

**Charakterisierung, Struktur-Aktivitäts-Beziehungen
und Mechanismus eines mikrosomalen,
N-reduktiven Biotransformationssystems**



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Wiebke Karhan

Kiel 2002

Referent:

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt:

Prof. Dr. B. Clement

Prof. Dr. W. Blaschek

5., 6. und 11. Juni 2002

Kiel, den 12. Juni 2002

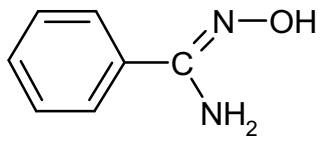
Prof. Dr. T. Bauer

(Dekan)

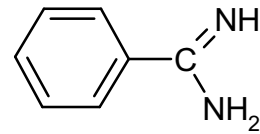
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5'-AMP	Adenosinmonophosphat
b ₅ -Reduktase	NADH-Cytochrom b ₅ Reduktase
BCA	2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure
CYP	Cytochrom P450
DEAE	Diethylaminoethyl-
DLPC	L- α -Dilaurylphosphatidylcholin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (reduzierte Form)
NMR	Kernresonanzspektroskopie
P450	Cytochrom P450
P450-Reduktase	NADPH-Cytochrom P450 Reduktase
SDS-Page	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
V _{max}	Maximale Umsetzungsgeschwindigkeit

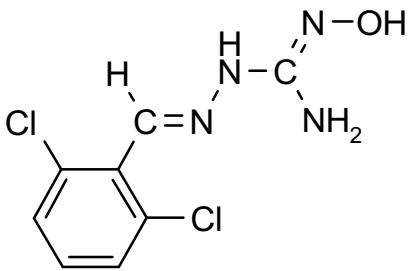
STRUKTURFORMELN HÄUFIG ZITIERTER VERBINDUNGEN



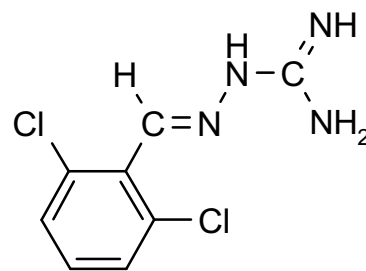
Benzamidoxim



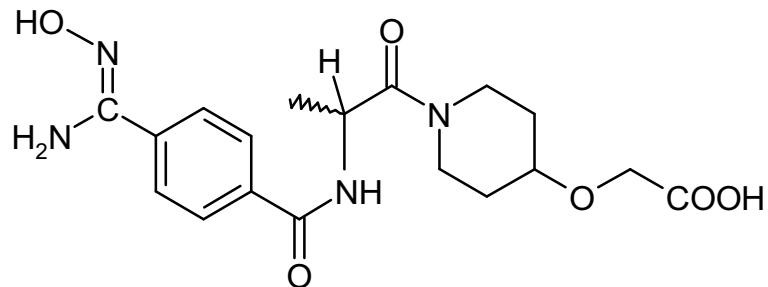
Benzamidin



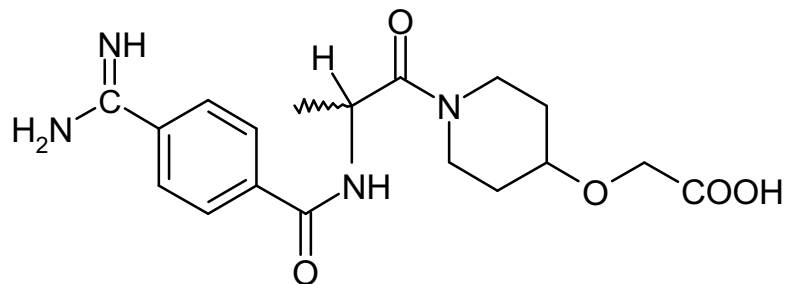
Guanoxabenz



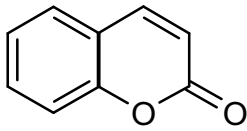
Guanabenz



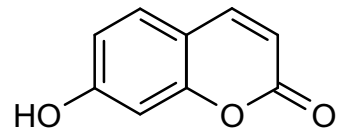
RO 48-3656



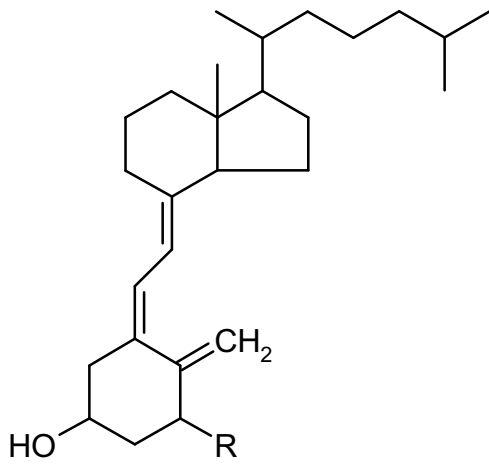
RO 44-3888



Coumarin

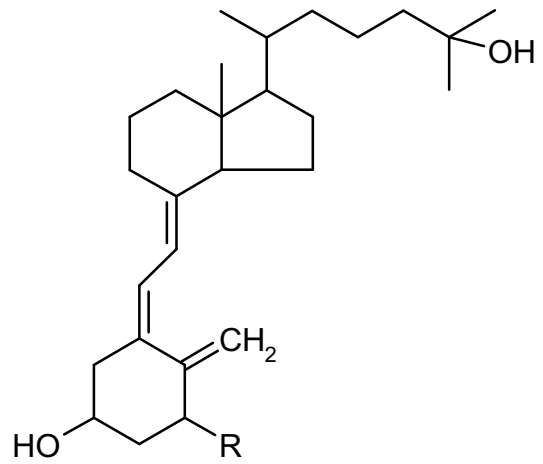


7-Hydroxycoumarin



R = H, Vitamin D₃

R = OH, 1 α -Hydroxyvitamin D₃



R = H, 25-Hydroxyvitamin D₃

R = OH, 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃

1. EINFÜHRUNG IN DIE BIOTRANSFORMATION	1
1.1. BIOTRANSFORMATIONEN	1
1.2. ENZYME DER BIOTRANSFORMATION	4
1.2.1. ALLGEMEINE ÜBERSICHT	4
1.2.2. CYTOCHROM P450	5
1.3. BIOTRANSFORMATIONEN STICKSTOFFHALTIGER FUNKTIONELLER GRUPPEN	8
1.3.1. OXIDATION STICKSTOFFHALTIGER FUNKTIONELLER GRUPPEN	8
1.3.2. REDUKTION STICKSTOFFHALTIGER FUNKTIONELLER GRUPPEN	12
1.4. PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER REDUKTION N-HYDROXYLIERTER VERBINDUNGEN	19
1.5. STAND DER VORARBEITEN	23
1.6. ZIELSETZUNG	25
2. ISOLIERUNG DER HUMANEN BENZAMIDOXIM-REDUKTASE	28
2.1. EINFÜHRUNG	28
2.1.1. CYTOCHROM P450 2A6	28
2.1.2. STAND DER VORARBEITEN	35
2.1.3. ZIELSETZUNG	38
2.2. METHODEN	40
2.2.1. ISOLIERUNG VON CYP2A6 AUS HUMANEN LEBERMİKROSOMEN	40
2.2.1.1. Gewinnung humaner Lebermikrosomen	40
2.2.1.2. Isolierung von CYP2A6 aus Mikrosomen	40
2.2.1.2.1. Hydrophobe Interaktionschromatographie an Octyl-Sepharose CL 4B	41
2.2.1.2.2. Anionenaustauschchromatographie an einer Hydroxylapatit-Säule	43
2.2.1.2.3. Anionenaustauschchromatographie an einer DEAE-Cellulose-Säule	44
2.2.1.2.4. Entfernung des Detergenz	45
2.2.1.2.4.1. Detergenzentfernung über Hydroxylapatit	45
2.2.1.2.4.2. Detergenzentfernung durch Calbiosorb®	45
2.2.1.3. Analytische Methoden zur Charakterisierung des CYP2A6 aus humanen Lebermikrosomen	46
2.2.1.3.1. Proteingehaltsbestimmung	46
2.2.1.3.2. P450-Gehaltsbestimmung	46
2.2.1.3.3. Überprüfung der Identität und Reinheit mittels SDS-Page und Western-Blot	46
2.2.1.3.3.1. Lösungen	46
2.2.1.3.3.2. Zusammensetzung der Gele	47

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.1.3.3.3.	Herstellung der Gele	47
2.2.1.3.3.4.	Probenvorbereitung	48
2.2.1.3.3.5.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
2.2.1.3.3.6.	Western-Blot	49
2.2.1.3.4.	Sequenzierung des isolierten Enzyms	49
2.2.1.3.5.	Cumarin-7-Hydroxylierung	50
2.2.1.3.5.1.	Fluorimeter	50
2.2.1.3.5.2.	HPLC	51
2.2.1.3.5.2.1.	Inkubationsbedingungen	51
2.2.1.3.5.2.2.	HPLC-Analytik	51
2.2.1.3.6.	Reduktion von Benzamidoxim	52
2.2.1.3.6.1.	Inkubationsbedingungen	52
2.2.1.3.6.2.	HPLC-Analytik	53
2.2.1.3.6.3.	Reduktion von Benzamidoxim durch rekombinant exprimiertes, gereinigtes CYP3A4	54
2.2.1.3.6.4.	Reduktion von Benzamidoxim durch rekombinant exprimiertes, gereinigtes CYP2C19	54
2.2.1.3.6.5.	Reduktion von Benzamidoxim durch die rekombinant exprimierte UDP-Glucuronyltransferase	55
2.2.1.3.7.	Reduktion von Guanoxabenz	55
2.2.1.3.7.1.	Inkubationsbedingungen	55
2.2.1.3.7.2.	HPLC-Analytik	55
2.2.1.3.8.	Reduktion von RO 48-3656	57
2.2.1.3.8.1.	Inkubationsbedingungen	57
2.2.1.3.8.2.	HPLC-Analytik	57
2.2.1.3.9.	Aktivitäten von Cytochrom b ₅ und NADH-Cytochrom b ₅ Reduktase aus Schweineleber bzw. humaner Leber	58
2.2.1.3.10.	Studien mit einem Antikörper gegen CYP2A6	58
2.2.1.3.11.	Hemmung der Cumarin-7-Hydroxylierung durch Benzamidoxim	59
2.2.1.3.12.	Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim durch Cumarin	60
2.2.2.	ISOLIERUNG VON REKOMBINANT EXPRIMIERTEM CYP2A6 AUS HEFEZELLEN	61
2.2.2.1.	Gewinnung des rekombinanten CYP2A6 aus Hefezellen	61
2.2.2.1.1.	Solubilisation der Hefezellen	61
2.2.2.1.2.	Reinigung an DEAE-Cellulose	62
2.2.2.1.3.	Reinigung an CM-Sepharose	62
2.2.2.1.4.	Detergenzentfernung	63

2.2.2.2.	Analytische Methoden zur Charakterisierung des rekombinant exprimierten CYP2A6 aus Hefezellen	64
2.2.2.2.1.	Überprüfung der Identität und Reinheit der Reinigung mittels SDS-Page und Western-Blot	64
2.2.2.2.2.	Cumarin-7-Hydroxylierung	64
2.2.2.2.3.	Reduktion von Benzamidoxim	65
2.2.2.2.4.	Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim durch Bestandteile in Hefezellen	65
2.2.2.2.4.1.	Hemmung der Reduktion in humanen Lebermikrosomen durch aus Hefezellen isolierte 2A6-Fractionen	65
2.2.2.2.4.2.	Hemmung der Reduktion in humanen Lebermikrosomen durch Hefezellen	66
2.2.2.2.5.	25-Hydroxylierung von 1 α -Hydroxyvitamin D ₃	66
2.2.2.2.5.1.	Inkubationsbedingungen	66
2.2.2.2.5.2.	HPLC-Analytik	67
2.2.2.2.5.2.1.	Normalphasenchromatographie	67
2.2.2.2.5.2.2.	Reversed-Phase Chromatographie	68
2.3.	ERGEBNISSE	69
2.3.1.	ISOLIERUNG VON CYP2A6 AUS HUMANEN LEBERMIKROSOMEN	69
2.3.1.1.	Gewinnung humaner Lebermikrosomen	69
2.3.1.2.	Isolierung von CYP2A6 aus humanen Lebermikrosomen	69
2.3.1.2.1.	Hydrophobe Interaktionschromatographie an Octyl-Sepharose CL 4B	72
2.3.1.2.2.	Anionenaustauschchromatographie an einer Hydroxylapatit-Säule	73
2.3.1.2.3.	Anionenaustauschchromatographie an einer DEAE-Cellulose-Säule	74
2.3.1.3.	Analytische Methoden zur Charakterisierung des CYP2A6 aus humanen Lebermikrosomen	76
2.3.1.3.1.	Überprüfung der Identität und Reinheit mittels SDS-Page und Western-Blot	76
2.3.1.3.2.	Sequenzierung der gereinigten 2A6-aktiven Enzymfraktion	79
2.3.1.3.3.	Cumarin-7-Hydroxylierung	80
2.3.1.3.4.	Reduktion von Benzamidoxim	81
2.3.1.3.4.1.	Reduktion von Benzamidoxim durch CYP2A6	81
2.3.1.3.4.2.	Reduktion von Benzamidoxim durch weitere P450-Enzyme	82
2.3.1.3.5.	Reduktion von Guanoxabenz	82
2.3.1.3.6.	Reduktion von RO 48-3656	83
2.3.1.3.7.	Aktivitäten von Cytochrom b ₅ und NADH-Cytochrom b ₅ Reduktase aus Schweineleber bzw. humaner Leber	83

INHALTSVERZEICHNIS

2.3.1.3.8.	Studien mit einem Antikörper gegen CYP2A6	85
2.3.1.3.9.	Hemmung der Cumarin-7-Hydroxylierung durch Benzamidoxim	88
2.3.1.3.10.	Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim durch C umarin	91
2.3.2.	ISOLIERUNG VON REKOMBINANT EXPRIMIERTEM CYP2A6 AUS HEFEZELLEN	94
2.3.2.1.	Gewinnung des rekombinanten CYP2A6 aus Hefezellen	94
2.3.2.2.	Analytische Methoden zur Charakterisierung des rekombinant exprimierten CYP2A6 aus Hefezellen	95
2.3.2.2.1.	Überprüfung der Identität und Reinheit mittels SDS-Page und Western-Blot	95
2.3.2.2.2.	Cumarin-7-Hydroxylierung	96
2.3.2.2.3.	Reduktion von Benzamidoxim	96
2.3.2.2.4.	Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim durch Bestandteile des Expressionssystems	97
2.3.2.2.4.1.	Hemmung der Reduktion in humanen Lebermikrosomen durch aus Hefezellen isolierte 2A6 -Fraktionen	97
2.3.2.2.4.2.	Hemmung der Reduktion in humanen Lebermikrosomen durch Hefezellen	99
2.3.2.2.5.	25-Hydroxylierung von 1α -Hydroxyvitamin D ₃	100
2.4.	DISKUSSION	101
<u>3. STRUKTUR-AKTIVITÄTS-BEZIEHUNGEN DER REDUKTION VON BENZAMIDOXIMEN</u>		<u>111</u>
3.1.	EINFÜHRUNG	111
3.1.1.	QUANTITATIVE STRUKTUR-AKTIVITÄTS-BEZIEHUNGEN (QSAR)	111
3.1.1.1.	Allgemeine Einführung	111
3.1.1.2.	Physikalische Parameter zur Ermittlung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen	115
3.1.1.2.1.	Hammett Konstante σ	115
3.1.1.2.2.	Hansch´sche Hydrophobiekonstante π	117
3.1.2.	STAND DER VORARBEITEN UND ZIELSETZUNG	124
3.2.	METHODEN	129
3.2.1.	GEWINNUNG DER ENZYMQUELLEN	129
3.2.1.1.	Herstellung von Schweinelebermikrosomen	129
3.2.1.2.	Isolierung der einzelnen Komponenten des rekonstituierten Systems aus dem Schwein	129
3.2.1.2.1.	Reinigung der Benzamidoxim-Reduktase und Cytochrom b ₅	129

3.2.1.2.2.	Reinigung der Cytochrom b ₅ -Reduktase	130
3.2.2.	SYNTHESE DER <i>PARA</i> - UND <i>META</i> -SUBSTITUIERTEN BENZAMIDOXIME UND BENZAMIDINE	131
3.2.3.	CHARAKTERISIERUNG DER REDUKTION VON <i>PARA</i> -SUBSTITUIERTEN BENZAMIDOXIMEN	132
3.2.3.1.	HPLC-Analytik	132
3.2.3.2.	Reduktion der Benzamidoxime in Abhängigkeit von der Protein-konzentration	135
3.2.3.3.	Reduktion der Benzamidoxime in Abhängigkeit von der Cosubstrat-konzentration	136
3.2.3.4.	Reduktion der Benzamidoxime in Abhängigkeit von der Zeit	136
3.2.3.5.	Reduktion der Benzamidoxime in Abhängigkeit vom pH-Wert	136
3.2.3.6.	Reduktion der Benzamidoxime in Abhängigkeit von der Substrat-konzentration	137
3.2.3.7.	Reduktion der Benzamidoxime unter optimierten Bedingungen	137
3.2.4.	BESTIMMUNG VON ENZYMKINETISCHEN PARAMETERN	138
3.2.5.	KORRELATION MIT DEN HAMMETTSCHEN σ_{PARA} -KONSTANTEN	139
3.2.6.	BESTIMMUNG DER LIPOPHILIE DER BENZAMIDOXIME UND BENZAMIDINE	139
3.2.7.	REDUKTION VON <i>META</i> -SUBSTITUIERTEN BENZAMIDOXIMEN	140
3.2.7.1.	Reduktion von m-Methylbenzamidoxim	140
3.2.7.2.	Reduktion von m-Nitrobenzamidoxim	140
3.2.8.	UMSETZUNG WEITERER SUBSTRATE DURCH DIE BENZAMIDOXIM-REDUKTASE (CYP2D)	141
3.2.8.1.	Reduktion von RO 48-3656	141
3.2.8.2.	25-Hydroxylierung von 1 α -Hydroxyvitamin D ₃	141
3.2.8.3.	Reduktion von Benzamidoxim durch die 1 α -Vitamin D ₃ -Hydroxylase	141
3.3.	ERGEBNISSE	142
3.3.1.	GEWINNUNG DER ENZYMQUELLEN	142
3.3.2.	SYNTHESE DER <i>PARA</i> - UND <i>META</i> -SUBSTITUIERTEN BENZAMIDOXIME UND BENZAMIDINE	142
3.3.2.1.	Benzamidoxime	143
3.3.2.2.	Benzamidine	143
3.3.3.	CHARAKTERISIERUNG DER REDUKTION VON BENZAMIDOXIMEN	145
3.3.4.	BESTIMMUNG VON ENZYMKINETISCHEN PARAMETERN	146
3.3.5.	KORRELATION MIT DEN HAMMETTSCHEN σ_{PARA} -KONSTANTEN	150
3.3.6.	BESTIMMUNG DER LIPOPHILIE DER BENZAMIDOXIME UND BENZAMIDINE	153
3.3.7.	REDUKTION VON <i>META</i> -SUBSTITUIERTEN BENZAMIDOXIMEN	156

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.8.	UMSETZUNG WEITERER SUBSTRATE DURCH DIE BENZAMIDOXIM REDUKTASE	157
3.3.8.1.	Reduktion von RO 48-3656	157
3.3.8.2.	25-Hydroxylierung von 1 α -Hydroxyvitamin D ₃	158
3.3.8.3.	Reduktion von Benzamidoxim durch die 1 α -Vitamin D ₃ -Hydroxylase	159
3.4.	DISKUSSION	160
4. MECHANISMUS DER REDUKTION VON BENZAMIDOXIMEN		169
4.1. EINFÜHRUNG		169
4.1.1.	MECHANISMUS DER OXYGENIERUNG DURCH P450	169
4.1.1.1.	Elektronenübertragung auf Cytochrom P450	169
4.1.1.2.	Katalytischer Zyklus	173
4.1.2.	STAND DER VORARBEITEN	181
4.1.3.	ZIELSETZUNG	185
4.2. METHODEN		187
4.2.1.	REDUKTION VON BENZAMIDOXIM UNTER ANAEROBEN BEDINGUNGEN	187
4.2.2.	HEMMSTUDIEN MIT 5-PROPYL-2-THIOURACIL	187
4.2.3.	SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	188
4.2.3.1.	Substratbindungsspektren mit Schweinelebermikrosomen	188
4.2.3.2.	Substratbindungsspektren mit der gereinigten Benzamidoxim-Reduktase	189
4.3. ERGEBNISSE		190
4.3.1.	REDUKTION VON BENZAMIDOXIM UNTER ANAEROBEN BEDINGUNGEN	190
4.3.2.	EINFLUß DES HEMMSTOFFS 5-PROPYL-2-THIOURACIL	191
4.3.3.	SPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	192
4.3.3.1.	Substratbindungsspektren mit Schweinelebermikrosomen	192
4.3.3.2.	Substratbindungsspektren mit der gereinigten Benzamidoxim-Reduktase	194
4.3.3.3.	Substratbindungsspektren mit dem rekombinanten, gereinigten CYP3A4	196
4.4. DISKUSSION		198
5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK		204
6. ANHANG ÜBER VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE		209
6.1. MATERIALIEN		209
6.2. GERÄTE		211
7. LITERATURVERZEICHNIS		212

1. EINFÜHRUNG IN DIE BIOTRANSFORMATION

1.1. Biotransformationen

Als Biotransformation bezeichnet man die Umwandlung körperfremder Stoffe, die auch als Xenobiotika bezeichnet werden, durch den Organismus [Mutschler, 1997]. Hierdurch kann es zur Änderung der pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften der Arzneistoffe kommen. In den meisten Fällen führt die Biotransformation zu unwirksamen Metaboliten und somit zur Bioinaktivierung. Arzneistoffe können aber auch durch Biotransformation aktiviert werden, wobei entweder schwächer oder stärker (prodrug-Prinzip) wirksame Metaboliten entstehen, oder diese eine völlig andere Wirksamkeit besitzen. Führt die Verstoffwechslung zu toxischen Produkten, wird dieser Vorgang als Biotoxifizierung bezeichnet [Testa, 1996].

Von großer Bedeutung ist die Biotransformation auch im Hinblick auf pharmakokinetische Interaktionen. Arzneistoffe, die Inhibitoren von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen darstellen, können den Metabolismus anderer gleichzeitig verabreichter Wirkstoffe hemmen. Dies führt zu höheren Plasmaspiegeln der betroffenen Verbindungen, die dann toxische Konzentrationen erreichen können [Forth *et al.*, 1998]. Für die Biotransformation spielen ebenso genetische Polymorphismen eine große Rolle, bei denen es zum Auftreten von Patientensubpopulationen kommt, die sich deutlich dadurch unterscheiden, daß sie bestimmte Enzyme nur in sehr geringem Ausmaß, überhaupt nicht oder falsch exprimieren. Dadurch können sie manche Biotransformationen gar nicht oder nur unzureichend ausführen (Abb. 1-1) [Forth *et al.*, 1998]. Im Hinblick auf mögliche auftretende Interaktionen und Polymorphismen ist es folglich für die Arzneistoffentwicklung von großer Bedeutung, das jeweilige Enzymsystem zu identifizieren, welches für die Verstoffwechslung eines Pharmakons verantwortlich ist. Wechselwirkungen mit anderen Arzneistoffen sowie auftretende Toxizitäten lassen sich hierdurch vorhersehen.

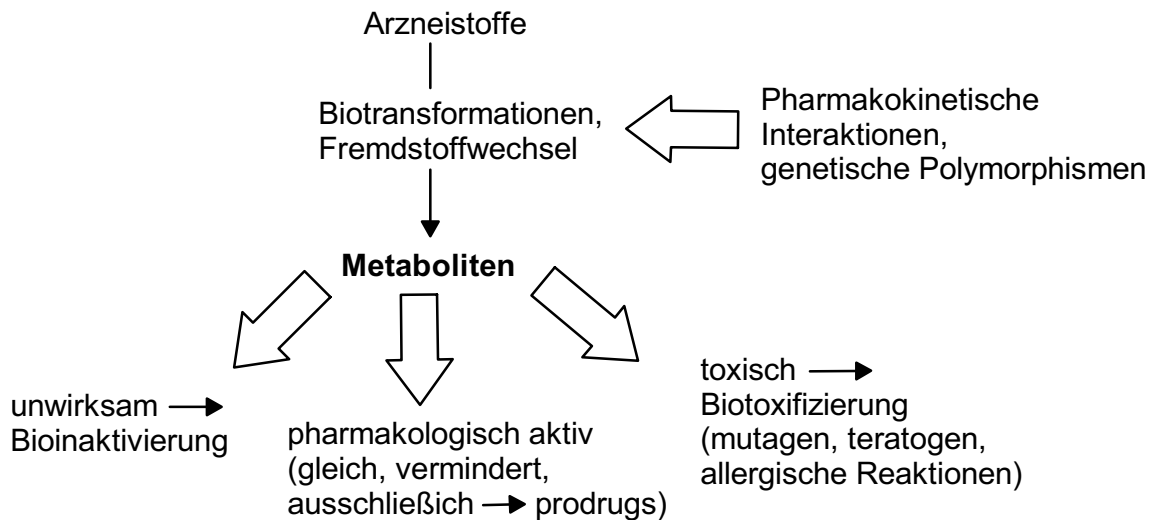


Abb. 1-1. Bedeutung des Fremdstoffwechsels für die Arzneimitteltherapie

Die Biotransformation lässt sich in 2 verschiedene Phasen unterteilen. Innerhalb der Phase I-Reaktionen findet eine Funktionalisierung der Xenobiotika statt. Hier kommt es vorwiegend zu Oxidationsreaktionen, aber auch zu Reduktionen und Hydrolysen von Arzneistoffen. Dabei werden funktionelle Gruppen freigelegt oder eingeführt, an die häufig innerhalb von Phase II-Reaktionen Reste ankonjugiert werden, die aus dem Intermediärstoffwechsel zur Verfügung gestellt werden müssen. Konjugationen mit Glucuronsäure, Schwefelsäure, Aminosäuren oder Glutathion sind die häufigsten Reaktionen. In der Regel führen die Phase II-Reaktionen zu inaktiven und wasserlöslichen Metaboliten, wodurch diese besser ausgeschieden werden können [Mutschler, 1997]. Mittlerweile sind jedoch auch eine Reihe von wirksamen bzw. toxischen Konjugaten beschrieben worden [Testa, 1995]. Eine Übersicht gibt Abbildung 1-2.

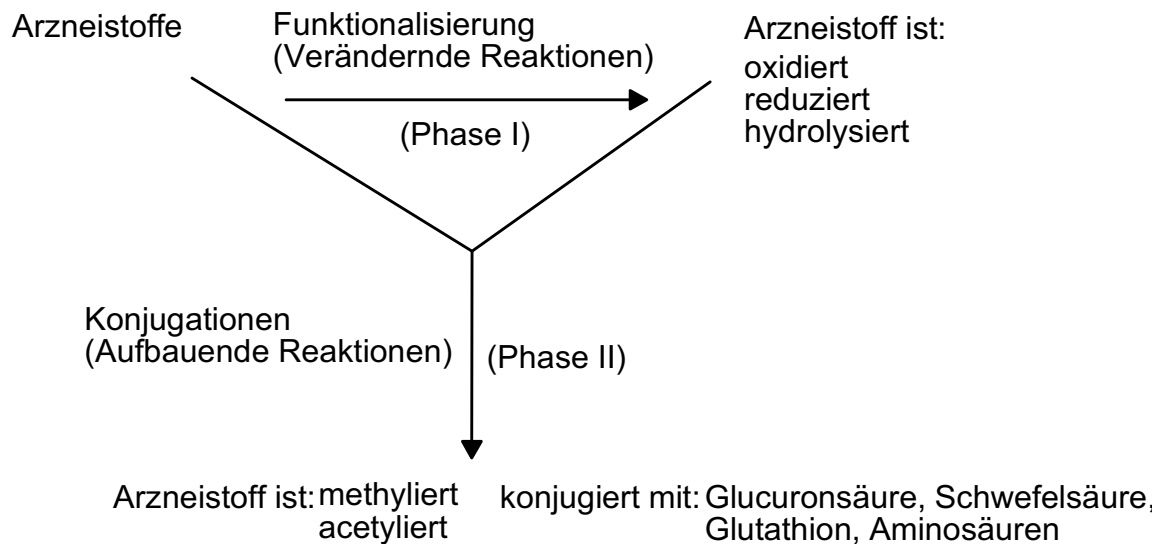


Abb. 1-2. Einteilung der Biotransformation in Phase I- und Phase II-Reaktionen.

In der Biotransformation können zum Teil erhebliche Unterschiede auftreten, wodurch es u.a. zu unterschiedlichen Verträglichkeiten von Arzneistoffen bei verschiedenen Patienten kommt. Ursachen hierfür können z.B. die schon erwähnten genetischen Polymorphismen oder Rassenunterschiede sein, aber auch Alter, Geschlecht, Umweltfaktoren, Krankheiten sowie Ernährung, Rauch- und Trinkgewohnheiten spielen eine Rolle [Testa, 1995].

Die Metabolisierung eines Arzneistoffs bzw. Arzneistoffkandidaten kann auf unterschiedliche Weise verfolgt werden. Entweder werden die Biotransformationsvorgänge direkt *in vivo* untersucht, wodurch Tierversuche nicht vermieden werden können, oder es werden entsprechende *in vitro* Methoden verwendet. Hierzu gehören Studien an isolierten perfundierten Organen, Organdünnschnitten („liver slices“), Zellsystemen (Hepatozyten), Zellfraktionen (Mikrosomen und Mitochondrien) sowie Studien mit rekonstituierten Enzymsystemen [Wateman und Johnson, 1991]. Diese *in vitro*-Methoden dienen ebenfalls zur Aufklärung von enzymatischen Grundlagen metabolischer Umwandlungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Biotransformationsstudien ausschließlich mit Lebermikrosomen und rekonstituierten Enzymsystemen durchgeführt. Mikrosomen stellen kleine zu Vesikeln zusammengelagerte Bruchstücke des Endoplasmatischen Retikulums (ER) dar, die durch differentielle Ultrazentrifugation gewonnen werden. Im ER befinden sich die meisten fremdstoffmetabolisierenden Enzyme in der

Membran verankert. Mikrosomen bieten den Vorteil der einfachen Gewinnung und Robustheit, sind aber wenig spezifisch aufgrund der zahlreichen hier vorhandenen Enzymsysteme. Für die Arbeit mit rekonstituierten Systemen müssen die einzelnen für die Enzymaktivität verantwortlichen Proteine zunächst isoliert werden, um anschließend unter Versuchsbedingungen wieder zusammengesetzt zu werden.

Biotransformationen finden in erster Linie in der Leber statt. Enzymaktivitäten sind aber in fast allen Organen nachzuweisen, besonders in der Niere, Lunge, Haut, Plazenta, Gehirn und im Intestinum. Nicht zu vergessen ist auch die Biotransformation durch die mikrobielle Darmflora, die hier vor allem für Reduktionen und Hydrolysen verantwortlich ist [Mutschler, 1997] .

1.2. Enzyme der Biotransformation

1.2.1. Allgemeine Übersicht

Die Metabolisierung von Xenobiotika erfolgt überwiegend enzymatisch. Spontan ablaufende Reaktionen, die nicht durch Enzyme katalysiert werden, spielen eine sehr untergeordnete Rolle. Hauptmetabolisierungsort ist, wie bereits erwähnt, die Leber, die auch als erstes Organ von oral applizierten Arzneistoffen passiert werden muß. Direkt nach der Resorption erfolgen hier wichtige Biotransformationen wie Entgiftungsreaktionen [Mutschler, 1997].

Die an der Phase I-Biotransformation beteiligten Enzyme sind vor allem im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, aber auch im Cytosol und den Mitochondrien befinden sich einige wichtige Enzymsysteme. Die wichtigsten Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums sind die Cytochrom P450 Monooxygenasen (EC 1.14.14.1) [Guengerich, 1987], die Epoxidhydrolase (EC 4.2.1.63) [Bonse und Metzler, 1978], die flavinhaltige Monooxygenase (EC 1.14.13.8) [Ziegler, 1988] sowie die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase (EC 1.6.2.4) [Nebert und Gonzales, 1987]. Im Cytosol befinden sich unter anderem die Alkohol (EC 1.1.1.1.) und die Aldehyddehydrogenase (EC 1.2.1.3), die Xanthinoxidase (EC 1.2.3.2) sowie verschiedene Esterasen und Monoaminoxidasen [Bonse und Metzler, 1978]. In den

Mitochondrien befinden sich ebenfalls Phase I-Reaktionen katalysierende Enzyme wie Esterasen, Monoaminoxidasen (EC 1.4.3.4) und einige Cytochrom P450 Monooxygenasen [Bonse und Metzler, 1978].

Zu den Phase II-Reaktionen katalysierenden Enzymen gehören die im Endoplasmatischen Retikulum verankerten UDP-Glucuronyltransferasen (EC 2.4.1.17) [Ruckpaul und Bernhardt, 1984] und einige Methyltransferasen (EC 2.1.1.X) [Bonse und Metzler, 1978]. Im Cytosol befinden sich *N*-Acetyltransferasen (EC 2.3.1.X), Sulfotransferasen (EC 2.8.2.X) sowie Glutathion-S-Transferasen (EC 2.5.1.18), die ebenfalls an der Phase II-Biotransformation beteiligt sind.

1.2.2. Cytochrom P450

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit Phase I-Biotransformationen, die durch Cytochrom P450 katalysiert werden. Cytochrom P450 bildet eine Supergenfamilie, die in fast allen Organismen vorkommt, mit über 500 verschiedenen Isoenzymen [Lewis and Pratt, 1998]. Bei allen Säugetieren handelt es sich um membranständige Enzyme, die vor allem in Leberzellen lokalisiert sind. P450 ist hier in hoher Konzentration in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankert, einige Isoenzyme befinden sich aber auch in der Mitochondrienmembran [Lewis and Pratt, 1998].

Cytochrom P450 Isoenzyme sind Hämoproteine mit einem Molekulargewicht von 45 bis 55 kDa, die aus nur einer Peptidkette mit etwa 400-500 Aminosäuren und einem Eisen-Protoporphyrin IX Hämgerüst als prosthetischer Gruppe bestehen [Goepfert *et al.*, 1995]. Die Polypeptidkette setzt sich zusammen aus einem lipophilen Anteil, der das Enzym in der Membran verankert, und einer dem Cytosol zugewandten hydrophilen Seite. Das Häm besitzt ein Eisen als Zentralatom, das zwischen verschiedenen Oxidationsstufen wechseln kann. Vier Stickstoffe von jeweils vier Pyrrolen des Porphyringerüsts bilden eine stabile Ligandenbindung zum Eisen aus. Das Hämgerüst wird mit dem restlichen Apoprotein über den Schwefel eines Cysteinrests verknüpft, der den fünften Liganden des Zentralatoms darstellt. Die sechste Koordinationsstelle des Eisens kann entweder durch Wasser, Sauerstoff,

Kohlenmonoxid, Cyanid, *N*-/S- und *O*-haltige Verbindungen oder gar nicht besetzt werden. Diese Hämbindungsseite ist in allen Isoenzymen hochkonserviert (Abb. 13).

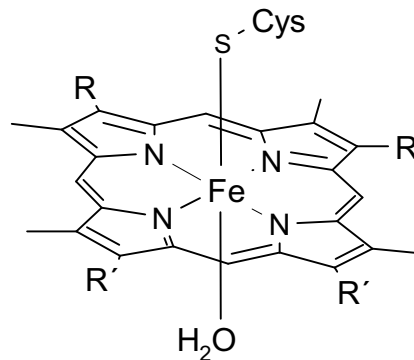


Abb. 1-3. Hämbindungsseite von Cytochrom P450.

Die einzelnen Isoenzyme unterscheiden sich lediglich in der Aminosäuresequenz ihres Apoproteins [Testa, 1995], auf die sich auch die heutige Nomenklatur gründet. Die Einteilung der P450-Enzyme erfolgt in Familien durch arabische Ziffern, Unterfamilien durch Großbuchstaben und in einzelne Isoenzyme wieder durch arabische Ziffern. Besitzen zwei Isoenzyme mindestens 40 % Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz, werden sie einer Familie zugeordnet. Bei mehr als 59 % Homologie gehören sie der gleichen Unterfamilie an [Nelson, 1999]. So ist das CYP2A6 zum Beispiel ein Mitglied der Familie 2 sowie der Unterfamilie A, während die 6 das Isoenzym bezeichnet. Seit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms sind sämtliche P450-Gene des Menschen bekannt [Venter *et al.*, 2001]. Dennoch konnte ein Teil der zugehörigen Genprodukte noch nicht charakterisiert werden.

Die einzelnen P450-Isoenzyme unterscheiden sich weiterhin durch ihre Substratspezifität, die teilweise überlappend ist. Ein Substrat kann von mehreren Enzymen in gleicher Weise umgesetzt werden, wobei meist ein Isoenzym das potenteste ist [Testa, 1995]. Für jedes P450 gibt es eine sogenannte Markerreaktion, d.h. die Umsetzung eines Substrates erfolgt nur durch dieses Isoenzym. Somit kann man die Aktivitäten einzelner Isoenzyme in einem Enzymgemisch, wie es z.B. in Mikrosomen vorliegt, bestimmen.

Cytochrom P450 besitzt hauptsächlich Monooxygenase-Eigenschaften (Abb. 1-4). Die Elektronen für die mikrosomale Oxygenierung werden schrittweise durch die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase, die ebenfalls im Endoplasmatischen Retikulum

verankert ist, auf das CYP450 übertragen. Bei diesem Elektronentransfer ist auch Cytochrom b_5 beteiligt. Die P450-Enzyme liegen eingebettet in die Phospholipidmembran als hexamere Strukturen vor, die wahrscheinlich mit ihrer Reduktase assoziiert sind [Lewis and Pratt, 1998]. Die Elektronenübertragung auf mitochondriales P450 erfolgt durch andere Transportmechanismen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll. Durch die Einführung eines Sauerstoffs kommt es unter anderem zur Epoxidierung von Aromaten und Alkenen, zu aliphatischen und aromatischen Hydroxylierungen, *N*- und *S*-Oxidationen, *N*-Hydroxylierungen sowie *N*- und *S*-Desalkylierungen.

Neben Monooxygenase-Aktivitäten weisen Cytochrom P450 Enzyme auch Oxidase sowie Peroxidase-Aktivitäten auf (Abb. 1-4).

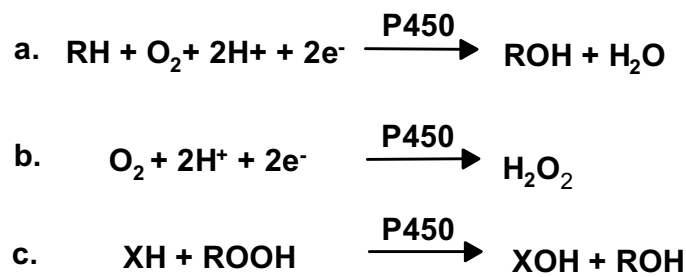


Abb. 1-4. Cytochrom P450 katalysierte Oxidationsreaktionen: a. Monooxygenase-Aktivität, b. Oxidase-Aktivität, c. Peroxidase-Aktivität.

Auch Reduktionen werden unter anaeroben Bedingungen durch P450 katalysiert, spielen aber eher eine untergeordnete Rolle. Die aerobe Reduktion bestimmter stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen hat sich jedoch sowohl *in vivo* als auch *in vitro* als ausgeprägt erwiesen. Insgesamt werden etwa 60 verschiedene Biotransformationsreaktionen von Cytochrom P450 durchgeführt [Lewis and Pratt, 1998].

P450 Enzyme metabolisieren aber nicht nur eine Vielzahl von Xenobiotika sondern auch zahlreiche endogene Substrate wie Steroide, Prostanoiden, Eicosanoide, fettlösliche Vitamine, Fettsäuren sowie Säugetieralkaloide [Goepfert *et al.*, 1995]. Je spezieller dabei die Aufgabe des Enzyms im endogenen Stoffwechsel ist, desto geringer ist die Substratbandbreite. Am katabolen Stoffwechsel beteiligte P450-Enzyme setzen jedoch eine Vielzahl an Substraten um [Poulos, 1995].

Zu den hauptsächlich am Fremdstoffmetabolismus beteiligten P450Isoenzymen gehören unter anderem CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4 [Guengerich, 2001]. Einige dieser Isoenzyme lassen sich durch bestimmte Arzneistoffe oder durch andere chemische Verbindungen induzieren. Hierdurch wird eine verstärkte Expression dieser Proteine verursacht, durch die es zu einer Interaktion mit anderen Pharmaka kommen kann. Deren rascherer Abbau führt meistens zu einer Wirkungsverkürzung.

Die einzelnen Isoenzyme der P450-Familie unterscheiden sich aber nicht nur in ihrer Aminosäuresequenz, Substratspezifität sowie ihrer unterschiedlichen Induzierbarkeit, sondern auch in ihrer Inhibition. Es gibt unspezifische Inhibitoren, welche die Aktivität der meisten P450 Enzyme hemmen. Hierzu gehören unter anderem die Cyanid Ionen, die anstelle des Sauerstoffs an das Hämeisen binden und so die Monooxygenierung unterbinden [Ortiz de Montellano, 1995]. Es existiert aber auch eine Vielzahl von Inhibitoren, die nur einige oder sogar ein einzelnes Isoenzym zu hemmen vermögen.

Trotz der zahlreichen Gemeinsamkeiten der P450-Enzyme, wie z.B. der katalytische Mechanismus der Oxygenierung sowie der Elektronenübertragung durch die P450-Reduktase, lassen sich auch sehr viele Unterschiede der einzelnen Isoenzyme erkennen. Diese können zu ihrer näheren Charakterisierung in Biotransformationsstudien herangezogen werden.

1.3. Biotransformationen stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen

1.3.1. Oxidation stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen

Die Oxidation stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen führt entweder zu *N*- oder zu *C*-oxygenierten Metaboliten. Im Falle der *N*-Desalkylierung bzw. *N*-Desaminierung entsteht die freie Aminogruppe und das *C*-oxygenierte Produkt. Bei der *N*-Oxygenierung wird der Sauerstoff direkt an den Stickstoff gebunden und entweder ein *N*-Oxid oder ein *N*-Hydroxid gebildet. Die Rückreduktion dieser Metaboliten ist möglich, wird jedoch durch andere Enzymsysteme katalysiert (Abb. 1-5).

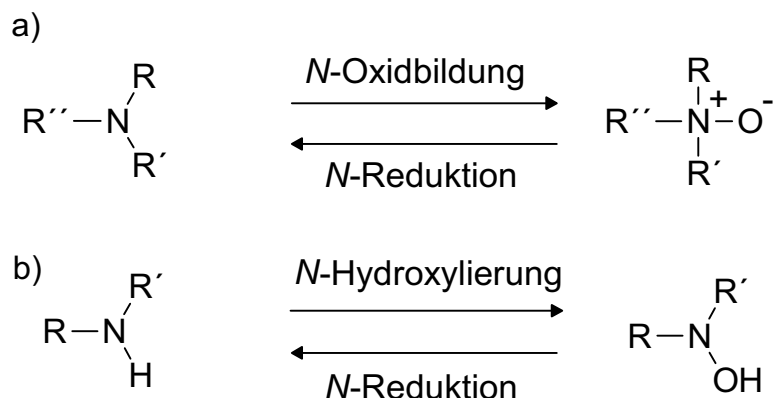


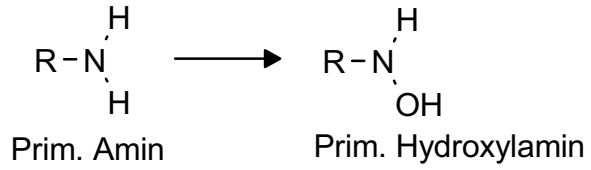
Abb. 1-5. Bildung a) der N-Oxide und b) der N-hydroxylierten Verbindung sowie deren Rückreduktion [Clement, 1998].

N-Oxygenierungen zu N-Oxiden oder N-hydroxylierten Verbindungen werden hauptsächlich durch Cytochrom P450 oder die Flavinhaltige Monooxygenase (FMO) katalysiert. Beide führen ein Sauerstoffatom in das Substrat ein, während das zweite Sauerstoffatom in einem Molekül Wasser eingebunden wird. Hierbei ist NADPH das bevorzugte Cosubstrat. Sowohl P450 als auch FMO führen zu den gleichen Produkten, verwenden dabei aber unterschiedliche Katalysemechanismen [Testa, 1995].

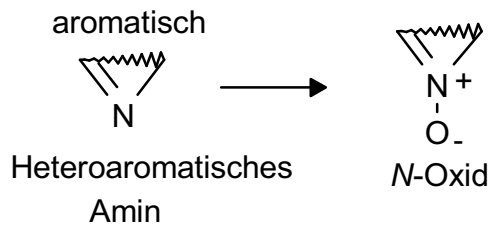
P450 oxidiert primäre und auch heteroaromatische Amine zu den entsprechenden Hydroxylaminen. N-Arylamide werden zu Hydroxamsäurederivaten oxygeniert. Aus Substanzen mit N=N oder C=N Doppelbindungen wie Azoverbindungen, Iminen, Amidinen oder Guanidinen entstehen die entsprechenden N-oxygenierten Verbindungen. Typische durch Cytochrom P450 katalysierte N-Oxygenierungen sind in Abbildung 1-6 zusammengefasst. Ein Sauerstoffatom kann jedoch nicht in jede Stickstofffunktion eingefügt werden. Cyclische Amide und Imide, wie sie z. B. in Barbituraten und Hydantoinen vorkommen, werden nicht am Stickstoff oxygeniert [Clement, 1998].

Amine

Primäre Amine:

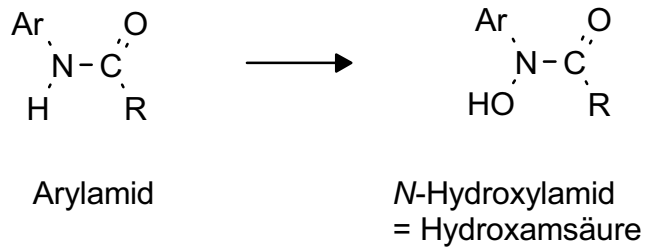


Tertiäre heteroaromatische Amine

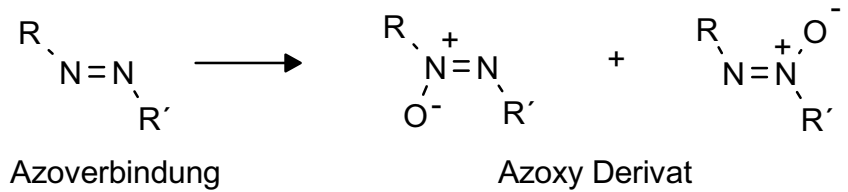


Amide

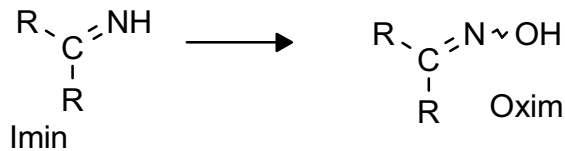
N-Arylamide:



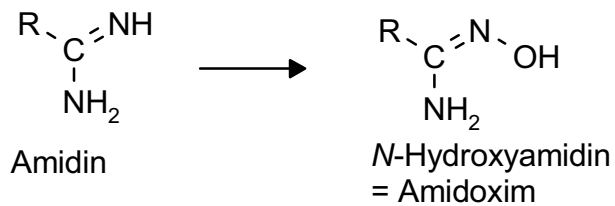
Azoverbindungen:



Imine:



Amidine:



Guanidine und Amidinohydrazone:

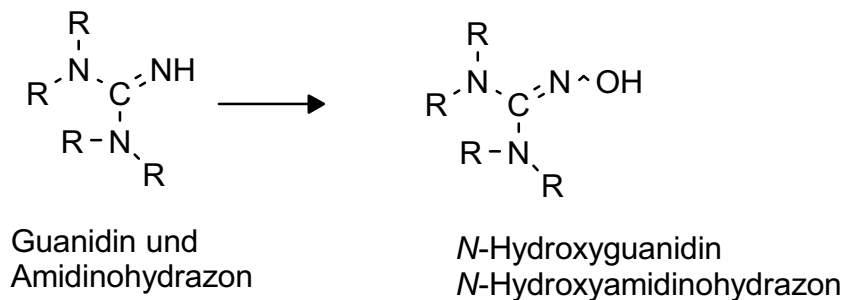


Abb. 1-6. Cytochrom P450 katalysierte N-Oxygenierungen [Clement, 1998].

Die *N*-Oxygenierung stark basischer funktioneller Gruppen wie in Amidinen und Guanidinen konnte erstmals von Clement *et al.* [1983] gezeigt werden. Diese Verbindungen liegen aufgrund ihrer sehr hohen Basizität unter physiologischen Bedingungen überwiegend protoniert vor und sind dadurch sehr hydrophil. Trotz dieser Eigenschaften konnte die *N*-Hydroxylierung dieser gut wasserlöslichen Verbindungen durch P450 nachgewiesen werden. Guanidine sind noch stärkere Basen als Amidine, da die durch Protonierung bedingte positive Ladung über drei Stickstoffatome mesomeriestabilisiert werden kann [Clement, 1998].

Ähnliche Strukturen wie Amidinohydrazone oder auch Aminoguanidine, an denen die Guanidinstruktur an einen weiteren Stickstoff gebunden ist, können ebenfalls *N*-hydroxyliert werden. Der Nachweis der *N*-oxygenierten Metaboliten *in vivo* ist schwierig, da eine ausgeprägte Rückreduktion zu den Amidinen und Guanidinen stattfindet. Wie bereits erwähnt wird die Reduktion dabei durch andere Enzyme katalysiert als die Oxidation. In Abbildung 1-7 ist die *N*-Hydroxylierung von Amidinen, Guanidinen sowie Amidinohydrasonen dargestellt [Clement, 1998].

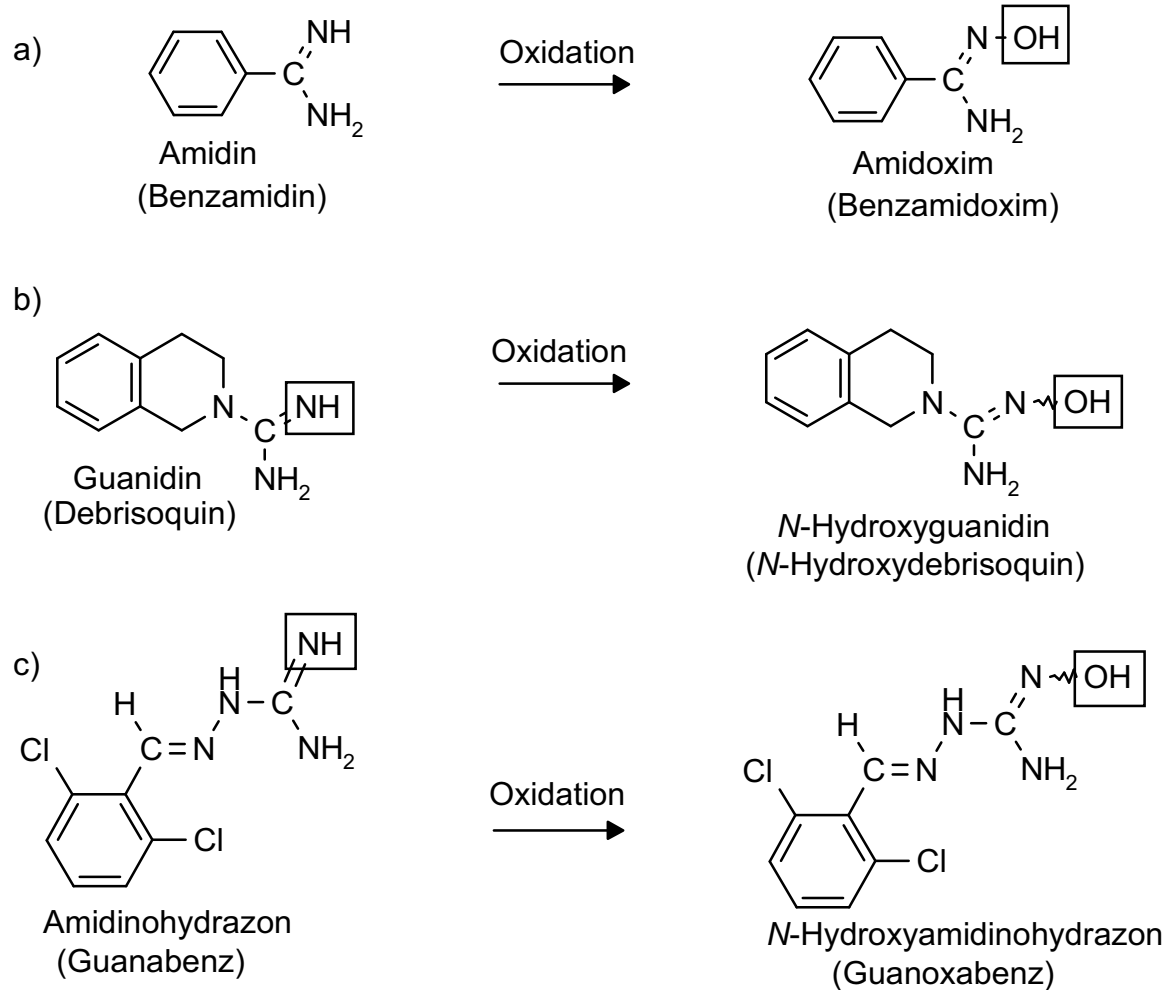


Abb. 1-7. N-Hydroxylierung von a) Amidinen, b) Guanidinen und c) Amidinohydrazonen [Clement, 1998].

1.3.2. Reduktion stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen

Reduktionen von Xenobiotika sind im allgemeinen weniger gut untersucht als deren Oxidationen. Der aerobe Stoffwechsel von Säugetieren und das hohe Redoxpotential in den Zellen bewirken eine generelle Bevorzugung der Oxidationsreaktion. Daher konnten viele der untersuchten Reduktionen auch nur unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen werden [Testa, 1995]. Aufgrund der guten Sauerstoffversorgung des Organismus ist ihre *in vivo* Relevanz jedoch fraglich. Auch die Reduktion stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen durch Cytochrom P450 wurde bisher lediglich

unter Sauerstoffausschluß beschrieben. Der Nachweis aerob ablaufender reduktiver Biotransformationen gelang nur für andere Enzymsysteme.

Mittlerweile konnte jedoch im Arbeitskreis Clement die Reduktion verschiedener *N*-hydroxylierter Verbindungen durch Cytochrom P450 unter aeroben Bedingungen gezeigt werden. Amidoxime, *N*-Hydroxyguanidine, *N*-Hydroxyamidinohydrazone sowie *N*-Methylhydroxylamin werden in Schweineleber durch das gleiche Enzymsystem reduziert (Abb. 1-8) [Clement, 1998], das von Lomb und Möller identifiziert werden konnte. Es handelt sich um ein aus der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase, Cytochrom b_5 und dem Cytochrom P450 Isoenzym 2D (Benzamidoxim-Reduktase) zusammengesetztes Enzymsystem [Clement *et al.*, 1997]. Ähnliche bisher noch nicht näher charakterisierte Enzymsysteme, die ebenfalls in der Lage sind *N*-hydroxylierte Verbindungen zu reduzieren, wurden in Mitochondrien [Deters, 2002] sowie in anderen Organen als der Leber (Niere, Lunge, Gehirn, Darm) [Mau, 2002] gefunden.

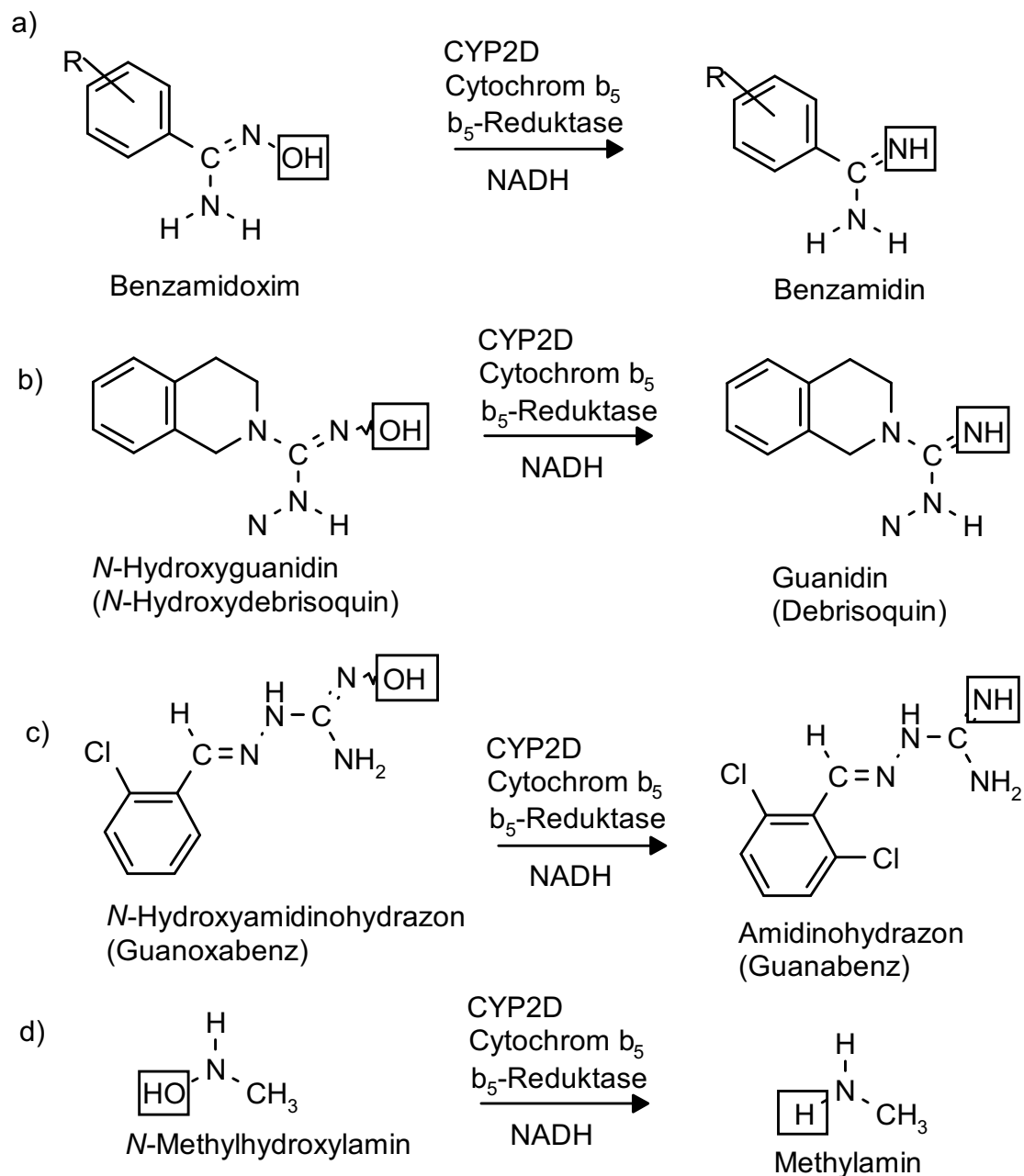


Abb. 1-8. Reduktion a) von Benzamidoxim, b) eines *N*-Hydroxyguanidins, c) eines *N*-Hydroxyamidinohydrazons und d) von *N*-Methylhydroxylamin durch das aus Schweineleber isolierte *N*-reduktive Enzymsystem aus Cytochrom b_5 , b_5 -Reduktase und CYP2D unter aeroben Bedingungen [Clement, 1998].

Eine Hydroxylamin-Reduktase wurde beschrieben, die ebenfalls unter aeroben Bedingungen Hydroxylamine zu den entsprechenden Aminen umsetzen kann. Auch dieses Enzymsystem setzt sich aus drei Komponenten zusammen, der NADH

Cytochrom b_5 Reduktase, Cytochrom b_5 und einer dritten nicht identifizierten Komponente [Kadlubar und Ziegler 1974]. Ein Vergleich der Benzamidoxim-Reduktase mit der Hydroxylamin-Reduktase ergab zahlreiche Übereinstimmungen der Enzymsysteme. Hierbei fiel auf, daß beide die für die Reduktion notwendigen Elektronen vom Cytochrom b_5 und der b_5 -Reduktase erhalten, wobei NADH das bevorzugte Cosubstrat darstellt. Weiterhin wird die Reduktion durch Sauerstoff nicht gehemmt. Das pH-Optimum der Reaktion ist für beide Enzyme in den leicht sauren Bereich nach pH 6.3 verschoben [Kadlubar und Ziegler, 1974].

Cribb *et al.* [1995] publizierten die Reduktion von Sulfamethoxazolhydroxylamin durch die NADH-abhängige Hydroxylamin-Reduktase in humanen Lebermikrosomen, die käuflich zu erwerben waren. Die gleiche Mikrosomenpräparation wurde zur Testung der Reduktion von Benzamidoxim herangezogen. Der Vergleich der Umsetzungsraten der Reduktion von Benzamidoxim und Sulfamethoxazolhydroxylamin ergab eine sehr hohe Korrelation. Daraus wurde gefolgert, daß beide Substrate wahrscheinlich durch das gleiche Enzymsystem umgesetzt werden [Clement *et al.*, 1997].

Neben Hydroxylaminen und *N*-Oxiden sowie Amidoximen werden auch weitere stickstoffhaltige Substrate wie Azoverbindungen, Nitro- und Nitroverbindungen sowie Oxime durch unterschiedliche mikrosomale, cytosolische und mitochondriale Enzymsysteme reduziert. Tabelle 1-1 gibt eine Übersicht über bekannte *N*-reduktive Biotransformationen und die daran beteiligte Enzymsysteme.

Wie bereits erwähnt sind Mikroorganismen des Gastrointestinal-Traktes ebenfalls in der Lage, Xenobiotika zu reduzieren. Der Hauptort reduktiver Biotransformationen ist jedoch die Leber [Hewick, 1982]. Reduzierende Enzyme finden sich hier im Cytosol, den Mitochondrien und im Endoplasmatischen Retikulum. In allen Zellkompartimenten liegen Enzyme vor, die die *N*-Reduktionen von Xenobiotika sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen katalysieren können. Welche der in Tabelle 1-1 aufgeführten anaerob ablaufenden Biotransformationen tatsächlich *in vivo* auftreten und in welchem Ausmaß, ist jedoch fraglich. Die Leber wird als Hauptmetabolisierungsort permanent von sauerstoffreichem Pfortaderblut durchspült, so daß eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet ist. Die Reduktion von Xenobiotika steht jedoch in Konkurrenz zu den nur aerob ablaufenden Oxidationen,

die im allgemeinen durch die in der Leber herrschenden Bedingungen bevorzugt werden.

Tabelle 1.1. gibt weiterhin Aufschluß darüber, daß ein bestimmtes Substrat von mehreren Enzymen umgesetzt werden kann, aber auch umgekehrt ein einziges Enzym unterschiedliche Substrate zu metabolisieren vermag.

In der Tabelle aufgeführt sind nur die in Mikrosomen sowie im Cytosol auftretenden *N*-Reduktionen. *N*-reduktive Biotransformationen in Mitochondrien werden im Rahmen einer weiteren Dissertation im Arbeitskreis Clement untersucht [Deters, 2002].

Tab. 1-1. An der Reduktion stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen beteiligte Enzyme.

Mikrosomale Enzyme

Enzym	Elektronen- donator	Sauerstoff- bedingungen	Funktionelle Gruppe	Literatur	
Cytochrom P450	NADPH	anaerob	N-Oxide	Kato <i>et al.</i> , 1978	
	NADH		arom.Nitro-Verb.	Hewick, 1982	
	FAD		Azo-Verb.	Stoddard, Levine, 1992	
	FMN		Nitroxide	Rosen <i>et al.</i> , 1977	
	Riboflavin			1,2-Isoxazole	Nakasa <i>et al.</i> , 1993
				org. Nitrate	Delaforge <i>et al.</i> , 1993
				Nitrosamine	Scheper <i>et al.</i> , 1991
				Azoxy-Verb.	Zbaida <i>et al.</i> , 1992
				quartäre N-Verb.	Harrelson, Mason, 1982
				Nitroimidazole	Aboagye <i>et al.</i> , 1997
	anaerob/aerob	Azid-Verb.	Cretton <i>et al.</i> , 1993		
NADPH- Cytochrom P450 Reduktase	NADPH	anaerob	Nitro-Verb.	Hewick, 1982	
			Azoxy-Verb.	Zbaida <i>et al.</i> , 1992	
			quartäre N-Verb.	DeGray <i>et al.</i> , 1991	
			anaerob/aerob	Azid-Verb.	Cretton <i>et al.</i> , 1993
Hydroxylamin- Reduktase	NADH	aerob	Aliphatische Hydroxylamine	Kadlubar, Ziegler, 1974	
Benzamidoxim- Reduktase	NADH	aerob	Amidoxime	Clement <i>et al.</i> , 1988a	
			Hydroxylamine N-hydroxylierte Guanidine und Amidino- hydrazone	Clement <i>et al.</i> , 1997	

Tab. 1-1. Fortsetzung

Cytosolische Enzyme

Enzym	Elektronen- donator	Sauerstoff- bedingungen	Funktionelle Gruppe	Literatur
Xanthin-Oxidase/ Dehydrogenase	NADH	anaerob/ aerob	Hydroxylamine <i>N</i> -Oxide Nitro-Verb. quartäre <i>N</i> -Verb. S-Nitroso-Thiole	Clement, Kunze, 1992 Beedham, 1985 Nakao <i>et al.</i> , 1991 DeGray <i>et al.</i> , 1991 Trujillo <i>et al.</i> , 1998
Aldehyd Oxidase	NADH NADPH N-MN ^a 2-HP ^b	anaerob	<i>N</i> -Oxide Hydroxamsäuren Azo-Verb. Nitrosamine Nitro-Verb. Oxime	Beedham, 1985 Sugihara, Tatsumi, 1986 Beedham 1985; McLane <i>et al.</i> , 1983 Tatsumi <i>et al.</i> , 1983 Tatsumi, Amano, 1987 Tatsumi, Ishigai, 1987
DT-Diaphorase	NADH NADPH	aerob	Nitroso-Verb. Azo-Verb. Nitro-Verb. <i>N</i> -Oxide	Hajos, Winston, 1992 McLane <i>et al.</i> , 1983 Hewick, 1982 Riley, Workman, 1992
Lipoamid- Dehydrogenase	NADH	aerob	Nitro-Verb.	McLane, 1982
Alkohol- Dehydrogenase	NADH	aerob	Nitroso-Verb.	Kuwada <i>et al.</i> , 1980
<i>N,N</i> -Dimethyl- <i>p</i> - Aminoazobenzol- <i>N</i> -Oxid-Redukt.	NADPH	aerob	spezifisch	Lashmet-Johnson, Ziegler, 1988

^a *N*-Methylnicotinamid, ^b 2-Hydroxypyrimidin

Tab. 1-1. Fortsetzung

Cytosolische Enzyme

Enzym	Elektronen- donator	Sauerstoff- bedingungen	Funktionelle Gruppe	Literatur
<i>N</i> -Hydroxy-2- Acetylamino- fluoren- Reduktase	NADH NADPH Cystein, GSH ^c , DTT ^d	anaerob/aerob	spezifisch	Kitamura, Tatsumi, 1985

^c Glutathion, ^d Dithiothreitol

Mikrosomales, cytosolisches und mitochondriales Enzymsystem

Enzym	Elektronen- donator	Sauerstoff- bedingungen	Funktionelle Gruppe	Literatur
Chinon- Reduktase	NAD(P)H/ Chinon	anaerob	<i>N</i> -Oxide	Kitamura <i>et al.</i> , 1999

1.4. Physiologische Bedeutung der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen

Biotransformationen stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen sind von hoher toxikologischer und pharmakologischer Relevanz. *N*-hydroxylierte Verbindungen besitzen oft genotoxische Eigenschaften, besonders die *N*-Oxygenierung schwach basischer Arzneistoffe kann zu den toxischen Produkten führen. So führt die *N*-Hydroxylierung von primären aromatischen Aminen und *N*-Acetyl-substituierten Säureamiden zu mutagenen Metaboliten. Benzamidoxim zeigte ebenfalls im Ames Test eine geringe Mutagenität und verursachte Einzelstrangbrüche in Rattenhepatozyten sowie DNA-Amplifikationen in transformierten Hamsterzellen [Clement *et al.*, 1988b]. Guanoxabenz, ein *N*-hydroxyliertes Guanidinderivat, erwies sich ebenfalls als mutagen im Ames-Test [Clement *et al.*, 1996]. Für die als prodrugs

entwickelten Amidoxime hingegen wurde bisher keine Mutagenität nachgewiesen. Für aromatische Amine ist der Weg der Biotoxifizierung aufgeklärt.

Der erste Schritt der metabolischen Aktivierung ist die *N*-Hydroxylierung der Amin- und Amidfunktion von Arylamiden, Arylaminen und Aminoazoheterocyclen. Dabei entstandene Hydroxylamine können durch Phase II Biotransformationen mit verschiedenen Säureresten konjugiert werden. Die gebildeten Ester sind jedoch instabil und zerfallen rasch zu Arylnitrenium-Ionen, welche an DNA-Moleküle binden können und somit ein mutagenes oder karzinogenes Potential besitzen (Abb.19) [Hoffmann und Fuchs, 1997].

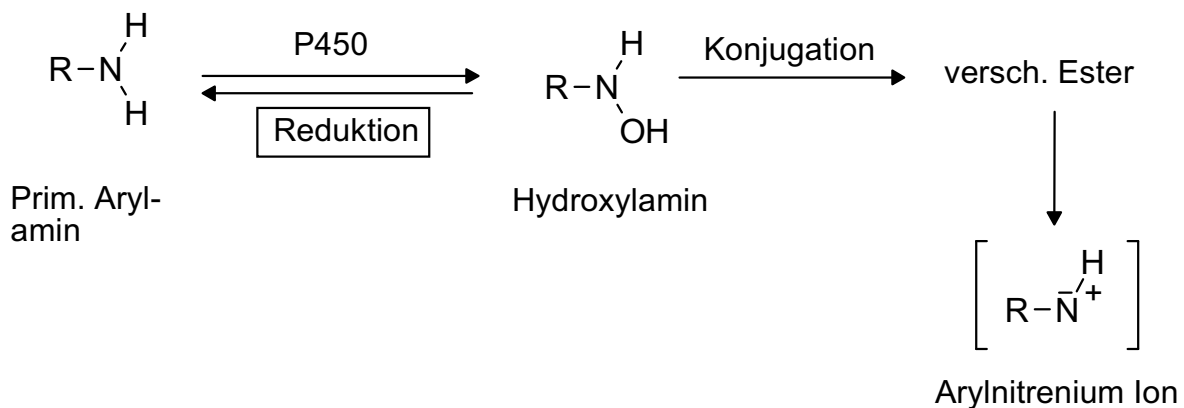


Abb. 1-9. Metabolische Aktivierung von mutagenen und karzinogenen primären Arylaminen und Aminoazoheterocyclen [Clement, 1998].

Ob *N*-hydroxylierte Derivate von stark basischen funktionellen Gruppen wie Amidoxime in ähnlicher Weise biotoxifiziert werden können, ist bisher nicht bewiesen worden. Das Sulfat und Glucuronid des Benzamidoxims (siehe Abb. 1-11) erwiesen sich als nicht mutagen im Ames-Test [Clement *et al.*, 2001], die Acetylverbindung zeigte hingegen mutagene Eigenschaften [Sabine Linne, 1996]. Trotzdem kann die Reduktion *N*-hydroxylierter Derivate als Detoxifizierung angesehen werden.

Die schnelle Rückreduktion der *N*-hydroxylierten Metaboliten zu den untoxischen Ausgangsverbindungen stellt somit einen effizienten Detoxifizierungsmechanismus dar. *In vivo* (Kaninchen und Ratte) konnte z.B. eine rasche Reduktion von

Benzamidoxim zum Benzamidin nachgewiesen werden. Die Ausgangsverbindung war nach oraler Gabe nur in sehr geringen Mengen und nur nach Vorbehandlung der Proben mit Glucuronidase sowie Sulfatase zu detektieren [Clement *et al.*, 1993a]. Die rasche Rückreduktion schützt den Körper vor der metabolischen Aktivierung *N*-hydroxylierter Verbindungen zu potentiell karzinogenen oder mutagenen Arylnitrenium-Ionen. Es wird diskutiert, daß nur solche Amine eine karzinogene Wirkung entfalten können, die schlecht oder gar nicht von dem reduktiven Enzymsystem umgesetzt werden und so der Detoxifizierung entgehen [Clement, 1998].

