

STUDIEN ZUR IDENTIFIZIERUNG EINES PRODRUG-AKTIVIERENDEN ENZYMSYSTEMS



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

vorgelegt von
KATRIN MATSCHKE

KIEL 2004

Referent:

Prof. Dr. B. Clement

Korreferent:

HD Dr. T. Kunze

Tag der mündlichen Prüfung:

3., 7. und 13. Dezember 2004

zum Druck genehmigt:

Kiel, den 15. Dezember 2004

Prof. Dr. W. Grotemeyer
(Dekan)

Für meine Eltern

A	Absorption
Abb.	Abbildung
Ac(M)NPV	<i>Autographa californica</i> (multiple) nuclear polyhedrosis virus (Wildtyp)
ACN	Acetonitril
AcNPV/...	rekombinante Viren mit dem im Text erläuterten Insert
ade	Adenin
δ -ALA	δ -Aminolävulinsäure
5'-AMP-Sepharose	5'-Adenosinmonophosphat-Sepharose
APCI	Athmospheric Pressure Chemical Ionization
APOD	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
Aqua dem.	Demineralisiertes Wasser
AS	Aminosäure
Aufs	Absorbance units full-scale
b ₅	Cytochrom b ₅
BA	Benzamidin
BAO	Benzamidoxim
BCA	Bicinchonic Acid (=2,2'-Bischinolin-4,4'-dicarbonsäure)
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaar (base pair)
b ₅ -Reduktase	NADH-Cytochrom b ₅ -Reduktase
BSA	Bovines Serum Albumin
<i>Bsu</i> 36 I	Restriktionsendonuklease
BVES	Baculovirusvektor-Expressionssystem
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CYP	Cytochrom P450
CYP2D25'	CYP2D25-Sequenz mit 5 Aminosäureaustauschen
DCM	Dichlormethan
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

DLPC	L- α -Dilaurylphosphatidylcholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPC	L- α -Dioleoylphosphatidylcholin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> - tetraessigsäure
Em	Emission
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray Ionisierung
Ex	Extinktion
FKS	Fötales Kälberserum
FM	Fließmittel
GST	Glutathion-S-Transferase
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
his	Histidin
HLM	Humane Lebermikrosomen
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
I	Intensität
ICSC	International chemical safety cards
kD	Kilodalton
KOH	Kaliumhydroxid
LB	Luria-Bertani
LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
lys	Lysin
MALDI	matrix-assisted laser-desorption ionization
MAK	Monoklonale(r) Antikörper
MCS	multiple Klonierungsstelle
MeOH	Methanol

MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MS	Massenspektrometrie/Massenspektrometer
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
ND	nicht detektierbar
NP	Normalphase
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
P450	Cytochrom P450
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEG	Polyethylenglykol
<i>p.i.</i>	post infectionem
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phospho-L-Serin
RP	Umkehrphase (reversed phase)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
<i>Sf</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SLM	Schweinelebermikrosomen
SOD	Superoxid-Dismutase
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCE	1,1,1-Trichlorethan
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

trp	Tryptophan
U	Unit
UDP	Uridindiphosphat
U/min	Umdrehungen pro Minute
ura	Uracil
v/v	Volumenverhältnis
wt	Wildtyp
YLE	Yeast Lytic Enzyme

1	EINFÜHRUNG	1
1.1	BIOTRANSFORMATION	1
1.1.1	DEFINITION UND BEDEUTUNG	1
1.1.2	FREMDSTOFFMETABOLISIERENDE ENZYME	4
1.1.2.1	Übersicht	4
1.1.2.2	Das Cytochrom P450-Enzymsystem	5
1.1.2.2.1	Vorkommen, Struktur und Funktion	5
1.1.2.2.2	Der katalytische Zyklus	10
1.1.3	BIOTRANSFORMATION STICKSTOFFHALTIGER FUNKTIONELLER GRUPPEN	11
1.1.3.1	Übersicht	11
1.1.3.2	Das Benzamidoxim-Reduktase-System	15
1.2	VITAMIN D₃ UND DESSEN METABOLITE	19
1.2.1	VORKOMMEN, STRUKTUR UND BEDEUTUNG	19
1.2.2	REAKTIONEN DER VITAMIN D ₃ -HYDROXYLASEN	20
1.3	THEMA UND ZIELSETZUNG	25
2	EXPRESSION DER PORCINEN VITAMIN D₃ 25-HYDROXYLASE	27
2.1	EINLEITUNG	27
2.1.1	<i>IN VITRO</i> BIOTRANSFORMATION	27
2.1.1.1	<i>In vitro</i> Systeme für Metabolismusstudien	27
2.1.1.2	Rekombinante P450-Enzyme	29
2.1.2	DAS EXPRESSIONSSYSTEM <i>ESCHERICHIA COLI</i>	30
2.1.3	DAS BACULOVIRUSVEKTOR-EXPRESSIONSSYSTEM (BVES)	30
2.1.3.1	Allgemeine Einführung	30
2.1.3.2	Expression von CYP2D25' im BVES/ <i>Sf9</i>	32
2.1.4	DAS EXPRESSIONSSYSTEM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	33
2.1.4.1	Allgemeine Einführung	33
2.1.4.2	Expression von CYP2D25 in der Hefe	35

