livers. *JEPET* 2004;310:718-727

Wang H, Negishi M: Transcriptional regulation of cytochrome p450 2B genes by nuclear receptors. *Curr Drug Metab* 2003;4:515-25

Ward BA, Gorski JC, Jones DR, Hall SD, Flockhart DA, Desta Z: The cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;306:287-300

Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, McRee DE: Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol Cell* 2000;5:121-31

Wolbold R, Klein K, Burk O, Nussler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM: Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology* 2003;38:978-88

Wolf CR, Smith CA, Smith G, Gough AC, Bryant S, Spurr NK, Harrison DJ: Molecular genetics of the human cytochrome P450-dependent monooxygenases. *Tohoku J Exp Med* 1992;168:73-81

Wooltorton E: Propofol: contraindicated for sedation of pediatric intensive care patients. *CMAJ* 2002;167:507

Xie HJ, Yasar U, Lundgren S, Griskevicius L, Terelius Y, Hassan M, Rane A: Role of polymorphic human CYP2B6 in cyclophosphamide bioactivation. *Pharmacogenomics J* 2003;3:53-61

Yamaguchi Y, Khan KK, He YA, He YQ, Halpert JR: Topological changes in the CYP3A4 active site probed with phenyldiazene: effect of interaction with NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome b5 and of site-directed mutagenesis. *Drug Metab Dispos* 2004;32:155-61

Yamano S, Nhamburo PT, Aoyama T, Meyer UA, Inaba T, Kalow W, Gelboin HV, McBride OW, Gonzalez FJ: cDNA cloning and sequence and cDNA-directed expression of human P450 IIB1: identification of a normal and two variant cDNAs derived from the CYP2B locus on chromosome 19 and differential expression of the IIB mRNAs in human liver. *Biochemistry* 1989;28:7340-8

Yamazaki H, Inoue K, Hashimoto M, Shimada T: Roles of CYP2A6 and CYP2B6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *Arch Toxicol* 1999;73:65-70

Yamazaki H, Shimada T, Martin MV, Guengerich FP: Stimulation of cytochrome P450 reactions by apo-cytochrome b5: evidence against transfer of heme from cytochrome P450 3A4 to apo-cytochrome b5 or heme oxygenase. *J Biol Chem* 2001;276:30885-91

Yamazaki H, Tanaka M, Shimada T: Highly sensitive high-performance liquid chromatographic assay for coumarin 7-hydroxylation and 7-ethoxycoumarin O-deethylation by human liver cytochrome P450 enzymes. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;721:13-19

Yanagihara Y, Kariya S, Ohtani M, Uchino K, Aoyama T, Yamamura Y, Iga T: Involvement of CYP2B6 in n-demethylation of ketamine in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 2001;29:887-90

Yanev S, Kent UM, Pandova B, Hollenberg PF: Selective mechanism-based inactivation of cytochromes P-450 2B1 and P-450 2B6 by a series of xanthates. *Drug Metab Dispos* 1999;27:600-604

Yengi LG, Xiang Q, Pan J, Scatina J, Kao J, Ball SE, Fruncillo R, Ferron G, Roland Wolf C. Quantitation of cytochrome P450 mRNA levels in human skin. *Anal Biochem* 2003;316:103-10

Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M: Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;369:23-37



## 6 PUBLIKATIONEN

### 6.1 Posterpräsentationen

T. Richter, K. Klein, T.E. Mürdter, M. Eichelbaum, M. Schwab, U.M. Zanger: Enzymatic function of human CYP2B6 in relation to its genetic polymorphism. Präsentiert beim 14. World Congress of Pharmacology, San Francisco

T. Richter, K. Klein, T.E. Mürdter, M. Eichelbaum, M. Schwab, U.M. Zanger: ThioTepa and clopidogrel are specific mechanism-based inhibitors of human cytochrome P450 2B6. Präsentiert bei der DGPT (Herbsttagung 2002), Halle

Tanja Richter, Kathrin Klein, Thomas E. Mürdter, Michel Eichelbaum, Matthias Schwab, Ulrich M. Zanger: Clopidogrel and Ticlopidine are specific mechanism-based inhibitors of human Cytochrome P450 2B6. Präsentiert bei der 13. International Conference on cytochrome P450 Biochemistry, Biophysics and drug metabolism, Prag

Tanja Richter, Kathrin Klein, Jörg Zukunft, Thomas Lang, Michel Eichelbaum, Matthias Schwab, Ulrich M. Zanger: Multifactorial analysis of CYP2B6 expression and function in a human liver bank. Präsentiert beim 8. World Congress on clinical pharmacology & therapeutics, Brisbane

### 6.2 Originalarbeiten

Laepfle F, von Richter O, Fromm MF, Richter T, Thon KP, Wisser H, Griese EU, Eichelbaum M, Kivisto KT: Differential expression and function of CYP2C isoforms in human intestine and liver. *Pharmacogenetics* 2003;13:565-75

Richter T, Mürdter TE, Heinkele G, Pleiss J, Tatzel S, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM: Potent mechanism-based inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308:189-97

Lang T, Klein K, Richter T, Zibat A, Kerb R, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM: Multiple novel nonsynonymous CYP2B6 gene polymorphisms in Caucasians: demonstration of phenotypic null alleles. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311:34-43

Richter T, Schwab M, Eichelbaum ME, Zanger, UM: Inhibition of human CYP2B6 by N, N', N''- triethylenephosphoramidate is irreversible and mechanism-based. *Biochem Pharmacol* 2005;69:517-24