Biotransformationen am Stickstoff zeigen ebenfalls, wie bereits erwähnt, eine hohe pharmakologische Bedeutung. Zahlreiche Arzneistoffe besitzen eine Amidinfunktion, die jedoch aufgrund ihrer starken Basizität ($pK_a \sim 11-12$) bei physiologischem pH-Wert überwiegend als protoniertes, mesomeriestabilisiertes Amidiniumkation vorliegt. Die dadurch bedingte Hydrophilie dieser Verbindungen führt zu einer schlechten Resorption des Arzneistoffs nach oraler Gabe und damit zu einer schlechten Bioverfügbarkeit. Die entsprechenden *N*-hydroxylierten Verbindungen (Amidoxime) besitzen eine geringere Basizität ($pK_a \sim 4-5$). Sie liegen bei physiologischem pH-Wert überwiegend nicht protoniert vor und werden daher wesentlich besser resorbiert. Hierdurch kann die orale Bioverfügbarkeit erheblich gesteigert werden. Da Amidoxime *in vivo* rasch zu Amidinen reduziert werden, kann man diese *N*-Hydroxyamide als sogenannte Prodrugs einsetzen. Prodrugs sind pharmakologisch inaktive Verbindungen, die durch meist fremdstoffmetabolisierende Enzyme (häufig Phase I) in den aktiven Wirkstoff überführt werden.

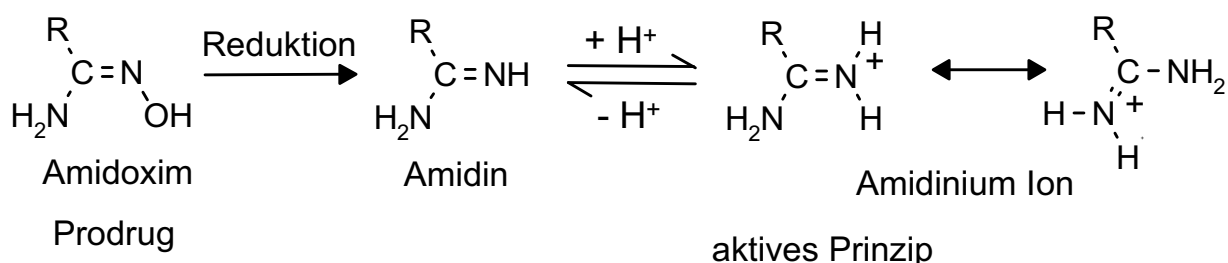


Abb. 1-10. Prinzip der Amidoxime als Prodrugs von Amidinen.

Das Konzept der Amidoxime als prodrugs für Amidine wurde erstmals für das Pentamidin entwickelt [Clement *et al.*, 1992; Clement, 1993]. Das Diamidoxim des Pentamidins (Pentoxim) wird nach oraler Gabe *in vivo* (Ratte) rasch zum Pentamidin reduziert, welches daraufhin seine Wirkung gegen Trypanosomen-Infektionen, *Leishmania donovani* (Schlafkrankheit) und *Pneumocystis carinii*-Infektionen entfalten kann. Die zusätzliche Acetylierung der beiden Amidoximfunktionen des Pentoxims verbessert zum einen die Lipophilie der Verbindung, zum anderen bietet sie einen weiteren Metabolisierungsschutz, wodurch die orale Bioverfügbarkeit noch weiter gesteigert werden konnte. Die Biotransformation des Pentoximesters zum Pentamidin konnte *in vivo* im Experiment an Ratten gezeigt werden [Rieckert, 1999].

Das für Pentamidin entwickelte prodrug-Prinzip wurde mittlerweile auf viele andere Arzneistoffkandidaten übertragen. Amidine sind u.a. Bestandteile blutgerinnungshemmender Pharmaka. Das Doppelprodrug Sibrafiban ist ein Glycoprotein IIb/IIIa Rezeptor-Antagonist der Firma Hoffmann La Roche mit einer Amidoximfunktion und einem Ester. Sibrafiban besitzt eine gute orale Bioverfügbarkeit [Wittkeet *et al.*, 1999]. Dieser Arzneistoff scheiterte jedoch in klinischen Studien, da er nach oraler Gabe mangelnde Wirksamkeit besaß und weiterhin keinen Vorteil gegenüber der Therapie mit Aspirin erbrachte [Topol, 2000].

Die Firma Astra Zeneca hingegen wird in naher Zukunft einen Thrombininhibitor, das Ximelagatran, auf den Markt bringen, der ebenfalls eine Amidoxim- und eine Esterfunktion besitzt. Die Metabolisierung beider funktioneller Gruppen zum Amidin und der freien Säure führt *in vivo* zum eigentlichen Wirkstoff Melagatran [Eriksson *et al.*, 1999; Lopian, 2002]. In der Pharmazeutischen Industrie besteht zusätzlich ein großes Interesse an der Entwicklung weiterer Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten, Thrombininhibitoren sowie FaktorXa-Antagonisten mit dem hier beschriebenen prodrug Prinzip. Der Einsatz von Amidoximen anstelle von Amidinen hat sich zur Verbesserung der oralen Verfügbarkeit für diese Wirkstoffklasse ebenso bewährt wie für die oben angeführten Arzneistoffe gegen *Pneumocystis carinii* und weitere Infektionen.

1.5. Stand der Vorarbeiten

Amidine, Guanidine sowie Amidinohydrazone werden *in vivo* (Kaninchen, Ratte, Mensch) durch Cytochrom P450 Enzyme zu ihren *N*-hydroxylierten Verbindungen oxidiert. Die *N*-Oxygenierung dieser Verbindungen erfolgt durch ein Cytochrom P450-Enzym im Zusammenspiel mit der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase. Im Kaninchen wird die Reaktion durch das P450-Isoenzym 2C3 katalysiert [Clement *et al.*, 1993b]. Sowohl Amidine als auch Guanidine werden in menschlicher Leber u.a. vom CYP2C19 *N*-hydroxyliert [Clement und Jung, 1994]. Für die entsprechende *N*-Hydroxylierung der Amidinohydrazone ist hier jedoch ausschließlich das humane CYP1A2 das verantwortliche Isoenzym [Clement *et al.*, 1996]. Die *N*-Oxygenierung von Amidinohydrazonen kann daher auch als Markereaktion für dieses Enzym verwendet werden. Sowohl CYP2C19 als auch CYP1A2 sind in erheblichem Ausmaß am Fremdstoffmetabolismus beteiligt.

Eine rasche Rückreduktion der *N*-hydroxylierten Metaboliten zu ihren Ausgangsverbindungen konnte nachgewiesen werden. Diese Reduktion läuft wesentlich schneller ab als die Oxidation, so daß die Reduktion *in vivo* überwiegt [Clement und Zimmermann, 1988; Hauptmann *et al.*, 1988].

N-Hydroxyguanidine, *N*-Hydroxyamidinohydrazone sowie Hydroxylamine werden durch das gleiche Enzymsystem reduziert wie Amidoxime. Dieses besteht aus der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase, Cytochrom b_5 und einem P450-Enzym. Dieses P450-Isoenzym wurde aus Schweineleber isoliert und als zur Familie CYP2D gehörig identifiziert. Ein Isoenzym der Familie CYP2D wurde hiermit erstmals aus Schweineleber gereinigt, so daß keine nähere Zuordnung des Isoenzym getroffen werden konnte [Lomb, 1995].

Daraufhin wurde mit der gleichen Reinigungsvorschrift versucht, das für die *N*-Reduktion in humaner Leber verantwortliche Enzymsystem zu isolieren [Rieckert, 1999; Behrens, 1999]. Auch im Menschen wird die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen durch ein Enzymsystem aus Cytochrom b_5 , b_5 -Reduktase und einem P450-Enzym katalysiert. Das entsprechende humane Cytochrom P450-Enzym konnte jedoch bislang nicht eindeutig identifiziert werden. Da sowohl die Isolierung

dieses Enzyms aus humaner als auch aus Schweineleber mit der gleichen Vorschrift gelang, wäre die Vermutung naheliegend, daß es sich auch im Menschen um einen Vertreter der Familie 2D handelt. Das dem CYP2D aus dem Schwein analoge humane Isoenzym wäre CYP2D6, welches ebenfalls eine große Rolle im Xenobiotikastoffwechsel spielt. Die Beteiligung dieses Isoenzym konnte zuvor jedoch durch den Einsatz von CYP2D6-defekten Mikrosomen sowie Antikörperstudien ausgeschlossen werden [Möller, 1997]. Die partielle Aminosäuresequenzanalyse der gereinigten Benzamidoxim-Reduktase aus humaner Leber ergab eine hohe Übereinstimmung mit dem Cytochrom P450 Isoenzym 2A6, aber auch mit CYP2A7 und CYP2A13. Die humane Benzamidoxim-Reduktase war weiterhin in der Lage, die Markeraktivität des CYP2A6, die 7-Hydroxylierung von Cumarin, durchzuführen [Rieckert, 1999, Behrens, 1999]. Ein endgültiger Beweis für die Identifizierung des humanen *N*-reduktiven Enzymsystems z.B. durch Antikörperstudien steht jedoch noch aus. Zudem konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, ob auch weitere Enzyme in der Lage sind, die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen zu katalysieren.

Für die Modellsubstanz Benzamidoxim wurde im Arbeitskreis Clement neben *N*-reduktiven Phase I-Biotransformation auch eine Untersuchung von Phase II-Metaboliten durchgeführt. Hierbei zeigte sich, daß in Hepatocyten sowohl das Benzamidoxim-*O*-sulfat als auch das *O*-glucuronid gebildet wird. Beide Metaboliten besitzen weder toxische noch mutagene Eigenschaften. Das Benzamidoxim-*O*-acetat, welches sich im Ames-Test als mutagen erwies, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Konjugation von Benzamidoxim mit Sulfat und Glucuronid kann somit als Detoxifizierungsreaktion eingestuft werden. [Clement *et al.*, 2001].

Alle Biotransformationen der Modellsubstanz Benzamidoxim sind in Abbildung 111 zusammengefaßt.

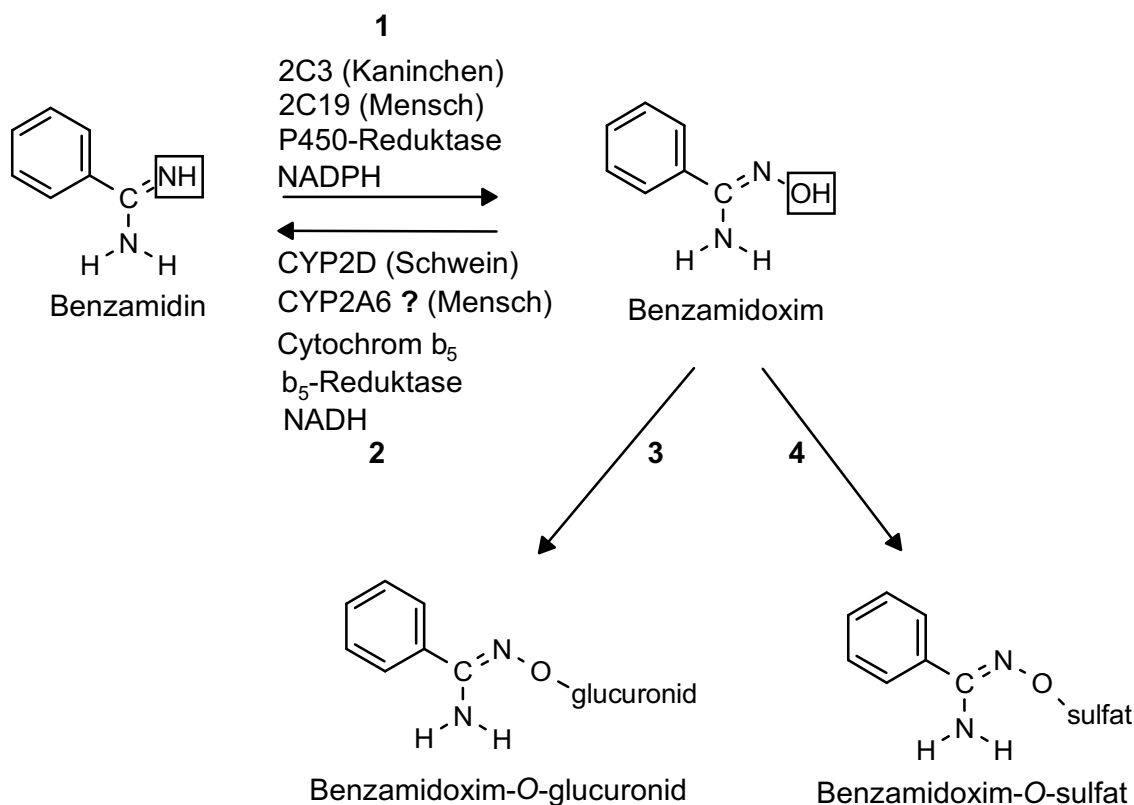


Abb. 1-11. Phase I- und Phase II-Metabolismus von Benzamidin und Benzamidoxim.
1, N-Oxygenierung von Benzamidin; 2, N-Reduktion von Benzamidoxim;
3, Glucuronidierung von Benzamidoxim; 4, Sulfatierung von Benzamidoxim.

1.6. Zielsetzung

Vorangegangene Arbeiten konnten ein mikrosomales Enzymsystem aus Cytochrom b_5 , NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und einem P450-Enzym identifizieren, welches für die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen in Schweineleber verantwortlich ist. Eine eindeutige Zuordnung des beteiligten humanen Cytochrom P450 Isoenzym konnte jedoch noch nicht getroffen werden. Im Hinblick auf die toxikologische und pharmakologische Relevanz von Amidoximen, welche sich als prodrugs von Arzneistoffen mit Amidfunktion zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit bewährt haben, ist es von großer Wichtigkeit, das beteiligte humane P450 Isoenzym zu identifizieren. Nur so können mögliche auftretende Interaktionen von Arzneistoffen bei ihrer Entwicklung vorausgesagt werden.

Den größten Anteil am Xenobiotikametabolismus besitzt CYP3A4. Ein Arzneistoff, der durch dieses Enzym verstoffwechselt wird, führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu Interaktionen, wenn gleichzeitig andere Arzneistoffe eingenommen werden. Diese Interaktion kann in vielen Fällen zum Scheitern des Arzneistoffs in klinischen Studien beitragen. Somit wurde die Umsetzung mit gereinigtem CYP3A4 in die Studien mit einbezogen (s. Kapitel 2). Da vorhergehende Untersuchungen eine Beteiligung von CYP2A6 an der Metabolisierung von Amidoximen zu Amidinen erbrachten, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit ebenfalls mit der Isolierung von CYP2A6 aus humaner Leber nach literaturbekannter Vorschrift. Ein Vergleich dieses Isoenzym mit der humanen Benzamidoxim-Reduktase soll durchgeführt werden, um die Identität des *N*-reduktiven Enzymsystems in menschlicher Leber endgültig zu klären (s. Kapitel 2).

Über den Mechanismus der Benzamidoxim-Reduktase ist bisher wenig bekannt. Weitere Studien zur Aufklärung des Mechanismus der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen sowie Struktur-Aktivitäts-Beziehungen verschiedener *para*-substituierter Benzamidoxime sollen Voraussagen darüber zulassen, wie gut ein Arzneistoff von diesem Enzymsystem reduziert wird. Mit gereinigten Enzymsystemen sowie mit Schweinelebermikrosomen sollen Umsetzungen mit verschiedenen *para*-substituierten Benzamidoximen erfolgen, um den Einfluß des Substituenten in *para*-Stellung auf die Reduktion zu überprüfen. Hierfür sollen Substituenten mit unterschiedlichen elektronischen Effekten, elektronenziehend und elektronenschiebend, verwendet werden (s. Kapitel 3). Für die Entwicklung neuer Amidoxime als prodrugs für Amidine ist es wichtig, die Beeinflussung der Reduktion durch bestimmte funktionelle Gruppen zu kennen.

Da die *N*-reduktiven Enzymsysteme aus dem Schwein und im Menschen ähnlich aufgebaut sind und mit hoher Wahrscheinlichkeit den gleichen katalytischen Mechanismus verwenden, dient ersteres als ideales Modell für weitere Studien. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit des *N*-reduktiven Enzymsystems aus Schweineleber sollen hieraus zunächst alle drei erforderlichen Komponenten (Cytochrom b_5 , b_5 -Reduktase und CYP2D) gereinigt werden.

Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus soll die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen unter anaeroben Bedingungen verfolgt werden. Zudem sollen Inhibitorstudien durchgeführt werden. Ebenso soll die Messung von Substratbindungsspektren weitere Details zum Mechanismus der Benzamidoxim Reduktase liefern (s. Kapitel 4).

2. ISOLIERUNG DER HUMANEN BENZAMIDOXIM-REDUKTASE

2.1. Einführung

2.1.1. Cytochrom P450 2A6

Cytochrom P450-Enzyme sind Vertreter einer großen Supergenfamilie und katalysieren in erster Linie die Oxidation zahlreicher endogener und exogener Verbindungen. Für den Xenobiotika-Metabolismus spielen hierbei vor allem P450 Enzyme aus den Familien CYP1, CYP2 und CYP3 eine große Rolle. Aus der Unterfamilie CYP2A besitzt das humane Isoenzym CYP2A6 die größte Bedeutung [Ortiz de Montellano, 1995]. Der Gehalt an CYP2A6 in humaner Leber ist mit etwa 4 % im Vergleich zu anderen P450-Enzymen des Fremdstoffwechsels eher gering. Hierbei können jedoch bis zu 30-fache Unterschiede auftreten [Ortiz de Montellano, 1995]. Einer der Gründe für die großen interindividuellen Schwankungen der 2A6 Level wird im Auftreten genetischer Polymorphismen gesehen [Kitagawa *et al.*, 2001]. Hierbei handelt es sich um genetisch veränderte Varianten des CYP2A6, die teilweise erhebliche Unterschiede in ihrer Enzymaktivität aufzeigen. CYP2A6 befindet sich zusammen mit CYP2A7 und CYP2A13 auf dem Chromosom 19 des menschlichen Genoms, wobei die ersteren beiden in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander vorliegen [Paschke *et al.*, 2001]. Bei dem Allel CYP2A6*1 handelt es sich um den sogenannten Wildtyp, bei dem keine Mutationen aufgetreten sind [Yamano *et al.*, 1990]. CYP2A6.1 gibt das dazugehörige Protein an, welches durch CYP2A6*1 zur Expression gebracht wird und eine unveränderte Enzymaktivität besitzt. Sowohl durch Punktmutationen, die zu einem Aminosäureaustausch in dem exprimierten Enzym führen, als auch durch Gen-Deletionen und Gen-Verdoppelungen können Enzyme mit einer verminderten oder einer fehlenden 2A6-Aktivität entstehen (Tab. 2-1). Im CYP2A6.2 beispielsweise führt ein einzelner Aminosäureaustausch zu einem Enzym, welches kein Häm in das Apoprotein inkorporieren kann und somit katalytisch inaktiv ist [Yamano *et al.*, 1990].

Tab. 2-1. Bisher bekannte genetische Polymorphismen des CYP2A6[www.imm.ki.se/CYPalleles]

Allele	Protein	Veränderungen	Enzymaktivität	Literatur
CYP2A6*1A	CYP2A6.1	keine	normal ^{1,2}	Yamano <i>et al.</i> , 1990
CYP2A6*1B	CYP2A6.1	Inversion am 3'Ende		Oscarson <i>et al.</i> , 1999b Ariyoshi <i>et al.</i> , 2000
CYP2A6*1X2	CYP2A6.1	CYP2A6 Genverdoppelung		Rao <i>et al.</i> , 2000
CYP2A6*2	CYP2A6.2	NT-Austausch 479T>A	keine ^{1,2}	Yamano <i>et al.</i> , 1990 Hadidi <i>et al.</i> , 1997 Oscarson <i>et al.</i> , 1998
CYP2A6*3	CYP2A6.3	CYP2A6/CYP2A7 Hybrid	?	Fernandez-Salguero <i>et al.</i> , 1995
CYP2A6*4A		CYP2A6 Deletion	keine ¹	Oscarson <i>et al.</i> , 1999a Nunoya <i>et al.</i> , 1999 Ariyoshi <i>et al.</i> , 2000
CYP2A6*4B		CYP2A6 Deletion	keine ¹	Nunoya <i>et al.</i> , 1998
CYP2A6*4C				Identisch mit CYP2A6*4A
CYP2A6*4D		CYP2A6 Deletion	keine ¹	Oscarson <i>et al.</i> , 1999b
CYP2A6*5	CYP2A6.5	NT-Austausch 1436G>T	keine ^{1,2}	Oscarson <i>et al.</i> , 1999b
CYP2A6*6	CYP2A6.6	NT-Austausch 383G>A	vermind. ²	Kitagawa <i>et al.</i> , 2001
CYP2A6*7	CYP2A6.7	NT-Austausch 1412T>C Inversion am 3'Ende	vermind. ²	Ariyoshi <i>et al.</i> , 2001 Xu <i>et al.</i> , 2002
CYP2A6*8	CYP2A6.8	NT-Austausch 1454G>T Geninversion am 3'Ende	normal ¹	Ariyoshi <i>et al.</i> , 2001 Xu <i>et al.</i> , 2002

Tab. 2-1. Fortsetzung

Allele	Protein	Veränderungen	Enzym-aktivität	Literatur
CYP2A6*9	CYP2A6.1	NT-Austausch in der TATA-Box -48T>G	vermind. ²	Pitarque <i>et al.</i> , 2001
CYP2A6*10	CYP2A6.10	NT-Austausch 1412T>G 1454G>T Inversion am 3'Ende	vermind. ¹	Xu <i>et al.</i> , 2002
CYP2A6*11	CYP2A6.11	NT-Austausch 670T>C	vermind. _{1,2}	Daigo <i>et al.</i> , in Vorbereitung

¹ *in vivo* Aktivität² *in vitro* Aktivität

NT = Nukleotid

Über die P450-Variante 2A6.3 herrscht noch Uneinigkeit. Verbesserte Methoden der Genotypisierung wurden entwickelt, mit denen sich diese Form des 2A6 Polymorphismus nicht mehr nachweisen ließ. Daher geht man heute davon aus, daß es sich lediglich um ein Artefakt der früher verwendeten Genidentifizierungs Methoden handelt und das CYP2A6.3 daher nicht natürlich vorkommt [Paschke *et al.*, 2001].

Erst kürzlich wurde eine völlig neuartige Variante des CYP2A6Gens entdeckt. Beim CYP2A6*9 führt der Austausch eines Nukleotids im Promotor des Gens zur Modulation der Genexpression. Es entsteht ein vollständig aktives Enzym, jedoch in wesentlich geringerer Menge. Träger dieses Gens entwickeln in etwa nur 50 % der Enzymaktivität des Wildtyps, obwohl identische Enzyme exprimiert werden [Pitarque *et al.*, 2001].

Länderübergreifende Studien haben gezeigt, daß nicht nur interindividuelle Unterschiede im CYP2A6-Genotyp und in der Enzymaktivität auftreten, sondern auch interethnische. So kommt es beispielsweise in der asiatischen Bevölkerung zur Anhäufung von Individuen mit einer verminderten Enzymaktivität, den sogenannten „poor metabolizern“ [Oscarson, 2001]. Eine Ursache dieses veränderten Phänotyps wird ebenfalls im Auftreten genetischer Polymorphismen gesehen. Tatsächlich

tragen 0.4 % der Japaner das 2A6*6 Allel, wodurch sie eine verminderte Enzymaktivität besitzen [Kitagawa *et al.*, 2001]. Ebenso sind 15-20 % der Asiaten Träger der Variante CYP2A6*4 und ein gleicher Prozentsatz dieser Bevölkerung des CYP2A6*9, bei der es zu einer verminderten 2A6-Expression kommt [Pitarque *et al.*, 2001]. Zudem ist das Vorkommen des Allels CYP2A6*2 in dieser Bevölkerungsgruppe gehäuft [Oscarson, 2001]. Besonders die Gruppe der Kaukasier ist von solchen Mutationen, die zum Fehlen jeglicher CYP2A6-Aktivität führen können, betroffen [Ortiz de Montellano, 1996]. Der genetische Polymorphismus des CYP2A6 tritt bei Europäern hingegen nur sehr selten auf. Lediglich 13 % der europäischen Bevölkerung sind Träger des CYP2A6*2 [Oscarson, 2001].

Der stark schwankende CYP2A6-Gehalt in humaner Leber kann jedoch auch andere Ursachen besitzen. Einige Arzneistoffe sowie Umweltfaktoren können die CYP2A6 Aktivität modulieren. Ebenso kann es durch eine Leberzirrhose, eine Hepatitis oder andere maligne Lebererkrankungen zur Induktion dieses P450-Isoenzym kommen [Niemelä *et al.*, 2000; Oscarson, 2001].

Die Genregulationsmechanismen des CYP2A6 sind bisher unbekannt. Erste Studien deuten jedoch darauf hin, daß ein cytosolisches Protein hieran beteiligt ist, welches an die mRNA des CYP2A6 bindet und diese somit stabilisiert [Gilmore *et al.*, 2001].

P450 2A6-Enzyme katalysieren eine Vielzahl an Reaktionen. Beispielsweise ist CYP2A6 an der O-Deethylierung von 7-Ethoxycumarin beteiligt [Greenlee und Poland, 1978]. Aufgrund des geringen Gehalts in der Leber spielt das CYP2A6 jedoch für diese Reaktion *in vivo* vermutlich eine eher untergeordnete Rolle [Shimada *et al.*, 1999].

Die 7-Hydroxylierung von Cumarin wird hingegen überwiegend durch dieses Isoenzym katalysiert, wodurch die Reaktion als Markeraktivität für CYP2A6 verwendet werden kann [Greenlee und Poland, 1978]. Bei dem hierbei gebildeten Metaboliten, dem 7-Hydroxycumarin, handelt es sich um eine stark fluoreszierende Verbindung, die mittels fluorimetrischer Meßverfahren sehr selektiv quantifiziert werden kann (Abb. 2-1).

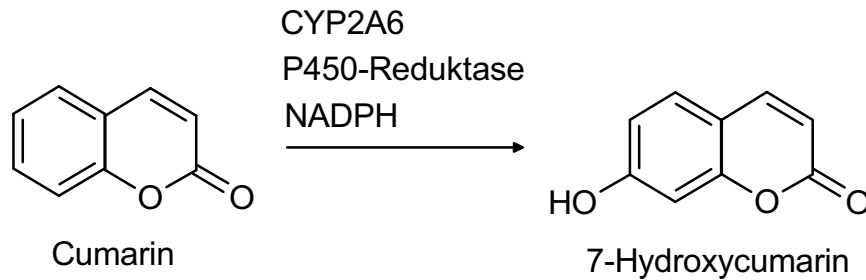


Abb.2-1. Coumarin-7-Hydroxylierung als Markeraktivität für CYP2A6.

Die 7-Hydroxylierung des Coumarins wurde bereits in Mäusen sowohl in Lebermikrosomen als auch in Lebermitochondrien nachgewiesen, wobei die mitochondriale Aktivität bis zu 55 % höher lag [Honkakoskiet *al.*, 1988].

Durch CYP2A6 werden zahlreiche Arzneistoffe wie beispielsweise das Analgetikum Acetaminophen [Chen *et al.*, 1998], das Antikonvulsivum Valproinsäure [Sadeque *et al.*, 1997] sowie das Cytostatikum Tegafur biotransformiert. Tegafur ist ein Prodrug des 5-Fluorouracils, dessen Aktivierung unter anderem durch CYP2A6 erfolgt, wobei hier starke interindividuelle Schwankungen auftreten können [Komatsu *et al.*, 2000; Murayama *et al.*, 2001].

Biotransformationsreaktionen, die durch CYP2A6 katalysiert werden, können auch zu toxischen Metaboliten führen. So werden einige Zwischenprodukte der chemischen Industrie wie beispielsweise 3-Alkoxyether [Le Gal *et al.*, 2001] oder 2,6-Dimethylanilin [Gan *et al.*, 2001] durch CYP2A6 zu potentiell toxischen Verbindungen metabolisiert.

Aber auch die Aktivierung einiger Prokarzinogene, wie Nitrosamine oder Aflatoxin B₁, konnte für das CYP2A6 nachgewiesen werden. Nitrosamine sind im Tabakrauch enthalten, können aber auch durch Biotransformation von einigen Lebensmitteln sowie Kosmetika, Arzneistoffen und Pestiziden entstehen. Die Rolle des CYP2A6 für die Krebsentstehung durch Aktivierung von einigen Nitrosaminen wird diskutiert, konnte bislang aber noch nicht bewiesen werden. Möglicherweise kommt es bei den sogenannten „poor metabolizern“ zu einer verminderten Aktivierung solcher

Verbindungen und dadurch zu einem gesenkten Krebsrisiko. Weitere Studien hierzu stehen jedoch noch aus [Kushida *et al.*, 2000].

Durch den geringen Gehalt an CYP2A6 in humaner Leber scheint dieses Isoenzym einen eher geringen Beitrag zu den genannten Aktivierungen zu leisten, der jedoch z.B. durch Enzyminduktion erheblich gesteigert werden kann [Ortiz de Montellano, 1995]. Gerichtete Mutationen sollen weiteren Aufschluß über die Rolle des CYP2A6 für den Xenobiotika-Metabolismus bringen [Nakamura *et al.*, 2001].

CYP2A6 ist das wichtigste Enzym des Nikotin-Stoffwechsels. Nikotin und das durch die Aldehyd-Oxidase hieraus gebildete Cotinin werden durch CYP2A6 metabolisiert. Die Produkte können nach Glucuronidierung ausgeschieden werden [Oscarson, 2001]. Somit spielt das CYP2A6 eine wichtige Rolle für die Nikotin-Clearance von Rauchern. Zahlreiche Studien wurden durchgeführt, die einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten genetischer 2A6-Polymorphismen und dem Rauchverhalten zeigen sollten. Dabei besaßen Personen mit einem 2A6-Gendefekt einen verzögerten Nikotin-Abbau und damit auch eine wesentlich längere Wirkung des Nikotins. Aus diesem Grund sollen sich unter diesen weniger Raucher befinden bzw. diese weniger Zigaretten pro Tag rauchen [Sellers *et al.*, 2000]. Das Lungenkrebsrisiko wäre bei solchen 2A6-defekten Menschen zum einen durch das veränderte Rauchverhalten, zum anderen durch die verminderte Aktivierung von Nitrosaminen erniedrigt (Abb. 2-2). Weitere Studien hierzu müssen jedoch noch folgen [Oscarson, 2001].

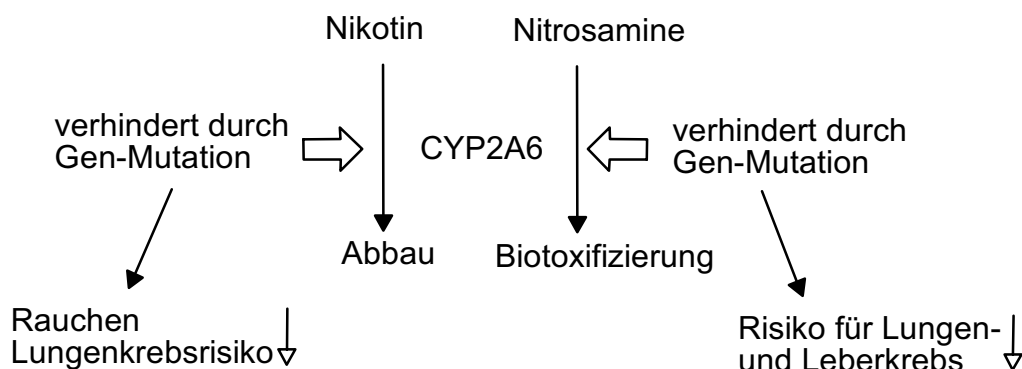


Abb. 2-2. Bedeutung des genetischen Polymorphismus des CYP2A6 für die Biotransformation von Nikotin und Nitrosaminen.

Man erhofft sich, durch Hemmung des CYP2A6-Isoenzym eine neue Form der Raucherentwöhnung entwickeln zu können. 8-Methoxypsoralen (Abb.2-3) ist ein potenter Suizid-Inhibitor des CYP2A6 [Koenigs *et al.*, 1997]. In einer ersten klinischen Studie konnte ein reduziertes Rauchverhalten durch Gabe dieses Hemmstoffs gezeigt werden [Sellers *et al.*, 2000]. Bei einmaliger oraler Gabe von 8-Methoxypsoralen konnte *in vivo* jedoch keine befriedigende Hemmung der 2A6-Aktivität erzielt werden. Dieses führt man auf einen zu hohen first-pass-Effekt dieser Verbindung zurück, die sich dadurch nicht in ausreichender Konzentration im Körper befindet [Kharash *et al.*, 2000].

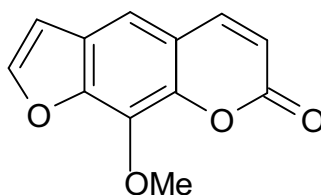


Abb. 2-3. 8-Methoxypsoralen als CYP2A6-Inhibitor.

Weitere Inhibitoren des CYP2A6 werden *in vitro* u.a. zur Detektion von katalytischen Aktivitäten dieses Isoenzym in Multienzymgemischen verwendet. Eine Übersicht über bekannte CYP2A6-Inhibitoren gibt die Tabelle 2-2.

Tab. 2-2. Potente Inhibitoren des CYP2A6

Verbindung	Eigenschaften	Literatur
8-Methoxypsoralen	Suizid-Inhibitor, relativ selektiv	Koenigs <i>et al.</i> , 1997 Koenigs, Traeger, 1998 Kharash <i>et al.</i> , 2000
Menthofuran	Suizid-Inhibitor, sehr selektiv	Khojasteh-Bakht <i>et al.</i> , 1998
Tranylcypromin	sehr selektiv	Zhang <i>et al.</i> , 2001
Tryptamin	selektiv	Zhang <i>et al.</i> , 2001
Diethyldithiocarbamat	relativ selektiv	Ortiz de Montellano, 1995

Lange Zeit galt das CYP2A6 als der einzige Vertreter der CYP2A-Unterfamilie in der humanen Leber [Ortiz de Montellano, 1995]. Inzwischen konnten aber zwei weitere Vertreter dieser Unterfamilie identifiziert werden. Das Isoenzym CYP2A7 ist zu 94 % mit der Aminosäuresequenz des CYP2A6 identisch. CYP2A7 ist jedoch katalytisch inaktiv, da es kein Hämgerüst zu inkorporieren vermag [Lewis, 1996].

Erst kürzlich gelang die Klonierung und Expression des CYP2A13, dessen Gen auf dem gleichen Chromosom lokalisiert ist wie das für CYP2A6 und CYP2A7. CYP2A13 scheint eine überlappende Substratspezifität mit CYP2A6 zu besitzen. So ist es in den Metabolismus von Cumarin, Nikotin, Cotinin sowie einiger Nitrosamine involviert [Su *et al.*, 2000]. CYP2A6 kommt in erster Linie in der Leber vor [Ortiz de Montellano, 1995]. CYP2A13 wird hingegen überwiegend in der nasalen Mukosa gebildet [Su *et al.*, 2000]. Weitere Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede beider Isoenzyme sollen durch nachfolgende Studien aufgedeckt werden.

2.1.2. Stand der Vorarbeiten

Die Reduktion von Benzamidoximen wird im Schwein durch ein Enzymsystem katalysiert, welches aus der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase, Cytochrom b_5 sowie dem P450-Isoenzym 2D besteht. Auch im Menschen konnte die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen nachgewiesen werden (s.u.). Hier konnte jedoch das verantwortliche Enzymsystem bislang nicht eindeutig identifiziert werden.

Erste Studien konnten die Reduktion von *N*-Hydroxypentamidin zum Pentamidin [Jung, 1994] in humanen Lebermikrosomen zeigen. Ebenso erfolgte die Biotransformation des Benzamidoxims zum Benzamidin durch verschiedene zuvor charakterisierte humane Leberproben [Lomb, 1995]. Eine Korrelationsanalyse beider Umsetzungen ergab, daß sowohl Pentamidin als auch Benzamidoxim mit hoher Wahrscheinlichkeit durch das gleiche Enzymsystem reduziert werden [Lomb, 1995]. Ein dem Schwein analoges Enzymsystem aus Cytochrom b_5 , b_5 -Reduktase und einem P450-Enzym konnte auch im Menschen als wahrscheinlich angesehen werden.

Die Beteiligung eines humanen P450-Enzyms an der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen konnte anhand einer Inhibitorstudie mit Octylamin, einem unspezifischen, kompetitiven Hemmstoff des CYP450, nachgewiesen werden [Möller, 1997].

In Schweinelebermikrosomen gehört das für die Reduktion verantwortliche P450 Isoenzym zur Unterfamilie CYP2D. Der einzige Vertreter dieser Unterfamilie im Menschen ist das CYP2D6. Eine Beteiligung dieses Isoenzym konnte jedoch durch den Einsatz des spezifischen Hemmstoffs Chinidin sowie eines polyklonalen Antikörpers gegen CYP2D6 ausgeschlossen werden. Ebenso konnte eine effektive Reduktion von Benzamidoxim in 2D6-defekten Mikrosomen gezeigt werden, die dieses Isoenzym nicht enthielten [Möller, 1997].

Die Anwesenheit eines polyklonalen Antikörpers gegen CYP2E1 oder eines monoklonalen Antikörpers gegen CYP3A4 führte ebenfalls zu keiner Erniedrigung der Umsatzrate vom Benzamidoxim [Möller, 1997].

In einem weiteren Versuch, die humane Benzamidoxim-Reduktase zu identifizieren, wurde die Reduktase-Aktivität mit folgenden rekombinant exprimierten P450-Isoenzymen im rekonstituierten System überprüft: CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6-Val, CYP2D6-Met, CYP2E1, CYP3A4 sowie CYP4A11 (Fa. Gentest). Die P450 Enzyme wurden in Lymphoblasten zur Expression gebracht, in denen gleichzeitig die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase coexprimiert wurde. Keines dieser gentechnisch hergestellten P450-Enzyme war im Zusammenspiel mit Cytochrom b_5 und b_5 -Reduktase in der Lage, die Modellsubstanz Benzamidoxim zu reduzieren [Möller, 1997].

Daraufhin versuchten Rieckert und Behrens, die Benzamidoxim-Reduktase aus humanen Lebermikrosomen zu isolieren. Dabei wurde die gleiche Methode verwendet, wie bereits für die Reinigung der Benzamidoxim-Reduktase aus dem Schwein beschrieben [Clement *et al.*, 1997]. Es gelang die Isolierung eines P450-Isoenzym aus humanen Lebermikrosomen mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa, welches nach Reduktion mit Na-Dithionit ein typisches CO-Differenzspektrum bildete. Dieses humane P450-Enzym war nur im Zusammenspiel mit Cytochrom b_5 und der b_5 -Reduktase in der Lage, Benzamidoxim zu reduzieren. Die Umsatzraten lagen dabei etwa um den Faktor 10 niedriger als für das aus dem Schwein isolierte Enzymsystem. Die humane Benzamidoxim-Reduktase war

ebenfalls sauerstoffunabhängig und bevorzugte NADH gegenüber NADPH als Cosubstrat für die Reduktion [Behrens, 1999; Rieckert, 1999].

Eine Aminosäuresequenzanalyse zweier Enzymfragmente des isolierten Proteins ergab eine vollständige Übereinstimmung mit dem P450-Isoenzym 2A6. Daraufhin wurde die humane Benzamidoxim-Reduktase auf die Cumarin-7-Hydroxylierungsaktivität, der Markerreaktion für CYP2A6, überprüft. Diese Reaktion konnte mit für CYP2A6 typischen Umsetzungsraten gezeigt werden. Umgekehrt war rekombinantes CYP2A6, welches zusammen mit der P450-Reduktase in Lymphoblasten coexprimiert wurde, jedoch nicht zur *N*-Reduktion des Benzamidoxims befähigt [Behrens, 1999; Rieckert, 1999].

Die humane Benzamidoxim-Reduktase wurde auf weitere Markerreaktionen fremdstoffmetabolisierender Enzyme (CYP3A4 und CYP2C19) untersucht. Die gereinigte Benzamidoxim-Reduktase zeigte jedoch weder die für CYP3A4 typische Markeraktivität, die Testosteron-6 β -Hydroxylierung, noch die für CYP2C19, die *S*-Mephenytoin-4'-Hydroxylierung [Behrens, 1999; Rieckert, 1999].

Das humane isolierte Enzymsystem weist zahlreiche Parallelen zu dem bereits zuvor identifizierten Enzymsystem aus Schweinelebermikrosomen auf. Sowohl im mikrosomalen Enzymsystem aus humaner als auch aus Schweineleber erfolgt die Reduktion erst durch das Zusammenspiel aus Cytochrom b_5 , der b_5 -Reduktase und einem P450-Enzym, wobei NADH das bevorzugte Cosubstrat darstellt.

Der einzige Unterschied besteht in dem beteiligten P450-Enzym. Während dieses für das mikrosomale Enzymsystem aus Schweineleber eindeutig als zur Familie CYP2D gehörig identifiziert werden konnte, deutet im Menschen alles auf die Beteiligung des CYP2A6 hin (Abb. 2-4).

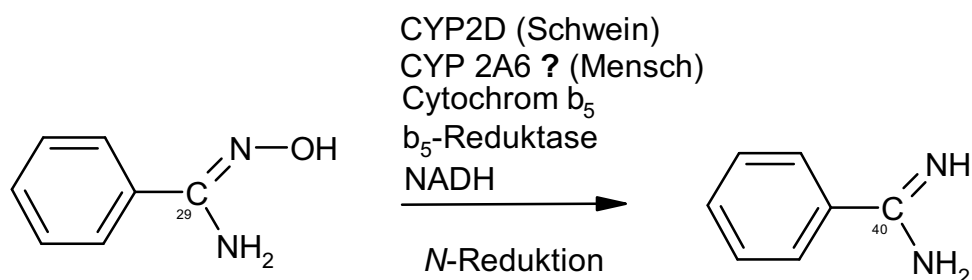


Abb. 2-4. Bisherige Kenntnisse der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin im Schwein und im Menschen.

Gentechnisch hergestelltes CYP2A6 hingegen zeigte keine Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität. Ein Grund hierfür könnte in dem veränderten Verhalten rekombinanter Enzyme liegen, die bei der Durchführung von Inkubationen noch in ihrem Expressionssystem vorliegen. Reduktionsreaktionen könnten dabei durch Faktoren gestört werden, die auf die Monooxygenierungsreaktionen, für die diese Enzyme optimiert worden sind, keinen Einfluß haben.

Durch die gleichzeitige Expression der P450-Reduktase und des CYP2A6 in Lymphoblasten könnte es aber auch zu einer Störung der Elektronenübertragung während der Reduktion kommen. Die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase ist üblicherweise am Elektronentransfer von Oxidations-, nicht aber von Reduktionsreaktionen beteiligt. Durch die zusätzliche Anwesenheit der P450 Reduktase im rekonstituierten System des Schweins aus Cytochrom b₅, b₅-Reduktase und CYP2D werden die Umsetzungsraten des Benzamidoxims zwar um die Hälfte vermindert, die Reduktion läßt sich aber dennoch effizient nachweisen [Clement *et al.*, 1997]. Daher kann ein gestörter Elektronentransport nicht als einzige Ursache für die fehlende Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität von rekombinant exprimiertem CYP2A6 angesehen werden.

Rekombinant exprimiertes sowie aus humaner Leber gereinigtes CYP2A6 weisen die gleiche Aminosäuresequenz und damit die gleiche Primärstruktur auf. Vielleicht treten aber geringe Unterschiede in der Tertiärstruktur auf, welche die Reduktion inhibieren, die Oxidation jedoch nicht beeinflussen.

2.1.3. Zielsetzung

Um die noch offenen Fragen endgültig zu klären, soll in der vorliegenden Arbeit die Reinigung des CYP2A6 nach literaturbekannter Vorschrift erfolgen [Yunet *et al.*, 1991]. Sollte das gereinigte CYP2A6 in der Lage sein, die Reduktion des Benzamidoxims zu katalysieren, würde dieses die Arbeiten von Riækert [1999] und Behrens [1999] bestätigen und gleichzeitig auf ein verändertes Verhalten rekombinant exprimierter Enzyme hinweisen.

Weiterhin soll die Reinigung von rekombinant exprimiertem CYP2A6 aus Hefezellen durchgeführt werden, um Hinweise auf eventuell vorhandene hemmende Faktoren in den verwendeten Expressionssystemen zu erhalten.

Die endgültige Identifizierung der humanen Benzamidoxim-Reduktase ist aufgrund der pharmakologischen Bedeutung von Benzamidoximen von enormer Bedeutung. Die Eignung zahlreicher Prodrugs, die eine Amidoxim-Funktion anstelle einer stark basischen Amidin-Gruppe zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit besitzen, konnte für Pentoxim [Clement *et al.*, 1992], Sibrafiban [Wittke *et al.*, 1999] sowie Ximelagatran [Eriksson *et al.*, 1999] gezeigt werden. Um mögliche auftretende Probleme bei der Arzneimittel-Therapie oder Interaktionen mit gleichzeitig verabreichten Arzneistoffen vorhersagen zu können, sollte das für die Reduktion verantwortliche P450-Enzym bekannt sein. Daher soll die endgültige Identifizierung der humanen Benzamidoxim-Reduktase aus humanen Lebermikrosomen im Rahmen dieser Arbeit erfolgen. Dabei sollen Antikörper-Studien die Beteiligung von CYP2A6 an der N-Reduktion bestätigen.

Auch die Reduktion weiterer N-hydroxylierter Verbindungen durch das humane mikrosomale Enzymsystem analog dem aus Schweineleber soll überprüft werden.

2.2. Methoden

2.2.1. Isolierung von CYP2A6 aus humanen Lebermikrosomen

2.2.1.1. Gewinnung humaner Lebermikrosomen

Humanes Lebergewebe wurde von der Firma Astra, Schweden, sowie von der Uniklinik der CAU in Kiel zur Verfügung gestellt. Das Gewebe stammte von Patienten, die aufgrund von primären oder sekundären Leberkarzinomen einer Leberteilresektion oder einer Hemihepatektomie unterzogen wurden. Das Vorgehen wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der CAU genehmigt, zudem wurde das Einverständnis der Patienten zuvor eingeholt. Die Leberfragmente wurden unter Eiskühlung in einem 20 mM Phosphatpuffer pH 7.4 mit einem Zusatz aus 250 mM Sucrose und 1 mM Na₂EDTA transportiert. Diese Gewebestücke wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Zur Mikrosomengewinnung wurden Leberstücke verschiedener Patienten bei 4 °C aufgetaut und in kleine Stücke geschnitten. Anschließend wurden diese mit Hilfe eines Teflon-Glas-Potters homogenisiert und mit dem bereits zum Transport verwendeten Puffer ohne Na₂EDTA verdünnt. Die Herstellung der humanen Lebermikrosomen erfolgte schließlich durch differentielle Ultrazentrifugation wie bereits bei Clement *et al.* [1996] für die Gewinnung von Mikrosomen aus Kaninchen und Schwein beschrieben.

2.2.1.2. Isolierung von CYP2A6 aus Mikrosomen

Die Reinigung des Cytochrom P450-Isoenzym 2A6 aus humanen Lebermikrosomen wurde in Anlehnung an das von Yun *et al.* [1991] publizierte Verfahren mit einigen nachfolgend aufgeführten Modifikationen durchgeführt. Dabei bedanke ich mich herzlich bei Katrin Lopian für die gute Zusammenarbeit. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit an humaner Leber wurde darauf verzichtet, nur die Leberhomogenate mit der größten Cumarin-7-Hydroxylierungsaktivität für die Reinigung zu verwenden. Alle erhaltenen Leberpräparationen wurden hierfür eingesetzt.

Sämtliche unter 2.2.1.2. beschriebenen Arbeitsschritte wurden bei 4° C durchgeführt.

2.2.1.2.1. Hydrophobe Interaktionschromatographie an Octyl-Sepharose CL 4B

Für die Hydrophobe Interaktionschromatographie wurde als Säulenmaterial Octyl Sepharose CL 4B anstelle von *N*-Octylamino-Sepharose 4B verwendet.

Die humanen Lebermikrosomen wurden mit nachfolgend aufgeführten Puffer S im Verhältnis 3:1 verdünnt:

Puffer S	10 mM Phosphatpuffer pH 7.4
	2 mM Na ₂ EDTA
	2 mM Dithiothreitol
	1 M NaCl
	40 % (v/v) Glycerol
	0.4 % (w/v) Thesit

Danach wurden die Mikrosomen 1 h mit einem KPG-Rührer unter Eiskühlung solubilisiert und anschließend 60 min bei 100000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde durch Verbandmull koliert, auf eine Na-Cholat-Konzentration von 0.6 % (w/v) eingestellt und für die weitere Aufarbeitung mittels Säulenchromatographie verwendet.

Für die Hydrophobe Interaktionschromatographie benötigte Puffer:

Puffer I	100 mM Phosphatpuffer pH 7.4
	0.4 % (w/v) Na-Cholat
	1 mM Na ₂ EDTA
	20 % (v/v) Glycerol
	0.06 % (w/v) Thesit

Puffer II	100 mM Phosphatpuffer pH 7.4
	0.4 % (w/v) Na-Cholat
	1 mM Na ₂ EDTA
	20 % (v/v) Glycerol
	0.2 % (w/v) Thesit

Puffer III	100 mM Phosphatpuffer pH 7.4
	0.4 % (w/v) Na-Cholat
	1 mM Na ₂ EDTA
	20 % (v/v) Glycerol
	0.5 % (w/v) Thesit

Das bei Yun *et al.* [1991] verwendete Detergenz Emulgen 911, das aufgrund der Verursachung endokriner Störungen nicht mehr erhältlich ist, wurde für die Hydrophobe Interaktionschromatographie durch Thesit ersetzt.

Der Überstand der Zentrifugation wurde auf eine zuvor mit Puffer I equilibrierte Octylamino-Sepharose CL 4B-Säule (5 x 40 cm) aufgetragen. Es wurden nacheinander die Puffer I, II und III, die sich durch unterschiedliche Detergenz Konzentrationen unterschieden, über die Säule gegeben. Mit Puffer III, der die höchste Konzentration an Thesit enthielt, wurde das 2A6 eluiert. Die Reinigung wurde bei 280 nm mittels einer UV-Durchflußzelle verfolgt, wobei zusätzlich ein zweites Elutionsprofil bei 417 nm aufgenommen wurde. Anhand beider Elutionsprofile konnten die einzelnen Fraktionen vereinigt und durch Ultrafiltration (Ausschlußgröße 10000 Da) einkonzentriert werden. Durch eine P450-Gehaltsbestimmung sowie einen 2A6-Aktivitätstest, der Cumarin-7-Hydroxylierung, konnten die 2A6-haltigen Fraktionen identifiziert werden. Für letzteren mußte zuvor das Detergenz weitgehend entfernt werden. Zur Vorbereitung auf die Anionenaustauschchromatographie wurde die entsprechende Fraktion auf eine Sephadex[®] G-25 Säule (NAP[™] 25) aufgetragen, mit dem zur Equilibrierung der Hydroxylapatit-Säule benötigten Puffer IV wieder eluiert und anschließend erneut einkonzentriert.

2.2.1.2.2. Anionenaustauschchromatographie an einer Hydroxylapatit-Säule

Für alle nachfolgenden Säulenchromatographien wurde anstelle von Thesit das Detergenz Triton X-100 verwendet, da es eine wesentlich geringere Affinität zu dem humanen CYP2A6 besitzt und sich dadurch leichter wieder entfernen läßt [Möller, 1997].

Für die Anionenaustauschchromatographie an Hydroxylapatit benötigte Puffer:

Puffer IV	40 mM Phosphatpuffer pH 7.4 0.2 mM Dithiothreitol 20 % (v/v) Glycerol 0.2 % (w/v) Triton X-100
Puffer V	90 mM Phosphatpuffer pH 7.4 0.2 mM Dithiothreitol 20 % (v/v) Glycerol 0.2 % (w/v) Triton X-100
Puffer VI	180 mM Phosphatpuffer pH 7.4 0.2 mM Dithiothreitol 20 % (v/v) Glycerol 0.2 % (w/v) Triton X-100
Puffer VII	300 mM Phosphatpuffer pH 7.4 0.2 mM Dithiothreitol 20 % (v/v) Glycerol 0.2 % (w/v) Triton X-100

Die aufgearbeitete Fraktion nach der Hydrophoben Interaktionschromatographie wurde auf eine zuvor mit Puffer IV equilibrierte Hydroxylapatit-Säule (2.5 x 10 cm) aufgetragen. Durch einen Stufengradienten aus 40, 90, 180 und 300 mM Phosphatpuffer konnte die Enzympräparation weiter aufgetrennt werden. Wieder wurde ein 417 nm Elutionsprofil erstellt, anhand dessen die entsprechenden

Fraktionen vereinigt und eingeeengt wurden. Aufkonzentriert wurde durch Ultrafiltration (Ausschlußgröße 10000Da). Die Bestimmung der 2A6-haltigen Fraktionen erfolgte wie unter 2.2.1.2.1. beschrieben. Zur Vorbereitung für die weitere Aufreinigung an DEAE-Cellulose wurde auch diese Enzympräparation mit Hilfe der Sephadex® G-25 Säule (NAP™ 25) auf den hierfür benötigten Equilibrierungspuffer, Puffer VIII, umgestellt.

2.2.1.2.3. Anionenaustauschchromatographie an einer DEAE-Cellulose-Säule

Für die Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose benötigter Puffer:

Puffer VIII	5 mM Phosphatpuffer pH 7.4
	0.1 mM Na ₂ EDTA
	0.2 mM Dithiothreitol
	20 % (v/v) Glycerol
	0.3 % (w/v) Triton X-100

Die nach 2.2.1.2.2. erhaltene Fraktion wurde auf eine DE-52 DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen (1.6 x 15 cm), die vorher mit Puffer VIII equilibriert wurde. Nach dem Auftrag der Enzympräparation wurde die Säule zunächst ebenfalls mit Puffer VIII gewaschen und anschließend ein Stufengradient aus 0-200 mM NaCl in diesem Puffer verwendet. Das zu isolierende Enzym wurde nicht an das Säulenmaterial gebunden und fand sich im Durchlauf wieder. Es wurde erneut ein 417nm Elutionsprofil aufgenommen, anhand dessen die einzelnen Fraktionen vereinigt und, wie unter 2.2.1.2.2. beschrieben, einkonzentriert wurden. Auch hier wurden die 2A6 haltigen Fraktionen über eine P450-Gehaltsbestimmung sowie eine Cumarin-7-Hydroxylierungsaktivität identifiziert.

2.2.1.2.4. Entfernung des Detergenz

Das Detergenz wurde entweder durch eine weitere kleinere Hydroxylapatit-Säule oder das Adsorbens Calbiosorb[®] entfernt.

2.2.1.2.4.1. Detergenzentfernung über Hydroxylapatit

Die Hydroxylapatit-Säule (1 x 3 cm) wurde zunächst mit einem 5 mM Phosphatpuffer pH 7.4, der zusätzlich noch 0.1 mM Na₂EDTA und 20 % (v/v) Glycerol enthielt, equilibriert. Anschließend wurde die Enzympräparation auf die Säule aufgebracht und so lange mit dem oben genannten Puffer gespült, bis diese von Detergenz vollständig befreit war. Dieses konnte anhand des 280 nm Elutionsprofils mit Hilfe einer Durchflußzelle verfolgt werden. Da Triton X-100 eine starke Eigenabsorption bei dieser Wellenlänge besitzt, konnte ein Schreiberausschlag beobachtet werden, der mit sinkender Konzentration an Detergenz kontinuierlich auf das Ausgangsniveau zurückging. Das auf der Säule befindliche Enzym konnte dann durch einen 500mM Phosphatpuffer pH 7.4 (mit 0.1 mM Na₂EDTA und 20 % (v/v) Glycerol) wieder eluiert werden. Schließlich wurden die enzymhaltigen Fraktionen wieder einkonzentriert und mit Hilfe einer Sephadex[®] G-25 Säule (NAP[™] 25) auf einen 50 mM Phosphatpuffer pH 7.4, der ebenfalls 0.1 mM Na₂EDTA sowie 20 % (v/v) Glycerol enthielt, eingestellt. In diesem Medium wurde das Enzym bis zur Durchführung der folgenden Studien im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.1.2.4.2. Detergenzentfernung durch Calbiosorb[®]

Die Enzympräparation wurde mit einer definierten Menge an Calbiosorb[®] Adsorbens versetzt und 2 h mittels eines Überkopfschüttlers vorsichtig bewegt [Möller, 1997]. Nach Absetzen des Adsorbens-Materials wurde die Lösung abpipettiert. Zur vollständigen Detergenz-Befreiung mußte dieser Vorgang mehrmals wiederholt werden.

2.2.1.3. Analytische Methoden zur Charakterisierung des CYP2A6 aus humanen Lebermikrosomen

2.2.1.3.1. Proteingehaltsbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts der gereinigten Enzympräparationen erfolgte durch die BCA-Methode in Anlehnung an Smith *et al.* [1985].

2.2.1.3.2. P450-Gehaltsbestimmung

Der Cytochrom P450-Gehalt wurde durch Aufnahme eines CO-Differenzspektrums nach der Methode von Omura und Sato [1964] ermittelt.

2.2.1.3.3. Überprüfung der Identität und Reinheit mittels SDS-Page und Western-Blot

Die Gelelektrophorese wurde in Anlehnung an das von Laemmli [1970] beschriebene Verfahren mit einigen Modifikationen durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Gele hergestellt, wovon das eine für die Färbung mit Coomassie und das andere für die Antikörperreaktion im Western-Blot verwendet wurde.

2.2.1.3.3.1. Lösungen

Trenngelpuffer:	0.75 M Tris-HCl pH 8.8, 0.2 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer:	0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 0.2 % (w/v) SDS
Elektrodenpuffer:	25 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.1 % (w/v) SDS, 195 mM Glycin

Probenauftragspuffer:	Trenngelpuffer pH 8.8, 2 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) Glycerol, 5 % (w/v) β -Mercaptoethanol, 0.001 % (w/v) Bromphenolblau
Transferpuffer:	25 mM Tris-HCl pH 8.3, 114 mM Glycin, 10 % Methanol
TBS-Puffer:	50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl
TBST-Puffer:	0.1 % (v/v) Tween 20 in TBS-Puffer
Maleinsäurelösung:	100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl
Acrylamid/Bisacrylamid:	30 % (g/v) Acrylamid, 0.8 % (g/v) Bisacrylamid
Coomassie-Färbelösung:	2 % (g/v) Coomassie Brilliant blue R 250, 10 % (v/v) Eisessig, 25 % (v/v) Isopropanol
Entfärbelösung:	12.5 % (v/v) Eisessig, 12.5 % (v/v) Isopropanol
Blocking-Reagenz:	25 mM Tris-HCl, 1 μ g/ml Polyvinylalkohol, 150 mM NaCl
APS	20 %
Bromphenolblau in Ethanol	10 %

2.2.1.3.3.2. Zusammensetzung der Gele

	Trenngel 10 %	Sammelgel 3.6 %
Acrylamid-Lösung	10.3 ml	1.2 ml
Trenngelpuffer	15 ml	
Sammelgelpuffer		5 ml
Aqua bidest.	4.7 ml	3.7 ml
APS-Lösung	0.1 ml	0.03 ml
TEMED	0.03 ml	0.01 ml

2.2.1.3.3.3. Herstellung der Gele

Zur Herstellung der Gele wurden jeweils 2 Glasplatten zusammen mit einem Abstandhalter in einen Gießstand eingespannt und das frisch zusammenpipettierte Trenngel luftblasenfrei zwischen die beiden Platten gegeben. Um ein Austrocknen

während des Auspolymerisierens zu verhindern, wurde mit ca. 1 ml Aqua bidest. überschichtet. Nach ca. 1 h wurden die Sammelgelkämme zwischen die Glasplatten gesteckt und das Sammelgel sofort nach Herstellung ebenfalls luftblasenfrei zwischen die Platten gegeben. Nach Aushärten des Sammelgels wurde der Gießstand mit feuchten Tüchern überschichtet und bis zum folgenden Tag im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.1.3.3.4. Probenvorbereitung

Zur Probenvorbereitung wurden die entsprechenden Enzympräparationen, die je nach Reinigungsgrad auf einen Proteingehalt von 5-20 µg pro Bahn mit Probenauftragspuffer verdünnt wurden, ebenso wie die Molekulargewichtsstandards (94; 67; 43; 30; 20.1; 14.4 kDa) 5 min bei 90 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben an zentrifugiert und bis zum nächsten Tag bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.1.3.3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zu Beginn der Gelelektrophorese wurden die Probenkämme vorsichtig aus den Gelen gezogen und die leeren Probentaschen zunächst mit Elektrodenpuffer gefüllt. Die Proben wurden mit einer 1 ml Hamilton-Spritze aufgetragen. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer soweit mit Elektrodenpuffer gefüllt, bis die beiden Elektroden mit Puffer bedeckt waren, und das Gel wurde eingespannt. Bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA (2 Gele!) fand die Probenaufkonzentrierung im Sammelgel statt. Nachdem das in den Proben enthaltene Bromphenolblau das Sammelgel durchlaufen hatte, wurde die Stromstärke auf 100mA erhöht. War die Laufstrecke von mindestens 6 cm im Trenngel erreicht, wurden die Gele der Apparatur entnommen und das Sammelgel wurde entfernt. Eins der Gele wurde etwa 1 h in einem Coomassie-Färbebad geschüttelt und anschließend mit Entfärbelösung von überschüssiger Farbe befreit, so daß nur noch die Proteinbanden angefärbt waren.

2.2.1.3.3.6. Western-Blot

Mit dem zweiten Gel wurde ein Western-Blot im „semi-dry“ Verfahren durchgeführt. Auf die untere Elektrode der Blot-Apparatur wurden zwischen mehreren Lagen in Transferpuffer getauchtes Filterpapier eine zuvor eine Stunde in Aqua bidest. eingeweichte Nitrocellulosemembran und das Elektrophoresegel gelegt. Die zweite Elektrode wurde angeschlossen und für 45 min eine konstante Stromstärke zwischen 50 und 100 mA angelegt, wobei die dazugehörige Spannung nicht über 14 V ansteigen sollte. Nach beendetem Blot wurde die Nitrocellulosemembran mit Ponceau 0.1 % (in 5% Essigsäure) angefärbt und der Standard mit Kugelschreiber markiert. Entfärbt wurde die Membran durch mehrfaches Spülen mit Wasser. Anschließend wurde die Membran durch einminütiges Schwenken in Blocking Reagenz blockiert. Dann wurde diese für 1 h mit einem monoklonalen Antikörper (1:1000-Verdünnung) gegen CYP2A6 (Gentest, A106, immunoblot-spezifisch) behandelt. Nach 4 x 5 minütigem Waschen mit TBST-Puffer wurde die Membran laut Vorschrift in der Lösung mit einem 2. Antikörper (BM Chromogenic Western Blotting Kit, Boehringer Mannheim), der an den 1. Antikörper binden sollte, ebenfalls für 1 h geschwenkt. Wieder wurde 4 x 5 min mit TBST-Puffer gespült und schließlich mit dem Färbereagenz des Kits angefärbt. Die Proteinbanden, die eine Reaktion mit dem Antikörper gegen 2A6 eingegangen waren, zeigten eine braun-violette Färbung.

2.2.1.3.4. Sequenzierung des isolierten Enzyms

Nach Durchführung einer SDS-Gelelektrophorese (2.2.1.3.3.) wurden die zu sequenzierenden Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und in Aqua bidest. gelagert. Die anschließende Sequenzierung fand mittels MALDI-MS (Peptide-Mass-Fingerprint-Analyse) durch die Firma Toplab GmbH, Martinsried, statt. Die Proteine wurden mit Trypsin verdaut. Der Überstand wurde anschließend über ZipTip (Millipore) aufkonzentriert und entsalzt. Anschließend fand die Messung mittels MALDI-MS statt. Die Meßergebnisse wurden mit den Daten der NCBI Nr (release 11/05/2001) Datenbank abgeglichen. Als software dienten die Programme ProFound und MS-Fit.

2.2.1.3.5. Cumarin-7-Hydroxylierung

Die Cumarin-7-Hydroxylierungsaktivität wurde mit Hilfe von zwei verschiedenen fluorimetrischen Meßverfahren ermittelt.

2.2.1.3.5.1. Fluorimeter

Die mittels Fluorimeter bestimmte 2A6-Aktivität fand in Anlehnung an das von Yun *et al.* [1991] publizierte Verfahren statt. Der Test auf Cumarin-7-Hydroxylierungsaktivität während der 2A6-Reinigung wurde in 50 mM Tris-Puffer pH 7.4 durchgeführt. Für die Inkubation mit Mikrosomen wurden 150 µg Protein verwendet. Die Umsetzung im rekonstituierten System erfolgte mit 540 pmol gereinigtem humanem CYP2A6, 5 U partiell gereinigter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase, die als Nebenprodukt bei der Hydrophoben Interaktionschromatographie anfiel (s. 2.3.1.2.1), sowie einem Zusatz von 30 µM DLPC. Nach Zusatz von 20 µM Cumarin wurde 3 min im Schüttelwasserbad bei 37 °C vorinkubiert und anschließend die Inkubation mit 0.5 mM NADPH gestartet. Das Endvolumen der Ansätze betrug 500 µl. Nach 10 min wurde die Reaktion mit 60 µl 15 % (w/v) Trichloressigsäure und 1 ml Dichlormethan abgestoppt. Daraufhin wurde der Ansatz erneut bei 37 °C für 10 min vorsichtig geschüttelt. 0.5 ml der organischen Phase wurden abgenommen und mit 3 ml 30 mM Borat-Puffer pH 9 versetzt, gevortext und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde fluorimetrisch bei einer Anregungswellenlänge von 358 nm und einer Emissionswellenlänge von 458 nm vermessen.

2.2.1.3.5.2. HPLC

2.2.1.3.5.2.1. Inkubationsbedingungen

Um die während der Reinigung stets mitgetestete 7-Hydroxylierung des Cumarins zu quantifizieren, wurde die 2A6-Aktivität mittels HPLC nochmals überprüft. Die Umsetzung wurde in Anlehnung an das von Harsdorf [1998] entwickelte Verfahren durchgeführt.

Es wurden 45 µg mikrosomales Protein mit 200 µM Cumarin in 50 mM Phosphatpuffer pH 7.4 3 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Für die Testung des rekonstituierten Systems wurden 5 µg gereinigtes CYP2A6, 50 µg rekombinante NADPH-Cytochrom P450-Reduktase und ein Zusatz von 30 µM DLPC verwendet. Die Umsetzung mit den Fraktionen nach Hydrophober Interaktionschromatographie wurde mit 45 µg, nach Hydroxylapatit-Säule mit 15 µg 2A6-haltiger Proteinfraction pro 150 µl-Ansatz durchgeführt. Mit 0.5 mM NADPH wurde die Reaktion gestartet und nach 20 min mit 150 µl Methanol beendet. Nach Abstoppen der Inkubation wurden die Ansätze 5 min bei 10000 U/min zentrifugiert und der Überstand mittels HPLC analysiert.

2.2.1.3.5.2.2. HPLC-Analytik

HPLC-Pumpe:	Gradientenpumpe W510 mit Systemcontroller <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Detektor:	Scanning Fluorescence Detektor Waters 470 <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Autosampler:	W710 WISP, <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Integrator:	Maxima [®] -Software 820, Version 3.30, <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Stationäre Phase:	ODS Hypersil-Säule (5µm) 250 x 4 mm (Hewlett Packard) Vorsäule RP-Select B (5µm) 4 x 4 mm (Fa. Merck)

Mobile Phase:	45 % Methanol 55 % 0.1 M Ammoniumacetatpuffer pH 4.5
Laufzeit:	isokratisch über 15 min
Detektion:	Fluoreszenz (Gain = 10, Attenuation = 1) $\lambda_{ex} = 358 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 458 \text{ nm}$
Flußrate:	0.8 ml / min
Injektionsvolumen:	10 μl
Retentionszeiten:	7-Hydroxycumarin: $6.2 \pm 0.2 \text{ min}$

Nach Einstellen des Fließmittels mit Ammoniak auf pH 4.5 wurde der Eluent filtriert (Sartorius-Membranfilter, 0.45 μm) und 15 min im Ultraschallbad entgast.

Die Quantifizierung des Metaboliten erfolgte über eine 6-Punkt-Kalibrierung mit Konzentrationswerten zwischen 20 und 1000 nM. Hierzu wurde die entsprechende Menge an 7-Hydroxycumarin im Fließmittel gelöst und mittels HPLC vermessen. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung verwendet. Diese wurden in 50 mM Phosphatpuffer pH 7.4 gelöst und jeweils einem Inkubationsansatz wie unter 2.2.1.3.5.2.1. beschrieben zugefügt. Die Inkubation erfolgte jedoch mit denaturierten Mikrosomen sowie ohne NADPH 23 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad. Die Inkubation wurde mit 300 μl Methanol abgestoppt und der Überstand anschließend mittels HPLC quantifiziert. Die sich hieraus ergebende Wiederfindungsrate betrug 106 %.

2.2.1.3.6. Reduktion von Benzamidoxim

2.2.1.3.6.1. Inkubationsbedingungen

Die Prüfung des gereinigten CYP2A6 auf Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität wurde nach der von Möller beschriebenen Methode [1997] durchgeführt. Der Inkubationsansatz bestand aus 75 pmol Cytochrom b_5 (aus Schweinelebermikrosomen), 0.35 U NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase (aus Schweinelebermikrosomen), 11 μg gereinigtem CYP2A6 sowie 40 μM DLPC für das rekonstituierte System oder 300 μg Protein für die Umsetzung mit humanen Lebermikrosomen. Die

Reduktion erfolgte in 100 mM Phosphatpuffer pH6.3 unter Zusatz von 0.5 mM Benzamidoxim. Das Ansatzvolumen betrug 150 µl für das gereinigte Enzym und 300 µl für das mikrosomale System. Nach 3-minütiger Vorinkubation bei 37 °C im Schüttelwasserbad wurde die Inkubation durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet und nach weiteren 30 min durch Zusatz von 150 bzw. 300µl Methanol beendet. Dabei gefällte Proteine wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 10000 U/min sedimentiert, der Überstand wurde mittels HPLC analysiert.

Die Inkubation von Benzamidoxim wurde ebenfalls wie oben beschrieben mit der humanen Benzamidoxim-Reduktase durchgeführt, die von Rieckert und Behrens nach der Vorschrift von Möller [1997] gereinigt wurde.

2.2.1.3.6.2. HPLC-Analytik

Das von Wohlers [1994] entwickelte Verfahren wurde leicht modifiziert.

HPLC-Pumpe:	Binäre Pumpe, Serie 1100, <i>Agilent, Waldbronn, Deutschland</i>
Detektor:	Diodenarray-Detektor Serie 1100, <i>Agilent, Waldbronn, Deutschland</i>
Autosampler:	Serie 1100, <i>Agilent, Waldbronn, Deutschland</i>
Integrator:	Hewlett Packard (HP) Chemstation A.07.01 <i>Agilent, Waldbronn, Deutschland</i>
Stationäre Phase:	LiChrospher [®] RP select B-Säule (5µm) 250 x 4 mm (Fa. Merck) Vorsäule RP-Select B (5µm) 4 x 4 mm (Fa. Merck)
Mobile Phase:	3 mM Octylsulfonat pH 2.5/Acetonitril 88:12 (v/v)
Laufzeit:	isokratisch über 35 min
Detektion:	UV, 229 nm
Flußrate:	1 ml / min
Injektionsvolumen:	10 µl
Retentionszeiten:	Benzamidoxim: 21.6 ± 0.1 min Benzamidin: 25.2 ± 0.2 min

Nachdem der pH-Wert des Fließmittels mit Phosphorsäure auf pH 2.5 eingestellt wurde, wurde der Eluent mittels Vakuum filtriert (SartoriusMembranfilter, 0.45 µm) und im Ultraschallbad 15 min lang entgast.

Die Quantifizierung des Metaboliten erfolgte über eine 7-Punkt-Kalibrierung mit Konzentrationswerten zwischen 2.5 und 100 µM. Hierzu wurde das Benzamidin im Fließmittel gelöst und mittels HPLC vermessen. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung verwendet. Diese wurden in 100 mM Phosphatpuffer pH 6.3 gelöst und jeweils einem Inkubationsansatz, wie unter 2.2.1.3.6.1. beschrieben, zugefügt. Die Inkubation erfolgte jedoch mit denaturierten Mikrosomen sowie ohne NADH 33 min bei 37°C im Schüttelwasserbad. Die Ansätze wurden mit jeweils 300 µl Menge Methanol abgestoppt und der Überstand anschließend mittels HPLC quantifiziert. Die sich hieraus ergebende Wiederfindungsrate betrug 108 %.