2.1.5	ZIELSETZUNG	38
2.2	METHODEN	40
2.2.1	ARBEITEN MIT DEM EXPRESSIONSSYSTEM BACULOVIRUS/ <i>Sf9</i>	40
2.2.1.1	Materialien	40
2.2.1.1.1	Chemikalien und verwendete Materialien	40
2.2.1.1.2	Verwendete Viren	40
2.2.1.1.3	Verwendeter Stamm	41
2.2.1.1.4	Eingesetzte Vektoren	41
2.2.1.2	Geräte	41
2.2.1.3	Heterologe Expression und Mikrosomengewinnung	42
2.2.1.3.1	Kultivierung der <i>Sf9</i> -Zellen	42
2.2.1.3.2	Überführung einer Dauerkultur in eine Schüttelkultur	42
2.2.1.3.3	Gewinnung eines High-Titer-Virusstocks	43
2.2.1.3.4	Infektion von <i>Sf9</i> -Schüttelkulturen und Zellernte	43
2.2.1.3.5	Mikrosomengewinnung aus <i>Sf9</i> -Zellen	43
2.2.1.3.6	Aufreinigung des exprimierten Proteins an Glutathion-Agarose	44
2.2.1.3.7	Variation der Hämin-Supplementierung	45
2.2.2	ARBEITEN MIT DEM EXPRESSIONSSYSTEM <i>ESCHERICHIA COLI</i>	47
2.2.2.1	Materialien	47
2.2.2.1.1	Chemikalien und verwendete Materialien	47
2.2.2.1.2	Enzyme	47
2.2.2.1.3	Verwendeter Stamm	48
2.2.2.1.4	Eingesetzte Plasmide	48
2.2.2.2	Geräte	48
2.2.2.3	Sterilisation	48
2.2.2.4	Transformation von <i>E. coli</i>	49
2.2.2.5	DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	50
2.2.2.6	Restriktionshydrolyse der aus <i>E. coli</i> isolierten DNA	50
2.2.2.7	Kontrolle der Restriktionshydrolyse mittels Gelelektrophorese	50
2.2.3	ARBEITEN MIT DEM EXPRESSIONSSYSTEM <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	51
2.2.3.1	Materialien	51
2.2.3.1.1	Chemikalien und verwendete Materialien	51
2.2.3.1.2	Verwendete Stämme	52

2.2.3.1.3	Eingesetzte Plasmide	52
2.2.3.1.4	Verwendete Primer	53
2.2.3.2	Geräte	53
2.2.3.3	Transformation von S 150	54
2.2.3.4	Transformation von PSY 142	55
2.2.3.5	Kultivierung des Hefestammes W(N)	55
2.2.3.6	Transformation von W(N)	56
2.2.3.7	Primerkontrolle mittels PCR	57
2.2.3.8	Überprüfung der Transformanten mittels PCR	58
2.2.3.9	Expression von CYP2D25 in W(N)	59
2.2.3.10	Mikrosomengewinnung aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60
2.2.3.10.1	Enzymatischer Zell-Aufschluss mit einem zellwandlyisierenden Enzym (Quantazyme ylg™)	60
2.2.3.10.2	Enzymatischer Zell-Aufschluss mit Zymolyase und Cytohelicase	62
2.2.3.10.3	Mechanischer Zell-Aufschluss mit der Glasperlenmethode	64
2.2.3.11	OD ₆₀₀ -Bestimmung	66
2.2.4	BIOCHEMISCHE METHODEN	66
2.2.4.1	Materialien	66
2.2.4.2	Geräte	67
2.2.4.3	SDS-PAGE	67
2.2.4.3.1	Verwendete Puffer und Lösungen	67
2.2.4.3.2	Zusammensetzung der Gele	68
2.2.4.3.3	Probenvorbereitung und Probenauftrag	68
2.2.4.3.4	Durchführung der Gelelektrophorese	69
2.2.4.3.5	Färben und Entfärben des Geles	69
2.2.4.4	Western Blot	69
2.2.4.4.1	Verwendete Puffer und Lösungen	69
2.2.4.4.2	Probenvorbereitung	70
2.2.4.4.3	Durchführung des Western Blots und Detektion	70
2.2.4.5	Gesamt-RNA-Isolierung aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und Northern Blot	71
2.2.4.5.1	Verwendete Puffer und Lösungen	71
2.2.4.5.2	Durchführung der Gesamt-RNA-Isolierung und Detektion	72

2.2.4.6	Northern Blot	73
2.2.4.7	Hybridisierung mit Decaprime-Markierung	73
2.2.4.7.1	Verwendete Puffer und Lösungen	73
2.2.4.7.2	Durchführung	74
2.2.5	VERWENDUNG EINES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS	74
2.3	ERGEBNISSE	76
2.3.1	EXPRESSION VON CYP2D25' IN <i>SF9</i> -ZELLEN	76
2.3.1.1	Aufreinigung des exprimierten CYP2D25' an Glutathion-Agarose	76
2.3.1.2	Varierte Hämin-Supplementierung	77
2.3.1.3	Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts	78
2.3.2	TRANSFORMATION IN <i>E. COLI</i>	80
2.3.2.1	DNA-Mengenbestimmung	80
2.3.2.2	Größenvergleich beider Plasmide	80
2.3.2.3	Primerkontrolle	82
2.3.3	EXPRESSION VON CYP2D25 IN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	84
2.3.3.1	S 150 und PSY 142	84
2.3.3.2	Der Hefestamm W(N)	85
2.3.3.2.1	Transformation von W(N)	85
2.3.3.2.2	Expression von CYP2D25	86
2.3.3.2.3	Mikrosomenherstellung	88
2.3.3.3	P450-Spektren der Mikrosomenfraktionen	90
2.3.3.3.1	CYP2D25 und V60A1 im Vergleich	90
2.3.3.3.2	CYP2D25 und Wildtyp W(N) im Vergleich	91
2.3.3.4	Gesamt-RNA-Isolierung, Northern Blot und Hybridisierung	92
2.3.3.5	Spezifität des monoklonalen Antikörpers	92
2.4	DISKUSSION	94
2.4.1	EXPRESSION VON CYP2D25' IN <i>SF9</i> -ZELLEN	94
2.4.2	EXPRESSION VON CYP2D25 IN <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	98
2.5	ZUSAMMENFASSUNG	106

3	<i>IN VITRO</i> BIOTRANSFORMATIONSSTUDIEN MIT DER BENZAMIDOXIM-REDUKTASE UND DER VITAMIN D₃ 25-HYDROXYLASE	107
3.1	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR BENZAMIDOXIM-REDUKTASE UND ZUR 1α-HYDROXYVITAMIN D₃ 25-HYDROXYLASE	107
3.1.1	EINLEITUNG	107
3.1.2	BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN	108
3.1.3	ZIELSETZUNG	109
3.2	METHODEN	110
3.2.1	GEWINNUNG DER EINZELNEN ENZYMPRÄPARATIONEN	110
3.2.1.1	Materialien	110
3.2.1.2	Geräte	110
3.2.1.3	Gewinnung der Mikrosomen	111
3.2.1.3.1	Schweinelebermikrosomen	111
3.2.1.3.2	Humane Lebermikrosomen	111
3.2.1.3.3	Porcine und humane Nierenmikrosomen	112
3.2.1.4	Gewinnung der Mitochondrien	112
3.2.1.5	Isolierung der drei Komponenten des rekonstituierten Systems aus SLM	112
3.2.1.5.1	Isolierung der Benzamidoxim-Reduktase (3. Protein)	112
3.2.1.5.2	Isolierung der NADH-Cytochrom b ₅ -Reduktase	113
3.2.1.5.3	Isolierung des Cytochrom b ₅	113
3.2.2	BESTIMMUNGSMETHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMQUELLEN	113
3.2.2.1	Proteinbestimmung nach der BCA-Methode	113
3.2.2.2	Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts	114
3.2.2.3	Aktivitätsbestimmung der NADH-Cytochrom b ₅ -Reduktase	115
3.2.2.4	Bestimmung des Cytochrom b ₅ -Gehalts	115
3.2.3	REDUKTION VON BENZAMIDOXIM ZU BENZAMIDIN	115
3.2.3.1	Materialien	115
3.2.3.2	Geräte	116