2.2.1.3.6.3. Reduktion von Benzamidoxim durch rekombinant exprimiertes, gereinigtes CYP3A4

In *E.coli* exprimiertes und gereinigtes CYP3A4 (PanVera) wurde, wie unter 2.2.1.3.6.1. beschrieben, in Kombination mit Cytochrom b_5 und der b_5 -Reduktase auf Reduktion von Benzamidoxim geprüft. Für die Inkubationen wurden 15 µg CYP3A4 anstelle des CYP2A6 verwendet.

2.2.1.3.6.4. Reduktion von Benzamidoxim durch rekombinant exprimiertes, gereinigtes CYP2C19

In *E.coli* exprimiertes und gereinigtes CYP2C19 (PanVera) wurde wie unter 2.2.1.3.6.1. beschrieben in Kombination mit Cytochrom b_5 und der b_5 -Reduktase auf Reduktion von Benzamidoxim geprüft. Für die Inkubationen wurden 15 µg CYP2C19 anstelle des CYP2A6 verwendet.

2.2.1.3.6.5. Reduktion von Benzamidoxim durch die rekombinant exprimierte UDP-Glucuronyltransferase

Das in Insektenzellen exprimierte humane Polypeptid B7 der UDPGlycosyl-Transferase 2 Familie (Panvera) wurde ebenfalls, wie unter 2.2.1.3.6.1. beschrieben, in Kombination mit Cytochrom b_5 und der b_5 -Reduktase auf Reduktion von Benzamidoxim geprüft. Für die Inkubationen wurden 15 μg UDP-Glucuronyltransferase anstelle des CYP2A6 verwendet.

2.2.1.3.7. Reduktion von Guanoxabenz

2.2.1.3.7.1. Inkubationsbedingungen

Die Reduktion von Guanoxabenz zum Guanabenz wurde nach der von Demesmaeker [1996] entwickelten Methode durchgeführt. Unter Zusatz von 40 μM DLPC und 0.5 mM Guanoxabenz wurden 11 μg 2A6-Präparation, 0.35 U NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase (Schwein) und 75 pmol Cytochrom b_5 (Schwein) in 150 μl 50 mM Phosphatpuffer pH 6.3 3 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 mM NADH gestartet und nach 30 min mit 150 μl Methanol beendet. Nach Abstoppen der Inkubation wurden die Ansätze für 1-2 Stunden bei -20 °C eingefroren, anschließend 5 min bei 10000 U/min zentrifugiert und der Überstand mittels HPLC analysiert.

2.2.1.3.7.2. HPLC-Analytik

HPLC-Pumpe: Gradientenpumpe W510 mit Systemcontroller

Waters, Milford, CT, USA

Detektor: W486 Tunable Absorbance Detector, *Waters, Milford, CT, USA*

Autosampler: W710 WISP, *Waters, Milford, CT, USA*

Integrator: Maxima[®]-Software 820, Version 3.30,
Waters, Milford, CT, USA

Stationäre Phase:	LiChrospher [®] RP select B-Säule (5µm) 125 x 4 mm (Fa. Merck) Vorsäule RP-Select B (5µm) 4 x 4 mm (Fa. Merck)
Mobile Phase:	30 % Methanol 0.4% Essigsäure, pH 4.0
Laufzeit:	isokratisch über 30 min
Detektion:	UV, 272 nm
Flußrate:	1 ml / min
Injektionsvolumen:	10 µl
Retentionszeiten:	Guanoxabenz: 15.2 ± 0.2 min Guanabenz: 21.7 ± 0.4 min

Nach Einstellen des pH-Wertes des Eluenten mit Ammoniak auf pH 4.0 wurde das Fließmittel filtriert (Sartorius-Membranfilter, 0.45 µm) und anschließend 15 min im Ultraschallbad entgast.

Die Quantifizierung des Metaboliten erfolgte über eine 7-Punkt-Kalibrierung mit Konzentrationswerten zwischen 2.5 und 100 µM. Hierzu wurde das Guanabenz im Fließmittel gelöst und mittels HPLC vermessen. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung verwendet. Diese wurden in 50 mM Phosphatpuffer pH 6.3 gelöst und jeweils einem Inkubationsansatz, wie unter 2.2.1.3.7.1. beschrieben, zugefügt. Die Inkubation erfolgte jedoch mit denaturierten Mikrosomen und ohne NADH 30 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad. Die Ansätze wurden mit 300 µl Methanol abgestoppt und anschließend mittels HPLC quantifiziert. Die sich hieraus ergebende Wiederfindungsrate betrug 110 %.

2.2.1.3.8. Reduktion von RO 48-3656

2.2.1.3.8.1. Inkubationsbedingungen

Die Inkubation von RO 48-3656 wurde analog dem unter 2.2.1.3.6.1. beschriebenen Verfahren für das Benzamidoxim durchgeführt. Statt einer 0.5mM Substratkonzentration wurde lediglich eine von 1 mM gewählt.

2.2.1.3.8.2. HPLC-Analytik

HPLC-Pumpe:	Gradientenpumpe W600E mit Systemcontroller
Detektor:	W486 Tunable Absorbance Detector, <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Autosampller:	W700 Satellite WISP, <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Integrator:	EZChrom™ Chromatography Data System, Version 6.7, <i>Scientific Software, Inc., San Ramon, CA, USA</i>
Stationäre Phase:	LiChrospher® RP select B-Säule (5µm) 250 x 4 mm (Fa. Merck) Vorsäule RP-Select B (5µm) 4 x 4 mm (Fa. Merck)
Mobile Phase:	96 % 100 mM Phosphatpuffer pH 4.5, 10 mM TMACI 4 % Acetonitril
Laufzeit:	isokratisch über 35 min
Detektion:	UV, 240 nm
Flußrate:	1 ml / min
Injektionsvolumen:	10 µl
Retentionszeiten:	RO 44-3888: 13.7 min RO 48-3656: 26 min

Nachdem der Eluent mit Phosphorsäure auf pH 4.5 eingestellt worden war, wurde das Fließmittel mittels Vakuum filtriert (Sarbrüis-Membranfilter, 0.45 µm) und im Ultraschallbad 15 min lang entgast.

Die Quantifizierung des Metaboliten erfolgte über eine 5-Punkt-Kalibrierung mit Konzentrationswerten zwischen 10 und 400 μM . Hierzu wurde der Metabolit, das RO 44-3888, im Fließmittel gelöst und mittels HPLC vermessen. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung verwendet. Diese wurden in 100 mM Phosphatpuffer pH 6.3 gelöst und jeweils einem Inkubationsansatz, wie unter 2.2.1.3.8.1. beschrieben, zugefügt. Die Ansätze wurden jedoch mit denaturierten Mikrosomen und ohne NADH 33 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Ansätze wurden mit 300 μl Methanol abgestoppt und der Überstand anschließend mittels HPLC quantifiziert. Die sich hieraus ergebende Wiederfindungsrate betrug 104 %.

2.2.1.3.9. Aktivitäten von Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 Reduktase aus Schweineleber bzw. humaner Leber

Benzamidoxim wurde mit 15 μg der humanen Benzamidoxim-Reduktase, die von Rieckert [1999] und Behrens [1999] nach der Vorschrift von Möller [1997] isoliert wurde, anstelle des CYP2A6 wie unter 2.2.1.3.6.1. beschrieben inkubiert. Dabei wurden jeweils 0.35 U NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und 75 pmol Cytochrom b_5 für die Ansätze verwendet, deren Endvolumen 150 μl betrug. Die Umsetzung mit gereinigter humaner NADH-Cytochrom b_5 Reduktase und humanem rekombinant exprimiertem Cytochrom b_5 (Panvera) diente als Vergleich zu der Umsetzung mit den Komponenten aus Schweinelebermikrosomen. Das humane Cytochrom b_5 und die b_5 -Reduktase wurden für die Umsetzung mit Benzamidoxim nacheinander gegen solche aus Schweinelebermikrosomen isolierte ausgetauscht.

2.2.1.3.10. Studien mit einem Antikörper gegen CYP2A6

Es wurden Inkubationen, wie unter 2.2.1.3.6.1. beschrieben, durchgeführt, denen unterschiedliche Mengen an Antikörpern zugesetzt wurden. Für die Testung mit Mikrosomen wurden Ansätze ohne und jeweils mit 3, 6 und 10 μl Antikörperlösung verwendet. Die Hemmung der Reduktion mit gereinigtem 2A6 wurde mit 3 μl

Antikörperpräparation überprüft, wobei wieder eine Vergleichsinkubation ohne Hemmstoff durchgeführt wurde. Der Antikörper wurde entweder humanen Lebermikrosomen oder den Bestandteilen des rekonstituierten Systems des gereinigten CYP2A6 zugesetzt und 15 min auf Eis vorinkubiert. Anschließend wurden die für die Inkubation benötigten weiteren Komponenten, wie unter 2.2.1.3.6.1. beschrieben (Puffer, gegebenenfalls DLPC, Benzamidoxim und NADH), dem Ansatz bis zu einem Endvolumen von 150 µl hinzugefügt und 30 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Abgestoppt wurde ebenfalls mit 150 µl Methanol. Die zentrifugierten Proben wurden mittels HPLC analysiert (2.2.1.3.6.2.).

Zur Überprüfung der Inhibitorpotenz des reaktionsspezifischen Antikörpers wurde die 7-Hydroxylierung des Cumarins mit rekombinant exprimiertem CYP2A6 (Panvera) in An- und Abwesenheit dieses Antikörpers durchgeführt. Dazu wurden die beiden hierfür benötigten Enzymkomponenten, das gentechnisch hergestellte 2A6 und die rekombinante NADPH-Cytochrom P450 Reduktase, zusammen mit 5 µl Antikörperpräparation wieder 15 min auf Eis vorinkubiert. Anschließend wurden alle weiteren Bestandteile wie Puffer, DLPC, Cumarin und NADPH hinzugefügt (2.2.1.3.5.2.1.) und 20 min bei 37 °C inkubiert. Da das Ansatzvolumen 150 µl betrug, wurde die Reaktion mit der gleichen Menge Methanol abgestoppt. Die Inkubationsansätze wurden 5 min bei 10000 U/min zentrifugiert und der Überstand mittels HPLC quantifiziert (2.2.1.3.5.2.2.).

2.2.1.3.11. Hemmung der Cumarin-7-Hydroxylierung durch Benzamidoxim

Im rekonstituierten System wurde die Oxidation von Cumarin, wie unter 2.2.1.3.5.2.1. beschrieben, unter Zusatz steigender Mengen Benzamidoxim durchgeführt. In Mikrosomen wurde der Einfluß von 0.05, 0.5, 1 und 5mM Benzamidoxim getestet, während dem rekonstituierten System nur 5 mM zugesetzt wurde. Als Kontrolle dienten jeweils Ansätze ohne zusätzliches zweites Substrat.

2.2.1.3.12. Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim durch Cumarin

Im rekonstituierten System wurde die Reduktion von Benzamidoxim, wie unter 2.2.1.3.6.1. beschrieben, unter Zusatz steigender Mengen Cumarin durchgeführt. Hierfür wurden Inkubationsansätzen mit humanen Lebermikrosomen 0.002, 0.02, 0.2, 1, 1.5 und 2 mM Cumarin zugesetzt. Die Inkubation im rekonstituierten System erfolgte unter Zusatz von 1.5 mM Cumarin. Ansätze ohne zweites Substrat dienten als Vergleich.

2.2.2. Isolierung von rekombinant exprimiertem CYP2A6 aus Hefezellen

2.2.2.1. Gewinnung des rekombinanten CYP2A6 aus Hefezellen

Das rekombinante CYP2A6 wurde zusammen mit der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase in Hefezellen exprimiert (AstraZeneca, Schweden). 100 nmol des CYP2A6 in diesen Hefezellen standen für die weitere Aufreinigung in gefriergetrockneter Form (Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) zur Verfügung. Die Isolierung des rekombinanten CYP2A6 aus Hefezellen wurde in Anlehnung an das Verfahren von Soucek [1999] mit Modifikationen durchgeführt, welcher die Reingung von CYP2A6 aus *E.coli* beschrieb. Der Maßstab der Säulenvolumina wurde entsprechend der geringen Auftragsmenge (100 nmol P450) verkleinert. Zudem mußte das Detergenz Triton[®] N-101 durch Tergitol[®] NPX ersetzt werden.

2.2.2.1.1. Solubilisation der Hefezellen

Die Hefezellen wurden zunächst langsam unter Eiskühlung aufgetaut und mit einem Solubilisierungspuffer auf einen P450-Gehalt von 0.83 nmol/ml eingestellt.

Zusammensetzung des Solubilisierungspuffers:	50 mM Tris-HCl pH 7.4
	20 % (v/v) Glycerol
	1 mM Na ₂ EDTA
	1 mM Dithiotreitol

Die verdünnte Protein-Puffer-Mischung wurde dann durch Zusatz von Na-Cholat und von Tergitol[®] NPX auf jeweils eine Endkonzentration von 0.625 % (w/v) der beiden Detergentien eingestellt. Anschließend wurde 2 h vorsichtig mit einem KPGRührer unter Eiskühlung solubilisiert und schließlich 1 h bei 100000 g und 4 °C zentrifugiert. Es bildete sich ein klarer Überstand mit einem dickflüssigen Pellet, welches sich durch Dekantieren nicht abtrennen ließ. Der gesamte Inhalt der Zentrifugenröhrchen

wurde daher nach Kolieren durch Verbandmull für die Reinigung an DEAE-Cellulose verwendet.

2.2.2.1.2. Reinigung an DEAE-Cellulose

Die DEAE-Cellulose-Säule (1.5 x 16 cm) wurde zu Beginn mit mindestens drei Säulenvolumina des Solubilisierungspuffers (2.2.2.1.1.) equilibriert. Nach Auftrag des Solubilisates wurde die DEAE-Cellulose erneut mit dem zur Equilibrierung verwendeten Puffer gewaschen. Wie nach Vorschrift fand sich das gesamte CYP2A6 im Durchlauf wieder. Dieser wurde mittels Ultrafiltration (Ausschlußgröße 10000 Da) einkonzentriert und zur Detergenzentfernung zweimal für jeweils 1h mit 1 g Amberlite bei 4 °C vorsichtig geschüttelt. Amberlite® XAD wurde anschließend durch Filtrieren über Glaswolle von der Enzympräparation wieder abgetrennt. Schließlich wurde mit einer Lösung aus 20 % (v/v) Glycerol sowie 0.2 mM Na₂EDTA und 1 mM Dithiothreitol auf das dreifache Volumen verdünnt. Die so erhaltene Verdünnung wurde für die weitere Aufreinigung an CM-Sepharose verwendet.

2.2.2.1.3. Reinigung an CM-Sepharose

Für die Reinigung an CM-Sepharose benötigte Puffer:

Equilibrierungspuffer	20 mM Phosphatpuffer pH 7.4 20 % (v/v) Glycerol 0.2 mM Na ₂ EDTA 1 mM Dithiothreitol
Waschpuffer	50 mM Phosphatpuffer pH 7.4 20 % (v/v) Glycerol 0.2 mM Na ₂ EDTA 1 mM Dithiothreitol

Elutionspuffer I	80 mM Phosphatpuffer pH 7.4 0.2 % (v/v) Tergitol [®] NPX 20 % (v/v) Glycerol 0.2 mM Na ₂ EDTA 1 mM Dithiothreitol
Elutionspuffer II	200 mM Phosphatpuffer pH 7.4 0.2 % (v/v) Tergitol [®] NPX 20 % (v/v) Glycerol 0.2 mM Na ₂ EDTA 1 mM Dithiothreitol

Die CM-Sepharose-Säule (fast flow, 1.5 x 3 cm) wurde zunächst mit mindestens drei Säulenvolumina eines 20 mM Phosphatpuffers pH 7.4 equilibriert (Equilibrierungspuffer). Nach Auftragen der unter 2.2.2.1.2. gewonnenen Enzympräparation wurde die Säule mit einem 50 mM Phosphatpuffer pH 7.4 gewaschen (Waschpuffer). Das CYP2A6 wurde sowohl mit Elutionspuffer I als auch mit Elutionspuffer II von der Säule eluiert. Die mit den beiden verschiedenen Puffern eluierten Fraktionen wurden mittels Ultrafiltration (Ausschlußgröße 10000 Da) jeweils getrennt einkonzentriert und, wie unter 2.2.2.1.4. beschrieben, aufgearbeitet.

2.2.2.1.4. Detergenzentfernung

Das von Soucek [1999] verwendete Detergenz Triton[®] N-101, das nicht mehr im Handel erhältlich ist, wurde für die gesamte Reinigung gegen Tergitol[®] NPX ausgetauscht. Hierbei handelt es sich ebenso wie bei Triton[®] N-101 um einen Nonyl-Polyethylenglykol-Ether. Tergitol[®] NPX wurde analog dem unter 2.2.1.2.4.1. beschriebenen Verfahren durch eine Hydroxylapatit-Säule (1 x 6 cm) entfernt. Die Säule wurde mit 10 mM Phosphatpuffer pH 7.7 equilibriert. Nach Auftragen des Enzyms auf die Säule erfolgte das Auswaschen des Detergenz mit dem selben Puffer. Auch hier konnte die sinkende Tergitol[®] NPX-Konzentration mittels einer Durchflußzelle bei 280 nm verfolgt werden, da dieses ebenso wie Triton[®] X-100 eine

starke Eigenabsorption bei der gewählten Wellenlänge besitzt. Das CYP2A6 wurde schließlich mit einem 300 mM Phosphatpuffer pH 7.4, welcher noch zusätzlich 20 % (v/v) Glycerol, 0.2 mM Na₂EDTA, 1 mM Dithiothreitol sowie 0.1 % (w/v) Na-cholat enthielt, wieder eluiert. Die aufgefangenen Fraktionen wurden vereinigt und durch Filtrationszentrifugation mit Centricon Plus-20 (Ausschlußgröße 30000 Da) erneut einkonzentriert. Mit Hilfe einer Sephadex[®] G-25 Säule (NAP[™] 25) wurde auf einen 50 mM Phosphatpuffer pH 7.4, der ebenfalls 1 mM Na₂EDTA sowie 20 % (v/v) Glycerol enthielt, umgestellt. In diesem Medium wurde das Enzym bis zur Durchführung der nachfolgenden Studien zunächst im Kühlschrank, später bei –20 °C aufbewahrt.

2.2.2.2. Analytische Methoden zur Charakterisierung des rekombinant exprimierten CYP2A6 aus Hefezellen

2.2.2.2.1. Überprüfung der Identität und Reinheit der Reinigung mittels SDS-Page und Western-Blot

Die gereinigten CYP2A6-Fractionen wurden zusammen mit Hefezellen, humanen Lebermikrosomen, in Lymphoblasten exprimiertem CYP2A6 sowie rekombinanter NADPH-Cytochrom P450 Reduktase mittels SDS-Page und Western-Blot überprüft. Für den Western-Blot wurde ebenfalls ein monoklonaler Antikörper gegen CYP2A6 (Gentest, A106, immunoblot-spezifisch) verwendet. Die Durchführung erfolgte wie bereits unter 2.2.1.3.3. beschrieben.

2.2.2.2.2. Cumarin-7-Hydroxylierung

Auch die Cumarin-7-Hydroxylierungsaktivität des rekombinanten aus Hefezellen gereinigten CYP2A6 wurde analog dem aus humanen Lebermikrosomen isolierten Enzym getestet (2.2.1.3.5.2.). Zum einen wurden die Hefezellen selber, zum anderen das hieraus isolierte CYP2A6 auf ihre Hydroxylierungsaktivität überprüft.

Desweiteren wurde dem rekonstituierten System eine Menge von 75 pmol Cytochrom b₅ zugesetzt, um den Einfluß dieses Elektronenüberträgers auf die Oxidation von Cumarin zu untersuchen.

2.2.2.2.3. Reduktion von Benzamidoxim

Die Fähigkeit zur Reduktion von Benzamidoxim durch das in Hefezellen exprimierte 2A6 wurde geprüft. Dabei wurden Umsetzungen mit Hefezellen analog der Reduktion mit Mikrosomen sowie mit aus diesen isoliertem CYP2A6 durchgeführt. Die verwendeten Inkubationsbedingungen und HPLC-Analytik entsprachen dabei der in 2.2.1.3.6. beschriebenen Methode.

2.2.2.2.4. Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim durch Bestandteile in Hefezellen

2.2.2.2.4.1. Hemmung der Reduktion in humanen Lebermikrosomen durch aus Hefezellen isolierte 2A6-Fractionen

Es wurden Umsetzungen von Benzamidoxim mit humanen Lebermikrosomen, denen steigende Mengen an rekombinanter, gereinigter 2A6-Präparation zugesetzt wurden, durchgeführt. Einem typischen Inkubationsansatz (2.2.1.3.6.1.) aus 300 µg mikrosomalem Protein sowie 0.5 mM Substrat wurden vor der dreiminütigen Vorinkubation Konzentrationen von 1 bis 150 µg der gereinigten Lösung aus Hefezellen zugesetzt. Die Reduktion wurde, wie beschrieben, mit 1 mM NADH gestartet und nach 30 min durch Zugabe der gleichen Menge Methanol beendet. Die Ansätze wurden nach Zentrifugation mittels HPLC analysiert (2.2.1.3.6.2.).

2.2.2.2.4.2. Hemmung der Reduktion in humanen Lebermikrosomen durch Hefezellen

Es wurden Umsetzungen, wie unter 2.2.1.3.6.1. beschrieben, mit humanen Lebermikrosomen und Benzamidoxim unter Zusatz von 5 bis 100 µg Hefezellen durchgeführt. Ansätze ohne Hefezellen dienten als Kontrollwert. Die Ansätze wurden nach Zentrifugation mittels HPLC vermessen (2.2.1.3.6.2.).

2.2.2.2.5. 25-Hydroxylierung von 1 α -Hydroxyvitamin D₃

Die Umsetzung von 1 α -Hydroxyvitamin D₃ sowie die anschließende HPLC-Analytik erfolgten in Anlehnung an das von Axén *et al.* [1992] publizierte Verfahren.

2.2.2.2.5.1. Inkubationsbedingungen

Die 25-Hydroxylierung wurde in 50 mM Tris-acetat-Puffer pH 7.4, dem noch 20 % (v/v) Glycerol sowie 0.1 mM EDTA zugesetzt waren, durchgeführt. Es wurden entweder 0.1 nmol rekombinantes und gereinigtes CYP2A6 aus Hefezellen (2.2.2.1.) oder in Lymphoblasten exprimiertes CYP2A6 (Gentest) zusammen mit 250µg rekombinanter P450-Reduktase, 50 µM 1 α -Hydroxyvitamin D₃ sowie 30 µM DLPC 5 min bei 37 °C vorinkubiert. Durch Zusatz von 1.2µmol NADPH bis zu einem Ansatzvolumen von 1000 µl wurde die Reaktion gestartet. Nach 20-minütiger Inkubation bei ebenfalls 37 °C im Schüttelwasserbad wurde durch Ausschütteln mit jeweils dreimal 5 ml eines Trichlorethan-Methanol-Gemisches (2:1, v/v) abgestoppt. Dabei wurden die jeweils abpipettierten organischen Phasen eines Ansatzes vereinigt, unter Stickstoffbegasung getrocknet und für die anschließende Normalphasenchromatographie in 130 µl des hierfür benötigten Fließmittels wieder aufgenommen.

2.2.2.2.5.2. HPLC-Analytik

2.2.2.2.5.2.1. Normalphasenchromatographie

Es wurde eine präparative HPLC in wasserfreiem Medium durchgeführt. Um dieses zu gewährleisten wurde die gesamte Anlage vor Einbau der Säule für einige Stunden mit Isopropanol gründlich gespült.

HPLC-Pumpe:	Waters 600 mit Systemcontroller <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Detektor:	Dual λ Absorbance Detector, Waters 2487, <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Autosampler:	Waters 717 plus, <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Integrator:	EZChrom™ Chromatography Data System, Version 6.7, <i>Scientific Software, Inc., San Ramon, CA, USA</i>
Stationäre Phase:	LiChrosorb® Si 60-Säule (5 μ m) 125 x 4 mm (Fa. Merck) LiChrospher® Si 60-Vorsäule (5 μ m) 4 x 4 mm (Fa. Merck)
Mobile Phase:	90 % Hexan, 10 % 2-Propanol
Laufzeit:	isokratisch über 20 min
Detektion:	UV, 265 nm
Flußrate:	0.7 ml / min
Injektionsvolumen:	100 μ l
Retentionszeiten:	1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃ : 14.8 min

Der Eluent wurde mittels Vakuumpumpe filtriert (Sartorius Membranfilter, 0.45 μ m) und 15 min im Ultraschallbad entgast.

Zunächst wurde ein Standard des 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ injiziert, um die Retentionszeit des Metaboliten zu bestimmen. Dementsprechend wurden die Fraktionen, die zu dieser Zeit \pm 2 min eluiert wurden, aufgefangen und ebenfalls unter Stickstoffbegasung getrocknet. Die trockene Präparation wurde in 130 μ l des für die nächste HPLC-Methode verwendeten Fließmittels erneut gelöst und anschließend der Reversed-Phase-Chromatographie zugeführt.

2.2.2.5.2.2. Reversed-Phase Chromatographie

HPLC-Pumpe:	Waters Modell 590, <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Detektor:	Dual λ Absorbance Detector, Waters 2487, <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Autosampler:	Waters 710 B WISP, <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Integrator:	EZChrom™ Chromatography Data System, Version 6.7, <i>Scientific Software, Inc., San Ramon, CA, USA</i>
Stationäre Phase:	Nucleosil 100 C18 (5 μ m) 125 x 4 mm (Fa. Merck) RP-select B (5 μ m) 4 x 4 mm (Fa. Merck)
Mobile Phase:	85 % Methanol, 15 % Aqua bidest.
Laufzeit:	isokratisch über 20 min
Detektion:	UV, 265 nm
Flußrate:	0.7 ml / min
Injektionsvolumen:	100 μ l
Retentionszeiten:	1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃ : 6.7 min

Der Eluent wurde filtriert (Sartorius-Membranfilter, 0.45 μ m) und 15 min im Ultraschallbad entgast. Die Retentionszeit des Metaboliten wurde mittels eines 4 μ M Standards bestimmt.

2.3. Ergebnisse

2.3.1. Isolierung von CYP2A6 aus humanen Lebermikrosomen

2.3.1.1. Gewinnung humaner Lebermikrosomen

Es wurden sieben verschiedene Chargen an humanen Lebermikrosomen aus gepoolten Leberproben gewonnen, die für die anschließende weitere Aufreinigung verwendet wurden. Die Proteinkonzentrationen der Mikrosomen lagen zwischen 20.85 und 41.59 mg/ml bei P450-Gehältern im Bereich von 0.4 bis 0.7 nmol P450/mg Protein.

2.3.1.2. Isolierung von CYP2A6 aus humanen Lebermikrosomen

Das Cytochrom P450-Isoenzym 2A6 wurde mehrfach in Anlehnung an das von Yun *et al.* [1991] publizierte Verfahren aus humanen Lebermikrosomen isoliert.

Eine Übersicht der 2A6-Reinigung aus humanen Lebermikrosomen gibt Abbildung 2-5.

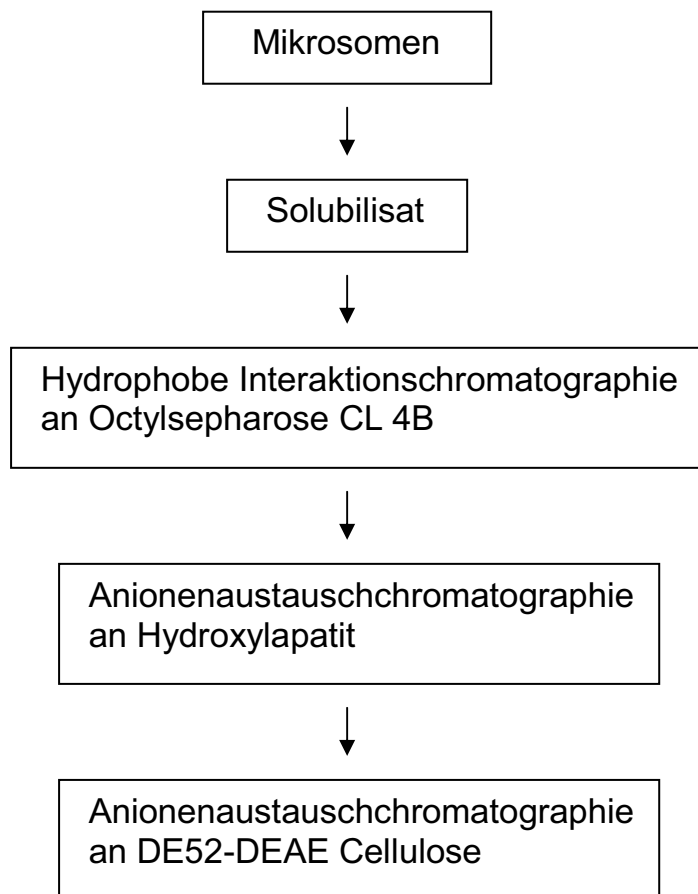
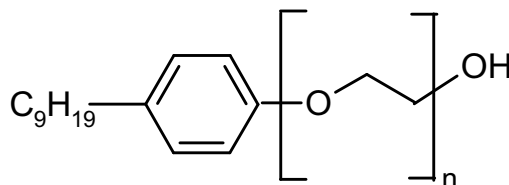
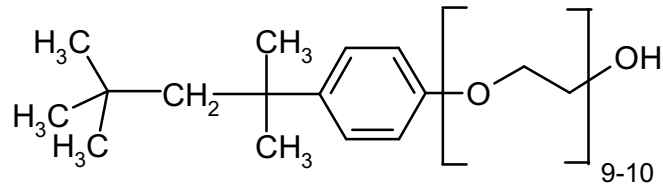


Abb. 2-5. Reinigungsschema der Isolierung von CYP2A6 aus humanen Lebermikrosomen.

Hierbei wurde das nicht mehr im Handel befindliche Detergenz Emulgen 911, ein Polyoxyethylen-nonylphenoether, zunächst durch Thesit ersetzt, welches bereits für die Reinigung der Benzamidoxim-Reduktase aus dem Schwein verwendet wurde [Clement *et al.*, 1997]. Später fand aufgrund der größeren strukturellen Ähnlichkeit zum Emulgen 911 ein weiterer Austausch gegen Triton X-100 statt.



Emulgen 911



Triton X-100

Triton X-100 besitzt zudem eine geringere Affinität zu humanem Cytochrom P450 als Thesit und lässt sich daher leichter wieder aus der Enzympräparation entfernen [Möller, 1997]. Das Entfernen des Detergenz ist für die Entfaltung der vollständigen Enzymaktivität von großer Bedeutung, da dieses schon in geringen Konzentrationen die Katalyse zahlreicher Reaktionen zu hemmen vermag. Ein Zusatz von 0.2 % Thesit zu einem Inkubationsansatz mit humanen Lebermikrosomen, wie unter 2.2.1.5.2. beschrieben, verminderte die 7-Hydroxylierung des Cumarins um ca. 60%. Aus diesem Grund wurde bei der ersten durchgeführten CYP2A6-Isolierung nach jedem Arbeitsschritt das Detergenz entfernt, um die 2A6-aktiven Fraktionen während der Reinigung zu bestimmen und nur diese für die weitere Aufarbeitung zu verwenden. Später wurde aufgrund der hierdurch bedingten starken Proteinverluste darauf verzichtet. Die Befreiung von Triton X-100 erfolgte lediglich bei der letzten aufgereinigten Enzympräparation.

Das Detergenz wurde aus der Enzympräparation entweder wie bei Yun *et al.* [1991] mittels einer Hydroxylapatit-Säule oder auch durch das Adsorptionsmaterial Calbiosorb[®] entfernt. Calbiosorb[®] Adsorbens besteht aus einem hydrophoben Harz, einem Styren-Divinylbenzen, mit einer Porengröße von 90 Angström. Es eignet sich zur Elimination von ungebundenen organischen Verunreinigungen, Salzen und Schwermetallionen, besonders aber auch zur Entfernung von Detergenzien mit niedriger CMC aus wässrigen Medien. Die Adsorptionskapazität beträgt 157 mg/ml für Triton X-100.

Ebenso erfolgte der Austausch der Puffer in den Enzympräparationen nicht, wie bei Yun *et al.* [1991] beschrieben, durch Dialyse sondern mittels einer Sephadex[®] G-25 Säule (NAP[™] 25). Durch die enorme Zeitersparnis dieser Methode des Pufferwechsels wurde das ohnehin sehr empfindliche CYP2A6 wesentlich weniger beansprucht.

2.3.1.2.1. Hydrophobe Interaktionschromatographie an Octyl-Sepharose CL 4B

Bei der Hydrophoben Interaktionschromatographie wurden durch stufenweise Erhöhung der Detergenzkonzentration in den Puffern I bis III von 0.06 auf 0.5 % drei verschiedene Fraktionen eluiert. Als erstes wurde neben einer Vielzahl nicht näher bestimmter mikrosomaler Proteine die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase mit dem Durchlauf von der Säule gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution des Cytochrom b_5 mit Puffer II. Diese Fraktion konnte allerdings nicht bei jeder CYP2A6 Reinigung detektiert werden, da der Gehalt an Cytochrom b_5 in den meisten humanen Lebermikrosomen zu gering war. Schließlich wurde mit der höchsten Konzentration an Thesit (Puffer III) die 2A6-haltige Fraktion eluiert, in der sich auch die NADH-Cytochrom b_5 Reduktase befand. Im Gegensatz dazu wurde das CYP2A6 bei Yun *et al.* [1991] nicht durch Elution mit Puffer III gewonnen, sondern mit Puffer I, der die geringste Menge an Detergenz enthielt. Gründe hierfür könnten zum einen das nicht identische Säulenmaterial und zum anderen der Austausch des Detergenz sein. Ein typisches 417 nm Elutionsprofil zeigt die Abbildung 26.

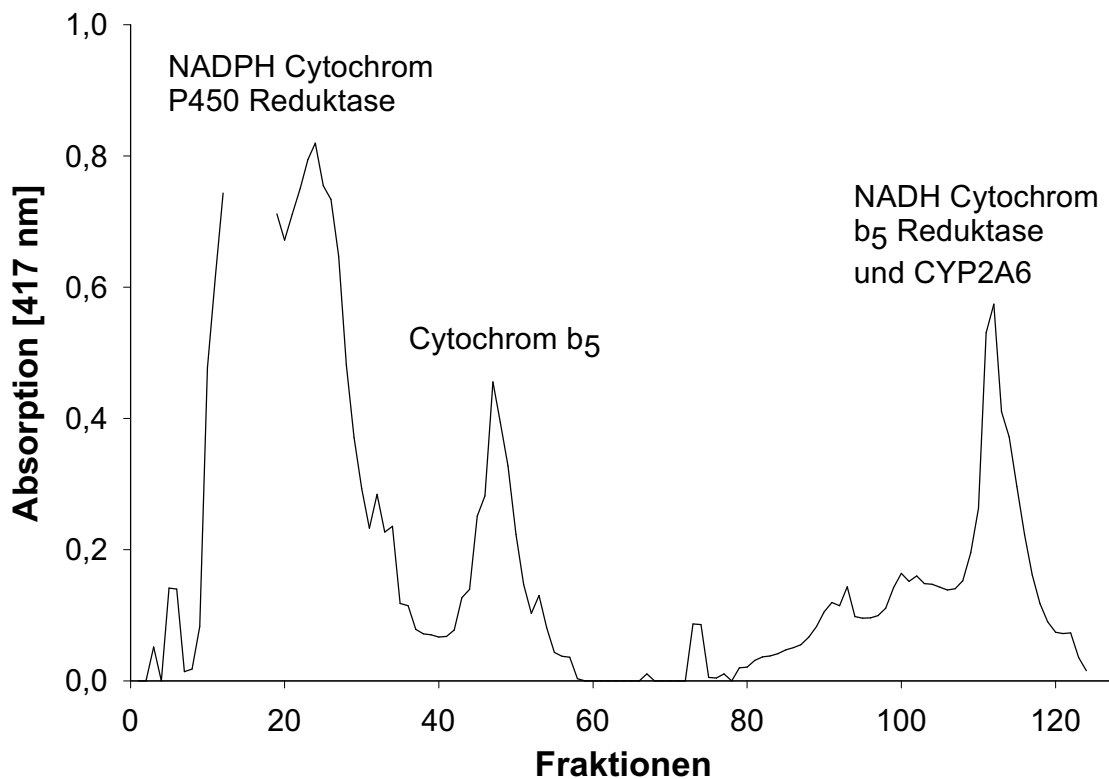


Abb. 2-6. *417 nm Elutionsprofil der Hydrophoben Interaktionschromatographie an Octyl-Sepharose CL 4B während der CYP2A6-Reinigung aus humanen Lebermikrosomen.*

2.3.1.2.2. Anionenaustauschchromatographie an einer Hydroxylapatit-Säule

Das Eluat der Anionenaustauschchromatographie an Hydroxylapatit konnte in vier verschiedene Fraktionen unterteilt werden. Als erstes wurde die NADH-Cytochrom b₅-Reduktase, die nicht an dieses Material bindet, mit dem Durchlauf von der Säule gewaschen. Danach wurden mit 90 mM Phosphatpuffer andere P450-Isoenzyme eluiert, die jedoch keine 2A6-Aktivität zeigten (Fraktion 2). Schließlich erfolgte die Elution des CYP2A6 teilweise bereits langsam mit 180 mM Phosphatpuffer (Fraktion 3), mit 300 mM dann sehr schnell (Fraktion 4). Da in den beiden Fraktionen 3 und 4 eine Cumarin-7-Hydroxylierungsaktivität zu detektieren war, wurden diese für die weitere Aufreinigung an DEAE-Cellulose vereinigt. Im

Gegensatz dazu enthielt bei Yun [1991] überwiegend der 300mM Puffer das CYP2A6. Der Verlauf dieser Säulenchromatographie wurde anhand eines bei 417 nm erstellten Elutionsprofils verfolgt (Abb 2-7).

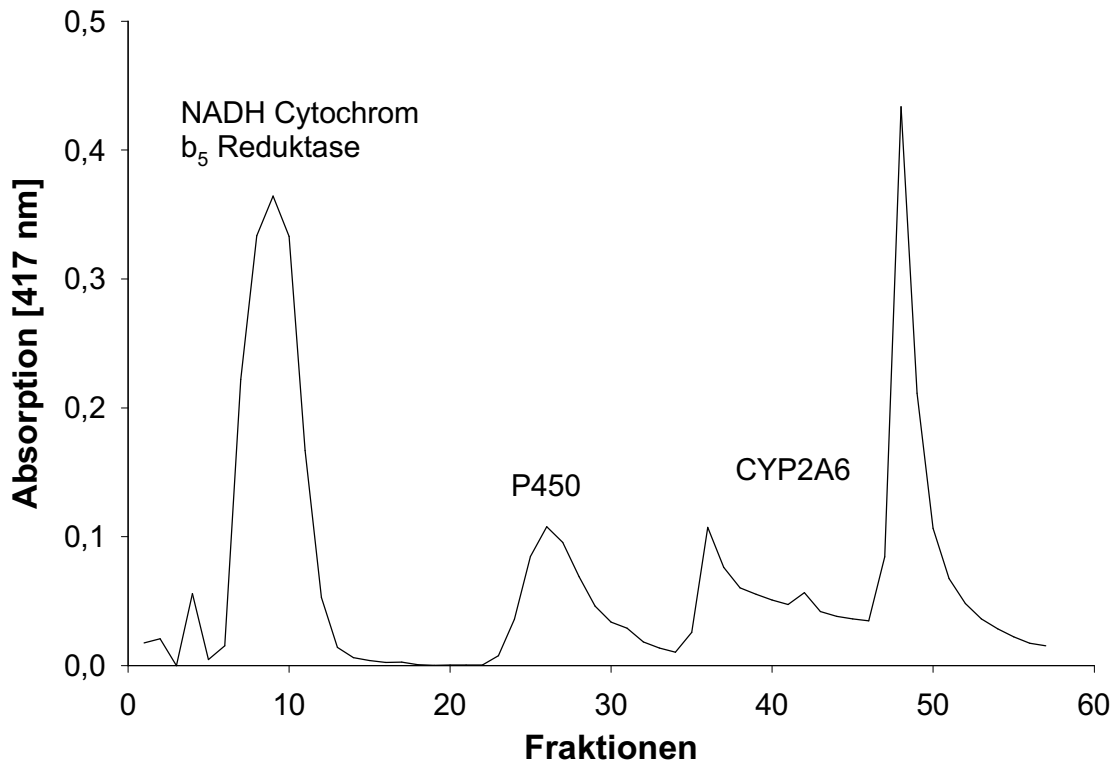


Abb. 2-7. 417 nm Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie an Hydroxylapatit während der CYP2A6-Reinigung aus humanen Lebermikrosomen.

2.3.1.2.3. Anionenaustauschchromatographie an einer DEAE-Cellulose-Säule

Die Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose führte zu einer Abtrennung weiterer Proteinbestandteile vom CYP2A6, die nicht näher untersucht wurden. Diese in Fraktion 2 enthaltenen Proteine enthielten jedoch kein P450. Das CYP2A6 wurde nicht vom Säulenmaterial gebunden und fand sich daher im Durchlauf wieder. Das 417 nm Elutionsprofil dieses Reinigungsschrittes zeigt die Abbildung 2-8.

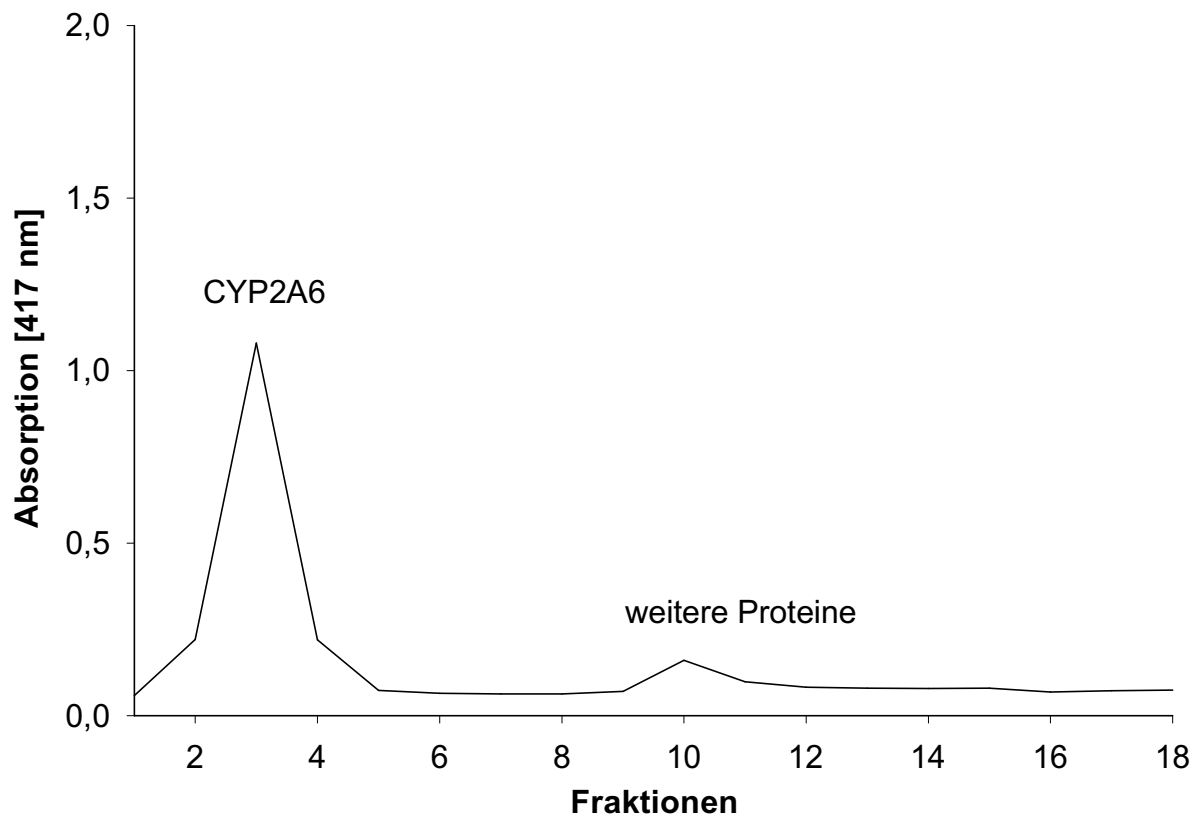


Abb. 2-8. 417 nm Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose der 2A6-Reinigung aus humanen Lebermikrosomen.

Nach Entfernen des Detergenz entweder mit Hydroxylapatit oder dem Adsorbens Calbiosorb, wie unter 2.2.1.2.4. beschrieben, wurde das CYP2A6 nach der ersten Reinigung zunächst bei -20°C , dann bei -80°C aufbewahrt. Nach einmaligem Lagern bei -80°C verlor die CYP2A6-Fraktion ihre Cumarin-7-Hydroxylierungs-Aktivität. Daher wurden die Aktivitätstests mit der isolierten aktiven Enzympräparation direkt im Anschluß an die jeweilige Reinigung durchgeführt.

Tabelle 2-1 gibt exemplarisch eine Zusammenfassung der Ergebnisse für die erste Isolierung des CYP2A6 wieder.

Tab. 2-1. Reinigung von CYP2A6 aus humanen Lebermikrosomen

Reinigungsschritt	Protein ^a [mg]	P450-Gehalt [nmol/mg]	P450 ^b [nmol]	Reinigung ^c -fach	Gewinn ^d [%]
Mikrosomen	2005	0.045	90.0	1	100
Octyl-Sepharose	50	0.440	22.0	10	24.4
Hydroxylapatit	6	1.160	7.0	26	7.7
DEAE-Cellulose	1.93	0.690	1.3	15	1.5

^a Gesamt-Protein-Menge.

^b Gesamt-P450-Menge.

^c basierend auf dem spezifischen P450-Gehalt [nmol/mg].

^d basierend auf der Gesamt-P450-Menge [nmol].

2.3.1.3. Analytische Methoden zur Charakterisierung des CYP2A6 aus humanen Lebermikrosomen

2.3.1.3.1. Überprüfung der Identität und Reinheit mittels SDS-Page und Western-Blot

Nach der CYP2A6-Reinigung aus humanen Lebermikrosomen wurde eine SDS Polyacrylamidgelelektrophorese sowie ein Western-Blot durchgeführt. Die SDS-Page ergab ein durchschnittliches Molekulargewicht des gereinigten Enzyms von etwa 53.000 Da. Hierfür wurde die im Gel markierte Bande für die Bestimmung zu Grunde gelegt, da diese für die positive Reaktion mit dem Antikörper gegen CYP2A6 im Western-Blot verantwortlich war (Abb. 2-9).

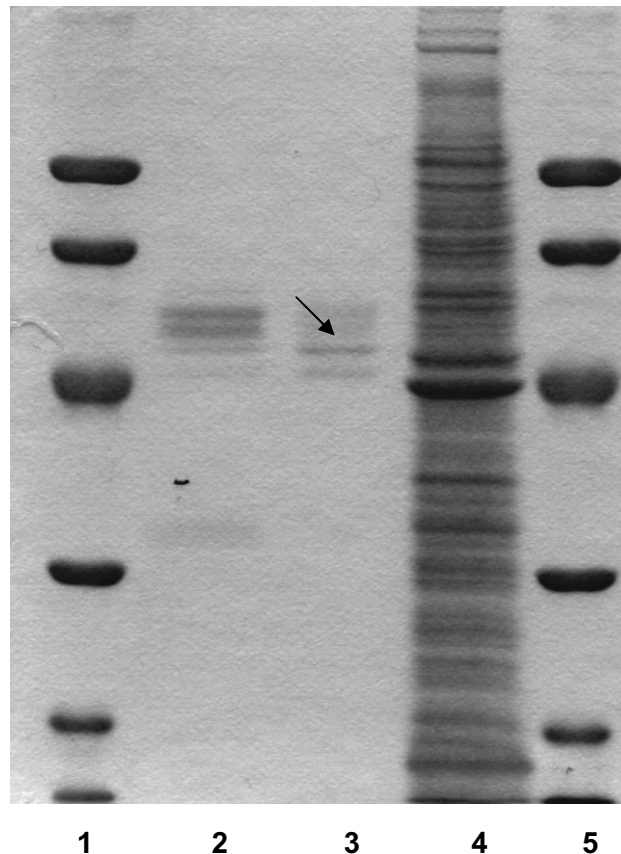


Abb. 2-9. *SDS-Gel der gereinigten CYP2A6-Fraktion aus humanen Lebermikrosomen. 1, 5, MG-Standard (94; 67; 43; 30; 20.1; 14.4 kDa); 2, humane Benzamidoxim-Reduktase [Rieckert, 1999; Behrens, 1999]; 3, gereinigtes CYP2A6 [Yun et al., 1991]; 4, rekombinantes CYP2A6 in Lymphoblasten; → Reaktion mit dem Antikörper gegen CYP2A6.*

Das SDS-Gel zeigt, daß das isolierte CYP2A6 nicht vollständig rein vorlag. Zusätzlich waren drei Proteinbanden vorhanden, die jedoch nur schwach ausgeprägt waren. Bei keinem Versuch, CYP2A6 aus humanen Lebermikrosomen zu isolieren, konnte die angestrebte Reinheit von 100 % erzielt werden. Das SDS-Gel zeigt jedoch, daß das CYP2A6 stark aufgereinigt wurde. Es konnten vor allem keine für die Rekonstitution des reduktiven oder oxidativen Enzymsystems notwendigen Bestandteile wie Cytochrom b_5 , b_5 -Reduktase oder P450-Reduktase nachgewiesen werden. Als Vergleich wurde die humane Benzamidoxim-Reduktase, die nach dem Verfahren von Möller [1997] isoliert wurde, sowie das in Lymphoblasten exprimierte CYP2A6 (Gentest) im SDS-Gel mit aufgetragen. Sämtliche Proteinbanden der Benzamidoxim-Reduktase sowie des gereinigten CYP2A6 zeigten sich ebenfalls beim rekombinant exprimierten CYP2A6.

Im Western-Blot konnte die Isolierung des Cytochrom P450-Isoenzym 2A6 durch die Reaktion mit einem immunoblot-spezifischen, monoklonalen Antikörper gegen dieses Enzym bestätigt werden. Dieser reagierte sowohl mit humanen Lebermikrosomen als auch mit sämtlichen 2A6-aktiven Fraktionen der Reinigung (Abb. 2-10). Je aufgereinigter die 2A6-Fractionen vorlagen, desto stärker konnte die Reaktion mit dem 2A6-spezifischen Antikörper detektiert werden. Die Endpräparation mit CYP2A6 nach der DEAE-Cellulose zeigte die intensivste Färbung im Western-Blot.

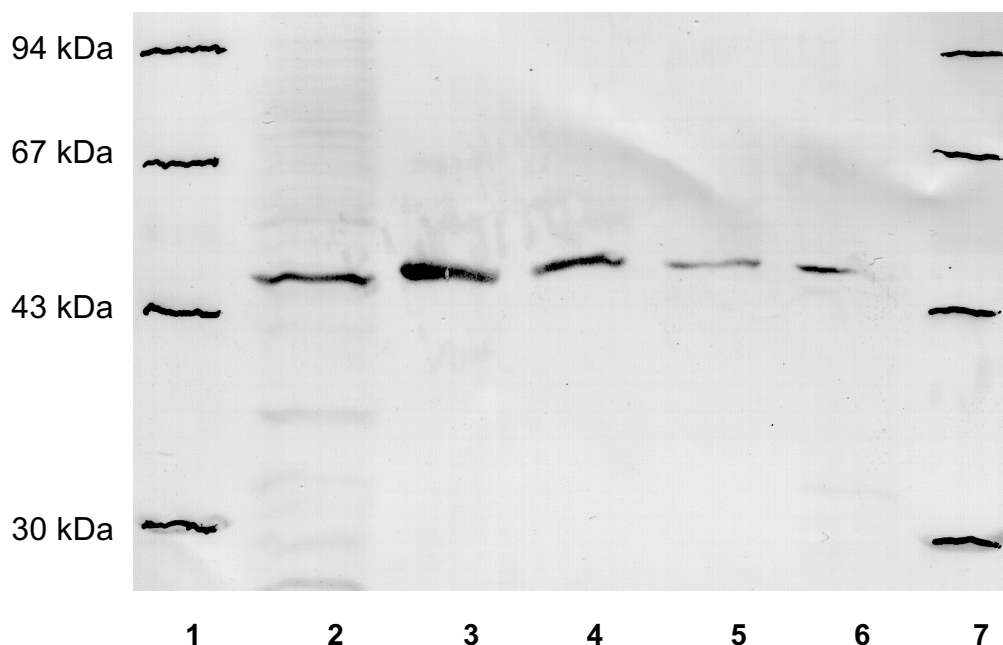


Abb. 2-10. *Western-Blot mit partiell gereinigtem CYP2A6 während der Reinigung aus humanen Lebermikrosomen. 1, 7, Molekulargewicht-Standard; 2, rekombinantes 2A6 (Gentest); 3, nach DEAE-Cellulose; 4, nach Hydroxylapatit; 5, Octyl-Sepharose; 6, humane Lebermikrosomen.*

2.3.1.3.2. Sequenzierung der gereinigten 2A6-aktiven Enzymfraktion

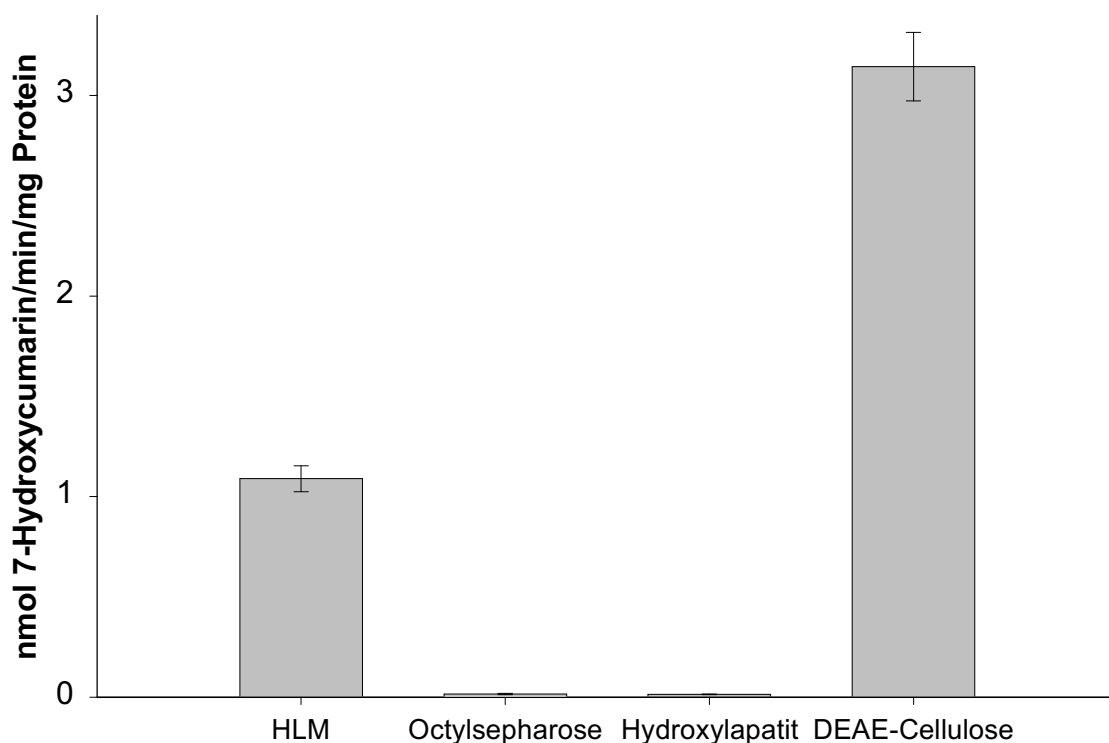
Die Sequenzierung der drei Proteinbanden der gereinigten Enzympräparation (siehe SDS-Gel unter 2.3.1.3.) durch die Firma Toplab mittels MALDI-MS ergab, daß es sich bei der Bande mit dem Molekulargewicht von ca. 53000 Da um das Cytochrom P450-Isoenzym 2A6 handelte. Zur Unterscheidung dieses Proteins vom CYP2A7, welches 94 % Homologie zum CYP2A6 aufweist, wurden die theoretischen Massen der tryptischen Peptide errechnet und mit den Massen aus den MALDI-MS Spektren verglichen. Dabei ergaben sich acht Peptidmassen, die nur im CYP2A6, nicht aber im CYP2A7 vorkommen, womit diese Proteinbande eindeutig als CYP2A6 identifiziert werden konnte (Tab. 2-2). Umgekehrt konnte kein Massenbruchstück gefunden werden, welches nur dem CYP2A7 und nicht dem CYP2A6 zuzuordnen war. Mit einem Molekulargewicht von 45830 Da konnte weiterhin das Vorhandensein der Arylacetamid-Deacetylase in der 2A6-haltigen Fraktion bestimmt werden. Die dritte Bande mit einem Molekulargewicht >53000 Da enthielt ein weiteres P450-Isoenzym, die S-Mephenytoin 4-Hydroxylase (CYP2C19), sowie das humane Polypeptid B7 der UDP Glycosyl-Transferase 2 Familie.

Tab. 2-2. Peptidmassen der gereinigten 2A6-haltigen Fraktion, die nur im CYP2A6 vorkommen.

807.4473	1421.8059
899.4530	1552.7963
1023.5023	2408.1780
1356.7952	2478.2782

2.3.1.3.3. Cumarin-7-Hydroxylierung

Das aus humanen Lebermikrosomen gewonnene CYP2A6 besaß nach der ersten erfolgreich durchgeführten Reinigung eine Cumarin-7-Hydroxylierungsaktivität von 3.14 ± 0.17 nmol 7-Hydroxycumarin/min/mg Protein, nach der letzten eine von 4.93 ± 0.03 nmol/min/mg. Während der ersten Isolierung wurde die 2A6-Aktivität nach jedem einzelnen Reinigungsschritt überprüft. Das Ergebnis dieser Umsetzung ist in Abbildung 2-11 dargestellt.



4

Abb. 2-11. Cumarin-7-Hydroxylierung während der 2A6-Reinigung. HLM, humane Lebermikrosomen.

Die Steigerung der Umsetzungsrate von 1.09 ± 0.06 7-Hydroxycumarin/min/mg Protein durch humane Lebermikrosomen auf 3.14 ± 0.17 nmol durch das gereinigte 2A6 ist in der Abbildung deutlich zu erkennen. Allerdings wurden nach der Octyl-Sepharose- sowie nach der Hydroxylapatit-Säule nur geringe Hydroxylierungs-

aktivitäten von 0.02 ± 0.001 bzw. 0.01 ± 0.001 7-Hydroxycumarin/min/mg Protein gemessen.

2.3.1.3.4. Reduktion von Benzamidoxim

2.3.1.3.4.1. Reduktion von Benzamidoxim durch CYP2A6

Die Reduktion von Benzamidoxim erfolgte durch das gereinigte CYP2A6 jeweils mit Umsetzungsraten im Bereich von 1.78 ± 0.07 bis 6.05 ± 0.17 nmol Benzamidin/min/mg Protein. Während der ersten Isolierung von CYP2A6 wurde auch die Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität nach jedem einzelnen Arbeitsschritt mitgetestet. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 2-12 dargestellt.

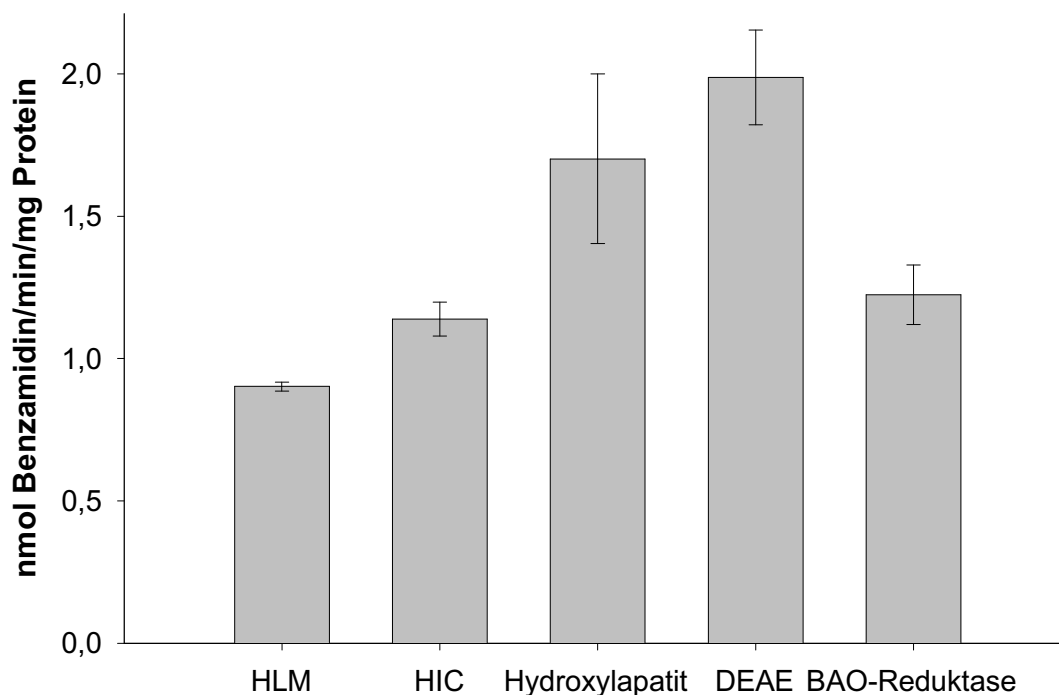


Abb. 2-12. *Reduktion von Benzamidoxim während der 2A6-Reinigung.* HLM, humane Lebermikrosomen; HIC, nach Hydrophober Interaktionschromatographie; Hydroxylapatit, nach Hydroxylapatit-Säule; DEAE, nach DEAE-Cellulose; BAO-Reduktase, humane gereinigte Benzamidoxim-Reduktase.

In der abgebildeten Graphik ist deutlich ein stufenweiser Anstieg der Reduktionsrate von Benzamidoxim während der 2A6-Reinigung zu erkennen. Während die humanen Lebermikrosomen lediglich eine Umsetzungsrate von 0.90 ± 0.02 nmol Benzamidin/min/mg Protein aufwiesen, zeigte die partiell gereinigte Fraktion nach der Octyl-Sepharose-Säule eine Aktivität von 1.14 ± 0.06 nmol Benzamidin/min/mg Protein. Nach Anionenaustauschchromatographie an Hydroxylapatit konnte diese dann weiter auf 1.70 ± 0.30 nmol Benzamidin/min/mg Protein gesteigert werden. Das endgültig gereinigte CYP2A6 besaß schließlich eine Aktivität von 1.99 ± 0.17 nmol Benzamidin/min/mg. Zum Vergleich wurde parallel hierzu eine Inkubation mit der von Rieckert und Behrens zuvor gereinigten humanen Benzamidoxim-Reduktase durchgeführt, die eine etwas niedrigere Umsetzungsrate von 1.22 ± 0.10 nmol Benzamidin/min/mg Protein besaß.

2.3.1.3.4.2. Reduktion von Benzamidoxim durch weitere P450-Enzyme

Die rekombinant exprimierten und aufgereinigten P450 Isoenzyme 3A4 und 2C19 sowie die humane UDP-Glucuronyltransferase wurden auf ihre Reduktase-Aktivität überprüft. Keines der drei Enzyme war in der Lage, die Modellsubstanz Benzamidoxim im rekonstituierten System mit Cytochrom b_5 und der b_5 -Reduktase zu reduzieren.

2.3.1.3.5. Reduktion von Guanoxabenz

Das aus humanen Lebermikrosomen gereinigte CYP2A6 ist ebenfalls zur *N*-Reduktion von Guanoxabenz befähigt. Hierbei zeigte sich eine Aktivität von 4.44 ± 0.35 nmol Guanabenz/min/mg Protein im rekonstituierten System mit CYP2A6, Cytochrom b_5 und Cytochrom b_5 -Reduktase. Im Vergleich dazu besaßen humane Lebermikrosomen eine Umsetzungsrate von 2.67 ± 0.47 Guanabenz/min/mg Protein.

2.3.1.3.6. Reduktion von RO 48-3656

Auch die Reduktion des Prodrugs RO 48-3656 wurde von dem aus humanen Lebermikrosomen gereinigten CYP2A6 im rekonstituierten System mit Umsetzungs-raten von 0.56 ± 0.20 nmol RO 44-3888/min/mg Protein katalysiert.

2.3.1.3.7. Aktivitäten von Cytochrom b₅ und NADH-Cytochrom b₅ Reduktase aus Schweineleber bzw. humaner Leber

Um zu überprüfen, ob die humane Benzamidoxim-Reduktase, die von Rieckert [1999] und Behrens [1999] nach der Vorschrift von Möller [1997] gereinigt wurde, zur Entfaltung ihrer vollständigen Reduktaseaktivität auf die humanen Bestandteile des rekonstituierten Systems Cytochrom b₅ und NADH-Cytochrom b₅ Reduktase angewiesen ist, wurden diese schrittweise durch solche aus Schweineleber-mikrosomen isolierte ersetzt. Eine Übersicht der Umsetzung von Benzamidoxim durch das rekonstituierte System mit menschlichen und porcinen Komponenten gibt die Abbildung 2-13.

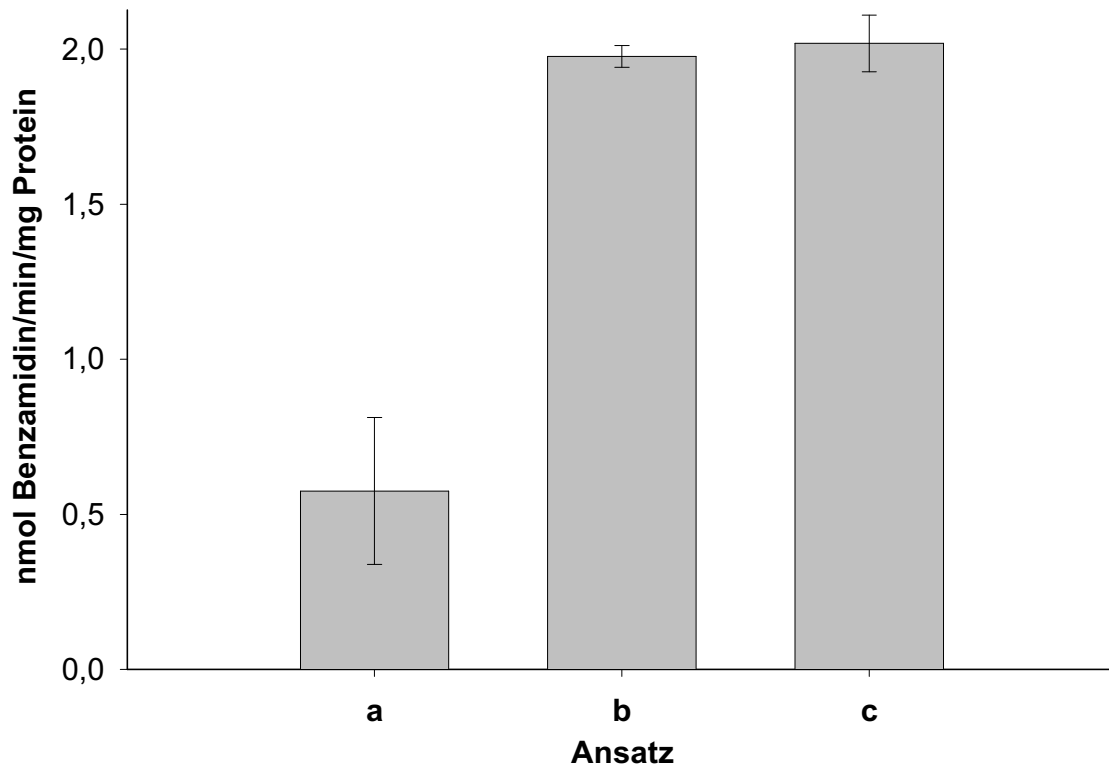


Abb. 2-13. *N-Reduktion von Benzamidoxim durch die humane Benzamidoxim-Reduktase im rekonstituierten System mit menschlichen und porcinen Komponenten. a, mit humaner b_5 -Reduktase und humanem Cytochrom b_5 ; b, mit porciner b_5 -Reduktase und humanem Cytochrom b_5 ; c, Cytochrom b_5 und b_5 -Reduktase aus Schweinelebermikrosomen.*

Das rekonstituierte System, in dem ausschließlich humane Enzymkomponenten enthalten waren, zeigte eine Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität von 0.58 ± 0.24 nmol Benzamidin/min/mg Protein. Wurde nur die humane NADH-Cytochrom b_5 Reduktase gegen die aus Schweinelebermikrosomen gewonnene ausgetauscht, so ließ sich die Umsatzrate auf 1.98 ± 0.04 nmol Benzamidin/min/mg Protein steigern. Wurden beide humanen Komponenten durch solche aus dem Schwein ersetzt, so ergab sich eine Aktivität von 2.02 ± 0.09 nmol/min/mg. Es konnte gezeigt werden, daß der Austausch von humanem Cytochrom b_5 und humaner b_5 -Reduktase gegen solche aus Schweinelebermikrosomen gereinigte möglich ist. Aufgrund der höheren Verfügbarkeit erfolgte die Durchführung sämtlicher Reduktionsreaktionen

mit humanem CYP2A6 in Anwesenheit der b_5 -Reduktase und des Cytochrom b_5 aus dem Schwein.

2.3.1.3.8. Studien mit einem Antikörper gegen CYP2A6

Ein reaktionsspezifischer, monoklonaler Antikörper gegen CYP2A6 der Firma Gentest wurde einem Inkubationsansatz mit humanen Lebermikrosomen und Benzamidoxim in steigender Konzentration zugesetzt. Es wurde überprüft, ob die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch die Gegenwart des Antikörpers gehemmt wird. Das Ergebnis dieser Antikörperstudie ist in Abbildung 2-14 dargestellt.

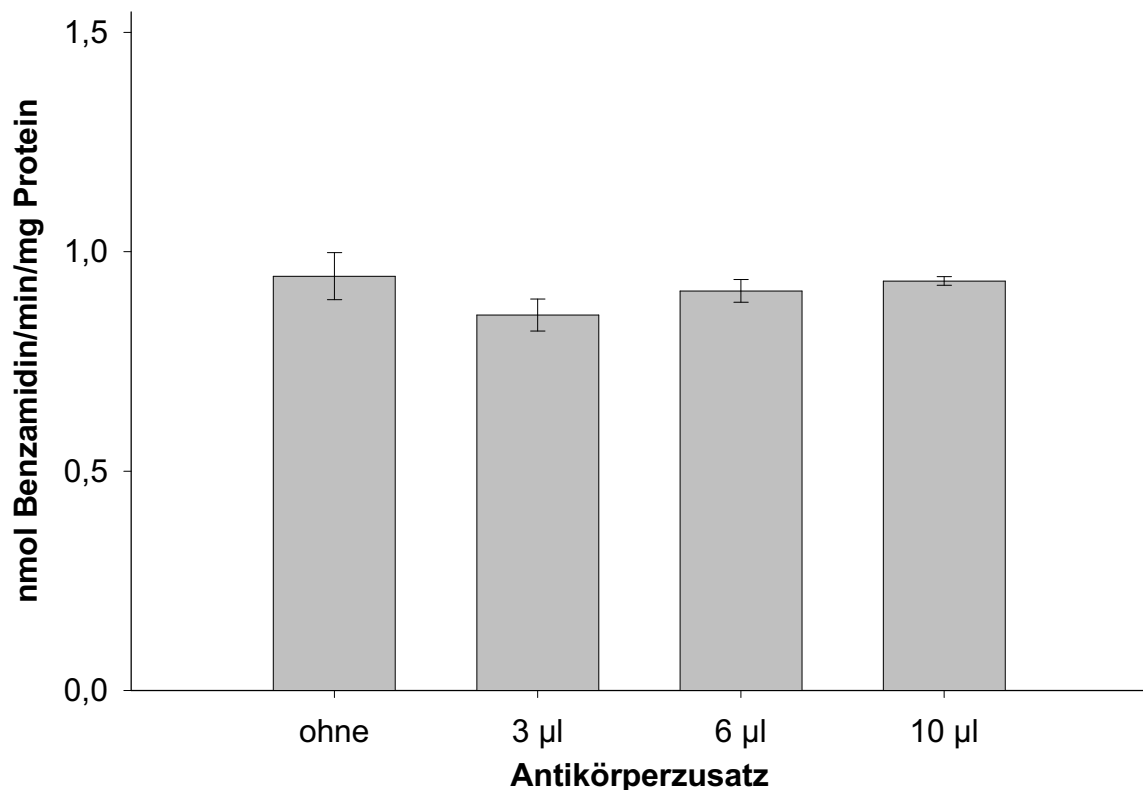


Abb. 2-14. *Einfluß eines reaktionsspezifischen Antikörpers auf die Reduktion von Benzamidoxim in humanen Lebermikrosomen.*

Die Reduktion in Abwesenheit des Antikörpers erfolgte mit Umsetzungsraten von 0.95 ± 0.05 nmol Benzamidin/min/mg Protein. Ein Zusatz von $3 \mu\text{l}$ Antikörperpräparation vermochte die Aktivität zwar signifikant auf 0.86 ± 0.04 nmol/min/mg zu senken ($P = 0.03$). Eine größere Menge an Antikörper im Inkubationsansatz führte jedoch wiederum zu einem geringen Anstieg der Umsatzrate auf 0.91 ± 0.03 nmol/min/mg mit $6 \mu\text{l}$ bzw. 0.93 ± 0.01 mit $10 \mu\text{l}$ Antikörper. Diese Ergebnisse unterschieden sich nicht signifikant von dem Ansatz ohne Antikörper ($P > 0.05$).

Der Einfluß von $3 \mu\text{l}$ Antikörperpräparation auf die Reduktion von Benzamidoxim im rekonstituierten System mit aus humanen Lebermikrosomen gereinigtem CYP2A6 sollte ebenfalls überprüft werden. Abbildung 2-15 gibt die Ergebnisse dieser Inkubation wieder.

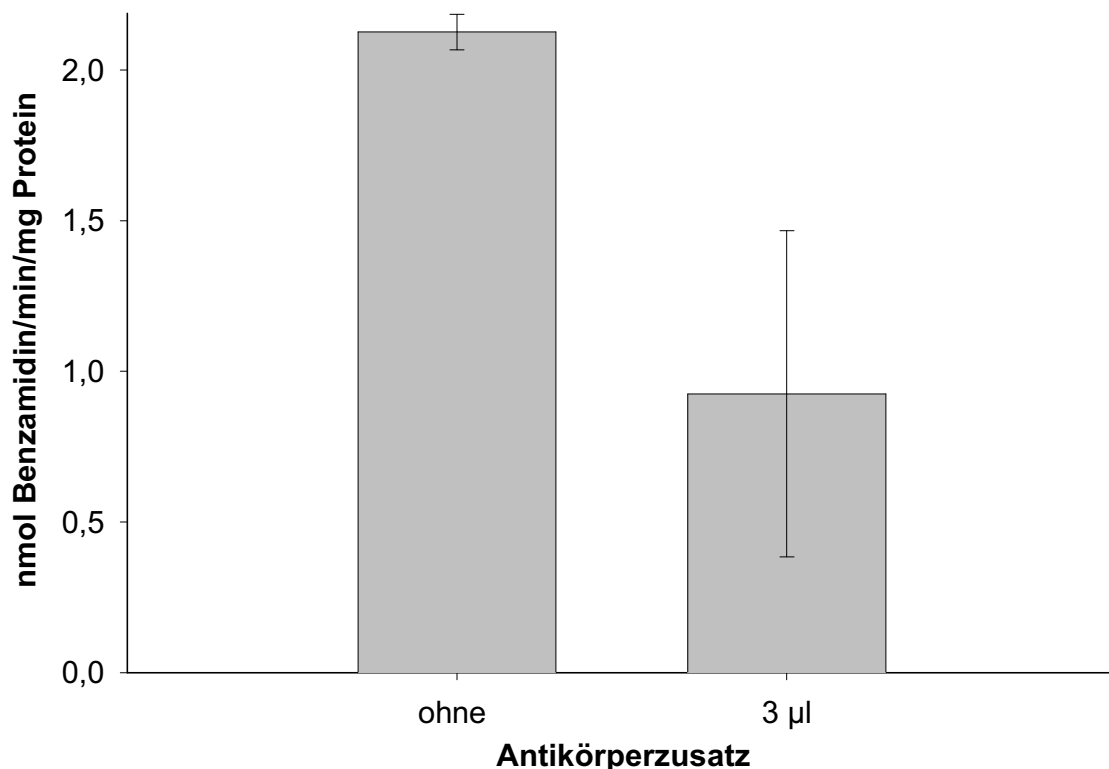


Abb. 2-15. *Einfluß eines reaktionsspezifischen Antikörpers gegen CYP2A6 auf die Reduktion von Benzamidoxim durch gereinigtes CYP2A6 aus humanen Lebermikrosomen im rekonstituierten System.*

Ohne Antikörper besaß das rekonstituierte System mit gereinigtem CYP2A6 eine Aktivität von 2.13 ± 0.06 nmol Benzamidin/min/mg Protein. Ein Zusatz von $3 \mu\text{l}$ Antikörper-Lösung führte zu einem starken Absinken der Umsetzungsrate auf 0.93 ± 0.54 nmol/min/mg. Die Reduktionsraten in An- und Abwesenheit des Antikörpers erwiesen sich trotz großer Standardabweichung als signifikant im student's ttest ($P = 0.005$).

Die große Standardabweichung veranlaßte schließlich zum Überprüfen des Antikörpers, der eine reaktionsspezifische Hemmung der Cumarin-7-Hydroxylierung bewirken sollte. Zu diesem Zweck wurde die Oxidation von Cumarin durch rekombinantes CYP2A6 mit $5 \mu\text{l}$ der Antikörperpräparation durchgeführt. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Antikörper. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 2-16 dargestellt.

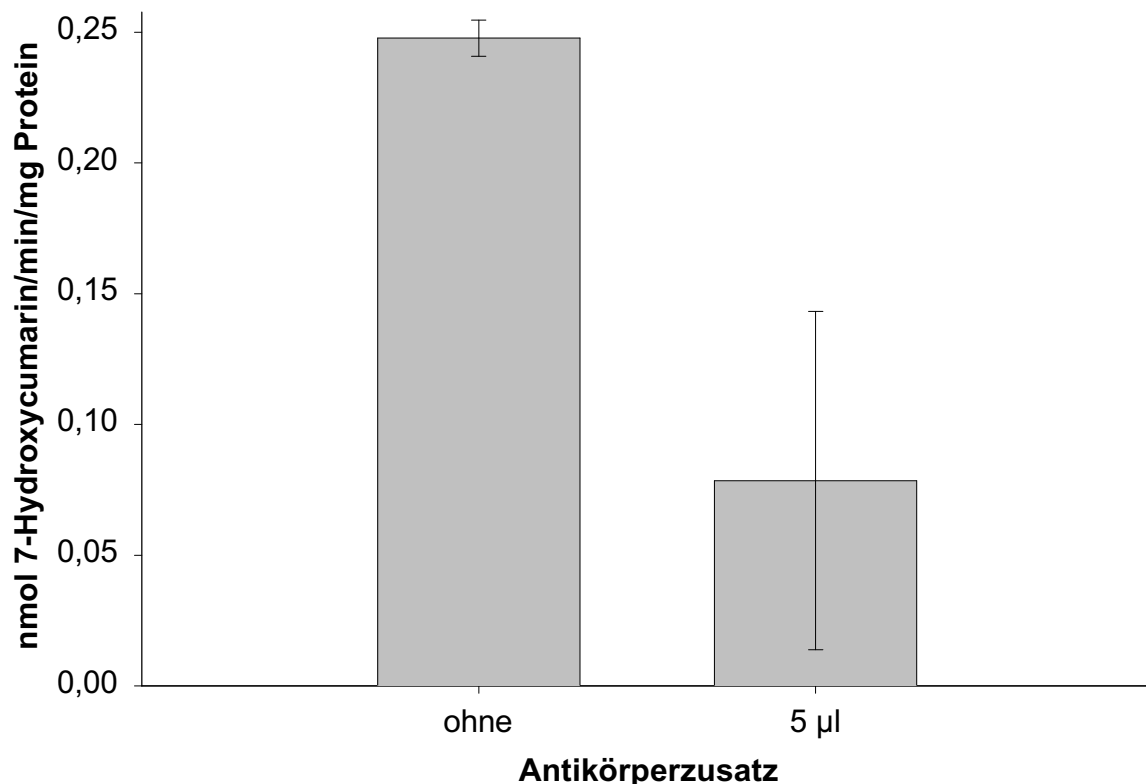


Abb. 2-16. Überprüfung des reaktionsspezifischen Antikörpers gegen 2A6 durch Umsetzung von Cumarin im rekonstituierten System mit rekombinantem CYP2A6.

Die Cumarin-7-Hydroxylierungsaktivität des in Lymphoblasten exprimierten CYP2A6 betrug in Abwesenheit des Antikörpers 0.25 ± 0.01 nmol 7-Hydroxycumarin/min/mg Protein. Durch Zusatz von 5 μ l Antikörper-Lösung zum Inkubationsansatz konnte die Umsatzrate auf 0.093 ± 0.054 nmol/min/mg gesenkt werden. Der Unterschied erwies sich ebenfalls als signifikant im student's ttest ($P = 0.002$). Zudem konnte bei der Inkubation mit dem reaktionsspezifischen Antikörper eine ähnlich große Standardabweichung wie bei der Reduktion von Benzamidoxim durch gereinigtes CYP2A6 gemessen werden.

2.3.1.3.9. Hemmung der Cumarin-7-Hydroxylierung durch Benzamidoxim

Der Einfluß von Benzamidoxim auf die 7-Hydroxylierung des Cumarins sollte untersucht werden. Hierfür wurden einer Inkubation mit Cumarin und humanen Lebermikrosomen steigende Mengen an Benzamidoxim zugesetzt. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in Abbildung 2-17 dargestellt.

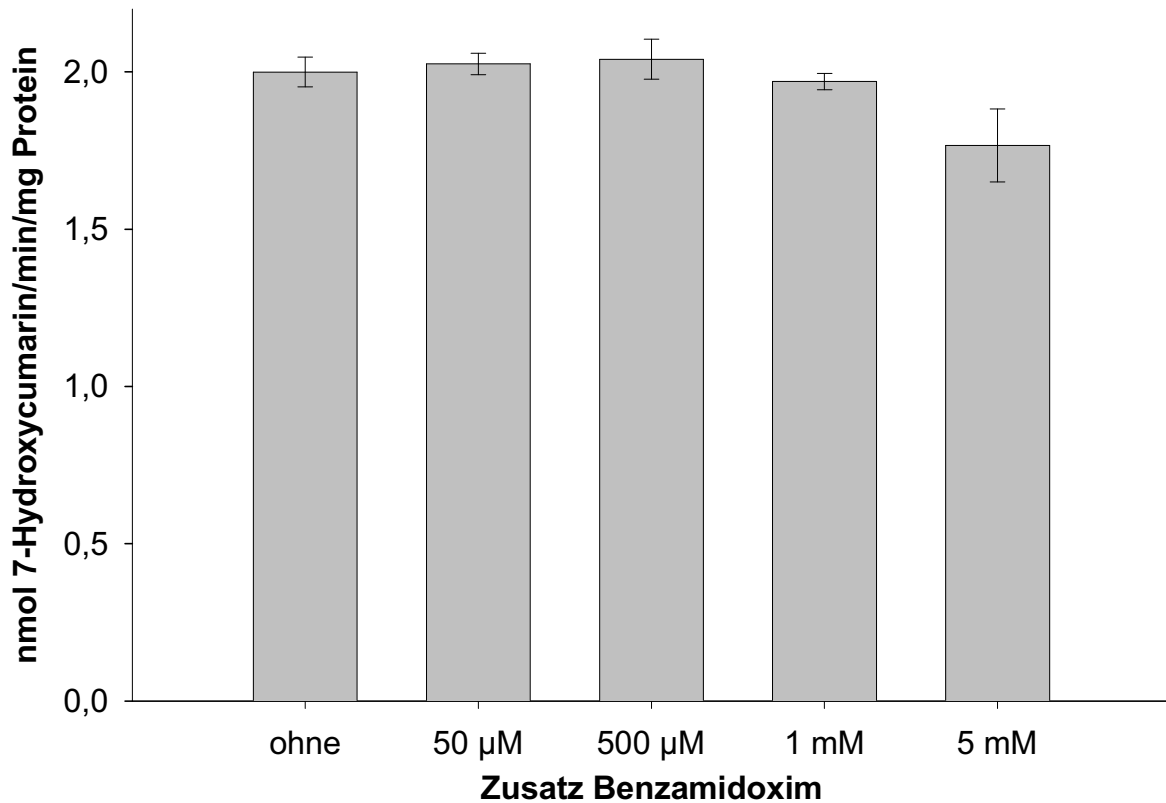


Abb. 2-17. *Einfluß von Benzamidoxim auf die 7-Hydroxylierung des Cumarins durch humane Lebermikrosomen.*

Die Kontrollinkubation ohne Zusatz von Benzamidoxim ergab eine Umsetzungsrate von 2.00 ± 0.05 nmol 7-Hydroxycoumarin/min/mg Protein für humane Lebermikrosomen. Die Anwesenheit von 50 µM bis 1 mM Benzamidoxim während der Cumarin-7-Hydroxylierung führte zu keiner signifikanten Veränderung (student's t-test, Signifikanzniveau = 95 %). Eine 5 mM Benzamidoxim-Konzentration bewirkte eine signifikante Verminderung der Aktivität auf 1.77 ± 0.11 nmol 7-Hydroxycoumarin/min/mg Protein ($P = 0.01$).

Der Einfluß von 5 mM Benzamidoxim auf die Cumarin-7-Hydroxylierung durch gereinigtes oder in Lymphoblasten exprimiertes CYP2A6 ist in Abbildung 218 dargestellt.

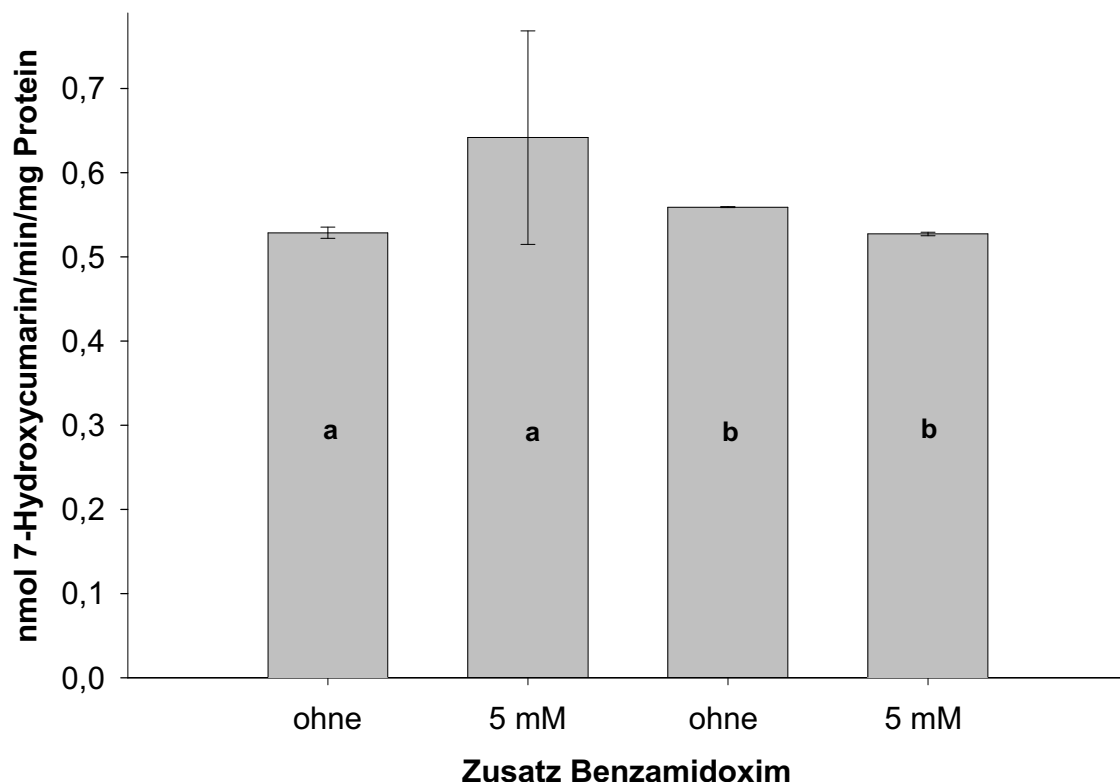


Abb. 2-18. *Einfluß von Benzamidoxim auf die 7-Hydroxylierung des Cumarins durch a, gereinigtes CYP2A6 und b, rekombinant exprimiertes CYP2A6.*

Eine Menge von 5 mM Benzamidoxim hatte keine signifikante Auswirkung auf die Umsetzung von Cumarin durch das aus humanen Lebermikrosomen gewonnene CYP2A6 ($P > 0.05$). Die Aktivität betrug ohne Zusatz 0.53 ± 0.01 nmol 7-Hydroxycumarin/min/mg Protein, während der Inkubationsansatz mit Benzamidoxim eine Umsetzungsrate von 0.64 ± 0.13 nmol/min/mg aufwies. Das rekombinant exprimierte CYP2A6 zeigte durch die Anwesenheit von 5mM eines zweiten Substrates eine nicht signifikante Hemmung der Aktivität von 0.56 ± 0.01 auf 0.53 ± 0.01 nmol 7-Hydroxycumarin/min/mg Protein.

2.3.1.3.10. Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim durch Cumarin

Um den Einfluß von Cumarin als zweites zusätzliches Substrat auf die Reduktion von Benzamidoxim zu prüfen, wurden Umsetzungen mit Benzamidoxim in humanen Lebermikrosomen in Abhängigkeit von der zugesetzten Cumarinkonzentration durchgeführt. Ein Vergleich der Aktivitäten der einzelnen Inkubationsansätze ist in Abbildung 2-19 dargestellt.

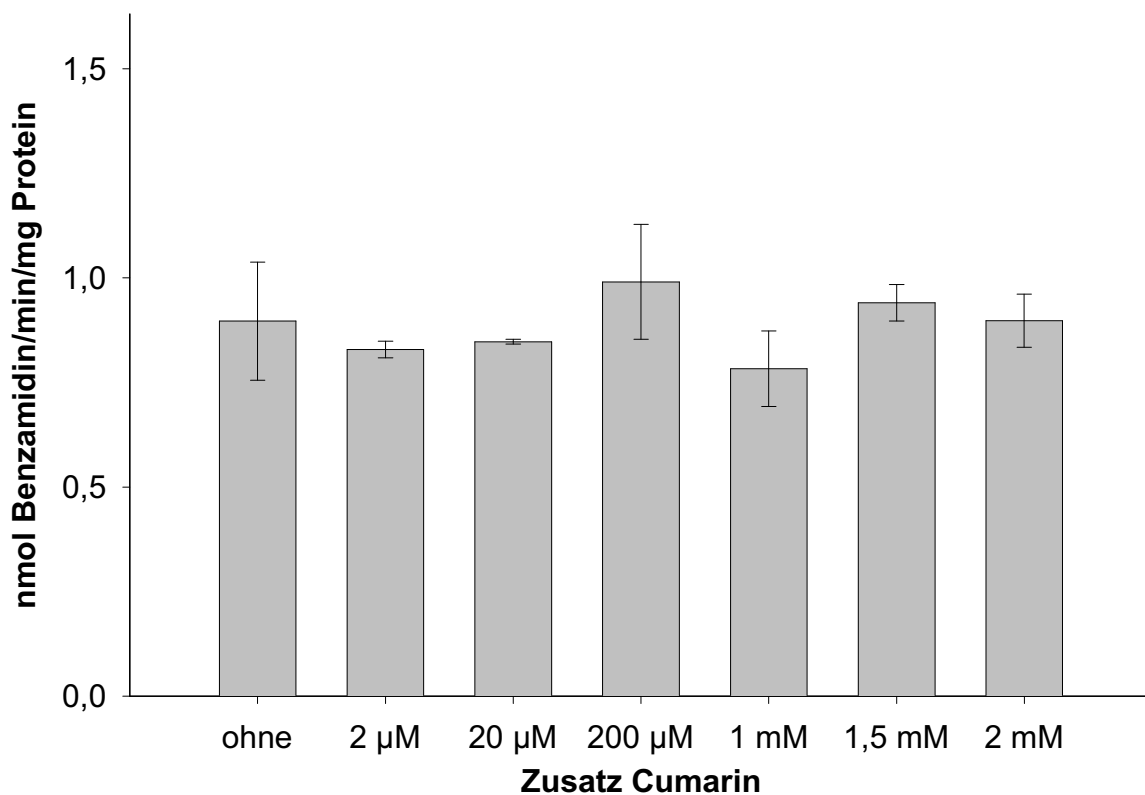


Abb. 2-19. Einfluß von Cumarin auf die Reduktion von Benzamidoxim mit humanen Lebermikrosomen.

Zur Überprüfung der Unterschiede der einzelnen Inkubationsansätze diente der student's t-test (Signifikanzniveau 95 %). Es ist jedoch kein signifikanter Einfluß von Cumarin auf die Reduktase-Aktivität der humanen Lebermikrosomen zu erkennen (alle Konzentrationen $P > 0.05$). Die Kontrollinkubation ohne Cumarin ergab eine

Umsetzungsrate von 0.90 ± 0.14 nmol Benzamidin/min/mg Protein, während der Zusatz von Cumarin zu den in Tabelle 2-3 beschriebenen Aktivitäten führte.

Tab. 2-3. Reduktion von Benzamidoxim durch humane Lebermikrosomen unter Zusatz von steigenden Konzentrationen an Cumarin im Inkubationsansatz.

Zusatz Cumarin [μ M]	Umsetzungsrate [Benzamidin/min/mg Protein]
0	0.90 ± 0.14 nmol
2	0.83 ± 0.02 nmol
20	0.85 ± 0.06 nmol
200	0.99 ± 0.14 nmol
1000	0.78 ± 0.09 nmol
1500	0.94 ± 0.04 nmol
2000	0.90 ± 0.06 nmol

Gleichzeitig wurde der Einfluß von Cumarin auf die Reduktion von Benzamidoxim im rekonstituierten System mit gereinigtem CYP2A6 geprüft. Ein Vergleich der Reduktase-Aktivitäten mit und ohne 1.5 mM Cumarin im Inkubationsansatz ist in Abbildung 2-20 dargestellt.

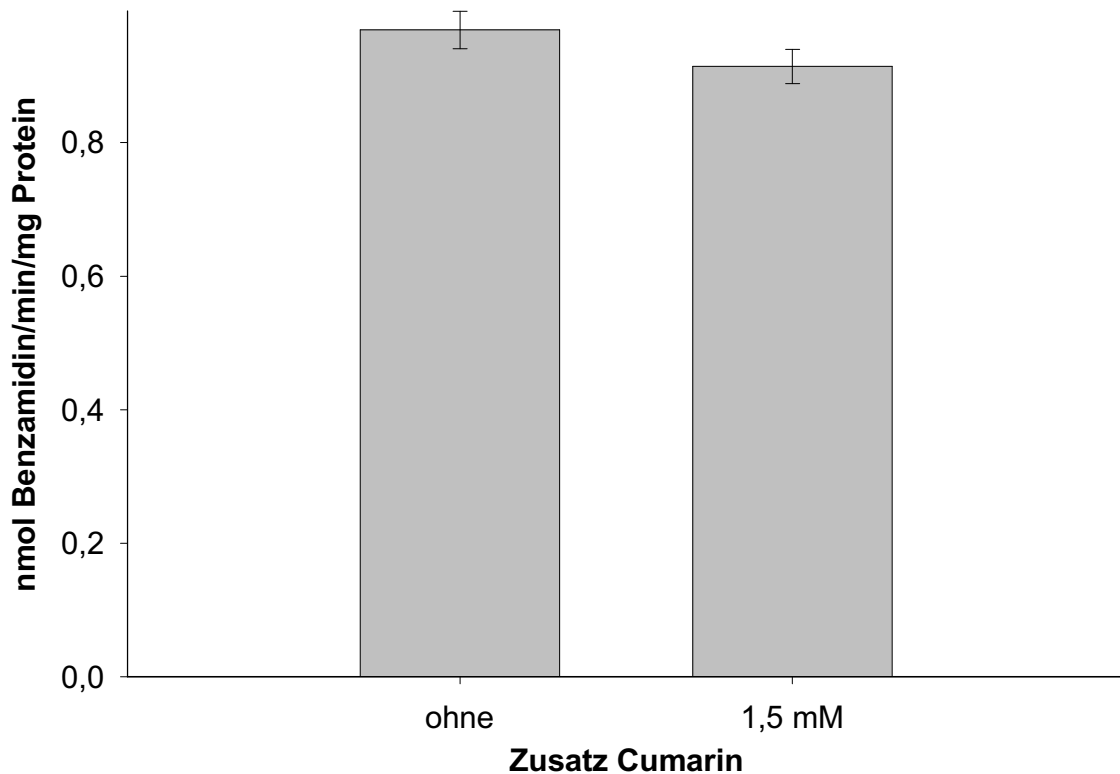


Abb. 2-20. *Einfluß von Cumarin auf die Reduktion von Benzamidoxim durch das aus humanen Lebermikrosomen gewonnene CYP2A6.*

Auch für das rekonstituierte System ließ sich keine signifikante Veränderung der Umsetzungsraten im student's t-test erkennen (Signifikanzniveau von 95 %). Die Reduktion von Benzamidoxim durch das gereinigte CYP2A6 in An- und Abwesenheit von Cumarin erfolgte jeweils mit einer Aktivität von $0,85 \pm 0,03$ nmol Benzamidin/min/mg Protein.

2.3.2. Isolierung von rekombinant exprimiertem CYP2A6 aus Hefezellen

2.3.2.1. Gewinnung des rekombinanten CYP2A6 aus Hefezellen

Zum ersten Mal gelang die Isolierung von rekombinant exprimiertem CYP2A6 aus Hefezellen. Die Methode von Soucek *et al.* [1999], der die Reinigung dieses Isoenzym aus *E.coli* beschrieben hat, wurde hierauf übertragen.

Eine Übersicht der Reinigung aus Hefezellen zeigt Abbildung 221.

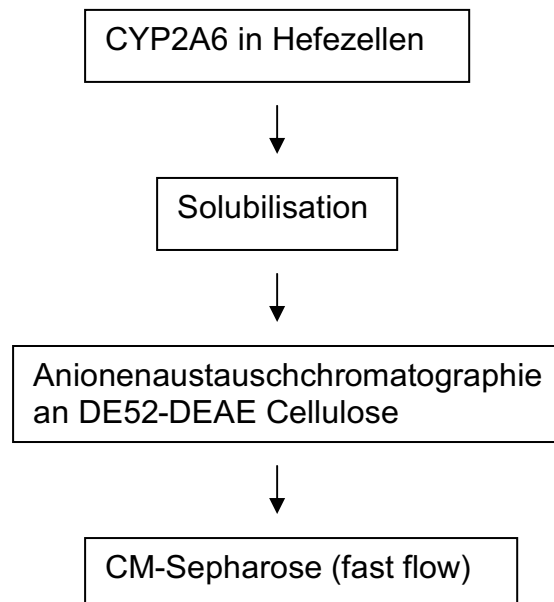


Abb. 2-21. Reinigungsschema der Isolierung von rekombinatem CYP2A6 aus Hefezellen.

Es standen 100 nmol P450 zur Isolierung von CYP2A6 aus Hefezellen zur Verfügung. Dabei wiesen die Hefezellen einen sehr hohen Proteingehalt von 53.86 mg/ml auf bei einem geringen spezifischen P450-Gehalt von 0.03 nmol/mg Protein. Aufgrund der großen Diskrepanz dieser beiden Werte, konnte die Verdünnung mit Solubilisierungspuffer nicht wie bei Soucek auf den Proteingehalt eingestellt werden, sondern wurde auf die Menge an Cytochrom P450 bezogen.

Nach Zentrifugation des Solubilisats bei 100000 g wurde keine klare, sondern eine trübe Enzympräparation auf die DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen. Das CYP2A6 befand sich neben anderen Zellbestandteilen nach DEAE-Cellulose im Durchlauf wieder. Durch das Säulenmaterial konnte zwar ein Teil der Zellbestandteile abgetrennt werden, dennoch zeigte die 2A6-enhaltende Fraktion (Durchlauf) eine deutliche Trübung. Nach Auftrag dieses Durchlaufs auf die CM-Sepharose-Säule wurde ein großer Teil des CYP2A6 jedoch vom Säulenmaterial gebunden, während übrige Zellfragmente und andere Enzyme sich wiederum im Durchlauf befanden. Es wurde eine himbeerrot gefärbte Bande auf der Säule beobachtet, die mit 200 mM Phosphatpuffer pH 7.4 eluiert wurde (Eluat II), während bei Soucek [1999] das CYP2A6 als braune Bande auf der CM-Sepharose beschrieben wurde. Zusätzlich konnte bereits durch Spülen mit 80 mM Phosphatpuffer pH 7.4 eine orangefarbene Fraktion (Eluat I) gewonnen werden. Beide Enzympräparationen wurden getrennt einkonzentriert und auf 2A6-Aktivität geprüft, die in beiden detektiert werden konnte.

Eluat I wurde mit einem Proteingehalt von 2.4 mg/ml und einem spezifischen P450-Gehalt von 0.20 nmol P450/mg Protein gereinigt. Eluat II besaß einen Proteingehalt von 3.5 mg/ml bei einem P450-Gehalt von 0.29 nmol/mg. Mit beiden Eluaten wurden die sich anschließenden Untersuchungen getrennt durchgeführt.

2.3.2.2. Analytische Methoden zur Charakterisierung des rekombinant exprimierten CYP2A6 aus Hefezellen

2.3.2.2.1. Überprüfung der Identität und Reinheit mittels SDS-Page und Western-Blot

Eluat I und Eluat II wurden nach Entfernen des Detergenz mittels SDS-Gelelektrophorese auf Reinheit untersucht. Im SDS-Gel war deutlich die CYP2A6-Bande bei etwa 53000 Da zu erkennen. Zusätzlich zeigten sich einige wenige sehr schwache Proteinbanden sowie eine Doppelbande bei einem Molekulargewicht von knapp > 30000 Da. Die aus Hefezellen gewonnene 2A6-Fraktion besaß demnach keine vollständige Reinheit, erwies sich aber im Vergleich zu den Hefezellen als stark

aufgereinigt. Die Isolierung von CYP2A6 konnte weiterhin durch Reaktion mit einem monoklonalen Antikörper gegen CYP2A6 im Western-Blot bestätigt werden.

2.3.2.2.2. Cumarin-7-Hydroxylierung

Die Hefezellen zeigten eine Cumarin-7-Hydroxylierungsaktivität von 2.97 ± 0.49 nmol 7-Hydroxycumarin/min/mg Protein. Eluat I der CM-Sepharose hydroxylierte das Cumarin mit einer Umsetzungsrate von 0.15 ± 0.01 nmol 7-Hydroxycumarin/min/mg Protein, Eluat II mit 0.13 ± 0.00 nmol/min/mg.

Durch Zusatz von Cytochrom b_5 zum Inkubationsansatz konnte die 2A6-Aktivität des Eluat I auf 0.25 nmol 7-Hydroxycumarin/min/mg gesteigert werden.

Ein Einfrieren der Enzympräparationen bei -20 °C über Nacht bewirkte keine Verminderung der Aktivität, so wie bei aus humanen Lebermikrosomen gereinigtem CYP2A6 beobachtet wurde (siehe 2.3.1.2.3.).

2.3.2.2.3. Reduktion von Benzamidoxim

Die Hefezellen, in denen das Isoenzym CYP2A6 exprimiert wurde, waren nicht zur Reduktion von Benzamidoxim befähigt. Auch für das gereinigte, rekombinante CYP2A6 konnte keine Reduktase-Aktivität nachgewiesen werden, weder mit Eluat I noch mit Eluat II der Reinigung aus Hefezellen. Kontrollinkubationen mit humanen Lebermikrosomen sowie mit dem rekonstituierten System aus dem Schwein, die gleichzeitig hiermit durchgeführt wurden und die Funktionsfähigkeit des Systems unter den gegebenen Bedingungen überprüfen sollten, zeigten dagegen eindeutig die Reduktion von Benzamidoxim.

2.3.2.2.4. Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim durch Bestandteile des Expressionssystems

2.3.2.2.4.1. Hemmung der Reduktion in humanen Lebermikrosomen durch aus Hefezellen isolierte 2A6-Fractionen

Es wurde eine Studie durchgeführt, die klären sollte, ob Bestandteile in den isolierten 2A6-haltigen Fraktionen vorhanden waren, welche die Reduktion von Benzamidoxim zu hemmen vermögen. Hierzu wurden Umsetzungen von Benzamidoxim in humanen Lebermikrosomen durchgeführt, denen steigende Mengen an Eluat I und Eluat II der 2A6-Reinigung aus Hefezellen (2.3.2.1.) zugefügt wurden. Der Einfluß dieser Fraktionen auf die Reduktion ist in Abbildung 2-22 dargestellt.

Aus der Abbildung geht eindeutig hervor, daß eine steigende Menge an Eluat I im Inkubationsansatz eine stetige Verminderung der Reduktaseaktivität in humanen Lebermikrosomen zur Folge hatte. Die Reduktion in humanen Lebermikrosomen zeigte ohne Zusatz von Eluat I eine Umsetzungsrate von 1.60 ± 0.02 nmol Benzamidin/min/mg Protein. Ein Beimischen von 1 µg der 2A6-haltigen Fraktion aus Hefe bewirkte ein nicht signifikantes Absinken der Rate auf 1.55 ± 0.06 nmol/min/mg ($P > 0.05$). Die Zugabe von größeren Mengen an Eluat I bewirkte jedoch eine signifikante Verminderung der Aktivität von 1.06 ± 0.05 nmol/min/mg durch 5 µg bis zu 0.30 ± 0.01 nmol/min/mg durch 150 µg an gereinigter Hefefraktion ($P < 0.0001$). Um eine Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim durch das in der isolierten 2A6-haltigen Enzympräparation enthaltene Na-Cholat auszuschließen, wurde ein Ansatz mit einem 0.1 %-igen Zusatz an Na-Cholat mitinkubiert. Dieser zeigte keinen signifikanten Unterschied zu der Kontrollinkubation ohne Zusätze ($P > 0.05$) mit einer Umsetzungsrate von 1.54 ± 0.05 nmol Benzamidin/min/mg Protein.

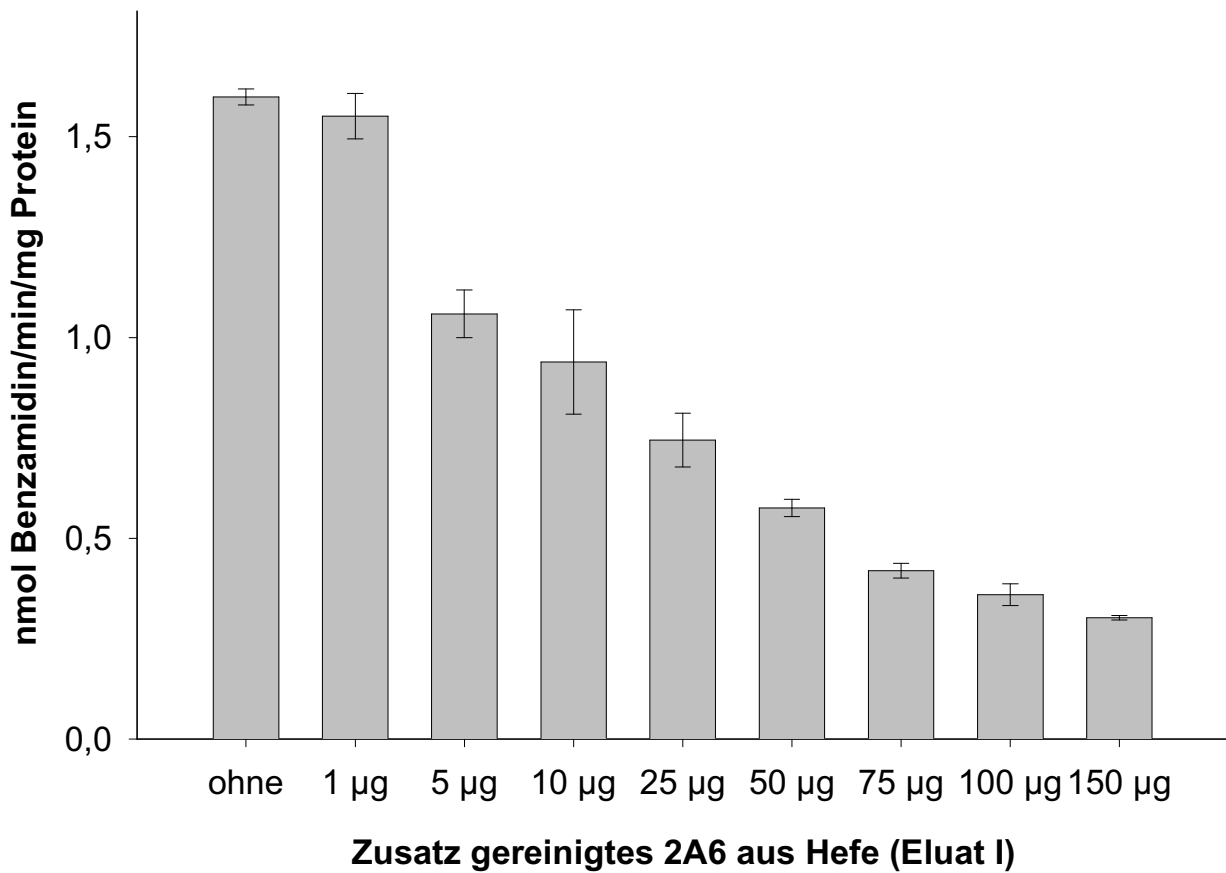


Abb. 2-22. *Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim in humanen Lebermikrosomen durch das bei der Isolierung von 2A6 aus Hefe gewonnene Eluat I.*

Die gleiche Studie, wie hier beschrieben, wurde mit Eluat II der 2A6Reinigung aus Hefezellen durchgeführt. Da auch hier eine Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim durch steigende Mengen an Eluat II zu erkennen war, wurde auf ein Darstellen der Ergebnisse an dieser Stelle verzichtet.

2.3.2.2.4.2. Hemmung der Reduktion in humanen Lebermikrosomen durch Hefezellen

Es wurde eine Hemmstudie ähnlich, wie unter 2.3.2.5.1. beschrieben, durchgeführt, in der die Reduktionsrate von Benzamidoxim in humanen Lebermikrosomen unter Zusatz steigender Mengen an Hefezellen bestimmt wurde. Abbildung 223 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.

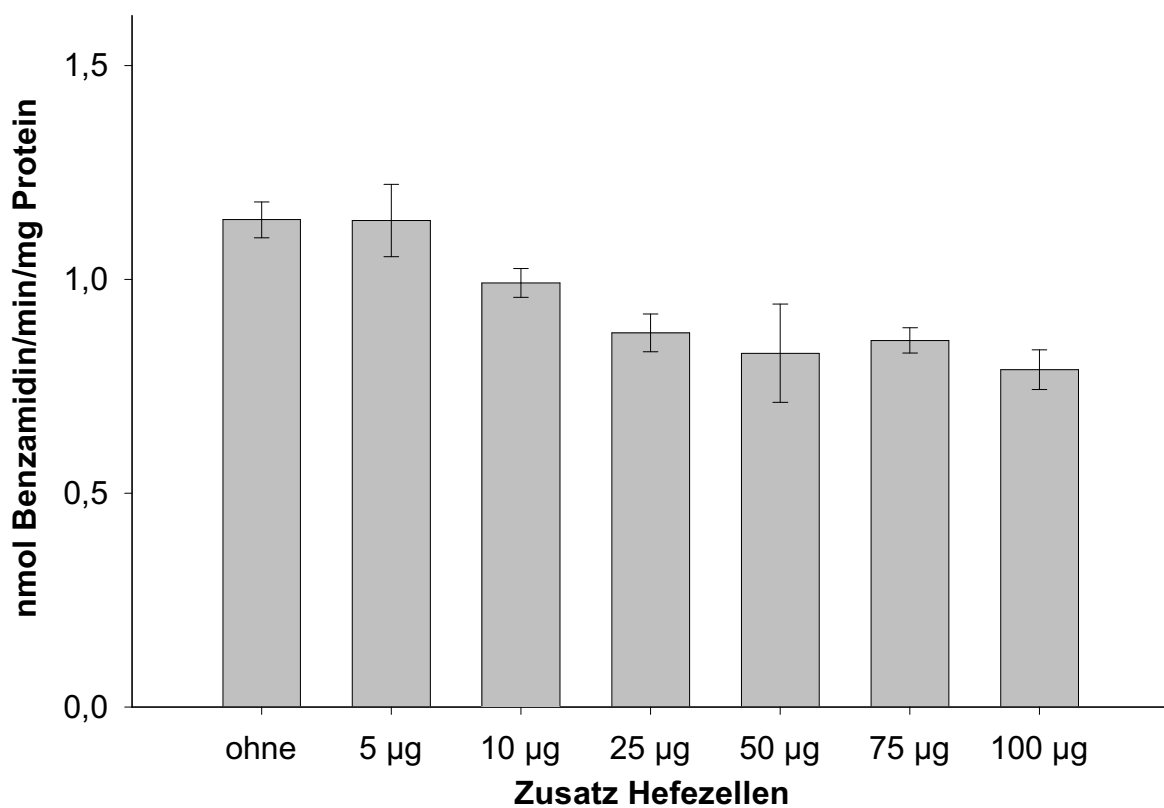


Abb. 2-23. *Einfluß von Hefezellen auf die Reduktion von Benzamidoxim in humanen Lebermikrosomen.*

Auch hier zeigten die Kontrollansätze ohne Zusatz von Hefezellen die größte Umsatzrate von 1.14 ± 0.04 nmol Benzamidin/min/mg Protein. Durch Zusatz von 5 µg Hefe wurde bei einer Aktivität von 1.14 ± 0.08 nmol/min/mg noch keine Hemmung der Reduktion erzielt, während durch eine Menge von 10 µg Hefe die

Umsetzungsrate signifikant auf 0.99 ± 0.33 nmol/min/mg abgesenkt wurde ($P = 0.0015$). 100 μg Hefezellen im Ansatz verminderten die Reduktaseaktivität der Lebermikrosomen auf 0.79 ± 0.05 nmol Benzamidin/min/mg Protein. Auch wenn kein streng linearer Zusammenhang zwischen steigenden Mengen an Hefezellen und sinkenden Umsetzungsraten besteht, wie unter 2.3.2.5.1. mit Eluat I zu erkennen war, war eine deutliche Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim in humanen Lebermikrosomen durch den Zusatz von Hefe zu verzeichnen.

2.3.2.2.5. 25-Hydroxylierung von 1α -Hydroxyvitamin D_3

Das aus Hefezellen gereinigte rekombinante CYP2A6 war nicht in der Lage, das körpereigene Substrat 1α -Hydroxyvitamin D_3 in 25-Position zu hydroxylieren.

2.4. Diskussion

Anhand der 2A6-Markeraktivität gelang mehrfach die Isolierung des CYP2A6 aus humanen Lebermikrosomen nach bekannter Vorschrift [Yun *et al.*, 1991]. Das Verfahren nach Yun *et al.* [1991] wurde dabei jedoch leicht modifiziert, wodurch sich einige Änderungen für die Reinigung ergaben. Zum einen wurde Octylsepharose CL 4B anstelle von *N*-Octylamino-Sepharose 4B als Säulenmaterial für die Hydrophobe Interaktionschromatographie verwendet, zum anderen wurde das Detergenz Emulgen[®] 911 aufgrund mangelnder Verfügbarkeit gegen Thesit[®] und Triton[®] X-100 ausgetauscht. Nach der Hydrophoben Interaktionschromatographie werden die 2A6-aktiven Fraktionen, wie auch die humane Benzamidoxim-Reduktase [Rieckert, 1999; Behrens, 1999], immer zusammen mit der NADH-Cytochrom b₅ Reduktase in dem Puffer mit der höchsten Detergenzkonzentration eluiert. Die Hydrophobe Interaktionschromatographie dient einer ersten Vortrennung aller enthaltenen Proteine. Ein ähnliches Verhalten von CYP2A6 und Benzamidoxim-Reduktase während dieses Reinigungsschrittes läßt auf Ähnlichkeiten beider Enzyme schließen.

Die isolierte CYP2A6 Endfraktion besaß eine mit der Literatur vergleichbare Cumarin-7-Hydroxylierungs-Aktivität (Abb. 2-24) [Yun *et al.*, 1991]. Yun *et al.* konnten jedoch keine Steigerung der Umsetzungsraten durch das gereinigte CYP2A6 im Vergleich zu humanen Lebermikrosomen erzielen. Im Gegensatz dazu zeigte das in der vorliegenden Arbeit gereinigte CYP2A6 eine etwa dreimal höhere 7-Hydroxylierungsaktivität als die humanen Lebermikrosomen. Die während der Reinigung mitgetestete Umsetzung von Cumarin durch die isolierten Zwischenfraktionen nach der Hydroxylapatit sowie nach der DEAE-Cellulose-Säule waren äußerst gering. Bei diesen Fraktionen wurde das Detergenz, welches die Enzymaktivität hemmt, nur soweit entfernt, daß sich eine 2A6-Aktivität gerade nachweisen ließ, da die Detergenzentfernung in der Regel hohe Proteinverluste zur Folge hat. Daher lassen sich die niedrigen Aktivitäten dieser Fraktionen durch das noch vorhandene Detergenz erklären.

Die Reduktion von Benzamidoxim konnte für alle 2A6-aktiven Fraktionen nach jedem Isolierungsschritt der Reinigung nachgewiesen werden (Abb. 224). Dabei war

deutlich eine Steigerung der Reduktionsrate während der Reinigung zu erkennen. Das gereinigte CYP2A6 besaß eine etwa zweifach höhere Reduktase-Aktivität als die humanen Lebermikrosomen.

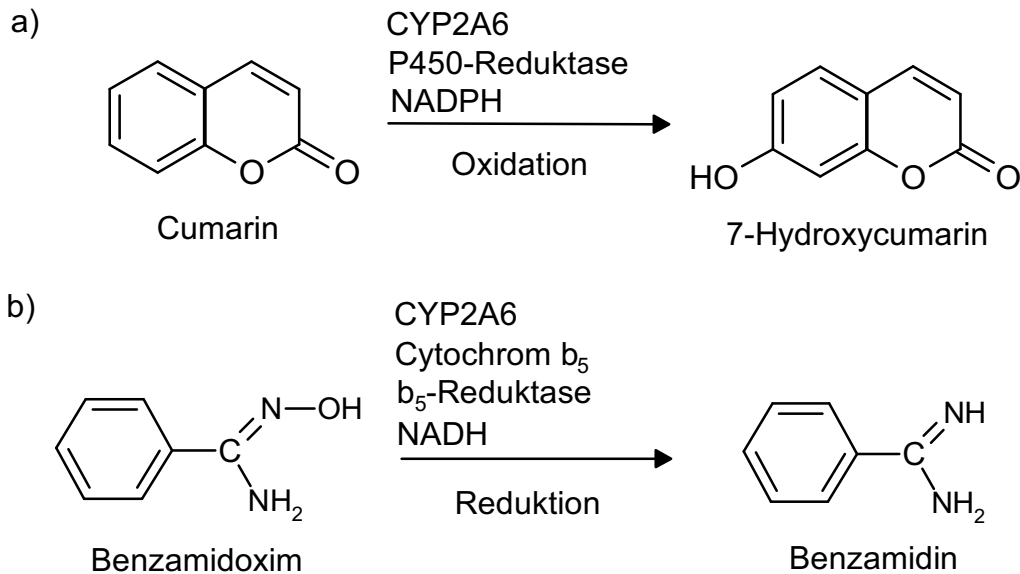


Abb. 2-24. Umsetzungen der 2A6-haltigen Fraktionen: a) Cumarin-7-Hydroxylierung, b) Reduktion von Benzamidoxim.

Die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin erfolgte jedoch mit etwa hundertfach geringeren Umsetzungsraten im Vergleich zu der Benzamidoxim-Reduktase aus dem Schwein [Lomb, 1995; Möller, 1997]. Die Aktivität der humanen Benzamidoxim-Reduktase lag ebenfalls um den Faktor zehn höher als die des CYP2A6 [Behrens, 1999; Rieckert, 1999]. Die Reduktase-Aktivität der von Behrens und Rieckert gereinigten Benzamidoxim-Reduktase wurde jedoch nochmals unter den gleichen Bedingungen überprüft wie die des isolierten CYP2A6. Dabei zeigte die humane Benzamidoxim-Reduktase sogar etwas geringere Umsetzungsraten für Benzamidoxim als die CYP2A6-haltige Fraktion. Die Aktivitäten beider humanen Enzyme lagen dabei jedoch im gleichen Größenordnungsbereich. Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Umsetzungsraten im Schwein und im Menschen könnte die geringere Potenz des humanen CYP2A6 im Vergleich zum CYP2D des Schweins sein. Andererseits könnten auch die verwendeten Ausgangsbedingungen für das humane rekonstituierte Enzymsystem nicht optimal gewesen sein. Diese sind

bisher nur für das rekonstituierte System des Schweins überprüft worden [Möller, 1997]. Für das humane System sind eventuell jedoch andere Konzentrationen der beteiligten Komponenten wie z.B. mehr b_5 -Reduktase erforderlich. Dieses müßte im Rahmen weiterer Arbeiten überprüft werden.

Eine andere Ursache für die geringere Enzymaktivität des gereinigten CYP2A6 könnte in der schlechten Qualität der Leberproben liegen, die als Ausgangsmaterial für die CYP2A6-Isolierung dienten. Das Lebergewebe stammte ausschließlich von Patienten mit primären oder sekundären Lebertumoren und wurde darüber hinaus in vielen Fällen mit Cytostatika behandelt, wodurch die Leber wahrscheinlich beträchtlich geschädigt war.

Dennoch läßt sich die Reduktion von Benzamidoxim zum Benzamidin durch die 2A6 haltigen Enzymfraktionen nachweisen.

Die Isolierung des CYP2A6 konnte im Western-Blot mit Hilfe eines Antikörpers gegen CYP2A6 bestätigt werden. Dabei zeigte sich durch die zunehmende Intensität der Antikörper-Reaktion mit den einzelnen Fraktionen der CYP2A6-Reinigung eine Aufkonzentrierung dieses Isoenzym während der Reinigung.

Die SDS-Gelelektrophorese zeigte hingegen, daß in der gereinigten Endfraktion noch weitere Proteinbanden enthalten waren. Es waren jedoch weder NADH-Cytochrom b_5 Reduktase oder Cytochrom b_5 noch die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase, bei denen es sich um essentielle Bestandteile des reductiven sowie des oxidativen rekonstituierten Systems handelt, in der gereinigten CYP2A6-Fraktion enthalten. Demnach war die Durchführung von Rekonstituierungsexperimenten möglich.

Durch die Aminosäure-Sequenz-Analyse der gereinigten 2A6-aktiven Fraktion mittels MALDI-MS konnte wiederum die Isolierung des CYP2A6 bestätigt werden. Die zusätzliche Anwesenheit von CYP2A7 in der gereinigten Fraktion konnte dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da in der Enzympräparation keine für CYP2A7 typischen Massenfragmente nachgewiesen werden konnten. Es wurden hingegen acht Massenbruchstücke detektiert, die ausschließlich dem CYP2A6 zugeordnet werden können.

Die mitisolierten Proteinverunreinigungen konnten ebenfalls identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um die UDP-Glucuronyl-Transferase sowie das CYP2C19. Beide Enzyme sind käuflich zu erwerben, zeigten jedoch im Zusammenspiel mit

Cytochrom b_5 und der b_5 -Reduktase keine Benzamidoxim-Reduktase-Aktivität, wodurch sie somit als für die Reduktion verantwortliche Enzyme ausgeschlossen werden konnten. Lediglich die Arylacetamid-Deacetylase, die ebenfalls in der 2A6-haltigen Fraktion enthalten war, war nicht käuflich zu erwerben, wodurch die Rolle dieses Enzyms für die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen nicht endgültig geklärt werden konnte. Die Arylacetamid-Deacetylase wird überwiegend in der Leber exprimiert und wurde als Esterase klassifiziert. Dieses Enzym ist in erster Linie an der Hydrolyse von Arylacetamiden zu Arylaminen beteiligt [Probst *et al.*, 1994]. Da eine Esterase und damit eher Hydrolase nicht an Redoxprozessen beteiligt sein kann, kann dieses Enzym mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit als Reduktase jedoch ausgeschlossen werden.

Die Möglichkeit besteht, daß neben dem identifizierten Enzymsystem aus humanen Lebermikrosomen, bestehend aus Cytochrom b_5 , der b_5 -Reduktase und CYP2A6, noch weitere mikrosomale Enzymsysteme zur Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen befähigt sind. Rekombinantes, gereinigtes CYP3A4 (Panvera) zeigte in Gegenwart von Cytochrom b_5 und der b_5 -Reduktase die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin jedoch nicht. Dies ist für den Metabolismus von Amidoximen als Arzneistoffe von immenser Bedeutung, da CYP3A4 etwa ein Drittel aller P450-Enzyme der Leber ausmacht und daher einen großen Anteil am Fremdstoffmetabolismus besitzt [Ortiz de Montellano, 1995]. Würde die Aktivierung von Amidoximen als prodrugs von Amidinen durch CYP3A4 katalysiert werden, so könnten sich zahlreiche Interaktionen mit anderen Arzneistoffen hieraus ergeben.

Nicht nur die Reduktion der Modellsubstanz Benzamidoxim konnte durch das aus humanen Lebermikrosomen isolierte CYP2A6 gezeigt werden, sondern auch die Reduktion weiterer *N*-hydroxylierter Verbindungen. Hierdurch zeigten sich weitere Parallelen zu dem reduktiven Enzymsystem aus Schweinelebermikrosomen. Beispielsweise war das gereinigte CYP2A6 im Zusammenspiel mit Cytochrom b_5 und der b_5 -Reduktase in der Lage, das *N*-Hydroxyamidinohydrazon Guanoxabenz zu reduzieren (Abb. 2-25). Die Reduktion von Guanoxabenz wurde bereits für das rekonstituierte System des Schweins beschrieben [Lomb, 1995].

Ebenso konnte die Aktivierung des prodrugs RO 483656, ein Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonist der Firma Hoffmann La Roche, mit einer Amidoxim-Struktur

durch das gereinigte CYP2A6 im Zusammenspiel mit Cytochrom b_5 und b_5 -Reduktase zum Amidin gezeigt werden (Abb. 225). Erst diese Reduktion zum Amidin führt zur Aktivierung des Arzneistoffs. Die *in vivo*-Eignung von Sibrafiban als Prodrug konnte bereits gezeigt werden [Wittke *et al.*, 1999].

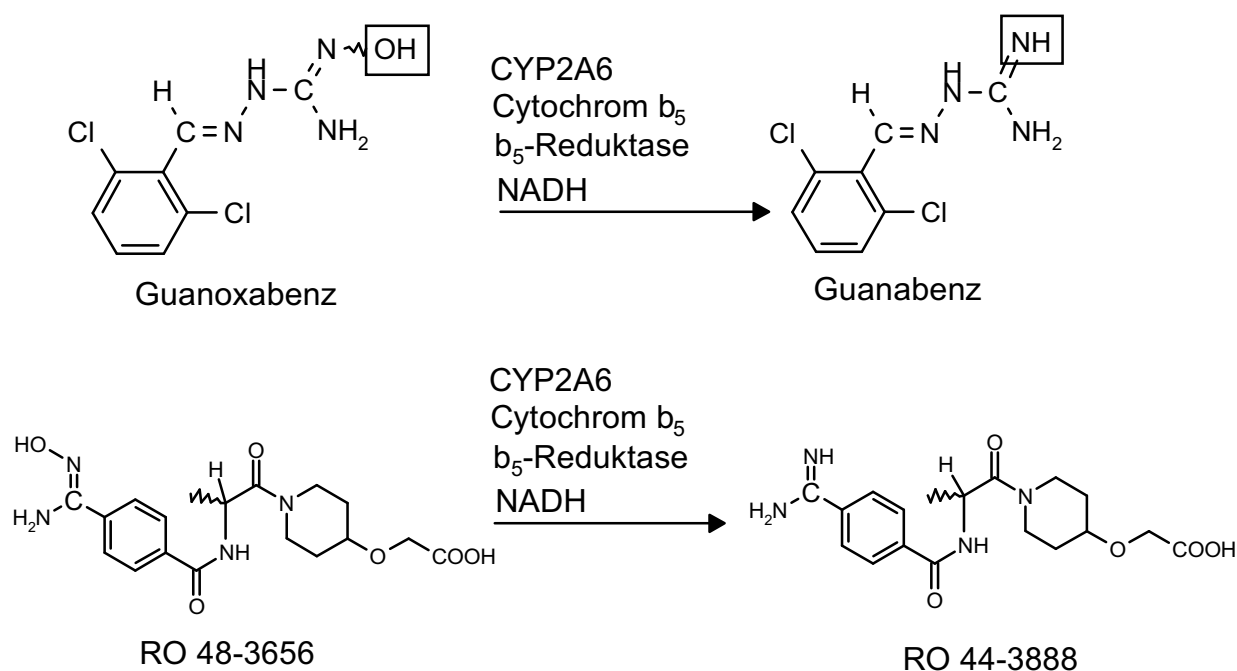


Abb. 2-25. Reduktionen weiterer N-hydroxylierter Verbindungen durch die gereinigte CYP2A6-Präparation.

Für die Reduktion von Benzamidoximen konnte gezeigt werden, daß humanes Cytochrom b_5 und die humane b_5 -Reduktase als Bestandteile des reduktiven Enzymsystems durch aus Schweinelebermikrosomen isolierte Komponenten austauschbar sind. Aufgrund ihrer besseren Verfügbarkeit konnten diese daher für die Durchführung von Studien im rekonstituierten Enzymsystem verwendet werden. Da der Gehalt an NADH-Cytochrom b_5 Reduktase in humanen Lebermikrosomen im Vergleich mit Schweinelebermikrosomen eher gering ist und wenig humane Leber zur Verfügung stand, erfolgte die Reinigung der humanen b_5 -Reduktase unter erschwerten und weniger effizienten Bedingungen.

Hemmstudien mit einem reaktionsspezifischen Antikörper gegen CYP2A6 sollten den Hinweis, daß das humane P450 Isoenzym 2A6 an der Reduktion von Benzamidoxim beteiligt ist, untermauern. Hierfür wurde ein reaktionsspezifischer Antikörper gegen CYP2A6 verwendet, der die 7-Hydroxylierung des Cumarins zu unterbinden vermag. Die Reduktion von Benzamidoxim in humanen Lebermikrosomen wurde durch diesen Antikörper nicht gehemmt. Hingegen konnte die Umsetzung von Benzamidoxim zu Benzamidin im rekonstituierten Enzymsystem mit CYP2A6 trotz einer hohen Standardabweichung signifikant vermindert werden. Diese hohe Standardabweichung zeigte sich jedoch auch für die Kontrollinkubation, bei der die Inhibition der Cumarin-7-Hydroxylierung durch diesen Antikörper überprüft wurde. Somit kann man von einer Hemmung der Benzamidoxim-Reduktion im rekonstituierten System mit CYP2A6, Cytochrom b_5 und b_5 -Reduktase durch den reaktionsspezifischen Antikörper gegen CYP2A6 ausgehen. Der fehlende Einfluß dieses Antikörpers auf humane Lebermikrosomen ist ein Indiz dafür, daß eventuell noch weitere zur Reduktion befähigte Enzymsysteme vorhanden sein müssen.

Eine Beeinflussung der Reduktion von Benzamidoxim durch Cumarin-Zusatz war jedoch nicht erkennbar. Umgekehrt wurde die 7-Hydroxylierung des Cumarins nicht durch den Zusatz von Benzamidoxim gestört. Die fehlende Substrathemmung von Cumarin und Benzamidoxim, die beide durch das CYP2A6 umgesetzt werden, läßt auf zwei unterschiedliche Bindungsstellen dieser Substrate am CYP2A6 schließen. Während das Cumarin wahrscheinlich wie die meisten Substrate an der hydrophoben Bindungstasche des P450-Enzyms bindet, könnte die Bindung des Amidoxims direkt am Häm des CYP2A6 erfolgen (s. Kapitel 4).

Ein zusätzlicher Unterschied besteht in den optimalen Inkubationsbedingungen wie z.B. der Wahl der Elektronenüberträger für die oxidativen sowie die reduktiven Umsetzungen. Die Substrathemmung müßte in nachfolgenden Arbeiten erneut unter Zusatz beider Cosubstrate, NADH und NADPH, sowie unter Zusatz sowohl von Cytochrom b_5 und der b_5 -Reduktase als auch der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase überprüft werden. Unter diesen Bedingungen ergab sich für das rekonstituierte Enzymsystem des Schweins eine verminderte Reduktionsrate des Benzamidoxims durch Dextromethorphan, welches durch das CYP2D aus Schweineleber oxidiert wird [Möller, 1997].

Die isolierte Endfraktion der CYP2A6-Reinigung war noch mit drei weiteren Enzymen verunreinigt, CYP2C19, der UDP-Glucuronyltransferase sowie der Arylacetamid-Deacetylase. Gereinigtes rekombinantes CYP2C19 sowie die humane UDP-Glucuronyltransferase wurden im rekonstituierten System mit Cytochrom b_5 und der b_5 -Reduktase auf die Reduktion von Benzamidoxim überprüft, zeigten jedoch keine Reduktase-Aktivität. Somit konnte die Beteiligung beider Enzyme am humanen reduktiven Enzymsystem ausgeschlossen werden. Die Reduktion von Benzamidoxim wird somit innerhalb der gereinigten Fraktion eindeutig dem CYP2A6 zugesprochen.

Die Reinigung einer Enzympräparation aus humanen Lebermikrosomen, die sowohl die Reduktion von Benzamidoxim als auch die 7-Hydroxylierung von Cumarin katalysieren konnte, gelang durch zwei unterschiedliche Methoden: zum einen wurde die Reduktion als Aktivitätsassay verwendet [Behrens, 1999; Rieckert, 1999], zum anderen erfolgte die Reinigung gemäß der 2A6-Markeraktivität. Für beide Methoden wurden unterschiedliche Säulenmaterialien verwendet. Trotzdem gelang mit Hilfe beider Verfahren die Isolierung von zwei Enzympräparationen mit gleichen Enzymaktivitäten. Hieraus läßt sich folgern, daß die humane Benzamidoxim-Reduktase [Rieckert, 1999; Behrens, 1999] und das CYP2A6 [Yun *et al.*, 1991] identisch sind. Durch die Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim durch einen reaktionsspezifischen Antikörper gegen CYP2A6 wird diese Schlußfolgerung untermauert.

In Lymphoblasten exprimiertes CYP2A6 war im Gegensatz zu aus humaner Leber gereinigtem CYP2A6 nicht in der Lage, Benzamidoxim zu reduzieren. Um die Gründe hierfür näher zu untersuchen, wurde gentechnisch hergestelltes CYP2A6 aus dem Expressionssystem Hefezellen gereinigt. Anschließend wurde die Reduktase-Aktivität des rekombinanten und gereinigten CYP2A6 überprüft.

Die Isolierung von rekombinantem CYP2A6 gelang erstmals aus Hefezellen. Dabei wurde das Verfahren der Reinigung von rekombinantem CYP2A6 aus *E.coli* leicht modifiziert [Soucek *et al.*, 1999]. Obwohl das gereinigte rekombinante CYP2A6 eine geringere 7-Hydroxylierungsaktivität von Cumarin besaß als das aus humanen Lebermikrosomen isolierte Isoenzym, konnte die Markeraktivität dennoch gezeigt werden. Hierbei muß auch berücksichtigt werden, daß die Hefezellen, die als Ausgangsmaterial für die CYP2A6-Reinigung dienten, einen sehr geringen

spezifischen P450-Gehalt besaßen. Durch den hohen Gehalt an Begleitproteinen wurde die Isolierung des CYP2A6 erheblich erschwert.

Gereinigtes rekombinantes CYP2A6 zeigte die Reduktion von Benzamidoxim nicht. Die Überprüfung der Reinheit dieser Enzymfraktion mittels SDS-Gelelektrophorese ergab, daß noch drei weitere Proteinbanden jedoch in geringer Konzentration in der CYP2A6-Präparation enthalten waren. Diese könnten immer noch einen hemmenden Einfluß auf die reduktive Enzymaktivität ausüben.

Um die Anwesenheit hemmender Faktoren in der gereinigten CYP2A6-Präparation zu überprüfen, wurden zu einer Inkubation mit humanen Lebermikrosomen steigende Mengen dieser Präparation zugefügt. Die Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim konnte konzentrationsabhängig gezeigt werden. Dabei konnte eine zu hohe Natriumcholat-Konzentration als Ursache dieser Störung ausgeschlossen werden. Die Reduktion von Benzamidoxim durch humane Lebermikrosomen wurde ebenfalls unter Zusatz von steigenden Mengen an Hefezellen überprüft. Auch hier zeigte sich eine Hemmung der Reduktion, die jedoch weniger ausgeprägt verlief als die durch die gereinigte Enzympräparation.

Daraus läßt sich folgern, daß sowohl in dem Expressionssystem als auch in dem gereinigten rekombinanten CYP2A6 Bestandteile vorhanden sind, die in der Lage sind, die Reduktion zu inhibieren. Offenbar besitzen diese Bestandteile nur einen Einfluß auf die Reduktion, wodurch die dennoch auftretende Cumarin-7-Hydroxylierung zu erklären wäre. Die Reduktion von Benzamidoxim durch rekombinant exprimiertes CYP2A6 kann nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß natives CYP2A6 aus humanen Lebermikrosomen und rekombinant exprimiertes CYP2A6 eine leicht unterschiedliche Tertiärstruktur besitzen, welche die Oxidation von Cumarin ermöglicht, die Reduktion jedoch verhindert.

Eventuell liegen bei dem rekombinanten Enzym im Vergleich zur gereinigten Form auch einige Austauschungen in der Aminosäuresequenz vor, die sich auf die Reduktion negativ auswirken. Es ist bekannt, daß schon der Austausch einer Aminosäure die katalytischen Aktivitäten von CYP2A6 erheblich beeinflussen kann (s. 2.1.1.) [Oscarson *et al.*, 1999b].

Letzlich ist noch ein anderer Effekt denkbar, der bei zukünftigen Studien geprüft werden sollte. Eventuell sind in den gereinigten Fraktionen noch Aktivatoren der

Reduktion vorhanden, die in der rekombinanten Präparation naturgemäß nicht enthalten sind.

Die Rolle des CYP2A6 an physiologischen Prozessen ist bislang unklar. Bisher ist noch kein physiologisches Substrat für CYP2A6 beschrieben worden. Da das für die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen verantwortliche Enzymsystem des Schweins ebenfalls zur Oxidation des physiologischen Substrats 1α -Hydroxyvitamin D_3 befähigt ist, sollte auch die 25-Hydroxylierungsaktivität des CYP2A6 getestet werden. Gereinigtes rekombinant exprimiertes CYP2A6 war jedoch nicht in der Lage, die Umsetzung des 1α -Hydroxyvitamin D_3 zu katalysieren (Abb. 2-26). Hierdurch wurden die Ergebnisse einer Studie mit zahlreichen rekombinanten P450-Isoenzymen, u.a. auch CYP2A6, bestätigt, in der diese auf die Vitamin D_3 -25-Hydroxylierung getestet wurden [Kamachi *et al.*, 2001]. Demnach ist das humane CYP2A6 mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht am Vitamin D_3 -Stoffwechsel beteiligt.

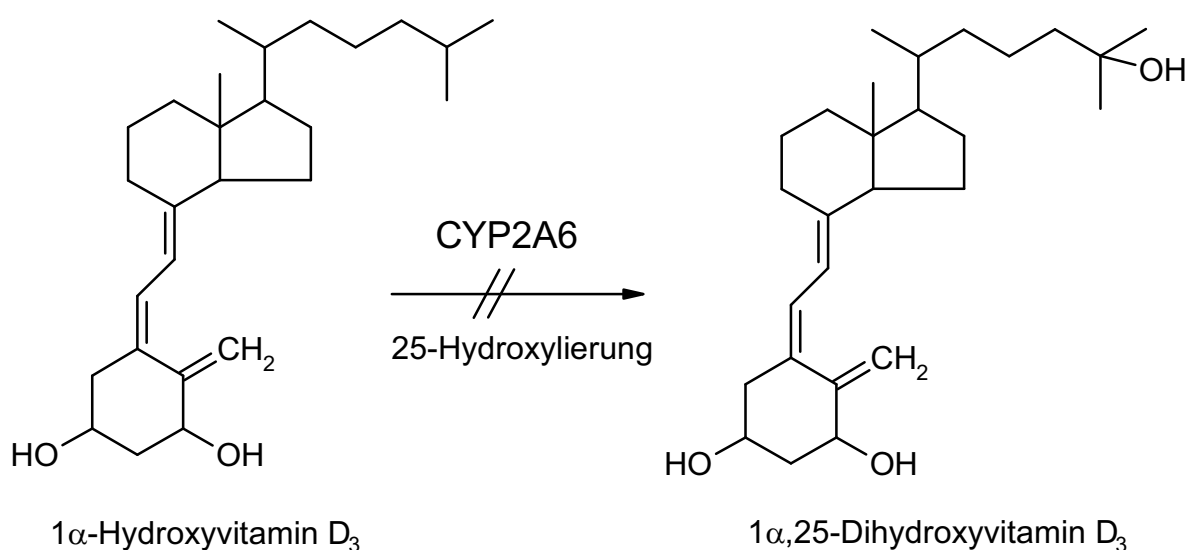


Abb. 2-26. 25-Hydroxylierung von 1α -Hydroxyvitamin D_3 zu $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß mit CYP2A6 ein Isoenzym identifiziert worden ist, welches im Zusammenspiel mit Cytochrom b_5 und b_5 -Reduktase die Reduktion von Amidoximen katalysiert. Da CYP2A6 polymorph ist (s. 2.1.1.), könnte sich dies gegenteilig auf die Aktivierung von prodrugs auswirken. Klinische Studien der Phase III mit Sibrafiban [Wittke *et al.*, 1999] und Ximelagatran [Eriksson *et al.*, 1999] zeigen aber eindeutig, daß individuelle Unterschiede in der Reduktion nicht zu beobachten sind. Somit müssen mehrere Enzyme an der Reduktion beteiligt sein. Auch die hier vorliegenden Studien ergaben mehrere Hinweise darauf, daß noch weitere mikrosomale Enzyme die Reduktion katalysieren können. Hinzu kommt ein sehr effektives mitochondriales Enzymsystem [Deters und Clement, 2000] und das Vorkommen von Reduktasen in sehr vielen Organen [Mau und Clement, 2001], die im Rahmen von anderen Studien zur Zeit charakterisiert werden. Das Zusammenspiel all dieser Enzyme ist für die effektive *in vivo*-Reduktion von Amidoximen und die nicht vorhandenen individuellen Schwankungen verantwortlich.

3. STRUKTUR-AKTIVITÄTS-BEZIEHUNGEN DER REDUKTION VON BENZAMIDOXIMEN

3.1. Einführung

3.1.1. Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR)

3.1.1.1. Allgemeine Einführung

Wie bereits unter 1.1. beschrieben, sind Enzyme in der Lage, eine Vielzahl von Verbindungen zu metabolisieren. Die Geschwindigkeit, mit der ein Enzym ein solches Substrat umzusetzen vermag, ist unter anderem von der Struktur dieser Verbindung abhängig. Eine quantitative Beschreibung solcher Abhängigkeiten kann mit Hilfe von Quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (QSAR, Quantitative Structure Activity Relationships) erfolgen. Durch QSAR-Analysen können allgemein biologische Aktivitäten von Proteinen mit den physikochemischen Eigenschaften ihrer Substrate korreliert werden. Unter Biologischen Aktivitäten kann man neben Reaktionsgeschwindigkeiten auch Enzymaffinitäten oder inhibitorische Effekte auf Enzyme bzw. Rezeptoren verstehen. Diese werden vor allem mit physikalischen Eigenschaften wie der Lipophilie oder elektronischen Effekten funktioneller Gruppen von Verbindungen in Beziehung gesetzt. Die klassischen Korrelationsmethoden berücksichtigen hierbei nur die physikalischen Parameter von Substituenten. Teilweise werden aber auch die gesamten strukturellen Eigenschaften einer Verbindung in die Korrelation mit einbezogen [Kubinyi, 1994].

Mittels QSAR-Analyse können folglich Aussagen über strukturelle Anforderungen von Substanzen getroffen werden, die für die Entfaltung optimaler biologischer Aktivitäten erforderlich sind [Kubinyi, 1994].

QSAR-Analysen besitzen in der Arzneimittelforschung einen hohen Stellenwert, besonders wichtig sind sie für das Auffinden neuer Leitstrukturen und deren Optimierung [Kubinyi, 1994]. In der Arzneistoffentwicklung werden zahlreiche Synthesen sowie Screening-Verfahren durchgeführt, um neue Wirkstoffe ausfindig zu machen oder die Eigenschaften bereits bekannter Substanzen zu verbessern. Da

diese Verfahren oft sehr zeit- und kostenintensiv sind, ist man um effektivere Methoden der Arzneistoffentwicklung bemüht. Hierfür kann die Ableitung von Struktur-Aktivitäts-Hypothesen sowie deren Quantifizierung nützlich sein, durch die eine Vorauswahl an geeigneten Verbindungen getroffen werden kann [Kubinyi, 1993]. Desweiteren kann die Aussagekraft verschiedener *in vitro* Modelle beurteilt werden, indem man die Korrelation der gleichen biologischer Aktivitäten, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht wurden, überprüft [Kubinyi, 1994].

Erste Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen wurden bereits 1868 von Crum Brown und Fraser ermittelt. Diese beobachteten eine Abhängigkeit der biologischen Wirkung von Alkaloiden von ihrer chemischen Struktur.

1893 entdeckte Richet einen Zusammenhang zwischen der Toxizität bestimmter Verbindungen und ihrer Lipophilie. Damals fehlten jedoch die mathematischen Hilfsmittel, welche die Berechnung solch komplizierter multipler Korrelationen erst ermöglichen.

Als Begründer der klassischen QSAR-Analyse gilt Hansch, dem Anfang der sechziger Jahre durch die Entwicklung von Computern die erforderlichen Mittel zur Verfügung standen. 1964 stellte er zusammen mit Fujita ein allgemein gültiges mathematisches Modell zur quantitativen Beschreibung linearer und nichtlinearer Struktur-Wirkungs-Beziehungen auf [Hansch und Fujita, 1964]:

$$\log 1/C = a (\log P)^2 + b_1 \log P + b_2 \sigma + \dots + c$$

Dabei drückt $\log 1/C$ den logarithmierten Kehrwert der Konzentration aus, die einen biologischen Effekt hervorruft. Anstelle der Konzentration können hier auch Binde-, Hemm- und Geschwindigkeitskonstanten verwendet werden. Die Lipophilie des Substrates fließt in die Gleichung über den Oktano/Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log P$ ein. Der Hammett-Parameter σ beschreibt die Elektronendichteverteilung in der Verbindung. Durch die Regressionsanalyse werden die Koeffizienten a , b_1 und b_2 ermittelt, c stellt eine Konstante dar.

Die biologische Wirkung kann aber nicht nur von elektronischen oder lipophilen Effekten abhängig sein, sondern auch von weiteren physikochemischen Eigenschaften, wie z.B. der Polarisierbarkeit einer Verbindung, die durch die Molrefraktion MR ausgedrückt wird [Kubinyi, 1994]. Eines der ersten Computer

Modelle zur Berechnung von Quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen unter Einbeziehung von multiplen Regressionen wurde 1976 von C. Hansch publiziert, das jedoch noch zahlreiche Unzulänglichkeiten enthielt [Hansch, 1976].

Zunächst wurden mit der Hansch-Analyse überwiegend toxische, narkotische, bakterizide, fungizide sowie hämatolytische Wirkungen beschrieben. Später wurden hierüber Abhängigkeiten des Transports und der Verteilung von Arzneistoffen von ihrer Lipophilie und Ionisation bzw. Dissoziation ermittelt. Bis heute besitzt die Hansch-Analyse auf diesem Gebiet den höchsten Stellenwert [Kubinyi, 1994].

Zahlreiche Struktur-Aktivitäts-Beziehungen konnten mit Hilfe der QSAR-Analyse ermittelt werden. So beschäftigte sich z.B. Hansch mit den für die Resistenz von Zytostatika verantwortlichen Strukturelementen und fand u.a. eine nichtlineare Abhängigkeit der Resistenz von der Molekülgröße der zytostatischen Verbindungen [Selassie *et al.*, 1990]. Weiter zeigten systematische Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen der Resorption, dem Transport sowie der Verteilung von Arzneistoffen und ihrer Lipophilie. Hierbei stellte sich heraus, daß Biomembranen nicht nur für die Permeation eines Pharmakons, sondern auch für dessen biologische Aktivität eine große Rolle spielen [Mason *et al.*, 1991]. Eine weitere Studie befaßte sich mit der kinetisch kontrollierten Resorption saurer Verbindungen. Hier fließen anstelle der log P-Werte die pH-Werte in die Korrelationsanalyse ein [Kubinyi, 1994]. Auch die minimale Hemmkonzentration von Sulfonamiden korreliert in erster Linie mit deren pKa Werten und nicht mit der Wasserlöslichkeit [Silipo und Vittoria, 1979]. Mittels QSAR-Analyse konnte weiterhin eine Korrelation der Mutagenität von Nitro Verbindungen mit der Lipophilie gezeigt werden [Debnath *et al.*, 1991].

Eine Vereinfachung der Hansch-Analyse stellt die Free-Wilson-Methode dar, in der eine Korrelation biologischer Wirkungen mit der An- und Abwesenheit bestimmter funktioneller Gruppen oder Substituenten erfolgt. Durch die Kombination von Hansch- und Free-Wilson-Analyse werden die Anwendungsgebiete beider Methoden enorm erweitert [Kubinyi, 1993]. Es konnte gezeigt werden, daß eine Kombination ebenfalls zu besseren Korrelationen der untersuchten Aktivitäten mit physikalischen Parametern führen kann [Tmej *et al.*, 1998].

Eine wichtiger Fortschritt wurde mit der Entwicklung der 3D QSAR-Analyse erzielt, in der zusätzlich die dreidimensionale Struktur der Wirkstoffe berücksichtigt wird. Diese wird entweder durch Röntgenstruktur-Analyse oder theoretisch durch sogenannte Expertensysteme mittels Computer-Technik ermittelt. Eine Weiterentwicklung der 3D QSAR-Analyse ist z.B. die 1988 von Cramer entwickelte CoMFA-Analyse (Comparative molecular field analysis). In dieser werden biologische Aktivitäten mit Feld-Eigenschaften von Molekülen (z.B. sterische oder elektronische Effekte) im Raum korreliert [Podlogar und Ferguson, 2000]. Die CoMFA-Analyse gilt dabei als vielseitiger, da sie die 3D-Struktur berücksichtigt und auch Moleküle mit unterschiedlichen Grundgerüsten vergleichen kann.

Es existiert eine Vielzahl weiterer Computerprogramme, die alle für die Betrachtung von Quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen entwickelt wurden. Eine detaillierte Einführung in die verschiedenen Techniken der unterschiedlichen Computerprogramme wird in dem Buch „3D QSAR in Drug Design“ von Hugo Kubinyi gegeben [Kubinyi, 1993].

Erst kürzlich konnte eine weitere Entwicklung in der klassischen QSAR-Analyse verzeichnet werden. Für die Korrelation mit biologischen und pharmakologischen Aktivitäten wurden physikalische Parameter durch quantenmechanische Messungen ausgetauscht. Aussagen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen können demnach ebenso mit Hilfe der Quantenmechanik getroffen werden. Die Ergebnisse konnten durch die klassische QSAR-Analyse verifiziert werden [Amat und Carbó Dorca, 1999].

Eine einzelne QSAR-Analyse kann selbst durch Signifikanzprüfungen statistisch nicht eindeutig belegt werden und auch Computerprogramme können falsche Ergebnisse liefern, wenn diese auf inadäquaten Hypothesen basieren. Aus diesem Grund fordert Hansch eine Validierung der jeweiligen Analyse. Dabei sollen die Ergebnisse einer QSAR-Studie möglichst mit mehreren Substanzgruppen bzw. ähnlichen biologischen Systemen verglichen werden, wodurch sich Aussagen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen mit einer höheren Sicherheit treffen lassen [Kubinyi, 1994].

3.1.1.2. Physikalische Parameter zur Ermittlung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Die biologischen Aktivitäten werden in der klassischen Hansch-Analyse mit unterschiedlichen physikalischen Parametern von Substraten korreliert. Hierbei besitzen sowohl elektronische als auch sterische und lipophile Effekte die größte Bedeutung. Die biologischen Effekte können z.T. nur von einem oder aber auch von mehreren physikalischen Eigenschaften der Verbindungen abhängen. Das Ausmaß ihres Einflusses läßt sich anhand ihrer Koeffizienten aus der Regressionsgleichung ermitteln (s. 3.1.1.1.). Da sich die vorliegende Arbeit im wesentlichen mit dem Einfluß von lipophilen sowie elektronischen Effekten von Substituenten in aromatischen Verbindungen auf die Geschwindigkeit von enzymatischen Reaktionen beschäftigt, soll an dieser Stelle nur auf die Hammett- sowie auf die Hansch-Konstante näher eingegangen werden.

3.1.1.2.1. Hammett Konstante σ

Substituenten in *meta*- oder *para*-Stellung einer aromatischen Verbindung können wesentlich die Elektronendichteverteilung in einem Molekül beeinflussen. Die Hammett-Konstante σ beschreibt die Fähigkeit einer funktionellen Gruppe zur Anziehung bzw. Abstoßung von Elektronen und ist für jeden Substituenten charakteristisch. Dabei werden die gesamten induktiven und mesomeren Effekte des Substituenten berücksichtigt. Die Hammett-Konstante wird ermittelt, indem man den Einfluß des Substituenten auf die Ionisationskonstante der Benzoesäure in Wasser mißt:

$$\sigma = \log \frac{(K_{x-C_6H_4-COOH})}{(K_{C_6H_5-COOH})}$$

Hierbei stellt K jeweils die Dissoziationskonstante der substituierten sowie der unsubstituierten Verbindung dar. Die Ionisation der Benzoesäure wird verwendet, da die Säurestärke erheblich durch den Substituenten beeinflusst werden kann. Elektronenziehende Gruppen stabilisieren das entstehende Carboxylat-Anion und erleichtern dadurch die Abspaltung eines Protons, während elektronenschiebende

die Reaktion erschweren. Besitzt σ einen positiven Wert, so zieht der Substituent stärker Elektronen an als Wasserstoff, bei einem negativen Wert ist dieser schwächer elektronenanziehend als Wasserstoff [Livingstone, 1995].

Für *meta*- und *para*-substituierte Aromaten kann eine quantitative Beziehung zwischen Struktur und Reaktivität einer Verbindung hergestellt werden. Die Hammett-Gleichung zeigt einen linearen Zusammenhang zwischen der Struktur *meta*- und *para*-substituierter Benzol-Derivate und den Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten bei ihren Reaktionen. Sie gilt nur für Umsetzungen von aromatischen Verbindungen, die das gleiche Reaktionszentrum in der Seitenkette, aber einen unterschiedlichen Substituenten in *m*-/*p*-Stellung besitzen. Für die Ionisation von Benzoesäure wurde folgende lineare freie Enthalpie-Beziehung nach Hammett aufgestellt [Livingstone, 1995]:

$$\log K_x - \log K_H = \rho \sigma_x$$

K_x stellt die Ionisationskonstante mit dem Substituenten x dar, während K_H für die Ionisationskonstante der unsubstituierten Benzoesäure steht. Die Reaktionskonstante ρ gibt die Empfindlichkeit der Reaktion gegenüber dem Einfluß des Substituenten an. Für die Dissoziation der Benzoesäure bei 25 °C in wäßriger Lösung wurde für ρ der Wert 1 gewählt, so daß diese als Standardreaktion für die Ermittlung von Substituentenkonstanten dienen kann. Die so ermittelten σ -Konstanten konnten inzwischen erfolgreich auf zahlreiche quantitative Beschreibungen von chemischen Gleichgewichten und Reaktionen angewandt werden [Livingstone, 1995]. Hängt die Reaktion einer aromatischen Verbindungen von den elektronischen Effekten ihres Substituenten ab, so läßt sich diese durch die Hammett-Gleichung formulieren. Die Hammett-Gleichung gilt nur für *meta*- und *para*-substituierte Benzolderivate, da in *ortho*-Position neben elektronischen zusätzlich sterische Effekte wirksam werden können, die bei Hammett keine Berücksichtigung finden.

Um Ergebnisse aus chemischen und biochemischen Studien mit den Hammettschen σ -Konstanten zu korrelieren, muß man die gemessenen Aktivitäten verschiedener *m*-/*p*-substituierter Substrate logarithmierten und gegen die entsprechende

Substituenten-Konstante auftragen. Läßt sich eine Gerade durch die eingezeichneten Meßpunkte legen, so zeigt sich ein elektronischer Einfluß des Substituenten in *meta*- oder *para*-Stellung auf die Reaktion. Je besser der Korrelationskoeffizient und je steiler die Gerade, desto größer ist dieser Effekt. Dabei bedeuten positive Vorzeichen von ρ eine Verminderung der Umsetzungsgeschwindigkeit durch Elektronendonatoren, während ein negatives Vorzeichen eine Steigerung anzeigt.

3.1.1.2.2. Hansch'sche Hydrophobiekonstante π

Die Lipophilie ist ein weiterer physikalischer Parameter, der ebenfalls einen großen Einfluß auf biologische Aktivitäten haben kann. Die Lipophilie besitzt beispielsweise eine große Bedeutung für die Annäherung und Bindung von Substraten an hydrophile oder hydrophobe Regionen eines Enzyms. Ein Maß für die Lipophilie einer Verbindung ist der Nernstsche Verteilungskoeffizient P . Dieser gibt das Verhältnis der Konzentration einer Substanz in zwei nicht miteinander mischbaren Phasen an, einer Lipid- (C_{Lipid}) und einer wäßrigen Phase (C_{Wasser}). Als lipophile Phase wird heute Oktanol verwendet, da es aufgrund seiner Fähigkeit, Wasserstoffbrücken auszubilden, den physiologischen Verhältnissen am nächsten kommt:

$$P = \frac{C_{\text{Oktanol}}}{C_{\text{Wasser}}}$$

Aus dem Logarithmus der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten einer substituierten ($\log P_X$) und einer unsubstituierten Verbindung ($\log P_H$) kann weiterhin die Hydrophobie-Konstante π_X nach Hansch und Leo berechnet werden, der folgende Gleichung zugrunde liegt [Leo *et al.*, 1975]:

$$\pi_X = \log P_X - \log P_H$$

Hier wird der Einfluß eines Substituenten auf die Lipophilie eines Moleküls gezeigt. Die Hydrophobie-Konstante gibt den Beitrag eines Substituenten an der

Gesamtlipophilie einer Verbindung wieder. Besitzt π_x ein negatives Vorzeichen, verleiht er der Substanz einen hydrophileren Charakter, bei positivem Vorzeichen einen lipophileren. Eine Ähnlichkeit dieser Gleichung nach Hansch ist mit der Hammett-Gleichung zu erkennen, jedoch läßt sich für die Hydrophobie-Konstante keine Hammett-äquivalente Reaktionskonstante formulieren [Livingstone, 1995].

3.1.2. Bedeutung von QSAR für die Reduktion von Amidoximen

Zahlreiche Arzneistoffe enthalten stark basische Amidin-funktionen, die für die pharmakologische Aktivität des Wirkstoffes mitverantwortlich sind. Besonders dikationische Verbindungen mit zwei Amidin-funktionen in einem Molekül sind beispielsweise gegen eine Vielzahl pathogener Keime aktiv. In erster Linie haben sich Bisbenzamidine, Bisbenzimidazole sowie Carbazole, die alle positiv geladene Amidinium-Gruppen in ihrer Wirkform enthalten, zur Bekämpfung der *Pneumocystis carinii* Pneumonie (PCP) bewährt [Rahmathullah *et al.*, 1999]. Diese Infektion tritt vor allem als Folge eines durch AIDS geschwächten Immunsystems auf. Aufgrund der schlechten Resorption der bei physiologischem pH-Wert überwiegend protoniert vorliegenden Amidine nach oraler Gabe wird die Entwicklung oral verfügbarer Prodrugs von Amidinen angestrebt. Erst durch Biotransformation werden *in vivo* aus den Prodrugs die mikrobiell wirksamen Metaboliten gebildet (s. 1.4.).

Am Beispiel des Pentamidins konnte gezeigt werden, daß sich Amidoxime sehr gut als Prodrugs von Bisbenzamidinen eignen. Der Wirkstoff Pentamidin besitzt eine hohe Anti-PCP-Aktivität nach intravenöser Applikation, ist jedoch aufgrund mangelnder Resorption nach oraler Gabe nur sehr schwach wirksam. Das selbst inaktive Prodrug mit zwei Amidoxim-funktionen (Pentoxim) anstelle der Amidin-funktionen wird hingegen sehr gut resorbiert und *in vivo* rasch zum Pentamidin reduziert (Tab. 3-1), welches daraufhin seine hohe antimikrobielle Wirksamkeit entfalten kann [Clement *et al.*, 1992; Clement, 1993; Rieckert, 1999]. Die Lipophilie wurde dabei durch Veresterung der Amidoxim-funktion weiter erhöht.

Da Pentamidin jedoch mit zahlreichen Nebenwirkungen wie Hypotension, Hypoglykämie oder Arrhythmien belastet ist, wurde nach besser wirksamen Alternativen mit weniger Nebenwirkungspotential gesucht.

Zu diesem Zweck wurden im Arbeitskreis Tidwell weitere Bisbenzamidine und Bisbenzimidazole entwickelt, die zusätzlich Carbazol-, Dibenzofuran- oder Dibenzothiophenderivate darstellen [Boykin *et al.*, 1996; Hall *et al.*, 1998; Rahmathullah *et al.*, 1999; Patrick *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999]. Sie wurden auf ihre Wirksamkeit gegen den Erreger *Pneumocystis carinii* untersucht, zudem wurde ihre Toxizität überprüft. Auch auf diese wurde das für Pentoxim entwickelte prodrug-Prinzip übertragen.

Die untersuchten Bisbenzamidine, bei denen die Kettenlänge der Etherbrücke variiert wurde, zeigten *i.v.* alle eine gute, teilweise bessere Wirksamkeit gegen PCP als Pentamidin. Sie wurden jedoch, wie auch das Pentamidin selbst, aufgrund ihrer positiven Ladung bei oraler Gabe unzureichend resorbiert. Die zugehörigen Amidoxime zeigten sowohl *i.v.* als auch oral eine hohe Aktivität gegen PCP (Tab. 3-1), zudem besaßen sie eine geringere Toxizität als die Amidinanaloga. Für die ausreichende orale Resorption war die Oxidation beider kationischer Zentren zu den Amidoximen notwendig [Hall *et al.*, 1998]. Durch Veretherung der Amidoximgruppe zum O-Methyl-Derivat wurde die Lipophilie weiter erhöht [Boykin *et al.*, 1996]. Dieses Verfahren erscheint gegenüber der Veresterung jedoch nachteilig, da die Spaltung des Ethers oxidativ erfolgen muß und wahrscheinlich größeren Schwankungen unterliegen würde als die Hydrolyse des Esters. Die Oxidation des Ethers würde somit kaum umfassend ablaufen.

Das Einführen einer Amidfunktion in die Etherbrücke zwischen den Aromaten sowie die Verwendung eines Triazins anstelle des Ethers führte zu unwirksamen prodrugs. *In vivo* konnte sowohl oral als auch *i.v.* keine Anti-PCP-Aktivität dieser Verbindungen nachgewiesen werden [Hall *et al.*, 1998].

Bisbenzimidazol- sowie Carbazol-Derivate mit zwei Amidin-Funktionen besaßen ebenfalls eine sehr gute Wirksamkeit gegen *Pneumocystis carinii*. Vor allem die Carbazol-Derivate zeigten dabei eine bessere pharmakologische Aktivität sowie eine geringere Toxizität in Ratten verglichen mit Pentamidin. Die zur Verbesserung der oralen Verfügbarkeit eingesetzten Amidoxime waren erstaunlicherweise weder nach oraler noch nach intravenöser Gabe im Rattenmodell wirksam. Dabei konnten Studien mit Leberzellhomogenaten die Metabdisierung der prodrugs zu den entsprechenden Amidinen zeigen. Die Reduktion in intakten Zellsystemen mit Rattenhepatozyten war jedoch nicht zu detektieren (Tab. 3-1). Da eine

Biotransformation der Verbindungen nur innerhalb der Zellen erfolgen kann, wurde spekuliert, daß die mangelnde Wirksamkeit dieser Amidoxime auf unzureichender zellulärer Aufnahme basiert [Hall *et al.*, 1998]. Beim Vergleich der Bisbenzamide sowie Bisbenzimidazole und Carbazol-Derivate zeigte sich, daß alle inaktiven Amidoxime ein oder mehrere Stickstoffatome zwischen den beiden Amidoximfunktionen besaßen, während der Ethersauerstoff fehlte [Hallet *et al.*, 1998].

Eine Abwandlung der Carbazolbisamide durch Einführen eines Sauerstoffs anstelle eines Stickstoffatoms führte zu einer weiteren Wirkstoffgruppe mit hoher Aktivität gegen PCP. Das 2,8-Bisamidin des Dibenzofurans besitzt bei intravenöser Applikation eine gute Wirksamkeit, die ebenso wie bei den Carbazolen dem Pentamidin leicht überlegen ist. Das entsprechende 3,7-Derivat, bei der sich die Amidfunktion in *meta*-Stellung zum Sauerstoff des Furanrings befindet, ist inaktiv. Das dem 2,8-Bisamidin analoge Prodrug 2,8-Bisamidoxim des Dibenzofurans ist im Vergleich mit dem Amidin nur mäßig, jedoch noch ausreichend wirksam (Tab. 31). Auch hier wird entweder mangelnder Zelltransport oder eine geringere Aktivität des reduzierenden Enzymsystems diskutiert [Wanget *et al.*, 1999].

Der Austausch des Carbazol-Stickstoffs gegen einen Schwefel führt zu den ebenfalls gegen PCP wirksamen Dibenzothiophenen. Analog den Dibenzofuranderivaten zeigte das 2,8-Bisamidin des Dibenzothiophens eine sehr gute pharmakologische Aktivität. Das entsprechende Amidoxim-Derivat zeigte eine ebenso gute Wirksamkeit nach oraler Gabe (Tab. 3-1) und ist damit als Prodrug zur Verbesserung der oralen Verfügbarkeit hervorragend geeignet [Patrick *et al.*, 1999].

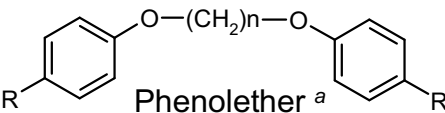
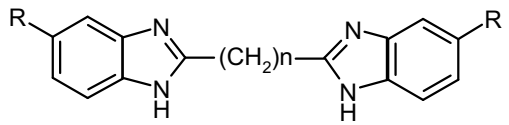
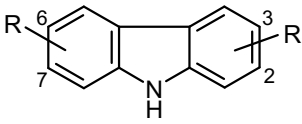
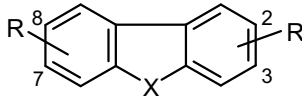
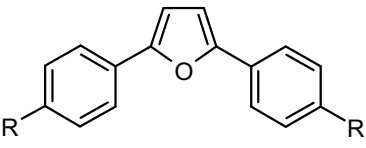
Auch das Amidoxim-Prodrug des ebenfalls gegen PCP wirksamen 2,5-bis (4-amidinophenyl) furans zeigte nach oraler Applikation die gewünschte Aktivität (Tab. 3-1) [Rahmathullah *et al.*, 1999].

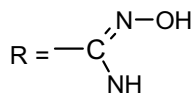
Sämtliche oben aufgeführten Amidoxime, die als Prodrugs verwendet wurden, sind in Tabelle 3-1 aufgeführt. Ebenso ist hier dargestellt, ob im Rattenmodell nach oraler Gabe pharmakologische Effekte auftraten oder nicht.

Es wurden folglich zahlreiche oral verfügbare Arzneimittel gegen PCP-Erkrankungen entwickelt, die alle eine Amidoximfunktion besitzen. Nur bei den Verbindungen mit einem Stickstoff zwischen den beiden kationischen Zentren war keine Aktivität gegen PCP festzustellen. Ob hier eine mangelnde Biotransformation zum Wirkstoff, die verminderte zelluläre Aufnahme der Substanz oder andere Effekte, die die Wirksamkeit verhindern, vorliegen, konnte bisher nicht geklärt werden. Für die Arzneistoffentwicklung ist es aus diesem Grund von besonderem Interesse, die Reduktion von Benzamidoximen zu den entsprechenden Benzamidinen näher zu untersuchen und herauszufinden, welchen Einfluß Substituenten des aromatischen Rings auf die Reduktion haben. Zudem können Studien über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen Auskunft darüber geben, welche Substituenten bei der Entwicklung neuer Prodrugs von vornherein auszuschließen wären oder welche die Bioaktivierung fördern könnten.

Außer bei dem Diamidoxim des Pentamidins und den zugehörigen Estern [Clement *et al.*, 1992; Clement, 1993] ist allerdings bei den anderen in Tabelle 31 wiedergegebenen Diamidoximen, die in weiterem Sinne alle Derivate des Pentamidins darstellen, nur der pharmakologische Effekt im Rattenmodell getestet worden. Die tatsächliche Reduktion wurde für diese Derivate jedoch nicht durch Bestimmung von Serum- oder Plasmakonzentrationen geprüft. Als weitere Problematik kommt hinzu, daß sich bei *in vitro*-Untersuchungen oft Enzymquellen aus der Ratte als weniger aussagekräftig für die Situation im Menschen erwiesen haben als z.B. aus dem Schwein [Schmitt, 1991].

Tab. 3-1. Getestete Amidoxime als Prodrugs für Amidine und pharmakologische Aktivität gegen *Pneumocystis carinii* Pneumonie.

Verbindung	Wirksamkeit gegen PCP	Reduktion	
		<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
 Phenoether ^a	+	?	+
n=5, Pentoxim ^b	+	+	+
 Benzimidazole ^c	-	?	-1/+2
 Carbazole ^d	-	?	-1/+2
 X = O, Dibenzofurane ^e	(+)	?	?
X = S, Dibenzothiophene ^f	+	?	?
 Diphenylfurane ^g	+	?	?


¹, Test mit intakten Zellkulturen (Rattenmodell)

², Test mit Leberzellhomogenaten (Rattenmodell)

^{a,c,d} Hall *et al.*, 1998

^b Clement *et al.*, 1992; Rieckert, 1999

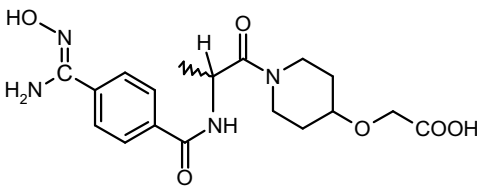
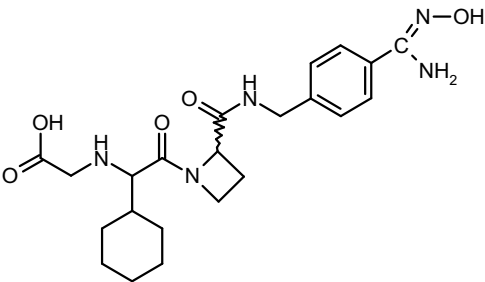
^e Wang *et al.*, 1999

^f Patrick *et al.*, 1999

^g Rahmathullah *et al.*, 1999

Das prodrug-Prinzip Amidoxime anstelle von Amidinen beschränkt sich jedoch nicht nur auf Arzneistoffe mit Wirksamkeit gegen PCP. Weitere Amidoxime mit Wirkung auf die Blutgerinnung wurden entwickelt. Deren pharmakologische Aktivität sowie Metabolisierung sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

Tab. 3-2. Weitere Amidoxime als Prodrugs für Amidine und deren pharmakologische Aktivität.

Verbindung	Pharmakologische Aktivität	Reduktion	
		<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
 <p>RO 48-3656 ^a (Amidoxim-Säure des Sibrafiban)</p>	+	+	+
 <p>H415/04 ^b (Amidoxim-Säure des Melagatran)</p>	+	+	+

^a Wittke *et al.*, 1999

^b Eriksson *et al.*, 1999

Für das prodrug des Thrombozytenaggregationshemmers Ximelagatran und für das Amidoxim des Sibrafibans, ein Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonist, konnte die Reduktion zur Wirkform sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden [Eriksson *et al.*, 1999; Wittke *et al.*, 1999]. Klinische Studien der Phase III zeigten für das Sibrafiban [Wittke *et al.*, 1999] eine umfassende Reduktion im Menschen, keine

signifikanten interindividuellen Schwankungen in der Bioverfügbarkeit und keine Zeichen von Toxizität.

3.1.2. Stand der Vorarbeiten und Zielsetzung

Erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zur Inhibition von humanen Serinproteasen durch Benzamide wurden bereits 1978 durchgeführt [Andrews *et al.*, 1978]. Hierbei wurden elektronische, lipophile sowie sterische Effekte verschiedener *meta*- und *para*-substituierter Benzamide auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Proteinspaltenden Enzyme Plasmin, Thrombin sowie Trypsin zu hemmen. Die Korrelation der experimentell bestimmten $\log 1/K_i$ Werte der verschiedenen Proteasen mit den oben genannten physikalischen Parametern ergab eine Abhängigkeit der Inhibitorpotenz von der Lipophilie der verschiedenen Benzamide für das Thrombin. Ebenso beeinflusste die Lipophilie die Hemmung von Plasmin. Zusätzlich war hier jedoch noch ein schwach positiver Effekt von elektronenschiebenden Substituenten zu erkennen. Trypsin besaß eine etwas komplexere Interaktion mit den Benzamiden. Kleine Molekulargewichte sowie eine höhere Molrefraktion (Polarisierbarkeit) förderten die Bindung der Inhibitoren [Andrews *et al.*, 1978]. Weitere QSAR-Analysen zur Hemmung von Trypsin durch verschieden substituierte Benzamide wurden durchgeführt und von Racanati *et al.* [1985] zusammengefaßt. Im Gegensatz zu Andrews *et al.* zeigte die erste Studie einen positiven Effekt elektronenschiebender Substituenten auf die Inhibitorpotenz. Eine weitere Untersuchung ergab wiederum nur einen geringen elektronischen Effekt, dafür aber eine hohe Korrelation der Hemmung mit der Lipophilie der Substrate [Racanati *et al.*, 1985].

Aber nicht nur die Inhibitorpotenz der Benzamide in Abhängigkeit von den Substituenten wurde untersucht. Eine Studie zur enzymatischen *N*-Hydroxylierung von Benzamiden zu den entsprechenden Benzamidoximen wurde im Arbeitskreis Clement von Zimmermann durchgeführt. Hierbei wurde der Einfluß von Substituenten in *para*-Stellung zur Amidfunktion auf die Oxidation dieser Verbindungen durch ein mikrosomales Enzymsystem untersucht. Das verantwortliche Enzymsystem wurde später als Cytochrom P450 identifiziert

[Clement *et al.*, 1993b]. Um Hinweise auf mögliche Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu erhalten, wurden zunächst die Maximalgeschwindigkeiten (v_{\max}) der Umsetzung der verschiedenen Benzamide durch Mikrosomen ermittelt (Abb. 31).

Es wurden ausschließlich *para*-substituierte Verbindungen für die Studie verwendet, um sterische Einflüsse des Substituenten zu vermeiden. Zudem sollte die räumliche Beanspruchung der Substrate ähnlich sein, um Unterschiede bei der Annäherung an das Enzym möglichst klein zu halten. Hauptsächlich unterschieden sich die Substituenten in ihren elektronischen Effekten auf die Benzamide. Als elektronenschiebende Gruppen wurden *p*-Methyl und *p*-Methoxy verwendet, als elektronenziehende *p*-Brom, *p*-Chlor, *p*-Cyano sowie *p*-Nitro. Die Abhängigkeit der experimentell ermittelten Maximalgeschwindigkeiten von der Hammett-Konstanten σ wurde überprüft, wobei sich eine Korrelation dieses physikalischen Parameters mit den logarithmierten v_{\max} -Werten ergab. Hierdurch konnte die Gültigkeit der Hammett-Gleichung für die *N*-Oxygenierung *para*-substituierter Benzamide belegt werden. Folglich konnte gezeigt werden, daß diese Umsetzung im wesentlichen von elektronischen Einflüssen abhängig ist. Eine negative Reaktionskonstante ρ zeigte an, daß die Reaktion durch Elektronendonatoren erleichtert wurde, während Elektronenakzeptoren diese erschwerten. Eine weitere Korrelationsanalyse mit der Hansch'schen π -Konstanten ergab jedoch keine Abhängigkeit der *N*-Hydroxylierung von der Lipophilie der Benzamide [Clement und Zimmermann, 1988].

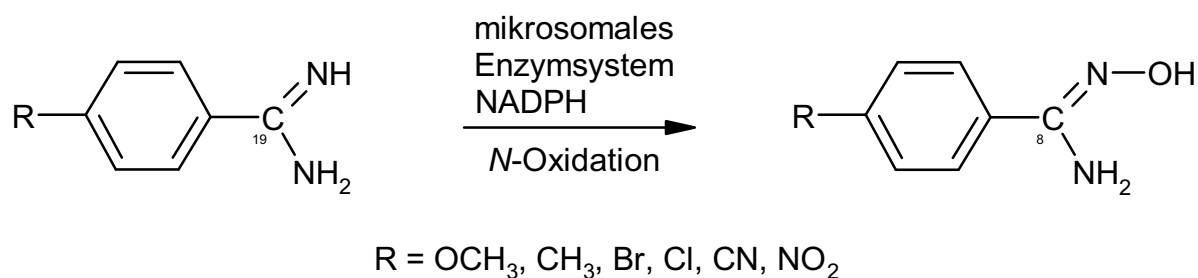
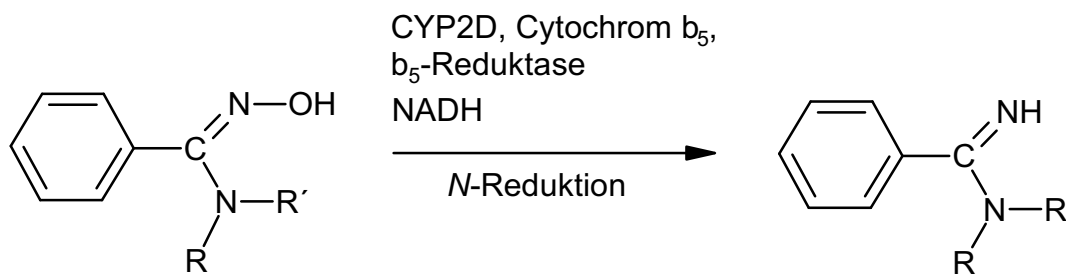


Abb. 3-1. *N*-Hydroxylierung unterschiedlich substituierter Benzamide durch ein mikrosomales Enzymsystem [Clement und Zimmermann, 1988].

Gao und Hansch werteten weiter aus und fanden für die von Zimmermann untersuchte *N*-Oxidation *para*-substituierter Benzamide eine Korrelation der

$\log 1/K_m$ -Werte sowohl mit der Lipophilie als auch mit elektronischen Effekten. Letztere besaßen auf die Michaelis-Menten-Konstante jedoch genau den gegenteiligen Effekt wie auf die Maximalgeschwindigkeiten: elektronenschiebende Substituenten beeinflussten die Bindung der Benzamide am metabolisierenden Enzym negativ. Da sich in der Gesamtgleichung die elektronischen Effekte für die Substratbindung und die Umsetzungsgeschwindigkeit gegenseitig auslöschen, korreliert die katalytische Effizienz lediglich mit der Lipophilie der Benzamide [Gao und Hansch, 1996].

Zahlreiche Untersuchungen zur *N*-Hydroxylierung von Benzamiden sind durchgeführt worden, wobei sich eine Abhängigkeit enzymkinetischer Parameter von den physikalischen Eigenschaften ihrer Substituenten zeigte. Aufgrund der hohen toxikologischen und pharmakologischen Relevanz der Benzamidoxime als Prodrugs wäre es von großer Bedeutung, auch für diese Reduktion mögliche Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu finden. Somit könnten beispielsweise Benzamidoxime mit Substituenten, die einen ungünstigen Einfluß auf die Aktivierung des Prodrugs besitzen, von vornherein von der Arzneistoffentwicklung ausgeschlossen werden. Möller untersuchte in einer vorangegangenen Arbeit erste Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für die Reduktion *N*-substituierter Benzamidoxime durch ein mikrosomales Enzymsystem aus CYP2D, Cytochrom b_5 und b_5 -Reduktase (Abb 3-2) [Möller, 1997].



R =	R' =	Benzamidoxim-Derivat
H	CH ₃	<i>N</i> -Methyl-Derivat
CH ₃	CH ₃	<i>N,N</i> -Dimethyl-Derivat
H	Phenyl	<i>N</i> -Phenyl-Derivat
Piperazin		Piperidin-Derivat

Abb. 3-2. Reduktion *N*-substituierter Benzamidoxime zu den *N*-substituierten Benzamidinen durch ein mikrosomales Enzymsystem.

N,N-Dimethyl- sowie *N*-Methylbenzamidoxim konnten durch das mikrosomale Enzymsystem reduziert werden. Die Einführung der Methylgruppe(n) zeigte hier einen positiven Effekt auf die Umsetzung. Die Reduktion des Piperazin-Derivates erfolgte hingegen nur sehr schwach, während sich die Bildung des *N*-Phenylbenzamidins überhaupt nicht nachweisen ließ. Der Grund hierfür wird in der Größe der Substituenten gesehen, durch die es zu einer sterischen Hinderung der Enzymsbindung kommen könnte. Hinzu kommt die geringe Basizität und große Lipophilie der *N*-Phenyl-derivate.

Die von Möller durchgeführte Studie lieferte erste Hinweise zur Abhängigkeit der Benzamidoxim-Reduktion von dessen Substituenten. Eine QSAR-Analyse der *N*-Reduktion unter Berücksichtigung von Substituenten in *para*-Stellung der Amidoxim-Funktion ist bisher jedoch noch nicht beschrieben worden. Zahlreiche Prodrugs mit einer Benzamidoxim-Struktur sind ebenfalls am aromatischen Ringsystem substituiert. Aufgrund der pharmakologischen Bedeutung der Bioaktivierung dieser Prodrugs zu den Benzamidinen soll in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob eine Korrelation von Maximalgeschwindigkeiten oder Michaelis-Menten-Konstanten der Reduktion mit physikalischen Parametern verschieden

substituierter Benzamidoxime möglich ist. Hierbei sollen die gleichen *para*-substituierten Verbindungen wie bei Zimmermann [Clement und Zimmermann, 1988] verwendet werden (Abb. 3-3).

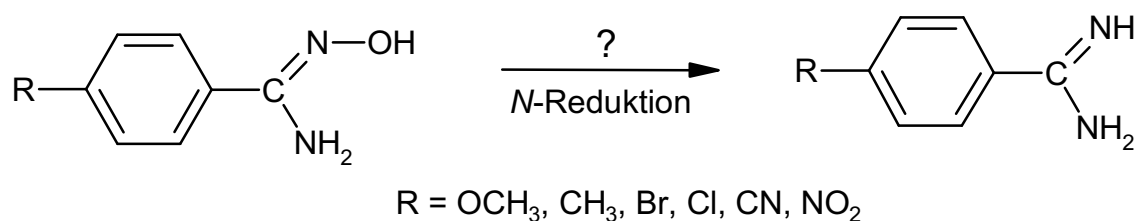


Abb. 3-3. Untersuchung des Einflusses der Substituenten auf die Reduktion verschiedener *para*-substituierter Benzamidoxime.

Zunächst soll eine Charakterisierung der *N*-Reduktion der einzelnen *para*-substituierten Benzamidoxime durchgeführt werden, um die Inkubationsbedingungen der Reduktion zu optimieren. Dabei sollen sowohl der pH-Wert als auch die Substrat- und Cosubstratkonzentration sowie die Inkubationszeit ermittelt werden, unter denen die Verbindungen am stärksten umgesetzt werden.

Anschließend soll die Bestimmung enzymkinetischer Parameter wie Maximalgeschwindigkeit, Michaelis-Menten-Konstante und der katalytischen Effizienz für die Reduktion der Benzamidoxime sowohl in Schweinelebermikrosomen als auch im rekonstituierten Enzymsystem aus CYP2D, Cytochrom *b*₅ und *b*₅-Reduktase erfolgen. Diese sollen dann mit den elektronischen und lipophilen Eigenschaften der einzelnen Benzamidoxime in Abhängigkeit vom Substituenten in *para*-Stellung korreliert werden, um gegebenenfalls eine Beziehung zwischen der biologischen Aktivität und physikalischen Parametern der Substrate aufzuzeigen.

Schließlich soll nicht nur der Einfluß von *para*-Substituenten auf die *N*-Reduktion von Benzamidoximen geprüft werden. Entsprechend *meta*-substituierte Derivate sollen ebenfalls durch das gleiche reduktive Enzymsystem umgesetzt werden, um auch mögliche sterische Einflüsse von *meta*-Substituenten diskutieren zu können.

3.2. Methoden

3.2.1. Gewinnung der Enzymquellen

3.2.1.1. Herstellung von Schweinelebermikrosomen

Die Schweinelebern wurden vom Schlachthof Wellsee oder von der Schlachtereier Horn in Flintbek zur Verfügung gestellt. Die frisch entnommenen Lebern wurden in eisgekühltem 20 mM Phosphatpuffer pH 7.4, der zusätzlich noch 1 mM Na₂EDTA sowie 250 mM Sucrose enthielt, transportiert. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wurden die Leberlappen mit 50 mM Phosphatpuffer pH 7.4 (mit 1 mM Na₂EDTA) gründlich perfundiert, dann klein geschnitten, mehrfach mit dem gleichen Puffer gewaschen und anschließend durch einen Fleischwolf gegeben. Schließlich wurden die Gewebestücke mit einem 20 mM Phosphatpuffer pH 7.4 (+250 mM Sucrose) etwa 1:1 verdünnt und mittels eines Durchflußhomogenisators homogenisiert. Die Herstellung der Mikrosomen aus Schweineleberhomogenat erfolgte dann durch differentielle Ultrazentrifugation wie bereits bei Clement *et al.* [1996] für die Gewinnung von Mikrosomen aus Kaninchen und Schwein beschrieben.

3.2.1.2. Isolierung der einzelnen Komponenten des rekonstituierten Systems aus dem Schwein

3.2.1.2.1. Reinigung der Benzamidoxim-Reduktase und Cytochrom b₅

Die Benzamidoxim-Reduktase wurde mittels präparativer HPLC nach dem von Möller [Möller, 1997] entwickelten Verfahren isoliert. Ebenso wurde für die Reinigung von Cytochrom b₅ aus Schweineleber die Methode von Möller verwendet [1997]. Der Cytochrom P450-Gehalt wurde durch Aufnahme eines CO-Differenzspektrums nach der Methode von Omura und Sato [1964] ermittelt.

Die Gehaltsbestimmung von Cytochrom b_5 erfolgte nach dem von Estabrook und Werringloer [1978] beschriebenen Verfahren anhand eines Differenzspektrums von reduzierter und oxidiertes Form des Cytochrom b_5 .

Die Proteinkonzentrationen wurden durch die BCA-Methode nach Smith *et al.* [1985] bestimmt.

3.2.1.2.2. Reinigung der Cytochrom b_5 -Reduktase

Die Reinigung der NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase erfolgte in Anlehnung an die von Möller [1997] entwickelte Methode mit kleinen Veränderungen.

Nach Solubilisation von Schweinelebermikrosomen wurde zunächst eine Hydrophobe Interaktionschromatographie an Octyl-Sepharose CL 4B durchgeführt. Die Cytochrom b_5 -Reduktase-haltigen Fraktionen wurden mittels einer präparativen HPLC an Fractogel[®] EMD TMAE 650 (S) von der Benzamidoxim-Reduktase abgetrennt. Zur weiteren Aufreinigung erfolgte eine Bioaffinitätschromatographie an 5'-AMP-Sepharose[®], die durch einige Modifikationen weiter optimiert werden konnte.

Es wurde eine doppelt so große 5'-AMP-Sepharose[®]-Säule wie bei Möller für die Reinigung der b_5 -Reduktase verwendet (3 x 6 cm statt 3 x 3 cm). Die Säule wurde mit einem 10 mM Phosphatpuffer pH 7.4, dem 0.1 mM Na_2EDTA , 0.1 mM Dithiothreitol, 20 % (v/v) Glycerol sowie 0.02 % (v/v) Triton X-100 zugesetzt wurden, equilibriert. Nach Auftragen der Enzympräparation auf die Säule wurde diese mit dem gleichen Puffer gründlich gespült. Anschließend wurde die an der Säule gebundene b_5 -Reduktase mit einem 100 mM Phosphatpuffer pH 7.4 eluiert, dem neben 0.1 mM Na_2EDTA , 0.1 mM Dithiothreitol, 20 % (v/v) Glycerol sowie 0.02 % (v/v) Triton X-100 noch eine 0.5 mM Konzentration an NADH beigefügt wurde. Sämtliche mit NADH eluierten Fraktionen wurden vereinigt und durch Filtration mittels Zentrifuge (Ausschlußgröße 10000 Da) einkonzentriert. Das Detergenz wurde durch das Adsorptionsmaterial Calbiosorb[®] entfernt. Es erfolgte der Austausch des Puffers gegen einen 10 mM Phosphatpuffer pH 7.4 (20 % (v/v) Glycerol) mit Hilfe von NAP 25 Säulen.

Die Bestimmung der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase-Aktivität erfolgte schließlich in Anlehnung an das von Mihara und Sato [1978] beschriebene Verfahren durch spektralphotometrische Verfolgung der Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat (III) bei 420 nm.

3.2.2. Synthese der *para*- und *meta*-substituierten Benzamidoxime und Benzamidine

Alle verwendeten Benzamidoxime und Benzamidine (Benzamidin wurde käuflich erworben) waren literaturbekannt und lagen im Arbeitskreis vor oder wurden von Frau König unter Anleitung von Dr. Girreser synthetisiert. Hierbei wurden folgende Literaturstellen zugrunde gelegt:

Benzamidoxim	[Tiemann, 1884; Krüger, 1885]
p-Methylbenzamidoxim	[Tiemann, 1884; Schubart, 1886]
p-Methoxybenzamidoxim	[Tiemann, 1884; Miller, 1889]
p-Chlor-, p-Brom-, p-Cyano, m-Methyl-, m-Nitrobenzamidoxim	[Tiemann, 1884; Stephenson <i>et al.</i> , 1969]
p-Nitrobenzamidoxim	[Tiemann, 1884; Weise, 1889]
p-Methylbenzamidin	[Pinner, 1883; Glock, 1888]
p-Chlor-, p-Brom-, m-Methyl-, m-Nitrobenzamidin	[Pinner, 1883; Moss <i>et al.</i> , 1985]
p-Methoxybenzamidin	[Pinner, 1883; Tafel und Enoch, 1888]
p-Nitrobenzamidin	[Pinner, 1883; Pinner und Gradenwitz, 1897]
p-Cyanobenzamidin	[Sandmeyer, 1884; Zimmermann, 1987]

Alle Verbindungen wurden auf üblichem Wege charakterisiert (Schmelzpunkt, IR, NMR, MS) und stimmten in allen Daten mit denen von Literatur-Werten überein. Zusätzlich wurden die ^{15}N - und ^{13}C -NMR-Daten vermessen [Girreser *et al.*, 2002].

3.2.3. Charakterisierung der Reduktion von *para*-substituierten Benzamidoximen

3.2.3.1. HPLC-Analytik

Für jedes Substrat wurde eine eigene HPLC-Analytik entwickelt. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Substrate konnten für die einzelnen *para*-substituierten Benzamidoxime ähnliche Fließmittelsysteme verwendet werden. In allen Fällen wurde eine Ionenaenchromatographie durchgeführt.

HPLC-System für unsubstituiertes Benzamidoxim:

HPLC-Pumpe:	Binäre Pumpe Serie 1100, <i>Agilent, Waldbronn, Deutschland</i>
Detektor:	Diodenarray-Detektor Serie 1100, <i>Agilent, Waldbronn, Deutschland</i>
Autosampler:	Serie 1100, <i>Agilent, Waldbronn, Deutschland</i>
Integrator:	Hewlett Packard (HP) Chemstation A.07.01 <i>Agilent, Waldbronn, Deutschland</i>
Stationäre Phase:	LiChrospher® RP select B-Säule (5µm) 250 x 4 mm (Fa. Merck) Vorsäule RP-Select B (5µm) 4 x 4 mm (Fa. Merck)
Mobile Phase:	3 mM Octylsulfonat pH 2.5/Acetonitril 88:12 (v/v)
Laufzeit:	35 min
Detektion:	UV, 229 nm
Flußrate:	1 ml / min
Injektionsvolumen:	10 µl
Retentionszeiten:	Benzamidoxim = 21.6 ± 0.1 min Benzamidin = 25.2 ± 0.2 min

Nachdem der pH-Wert der mobilen Phase mit Phosphorsäure auf pH 2.5 eingestellt wurde, wurde der Eluent durch einen Sartorius-Membranfilter (0.45 µm) filtriert und im Ultraschallbad 15 min lang entgast.

Die Quantifizierung des Metaboliten erfolgte über eine 8-Punkt-Kalibrierung mit Konzentrationswerten zwischen 0.1 und 50 µM. Hierzu wurde Benzamidin im Fließmittel gelöst und mittels HPLC vermessen. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden die gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung verwendet. Benzamidin wurde in 100 mM Phosphatpuffer pH 6 gelöst. Den Inkubationsansätzen wurden weiterhin 300 µg denaturierte Mikrosomen sowie 0.5 mM Benzamidoxim zugefügt. Diese wurden dann 33 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert, mit 300 µl Methanol abgestoppt und nach Zentrifugation bei 10000 U/min anschließend mittels HPLC quantifiziert. Die Wiederfindungsrate betrug 98 %.

HPLC-System für alle *para*-substituierten Benzamidoxime:

HPLC-Pumpe:	Gradientenpumpe W510 mit Systemcontroller <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Detektor:	W486 Tunable Absorbance Detector, <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Autosampler:	W710 WISP, <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Integrator:	Maxima [®] -Software 820, Version 3.30, <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Stationäre Phase:	LiChrospher [®] RP select B-Säule (5µm) 250 x 4 mm (Fa. Merck) Vorsäule RP-Select B (5µm) 4 x 4 mm (Fa. Merck)
Detektion:	UV, 215 nm
Flußrate:	1 ml / min
Injektionsvolumen:	10 µl

Auflistung der mobilen Phasen:

p-Nitrobenzamidoxim	85 % 3 mM Octylsulfonat pH 3, 15 % Acetonitril isokratisch über 32 min $R_{t\text{ BAO}} = 20.3 \pm 0.2$ min, $R_{t\text{ BA}} = 23.0 \pm 0.2$
p-Methoxybenzamidoxim	86 % 3 mM Octylsulfonat pH 3, 14 % Acetonitril isokratisch über 45 min $R_{t\text{ BAO}} = 31.7 \pm 0.1$ min, $R_{t\text{ BA}} = 38.1 \pm 0.3$
p-Methylbenzamidoxim	86 % 3 mM Heptylsulfonat pH 3, 14 % Acetonitril isokratisch über 35 min $R_{t\text{ BAO}} = 25.6 \pm 0.2$ min, $R_{t\text{ BA}} = 30.1 \pm 0.4$
p-Brombenzamidoxim	85 % 3 mM Heptylsulfonat pH 3, 15 % Acetonitril isokratisch über 45 min $R_{t\text{ BAO}} = 29.6 \pm 0.3$ min, $R_{t\text{ BA}} = 34.1 \pm 0.3$
p-Chlorbenzamidoxim	87 % 3 mM Heptylsulfonat pH 3, 13 % Acetonitril isokratisch über 42 min $R_{t\text{ BAO}} = 33.0 \pm 0.4$ min, $R_{t\text{ BA}} = 38.5 \pm 0.5$
p-Cyanobenzamidoxim	Gradient: A: 90 % 3 mM Heptylsulfonat pH 3, 10 % Acetonitril B: 100 % Acetonitril 0-24 min: 100 % A 24 min: 100 % A 29 min: 70 % A, 30 % B 34 min: 100 % A 34-50 min: 100 % A $R_{t\text{ BAO}} = 18.3 \pm 0.2$ min, $R_{t\text{ BA}} = 22.7 \pm 0.2$

$R_{t\text{ BAO}}$ = Retentionszeit des *para*-substituierten Benzamidoxims

$R_{t\text{ BA}}$ = Retentionszeit des *para*-substituierten Benzamidins

Alle *para*-substituierten Benzamidoxime sowie die entsprechenden Benzamidine konnten isokratisch vermessen werden. Da das p-Cyanobenzamidoxim trotz

Aufarbeitung jedoch noch eine geringe Menge an Restverunreinigung enthielt, wurde hierfür ein Gradient gewählt.

Nach Einstellen des pH-Wertes des Eluenten auf pH 2.5 mit Phosphorsäure wurde das Fließmittel filtriert (Sartorius-Filter, 0.45 μm) und anschließend 15 min im Ultraschallbad entgast.

Die Quantifizierung des Metaboliten erfolgte jeweils über eine 7Punkt-Kalibrierung mit Konzentrationswerten des jeweiligen Benzamidins zwischen 2.5 und 100 μM . Hierzu wurde das entsprechende Benzamidin im Fließmittel gelöst und mittels HPLC vermessen. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden die gleichen Konzentrationen wie für die Kalibrierung verwendet. Das Benzamidin wurde in 100 mM Phosphatpuffer pH 6 gelöst und jeweils einem Inkubationsansatz mit 300 μg denaturierten Mikrosomen und 0.5 mM des entsprechenden Substrats zugefügt. Die Inkubation erfolgte 33 min bei 37 °C. Mit 300 μl Methanol wurde abgestoppt und der zentrifugierte Ansatz anschließend mittels HPLC quantifiziert. Es wurden Wiederfindungsraten zwischen 98 und 110 % ermittelt.

3.2.3.2. Reduktion der Benzamidoxime in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration

Die gesamten unter 3.2.3.2.-3.2.3.6. beschriebenen Abhängigkeiten wurden mit Schweinelebermikrosomen durchgeführt. Es wurden Inkubationsansätze, die 0.5 mM *para*-substituiertes Benzamidoxim in 100 mM Phosphatpuffer pH6 enthielten, mit steigenden Mengen an mikrosomalem Protein versetzt und 3 min bei 37°C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Dabei wurden jeweils Konzentrationen von 100, 200, 300, 400, 500 und 600 μg Protein je Ansatz verwendet. Die Reduktion wurde durch Zugabe von 1 mM NADH bis zu einem Endvolumen von 300 μl gestartet und nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C mit dem gleichen Volumen an Methanol abgestoppt. Nach Zentrifugation der Ansätze wurden diese mittels HPLC wie unter 3.2.3.1. beschrieben quantifiziert. Die Proteinmenge, die zum einen ausreichende Signalflächen lieferte und zum anderen im linearen Meßbereich lag, wurde für nachfolgende Testungen verwendet.

3.2.3.3. Reduktion der Benzamidoxime in Abhängigkeit von der Cosubstratkonzentration

Inkubationsansätze, bestehend aus 100 mM Phosphatpuffer pH 6, 0.5mM *para*-substituiertem Benzamidoxim und 300 µg mikrosomalem Protein, wurden 3min bei 37 °C vorinkubiert. Die Reduktion wurde durch Zugabe von jeweils 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 und 1.5 mM NADH zu den Reaktionsansätzen gestartet und 30 min bei 37°C im Schüttelwasserbad aufrechterhalten. Das Endvolumen dieser Inkubationsansätze betrug ebenfalls 300 µl. Nach Abstoppen mit der gleichen Menge an Methanol und Zentrifugation wurde mittels HPLC (3.2.3.1.) quantifiziert. Es wurde diejenige NADH Konzentration für die nachfolgenden Umsetzungen verwendet, bei der sich die Umsetzungsrate durch einen weiteren Zusatz an Cosubstrat nicht mehr steigern ließ.

3.2.3.4. Reduktion der Benzamidoxime in Abhängigkeit von der Zeit

Die Inkubationen wurden mit 0.5 mM an entsprechendem Benzamidoxim und 300 µg mikrosomalem Protein in 100 mM Phosphatpuffer pH 6 durchgeführt. Einer 3-minütigen Vorinkubation bei 37 °C folgte durch Zugabe von 1mM NADH das Starten der Reaktion. Diese wurde nach 0, 5, 10, 20, 30, 40 und 60min bei ebenfalls 37 °C im Schüttelwasserbad durch Zugabe der gleichen Menge Methanol wie im Inkubationsansatz beendet. Die entstandene Menge an Metabolit wurde nach Zentrifugieren der Ansätze mittels HPLC (3.2.3.1.) quantifiziert. Es wurde wieder die Inkubationszeit für nachfolgende Umsetzungen ausgewählt, bei der zum einen eine ausreichende Menge an Metabolit entstanden war, zum anderen die Reaktion jedoch noch linear von der Zeit abhängig war.

3.2.3.5. Reduktion der Benzamidoxime in Abhängigkeit vom pH-Wert

Es wurden Inkubationen mit 0.5 mM entsprechendem Benzamidoxim und 300 µg mikrosomalem Protein in 100 mM Phosphatpuffer pH 5, 5.5, 6, 6.3, 6.5, 7, 7.5 und 8 durchgeführt. Nach 3-minütiger Vorinkubation bei 37 °C wurde nach Zugabe von

1 mM NADH bis zum Endvolumen von 300 µl 30 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde mit 300 µl Methanol abgestoppt. Nach Zentrifugation wurden die Ansätze mit Hilfe der vorher beschriebenen HPLGAnalytik quantifiziert (3.2.3.1.). Der pH-Wert, bei dem die höchsten Umsetzungsraten ermittelt wurden, wurde für die weiteren Inkubationen verwendet.

3.2.3.6. Reduktion der Benzamidoxime in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Einem 100 mM Phosphatpuffer pH 6, der bereits 300 µg mikrosomales Protein enthielt, wurden steigende Mengen an dem jeweiligen Benzamidoxim zugesetzt: 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 und 2 mM. Nach einer Vorinkubationszeit von 3 min bei 37 °C wurde die Reaktion wieder durch Zugabe von 1 mM NADH bis zu einem Endvolumen von 300 µl gestartet und 30 min ebenfalls bei 37°C im Schüttelwasserbad aufrechterhalten. Nach Beenden der Umsetzung mit gleichem Volumen an Methanol, wurden die Ansätze bei 10000U/min zentrifugiert und mittels HPLC (3.2.3.1.) analysiert. Wieder wurde die Konzentration ermittelt, bei der dem Enzym bis zum Abstoppen der Reaktion genügend Substrat für die Reduktion zur Verfügung stand.

3.2.3.7. Reduktion der Benzamidoxime unter optimierten Bedingungen

Die Umsetzungsraten der *para*-substituierten Benzamidoxime in Schweinelebermikrosomen wurden unter optimierten Bedingungen ermittelt. Dafür wurden die unter 3.2.3.2.-3.2.3.6. ermittelten Konzentrationen, Zeiten und pH-Werte für die Inkubation verwendet. So wurde für alle *para*-substituierten Benzamidoxime eine Umsetzung in 300 µl eines 100 mM Phosphatpuffers pH 6 durchgeführt. Zusammen mit 0.5 mM des jeweiligen Substrates und 300 µg mikrosomalem Protein wurde 3 min bei 37 °C vorinkubiert und nach Zugabe von 1 mM NADH die Reaktion gestartet. Nach 30 minütiger Inkubation bei ebenfalls 37 °C wurden die Ansätze durch Zupipettieren

von Methanol abgestoppt, zentrifugiert und schließlich chromatographisch analysiert (3.2.2.1).

Zusätzlich wurde die Reduktion der *para*-substituierten Benzamidoxime mit dem Cosubstrat NADPH anstelle von NADH geprüft. Außerdem wurden Kontrollinkubationen unter den hier beschriebenen Bedingungen in Abwesenheit von mikrosomalem Protein, von Substrat oder von Cosubstrat durchgeführt.

3.2.4. Bestimmung von enzymkinetischen Parametern

Zur Ermittlung der maximal möglichen Umsetzungsraten v_{\max} und der Michaelis-Menten-Konstante K_m der einzelnen *para*-substituierten Benzamidoxime wurde die Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration, wie bereits unter 3.2.3.6. beschrieben, bestimmt. Es wurden dem entsprechende Inkubationen mit drei verschiedenen Chargen an Schweinelebermikrosomen durchgeführt, um natürliche Schwankungen im biologischen Material auszuschließen. Es wurden jedoch auch Umsetzungen mit einem gereinigten Enzymsystem aus dem Schwein analog hierzu durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 5 μg isolierte Benzamidoxim-Reduktase, 0.35 U NADH-Cytochrom b_5 Reduktase sowie 75 pmol Cytochrom b_5 zusammen mit 40 μM DLPC in 100 mM Phosphatpuffer pH 6 gelöst. Steigende Mengen an entsprechendem Benzamidoxim wurden dem Ansatz zugefügt. Dabei wurden für jedes Substrat mindestens 6 verschiedene Konzentrationen im Bereich von 0.05 bis 4 mM Substrat ausgewählt. Nach 3 minütiger Vorinkubation und anschließender Zugabe von 1 mM NADH wurden die Reaktionsansätze bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Das Ansatzvolumen für die Umsetzung im rekonstituierten System betrug lediglich 150 μl und es wurde mit der gleichen Menge an Methanol abgestoppt. Die weitere Vorgehensweise entsprach der für die Testung mit Schweinelebermikrosomen verwendete.

Die maximale Umsetzungsrate sowie die Michaelis-Menten-Konstante für die einzelnen Substrate wurde durch hyperbole Regression ermittelt. Hieraus konnte schließlich die Katalytische Effizienz, der Quotient aus v_{\max} und K_m , abgeleitet werden.

3.2.5. Korrelation mit den Hammettschen σ_{para} -Konstanten

Der elektronische Einfluß des Substituenten in *para*-Stellung auf die Reduktase-Aktivität in Schweinelebermikrosomen sowie im rekonstituierten System des Schweins sollte überprüft werden. Es wurde versucht, die ermittelten maximalen Umsetzungsraten (3.2.3.6.) mit den aus der Literatur entnommenen σ_{para} -Konstanten [Gould, 1962] nach Hammett zu korrelieren. Hierzu wurden die logarithmierten v_{max} - und $1/K_m$ -Werte sowie die katalytische Effizienz der verschiedenen *para*-substituierten Benzamidoxime graphisch gegen die entsprechenden σ_{para} -Konstanten aufgetragen und eine lineare Regressionsgerade durch die einzelnen Meßpunkte gelegt.

3.2.6. Bestimmung der Lipophilie der Benzamidoxime und Benzamide

Eine indirekte Methode zur Bestimmung der Lipophiliekonstanten $\log P$ wurde gewählt. Hierfür wurde folgende HPLC-Analytik in Anlehnung an Kaup [1996] verwendet. Es wurden jeweils Verdünnungen der verschiedenen *para*-substituierten Benzamide und Benzamidoxime injiziert. In gleicher Weise wurden die $\log k'$ -Werte von Benzamid, *p*-Methylbenzamid und *p*-Ethylbenzamid bestimmt.

HPLC-Pumpe:	Waters 590 HPLC Pump, <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Detektor:	Waters 486, UV-Detektor, <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Integrator:	Waters 746 Data Moduls, <i>Waters, Milford, CT, USA</i>
Stationäre Phase:	Superspher [®] 60, RP select B-Säule 100 mm (Fa. Merck) Vorsäule RP-Select B (5 μ m) 4 x 4 mm (Fa. Merck)
Mobile Phase:	9.6 mM Phosphatpuffer pH 7.2, 140 mM NaCl, oktanol- gesättigt
Detektion:	UV, 215 nm
Flußrate:	0.3 ml / min
Injektionsvolumen:	20 μ l

3.2.7. Reduktion von *meta*-substituierten Benzamidoximen

3.2.7.1. Reduktion von *m*-Methylbenzamidoxim

Es wurde eine Inkubation mit *m*-Methylbenzamidoxim, wie unter 3.2.3.7. beschrieben, mit Schweinelebermikrosomen durchgeführt. Hierbei wurden ebenfalls jeweils Komplettansätze mit NADH oder NADPH verwendet. Zudem wurde das Entstehen des Metaboliten in Abwesenheit des Substrates, des Cosubstrates oder des mikrosomalen Proteins geprüft.

Wieder wurde das *m*-Methylbenzamidin mittels HPLC quantifiziert. Dabei wurde das gleiche chromatographische System verwendet, wie bereits für das *p*-Methylbenzamidoxim beschrieben (3.2.3.1.). Die Retentionszeit betrug für *m*-Methylbenzamidoxim 20.7 ± 0.1 min, für *m*-Methylbenzamidin 24.5 ± 0.1 min. Es wurde eine 7-Punkt-Kalibrierung im Bereich von 1 bis 100 μ M durchgeführt. Die Wiederfindungsrate betrug 127 %.

3.2.7.2. Reduktion von *m*-Nitrobenzamidoxim

Die Reduktion von *m*-Nitrobenzamidoxim in Schweinelebermikrosomen wurde ebenfalls wie unter 3.2.3.7. beschrieben geprüft. Das HPLC-System für die Quantifizierung des Metaboliten entsprach hierbei dem des für das *p*-Nitrobenzamidoxim verwendeten (3.2.3.1.). Lediglich das Fließmittel unterschied sich im Mischungsverhältnis der beiden Komponenten. Der Eluent setzte sich aus 86 % 3 mM Octylsulfonat pH 3 und 14 % Acetonitril zusammen. Die Laufzeit betrug 30 min, in denen das *m*-Nitrobenzamidoxim eine Retentionszeit von 21.4 ± 0.3 min besaß, während das *m*-Nitrobenzamidin nach 24.4 ± 0.1 min eluiert wurde. Auch hier wurde eine 7-Punkt-Kalibrierung im Bereich von 1 bis 100 μ M durchgeführt. Die Wiederfindungsrate betrug 132 %.

3.2.8. Umsetzung weiterer Substrate durch die Benzamidoxim-Reduktase (CYP2D)

3.2.8.1. Reduktion von RO 48-3656

Die Umsetzungen wurden, wie unter 2.2.1.3.8. für die humane Benzamidoxim-Reduktase (CYP2A6) beschrieben, durchgeführt. Im Gegensatz dazu wurden hierbei lediglich 5 µg der gereinigten P450-Fraktion eingesetzt.

3.2.8.2. 25-Hydroxylierung von 1 α -Hydroxyvitamin D₃

Die Inkubationen wurden, wie unter 2.2.2.2.5. beschrieben, sowohl mit 1 α -Hydroxyvitamin D₃ als auch mit Vitamin D₃ durchgeführt. Anstelle des humanen Enzymsystems wurde hierfür die gleiche Menge an Benzamidoxim-Reduktase aus dem Schwein verwendet.

3.2.8.3. Reduktion von Benzamidoxim durch die 1 α -Vitamin D₃-Hydroxylase

Die Reduktion von Benzamidoxim erfolgte analog dem unter 2.2.1.3.6. beschriebenen Verfahren für das humane rekonstituierte System. Hierbei wurden sowohl für die Benzamidoxim-Reduktase (CYP2D) aus dem Schwein als auch für die Hydroxylase 5 µg Protein für die Reduktion eingesetzt.

3.3. Ergebnisse

3.3.1. Gewinnung der Enzymquellen

Es wurden drei verschiedene Chargen Schweinelebermikrosomen mit Protein konzentrationen von 47.02, 64.20 und 70.14 mg/ml bei einem P450-Gehalt von 0.75, 0.46 und 0.53 nmol P450/min/mg Protein gewonnen, mit denen jeweils die Abhängigkeit der Umsatzrate von der Substratkonzentration untersucht wurde. Nur mit einer der Chargen wurden die weiteren Einflüsse von pH-Wert, (Co-)Substratkonzentration sowie der Inkubationszeit zur Ermittlung der optimalen Inkubationsbedingungen getestet.

Die drei für die Inkubation mit dem rekonstituierten System benötigten Komponenten wurden in ausreichender Reinheit aus Schweinelebermikrosomen gewonnen. Die Benzamidoxim-Reduktase wurde mit einem Proteingehalt von 2.51 mg/ml sowie einem spezifischen P450-Gehalt von 2.64 nmol/mg isoliert. An dieser Stelle möchte ich mich bei Silke Friedrich bedanken, die mir einen großen Teil der von ihr gereinigten Benzamidoxim-Reduktase zur Durchführung dieser Studie überlassen hat (Proteingehalt: 7.37 mg/ml, P450-Gehalt: 2.33 nmol/mg). Das Cytochrom b_5 wurde mir freundlicherweise von Rieckert und Behrens zur Verfügung gestellt (Gehalt: von 36.85 nmol/ml). Die NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase wurde mit einer Ferricyanid-Reduktase-Aktivität von 173 U/ml nach dem unter 3.2.1.2.2. modifizierten Verfahren gewonnen.

3.3.2. Synthese der *para*- und *meta*-substituierten Benzamidoxime und Benzamide

Die meisten der *para*-substituierten Benzamidoxime und Benzamide waren bereits im Arbeitskreis vorhanden. Diese wurden mittels 1H -NMR-Spektren auf ihre Identität sowie Reinheit überprüft. Fehlende oder stark verunreinigte Substrate und Metaboliten wurden freundlicherweise von Frau König unter Anleitung von Herrn Dr. Girreser nach literaturbekannter Vorschrift [Krüger, 1885; Stephenson *et al.*, 1969; Clement, 1985; Moss, 1985; Zimmermann, 1987; Judkins, 1996] synthetisiert

bzw. aufgearbeitet. Das *para*-substituierte Cyanobenzamidoxim und das dazugehörigen Amidin waren so stark verunreinigt, daß weitere Aufreinigungsschritte nötig waren. Das *p*-Cyanobenzamidin wurde hierfür mit Wasser ausgeschüttelt, während Fremdbestandteile im *p*-Cyanobenzamidoxim mittels Toluol ausgewaschen wurden.

3.3.2.1. Benzamidoxime

Die Benzamidoxime (*p*-Methyl, *p*-Methoxy, *p*-Brom, *p*-Chlor, *p*-/m-Nitro, *p*-Cyano) konnten gemäß der Tiemann-Reaktion [Tiemann, 1884] dargestellt werden. Durch nukleophile Addition eines Hydroxylamins an das entsprechend substituierte Benzonitril konnten die Benzamidoxime direkt gewonnen werden (Abb. 34).

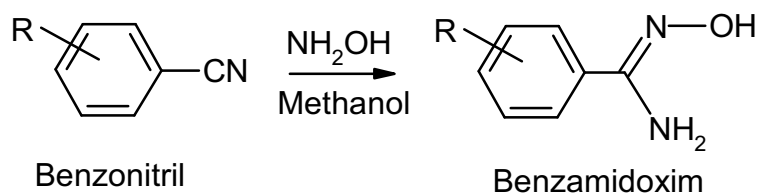


Abb. 3-4 *Synthese der Benzamidoxime durch die Tiemann-Reaktion* [Tiemann, 1884].

3.3.2.2. Benzamidine

Die Synthese der Benzamidine (*p*-/m-Nitro, *p*-/m-Methyl, *p*-Methoxy, *p*-Brom, *p*-Chlor) erfolgte mit Ausnahme des *p*-Cyanobenzamidin nach dem Pinner-Verfahren [Pinner, 1883]. Dabei geht man von dem entsprechenden Nitril aus und gelangt über Imidoester zu den Amidinen (Abb. 3-5).

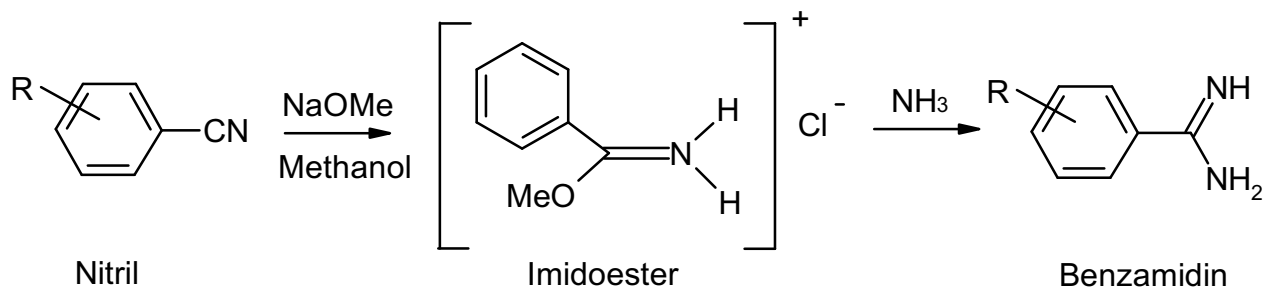


Abb. 3-5. Synthese der Benzamide nach dem Pinner-Verfahren [Pinner, 1883].

Das *p*-Cyanobenzamidin konnte mit Hilfe des Sandmeyer-Verfahrens synthetisiert werden [Sandmeyer, 1884]. Hierfür entwickelte Zimmermann eine Methode, bei der ausgehend von *p*-Aminobenzamidin zunächst eine Diazotierung mit Hilfe von Natriumnitrit durchgeführt wurde [Zimmermann, 1987]. Durch weitere Umsetzung mit Kupfer(I)cyanid entstand schließlich das entsprechende Amidin (Abb. 36).

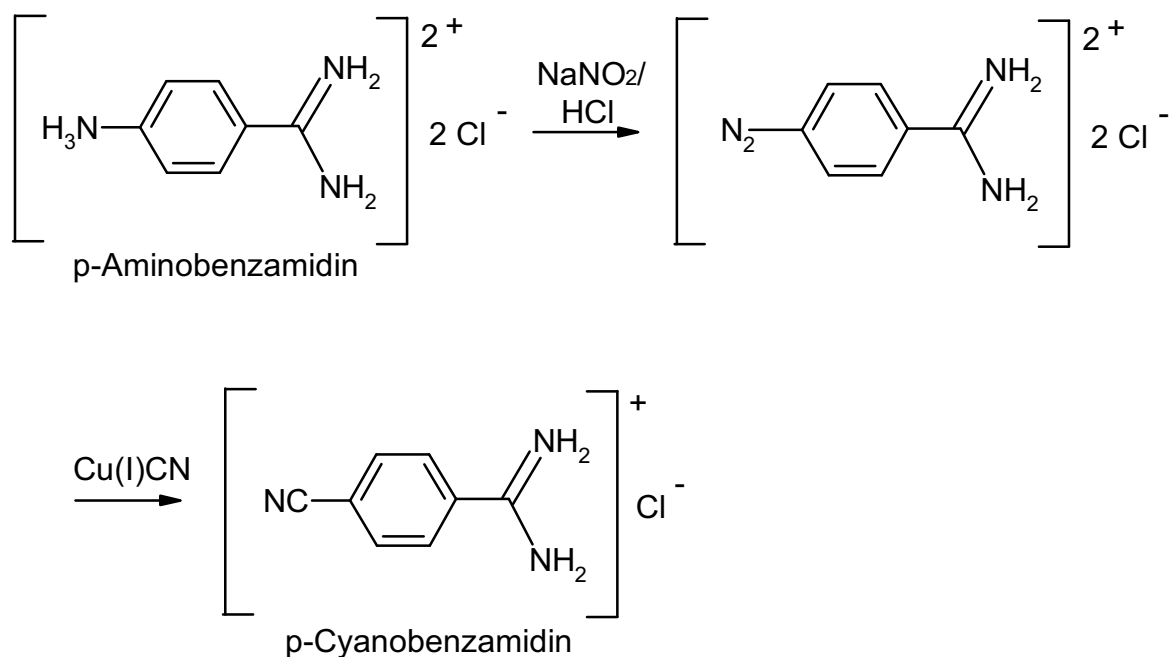


Abb. 3-6. Synthese des *p*-Cyanobenzamidins nach dem Sandmeyer-Verfahren [Sandmeyer, 1884].

3.3.3. Charakterisierung der Reduktion von Benzamidoximen

Sämtliche *para*-substituierten Benzamidoxime zeigten in Phosphatpuffer pH 6.0 die höchsten Umsetzungsraten. Bei Verwendung von 300 µg mikrosomalem Protein in 300 µl-Inkubationsansätzen war die Reduktion linear ansteigend in Abhängigkeit von der Proteinmenge. Auch erwies sich die Entstehung des Metaboliten über einen Zeitraum von 30 min als linear. Das Cosubstrat NADH wurde in 1 mM Konzentration der Umsetzung zugefügt, obwohl eine 0.5 mM Menge ausreichend gewesen wäre, um eine Sättigung des Enzyms mit NADH zu gewährleisten. Für alle untersuchten Verbindungen führte eine 0.5 mM Konzentration des jeweiligen Benzamidoxims zu einer Sättigung des Enzymsystems in Schweinelebermikrosomen. Lediglich für *para*-Cyanobenzamidoxim wurde hierfür eine Menge von etwa 1.5 mM benötigt. Unter diesen aufgeführten optimierten Bedingungen für das Enzymsystem wurde die Reduktion aller *para*-substituierten Benzamidoxime durch Schweinelebermikrosomen getestet. Es wurde zusätzlich das Reduktionsäquivalent NADH gegen NADPH ausgetauscht. Die Abwesenheit von mikrosomalem Protein, Cosubstrat oder Substrat führte zu keiner Reduktion. Die Ergebnisse der Umsetzungen der einzelnen Amidoxime mit NADH bzw. NADPH sind in Abbildung 37 dargestellt.

Aus dieser Abbildung geht eindeutig hervor, daß für die Reduktion sämtlicher Substrate mit NADH als Cosubstrat die jeweils höheren Umsetzungsraten zu detektieren waren als mit NADPH. Unter den optimierten Bedingungen zeigten mit NADH *p*-Brom-, *p*-Chlor- sowie *p*-Methoxybenzamidoxim die höchsten Umsetzungsraten von 5.63 ± 0.15 nmol *p*-Brombenzamidin/min/mg, 5.56 ± 0.38 nmol *p*-Chlorbenzamidin/min/mg bzw. 5.65 ± 0.16 nmol *p*-Methoxybenzamidin/min/mg Protein. Die geringste Aktivität von 2.44 ± 0.08 nmol *p*-Nitrobenzamidin/min/mg Protein war hierbei für das *p*-Nitrobenzamidoxim zu verzeichnen. Ähnliche Ergebnisse wurden durch die Umsetzung mit NADPH erzielt. Die Substrate *p*-Methoxy- und *p*-Brombenzamidoxim zeigten wieder die höchste Reduktaseaktivität (3.27 ± 0.19 nmol *p*-Methoxybenzamidin/min/mg, 3.15 ± 0.07 nmol *p*-Brombenzamidin/min/mg Protein). Die geringste Umsetzungsrate mit 0.80 ± 0.01 nmol *p*-Nitrobenzamidin/min/mg Protein ließ sich auch hier für das *p*-Nitrobenzamidoxim erkennen.

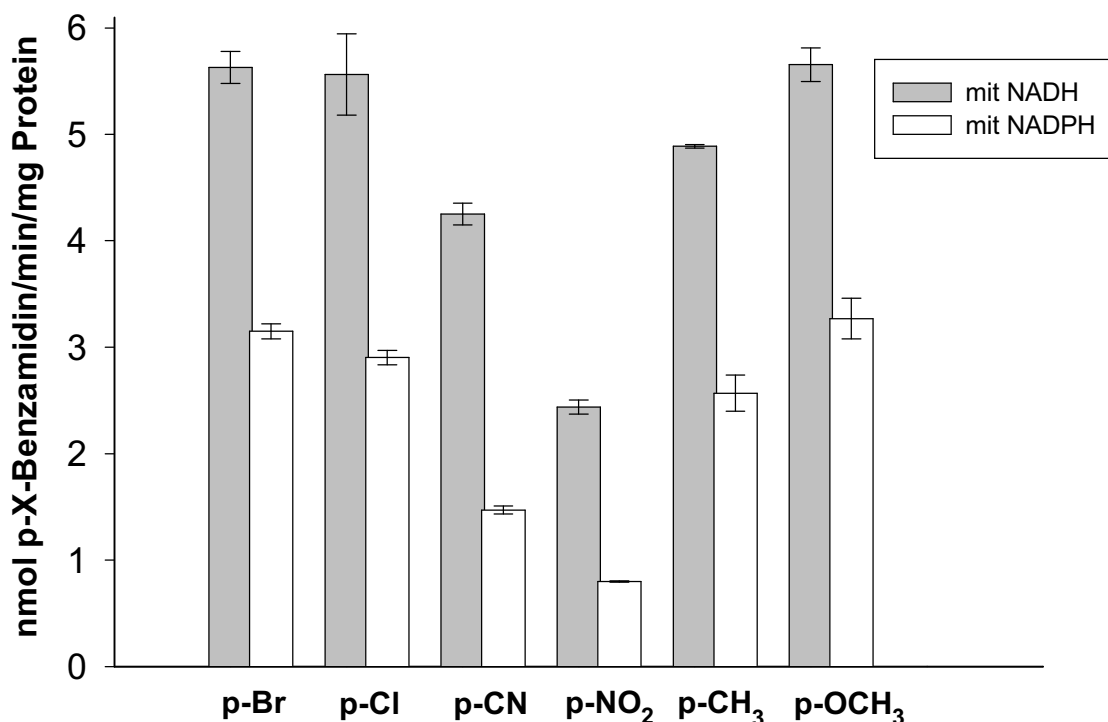


Abb. 3-7. Umsetzung der *para*-substituierten Benzamidoxime zu den entsprechenden Amidinen unter Verwendung von NADH sowie NADPH als Reduktionsäquivalent ($n = 4$). Angegeben ist nur der Substituent in *para*-Stellung.

3.3.4. Bestimmung von enzymkinetischen Parametern

Die Umsetzungsraten der verschiedenen *para*-substituierten Benzamidoxime in Abhängigkeit von der Substratkonzentration wurden mit drei verschiedenen Chargen Schweinelebermikrosomen und mit dem rekonstituierten System aus dem Schwein bestimmt. Alle getesteten *para*-substituierten Benzamidoxime wurden sowohl in Mikrosomen als auch im rekonstituierten System gemäß der Michaelis-Menten-Kinetik zu den korrespondierenden Benzamidinen reduziert. Die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) sowie die maximalen Umsetzungsraten (v_{max}) konnten daher durch

hyperbole Regression ermittelt werden. Abbildung 3-8 gibt exemplarisch für einige Benzamidoxime die hyperbole Regression wieder. Abgebildet sind jeweils nur das Substrat mit der höchsten und der niedrigsten maximalen Umsetzungsrate im Vergleich mit Benzamidoxim.

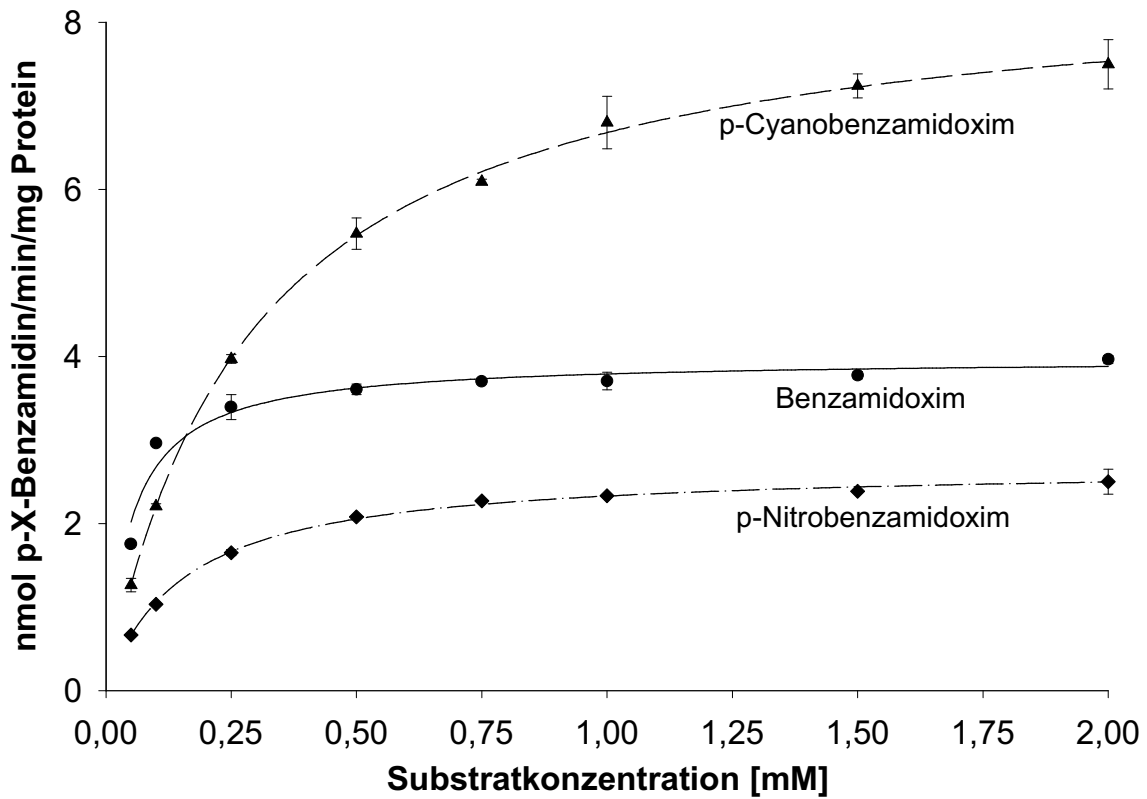


Abb. 3-8. *Darstellung der Abhängigkeit der Umsetzungsrate von der Substratkonzentration für Benzamidoxim, p-Cyanobenzamidoxim und p-Nitrobenzamidoxim als hyperbole Regression.*

Die ermittelten maximalen Umsetzungsrate für die Reduktion in Schweinelebermikrosomen sowie im rekonstituierten System sind in Tabelle 3-3 zusammengefaßt.

Tab. 3-3. Maximale Umsetzungsraten der Reduktion verschiedener para-substituierter Benzamidoxime durch Schweinelebermikrosomen (n = 12) und das rekonstituierte Enzymsystem (n = 4).

Substrat	V_{\max} [nmol Metabolit/min/mg Protein]	
	Schweinelebermikrosomen	rekonstituiertes System
p-Cyanobenzamidoxim	8.75 ± 0.57	240.50
p-Methoxybenzamidoxim	7.50 ± 1.10	213.40
p-Chlorbenzamidoxim	5.68 ± 1.71	217.50
p-Brombenzamidoxim	5.75 ± 1.28	160.20
p-Methylbenzamidoxim	5.09 ± 1.29	105.00
Benzamidoxim	4.48 ± 0.79	107.80
p-Nitrobenzamidoxim	3.60 ± 1.24	43.40

Die Signifikanz der in Schweinelebermikrosomen ermittelten Maximalgeschwindigkeiten für die Reduktion der Benzamidoxime wurde auf dem Signifikanzniveau von 95 % geprüft. Außer für das p-Cyano- ($P = 0.002$) sowie das p-Methoxybenzamidoxim ($P = 0.02$) waren die Unterschiede in den maximalen Umsetzungsraten zum Benzamidoxim im student's ttest nicht signifikant ($P > 0.05$). Das p-Cyano-substituierte Derivat erwies sich als signifikant unterschiedlich zu allen anderen Substraten (P von 0.003 bis 0.04), außer zum p-Methoxybenzamidoxim ($P = 0.16$). Dieses zeigte weiterhin einen signifikant unterschiedlichen v_{\max} -Wert im Vergleich mit dem p-Nitrobenzamidoxim ($P = 0.015$). Der Unterschied aller anderen in der Tabelle aufgeführten Umsetzungsraten war nicht signifikant.

Die Überprüfung der Ergebnisse mit dem student's ttest konnte nur für die Reduktion in Schweinelebermikrosomen durchgeführt werden, da die Inkubation im rekonstituierten System nur jeweils einmal für jedes Substrat erfolgte, da aus den aufwendigen Reinigungen größere Enzymmengen nicht bereit gestellt werden konnten. Alle para-substituierten Benzamidoxime wurden mit hohen Umsetzungsraten reduziert.

Ein weiterer wichtiger Parameter, der hier bestimmt wurde, war die Michaelis-Menten-Konstante. Zur besseren Übersicht wurden die ermittelten K_m -Werte der

einzelnen *para*-substituierten Benzamidoxime ebenfalls in einer Tabelle zusammengefaßt (Tab 3-4).

Tab. 3-4. K_m -Werte der verschiedenen *para*-substituierten Benzamidoxime in Schweinelebermikrosomen ($n = 12$) sowie im rekonstituierten Enzymsystem ($n = 4$).

Substrat	Michaelis-Menten-Konstante [μM]	
	Schweinelebermikrosomen	rekonstituiertes System
p-Nitrobenzamidoxim	657.3 ± 872.7	1374.6
Benzamidoxim	260.3 ± 18.3	174.4
p-Methoxybenzamidoxim	100.1 ± 10.0	202.1
p-Cyanobenzamidoxim	92.7 ± 58.0	1996.7
p-Brombenzamidoxim	87.0 ± 32.7	301.2
p-Chlorbenzamidoxim	82.5 ± 14.7	237.4
p-Methylbenzamidoxim	78.9 ± 23.7	85.0

Wieder wurde der student's t-test nur für die K_m -Werte der *para*-substituierten Benzamidoxime in Schweinelebermikrosomen durchgeführt. Hier zeigten alle Substrate einen signifikant unterschiedlichen Wert im Vergleich zum unsubstituierten Derivat ($P < 0.05$) mit Ausnahme des p-Cyanobenzamidoxims ($P = 0.11$). Die Michaelis-Menten-Konstante des p-Nitrobenzamidoxim wies weiterhin einen signifikanten Unterschied zum p-Brom- ($P = 0.02$) sowie p-Methylbenzamidoxim ($P = 0.01$) auf. Alle anderen gemessenen Daten zeigten keine Signifikanz im student's t-test ($P > 0.05$).

Schließlich wurde der Quotient aus v_{\max} und K_m gebildet und somit die katalytische Effizienz für die Reduktion in Schweinelebermikrosomen sowie im rekonstituierten Enzymsystem ermittelt. Ein Vergleich der Katalytischen Effizienz K_{eff} dieser Reaktion in Mikrosomen sowie im gereinigten Enzymsystem zeigt Tabelle 35.

Tab. 3-5. Katalytische Effizienz der Reduktion von *para*-substituierten Benzamidoximen in Schweinelebermikrosomen ($n = 12$) sowie im rekonstituierten Enzymsystem ($n = 4$).

Substrat	Katalytische Effizienz [l/min/mg Protein]	
	Schweinelebermikrosomen	rekonstituiertes System
p-Methoxybenzamidoxim	$7.54 \cdot 10^{-5} \pm 1.39 \cdot 10^{-5}$	$1.06 \cdot 10^{-3}$
p-Chlorbenzamidoxim	$7.11 \cdot 10^{-5} \pm 1.33 \cdot 10^{-5}$	$7.95 \cdot 10^{-4}$
p-Brombenzamidoxim	$6.79 \cdot 10^{-5} \pm 1.73 \cdot 10^{-5}$	$5.32 \cdot 10^{-4}$
p-Cyanobenzamidoxim	$6.38 \cdot 10^{-5} \pm 2.84 \cdot 10^{-5}$	$1.20 \cdot 10^{-4}$
p-Methylbenzamidoxim	$5.95 \cdot 10^{-5} \pm 1.56 \cdot 10^{-5}$	$1.24 \cdot 10^{-3}$
p-Nitrobenzamidoxim	$3.72 \cdot 10^{-5} \pm 3.30 \cdot 10^{-5}$	$3.16 \cdot 10^{-5}$
Benzamidoxim	$3.38 \cdot 10^{-5} \pm 0.47 \cdot 10^{-5}$	$6.18 \cdot 10^{-4}$

Bei der Katalytischen Effizienz der Reduktion der *para*-substituierten Benzamidoxime in Schweinelebermikrosomen konnte lediglich für das unsubstituierte Derivat ein signifikanter Unterschied zum p-Methoxy- ($P = 0.008$), zum p-Chlor- ($P = 0.01$) sowie zum p-Brombenzamidoxim festgestellt werden. Alle anderen K_{Eff} -Werte erwiesen sich nicht als signifikant unterschiedlich im student's ttest ($P > 0.05$). Für sämtliche *para*-substituierten Benzamidoxime wurde eine große katalytische Effizienz ermittelt.

3.3.5. Korrelation mit den Hammettschen σ_{para} -Konstanten

Eine Korrelation der ermittelten v_{max} -Werte mit den Hammettschen σ_{para} -Konstanten wurde angestrebt. Hierfür wurden jeweils die logarithmierten maximalen Umsetzungsraten gegen die entsprechende Substituentenkonstante σ_{para} graphisch aufgetragen und eine Regressionsgerade durch die einzelnen Datenpunkte gelegt. Es ergab sich weder mit Schweinelebermikrosomen noch mit dem rekonstituierten System eine Korrelation der v_{max} -Werte mit den Hammettschen σ_{para} -Konstanten.

Die Überprüfung des Einflusses der Hammett-Konstanten auf den logarithmierten Kehrwert der Michaelis-Menten-Konstante des rekonstituierten Systems zeigte jedoch eine lineare Abhängigkeit beider Parameter mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.812 (Abb. 3-9). Hieraus ergab sich folgende Beziehung:

$$\log 1/K_m = -1.69 \sigma + 4.415$$

Diese Korrelation gilt jedoch nur für das rekonstituierte System. Die Überprüfung der mikrosomalen $\log 1/K_m$ -Werte ließen keinen Zusammenhang mit den Hammett-Konstanten erkennen.

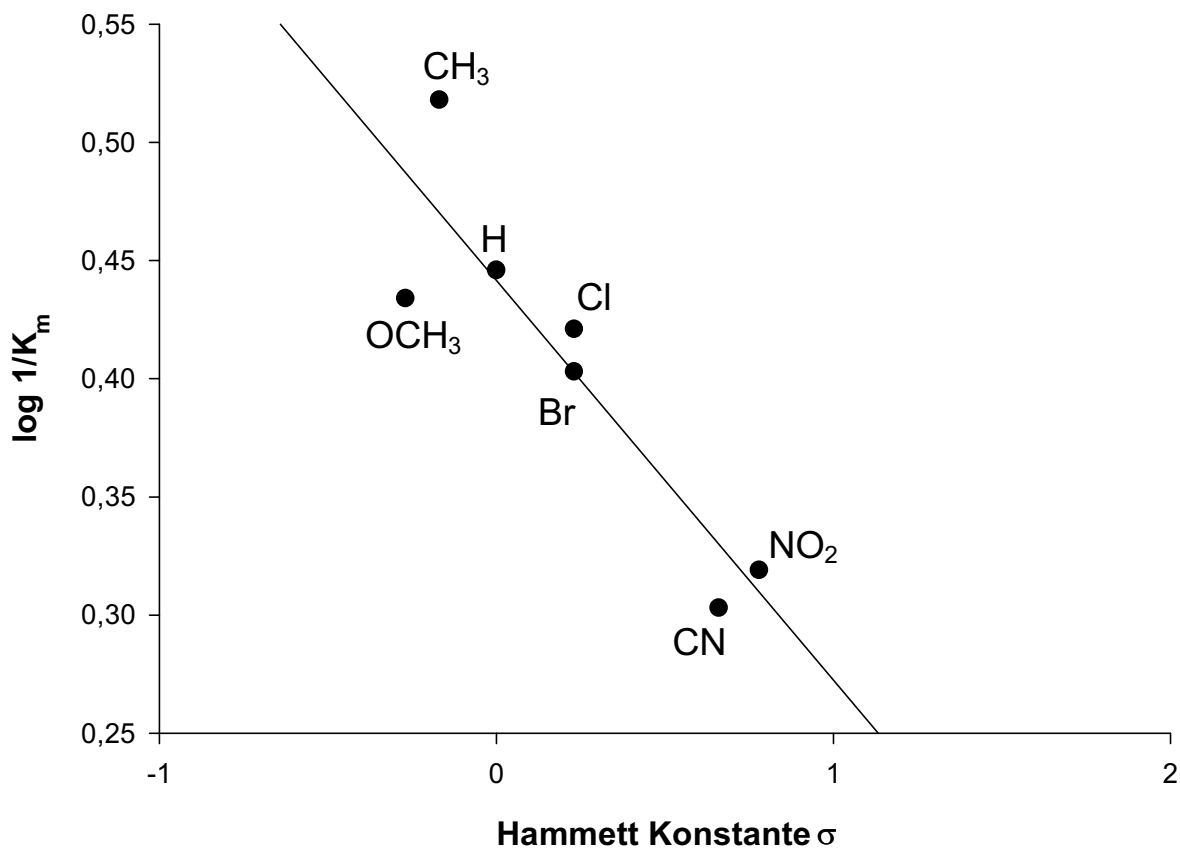


Abb.3-9. Korrelation der im rekonstituierten Enzymsystem ermittelten $\log 1/K_m$ -Werte der N-Reduktion para-substituierter Benzamidoxime mit den σ -Konstanten nach Hammett. Angegeben ist jeweils nur der Substituent in para-Stellung.

Beim Auftrag der logarithmierten katalytischen Effizienz gegen die jeweilige Hammett-Konstante konnte ebenfalls eine lineare Regression mit einem etwas höheren Korrelationskoeffizienten von 0.851 ermittelt werden (Abb. 310). Beide Parameter stehen durch folgende Gleichung miteinander in Beziehung:

$$\log K_{\text{Eff}} = -1.356 \sigma - 3.129$$

Diese Korrelation ließ sich wiederum nur für die gereinigten Enzyme und nicht für das mikrosomale System ermitteln.

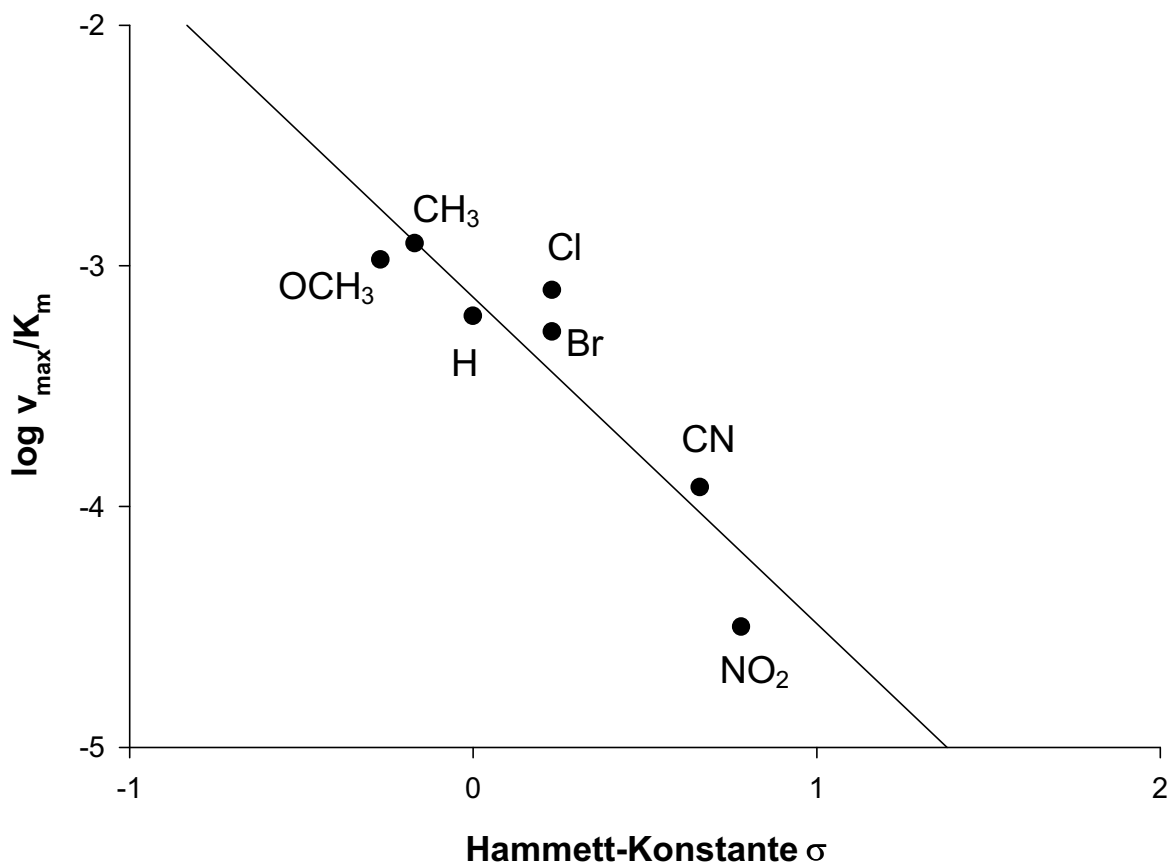


Abb. 3-10. Korrelation der im rekonstituierten Enzymsystem ermittelten Katalytischen Effizienz der N-Reduktion para-substituierter Benzamidoxime mit den σ -Konstanten nach Hammett.

Für die *N*-Reduktion *para*-substituierter Benzamidoxime konnte folglich eine Abhängigkeit der Katalytischen Effizienz sowie der MichaelisMenten-Konstante des rekonstituierten Systems von elektronischen Einflüssen des Substituenten gezeigt werden. Für die Reduktion in Schweinelebermikrosomen konnte eine solche Korrelation nicht ermittelt werden.

3.3.6. Bestimmung der Lipophilie der Benzamidoxime und Benzamide

Die log k' -Werte der *para*-substituierten Benzamidoxime wurden mit Hilfe der in 3.2.6. beschriebenen HPLC-Methode ermittelt. Durch einen mit Oktanol gesättigten Phosphatpuffer erfolgte das dynamische coaten einer RP18-Säule mit dieser stark lipophilen Substanz. Der auf dem Trägermaterial haftende Oktanol-Film bildete die stationäre Phase des Systems, während der oktanolgesättigte Phosphatpuffer als mobile Phase fungierte. Es wurden jeweils Verdünnungen der verschiedenen *para*-substituierten Benzamidoxime und Benzamide injiziert. Diese konnten sich nun, ihren physikochemischen Eigenschaften entsprechend, zwischen der lipophilen stationären und der hydrophilen mobilen Phase verteilen. Lipophile Substanzen lösten sich besser in dem Oktanolfilm als hydrophile, wovon sich längere Retentionzeiten ergaben. Die Lipophiliekonstante errechnet sich aus der Retentionszeit der einzelnen Amidoxime und Amidine sowie der mit Uracil bestimmten Totzeit und wird hier im Gegensatz zur Ausschüttelmethode als log k' bezeichnet:

$$\log k' = \log \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

t_R = Gesamtretentionszeit, t_0 = Totzeit

Zur Ermittlung der entsprechenden log k' -Werte der *para*-substituierten Benzamidoxime und Benzamide wurden ebenfalls die Lipophiliekonstanten log k' von drei Standardsubstanzen, wie beschrieben, bestimmt. Hierfür verwendet wurden Vertreter einer homologen Reihe (Benzamid, *p*-Methylbenzamid sowie *p*-Ethylbenzamid), von denen die log k' -Werte der Literatur entnommen werden konnten.

Durch eine graphische Korrelation dieser literaturbekannten Werte mit den experimentell ermittelten $\log k'$ -Werten erhielt man eine Geradengleichung, aus der sich die entsprechenden $\log P$ -Werte der Amidoxime bzw. Amidine berechnen ließen (Abb. 3-11).

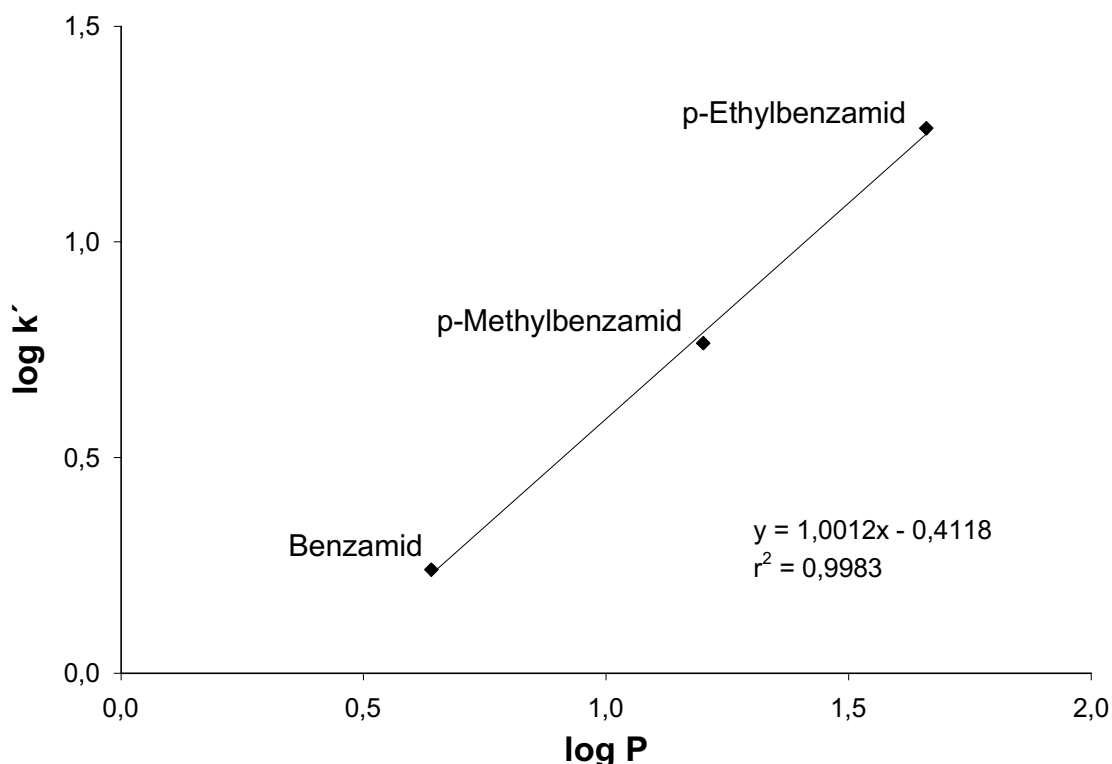


Abb. 3-11. Korrelation der gemessenen $\log k'$ -Werten mit den literaturbekannten $\log P$ -Werten der drei Standardsubstanzen Benzamid, *p*-Methylbenzamid und *p*-Ethylbenzamid.

Da die drei verwendeten Standardsubstanzen einer homologen Reihe angehören, konnte eine hohe Korrelation zwischen den ermittelten $\log k'$ und den $\log P$ -Werten der Literatur erzielt werden. Mit Hilfe der sich hieraus ergebenden Geradengleichung wurden die $\log P$ -Werte der einzelnen *para*-substituierten Benzamidoxime und Benzamidine ermittelt. Aus den gemessenen Daten konnte weiterhin die Hydrophobie-Konstante π_x nach Hansch und Leo [1979] für jeden einzelnen Substituenten berechnet werden. Hierfür wurde die Differenz aus den experimentell

ermittelten log P-Werten der *para*-substituierten Benzamidoxime und der unsubstituierten Verbindung gebildet. Eine Übersicht der Lipophilie-Daten der Benzamidoxime zeigt Tabelle 3-6.

Tab. 3-6. Bestimmung der Lipophilie der *para*-substituierten Benzamidoxime.

Substanz	log k'	log P	π_x
p-Cyanobenzamidoxim	-0.06	0.35	-0.12
Benzamidoxim	0.06	0.47	0
p-Methoxybenzamidoxim	0.20	0.61	0.14
p-Nitrobenzamidoxim	0.39	0.80	0.33
p-Methylbenzamidoxim	0.60	1.01	0.54
p-Chlorbenzamidoxim	0.94	1.35	0.89
p-Brombenzamidoxim	1.15	1.56	1.09

Die Benzamidoxime sind entsprechend ihrer Lipophilie geordnet. Die Substanz mit der kleinsten Hydrophobie-Konstante, hier das p-Cyanobenzamidoxim, besitzt die größte Hydrophilie. Es ist das einzige Amidoxim, welches hydrophiler als die unsubstituierte Verbindung ist. Alle anderen besitzen eine größere Lipophilie als das Benzamidoxim selbst. Das p-Brombenzamidoxim stellt in dieser Reihe die lipophilste Verbindung dar.

Auch die Lipophilie der bei der Reduktion der Benzamidoxime entstehenden Metaboliten wurde überprüft. Eine Übersicht über die ermittelten Daten der Benzamide ist in Tabelle 3-7 gezeigt.

Tab. 3-7. Bestimmung der Lipophilie der *para*-substituierten Benzamide.

Substanz	Log k'	Log P	π_x
p-Cyanobenzamidin	-0.17	0.24	-0.48
p-Nitrobenzamidin	0.11	0.52	-0.20
Benzamidin	0.31	0.72	0
p-Methoxybenzamidin	0.67	1.08	0.35
p-Methylbenzamidin	0.83	1.24	0.52
p-Chlorbenzamidin	0.93	1.34	0.62
p-Brombenzamidin	1.10	1.51	0.79

Hier besitzen p-Cyano- und p-Nitrobenzamidin hydrophilere Eigenschaften als das Benzamidin selbst, während alle anderen Verbindungen eine größere Lipophilie aufweisen.

Man erkennt sowohl für die Benzamidoxime als auch für die Benzamide wesentliche Unterschiede in der Lipophilie, die allein durch den Substituenten in *para*-Stellung verursacht werden. Eine Korrelation dieser Daten mit den enzymkinetischen Parametern (s. 3.3.4.) war jedoch weder für das rekonstituierte noch für das mikrosomale Enzymsystem möglich.

3.3.7. Reduktion von *meta*-substituierten Benzamidoximen

Das m-Methylbenzamidoxim wurde mit einer Umsatzrate von 3.63 ± 0.19 nmol m-Methylbenzamidin/min/mg Protein reduziert. Bei Verwendung von NADPH als Cosubstrat verminderte sich die Aktivität auf 1.30 ± 0.16 nmol/min/mg Protein. Das Fehlen von Substrat, Cosubstrat oder mikrosomalem Protein führte zu keiner Reduktion.

Die Umsetzung von m-Nitrobenzamidoxim erfolgte mit einer Aktivität von 1.04 ± 0.01 nmol m-Nitrobenzamidin/min/mg Protein bei Verwendung von NADH als Cosubstrat und 0.44 ± 0.03 nmol/min/mg mit NADPH als Reduktionsäquivalent. Auch hier konnte bei Abwesenheit einer der oben genannten Komponenten keine Reduktion nachgewiesen werden.

3.3.8. Umsetzung weiterer Substrate durch die Benzamidoxim Reduktase

3.3.8.1. Reduktion von RO 48-3656

Ein weiteres potentiell Substrat der aus Schweinelebermikrosomen isolierten Benzamidoxim-Reduktase wurde untersucht. Hierfür wurde die freie Säure des prodrugs Sibrafiban, nämlich RO 48-3656, ein Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonist der Firma Hoffmann La Roche, verwendet. Die Substanz enthält eine Amidoxim Struktur, deren Reduktion zum Amidin zur eigentlichen Wirkform führt. Das Prodrug RO 48-3656 wurde hierbei von der Benzamidoxim-Reduktase im rekonstituierten System mit einer Aktivität von 21.15 ± 2.07 nmol RO 44-3888/min/mg Protein umgesetzt (Abb. 3-12).

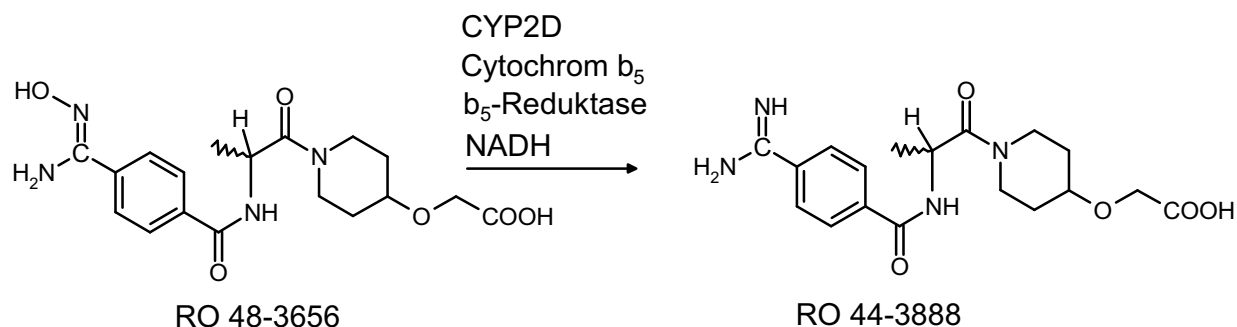


Abb. 3-12. Aktivierung des prodrugs RO 48-3656 durch das rekonstituierte System des Schweins.

3.3.8.2. 25-Hydroxylierung von 1 α -Hydroxyvitamin D₃

Im Arbeitskreis von Wikvall wurde die unter 3.2.1.2.1. aus Schweinelebermikrosomen isolierte Benzamidoxim-Reduktase im Vergleich mit der von Wikvall gereinigten Vitamin D₃-25-Hydroxylase [Axén 1992] auf die Fähigkeit zur 25-Hydroxylierung von 1 α -Vitamin D₃ untersucht. Beiden Enzymen war es möglich, dieses Substrat zu metabolisieren (Abb. 3-13). Dabei ergaben sich für 2 verschiedene Chargen an 25-Hydroxylase Umsetzungsraten von 2.24 und 5.60 nmol 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃/min/mg Protein, während die Benzamidoxim-Reduktase das Substrat mit einer Aktivität von 0.225 nmol 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ /min/mg Protein zu hydroxylieren vermochte. Bei einer weiteren Charge an gereinigter Benzamidoxim-Reduktase aus Schweineleber war weniger als 40 pmol 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃/min/mg zu detektieren. Die 25-Hydroxylase besaß eine deutlich höhere Aktivität als die Reduktase.

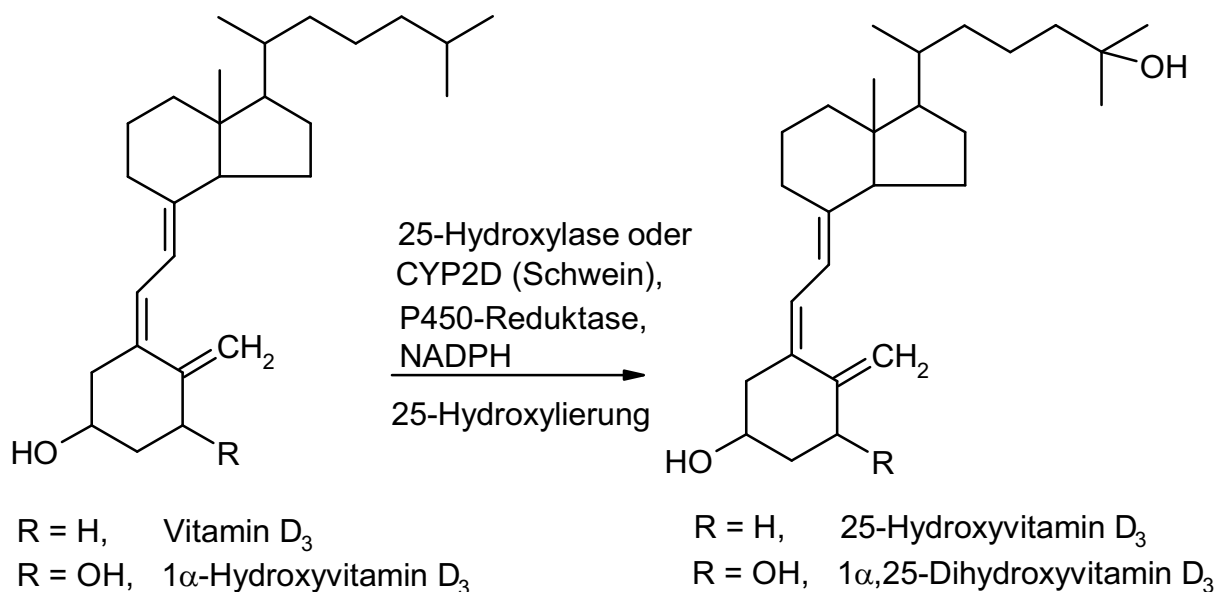


Abb. 3-13. 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ und 1 α -Hydroxyvitamin D₃ durch die Vitamin D₃-25-Hydroxylase sowie durch das Cytochrom P450 Isoenzym 2D.

3.3.8.3. Reduktion von Benzamidoxim durch die 1 α -Vitamin D₃-Hydroxylase

Zum Vergleich der 1 α -Vitamin D₃ 25-Hydroxylase mit der Benzamidoxim-Reduktase wurden beide Enzyme auf ihre Reduktaseaktivität überprüft. Dabei zeigten beide Proteine gleich hohe Umsetzungsraten von 8.0 nmol Benzamidin/min/mg Protein für die Hydroxylase und 8.2 nmol Benzamidin/min/mg Protein für die Reduktase (Abb. 3-14).

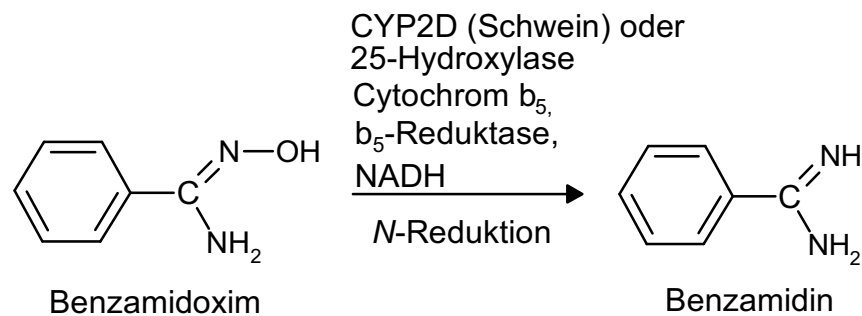


Abb. 3-14. Reduktion von Benzamidoxim durch das rekonstituierte System mit CYP2D oder der Vitamin D₃-25-Hydroxylase.

3.4. Diskussion

Die *N*-Reduktion sämtlicher getesteten *para*-substituierten Benzamidoxime konnte sowohl mit Schweinelebermikrosomen als auch mit dem rekonstituierten Enzymsystem nachgewiesen werden (Abb. 3-15). Die umgekehrte Reaktion, die *N*-Hydroxylierung der Benzamidine, wurde in einer vorangegangenen Arbeit von Zimmermann untersucht. Dabei wurden jeweils die gleichen Substituenten in *para*-Stellung zur Amidin- bzw. Amidoxim-Funktion verwendet. Die *N*-Oxidation von *p*-Nitrobenzamidin konnte *in vitro* nicht gezeigt werden [Clement und Zimmermann, 1988], während die Reduktion der entsprechenden *p*-Nitro-Verbindung in dieser Studie detektiert werden konnte.

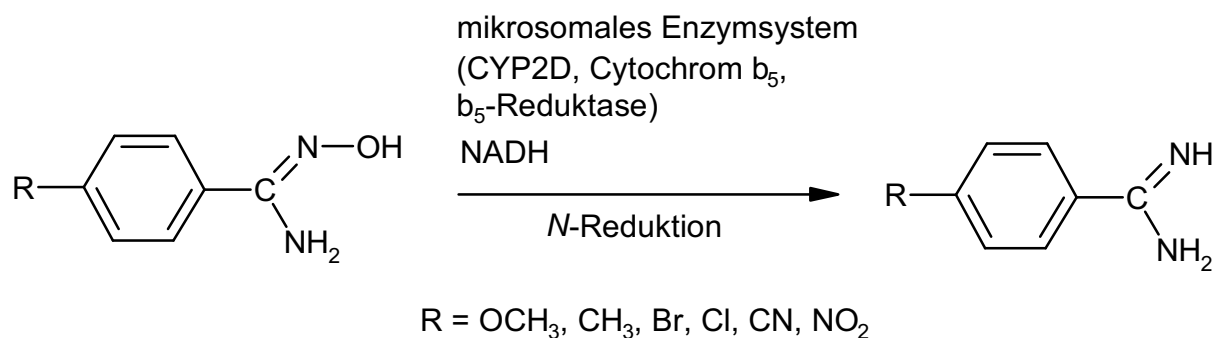


Abb. 3-15. *N*-Reduktion *para*-substituierter Benzamidoxime durch ein mikrosomales Enzymsystem aus CYP2D, Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 Reduktase.

Die Reaktionsbedingungen, unter denen die Reduktion am effektivsten abläuft, wurden für jedes einzelne Derivat in Mikrosomen ermittelt. Dabei ergaben sich, wie erwartet, für alle substituierten Benzamidoxime ähnliche Konditionen wie für die unsubstituierte Verbindung. Für Benzamidoxim selbst konnten die optimalen Reduktionsbedingungen bereits in vorangegangenen Arbeiten bestimmt werden [Clement *et al.*, 1997]. Der pH-Wert des Inkubationspuffers, bei dem die höchste Enzymaktivität erzielt wurde, war in den leicht sauren Bereich nach pH 6 verschoben. Zudem wurde das Cosubstrat NADH gegenüber NADPH für die Reduktion bevorzugt. Unter den optimalen Bedingungen wurden *p*-Methoxy-, *p*-Brom- sowie *p*-Chlorbenzamidoxim am stärksten umgesetzt, während *p*-Nitrobenzamidoxim am

schwächsten reduziert wurde. Aufgrund der identischen optimalen Bedingungen wird deutlich, daß alle Benzamidoxime durch das gleiche Enzymsystem umgesetzt werden.

Eine solche Inkubation unter optimalen Bedingungen kann ebenso wie die katalytische Effizienz dazu dienen, das Ausmaß der Metabolisierung eines Substrats im Vergleich mit anderen zu beurteilen. Die katalytische Effizienz berücksichtigt dabei sowohl Umsetzungsgeschwindigkeiten als auch Enzymaffinitäten (s.u.). Auch hier weisen p-Methoxy-, p-Brom- sowie p-Chlorbenzamidoxim den effektivsten Metabolismus zu den Benzamidinen auf, p-Nitrobenzamidoxim den uneffektivsten. Für das p-Nitrobenzamidoxim zeigte sich jedoch eine höhere katalytische Effizienz als für die unsubstituierte Verbindung.

Die Reduktion sämtlicher Benzamidoxime erfolgte gemäß der Michaelis-Menten-Kinetik. Dieses wurde durch eine hyperbol verlaufende Abhängigkeit der Umsatzrate von der Substratkonzentration gezeigt. Hierdurch konnten die enzymkinetischen Parameter v_{\max} und K_m mittels hyperboler Regression bestimmt werden, aus denen anschließend die katalytische Effizienz errechnet wurde.

Die ermittelten v_{\max} -Werte geben dabei die jeweils höchste Umsetzungsgeschwindigkeit an, mit der ein Enzym ein bestimmtes Substrat umzusetzen vermag. Die Michaelis-Menten-Konstante K_m beschreibt die Affinität der einzelnen Benzamidoxime zu dem reduzierenden Enzym, wobei kleine Werte eine hohe Bindungsfähigkeit anzeigen. Die katalytische Effizienz stellt schließlich den Quotienten aus v_{\max} und K_m dar.

Folglich werden hierbei sowohl die maximal möglichen Umsetzungsgeschwindigkeiten als auch die Enzymaffinitäten berücksichtigt, wodurch die katalytische Effizienz u.a. für die Beurteilung der *in vivo*-Relevanz einer Reaktion geeignet ist.

Der Vergleich der Maximalgeschwindigkeiten der N-Reduktion der *para*-substituierten Benzamidoxime ergab, daß sowohl im mikrosomalen als auch im rekonstituierten System die Umsetzung von p-Cyanobenzamidoxim am schnellsten erfolgte. In beiden Enzymsystemen wurden alle substituierten Verbindungen bis auf p-Nitrobenzamidoxim schneller reduziert als Benzamidoxim selbst. Die Reihenfolge der Maximalgeschwindigkeiten, mit denen die einzelnen Verbindungen reduziert

wurden, stimmten für das mikrosomale und das rekonstituierte System weitgehend überein. Dabei muß berücksichtigt werden, daß sich die Umsetzungsraten der verschiedenen Benzamidoxime in Schweinelebermikrosomen größtenteils nicht signifikant unterschieden. Die Differenz der durch die gereinigten Enzyme ermittelten v_{max} -Werte der einzelnen Verbindungen war wesentlich größer. Ein Vergleich der Umsetzungsgeschwindigkeiten der einzelnen Substrate könnte somit für das rekonstituierte System mit einer höheren Sicherheit als für Mikrosomen erfolgen. Da jedoch eine zu geringe Stichprobenzahl vorlag, konnte die Signifikanz der Unterschiede nicht geprüft werden. Aus diesem Grund liefern die mit gereinigtem Enzym ermittelten Daten lediglich erste Anhaltspunkte und müßten statistisch weiter verifiziert werden.

Insgesamt betrachtet liegen die Umsetzungsgeschwindigkeiten des rekonstituierten Enzymsystems etwa zehn- bis dreißigfach höher als die der Mikrosomen.

Die im rekonstituierten Enzymsystem ermittelten K_m -Werte der *para*-substituierten Benzamidoxime unterschieden sich erheblich von denen in Schweinelebermikrosomen. *p*-Methylbenzamidoxim zeigte die höchste Affinität im gereinigten Enzymsystem, während *p*-Cyano- sowie *p*-Nitrobenzamidoxim mit zehn- bis hundertfach höher liegenden K_m -Werten die geringste Affinität besaßen. In Schweinelebermikrosomen hingegen wurde für alle Verbindungen außer für *p*-Nitrobenzamidoxim, welches auch hier am schlechtesten gebunden wurde, eine höhere Enzymaffinität als für das unsubstituierte Derivat ermittelt. Obwohl die K_m -Werte für beide Enzymsysteme weitgehend im μM Bereich lagen, war ein erheblicher Unterschied in der Bindung der einzelnen Substrate in Mikrosomen und im rekonstituierten System zu erkennen.

Ebenso unterschied sich die katalytische Effizienz der in Mikrosomen und im rekonstituierten Enzymsystem gemessenen Reduktion der einzelnen Benzamidoxime. Das gereinigte Enzymsystem setzte die Substrate dabei im Durchschnitt etwa zehnfach effizienter um als die Schweinelebermikrosomen. In beiden Systemen zeigte *p*-Methoxybenzamidoxim die höchste katalytische Effizienz, *p*-Nitrobenzamidoxim hingegen nur eine sehr geringe. Im rekonstituierten System wurde im Gegensatz zu Mikrosomen für das *p*-Methylbenzamidoxim eine ebenso effiziente Reduktion wie für das Methoxy-Derivat ermittelt. Die Unterschiede der

katalytischen Effizienz der Reduktion der einzelnen Benzamidoxime waren in Schweinelebermikrosomen wieder nur sehr gering, im rekonstituierten Enzymsystem hingegen ausgeprägter.

Eine Regressionsanalyse erbrachte keine Korrelation der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeiten des rekonstituierten und mikrosomalen Enzymsystems mit der σ -Konstanten nach Hammett. Somit zeigte sich keine Abhängigkeit der Umsetzungsgeschwindigkeit der untersuchten Benzamidoxime von den elektronischen Einflüssen des Substituenten in *para*-Stellung. Für die umgekehrte Reaktion, die *N*-Hydroxylierung der Benzamidine, konnte hingegen ein solcher Einfluß des Substituenten auf die Maximalgeschwindigkeit gezeigt werden [Clement und Zimmermann, 1988]. Da aber die Oxidation und die Rückreduktion jeweils durch unterschiedliche Enzymsysteme erfolgen, muß eine solche Beziehung nicht auch zwangsläufig für das reduzierende Enzymsystem gelten.

Im rekonstituierten Enzymsystem konnte jedoch eine lineare Korrelation der Kehrwerte der Michaelis-Menten-Konstante mit dem Hammett-Parameter σ ermittelt werden. Hierdurch konnte eine Abhängigkeit der Enzymaffinität der Benzamidoxime von den elektronischen Einflüssen des Substituenten gezeigt werden. Aus der Geradengleichung ergab sich eine negative Reaktionskonstante, welche einen positiven Effekt elektronenschiebender Substituenten auf die Enzym-Bindung anzeigte.

Die Bindung von Benzamidoximen an das reduzierende Enzym über den Sauerstoff ihrer Amidoxim-Funktion wird diskutiert (s. Kapitel 4). Eine solche Bindung, in der der Amidoxim-Sauerstoff ein freies Elektronenpaar zur Verfügung stellen müßte, würde durch Elektronendonatoren erleichtert. Durch den positiven Effekt elektronenschiebender Gruppen auf die Michaelis-Menten-Konstante kann diese Theorie zur Bindung der Benzamidoxime an das Enzymsystem untermauert werden. Voraussetzung hierfür ist, daß die Bindung der Amidoximfunktion an das Hämeisen nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt.

In ^{15}N -NMR-Studien zeigte sich, daß die ^{15}N -NMR-Verschiebung der oximartigen Stickstoffe der *para*-substituierten Benzamidoxime sehr gut mit den Hammett Konstanten der Substituenten korreliert [Girreser *et al.*, 2002]. Hierdurch wird

deutlich, daß diese Substituenten die Elektronendichte an den Stickstoffen mit Hydroxyl-Funktion beeinflussen und z.B. eine *para*-Nitro-Gruppe diese sehr stark herabsetzt [Girreser *et al.*, 2002]. Eine geringe Elektronendichte an diesen Stickstoffen sollte eigentlich auch die Reduktion erleichtern, so daß ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Reduktion und Hammett-Konstanten wie für die ¹⁵N-NMR-Werte erwartet wurde. Dies war jedoch nicht der Fall. Offenbar ist, wie oben diskutiert, der Effekt auf die Bindung an das Eisen des Hämgerüsts der entscheidende Schritt. Elektronendonatoren wirken sich hierbei positiv aus.

Eine noch bessere Korrelation ergab sich beim Vergleich der katalytischen Effizienz, in der die Michaelis-Menten-Konstante enthalten ist, mit der σ -Konstanten. Hierbei zeigten elektronenschiebende Substituenten, wie erwartet, wieder einen positiven Effekt auf die Gesamtumsetzung. Da die einzelnen Meßdaten nicht exakt auf der Regressionsgeraden lagen, ist der Einfluß weiterer physikalischer Parameter, wie beispielsweise die Polarisierbarkeit oder das Molekulargewicht, auf die *N*-Reduktion der Benzamidoxime wahrscheinlich. Diese konnten hier jedoch nicht berücksichtigt werden. Würden diese neben den elektronischen Effekten in die aufgestellte Regressions-Gleichung mit einfließen, könnten wahrscheinlich noch größere Korrelationskoeffizienten erzielt werden. Die Ergebnisse dieser QSAR-Analyse, die eine Beziehung zwischen der katalytischen Effizienz und den elektronischen Effekten von Substituenten im rekonstituierten Enzymsystem zeigte, konnten jedoch aufgrund der geringen Stichprobenzahl statistisch nicht verifiziert werden. Die Korrelation müßte mit enzymkinetischen Parametern weiterer Enzymchargen durchgeführt und somit endgültig bewiesen werden, wobei man schon jetzt erste Anhaltspunkte erhält.

Die Abhängigkeit der katalytischen Effizienz von den elektronischen Eigenschaften der Substituenten konnte jedoch nur für das rekonstituierte System und nicht für Schweinelebermikrosomen gezeigt werden. Dieses und die teilweise erheblichen Unterschiede der enzymkinetischen Parameter von mikrosomalem und rekonstituiertem System lassen vermuten, daß verschiedene mikrosomale Enzymsysteme mit unterschiedlicher Funktionsweise zur *N*-Reduktion befähigt sein könnten. Bisher ist für Schweinelebermikrosomen nur das Enzymsystem aus CYP2D, Cytochrom b₅ und NADH-Cytochrom b₅ Reduktase beschrieben worden [Clement *et al.*, 1997]. Mikrosomen bilden jedoch einen Pool aus zahlreichen

Enzymsystemen. Wird eine Verbindung nur durch ein bestimmtes Enzym umgesetzt, so erhält man eindeutige Ergebnisse für die Enzymkinetik. Können aber mehrere Enzymsysteme die gleiche Biotransformation, in diesem Fall die *N*-Reduktion, durchführen, so würden sich die unterschiedlichen Enzymkinetiken überlagern. Dadurch würde man in Mikrosomen andere v_{max} - und K_m -Werte bestimmen als mit den gereinigten Enzymfraktionen. Eine Korrelation dieser überlagerten Aktivitäten mit beispielsweise physikalischen Parametern würde zu keinem eindeutigen Ergebnis führen.

Weitere lineare Regressions-Analysen zeigten keine zusätzliche Abhängigkeit der experimentell ermittelten biologischen Aktivitäten von der Lipophilie. Obwohl die Enzymaffinität in vielen Fällen von dieser abhängig ist, konnte ebenfalls keine Beziehung zwischen der Michaelis-Menten-Konstante und der Hansch'schen Hydrophobie-Konstante der Substrate hergestellt werden. Ebenso besaßen die π -Werte der entstandenen Metaboliten keinen Einfluß auf die Umsetzungsgeschwindigkeit, auch wenn die Lipophilie der Produkte wahrscheinlich eine Rolle für deren Freisetzung spielt. Obwohl die Lipophilie der Substrate oftmals einen Einfluß auf biologische Aktivitäten besitzt, findet dieser physikalische Parameter ebenfalls in zahlreichen weiteren QSAR-Analysen keine Berücksichtigung, wobei die Gründe hierfür noch nicht bekannt sind [Hansch *et al.*, 2001].

Insgesamt läßt sich jedoch eine rasche Umsetzung sämtlicher *para*-substituierter Benzamidoxime zu den entsprechenden Benzamidinen erkennen. Die katalytische Effizienz dieser Reduktion in Schweinelebermikrosomen liegt in etwa hundertfach höher als die für die Oxidation in Kaninchenlebermikrosomen durch Zimmermann ermittelte [Clement und Zimmermann, 1988]. Obwohl die Studien in zwei verschiedenen Spezies durchgeführt wurden, läßt sich hieraus dennoch schließen, daß die Reduktion der Oxidation *in vivo* wahrscheinlich überlegen ist. Aufgrund der Toxizität zahlreicher Benzamidoxime, stellt die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen somit einen effizienten Detoxifizierungsmechanismus dar. Die ausschließliche Reduktion der sich mittlerweile in klinischen Studien der Phase III befindlichen Amidoxime Ximelagatran [Eriksson *et al.*, 2002] und Sibrafiban [Topol *et al.*, 2000] bestätigen dies.

Da sämtliche Benzamidoxime trotz einiger Unterschiede sehr effizient reduziert werden konnten, scheint der Einfluß der funktionellen Gruppe in *para*-Stellung eher gering zu sein. Benzamidoxim-Funktionen sind in zahlreichen Arzneistoffen als prodrug-Prinzip zur Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit von stark basischen Amidinen enthalten. Erst die Reduktion zum jeweiligen Benzamidin führt zur eigentlichen Wirkform. Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, daß Amidoxim-prodrugs unabhängig vom Substituenten in *para*-Stellung einer raschen Bioaktivierung zum Amidin unterliegen. Hierdurch wird die Anwendbarkeit des prodrug-Prinzips Amidoxime anstelle von Amidinen unterstrichen.

In der Literatur wurde die fehlende Wirksamkeit von einigen Amidoximprodrugs nach oraler Gabe beschrieben [Hall *et al.*, 1998]. Diese wurde entweder mit einer mangelnden zellulären Aufnahme der Amidoxime oder mit einer verminderten Biotransformation begründet. Die Reduktion der Arzneistoffe zu ihrer Wirkform konnte jedoch in Rattenleberhomogenaten nachgewiesen werden, nicht aber durch intakte Zelllinien, wodurch die fehlende Wirksamkeit wahrscheinlich nicht auf einen unzureichenden Metabolismus zurückgeführt werden kann [Hall *et al.*, 1998].

Andere Amidoxime von Pentamidinanaloga erwiesen sich jedoch als ausgezeichnete prodrugs (s. Einleitung). Da für alle im Arbeitskreis Tidwell synthetisierten Amidoxime keine v_{\max} - und K_m -Werte ihrer mikrosomalen Reduktion veröffentlicht worden sind, können diese nicht in Struktur-Wirkungs-Beziehungen einbezogen werden, zumal offenbar nur Enzymquellen der Ratte verwendet wurden. Mikrosomen der Rattenleber erwiesen sich bisher, im Gegensatz zu solchen aus Schweineleber als schlechte Modelle zur Simulierung der Stickstoffbiotransformation [Clement, 1985]. Soweit Studien im Menschen vorliegen (Ximelagatran, Sibrafiban) wurden die Amidoxime vollständig reduziert, ohne daß individuelle Schwankungen auftraten [Eriksson *et al.*, 1999; Wittke *et al.*, 1999].

Daß einige Amidoxime keine *in vivo*-Wirksamkeit zeigen, könnte auch auf der raschen bilären Elimination der durch Reduktion entstandenen Amidine beruhen [Hauptmann, 2002]. Eine solche biläre Elimination kann durch das prodrugPrinzip jedoch nicht verhindert werden.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführte QSAR-Analyse konnte ebenfalls die effiziente Reduktion von Benzamidoximen zu den Benzamidinen gezeigt werden, wobei die Umsetzung nur wenig durch den Substituenten in *para*-Stellung beeinflusst

wurde. Folglich kann das prodrug-Prinzip auf sämtliche *para*-substituierten Benzamidine zur Verbesserung der oralen Verfügbarkeit angewandt werden. Dies ist von großem Vorteil, da sich damit die Auswahl geeigneter Arzneistoffkandidaten ausschließlich nach den pharmakodynamischen Eigenschaften richten kann.

RO 48-3656 ist die freie Säure des Glycoprotein IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten Sibrafiban, bei dem es sich um einen Arzneistoff mit einer Amidoximfunktion in *para*-Stellung handelt. Durch Reduktion des Amidoxims zum Amidin erfolgt die Freisetzung der aktiven Form mit Wirkung auf die Blutgerinnung. Die Umsetzung dieses prodrugs konnte durch P450, Cytochrom b_5 und b_5 -Reduktase ebenso effizient gezeigt werden wie die Reduktion der Modellsubstanz Benzamidoxim. Hierdurch wird die Anwendbarkeit des prodrug-Prinzips Amidoxime anstelle von Amidinen weiter bestätigt.

Bisher wurden ausschließlich *N*-Reduktionen *para*-substituierter Benzamidoxime beschrieben. Um zu überprüfen, ob entsprechend *meta*-substituierte Derivate ebenfalls reduziert werden, wurden Inkubationen mit solchen *meta*-substituierten Verbindungen durchgeführt. Dabei zeigte sich ebenfalls eine rasche Umsetzung zu den Benzamidinen. Diese erfolgte zwar weniger ausgeprägt als die Reduktion der entsprechenden *para*-substituierten Verbindungen, die Umsetzungsraten lagen jedoch im gleichen Größenordnungsbereich. Daraus läßt sich folgern, daß auch *meta*-substituierte Benzamidoxime mit hoher Wahrscheinlichkeit *in vivo* rasch zu den korrespondierenden Amidinen reduziert werden können. Somit könnte die Anwendung des prodrug-Prinzips Amidoxime anstelle von Amidinen auf *meta*-substituierte Benzamidoxime erweitert werden.

Neben der Reduktion von Amidoximen und der Oxidation von Dextromethorphan ist die gereinigte Benzamidoxim-Reduktase aus dem Schwein in der Lage, auch das physiologische Substrat 1α -Hydroxyvitamin D_3 zu oxidieren. Dabei kommt es zu einer Hydroxylierung in Position 25. Die Umsetzungsraten entsprachen etwa nur einem Zehntel der Oxidationsaktivität der von Wikvall isolierten 25-Hydroxylase. Dies mag zum einen durch hemmende Zusätze in den von uns verwendeten Puffern verursacht werden, zum anderen könnte die Benzamidoxim-Reduktase aber auch nur eine Variante der 25-Hydroxylase mit überlappender Substratspezifität darstellen. Benzamidoxim jedoch wird sowohl von der Benzamidoxim-Reduktase als auch von der 25-Hydroxylase mit der gleichen Aktivität umgesetzt. Entweder handelt es sich um zwei identische Enzyme, die mit Hilfe unterschiedlicher Aktivitäten in zwei verschiedenen Arbeitskreisen isoliert wurden, oder um Enzyme mit hoher Ähnlichkeit in Struktur und Substratspezifität.

4. MECHANISMUS DER REDUKTION VON BENZAMIDOXIMEN

4.1. Einführung

4.1.1. Mechanismus der Oxygenierung durch P450

Cytochrom P450-Isoenzyme sind die wichtigsten Vertreter der Phase-I-Biotransformation von Arzneistoffen und besitzen dabei vielfältige Aufgaben. Sie katalysieren u.a. Oxidationsreaktionen am Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel, besitzen aber auch eine Peroxidase- sowie Oxidase-Aktivität [Testa, 1995]. Wenig Beachtung wurde bisher der Reduktion von Xenobiotika durch P450 geschenkt. Die meisten Reduktionen konnten nur unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen werden [Ortiz de Montellano, 1995; Testa, 1995; Goepfert *et al.*, 1995], wodurch ihre *in vivo*-Relevanz in Frage gestellt wird. Aber auch aerob ablaufende Reduktionen von stickstoffhaltigen funktionellen Gruppen wurden beschrieben [Kadlubar und Ziegler, 1974; Clement *et al.*, 1988a].

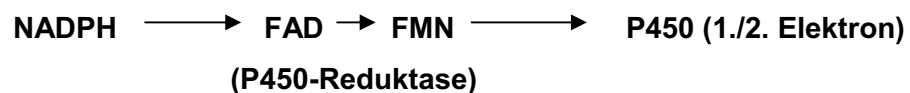
Die bisher am häufigsten durch P450 katalysierte Reaktion ist jedoch die Monooxygenierung, d.h. die Einführung eines Sauerstoffatoms in ein Substrat. Da der katalytische Mechanismus dieser Oxygenierung bislang am besten untersucht worden ist, soll zunächst eine Zusammenstellung der auf diesem Gebiet erlangten Erkenntnisse erfolgen, um diese dann auf den Mechanismus der Reduktion anwenden zu können.

4.1.1.1. Elektronenübertragung auf Cytochrom P450

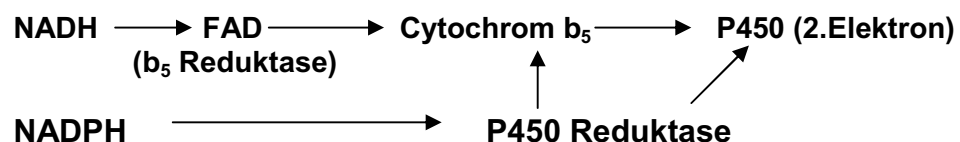
Die Oxidation eines Substrates durch Cytochrom P450 erfordert die Übertragung von zwei Elektronen auf das Enzym. Mit Hilfe dieser beiden Elektronen wird molekularer Sauerstoff zu einem Molekül Wasser reduziert, während das zweite Sauerstoffatom in das Substrat eingeführt wird. Die Übertragung der für die Oxidation erforderlichen Elektronen auf Cytochrom P450 kann mittels zweier verschiedener Coenzyme

erfolgen. Sowohl die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase als auch Cytochrom b_5 sind am Elektronentransfer beteiligt.

1. NADPH-Cytochrom P450 Reduktase. Der Mechanismus der Oxygenierung beinhaltet vor allem das Zusammenspiel von Cytochrom P450-Enzymen mit der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase als Elektronenlieferant. Die Reduktase erhält ihrerseits die Elektronen bevorzugt durch das Cosubstrat NADPH [Testa, 1995]. Die Interaktion von P450-Reduktase und Cytochrom P450 erfolgt durch komplementäre Ladungspaarung. Durch diese Komplexbildung können schrittweise 2 Elektronen von der P450-Reduktase, die ein Molekül FAD sowie ein Molekül FMN enthält, auf den Einelektronakzeptor P450 übertragen werden:



2. Cytochrom b_5 . Auch die Beteiligung von Cytochrom b_5 an dieser Reaktion wurde mehrfach beschrieben, wobei teilweise sehr kontroverse Effekte beobachtet wurden [Perret, 1998]. Cytochrom b_5 besitzt ein Hämgerüst ähnlich wie das P450 und ist nur zur einfachen Elektronenübertragung befähigt. Cytochrom b_5 wird seinerseits durch die NADH-Cytochrom b_5 Reduktase reduziert, die NADH als Reduktionsäquivalent bevorzugt. Cytochrom b_5 ist ein physiologischer Elektronenüberträger u.a. für verschiedene Desaturasen [Testa, 1995], die Prostaglandin Synthase Reduktase [Strittmatter *et al.*, 1982] und für Methämoglobin [Hultquist and Passon, 1971]. Der Transfer des 2. Elektrons auf P450 während der Oxygenierung kann auch durch Cytochrom b_5 erfolgen [Lewis and Pratt, 1998].



Cytochrom b_5 besitzt je nach P450-Isoenzym und nach Art des Substrates einen stimulierenden, hemmenden oder keinen Effekt auf die Oxygenierung [Perret, 1998]. Zum einen konnten stimulierende Effekte nur in Anwesenheit des Häms im Cytochrom b_5 beobachtet werden, was für seinen Eingriff in den Redoxprozeß spricht

[Schenkman und Jansson, 1999], zum anderen wurde aber auch von positiven Effekten durch Cytochrom b_5 mit inaktivem Häm berichtet, wodurch eine Beteiligung am Redoxprozeß wiederum ausgeschlossen wird [Yamazaki, 1996a]. Wahrscheinlich spielen beide Faktoren eine Rolle.

Es wird ein intensiver Elektronenaustausch zwischen Cytochrom b_5 und P450 postuliert, bei dem das Cytochrom b_5 auch die Rolle des Elektronenakzeptors übernehmen kann. Hierdurch kommt es zu dem beobachteten Eingriff von Cytochrom b_5 in den Redoxprozeß und das Verhältnis von Produktbildung zu Entkopplung wird gesteigert. Dieses äußert sich in vermehrter Elektronenübertragung auf das Substrat und verminderter Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies wie Superoxid oder Wasserstoffperoxid während des Oxygenierungszyklus [Perret, 1998]. Es wird die Bildung eines heterodimeren Komplexes zwischen Cytochrom b_5 und P450 angenommen, wodurch zwei Elektronen gleichzeitig von der P450-Reduktase auf diesen Komplex übertragen werden können. Somit wäre nur eine anstelle von zwei Interaktionen der P450-Reduktase mit dem P450-Enzym erforderlich [Schenkman, 1999].

Es gibt aber auch Hinweise darauf, daß die stimulierenden Effekte des Cytochrom b_5 auf die P450-vermittelte Oxidation einiger Substrate nicht durch den Eingriff in den Redoxprozeß zustande kommen, sondern andere Ursachen besitzen. Guengerich [1998] berichtet über eine ebenso stimulierende Wirkung von hämfreiem Cytochrom b_5 auf die Testosteron- und Nifedipin-Hydroxylierung im rekonstituierten System mit CYP3A4 und der P450-Reduktase. Hier wurde die Affinität des Substrates zum Enzym in Anwesenheit von Cytochrom b_5 erhöht. Weiterhin wurde beobachtet, daß die Interaktion der P450-Reduktase mit Cytochrom P450 durch die Komplexbildung von P450 mit Cytochrom b_5 erleichtert wurde [Yamazaki, 1996]. Cytochrom b_5 ist über eine lipophile Aminosäuresequenz fest in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verankert. Diese membranbindende Domäne spielt ebenfalls eine große Rolle, da ohne sie ein Verlust der stimulierenden Wirkung von Cytochrom b_5 beobachtet wurde [Guryev, 2001].

Auf dem Cytochrom P450-Enzym wurden unterschiedliche, teilweise überlappende Bindungsstellen für Cytochrom b_5 und die P450-Reduktase gefunden [Bridges,

1998]. Hierdurch wird die Ausbildung binärer oder ternärer Komplexe aus P450, P450-Reduktase und Cytochrom b_5 ermöglicht [Ingelman-Sundberg, 1984]. Cytochrom b_5 besitzt sehr unterschiedliche Effekte auf verschiedene P450-Isoenzyme, wodurch die Vielfältigkeit seiner Funktion gezeigt wird. Der Einfluß von Cytochrom b_5 auf P450-katalysierte Oxidationen ist wahrscheinlich abhängig von der Aminosäuresequenz des jeweiligen P450-Enzyms, welche die Interaktion dieser beiden Redoxpartner beeinflusst [Schenkman, 1999].

Allgemein wird für die Oxygenierung nur die Übertragung des zweiten Elektrons von Cytochrom b_5 auf P450 beschrieben. Cytochrom b_5 besitzt ein zu geringes Redoxpotential, um bereits das erste Elektron auf Cytochrom P450 übertragen zu können. Dennoch wurde der Transfer beider Elektronen durch Cytochrom b_5 auf das P450-Enzym für die Oxidation von p-Nitrophenol [Ingelman-Sundberg, 1984] sowie auf CYP2E1 für die O-Demethylierung von 7-Ethoxycumarin beschrieben [Yamazaki *et al.*, 1996b].

Ebenfalls wichtig für die Funktion membranständiger Enzyme ist das Vorhandensein bestimmter Phospholipide. Während in Mikrosomen die Enzyme in ihrer natürlichen Biomembran verankert sind, muß diese für Studien mit gereinigten Proteinen durch geeignete Zusätze imitiert werden, da es sonst zum Verlust der Aktivität durch Aggregation mehrerer Enzyme kommt [Testa, 1995]. Enzyme können auf der Membran monomer oder als Cluster vorliegen, wobei letztere in der Regel eine höhere enzymatische Aktivität aufweisen. Sechs P450-Enzyme bilden dabei ein Cluster um ein Molekül P450-Reduktase und können so schnell miteinander interagieren. Außerdem beeinflussen Phospholipide wahrscheinlich die Substratbindung sowie die Konformation des Enzyms und damit seinen spin-Zustand [Lewis, 1998].

Sämtliche Elektronenübertragungen werden durch die Veränderung des Redoxpotentials sowie den Abstand zwischen den Redoxzentren der beteiligten Enzyme bestimmt. Dabei erfolgt die gezielte Führung des Elektronentransfers u.a. durch Substrate [Sharp, 1999].

4.1.1.2. Katalytischer Zyklus

P450-Enzyme sind Proteine mit einem Hämothiolatgerüst als prosthetischer Gruppe und einem Eisen als Zentralatom. Die Hämbindungsseite ist in allen P450-Enzymen hochkonserviert [Koymans, 1993]. Das Eisen kann einen Komplex mit insgesamt sechs Liganden eingehen. Vier Stickstoffatome des Protoporphyrinringsystems sind derart an das Eisen gebunden. Der fünfte Ligand wird aus einem Thiolatrest der Aminosäure Cystein gebildet, der die Verknüpfung des Häms mit dem Apoprotein herstellt. Dieser Schwefel ist für viele Eigenschaften des Enzyms verantwortlich und kann u.a. das Redoxpotential erheblich beeinflussen [Lewis, 1998]. Weiterhin ist der Thiolat-Rest in Kombination mit Kohlenmonoxid an sechster Koordinationsstelle für die charakteristische Absorption des reduzierten P450 bei 450 nm verantwortlich, die im Differenzspektrum deutlich zu erkennen ist und diesem Enzym seinen Namen gab [Lewis, 1998]. Ein sechster Ligand kann, muß aber nicht gebunden werden. Im Ruhezustand des Enzyms besetzt z.B. Wasser die sechste Koordinationsstelle des Eisens.

Das Zentralatom Eisen besitzt fünf 3d-Elektronen, die in zwei unterschiedlichen Zuständen in den 3d-Orbitalen angeordnet vorliegen können. Je nach Anlagerung eines 6. Liganden findet eine Aufspaltung der Energieniveaus der fünf 3d-Orbitale statt. Dabei befinden sich drei der Orbitale zwischen den Bindungsachsen und sind daher energetisch begünstigt, während die restlichen zwei genau auf den Achsen liegen und ein höheres Energieniveau besitzen. Das Ausmaß dieser Energieaufspaltung ist abhängig von der Bindung eines axialen Liganden an die 6. Koordinationsstelle des Eisens und von der Art dieses Bindungspartners. Besetzen alle fünf d-Elektronen jeweils nur die drei energetisch günstigeren Orbitale, so liegen vier Elektronen gepaart und eins ungepaart vor. Diesen Zustand bezeichnet man als low-spin (Abb. 4-1). Ist der Energieunterschied der fünf d-Orbitale nicht so groß, können alle d-Orbitale jeweils einzeln gemäß der Hundschen Regel besetzt werden, wobei die Elektronen parallelen spin besitzen. Dieser Zustand wird als high spin Form bezeichnet (Abb. 4-1). Beide Zustände liegen im Gleichgewicht vor, wobei der eine in Abhängigkeit von den axialen Liganden favorisiert wird. Die Liganden können so eine Verschiebung der spektralen Eigenschaften des P450-Enzyms bewirken.

Der jeweilige spin-Zustand wird jedoch nicht nur durch den Liganden kontrolliert, sondern auch durch die Häm-Geometrie sowie die Umgebung des aktiven Zentrums, und kann durch Substrate oder pH-Verschiebungen verändert werden [Lewis and Pratt, 1998]. Der jeweilige pH-Wert der Umgebung wird durch die Aminosäuren im aktiven Zentrum bestimmt.

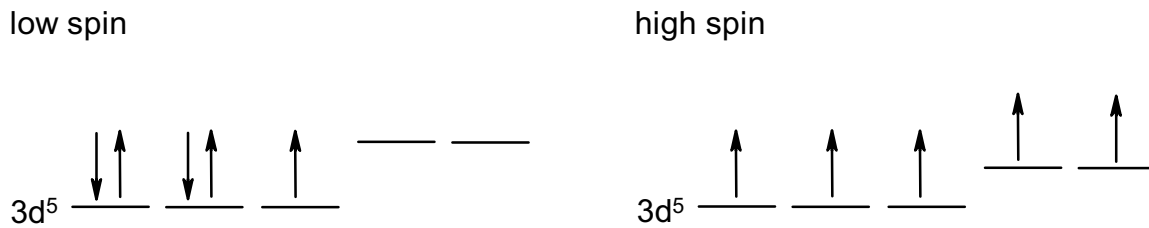


Abb. 4-1. Elektronenverteilung der fünf Außenelektronen des Eisen III in den 3d-Orbitalen im low spin und high spin Zustand.

Im Ruhezustand des Enzyms ist ein Wassermolekül bzw. ein Hydroxid-Ion an die 6. Koordinationsstelle des Eisen-III gebunden (Abb. 4-2). Gleichzeitig wird das gesamte aktive Zentrum von mehreren H_2O -Molekülen besetzt [Lewis and Pratt, 1998]. Der Wasser-Ligand bewirkt eine stärkere Aufspaltung der Energieniveaus der d-Orbitale, woraus ein low-spin Zustand resultiert. Das Zentralatom Eisen liegt in der durch das Porphyringerüst gebildeten planaren Ebene [Testa, 1995]. Im Ruhezustand besitzt das P450-Enzym ein sehr niedriges Redoxpotential von etwa -360 bis -300 mV. Das Redoxpotential ist umso positiver, je weniger exponiert die Hämgruppe zum Solvens liegt [Lewis, 1998].

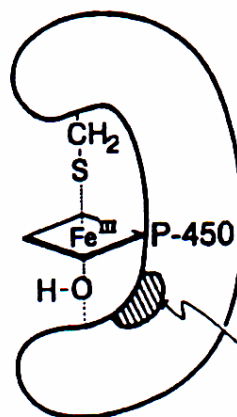


Abb. 4-2. Bindung von OH an Eisen III des Hämgerüsts von Cytochrom P450.

1. Substratbindung. Die Bindung eines Substrats (**1**) an die hydrophobe Substratbindungstasche, die sich in räumlicher Nähe zum Häm befindet, bewirkt ein Verdrängen des Wassers von der 6. Koordinationsstelle des Eisens sowie der übrigen Wassermoleküle im aktiven Zentrum je nach Größe und Lipophilie des Substrats [Lewis and Pratt, 1998]. Da durch die Substratbindung somit mehrere Wassermoleküle durch Desolvatisierung freigesetzt werden, stellt dieser Vorgang einen entropiegesteuerten Prozeß dar [Lewis, 1998]. Der Zugang eines Substrats zur hydrophoben Bindungstasche erfolgt über sogenannte Zugangstunnel, wobei jedes Enzym wahrscheinlich je nach Lipophilie des Substrates mehrere Wege besitzt [Koymans, 1993; Poulos, 1995].

Die Bindung des Substrats erfolgt über Wechselwirkungen mit verschiedenen Aminosäureresten des Enzyms [Ravichandran, 1993]. Die Bindungstasche ist für jedes P450-Isoenzym spezifisch und somit mitbestimmend für die Substratspezifität [Poulos, 1995]. Die Substratbindung kann weiterhin eine Verminderung der thermischen Mobilität des P450-Enzyms bewirken [Ortiz de Montellano, 1995], wodurch die Bindung eines zweiten Substrats verhindert wird. Für das CYP3A4 sind hingegen mehrere Bindungsstellen bekannt, welche gleichzeitig besetzt werden können [Khan *et al.*, 2002]. Weiterhin kommt es zu einer Konformationsänderung, welche die Interaktionen mit der P450-Reduktase bzw. Cytochrom b_5 fördert [Lewis and Pratt, 1998]. Durch das Fehlen des Wasserliganden werden die Eigenschaften des nun pentakoordinierten Häms im wesentlichen durch den Thiolatrest in Position fünf bestimmt. Dieser bewirkt eine Verminderung der Energieaufspaltung der d-Orbitale des Eisens und favorisiert somit die Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung high spin [Lewis, 1998]. Da diese Form des Eisens einen erhöhten Ionenradius besitzt, wurde eine Bewegung des Hämeisens aus der Ebene des Porphyrinringsystems in Richtung des Schwefelliganden beobachtet, wodurch die Bindung eines 6. Liganden deutlich erschwert wird [Lewis, 1998].

Durch Veränderung des spin-Zustandes und durch die erniedrigte Dielektrizitätskonstante durch Desolvatisierung wird das Redoxpotential des Cytochrom P450-Enzyms, welches im Ruhezustand zwischen -360 und -300 mV liegt, um ca. 100 mV angehoben [Lewis, 1998]. Die Übertragung eines Elektrons durch die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase mit einem Redoxpotential von

-270 mV wird dadurch erst ermöglicht. Zahlreiche Autoren postulieren eine Korrelation von spin-Zustand und Redoxpotential [Lewis, 1998]. Die Bindung des Substrats stellt einen wichtigen Initiationsschritt des P450-Zyklus dar.

Bisher konnten drei verschiedene Arten der Substratbindung spektroskopisch nachgewiesen werden. Typ I-Spektren erhält man durch die Bindung des Substrats an die hydrophobe Substratbindungstasche des Enzyms in räumlicher Nähe des aktiven Zentrums. Diese Art der Bindung stellt die am meisten verbreitete dar. Typ II-Spektren entstehen durch Ligandenbindung des Substrats an das Hämeisen, wobei es sich meist um Substanzen mit freiem Elektronenpaar handelt. Diese Form der Bindung wird für viele Inhibitoren beobachtet, es kommt nicht zu einer Verschiebung des spin Gleichgewichts in Richtung high spin. Schließlich wurden reverse Typ I- (modifizierte Typ II) Spektren beschrieben, deren Entstehung man bislang noch nicht klären konnte. Auch hier ist die low spin Form favorisiert, entweder durch eine Substratbindung ohne Verdrängung des Wassers von der 6. Koordinationsstelle oder durch eine Häm-Liganden-Interaktion. Die meisten reversen Typ I-Substrate enthalten einen Sauerstoff oder Stickstoff, der zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken befähigt ist [Lewis, 1998].

2. Erste Reduktion. Durch die Veränderung des Redoxpotentials nach Substratbindung erfolgt rasch die erste Elektronenübertragung von der P450 Reduktase auf das P450-Enzym, wodurch das Eisen III zu Eisen II reduziert wird (2). Im Substrat-ungebundenen Zustand würde P450 ein viel zu niedriges Redoxpotential besitzen, um reduziert werden zu können. Erst durch die Anlagerung des Substrates und der damit verbundenen Änderung des Redoxpotentials besitzt das P450-Enzym ein positiveres Potential als der Elektronenüberträger, wodurch die Übertragung eines Elektrons ermöglicht wird. Dieser Kontrollmechanismus verhindert den Elektronentransfer in Abwesenheit eines zu oxygenierenden Substrates und somit die Verschwendung wertvoller Reduktionsäquivalente.

Die Elektronenübertragung erfolgt nach Komplexbildung zwischen Cytochrom P450 und der P450-Reduktase [Goepfert, 1995]. Dabei kommt es zur Ausbildung ionischer Wechselwirkungen durch negativ geladene Aminosäurereste der P450-Reduktase sowie positive Aminosäurereste des P450 [Koymans, 1993]. Die Geschwindigkeit der

Elektronenübertragung hängt vom Abstand dieser beiden Redoxpartner, der Dielektrizitätskonstanten des Mediums sowie von den molaren Konzentrationen der beteiligten Enzyme ab [Lewis and Pratt, 1998]. Über die Beteiligung eines hochkonservierten Tryptophanrests im aktiven Zentrums am Elektronentransfer durch Wasserstoffbrückenbindungen oder $\pi\pi$ - Wechselwirkungen wird spekuliert [Lewis and Pratt, 1998].

3. Sauerstoffbindung. Sauerstoff ist ein Diradikal und zeigt wie auch CO und CN eine hohe Affinität zum Eisen II, während es nicht in der Lage ist, an Eisen III zu binden. Die Bindung von O₂ an Eisen II (**3**) erfolgt angular und bewirkt eine Änderung des spin-Gleichgewichts zugunsten des low spins [Lewis and Pratt, 1998]. Sauerstoff besitzt eine Zugangsstelle zum Häm, die eine Art Tunnel für kleine Moleküle durch eine unübliche Deformation der α -Helix beim Häm darstellt [Lewis and Pratt, 1998]. Zudem wurde eine Bindungstasche für molekularen Sauerstoff in P450_{cam} entdeckt, wobei unklar bleibt, zu welchem Zeitpunkt diese besetzt wird [Koymans, 1993].

Nach O₂-Bindung an das Hämeisen wird der FeII-O₂-Komplex mesomeriestabilisiert, wobei der stabilere Fe III-O₂⁻-Komplex (Superoxidradikal) eine mesomere Form darstellt (**3a**) [Lewis and Pratt, 1998]. Dieser Eisen-Superoxidkomplex wird zum einen durch die Bindung eines Substrates stabilisiert [Lewis 1998], zum anderen durch die Erhöhung der Elektronendichte am Sauerstoff durch den Thiolat-Liganden an fünfter Koordinationsstelle [Testa, 1995].

Wird an dieser Stelle kein zweites Elektron übertragen, kommt es zu einer Entkopplung des katalytischen Zyklus und das Superoxid-Radikal-Anion wird freigesetzt (**3b**). Dieser Prozeß wird durch Wassermoleküle im aktiven Zentrum begünstigt [Goeptar, 1995]. Eine solche Entkopplungsreaktion spielt für physiologische Stoffwechselprozesse eine große Rolle, vor allem für die Lipidperoxidation durch CYP2E1. Ein Superoxidradikal ist hierbei ein potenter Initiator dieser Reaktion [Goeptar, 1995]. Die Sauerstoffbindung und die Entstehung des Superoxid-Radikals konnten mittels Ramanspektroskopie nachgewiesen werden [Ortiz de Montellano, 1995].

4. Zweite Reduktion und Produktbildung. Ein zweites Elektron kann ebenfalls durch die NADPH-Cytochrom P450 Reduktase übertragen werden, aber auch das Coenzym Cytochrom b_5 ist hierzu in der Lage [Lewis, 1998; Testa, 1995]. Dieser Prozeß läuft relativ langsam ab und wird daher vielfach als geschwindigkeits bestimmender Schritt diskutiert [Lewis and Pratt, 1998]. Durch die Übertragung eines Elektrons auf den Eisen III-Superoxidradikal-Komplex entsteht ein Eisen III- Peroxykomplex. Die O-O-Bindung kann nun entweder homolytisch oder heterolytisch gespalten werden, wodurch wahrscheinlich ein Oxen (Oxokomplex, Abb. 44) unter Freisetzen eines Wassermoleküls entsteht (4) [Testa, 1995]. Beide Arten der O-O-Spaltung wurden in P450-Modellen beobachtet, konnten direkt jedoch noch nicht gezeigt werden [Ortiz de Montellano, 1995]. Die Entstehung eines Eisen-Oxen-Komplexes konnte mittlerweile durch Kombination von Röntgenstrukturanalyse, Zeitauflösung und Tieftemperaturbedingungen strukturell nachgewiesen werden [Schlichting *et al.*, 2000].

Der gebildete Oxokomplex kann mehrere mögliche Resonanzstrukturen annehmen und stellt wohl in den meisten Fällen die aktive Sauerstoffspezies dar.

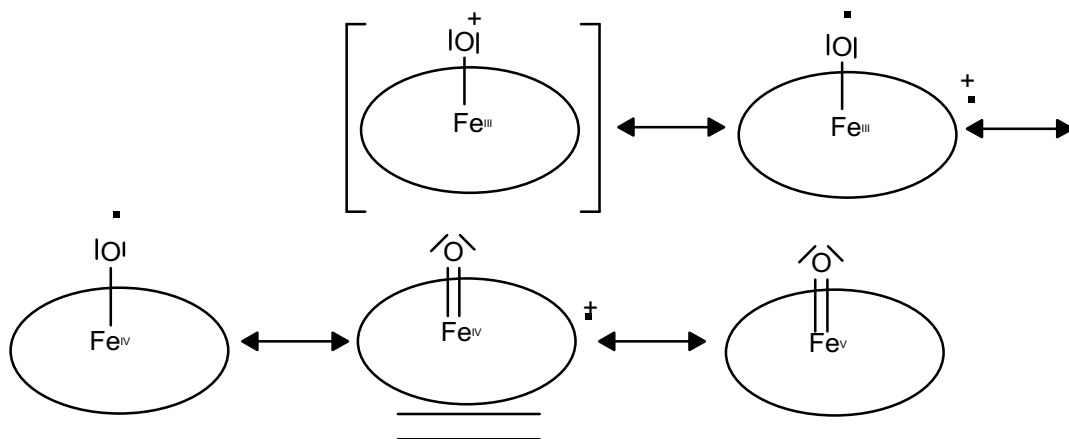


Abb. 4-4. Mögliche Zwischenstrukturen des Oxokomplexes während des oxidativen katalytischen Zyklus von Cytochrom P450.

Hierbei ist eine Resonanz mit dem Porphyringerüst oder mit Aminosäureresten des aktiven Zentrums möglich, da das Häm als kooperative Einheit reagieren kann [Lewis, 1998]. Das Porphyrinringsystem soll am Elektronentransfer mitbeteiligt sein [Hudecek, 2000], so daß wahrscheinlich ein Porphyrin Radikalkation vorliegt [Ortiz de

Montellano, 1995]. Das Oxen besitzt ähnliche Eigenschaften wie die Komponente I von Peroxidasen [Ortiz de Montellano, 1995]. Der Schwefelligand fungiert wieder als Stabilisator dieser reaktiven Sauerstoffspezies [Lewis, 1998].

Die oben beschriebene Spaltung des Eisen-Peroxykomplexes unter Entstehung des Oxokomplexes muß für die Oxygenierung eines Substrates nichtzwingend erfolgen. In manchen Fällen kann auch der Peroxykomplex das oxidierende Agens darstellen [Lewis and Pratt, 1998].

Für die Einführung des Sauerstoffs in das Substrat konnte kein gemeinsamer Mechanismus für P450-Enzyme festgestellt werden. Wahrscheinlich geschieht dies in Abhängigkeit vom jeweiligen Isoenzym und vom Substrat [Lewis, 1998].

An dieser Stelle des Oxygenierungszyklus besteht die Gefahr einer weiteren Entkopplung, die zur Freisetzung von Wasserstoffperoxid führt (**4a**). Dies geschieht vor allem in Abwesenheit von Substraten oder durch unzureichende Bindung der Substanzen [Testa, 1995] und wird zusätzlich durch die Anwesenheit von Wasser in der Nähe des aktiven Zentrums gefördert.

5. Produktfreisetzung. Die Hydrophilie des Substrats wird durch die Einführung eines Sauerstoffatoms gesteigert, wodurch die Hämumgebung besser solvatisiert werden kann. Dadurch kann ein H₂O-Molekül erneut als 6. Ligand an das Eisen III binden, womit der Ausgangszustand wiederhergestellt wäre (**5**). Durch die Oxygenierung entstehen insgesamt 1 mol oxygeniertes Substrat sowie 1 mol Wasser. Einigen Aminosäuren des aktiven Zentrums kommt wieder eine Schlüsselfunktion zu, da sie das Ausmaß der Solvation des aktiven Zentrums während der einzelnen Katalyseschritte beeinflussen [Lewis and Pratt, 1998]. Auch die Produktfreisetzung ist noch nicht ausreichend aufgeklärt. Guengerich entdeckte z.B. für das CYP1A2 einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt noch nach der Produktbildung, der jedoch keine Erklärung fand [Guengerich, 2001].

An der gesamten Monooxygenierungsreaktion sind wahrscheinlich zahlreiche Aminosäurereste des Apoproteins beteiligt. Diese Vermutung konnte durch gerichtete Mutations-Studien bestätigt werden [Poulos, 1995]. Auch konnte eine Veränderung der Struktur in der Nähe des aktiven Zentrums während des gesamten

katalytischen Zyklus beobachtet werden [Guengerich, 2001]. Weitere Aufklärung zum Mechanismus der Monooxygenierung durch P450 sollen Studien von Kristallstrukturen sowie von gelösten Strukturen der Enzyme, gerichtete Mutagenese-Studien, chemische Modifikationen, die Erforschung von Substrat-Interaktionen oder auch simple Computer-Chemie erbringen. Auch die Verbesserung der spektroskopischen Möglichkeiten könnte z.B. zum Nachweis der reaktiven Sauerstoffspezies führen [Koymans, 1993; Guengerich *et al.*, 1998]. Bisher bekannt ist die Beeinflussung der Elektronenübertragung durch die Konformation des Enzyms, den Oxidationsgrad, den spin-Zustand, die Substrat-Bindung sowie die Anwesenheit von Phospholipiden [Testa, 1995].

Aus all diesen zusammengetragenen Erkenntnissen läßt sich folgern, daß die Monooxygenierung durch P450-Enzyme im allgemeinen gleich abläuft. Dennoch gilt ein völlig einheitlicher katalytischer Mechanismus als unwahrscheinlich. Er wird u.a. von dem jeweiligen Isoenzym, vom Substrat sowie von den Verhältnissen der Umgebung bestimmt [Poulos, 1995].

4.1.2. Stand der Vorarbeiten

Bei der Untersuchung der *N*-Hydroxylierung von stark basischen stickstoffhaltigen funktionellen Gruppen fiel auf, daß sich solche Reaktionen zwar *in vivo* nachweisen lassen, das Vorkommen entsprechender *N*-hydroxylierter Metaboliten im Organismus aber eher gering ist. Eine Erklärung wird in der sehr schnellen Rückreduktion primärer *N*-oxygenierter Metaboliten gesehen. Die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin wurde erstmals 1988 unabhängig voneinander in zwei Arbeitskreisen beschrieben [Clement *et al.*, 1988; Hauptmann *et al.*, 1988].

Im Arbeitskreis Clement wurde versucht, das für die Reduktion von Amidoximen verantwortliche Enzym zu identifizieren. Dieses Enzym wurde gemäß seiner charakteristischen Reaktion als Benzamidoxim-Reduktase bezeichnet. Die Benzamidoxim-Reduktase wird nicht durch Sauerstoff gehemmt und zeigt damit eine ausgeprägte Analogie zu einer Hydroxylamin-Reduktase, die bereits 1974 von Kadlubar und Ziegler beschrieben wurde [Kadlubar und Ziegler, 1974]. Diese

Autoren geben ein Enzymsystem an, welches zur Entfaltung der optimalen Aktivität drei Komponenten benötigt. Während die ersten beiden, Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase, von ihnen identifiziert werden konnten, ließ sich das dritte benötigte Protein nicht näher charakterisieren.

Im Arbeitskreis Clement gelang es dann, auch diese dritte Komponente aus Schweineleber zu isolieren [Clement *et al.* 1997]. Zur näheren Charakterisierung wurde das Protein enzymatisch gespalten und die Aminosäuresequenzen von mehreren Fragmenten bestimmt. Diese zeigten hohe Übereinstimmungen mit solchen von Cytochrom P450-Isoenzymen der Unterfamilie 2D [Clement *et al.* 1997]. Analogien zu anderen P450-Isoenzymen waren weniger auffällig. So ließ sich die Reduktion beispielsweise nicht durch die Anwesenheit von Cyanidlonen als unspezifische P450-Inhibitoren hemmen [Lomb, 1995]. Octylamin hingegen, ein weiterer unspezifischer P450-Inhibitor, ergab jedoch in 1 mM Konzentration eine um 30 % erniedrigte Reduktase-Aktivität [Möller, 1997].

Auch weitere Untersuchungen dieses Proteins zeigten, daß es sich aufgrund des Kohlenmonoxid-Spektrums und typischer P450 abhängiger Reaktionen um ein P450-Isoenzym handelt. Die für humanes CYP2D6 spezifische O-Demethylierung von Dextromethorphan im rekonstituierten System mit NADPH und der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase konnte detektiert werden [Möller, 1997]. Ein P450 Enzym der Unterfamilie 2D ist bis dahin noch nicht aus Schweineleber gereinigt worden. Es wurde somit ein ganz neues System entdeckt, welches in der Lage ist, Stickstoffreduktionen durchzuführen. Das Zusammenspiel von Cytochrom b_5 und b_5 -Reduktase mit einem P450 Isoenzym wurde bisher nur für oxidative, aber noch nicht für reduktive Umwandlungen beschrieben [Clement *et al.*, 1997].

Rekonstituierte Systeme mit den drei Komponenten aus Schweineleber katalysieren unter optimalen Bedingungen die Reduktion vom Benzamidoxim sehr effizient. Es wurde ebenfalls gezeigt, daß diese Reduktion nur in Gegenwart aller drei Komponenten mit sehr hoher Umsatzrate verläuft. Bei Abwesenheit eines oder zweier Komponenten sind die Umsatzraten vergleichsweise gering, wobei NADH eindeutig das bevorzugte Cosubstrat darstellt [Clement *et al.*, 1997]. Der Einsatz eines Antikörpers gegen Cytochrom b_5 , der die Reduktion stark zu hemmen

vermochte, bestätigte die Beteiligung dieses Coenzym an der Reaktion [Lomb, 1995].

Weitere *N*-hydroxylierte Substrate wie *N*-Hydroxydebrisoquin, Guanoxabenz und *N*-Methylhydroxylamin wurden durch das Enzymsystem reduziert [Lomb, 1995]. Ein Mechanismus der Reduktion wurde von Lomb postuliert, in dem Cytochrom b_5 durch die NADH-Cytochrom b_5 Reduktase zunächst reduziert wird und anschließend eine Wechselwirkung mit dem Cytochrom P450 über komplementäre Ladungspaarung eingeht. Dieser Fe^{II} - Fe^{III} -Komplex kann durch ein weiteres Elektron der b_5 -Reduktase zum Fe^{II} - Fe^{II} -Komplex reduziert werden. Die beiden Elektronen können so simultan auf das Substrat übertragen werden [Lomb, 1995]. Dazu passend führten steigende Mengen an Cytochrom b_5 zum Inkubationsansatz zu linear ansteigenden Umsetzungsraten, während steigende b_5 -Reduktase-Konzentrationen schnell in einer Sättigung resultierten [Lomb, 1995]. Während Cytochrom b_5 einen stabilen Komplex mit dem P450-Enzym eingeht, kann die b_5 -Reduktase mit mehreren Molekülen Cytochrom b_5 schnell hintereinander interagieren, so daß eine geringere Menge an Reduktase ausreichend ist.

Weitere Studien zur näheren Charakterisierung dieses Enzymsystems, die auch auf den Mechanismus schließen lassen sollten, wurden von Lomb und Möller durchgeführt. So wurde die Reduktion von Benzamidoxim in Anwesenheit von Dextromethorphan um etwa 30 % gesenkt, was auf eine Substrathemmung durch Konkurrenz um das gleiche aktive Zentrum schließen läßt [Möller, 1997]. Die Reduktase-Aktivität des Enzymsystems konnte durch Zusatz von Superoxiddismutase, die während Oxidationsreaktionen entstehendes Superoxid zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid zersetzt, um 50 % gesteigert werden. Die Beteiligung von Superoxid an der Reduktion kann somit ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurden verminderte Umsetzungsraten in Anwesenheit der NADPH Cytochrom P450 Reduktase beobachtet sowie eine weitere Verminderung durch NADPH. Dieser Effekt wurde jedoch durch Zusatz von Superoxiddismutase wieder aufgehoben [Möller, 1997]. Daraus läßt sich schließen, daß es hierbei zu einer Konkurrenzreaktion zwischen oxidativen und reduktiven Prozessen kommt. Eine

weitere Oxidation von Benzamidoxim durch Superoxid und anschließendem Zerfall zu Benzamid und NO konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [Möller, 1997].

Substratbindungsspektren ergaben kein eindeutiges Typ I oder Typ II-Spektrum, sondern eine Mischform aus beidem, so daß keine direkten Aussagen zur Bindung des Substrats am Enzym gemacht werden konnten [Möller, 1997]. In Abwesenheit von Benzamidoxim wurde das P450-Enzym 2D nicht durch NADH, Cytochrom b_5 und die b_5 -Reduktase reduziert, was die fehlende Absorption bei 450 nm im CO-Differenzspektrum zeigte. Die Reduktion erfolgte in Abwesenheit eines Substrats jedoch durch NADPH und die P450-Reduktase [Möller, 1997].

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es sich um ein Enzymsystem aus den drei Komponenten Cytochrom b_5 , NADH-Cytochrom b_5 Reduktase sowie P450 2D (Schwein) handelt, welches unter aeroben Bedingungen *N*-hydroxylierte Verbindungen zu reduzieren vermag. In Abwesenheit eines Substrates findet allerdings keine Reduktion des P450-Enzyms durch Cytochrom b_5 und b_5 -Reduktase statt. Bevorzugtes Cosubstrat der Reduktion ist NADH, die höchsten Umsatzraten wurden mit einem pH-Wert des Inkubationspuffers von 6.3 erzielt. Das P450-Isoenzym 2D war zur *O*-Demethylierung von Dextromethorphan befähigt, wobei die Umsetzung in Konkurrenz zur Reduktion von Benzamidoxim stand. Eine Steigerung der Reduktaseaktivität wurde nach Zusatz an Superoxiddismutase zum Inkubationsansatz beobachtet. Die Umsetzung von Benzamidoxim zum Benzamidin wurde nicht durch Cyanid-Ionen gehemmt, was normalerweise für P450-Reaktionen der Fall ist. Substratbindungsspektren ergaben eine Mischform aus Typ I und Typ II-Spektren.

4.1.3. Zielsetzung

Aufgrund der besonderen Bedeutung *N*-hydroxylierter stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen für die Pharmakologie und Toxikologie (s. 1.4) soll der Mechanismus der Benzamidoxim-Reduktase weiter untersucht werden. Es besteht z.B. noch keine Klarheit darüber, ob bei der Bildung der entsprechenden dehydroxylierten Verbindungen - wie Amidinen und Guanidinen - isolierbare Zwischenstufen durchlaufen werden. Es ist bisher auch noch nicht festgestellt worden, ob die Reaktionen nur in Gegenwart von Sauerstoff ablaufen. Hierzu sollen Umsetzungen unter sauerstofffreier Atmosphäre durchgeführt werden. Wenn O_2 für die Umsetzungen notwendig ist, könnte man postulieren, daß in Gegenwart des P450 Enzyms und von Sauerstoff zunächst die *N*-hydroxylierten Verbindungen ein zweites Mal hydroxyliert werden und eine solche Zwischenstufe zerfällt. Die in Abb. 45 gezeigte dihydroxylierte Verbindung würde am Beispiel von Benzamidoxim gebildet werden und soll zu Vergleichszwecken zunächst synthetisch gewonnen werden.

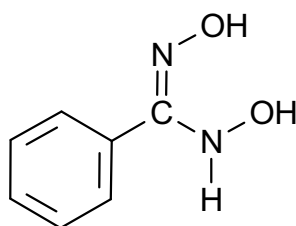


Abb. 4-5. *N,N'*-Dihydroxybenzamidin.

Die Beteiligung von Cytochrom b_5 an der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen konnte durch Zusatz eines Antikörpers gegen Cytochrom b_5 bestätigt werden. Weiterhin konnte die 3. unbekannte Proteinkomponente dieses reduktiven Enzymsystems als P450-Isoenzym identifiziert werden. Nun soll auch die Beteiligung der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase an der Biotransformation von Benzamidoxim zu Benzamidin weiter untermauert werden. Hierzu sollen weitere Inhibitorstudien mit Hemmstoffen der b_5 -Reduktase durchgeführt werden.

Die gegenwärtigen Überlegungen gehen davon aus, daß die einzelnen Komponenten, NADH-Cytochrom b_5 Reduktase, Cytochrom b_5 und Cytochrom P450,

wie in Abb. 4-6 angegeben, miteinander wechselwirken. Durch entsprechende spektroskopische Untersuchungen soll überprüft werden, ob der Elektronenfluß zutreffend ist.

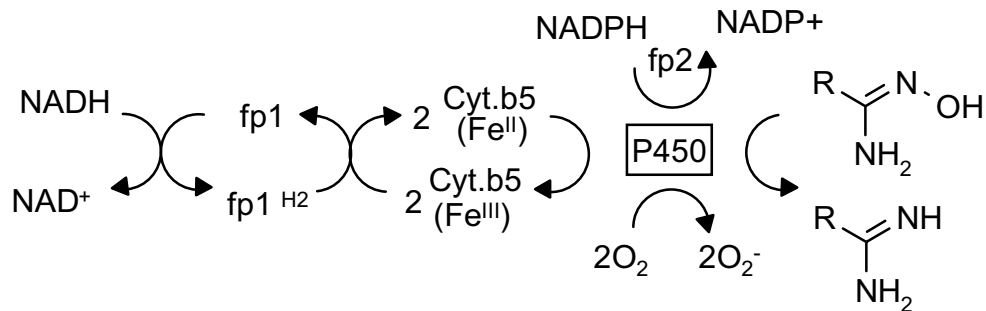


Abb. 4-6: Postulierter Mechanismus der Benzamidoxim-Reduktase [Möller, 1997].

fp1: NADH-Cytochrom b₅ Reduktase

fp2: NADPH-Cytochrom P450 Reduktase.

Hierzu sollen zunächst Substratbindungsspektren mit Mikrosomen, später dann mit dem gereinigten Enzym durchgeführt werden, wobei die Zugabe der Redoxpartner Cytochrom b₅ und b₅-Reduktase sowie NADH spektroskopisch verfolgt werden soll.

4.2. Methoden

4.2.1. Reduktion von Benzamidoxim unter anaeroben Bedingungen

Alle für die Inkubation benötigten Puffer und Lösungen wurden durch Begasen mit Helium von Sauerstoff befreit.

In einem Exsikkator wurde durch mehrfaches Entgasen mittels Wasserstrahlpumpe und erneutes Befüllen mit Argon eine sauerstofffreie Atmosphäre geschaffen.

Für die Umsetzung mit Mikrosomen wurden 100 µg mikrosomales Protein zusammen mit 0.5 mM Benzamidoxim und 1 mM NADH in 100 mM Phosphatpuffer pH 6.3 auf Eis im Exsikkator zusammenpipettiert. Für die Reduktion im rekonstituierten System erfolgte ein Vermischen von 5 µg gereinigter Benzamidoxim-Reduktase (CYP2D), 50 pmol Cytochrom b₅, 0.35 U NADH-Cytochrom b₅ Reduktase, 40 µM DLPC sowie ebenfalls 0.5 mM Benzamidoxim und 1 mM NADH in dem gleichen Puffer. Das Inkubationsvolumen betrug jeweils 150 µl. Beide Umsetzungen fanden in 1.5 ml Reaktionsgefäßen in sauerstofffreier Atmosphäre statt. Nach sorgfältigem Verschließen der Gefäße wurden diese in ein 37 °C Schüttelwasserbad überführt und 33 min inkubiert.

Um die anaeroben Bedingungen während der gesamten Versuchsdurchführung aufrecht zu erhalten, wurde hierbei auf eine Vorinkubation verzichtet. Das Abstoppen erfolgte sofort nach Öffnen der Gefäße durch Zusatz von 150 µl Methanol. Gleichzeitig wurde eine Kontrollinkubation unter aeroben Bedingungen wie unter 2.2.1.3.6.1. beschrieben durchgeführt. Nach Zentrifugation wurden alle Ansätze mittels HPLC quantifiziert (2.2.1.3.6.2.).

Parallel hierzu wurden Ansätze mit gleicher Zusammensetzung unter aeroben Bedingungen, wie oben beschrieben, inkubiert und quantifiziert.

4.2.2. Hemmstudien mit 5-Propyl-2-thiouracil

Einem Inkubationsansatz mit Schweinelebermikrosomen (analog 2.2.1.3.6.1.) wurden steigende Mengen an 5-Propyl-2-thiouracil zugesetzt, um dessen Einfluß auf die Reduktion von Benzamidoxim zu überprüfen. Es wurde 300 µg mikrosomales

Protein mit unterschiedlichen Mengen an 5-Propyl-2-thiouracil im Bereich von 10 bis 100 μM in 100 mM Phosphatpuffer pH 7.4 versetzt und 10 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Nach Beimischen von 0.5 mM Benzamidoxim wurde weitere 3 min vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Nach 30 min wurde der 300 μl -Ansatz mit der gleichen Menge Methanol wieder abgestoppt, zentrifugiert und wie unter 2.2.1.3.6.2. beschrieben mittels HPLC quantifiziert.

4.2.3. Spektroskopische Untersuchungen

Es wurden Substratbindungsspektren in Anlehnung an das von Schenkman *et al.* [1967] entwickelte Verfahren vermessen.

4.2.3.1. Substratbindungsspektren mit Schweinelebermikrosomen

Die Untersuchungen wurden in 100 mM Phosphatpuffer pH7.4 durchgeführt. Nach Verdünnen der Schweinelebermikrosomen auf einen P450-Gehalt von 1.14 nmol/ml wurden je 800 μl dieser Lösung in Quarzküvetten gefüllt. Der Probenküvette wurde das zuvor in Phosphatpuffer pH 7.4 gelöste Substrat bis zu einer Endkonzentration von 2 mM und einem Endvolumen von 1000 μl hinzugefügt. Die Referenzküvette wurde entsprechend mit Phosphatpuffer pH 7.4 bis zum gleichen Volumen aufgefüllt, so daß jedesmal 0.9 nmol mikrosomales P450 für die Messung verwendet wurden. Es wurden Spektren im Bereich von 350 nm bis 460 nm bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Studie wurde mit den Substraten Octylamin, Benzamidoxim, p-Chlor-, p-Brom-, p-Methyl-, p-Methoxy-, p-Cyano- und p-Nitrobenzamidoxim durchgeführt.

4.2.3.2. Substratbindungsspektren mit der gereinigten Benzamidoxim-Reduktase

Die Aufnahme der Spektren wurde ebenfalls in 100 mM Phosphatpuffer pH 7.4 durchgeführt. Hierfür wurde eine gereinigte Benzamidoxim-Reduktase-Fraktion (CYP2D) auf einen P450-Gehalt von 0.3 nmol/ml eingestellt und jeweils 1 ml dieser Verdünnung in Quarzküvetten gefüllt. Der Probenküvette wurde 2 mM p-Methylbenzamidoxim zugesetzt, während sich in der Referenzküvette lediglich Enzym-Puffer-Lösung befand. Spektren im Bereich von 350 nm bis 460 nm wurden aufgenommen und es wurde ein Differenzspektrum gebildet. Anschließend wurde in die Probenküvette zu der Benzamidoxim-Reduktase (CYP2D) und dem Substrat 36.85 nmol Cytochrom b_5 sowie 3.3 U NADH-Cytochrom b_5 Reduktase gegeben. Es wurde erneut ein UV/VIS-Spektrum im genannten Wellenlängenbereich aufgenommen und das Differenzspektrum mit der reinen Enzym-Puffer-Lösung gebildet. Schließlich wurde dem Ansatz in der Probenküvette noch eine 1 mM Konzentration an NADH hinzugefügt, bevor dieser wiederum spektroskopisch zwischen 350 und 460 nm vermessen und ein Differenzspektrum, wie vorher beschrieben, gebildet wurde. Zur Kontrolle wurden die gleichen Mengen an Cytochrom b_5 und seiner Reduktase wie oben angegeben in 100 mM Phosphatpuffer pH 7.4 gelöst und im aufgeführten Wellenlängenbereich vermessen.

Die gesamte Studie wurde ebenfalls mit rekombinantem, gereinigtem CYP3A4 (Panvera) anstelle der Benzamidoxim-Reduktase (CYP2D) aus dem Schwein, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Für die Aufnahme der Spektren wurde auf einen P450-Gehalt von ca. 0.2 nmol/ml 3A4 verdünnt.

4.3. Ergebnisse

4.3.1. Reduktion von Benzamidoxim unter anaeroben Bedingungen

Die Reduktion von Benzamidoxim zum Benzamidin wurde unter aeroben sowie anaeroben Bedingungen geprüft. Dabei wurden die Umsetzungsraten zum einen in Schweinelebermikrosomen zum anderen im rekonstituierten Enzymsystem in Anwesenheit und unter Ausschluß von Sauerstoff bestimmt. Die Ergebnisse dieser Studie sind in Abbildung 4-7 zusammengefaßt.

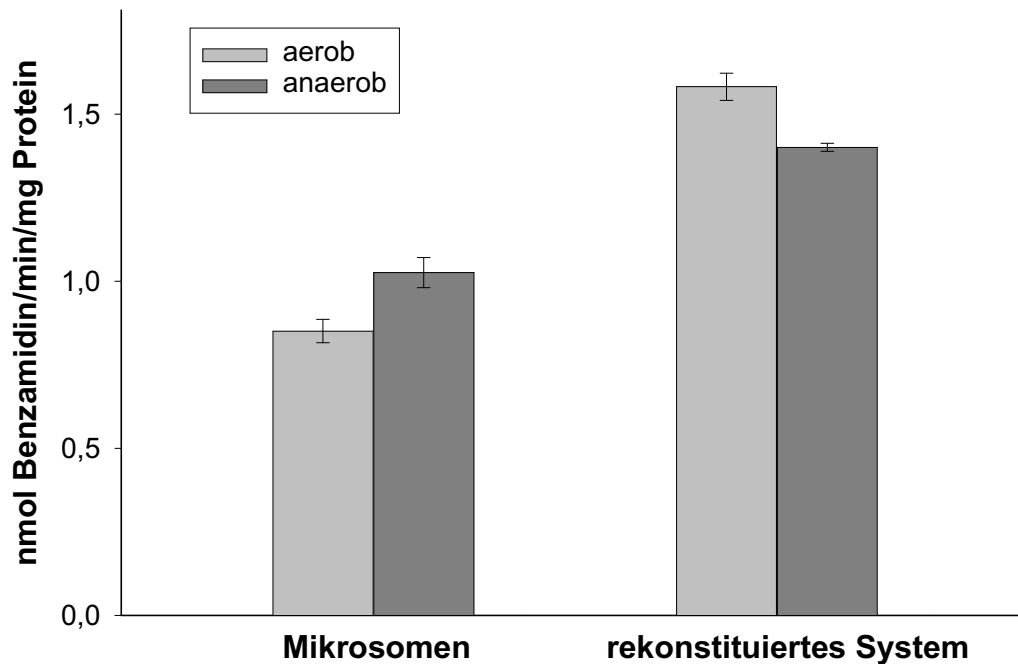


Abb. 4-7. Reduktion von Benzamidoxim durch Schweinelebermikrosomen und das rekonstituierte Enzymsystem unter aeroben und anaeroben Bedingungen ($n = 4$).

In Schweinelebermikrosomen wurde eine Reduktaseaktivität von 0.85 ± 0.04 nmol Benzamidin/min/mg Protein unter aeroben Bedingungen gemessen. Unter Sauerstoffausschluß erfolgte die Umsetzung mit einer etwas höheren Rate von 1.03 ± 0.05 nmol/min/mg. Diese leichte Steigerung der Aktivität erwies sich jedoch

als signifikant im student's t-test ($P = 0.0009$). Das rekonstituierte System reduzierte Benzamidoxim aerob mit 1.58 ± 0.04 nmol Benzamidin/min/mg Protein, während in Argonatmosphäre eine etwas geringere Aktivität von 1.40 ± 0.01 nmol/min/mg detektiert wurde. Auch hier zeigte sich der Unterschied in den Umsetzungsraten unter aeroben sowie anaeroben Bedingungen als signifikant im student's t-test ($P = 0.026$).

4.3.2. Einfluß des Hemmstoffs 5-Propyl-2-thiouracil

Die Beteiligung der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase an der Reduktion von Benzamidoxim in Schweinelebermikrosomen sollte überprüft werden. Hierfür wurde ein Hemmstoff dieses Flavoproteins, das 5-Propyl-2-thiouracil, entsprechenden Inkubationsansätzen in steigender Konzentration zugesetzt [Barham und Stratford, 1996]. Das Ergebnis dieser Hemmstudie gibt Abbildung 48 wieder.

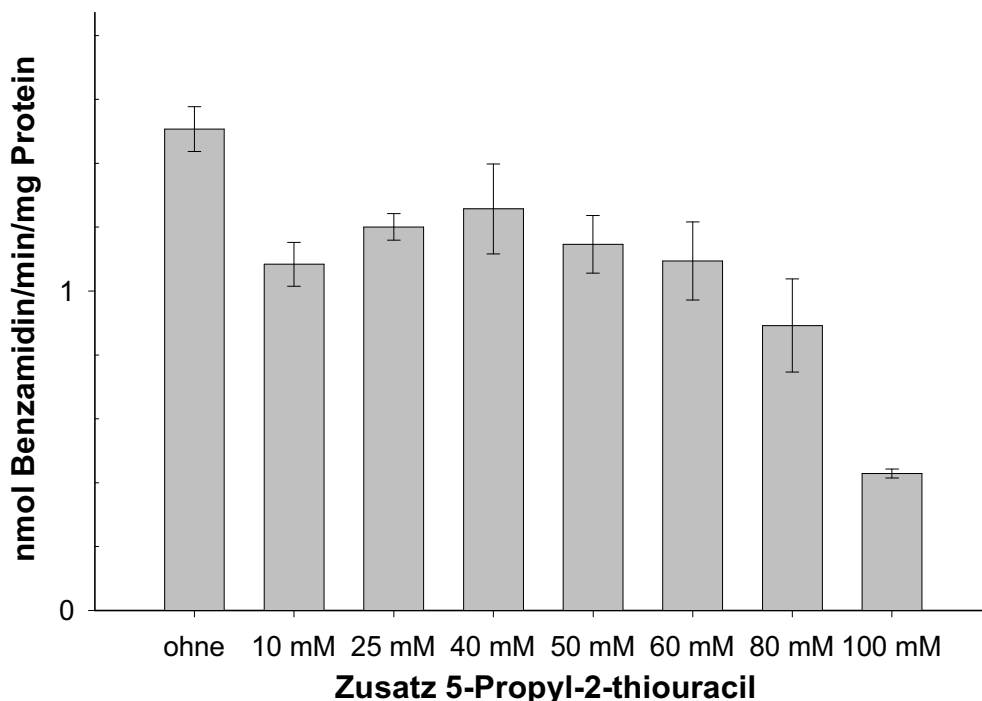


Abb. 4-8. *Beeinflussung der Reduktion von Benzamidoxim in Schweinelebermikrosomen durch den NADH-Cytochrom b_5 Reduktase-Hemmstoff 5-Propyl-2-thiouracil ($n = 4$).*

Ohne Zusatz von 5-Propyl-2-thiouracil wurde eine Reduktaseaktivität von 1.51 ± 0.07 nmol Benzamidin/min/mg Protein detektiert. Sämtliche Inkubationsansätze, denen der Hemmstoff beigefügt war, unterschieden sich signifikant von dem ohne Inhibitor. Dabei unterschied sich der 40 mM Ansatz mit einer Umsetzungsrate von 1.26 ± 0.14 nmol/min/mg mit einer Wahrscheinlichkeit von 96 % signifikant von dem ohne Hemmstoff. Ein Zusatz von 100 mM 5-Propyl-2-thiouracil bewirkte ein signifikantes Absinken der Aktivität auf 0.43 ± 0.01 nmol Benzamidin/min/mg Protein ($P = 0.00001$). Zwischen den 10 bis 60 mM Ansätzen war kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen ($P > 0.05$). Trotzdem läßt sich eine Hemmung der Reduktion durch größere Mengen an Inhibitor erkennen, unterstrichen durch das Ergebnis des 100 mM Zusatzes an Hemmstoff.

4.3.3. Spektroskopische Untersuchungen

4.3.3.1. Substratbindungsspektren mit Schweinelebermikrosomen

Es wurden Differenzspektren von Schweinelebermikrosomen in An- und Abwesenheit eines Substrats vermessen. Dabei diente die spektroskopische Untersuchung mit dem Substrat Octylamin als Kontrolle für die Meßbedingungen, bei der sich ein typisches Typ II-Spektrum mit einem Maximum bei 426 nm sowie einem Minimum bei 408 nm bildete (Abb. 4-9a). Daraufhin wurden Substratbindungsspektren verschiedener *para*-substituierter Benzamidoxime (p-Methyl, p-Methoxy, p-Cyano, p-Brom, p-Chlor, p-Nitro, unsubstituiertes Benzamidoxim) aufgenommen. Für alle Benzamidoxime wurde ein fast identisches Ergebnis erzielt. Es wurde ein Maximum bei ca. 412 nm sowie ein Minimum bei ca. 426 nm gemessen. Tabelle 4-1 gibt eine Übersicht der einzelnen ermittelten Minima und Maxima dieser Differenzspektren.

Tab. 4-1. Minima und Maxima der Substratbindungsspektren verschiedener *para*-substituierter Benzamidoxime in Schweinelbermikrosomen.

Substrat	Max [nm]	Min [nm]	ΔA
Octylamin	426	408	0.200
Benzamidoxim	410	424	0.053
<i>p</i> -Methoxybenzamidoxim	412	427	0.032
<i>p</i> -Methylbenzamidoxim	412	427	0.042
<i>p</i> -Cyanobenzamidoxim	411	427	0.045
<i>p</i> -Brombenzamidoxim	411	425	0.030
<i>p</i> -Chlorbenzamidoxim	412	424	0.029
<i>p</i> -Nitrobenzamidoxim	ND	ND	ND

ND = not detectable

Es konnte kein aussagekräftiges Substratbindungsspektrum mit *p*-Nitrobenzamidoxim aufgenommen werden, da dieses Substrat in dem gewählten Meßbereich von 350 bis 460 nm eine starke Eigenabsorption besitzt, welche mögliche Enzym-Substrat-Interaktionen zu überlagern vermag. Alle Differenzspektren sind weiterhin durch einen Anstieg der Absorption bei Wellenlängen größer als 427 nm, der schließlich in einer Sättigung resultiert, gekennzeichnet. Trotzdem läßt sich kein eindeutiges zweites Maximum in diesem Bereich definieren. Abbildung 4-9b zeigt ein typisches Substratbindungsspektrum der *para*-substituierten Benzamidoxime.

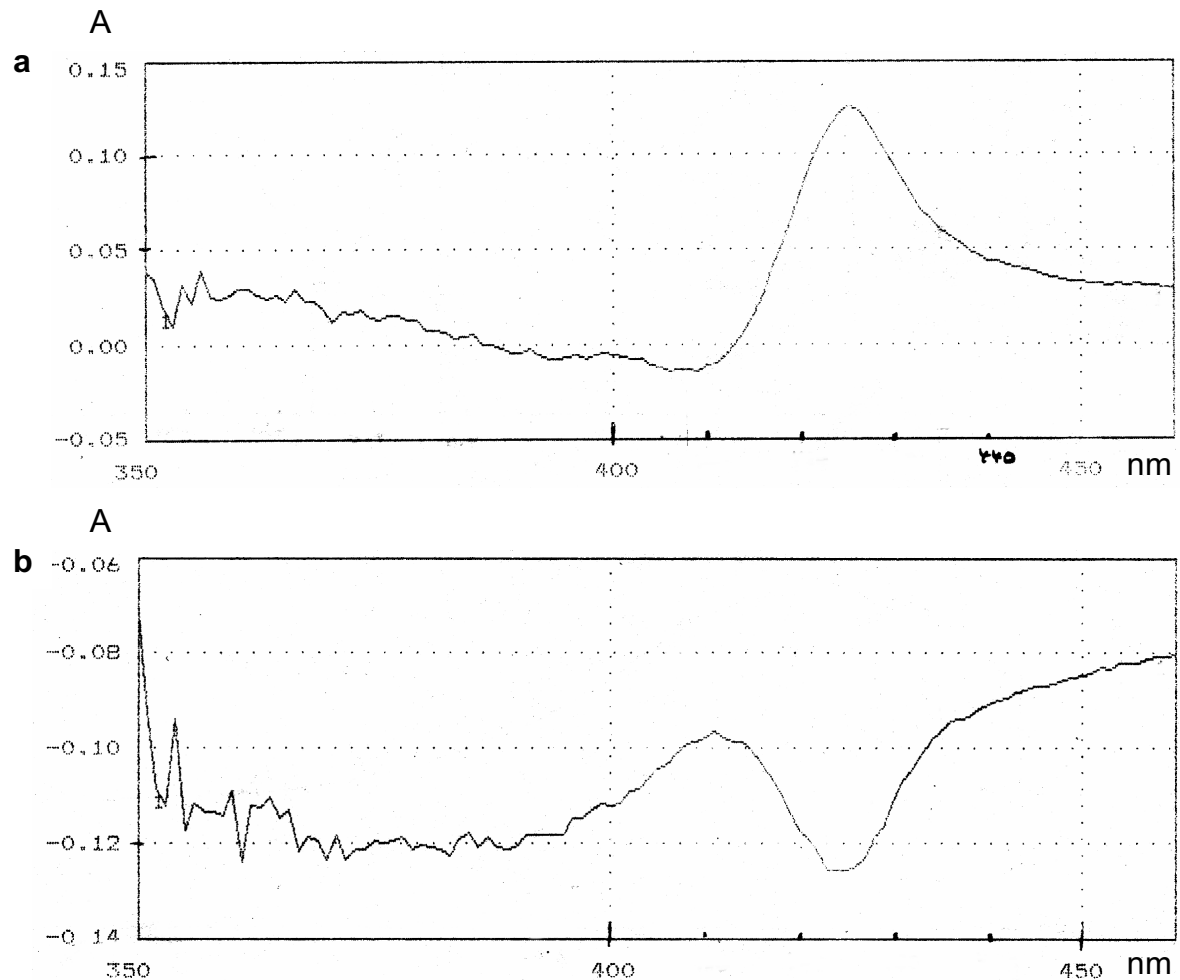


Abb. 4-9. *Substratbindungsspektrum in Schweinelebermikrosomen. Bildung des Differenzspektrums nach Zugabe von a, 2 mM Octylamin und b, 2 mM p-Brombenzamidoxim.*

4.3.3.2. Substratbindungsspektren mit der gereinigten Benzamidoxim-Reduktase

Es wurde ein Substratbindungsspektrum der gereinigten Benzamidoxim-Reduktase mit p-Methylbenzamidoxim aufgenommen. Hierfür zeigte sich lediglich ein Absorptionsminimum bei 416 nm, ein Maximum ließ sich nicht eindeutig bestimmen. Ein Zusatz von Cytochrom b_5 sowie der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase zu diesem Ansatz ließ ein Maximum bei 412 nm erkennen, welches jedoch durch das Cytochrom b_5 verursacht wurde. Eine weitere Zugabe des Reduktionsäquivalents

NADH führte zu einem Absorptionsminimum bei 409 nm sowie einer Verschiebung des Maximums zu 423 nm. Alle Ergebnisse sind in Abbildung 4-10 zusammengefasst.

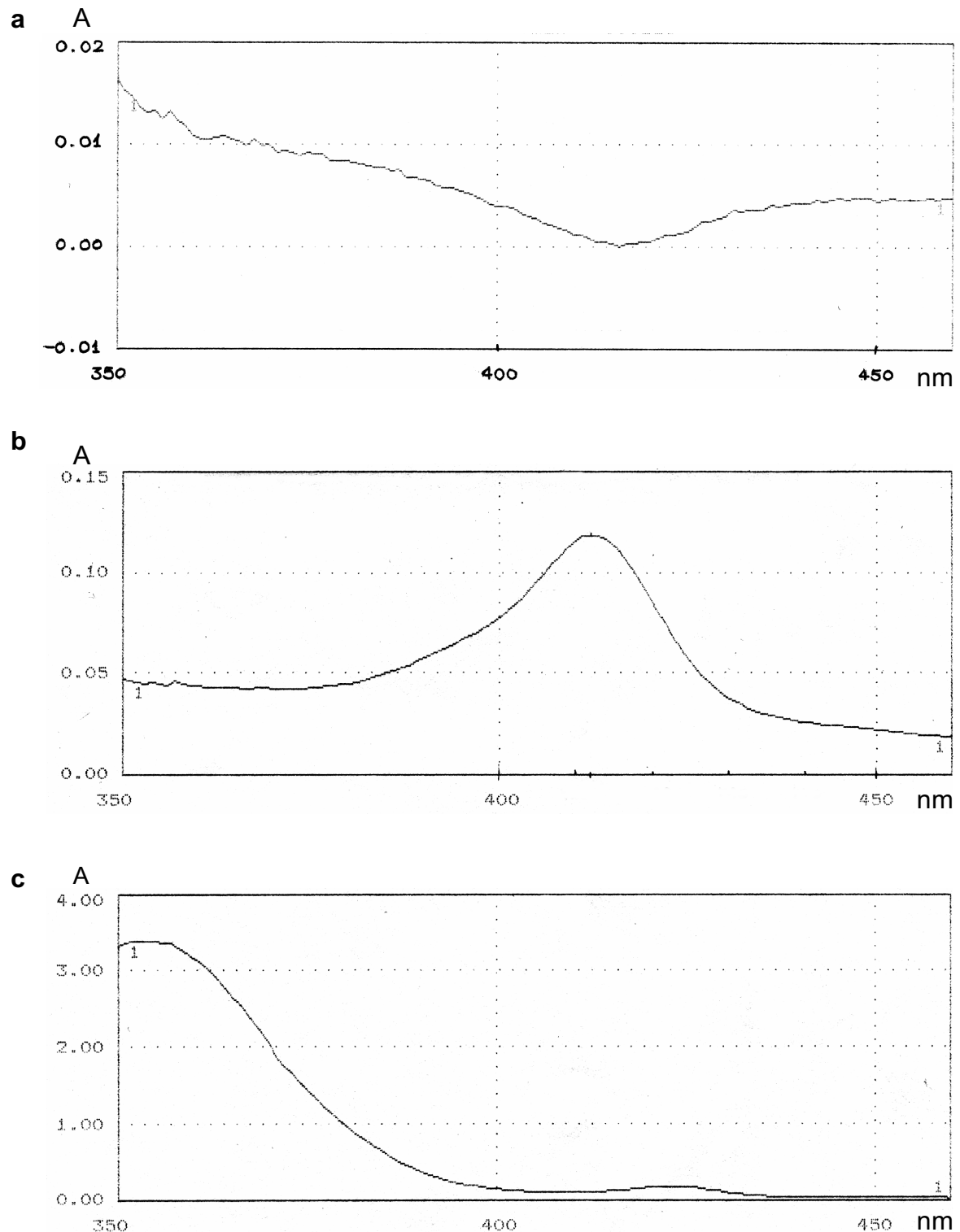


Abb. 4-10. Substratbindungsspektren der Benzamidoxim-Reduktase aus dem Schwein. Nach Zugabe von **a**, 2 mM *p*-Methylbenzamidoxim; **b**, 36.85 nmol Cytochrom b_5 und 3.3 U NADH-Cytochrom b_5 Reduktase zu **a**; **c**, 1 mM NADH zu **b**.

4.3.3.3. Substratbindungsspektren mit dem rekombinanten, gereinigten CYP3A4

Substratbindungsspektren des rekombinanten, gereinigten CYP3A4 der Firma Panvera mit p-Methylbenzamidoxim führten zu ähnlichen Ergebnissen wie die unter 4.3.3.2. beschriebenen Spektren mit gereinigter Benzamidoxim-Reduktase aus dem Schwein. Das Differenzspektrum des CYP3A4 zusammen mit dem Substrat resultierte in einem Minimum bei 417 nm. Wieder war kein eindeutiges Maximum zu bestimmen. Der Zusatz von Cytochrom b_5 und der Cytochrom b_5 Reduktase führte lediglich zu einem Absorptionsmaximum bei 412 nm. In diesem Fall war kein Minimum zu erkennen. Die weitere Zugabe von NADH ergab ein Absorptionsplateau zwischen 403 und 425 nm. Eindeutige Maxima und Minima ließen sich für diesen Ansatz mit 3A4, b_5 , b_5 -Reduktase sowie NADH nicht bestimmen. Auch diese Ergebnisse sind in Abbildung 4-11 zusammengefaßt.

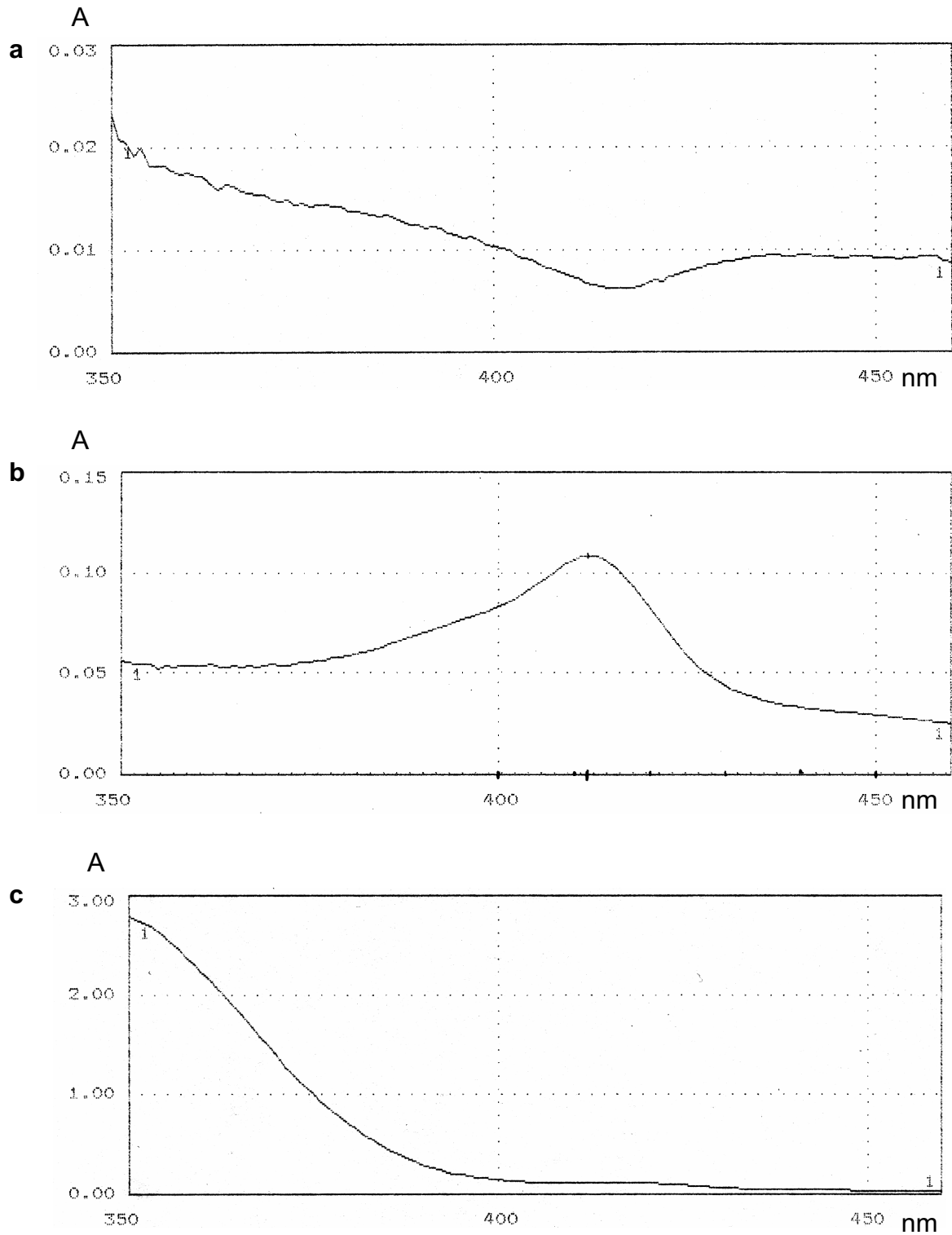


Abb. 4-11. Substratbindungsspektren des CYP3A4. Nach Zugabe von **a**, 2 mM *p*-Methylbenzamidoxim; **b**, 36.85 nmol Cytochrom b_5 und 3.3 U NADH-Cytochrom b_5 Reduktase zu **a**; **c**, 1 mM NADH zu **b**.

4.4. Diskussion

Es wurden indirekte Untersuchungen mit dem Ziel, weitere Erkenntnisse zum Mechanismus der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen zu erlangen, durchgeführt. So wurde unter anaeroben Bedingungen inkubiert, um die Rolle von Sauerstoff an der Reduktion zu überprüfen. Weiterhin wurden Hemmstoffe eingesetzt, die den Elektronentransfer näher untersuchen sollten, sowie spektroskopische Untersuchungen zur Aufklärung der Art der Substratbindung an das Enzym. Da ein direkter Nachweis der Interaktion des P450 mit seinen Redoxpartnern sowie die Entstehung von Zwischenstufen während der reduktiven Katalyse noch ausstehen, können bisher nur Spekulationen zum katalytischen Zyklus gemacht werden.

Die Zusammensetzung des reduktiven Enzymsystems konnte von Lomb [1995] und Möller [1997] aufgeklärt werden. Es handelt sich zum einen um ein P450 Isoenzym der Familie 2D im Schwein, was durch typische CO-Differenzspektren sowie die für CYP2D charakteristische *O*-Demethylierung von Dextromethorphan bestätigt wurde.

Weiterhin konnte die Beteiligung von Cytochrom b_5 an der Reduktion gezeigt werden. Ein Antikörper gegen Cytochrom b_5 führte zu einer starken Hemmung der Reaktion. Zudem bewirkten steigende Mengen dieses Coenzym im Inkubationsansatz auch linear ansteigende Umsatzraten [Lomb, 1995].

In der vorliegenden Arbeit konnte auch die Beteiligung der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase durch Einsatz eines Hemmstoffes weiter untermauert werden. 5-Propyl-2-thiouracil ist ein Inhibitor der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase [Barham and Stratford, 1996]. Durch 10 mM Zusatz zu einem Inkubationsansatz mit Schweineleber mikrosomen konnte bereits eine signifikante Reduktion der Aktivität verzeichnet werden, durch 100 mM Zusatz sank die Umsatzrate weiter auf ca. 30 % ab.

Das Zusammenspiel von b_5 -Reduktase, Cytochrom b_5 und P450 wird weiterhin durch die Tatsache bestätigt, daß in Abwesenheit einer der drei Bestandteile keine oder nur eine geringe Reduktase-Aktivität vorhanden war. NADH stellt das bevorzugte Cosubstrat für die Reaktion dar, was ebenfalls für den Elektronentransfer via Cytochrom b_5 spricht.

Die Übertragung eines Elektrons von NADH über die b_5 -Reduktase auf Cytochrom b_5 wurde bereits aufgeklärt [Testa, 1995]. Ein weiterer Elektronentransport von Cytochrom b_5 auf ein P450-Enzym wurde aufgrund der Redoxpotentiale aber nur für das 2. Elektron im Oxygenierungszyklus beschrieben. Cytochrom P450 besitzt im Ruhezustand ein Redoxpotential von etwa -300 mV und Cytochrom b_5 von etwa 0 mV, wodurch eine Reduktion von P450 thermodynamisch ungünstig erscheint [Guengerich, 2001]. Dennoch konnte auch die Übertragung beider Elektronen von Cytochrom b_5 auf P450 für die Oxygenierung beschrieben werden [Ingelmann-Sundberg, 1984; Yamazaki, 1996b]. Die Reduktion des Hämeisens von CYP2D konnte nur in Anwesenheit eines Substrates detektiert werden [Möller, 1997]. Daraus läßt sich schließen, daß die Bindung des Amidoxims wahrscheinlich eine Erhöhung des P450-Redoxpotentials zur Folge hat. Die Interaktion des Cytochrom b_5 mit P450 kann zwar schon durch entsprechende Komplexbildung das Potential von Cytochrom b_5 erniedrigen, dieses allein erscheint jedoch nicht ausreichend. Die Elektronenübertragung kann erst im Zusammenspiel mit der Erhöhung des P450-Redoxpotentials durch die Substratbindung erfolgen. Das Redoxpotential von Cytochrom b_5 kann durch die Veränderung der Dielektrizität der Mikroumwelt des Häms z.B. durch eine solche Komplexbildung beeinflusst werden [Rivera *et al.*, 1998].

Die Art der Substratbindung an das P450-Enzym wurde mittels UV/VIS-Spektroskopie untersucht. Ein Benzamidoxim-Bindungsspektrum mit gereinigtem CYP2D erlaubte keine eindeutige Zuordnung, sondern ergab ein Mischspektrum. Ein Absorptionsmaximum von 390 nm und ein Minimum von 415 nm ließen eher auf ein Typ I-Spektrum schließen, während der Anstieg bei 430 nm dem Maximum eines Typ II-Spektrums ähnelte [Möller, 1997]. Ein Substratbindungsspektrum mit gereinigtem CYP2D und *p*-Methylbenzamidoxim führte in der vorliegenden Arbeit zu einem ähnlichen Ergebnis, ebenso wie mit rekombinantem, gereinigtem CYP3A4, welches nicht zur Reduktion von Benzamidoxim in der Lage ist. Auch hier war ein Mischspektrum mit ähnlichem Verlauf zu erkennen. Die Mischspektren mit gereinigtem CYP2D lassen darauf schließen, daß Amidoxime sowohl an hydrophobe Bindungstaschen als auch an das Häm direkt binden können.

Eine Interaktion mit Cytochrom b_5 und seiner Reduktase konnte spektroskopisch aufgrund der hohen Eigenabsorption von Cytochrom b_5 leider nicht verfolgt werden. Ein weiterer Zusatz von NADH in die Meßküvette führte jedoch zu einer

Verschiebung des Minimums auf 409 nm, und ein Maximum bei 423 nm war zu erkennen. Dieses Spektrum mit NADH unterschied sich deutlich von dem mit CYP3A4, in dem kein Minimum bzw. eindeutiges Maximum bei den angegebenen Wellenlängen gemessen wurde. Diese Spektren mit allen Bestandteilen des rekonstituierten Systems deuten auf unterschiedliche Interaktionen der Redoxpartner mit CYP2D und CYP3A4 hin, während die reine Substratbindung keinen Unterschied ergab.

Substratbindungsspektren mit verschiedenen p-substituierten Benzamidoximen in Schweinelebermikrosomen führten immer zu ähnlichen Ergebnissen, die sich jedoch deutlich von den Bindungsspektren mit gereinigtem Enzym unterschieden. Für alle Substrate wurde ein Absorptionsmaximum bei 412 nm und einem Minimum bei 426 nm gemessen. Eine eindeutige Zuordnung zu einem Bindungstyp war aber auch hier nicht möglich. Die unterschiedlichen Bindungsspektren mit Mikrosomen und gereinigten Enzymen kommen entweder durch die Beeinflussung der Spektren durch andere mikrosomale Bestandteile zustande oder lassen auf weitere mikrosomale Enzymsysteme schließen, die zur N-Reduktion befähigt sind.

Für ein und dasselbe Substrat wurden bereits beide Bindungstypen in Abhängigkeit von der Konzentrationen und dem pH-Wert detektiert [Guengerich, 2001]. Stickstoffhaltige Gruppen binden bevorzugt an Fe-III, aber auch an Fe-II des P450-Häms und führen zu klassischen Typ II-Spektren. Sauerstoffhaltige Gruppen hingegen binden nur an Fe-III und erzeugen in der Regel reverse Typ I-Spektren. Für viele Substrate wurde jedoch sowohl eine Ligandenbindung als auch eine Bindung an hydrophobe Taschen des Enzyms beschrieben [Testa, 1995].

Die Zuordnung der gemessenen Spektren konnte nicht eindeutig erfolgen. Entweder wird ein Teil der Amidoxime an das Häm und der andere an das Apoprotein gebunden, wodurch es zu überlappenden Typ I- und Typ II-Spektren kommt. Wahrscheinlicher aber ist, daß es sich um einen neuen Typ handelt, bei dem es gleichzeitig zur Bindung des Substrats an das Häm und einer Interaktion mit dem Apoprotein kommt. Die Ligandenbindung kann angenommen werden, da in einem P450-Modellversuch mit der Microperoxidase-8 eine Hämbindung von p-Methoxy- und p-Chlorbenzamidoxim durch Bildung von Typ II-Spektren nachgewiesen wurde [Lefevre-Grobiollot *et al.*, 2001]. Da es sich hierbei um ein P450-Modell und nicht um

das für die Reduktion verantwortliche Enzym handelt, konnte auch keine Interaktion des Substrats mit dem Apoprotein detektiert werden. Für die zusätzliche Wechselwirkung mit dem Proteinanteil in der Nähe des Häms spricht, daß erst die Substratbindung zur Reduktion des P450-Enzyms durch Cytochrom b_5 und b_5 -Reduktase führt, und das Amidoxim demnach wahrscheinlich das Redoxpotential moduliert.

Im folgenden soll ein Mechanismus für die Reduktion *N*-Hdroxylierter Verbindungen durch P450 postuliert werden (Abb. 4-12).

Dabei kommt es über den Sauerstoff der Amidoximgruppe zur Anlagerung des Substrats an das Häm. Dabei tritt wahrscheinlich auch eine Wechselwirkung mit dem Apoprotein auf, die das Redoxpotential des P450 erhöht. Zudem könnte die Anlagerung so erfolgen, daß der Zugangstunnel für Sauerstoff und andere kleine Moleküle zum Häm versperrt wäre, wodurch auch der fehlende Einfluß von Sauerstoff und Cyanid-Ionen auf die Reduktion erklären werden könnte.

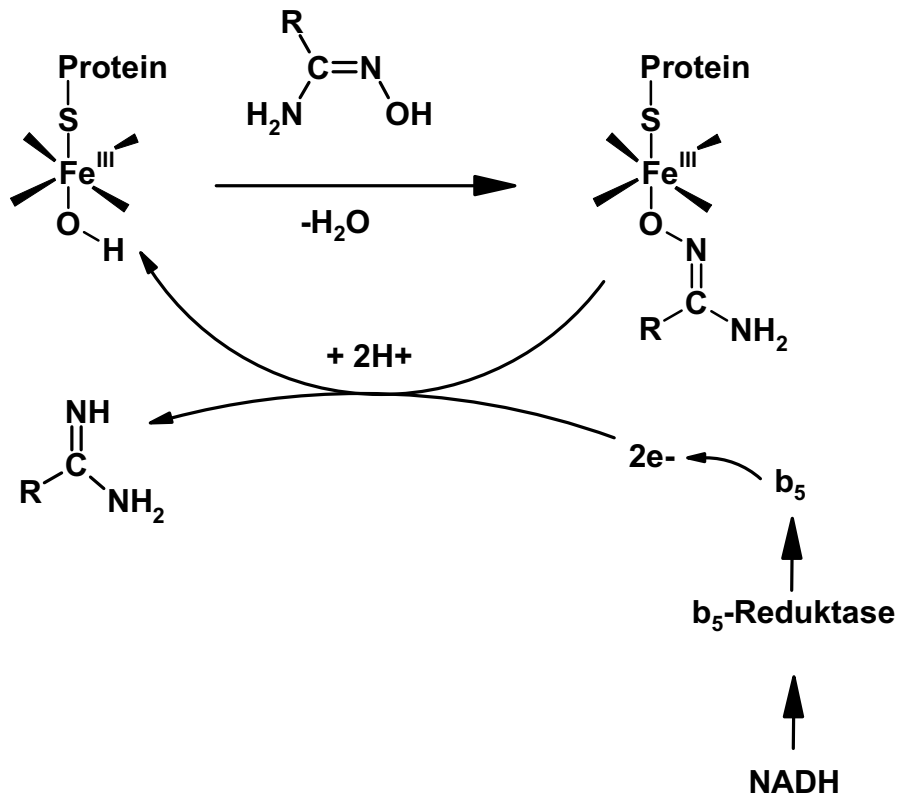


Abb. 4-12. Wahrscheinlicher Mechanismus der Reduktion N-hydroxylierter Verbindungen durch Cytochrom b₅, b₅-Reduktase und Cytochrom P450.

Die Übertragung der beiden Elektronen erfolgt wahrscheinlich rasch hintereinander. Auch Lomb postuliert einen Mechanismus, bei dem es zur Komplexbildung des P450 mit Cytochrom b₅ kommt. Der gebildete Fe II- Fe III- Komplex kann gleichzeitig zwei Elektronen von der P450-Reduktase aufnehmen, wodurch ein Fe II- Fe II- Komplex entstehen würde. Eine fast simultane Übertragung der beiden Elektronen auf das Substrat könnte nun erfolgen.

Die Reduktion steht vermutlich in Konkurrenz mit Oxidationsreaktionen. Eine Hemmung der Umsetzung von Amidoximen durch Sauerstoff tritt nicht auf, was für andere durch P450 katalysierte Reduktionen der Fall ist. Die Reduktion konnte in der vorliegenden Arbeit unter anaeroben Bedingungen genauso effektiv gezeigt werden wie unter aeroben. Das bedeutet, daß Sauerstoff nicht an der Katalyse beteiligt ist und die Reduktion unabhängig von Sauerstoff verläuft. Hierdurch wird die Entstehung der dihydroxylierten Verbindung und deren weiterer Zerfall zu Benzamidin und Wasser unwahrscheinlich.

Die geringen Umsetzungsraten des rekonstituierten Systems bei dieser Studie kommen durch eine Benzamidoxim-Reduktase mit niedriger Aktivität zustande. Da aber sowohl für die Inkubation unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen das gleiche Enzym verwendet wurde, sind die ermittelten Umsetzungsraten durchaus vergleichbar.

Die Zerstörung von Superoxid-Radikalanionen während der Inkubation durch Superoxiddismutase führte zu einer Steigerung der Umsetzungsraten der Reduktion von Benzamidoxim [Möller, 1997]. Die gesteigerte Aktivität des reduktiven Enzymsystems durch Zerstörung dieser reaktiven Sauerstoffspezies, die vor allem bei oxidativen katalytischen Reaktionen entsteht, spricht für eine Konkurrenz zwischen Reduktion und Oxidation unter aeroben Bedingungen. Am Cytochrom P450 könnte in Anwesenheit von Sauerstoff sowohl die Reduktion des Substrats als auch die Entstehung von Superoxidradikalanionen erfolgen, die das Hämeisen für weitere Substratreduktionen blockieren würden. Eine weitere Oxidation von Benzamidoxim durch Superoxidradikale zu Benzamid und NO wurde in Kaninchenlebermikrosomen beobachtet [Jung, 1994]. Das rekonstituierte System aus dem Schwein war jedoch nicht in der Lage, diese Reaktion zu katalysieren [Möller, 1997]. Die NO- und Benzamid-Entstehung scheint durch ein anderes Enzymsystem katalysiert zu werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit wurden die enzymatischen Grundlagen der sauerstoffunabhängigen *N*-reduktiven Biotransformation untersucht.

Die Komponenten eines mikrosomalen Enzymsystems, welches die Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen in Schweineleber katalysiert, konnten in vorangegangenen Arbeiten eindeutig identifiziert werden [Clement *et al.*, 1997]. Es handelt sich hierbei um ein Enzymsystem aus Cytochrom b_5 , der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase sowie einem Cytochrom P450 Isoenzym der Unterfamilie 2D, welches auch als Benzamidoxim-Reduktase bezeichnet wird.

Im Menschen konnte ein ähnliches Enzymsystem nachgewiesen werden, welches sich lediglich in dem beteiligten P450-Isoenzym unterscheidet. Die Isolierung und anschließende Teilsequenzierung der humanen Benzamidoxim-Reduktase ergab eine vollständige Übereinstimmung mit dem Cytochrom P450 Isoenzym 2A6. Ebenso zeigte das isolierte Enzym die 2A6-Markeraktivität, die Cumarin-7-Hydroxylierung [Rieckert, 1999; Behrens, 1999].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das CYP2A6 nach literaturbekannter Vorschrift [Yun *et al.*, 1991] aus humanen Lebermikrosomen isoliert, um die Beteiligung dieses Isoenzym an der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen zu bestätigen. Die Isolierung von CYP2A6 konnte zum einen durch Reaktion mit einem Immunoblot spezifischen Antikörper gegen dieses Isoenzym im Western-Blot, zum anderen durch Sequenzierung mittels MALDI-MS bestätigt werden.

Das gereinigte CYP2A6 zeigte eine effiziente Reduktion der Modells substanz Benzamidoxim (Abb. 5-1). Auch weitere *N*-hydroxylierte Verbindungen wie das *N*-Hydroxyamidinohydrazon Guanoxabenz und das Amidoxim-prodrug RO 48-3656 wurden durch das Enzymsystem bestehend aus Cytochrom b_5 , der b_5 -Reduktase sowie dem CYP2A6 reduziert. Die Umsetzung von Benzamidoxim wurde im genannten rekonstituierten Enzymsystem durch einen reaktionsspezifischen Antikörper gegen CYP2A6 inhibiert. Somit konnte der Hinweis auf die Beteiligung des humanen Cytochrom P450-Isoenzym 2A6 an der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen bestätigt werden.

In humanen Lebermikrosomen erfolgte jedoch keine Hemmung der Reduktion durch diesen Antikörper. Dieses läßt auf eine Beteiligung mehrerer mikrosomaler Enzymsysteme an der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen schließen.

Eine Substrathemmung von Benzamidoxim und Cumarin konnte weder im rekonstituierten System noch in humanen Lebermikrosomen nachgewiesen werden. Durch die fehlende Konkurrenz beider Substrate kann auf zwei unterschiedliche Bindungsstellen am CYP2A6 geschlossen werden.

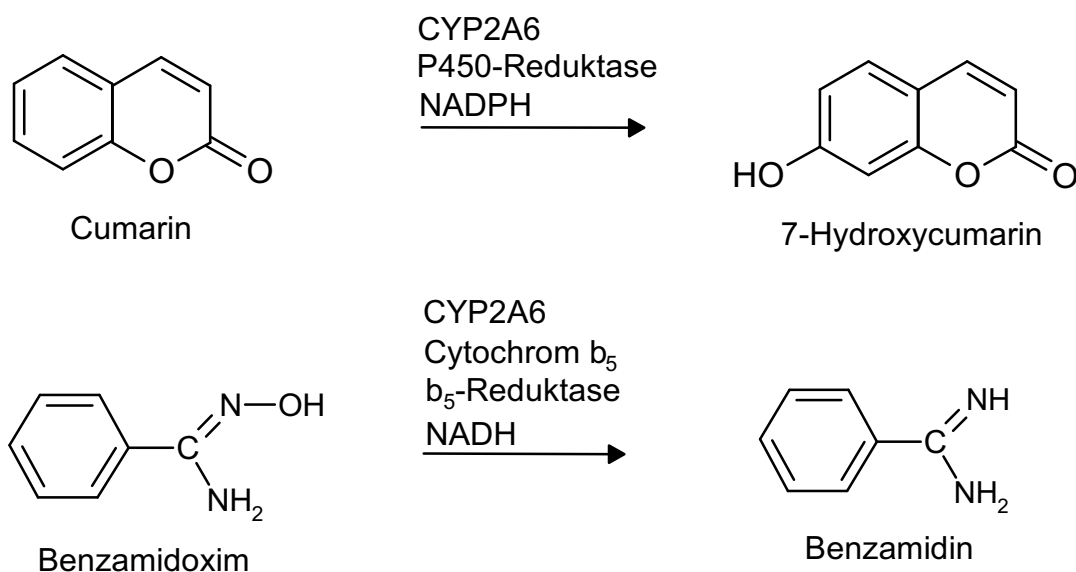


Abb. 5-1. Durch Cytochrom P450 2A6 katalysierte Reaktionen.

Obwohl isoliertes CYP2A6 die Reduktion von Benzamidoxim katalysiert, ist in *E. coli* exprimiertes CYP2A6 hierzu nicht in der Lage. Um dieses zu erklären, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Isolierung von rekombinant exprimiertem CYP2A6 aus Hefezellen. Auch das gereinigte rekombinant exprimierte CYP2A6 zeigte keine Reduktase-Aktivität im rekonstituierten Enzymsystem mit Cytochrom b₅ und der b₅-Reduktase. Ein Grund hierfür könnte in der Anwesenheit hemmender Bestandteile im Expressionssystem liegen, welche die Reduktion inhibieren, während die Oxidation nicht beeinflußt wird. Die Umsatzrate von Benzamidoxim in humanen Lebermikrosomen wurde sowohl durch einen Zusatz von Hefezellen als auch durch die hieraus gereinigte 2A6-Endfraktion konzentrationsabhängig vermindert.

Die Ursache für die fehlende Reduktion von Benzamidoxim durch rekombinant exprimiertes CYP2A6 soll im Rahmen nachfolgender Arbeiten genauer untersucht werden.

Weitere Studien dieser Arbeit befaßten sich mit möglichen Quantitativen Struktur Aktivitäts-Beziehungen der Reduktion verschiedener *para*-substituierter Benzamidoxime (Abb. 5-2). Die Umsetzung dieser Benzamidoxime erfolgte zum einen in Schweinelebermikrosomen, zum anderen im rekonstituierten Enzymsystem des Schweins. Eine Korrelation von Maximalgeschwindigkeiten oder MichaelisMenten-Konstanten der Reduktion in Mikrosomen mit elektronischen Effekten oder der Lipophile der *para*-substituierten Benzamidoxime ließ sich nicht nachweisen. Für das rekonstituierte Enzymsystem hingegen konnte eine lineare Abhängigkeit der Michaelis-Menten-Konstante und der Katalytischen Effizienz von den elektronischen Effekten der Substituenten in *para*-Stellung gezeigt werden. Elektronendonatoren bewirkten hierbei sowohl kleinere K_m -Werte als auch eine höhere katalytische Effizienz. Dieses Ergebnis muß durch Umsetzung mit weiteren Enzymchargen verifiziert werden.

Sämtliche *para*-substituierten Benzamidoxime ebenso wie das Amidoxim-prodrug RO 48-3656 wurden in Schweinelebermikrosomen und dem rekonstituierten Enzymsystem sehr effizient reduziert. Hierdurch wird die Anwendbarkeit von Amidoximen als prodrugs für Amidine bestätigt. Die Arzneistoffentwicklung kann unabhängig vom Substituenten erfolgen und das Amidin mit der jeweils besten Wirkung als Arzneistoffkandidat weiter verfolgt werden.

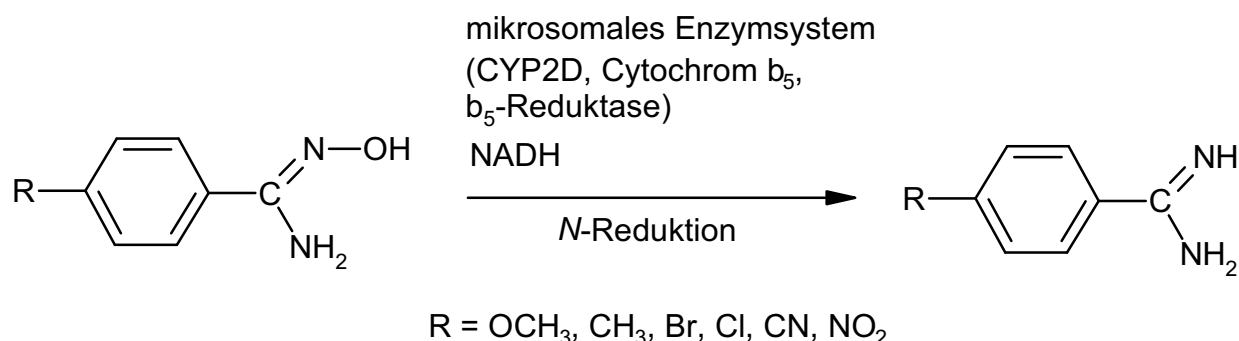


Abb. 5-2. Reduktion verschiedener *para*-substituierter Benzamidoxime durch ein mikrosomales Enzymsystem aus Schweineleber.

Die Reduktion *meta*-substituierter Benzamidoxime durch Schweinelebermikrosomen konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Die Umsetzung dieser Verbindungen erfolgte zwar mit geringeren Aktivitäten als die entsprechende Umsetzung *para*-substituierter Benzamidoxime, erwies sich aber dennoch als effizient. Hierdurch läßt sich das prodrug-Prinzip der Amidoxime auf *meta*-substituierte Derivate erweitern.

Weiterhin konnte die Beteiligung der Benzamidoxim-Reduktase aus Schweineleber an der 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ und 1 α -Hydroxyvitamin D₃ gezeigt werden (Abb. 5-3). Die Oxidation dieses physiologischen Substrates durch das CYP2D erfolgte dabei mit geringeren Umsetzungsraten als durch eine von Axénet *al.* [1992] beschriebene mikrosomale 25-Hydroxylase. Sowohl das CYP2D als auch die 25-Hydroxylase katalysierten die Reduktion von Benzamidoxim mit gleichen Umsetzungsraten. Hieraus läßt sich folgern, daß es sich bei beiden Enzymen wahrscheinlich um ähnliche Varianten handelt.

Die Beteiligung der humanen Benzamidoxim-Reduktase an der 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ kann ausgeschlossen werden, da gereinigtes rekombinant exprimiertes CYP2A6 keine Hydroxylierungs-Aktivität aufzeigte.

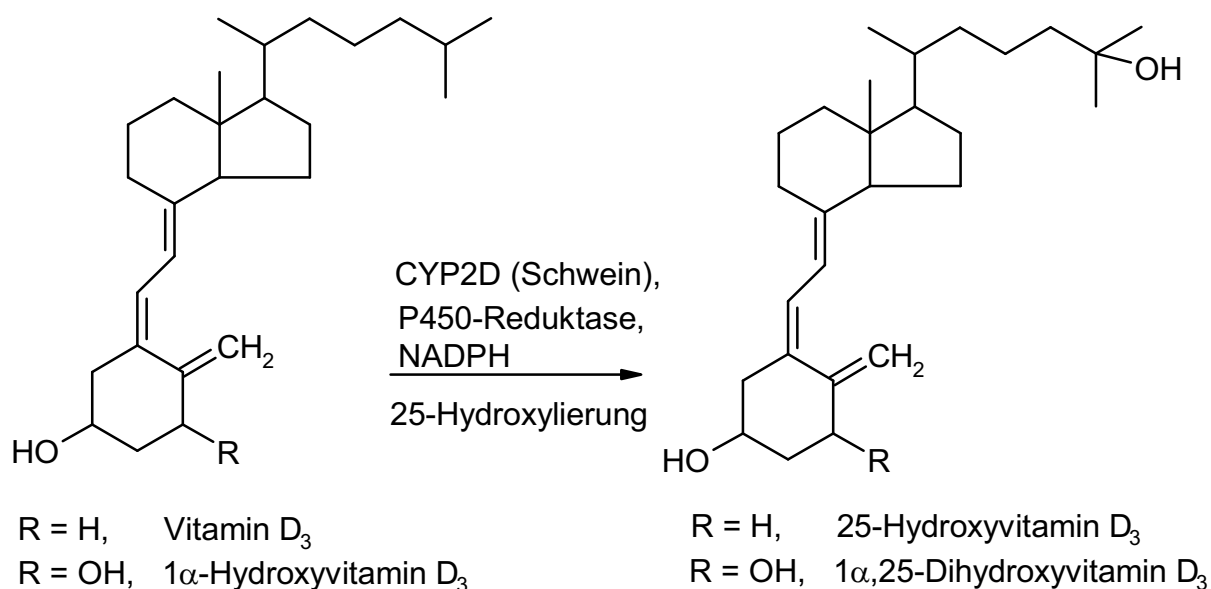


Abb. 5-3. 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ und 1 α -Vitamin D₃ durch CYP2D aus Schweineleber.

In der vorliegenden Arbeit wurden weiterhin Studien zur Aufklärung des reduktiven enzymatischen Mechanismus durchgeführt. Als Modell diente wiederum das rekonstituierte Enzymsystem aus Schweineleber.

Erstmals konnte die Reduktion von Benzamidoximen unter anaeroben Bedingungen gezeigt werden. Die Umsetzung *N*-hydroxylierter Verbindungen erfolgt somit vollkommen unabhängig von Sauerstoff.

Ebenso konnte die Beteiligung der NADH-Cytochrom b_5 Reduktase an der Reduktion durch den spezifischen Inhibitor 5-Propyl-2-thiouracil untermauert werden.

Die Aufnahme von Substratbindungsspektren mit *p*-Methylbenzamidoxim ergab Mischbindungsspektren für das CYP2D aus Schweineleber. Daraus ließ sich folgern, daß *N*-hydroxylierte Verbindungen zum einen über den Sauerstoff der Amidoxim-Funktion an das Hämeisen des CYP2D binden, zum anderen aber auch eine Wechselwirkung mit dem Apoprotein eingehen können. Der derzeitig postulierte Mechanismus der Benzamidoxim-Reduktase geht von einer solchen Bindung über den Sauerstoff der Amidoxim-Funktion an das Häm des CYP2D aus. Da *N*-hydroxylierte Verbindungen an humanem CYP2A6 eine andere Bindungsstelle als die für Cumarin übliche hydrophobe Bindungstasche zu besitzen scheinen, wird dieser postulierte Mechanismus weiterhin bestätigt.

Die mit Schweinelebermikrosomen erhaltenen Substratbindungsspektren zeigten starke Abweichungen von denen mit gereinigtem Enzym, wodurch die Anwesenheit mehrerer *N*-reduktiver mikrosomaler Enzymsysteme vermutet werden kann.

Zahlreiche Fragen zum Mechanismus der Reduktion von *N*-hydroxylierten Verbindungen bleiben jedoch noch ungeklärt. Diese sollen in nachfolgenden Arbeiten weiter untersucht werden.

6. ANHANG ÜBER VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE

6.1. Materialien

Alle verwendeten Materialien wurden in höchster verfügbarer Reinheit von folgenden Firmen bezogen:

Substanz	Firma
1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃	Leo Pharma, Dk
1 α -Hydroxyvitamin D ₃	Leo Pharma, Dk
5'-AMP-Sepharose	Pharmacia Biotech
5-Propyl-2-Thiouracil	Sigma
7-Hydroxycumarin	Sigma
Acetonitril	Baker
Amberlite	Supelco, USA
Ammoniumacetat	Merck
Antikörper gegen CYP2A6, monoklonal reaktionsspezifisch A306	Gentest Corporation
Antikörper gegen CYP2A6, monoklonal Immunoblot-spezifisch A106	Gentest Corporation
BCA-Reagenz	Pierce, UK
Benzamidin	Sigma
Benzamidoxim	Herstellung im Arbeitskreis
BM Chromogenic Western Blotting Kit (AP, mouse/rabbit)	Boehringer Mannheim
Calbiosorb	Calbiochem
CM-Sepharose	Sigma
Cumarin	Sigma
CYP2A6, rekombinant in <i>E. coli</i>	Gentest Corporation
CYP2A6, rekombinant in Hefe	Astra Zeneca, Schweden
CYP2C19	Gentest Corporation
CYP3A4, rekombinant, gereinigt	Gentest Corporation, USA
Cytochrom b ₅ , human	PanVera, USA
DE-52 DEAE-Cellulose	Serva
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck

ANHANG ÜBER VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE

Substanz	Firma
Dimethylsulfoxid	Merck
Dithiothreitol	Biomol
Ethanol	Merck
Glycerol	Riedel-de Hään
Guanabenz	Herstellung im Arbeitskreis
Guanoxabenztosylat	Herstellung im Arbeitskreis
Heptylsulfonat	ICN Biochemicals, USA
Hydroxylapatit, high resolution grade	Calbiochem
Isopropanol	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
L- α -Dilaurylphosphatidylcholin	Sigma
Methanol	Merck
Na ₂ EDTA	Fluka
NADH	Fluka
NADPH	Fluka
NADPH-Cytochrom P450 Reduktase	Gentest Corporation
NAP25-Säulen	Pharmacia Biotech
Natriumchlorid	Merck
Natriumcholat	Sigma
n-Hexan	Merck
Octyl-Sepharose CL 4B	Pharmacia Biotech
Octylsulfonat	Sigma
Polyvinylalkohol	Sigma
RO 44-3888	Hoffmann La Roche
RO 48-3656	Hoffmann La Roche
Saccharose	Merck
Tergitol NPX	Fluka
Thesit	Merck
Trichlorethan	Sigma
Tris-Base	Sigma
Triton-X100	Serva
Tween 20	Sigma
UDP-Glucuronyltransferase	Gentest Corporation

6.2. Geräte

Ultrazentrifuge L7-65, Rotor 45 Ti, Fa. Beckmann, München
 Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E, Rotor JA 10 und JA14, Fa. Beckmann, München
 Mikroliterzentrifuge, Fa. Hetterich, Tuttlingen
 Gewebehomogenisator, Fa. Braun, Melsungen
 Zweistrahlphotometer Uvicon 930, fa. Kontron, Neufahrn
 Photodiodenarray-Spektralphotometer DU 7500, Fa. Beckmann, München
 Perkin Elmer Luminescence Spektrometer (Fluorimeter)
 KPG-Rührer, Fa. Jahnke & Kunkel, Staufen
 Überkopfschüttler, Fa. Heidolph, Kehlheim
 Vortexer VF2, Fa. Janke & Kunkel
 Schüttelwasserbad GFL 1087, Gesellschaft Labortechnik, Burgwedel
 Ultrafiltrationszellen und –membranen YM, Fa. Amicon, Witten
 Centricon Zentrifugenröhrchen mit Membran YM, Fa. Millipore, Eschborn
 Halbmikroküvetten (Polystyrol), Fa. Sarstedt, Nümbrecht
 Quarzküvetten, Fa. Beckmann, München
 Vertikale Gelelektrophoresekammer Modell 2001, Fa. Pharmacia, Freiburg
 Stromversorger Macrodrive Modell 2301, Fa. Pharmacia, Freiburg
 Geltrockner Modell 2003, Fa. LKB, Bromma, Schweden
 Kälteumwälzthermostat Modell F20, Fa. Julabo, Seelbach
 100 µl Spritze, Fa. Hamilton, Schweiz
 Traumelschüttler Modell BEAX, Fa. Heidolph
 Electrophoretic Transfer Kit, 2117-250 Nova-Blot, Fa. LKB, Bromma, Schweden
 Peristaltische Schlauchpumpe Econo pump, Fa. Bio-Rad, München
 Standard-Glaschromatographiesäulen, Fa. Bio-Rad, München
 Fraktionssammler Redi frac, Fa. Pharmacia, Freiburg
 Durchflußphotometer Uvicord S II, Fa. Pharmacia, Freiburg
 Flachbettschreiber REC 2, Fa. Pharmacia, Freiburg
 Biokompatible HPLC-Pumpe L-6210, Fa. Merck-Hitachi, Darmstadt
 UV/VIS-Detektor L-4200, Fa. Merck-Hitachi, Darmstadt
 Integrator D-2500, Fa. Merck-Hitachi, Darmstadt

HPLC-Anlagen, Säulenmaterial: genaue Beschreibung im jeweiligen Kapitel Methoden.

7. LITERATURVERZEICHNIS

ABOAGYE E.O., LEWIS A.D., TRACY M., WORKMAN P.

Bioreductive metabolism of the novel fluorinated 2-nitroimidazole hypoxia probe *N*-(2-hydroxy-3,3,3-trifluoropropyl)-2-(2-nitroimidazolyl) acetamide (SR-4554). *Biochem. Pharmacol.*, **54**, (1997), 1217-1224.

AMAT L., CARBÓ-DORCA R., PONEC R.

Simple linear QSAR models based on quantum similarity measures. *J. Med. Chem.*, **42**, (1999), 5169-5180.

ANDREWS J.M., ROMAN D.P., BING D.H.

Inhibition of four human serine proteases by substituted benzamidines. *J. Med. Chem.*, **21**, (1978), 1202-1207.

ARIYOSHI N., TAKAHASHI Y., MIYAMOTO M., UMETSU Y., DAIGO S., TATEISHI T., KOBAYASHI S., MIZOROGI Y., LORIOT M.A., STUCKER I., BEAUNE P., KINOSHITA M., KAMATAKI T.

Structural characterization of a new variant of the CYP2A6 gene (CYP2A6*1B) apparently diagnosed as heterozygotes of CYP2A6*1A and CYP2A6*4C. *Pharmacogenetics*, **10**, (2000), 687-693.

ARIYOSHI N., SAWAMURA Y., KAMATAKI T.

A novel single nucleotide polymorphism altering stability and activity of CYP2A6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, (2001), 3.

AXÈN E., BERGMAN T., WIKVALL K.

Purification and characterization of a vitamin D₃ 25-hydroxylase from pig liver microsomes. *Biochemistry*, **287**, (1992), 725-731.

BARHAM H.M., STRATFORD I. J.

Enzymology of the reduction of the novel fused pyrazine mono-*N*-oxide bioreductive drug, RB90740 roles for P450 reductase and cytochrome b₅ reductase. *Biochem. Pharmacol.*, **51**, (1996), 829-837.

BEEDHAM C.

Molybdenum hydroxylases as drug-metabolizing enzymes. *Drug Metab. Rev.*, **16**, (1985), 119-156.

BEHRENS D.

Dissertation, Kiel 1999.

BONSE G., METZLER M.

Biotransformationen organischer Fremdstoffen. 57-103, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1978.

BOYKIN D.W., KUMAR A., HALL J.E., BENDER B.C., TIDWELL R.R.

Anti-*Pneumocystis* activity of bis-amidoximes and bis-*O*-alkylamidoximes prodrugs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **6**, (1996), 3017-3020.

BRIDGES A., GRUENKE L., CHANG Y.T., VAKSER I.A., LOEW G., WASKELL L.

Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome b₅ and cytochrome P450 reductase. *J. Biol. Chem.*, **273**, (1998), 17036-17049.

CHEN W., KOENIGS L.L.; THOMPSON S.J., PETER R.M., RETTIE A.E., TRAGER W.F., NELSON S.D.

Oxidation of acetaminophen to its toxic quinone imine and nontoxic catechol metabolites by baculovirus-expressed and purified human cytochromes P450 2E1 and 2A6. *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, (1998), 295-301.

CLEMENT B.

The *N*-oxidation of benzamidines *in vitro*. *Xenobiotica*, **13**, (1983), 467-473.

CLEMENT B.

Biotransformation stark basischer funktioneller Gruppen durch Stickstoffoxidation. In: *HochschulSammlung Naturwissenschaft Chemie und Pharmazie Band 3*, HochschulVerlag, Freiburg 1986.

CLEMENT B.

Methoden zur Behandlung und Prophylaxe der *Pneumocystis carinii* Pneumonie (PCP) und anderen Erkrankungen sowie Verbindungen und Formulierungen zum Gebrauch bei besagten Methoden. Dt. Patentanmeldung (1993), P 4321444.4, PCT/DE/00756(1994), weltweite Anmeldung, Europa erteilt (0708640, 16.09.1998), USA erteilt (5, 786,383; 28.06. 1998).

CLEMENT B.

Oxidation and reduction of nitrogen via CYP450: importance of the reduction of genotoxic *N*-hydroxylated functional groups. In: *Drug metabolism: towards the next millennium* (Gooderham N.J.), 59-71, IOS Press, Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington, DC, 1998.

CLEMENT B., SCHMITT S., ZIMMERMANN M.

Enzymatic reduction of benzamidoxime to benzamidine. *Arch. Pharm.*, **321**, (1988a), 955-956.

CLEMENT B., SCHMEZER P., WEBER H., SCHLEHOFER J.R., SCHMITT S., POOL B.L.

Genotoxic activities of benzamidine and its *N*-hydroxylated metabolite benzamidoxime in *Salmonella typhimurium* and mammalian cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **114**, (1988b), 363-368.

CLEMENT B., ZIMMERMANN M.

Mechanism of the microsomal *N*-hydroxylation of *para*-substituted benzamidines. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, (1988), 4747-4752.

CLEMENT B., IMMEL M., TERLINDEN R., WINGEN F.J.

Reduction of amidoxime derivatives to pentamidine *in vivo*. *Arch. Pharm.*, **325**, (1992), 61-62.

CLEMENT B., KUNZE T.

The reduction of 6-*N*-hydroxylaminopurine to adenine by xanthin oxidase. *Biochem. Pharmacol.*, **44**, (1992), 1501-1509.

CLEMENT B., KUNZE T.

In vitro oxygenation of *N,N'*-diphenylguanidines. *Xenobiotica*, **23**, (1993), 155-167.

CLEMENT B., IMMEL M., SCHMITT S., STEINMANN U.

Biotransformations of benzamidine and benzamidoxime *in vivo*. *Arch. Pharm.*, **326**, (1993a), 807-812.

CLEMENT B., JUNG F., PFUNDNER H.

N-hydroxylation of benzamidine to benzamidoxime by a reconstituted cytochrome P-450 oxidase system from rabbit liver: involvement of cytochrome P-450 IIC3. *Mol. Pharmacol.*, **43**, (1993b), 335-342.

CLEMENT B., JUNG F.

N-hydroxylation of the antiprotozoal drug pentamidine catalyzed by rabbit liver cytochrome P-450 2C3 or human liver microsomes, microsomal retroreduction, and further oxidative transformation of the formed amidoximes. *Drug Metab. Dispos.*, **22**, (1994), 486-497.

CLEMENT B., DEMESMAEKER M., LINNE S.

Microsomal catalyzed *N*-hydroxylation of guanabenz and reduction of the *N*-hydroxylated metabolite: characterization of the two reactions and genotoxic potential of guanoxabenz. *Chem. Res. Toxicol.*, **9**, (1996), 682-688.

CLEMENT B., LOMB R., MÖLLER W.

Isolation and characterization of the protein components of the liver microsomal O₂-insensitive NADH-benzamidoxime reductase. *J. Biol. Chem.*, **272**, (1997), 19615-19620.

CLEMENT B., CHRISTIANSEN K., GIRRESER U.

Phase 2 metabolites of *N*-hydroxylated amidines (amidoximes): synthesis, *in vitro* formation by pig hepatocytes, and mutagenicity testing. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, (2001), 319-326.

LITERATURVERZEICHNIS

CRETTON E.M., SOMMADOSSI J.P.

Reduction of 3'-azido-2',3'-dideoxynucleosides to their 3'-amino metabolite is mediated by cytochrome P-450 and NADH-cytochrome P-450 reductase in rat liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, **21**, (1993), 946-949.

CRIBB A.E., SPIELBERG S.P., GRIFFIN G.P.

N₄-hydroxylation of sulfamethoxazole by cytochrome P450 2C subfamily and reduction of sulfamethoxazole hydroxylamine in human and rat hepatic microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, **23**, (1995), 406-414.

DEBNATH A.K., LOPEZ DE COMPADRE R.L., DEBNATH G., SHUSTERMAN A.J., HANSCH C.

Structure-activity relationship of mutagenic aromatic and heteroaromatic nitro compounds. Correlation with molecular orbital energies and hydrophobicity. *J. Med. Chem.*, **34**, (1991), 786-797.

DEGRAY J.A., RAO D.N.R., MASON R.P.

Reduction of paraquat and related bipyridylum compounds to free radical metabolites by rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **289**, (1991), 145-152.

DELAForge M., SERVENT D., WIRSTA P., DUCROCQ C., MANSUY D., LENFANT M.

Particular ability of cytochrome P-450 CYP3A to reduce glyceryltrinitrate in rat liver microsomes: subsequent formation of nitric oxide. *Chem.-Biol. Interactions*, **86**, (1993), 103-117.

DEMESMAEKER M.

Dissertation, Kiel 1996.

DETERS S.

Dissertation in Vorbereitung, Kiel 2002.

DETERS S., CLEMENT B.

Characterization of the mitochondrial reductase involved in the activation of N-hydroxylated prodrugs. *Arch. Pharm.*, **333**, (2000), 12.

ERIKSSON B.I., ARFWIDSON A.C., FRISON L., ERIKSSON U.G., BYLOCK A., KALEBO P., FAGER G., GUSTAFSSON D.

A dose-ranging study of the oral direct thrombin inhibitor, ximelagatran, and its subcutaneous form, melagatran, compared with dalteparin in the prophylaxis of thromboembolism after hip or knee replacement: METHRO I. Melagatran for thrombin inhibition in orthopedic surgery. *Thromb. Haemost.*, **87**, (2002), 231-237.

ERIKSSON H., ERIKSSON U.G., FRISON L., HANSSON P.O., HELD P., HOLMSTRÖM M., HÄGG A., JONSSON T., LAPIDUS L., LEIJD B., STOCKELBERG D., SÄFWENBERG U., TAGHAVI A., THORSÉN M.

Pharmacokinetics and pharmacodynamics of melagatran, a novel synthetic LMW thrombin inhibitor, in patients with acute DVT. *Thromb. Haemost.*, **81**, (1999), 358-363.

ESTABROOK R.W., WERRINGLOER J.

The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Methods Enzymol.*, **52**, (1978), 212-221.

FERNANDEZ-SALGUERO P., HOFFMANN S.M., CHOLERTON S., MOHRENWEISER H., RAUNIOH., RAUTIO A., PELKONEN O., HUANG J.D., EVANS W.E., IDLE J.R. A

Genetic polymorphism in coumarin 7-hydroxylation: sequence of the human CYP2A genes and identification of variant CYP2A6 alleles. *Am. J. Hum. Genet.*, **57**, (1995), 651-660.

FORTH W., HENSCHLER D., RUMMEL W., STARKE K.

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 1998.

GAN J., SKIPPER P. L., TANNENBAUM S.R.

Oxidation of 2,6-dimethylaniline by recombinant human cytochrome P450s and human liver microsomes. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, (2001), 672-677.

GAO H., HANSCH C.

QSAR of P450 oxidation: on the value of comparing k_{cat} and K_m with k_{cat}/k_m . *Drug Metab. Rev.*, **28**, (1996), 513-526.

GILMORE J., ROTONDO F., PELLETIER A.M., LAMARRE J., ALAOUI -JAMALI M., KIRBY G.M.

Identification of a 43 kDa protein in human liver cytosol that binds to the 3'-untranslated region of CYP2A6 mRNA. *Biochem. Pharmacol.*, **62**, (2001), 669-678.

GIRRESER U., KÖNIG M., CLEMENT B.

Characterization of *para*-substituted benzamidoximes and benzamidine salts by ^{15}N NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **40**, (2002), 202-206.

GLOCK G.

P-Tolenylimidoäther. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **21**, (1888), 2650.

GOEPTAR A. R., SCHEERENS H., VERMEULEN N.P.E.

Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit. Rev. Toxicol.*, **25**, (1995), 25-65.

GOULD E.S.

Mechanismus und Struktur in der organischen Chemie. 265, Verlag Chemie, Weinheim 1962.

GREENLEE W.F., POLAND A.

An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity: induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Pharmacol. Experimental Therapeutics*, **205**, (1978), 596-605.

GUENGERICH F.P., BELL L.C., OKAZAKI O.

Interpretations of cytochrome P450 mechanisms from kinetic studies. *Biochimie*, **77**, (1995), 573-580.

GUENGERICH F.P., HOSEA N.A., PARIKH A., BELL-PARIKH L.C., JOHNSON W.W., GILLAM M.J., SHIMADA T.

Anthony Y.H. Lu. commemorative issue twenty years of biochemistry of human P450s. *Drug Metab. Dispos.*, **26**, (1998), 1175-1178.

GUENGERICH F.P.

Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, **6**, (2001), 611-650.

GURYEV O.L., GILEP A.A., USANOV S.A., ESTABROOK R.W.

Interaction of apo-cytochrome b_5 with cytochromes P450 3A4 and P450 17A: relevance of heme transfer reactions. *Biochemistry*, **40**, (2001), 5018-5031.

HADIDI H., ZAHLSEN K., IDLE J.R., CHOLERTON S.

A single amino acid substitution (Leu160His) in cytochrome P450 CYP2A6 causes switching from 7-hydroxylation to 3-hydroxylation of coumarin. *Food Chem. Toxicol.*, **35**, (1997), 903-907.

HAJOS A.K.D., WINSTON G.W.

Role of cytosolic NAD(P)H-quinone oxidoreductase and alcohol dehydrogenase in the reduction of p-nitrosophenol following chronic ethanol ingestion. *Arch. Biochem. Biophys.*, **295**, (1992), 223-229.

HALL E.J., KERRIGAN J.E., RAMACHANDRAN K., BENDER B.C., STANKO J.P., JONES S.K., PATRICK D.A., TIDWELL R.R.

Anti-*Pneumocystis* activities of aromatic diamidoxime prodrug. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **42**, (1998), 666-674.

HANSCH C.

On the structure of medicinal chemistry. *J. Med. Chem.*, **19**, (1976), 1-6.

HANSCH C., FUJITA T.

A method for the correlation of biological activity and chemical structure. *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, (1964), 1616-1626.

LITERATURVERZEICHNIS

HANSCH C., KURUP A., GARG R., GAO H.

Chem-bioinformatics and QSAR: a review of QSAR lacking positive hydrophobic terms. *Chem. Rev.*, **101**, (2001), 619-672.

HANSCH C., LEO A.J.

Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. John Wiley & Sons, New York, USA 1979.

HARRELSON W.G., MASON R.

Microsomal reduction of gentian violet evidence for cytochrome P-450-catalyzed free radical formation. *Mol. Pharmacol.*, **22**, (1982), 239-242.

HARSDORF A.

Dissertation, Kiel 1998.

HAUPTMANN J.

Pharmacokinetics of an emerging new class of anticoagulant/antithrombotic drugs. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **57**, (2002), 751-758.

HAUPTMANN J., PAINTZ M., KAISER B., RICHTER M.

Reduction of a benzamidoxime derivative to the corresponding benzamidine *in vivo* and *in vitro*. *Pharmazie*, **43**, (1988), 559-560.

HEWICK D.S.

Reductive metabolism of nitrogen-containing functional groups. In: *Metabolic basis of detoxification* (Hrsg. Jakoby W.B., Bend W.B., Caldwell J.R.). 151-170, Academic Press Inc., New York 1982.

HOFFMANN G.R., FUCHS R.P.P.

Mechanisms of frameshift mutations: insight from aromatic amines. *Chem. Res. Toxicol.*, **10**, (1997), 347-359.

HONKAKOSKI P., KOJO A., RAUNIO H., PASANEN M., JUVONEN R., LANG M.

Hepatic mitochondrial coumarin 7-hydroxylase: comparison with the microsomal enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, **267**, (1988), 558-567.

HUDECEK J., ANZENBACHEROVA E., ANZENBACHER P., MUNRO A.W., HILDEBRANDT P.

Structural similarities and differences of the heme pockets of various P450 isoforms as revealed by resonance Raman spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.*, **383**, (2000), 70-78.

HULTQUIST D.E., PASSON P.G.

Catalysis of methaemoglobin reduction by erythrocyte cytochrome b₅ and cytochrome b₅ reductase. *Nat. New Biol.*, **229**, (1971), 252-254.

INGELMAN-SUNDBERG M., JOHANSSON I.

Electron flow and complex formation during cytochrome P450-catalyzed hydroxylation reactions in reconstituted membrane vesicles. *Acta Chem. Scand.*, **38**, (1984), 845-851.

JUDKINS B.D., *et al.*

A versatile synthesis of amidines from nitriles via amidoximes. *Synthetic Communications*, **26**, (1996), 4351-4367.

JUNG F.

Dissertation, Kiel 1994.

KADLUBAR F.F., ZIEGLER D.

Properties of a NADH-dependent *N*-hydroxy amine reductase isolated from pig liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **162**, (1974), 83-92.

KATO R., IWASAKI K., NOGUCHI H.

Reduction of tertiary amine *N*-oxides by cytochrome P-450. *Mol. Pharmacol.*, **14**, (1978), 654-664.

KAUP H.

Dissertation, Kiel 1996.

KHAN K.K., HE Y.Q., DOMANSKI T.L., HALPERT J.R.

Midazolam oxidation by cytochrome P450 3A4 and active-site mutants: an evaluation of multiple binding sites and of the metabolic pathway that lead enzyme inactivation. *Mol. Pharmacol.*, **61**, (2002), 495-506.

KHARASCH E.D., HANKINS D.C., TARADY J.K.

Single-dose methoxsalen effects on human cytochrome P-450 2A6 activity. *Drug Metab. Dispos.*, **28**, (2000), 28-31.

KHOJASTEH-BAKHT S.C., KOENIGS L. L., PETER R.M., TRAGER W.F., NELSON S.D.

(R)-(+)-menthofuran is a potent, mechanism-based inactivator of human liver cytochrome P450 2A6. *Drug Metab. Dispos.*, **26**, (1998), 701-704.

KITAGAWA K., KUNUGITA N., KITAGAWA M., KAWAMOTO T.

CYP2A6*6, a novel polymorphism in cytochrome P450 2A6, has a single amino acid substitution (R128Q) that inactivates enzymatic activity. *J. Biol. Chem.*, **276**, (2001), 17830-17835.

KITAMURA S., TATSUMI K.

Purification of hydroxy-2-acetylaminofluorene reductase from rabbit liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **133**, (1985), 67-74.

KITAMURA S., SUGIHARA K., TATSUMI K.

A unique tertiary amine *N*-oxide reduction system composed of quinone reductase and heme in rat liver preparations. *Drug Metab. Dispos.*, **27**, (1999), 92-97.

KOENIGS L.L., PETER R.M., THOMPSON S.J., RETTIE A.E., TRAGER W.F.

Mechanism-based inactivation of human liver cytochrome P450 2A6 by 8-methoxypsoralen. *Drug Metab. Dispos.*, **25**, (1997), 1407-1415.

KOENIGS L.L., TRAGER W.F.

Mechanism-based inactivation of P450 2A6 by furanocoumarins. *Biochemistry*, **37**, (1998), 10047-10061.

KOMATSU T., YAMAZAKI H., SHIMADA N., NAKAJIMA M., YOKOI T.

Roles of cytochromes P450 1A2, 2A6, and 2C8 in 5-fluoruracil formation from tegafur, an anticancer prodrug, in human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.*, **28**, (2000), 1457-1463.

KOYMANS L., DONNÉ-OP DEN KELDER G.M., KOPPELE TE J.M., VERMEULEN N.P.E.

Cytochromes P450: their active-site structure and mechanism of oxidation. *Drug Metab. Rev.*, **25**, (1993), 325-387.

KRÜGER P.

Über Abkömmlinge des Benzenylamidoxims. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **18**, (1885), 1055-1060.

KUBINYI H.

3D QSAR in Drug Design Theory Methods and Applications. Escrom Science Publishers B.V., Leiden, Niederlande 1993.

KUBINYI H.

Der Schlüssel zum Schloß II. Hansch-Analyse, 3D-QSAR und *De novo*-Design. *Pharmazie in unsrer Zeit*, **5**, (1994), 281-290.

KUSHIDA H., FUJITA K., SUZUKI A., YAMADA M., NOHMI T., KAMATAKI T.

Development of a *Salmonella* tester strain sensitive to promutagenic *N*-nitrosamines: expression of recombinant CYP2A6 and human NADPH-cytochrome P450 reductase in *S. typhimurium* YG7108. *Mut. Res.*, **471**, (2000), 135-143.

KUWADA M., HORIE S., OGURA Y.

Studies on the enzymatic reduction of *C*-nitroso compounds. *J. Biochem.*, **88**, (1980), 859-869.

LITERATURVERZEICHNIS

LAEMMLI U.K.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage. *Nature*, **227**, (1970), 680-685.

LASHMET JOHNSON P.R., ZIEGLER D.M.

Properties of an *N,N*-dimethyl-*p*-aminoazobenzene oxide reductase purified from rat liver cytosol. *J. Biochem. Toxicol.*, **1**, (1986), 15-27.

LE GAL A., DRÉANO Y., GERVASI P.G., BERTHOU F.

Human cytochrome P450 2A6 is the major enzyme involved in the metabolism of three alkoxyethers used as oxyfuels. *Toxicol. Lett.*, **124**, (2001), 47-58.

LEFEVRE-GROBIOLLOT S.D., BOUCHER J.L., MAHY J-P., RICOUX R., DESBOIS A., ZIMMERMANN J.L., MANSUY D.

N-hydroxyguanidines as new heme ligands: UV-Visible, EPR, and resonance raman studies of the interaction of various compounds bearing a C=NOH function with microperoxidase-8. *Biochemistry*, **40**, (2001), 9909-9917.

LEO A., JOW P.Y., SILIPO C., HANSCH C.

Calculation of hydrophobic constant (log P) from π and f constants. *J. Med. Chem.*, **18**, (1975), 865-868.

LEWIS D.F.V. Cytochromes P450, structure function and mechanism. Taylor and Francis, London, UK 1996.

LEWIS D.F.V., PRATT J.M.

The P450 catalytic cycle and oxygenation mechanism. *Drug Metab. Rev.*, **30**, (1998), 739-786.

LINNE S.

Dissertation, Kiel 1996.

LIVINGSTONE D.

Data Analysis for Chemists. 6-9, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 1995.

LOMB R.

Dissertation, Kiel 1995.

LOPIAN K.

Dissertation in Vorbereitung, Kiel 2002.

MASON R.P., RHODES D.G., HERBETTE L.G.

Reevaluating equilibrium and kinetic binding parameters for lipophilic drugs based on a structural model for drug interaction with biological membranes. *J. Med. Chem.*, **34**, (1991), 869-877.

MAU S.

Dissertation in Vorbereitung, Kiel 2002.

MAU S., CLEMENT B.

Reduction of *N*-hydroxylated compounds by microsomal preparation from different organs, *Arch. Pharm.*, **334**, (2001), 23.

MCLANE K.E., FISHER J., RAMAKRISHNAN K.

Reductive drug metabolism. *Drug Metab. Rev.*, **14**, (1983), 741-799.

MIHARA K., SATO R.

Detergent-solubilized NADH-cytochrome b_5 reductase. *Methods Enzymol.*, **52**, (1978), 102-108.

MILLER J.A.

Anisenyl-, Salicyl- und Methylsalicylamidoxim. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **22**, (1889), 2790.

MÖLLER W.

Dissertation, Kiel 1997.

- MOSS R.A., TERPINSKY J., COX D.P., DENNEY D.Z., KROGH-JESPERSN K.
Azide and fluoride exchange reactions of halodiazirines. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, (1985), 2743-2748.
- MURAYAMA N., SAI K., NAKAJIMA Y., KANIWA N., OZAWA S., OHNO Y., SAWADA J.
Expression of CYP2A6 in tumor cells augments cellular sensitivity to tegafur. *Jpn. J. Cancer Res.*, **92**, (2001), 524-528.
- MUTSCHLER E.
Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 20-33, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1996.
- NAKAMURA K., MARTIN M.V., GUENGERICH F.P.
Random mutagenesis of human cytochrome P450 2A6 and screening with indole oxidation products. *Arch. Biochem. Biophys.*, **395**, (2001), 25-31.
- NAKAO M., GOTO Y., HIRATSUKU A., WATABE T.
Reductive metabolism of nitro-p-phenylenediamine by rat liver. *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, (1991), 177-180.
- NAKASA H., KOMIYA M., OHMORI S., RIKIHISA T., KIUCHI M., KITADA M.
Characterization of human liver microsomal cytochrome P450 involved in the reductive metabolism of zonisamide. *Mol. Pharmacol.*, **44**, (1993), 216-221.
- NEBERT D.W., GONZALEZ F.J.
P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, (1987), 945-993.
- NELSON D.R.
Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch. Biochem. Biophys.*, **369**, (1999), 1-10.
- NIEMELÄ O., PARKKILA S., JUVONEN R.O., VIITALA K., GELBOIN H.V., PASANEN M.
Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J. Hepatol.*, **893**, (2000), 893-901.
- NUNOYA K., YOKOI T., KIMURA K., INOUE K., KODAMA T., FUNAYAMA M., NAGASHIMA K., FUNAE Y., GREEN C., KINOSHITA M., KAMATAKI T.
A new deleted allele in the human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene found in individuals showing poor metabolic capacity to coumarin and (+)-cis-3,5-dimethyl-2-(3-pyridyl)thiazolidin-4-one hydrochloride (SM-12502). *Pharmacogenetics*, **8**, (1998), 239-249.
- NUNOYA K., YOKOI T., TAKAHASHI Y., KIMURA K., KINOSHITA M., KAMATAKI T.
Homologous unequal cross-over within the human CYP2A gene cluster as a mechanism for the deletion of the entire CYP2A6 gene associated with the poor metabolizer phenotype. *J Biochem.*, **126**, (1999), 402-407.
- OMURA T., SATO R.
The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 239 (1964), 2370-2385.
- ORTIZ DE MONTELLANO P.R.
Cytochrome P450. Structure, Mechanism and Biochemistry. Plenum Press, New York, USA 1995.
- OSCARSON M.
Genetic polymorphism in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metab. Dispos.*, **29**, (2001), S. 91-95.
- OSCARSON M., GULLSTEN H., RAUTIO A., BERNAL M.L., SINUES B., DAHL M.L., STENGARD J.H., PELKONEN O., RAUNIO H., INGELMAN-SUNDBERG M.
Genotyping of human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6), a nicotine C-oxidase. *FEBS Lett.*, **438**, (1998), 201-205.

LITERATURVERZEICHNIS

OSCARSON M., MC LELLAN R.A., GULLSTEN H., YUE Q.Y., LANG M.A., BERNAL M.L., SINUES B., HIRVONEN A., RAUNIO A., PELKONEN O., INGELMAN-SUNDBERG M.
Characterisation and PCR-based detection of a CYP2A6 gene deletion found at a high frequency in a chinese population. *FEBS Lett.*, **448**, (1999a), 105-110.

OSCARSON M., MC LELLAN R.A., GULLSTEN H., AGUNDEZ J.A., BENITEZ J., RAUTIO A., RAUNIO H., PELKONEN O., INGELMAN-SUNDBERG M.
Identification and characterization of novel polymorphisms in the CYP2A locus: implications for nicotine metabolism. *FEBS Lett.*, **460**, (1999b), 321-327.

PASCHKE T., RIEFLER M., SCHULER-METZ A., WOLZ L., SCHERER G., MCBRIDE C.M., BEPLER G.
Comparison of cytochrome P450 2A6 polymorphism frequencies in caucasians and african-americans using a new one-step PCR-RFLP genotyping method. *Toxicology*, **168**, (2001), 259-268.

PATRICK D.A., HALL J.E., BENDER B.C., MCCURDY D.R., WILSON W.D., TANIOUS F.A., SAHA S., TIDWELL R.R.
Synthesis and anti-*Pneumocystis carinii* pneumonia activity of novel dicationic dibenzothiophenes and orally active prodrugs. *J. Med. Chem.*, **34**, (1999), 575-583.

PERRET A., POMPON D.
Electron shuttle between membrane-bound cytochrome P450 3A4 and b₅ rules uncoupling mechanisms. *Biochemistry*, **37**, (1998), 11412-11424.

PINNER A.
Über die Umwandlung der Nitrile in Imide. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **16**, (1883), 1643-1655.

PINNER A., GRADENWITZ F.
Über die Einwirkung von Hydrazin auf Imidoäther. *Ann. Chem.*, **298**, (1897), 47.

PITARQUE M., VAN RICHTER O., OKE B., BERKKAN H., OSCARSON M., INGELMAN-SUNDBERG M.
Identification of a single nucleotide polymorphism in the TATA box of the CYP2A6 gene: impairment of its promoter activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **284**, (2001), 455-460.

PODLOGAR B.L., FERGUSON D.M. QSAR and CoMFA:
A perspective on the practical application to drug discovery. *Drug design and discovery*, **17**, (2000), 4-12.

POULOS T.L.
Cytochrome P450. *Current opinion in structural biology*, **5**, (1995), 767-774.

PROBST M.R., BEER M., BEER M., JENŐ P., MEYER U.A., GASSER R.
Human liver arylacetamide deacetylase. *J. Biol. Chem.*, **269**, (1994), 21650-21656.

RACANATINI M., KLEIN T., YANG C.Z., McCLARIN J., LANGRIDGE R., HANSCH C.
Quantitative structure-activity relationships and molecular graphics in ligand receptor interactions: amidine inhibition of trypsin. *Mol. Pharmacol.*, **29**, (1986), 436-446.

RAHMATHULLAH S.M., HALL J.E., BENDER B.C., MCCURDY D.R., TIDWELL R.R., BOYKIN D.W.
Prodrugs for amidines: synthesis and anti-*Pneumocystis carinii* activity of carbamates of 2,5-Bis(4-amidinophenyl)furan. *J. Med. Chem.*, **42**, (1999), 3994-4000.

RAO Y., HOFFMANN E., ZIA M., BODIN L., ZEMAN M., SELLERS E.M., TYNDALE R.F.
Duplications and defects in the CYP2A6 gene: identification, genotyping, and *in vivo* effects on smoking. *Mol Pharmacol.*, **58**, (2000), 747-755.

RAVICHANDRAN K.G., BODDUPALLI S.S., HASEMANN C.A., PETERSON J.A., DEISENHOFER J.
Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science*, **261**, (1993), 731-736.

RIECKERT W.

Dissertation, Kiel 1999.

RILEY R.J., WORKMAN P.

Enzymology of the reduction of the potent benzotriazine-di-*N*-oxide hypoxic cell cytotoxin SR 4233 (WIN 59075) by NAD(P)H:(quinone acceptor) oxidoreductase. *Biochem. Pharmacol.*, **43**, (1992), 167-174.

RIVERA M., SEETHARAMAN R., GIRDHAR D., WIRTZ M., ZHANG X., WANG X., WHITE S.

The reduction potential of cytochrome b₅ is modulated by its exposed heme edge. *Biochemistry*, **37**, (1998), 1485-1494.

ROSEN G.M., RAUCKMAN E., HANCK K.W.

Selective bioreduction of nitroxides by rat liver microsomes. *Toxicol. Lett.*, **1**, (1977), 71-74.

RUCKPAUL K., BERNHARDT R.

Biochemical aspects of the monooxygenase system in the endoplasmatic reticulum of mammalian liver. In: *Cytochrome P450* (Hrsg. Ruckpaul K., Hein H.), 9-57, Akademie-Verlag, Berlin 1984.

SADEQUE A.J.M., FISHER M.B., KORZEKWA K.R., GONZALEZ F. J., RETTIE A.E.

Human CYP2C9 and CYP2A6 mediate formation of the hepatotoxin 4-ene-valproic acid. *J. Pharmacol. Experimental Therapeutics*, **283**, (1997), 698-703.

SANDMEYER T.

Über die Ersetzung der Amidgruppe durch Chlor in den aromatischen Substanzen. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **17**, (1884), 1633.

SCHENKMAN J.B., JANSSON I.

Interaction between cytochrome P450 and cytochrome b₅. *Drug Metab. Rev.*, **31**, (1999), 351-364.

SCHENKMAN J.B., REMMER H., ESTABROOK R.W.

Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol. Pharmacol.*, **3**, (1967), 113-123.

SCHEPER T., APPEL K.E., SCHUNACK W., SOMOGYI A., HILDEBRANDT A.G.

Metabolic denitrosation of *N*-nitroso-*N*-methylaniline: detection of amine-metabolites. *Chem.-Biol. Interactions*, **77**, (1991), 81-96.

SCHLICHTING I., BERENDZEN J., CHU K., STOCK A.M., MAVES S.A., BENSON D.E., SWEET R.M., RINGE D., PETSKO G.A., SLIGAR S.G.

The catalytic pathway of cytochrome P450cam at atomic resolution. *Science*, **287**, (2000), 1615-1622.

SCHMITT S.

Dissertation, Marburg 1991

SCHUBART L.H.

Über das p-Homobenzylamidoxim und Abkömmlinge desselben. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **19**, (1886), 1487.

SELLERS E.M., KAPLAN H.L., TYNDALE R.F.

Inhibition of cytochrome P450 2A6 increases nicotine's oral bioavailability and decreases smoking. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **68**, (2000), 35-43.

SHARP R.E., CHAPMAN S.K.

Mechanisms for regulating electron transfer in multi-centre redox proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1432**, (1999), 143-158.

SHIMADA T., TSUMURA F., YAMAZAKI H.

Prediction of human liver microsomal oxidations of 7-ethoxycoumarin and chlorzoxazone with kinetic parameters of recombinant cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab. Dispos.*, **27**, (1999), 1274-1280.

LITERATURVERZEICHNIS

SILIPO C., VITTORIA A.

QSAR in a series of muscarinic agents. *Farmaco [Sci.]*, **34**, (1979), S. 858-868.

SMITH P.K., KROHN R.I., HERMANSON G.T., MAALIA A.K., GARTNER F.H., PROVENZANO M.D., FUJIMOTO E.K., GOEKE N.M., OLSON B.J., KLENK D.C.

Measurements of proteins using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, (1985), 76-85.

SOUCEK P.L.

Expression of cytochrome P450 2A6 in *Escherichia coli*: purification, spectral and catalytic characterization, and preparation of polyclonal antibodies. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2**, (1999), 190-200.

STEPHENSON L., WARBURTON W.K., WILSON M.J.

Reaction of some aromatic nitriles with hydroxylamine to give amides, and an alternative preparation of amidoximes. *J. Chem. Soc.*, **C**, (1969), 861-864.

STODDART A.M., LEVINE W.G.

Azoreductase activity by purified rabbit liver aldehyde oxidase. *Biochem. Pharmacol.* **43** (1992), 2227-2235.

STRITTMATTER P., MACHUGA E.T., ROTH G.J.

Reduced pyridine nucleotides and cytochrome b₅ as electron donors for prostaglandin synthetase reconstituted in dimyristyl phosphatidylcholine vesicles. *J. Biol. Chem.*, **257**, (1982), Nr. 20, 11883-11886.

SELASSIE C.D., HANSCH C., KHAWAJA T.A.

Structure activity relationships of antineoplastic agents in multidrug resistance. *J. Med. Chem.*, **33**, (1990), 1914-1919.

SU T., BAO Z., ZHANG Q.Y., SMITH T.J., HONG J.Y., DING X.

Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res.*, **60**, (2000), 5074-5079.

SUGIHARA K., TATSUMI K.

Participation of liver aldehyde oxidase in reductive metabolism of hydroxamic acids to amides. *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**, (1986), 289-293.

TAFEL J., ENOCH C.

Alkylierung der Säureamide. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **23**, (1890), 103.

TATSUMI K., AMANO H.

Biotransformation of 1-nitropyrene and 2-nitrofluorene to novel metabolites, the corresponding formylamino compounds, in animal bodies. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **142**, (1987), 376-382.

TATSUMI K., ISHIGAI M.

Oxime-metabolizing activity of liver aldehyde oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **253**, (1987), 413-418.

TATSUMI K., YAMADA H., KITAMURA S.

Reductive metabolism of *N*-nitrosodiphenylamine to the corresponding hydrazine derivative. *Arch. Biochem. Biophys.*, **226**, (1983), 174-181.

TESTA B.

Biochemistry of redox reactions. Academic Press Inc., San Diego, California 1995.

a) S. 8-10

b) S. 71-121

c) S. 164-202

d) S. 415-434

TIEMANN F.

Über die Einwirkung von Hydroxylamin auf die Nitrile. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **17**, (1884), 126.

- TMEJ C., CHIBA P., HUBER M., RICHTER E., HITZLER M., SCHAPER K.J., ECKER G.
A combined Hansch/Free-Wilson approach as predictive tool in QSAR studies on propafenone-type modulators of multidrug resistance. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, **331**, (1998), 233-240.
- TOPOL
Comparison of sibrifiban with aspirin for prevention of cardiovascular events after acute coronary syndroms: a randomised trial. *Lancet*, **355**, (2000), 337-345.
- TRUJILLO M., ALVAREZ M.N., PELUFFO G., FREEMAN B.A.
Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols. *J. Biol. Chem.*, **273**, (1998), 7828-7834.
- VENTER J.C. *et al.*
The sequence of the human genome. *Science*, **291**, (2001), 1304-1351.
- WANG S., HALL J.E., TANIOUS F.A., WILSON W.D., PATRICK D.A., MCCURDY D.R., BENDER B.C., TIDWELL R.R.
Dicationic dibenzofuran derivatives as anti-*Pneumocystis carinii* pneumonia agents: synthesis, DNA binding affinity, and anti-*P. carinii* activity in an immunosuppressed rat model. *Eur. J. Med. Chem.*, **34**, (1999), 215-224.
- WATERMAN M., JOHNSON E.F.
Methods in enzymology. Cytochrome P450. Bd. 206. Academic Press Inc., San Diego, California 1991.
- WEISE J.
P-Nitrobenzenylamidoxim und p-Methyl-o-nitrobenzenylamidoxim. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **22**, (1889), 2418.
- WITTKE B., MACKIE I.J., MACHIN S.J., TIMM U., ZELL M., GOGGIN T.
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of RO 44-3888 after single ascending oral doses of sibrifiban, an oral platelet aggregation inhibitor, in healthy male volunteers. *J. Clin. Pharmacol.*, **47**, (1999), 521-530.
- WOHLERS
Dissertation, Kiel 1994.
- XU C., RAO Y.S., XU B., HOFFMANN E., JONES J., SELLERS E.M., TYNDALE R.F.
An *in vivo* pilot study characterizing the new CYP2A6*7, *8, and *10 alleles. *Biochem Biophys Res Commun.*, **290**, (2002), 318-324.
- YAMANO S., NAGATA K., YAMAZOE Y., KATO R., GELBOIN H., GONZALEZ F. J.
cDNA and deduced amino acid sequences of human P450 2A3 (CYP2A3). *Nucleic Acids Res.*, **17**, (1989), 4888.
- YAMANO S., TATSUNO J., GONZALEZ F.J.
The CYP2A3 gene product catalyzes coumarin 7-hydroxylation in human liver microsomes. *Biochemistry*, **29**, (1990), 1322-1329.
- YAMAZAKI H., JOHNSON W.W., UENG Y.F., SHIMADA T., GUENGERICH F.P.
Lack of electron transfer from cytochrome b₅ in stimulation of catalytic activities of cytochrome P450 3A4. *J. Biol. Chem.*, **271**, (1996a), 27438-27444.
- YAMAZAKI H., NAKANO M., IMAI Y., UENG, Y.F., GUENGERICH, F., SHIMADA T.
Roles of cytochrome b₅ in the oxidation of testosterone and nifedipine by recombinant cytochrome P450 3A4 and by human liver microsomes. *Arch. Bioch. Biophys.*, **2**, (1996b), 174-182.
- YUN C., SHIMADA T., GUENGERICH F.P.
Purification and characterization of human liver microsomal cytochrome P-450 2A6. *Mol. Pharmacol.*, **40**, (1991), 679-685.

LITERATURVERZEICHNIS

ZBAIDA S., BREWER F., LEVINE W.G.

Substrates for microsomal azoreductase Hammett substituent effects, NMR studies, and response to inhibitors. *Drug Metab. Dispos.*, **20**, (1992), 902-908.

ZHANG W., KILICARSLAN T., TYNDALE R.F., SELLERS E.M.

Evaluation of methoxsalen, tranilcypromin, and tryptamine as specific and selective CYP2A6 inhibitors *in vitro*. *Drug Metab. Dispos.*, **26**, (2001), 897-902.

ZIEGLER D.M.

Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities. *Drug Metab. Rev.*, **19**, (1988), 1-32.

ZIMMERMANN M.

Dissertation, Freiburg 1987.

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. Bernd Clement.

Für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die fortwährende Diskussionsbereitschaft und die mir erwiesene Förderung möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Doktorvater herzlich bedanken.

Ganz besonders danke ich Katrin, Silke und Juliane für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die wertvollen Anregungen, die ich dabei von ihnen erhalten habe. Mein Vater war so lieb, viel Zeit in die Korrektur der Rechtschreibung zu investieren. Bei Silke möchte ich mich außerdem noch für das Bereitstellen von gereinigten Enzymen bedanken. Ich weiß, wieviel Arbeit dahinter steckt! Außerdem hatten wir immer viel Spaß auf diversen Partys. Juliane habe ich den ruhigen Raum zum Zusammenschreiben zu verdanken. Ich habe mich aber auch über die stets gute Zusammenarbeit mit Dir, Katrin, gefreut. Wir waren dabei nicht nur während der gemeinsamen CYP2A6-Reinigung ein super Team! Das wichtigste aber war, daß wir einander immer geholfen haben, vor allem wenn der andere gerade wenig Zeit hatte.

Bei Sven, Meike und Sabine bedanke ich mich für die nette Bürogemeinschaft. Ich habe mich im 4.Stock immer sehr wohl gefühlt. Sven war ich besonders dankbar für die stets prompte Hilfe bei HPLC-Problemen jeglicher Art. Außerdem danke ich ihm für die Durchführung der Untersuchung zur Vitamin-D₃-Hydroxylierung. Auch bei Kiki möchte ich mich für die kurze, aber gute Zusammenarbeit hierbei bedanken. Meike danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei meinen Inkubationen, auch das Squash-Spielen mit ihr hat mir immer viel Spaß gemacht.

Maren und Ulli Girreser danke ich für die Synthesen der *para*-substituierten Benzamidoxime und Benzamidine. Ulli hat mir außerdem mit seinen zahlreichen Diskussionen zum Thema Struktur-Aktivitäts-Beziehungen besonders weitergeholfen. Susan danke ich für die wirklich nette Hilfe bei der Lipophilie-Bestimmung. Außerdem möchte ich mich noch bei Kirsten für die Bereitstellung der Apparatur zur Einhaltung der anaeroben Bedingungen bedanken.

Ich danke allen Kollegen und Freunden, die mich gerade in den letzten Monaten des Zusammenschreibens durch aufmunternde Worte unterstützt haben.

Am allermeisten möchte ich aber meiner Familie danken, die immer an mich geglaubt und mich gerade in stressigen Zeiten unterstützt hat. Ihre seid mir sehr wichtig! Besonders Matthias hat mir bei allen Höhen und Tiefen, die ich während meiner Promotion durchlebt habe, immer liebevoll zur Seite gestanden. Ich würde Dich jederzeit wieder heiraten!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Familienname	Wiebke Karhan
Geburtsdatum	28. April 1973
Geburtsort	Husum
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1997 - 1983	Grund- und Hauptschule Mildstedt
1983 - 1992	Hermann-Tast-Gymnasium Husum
Juni 1992	Abitur

Studium

April 1993	Beginn des Pharmaziestudiums an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
März 1995	1. Staatsexamen
Juni 1997	2. Staatsexamen
Juli 1997 - Juni 1998	Praktisches Jahr in der Belvedere-Apotheke, Kiel
Juli 1998	3. Staatsexamen, Erteilung der Approbation

Promotion

1. Juli 1998 – 30. Juni 2002	Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement
1. Juli - 14. Oktober 1998	Wissenschaftliche Angestellte der Firma Pharmatech GmbH, Flintbek
15. Oktober - 31. Dezember 1998	Wissenschaftliche Angestellte der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
1. Januar 1999 - 14. November 2000	Stipendium zur Förderung des künstlerischen und wissenschaftlichen Nachwuchses des Landes Schleswig-Holstein
seit 15. November 2000	wissenschaftliche Angestellte der Christian- Albrechts-Universität