3.2.3.3	HPLC-Analytik zur Detektion von Benzamidin	116
3.2.3.4	<i>In vitro</i> Inkubationsbedingungen	117
3.2.3.4.1	Kalibrierung und Wiederfindung	117
3.2.3.4.2	Mikrosomales rekonstituiertes System aus dem Schwein	118
3.2.3.4.3	Rekombinante Enzympräparationen	118
3.2.3.4.4	Mikrosomale und mitochondriale Enzympräparationen	119
3.2.4	OXIDATION VON 1 α -HYDROXYVITAMIN D ₃ ZU 1 α ,25-DIHYDROXYVITAMIN D ₃	119
3.2.4.1	Materialien und Geräte	119
3.2.4.2	HPLC-Analytik mit UV-Detektion	120
3.2.4.3	<i>In vitro</i> Inkubationsbedingungen	121
3.2.4.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung	121
3.2.4.3.2	Mikrosomale Enzympräparationen	121
3.2.4.4	Probenaufbereitung	122
3.2.4.5	HPLC-Trennung	122
3.2.5	LC/MS-ANALYTIK ZUR BESTIMMUNG DES METABOLITEN 1 α ,25-DIHYDROXYVITAMIN D ₃	123
3.2.5.1	<i>In vitro</i> Inkubationsbedingungen	124
3.2.5.1.1	Direktkalibrierung, Kalibrierung und Wiederfindung	124
3.2.5.1.2	Mikrosomale und mitochondriale Enzympräparationen aus verschiedenen Organen und Spezies	124
3.2.5.1.3	Rekombinante mikrosomale Enzympräparationen	125
3.2.5.1.4	Mikrosomales rekonstituiertes System aus dem Schwein	125
3.2.5.1.5	Mitochondriale rekombinante Enzympräparation	125
3.2.5.2	Probenaufbereitung	126
3.2.5.3	LC/MS	126
3.2.6	O-DEMETHYLIERUNG VON DEXTROMETHORPHAN ZU DEXTRORPHAN	126
3.2.6.1	Materialien und Geräte	126
3.2.6.2	HPLC-Analytik zur Detektion von Dextrorphan	127
3.2.6.3	<i>In vitro</i> Inkubationsbedingungen	128
3.2.6.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung	128
3.2.6.3.2	Mikrosomale und rekombinante Enzympräparationen	128
3.2.7	AUFNAHME VON SUBSTRATBINDUNGSSPEKTREN	129
3.2.7.1	Materialien und Geräte	129

3.2.7.2	Substratbindungsspektren mit Schweinelebermikrosomen	129
3.2.7.3	Substratbindungsspektren mit rekombinantem CYP2D25 (ohne coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase)	130
3.3	ERGEBNISSE	131
3.3.1	VERGLEICH VON CYP2D-ISOENZYMEN UNTERSCHIEDLICHER SPEZIES	131
3.3.2	CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMQUELLEN	133
3.3.2.1	Spezifische Cytochrom P450-Gehalte und Proteingehalte der verwendeten Enzympräparationen	133
3.3.2.2	Charakterisierung des gereinigten dritten Proteins	134
3.3.2.3	Bestimmung der NADH-Cytochrom b ₅ -Reduktase-Aktivität	134
3.3.2.4	Bestimmung des Proteingehalts von Cytochrom b ₅	134
3.3.2.5	Aktivitätsbestimmung der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase	134
3.3.3	REDUKTION VON BENZAMIDOXIM ZU BENZAMIDIN	135
3.3.3.1	Kalibrierung und Wiederfindung	135
3.3.3.2	<i>In vitro</i> Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch Mikrosomen und Mitochondrien aus der Schweineleber	136
3.3.3.3	<i>In vitro</i> Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch das rekonstituierte System aus dem Schwein	136
3.3.3.4	<i>In vitro</i> Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch rekombinantes CYP2D25 mit coexprimierter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase	138
3.3.3.4.1	Umsetzungen von Benzamidoxim mit rekombinantem CYP2D25	138
3.3.3.4.2	Einfluss des pH-Wertes auf die Reduktion von Benzamidoxim	140
3.3.3.4.3	Einfluss von Superoxid-Dismutase und Tetrahydrobiopterin	141
3.3.3.4.4	Inhibitorischer Effekt der CYP2D25-Mikrosomen mit coexprimierter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase	141
3.3.3.4.5	Untersuchung möglicher Inhibitoren	142
3.3.3.5	<i>In vitro</i> Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch rekombinantes CYP2D25 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	144
3.3.3.5.1	Umsetzung von Benzamidoxim mit rekombinantem CYP2D25 ohne coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase	144

3.3.3.5.2	Einfluss steigender Konzentrationen an Cytochrom b ₅ , NADH-Cytochrom b ₅ -Reduktase bzw. rekombinantem Protein auf die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin	146
3.3.3.5.3	Testung auf einen inhibitorischen Effekt durch CYP2D25- Mikrosomen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	148
3.3.3.5.4	Coinkubation mit CYP2E1	149
3.3.3.6	<i>In vitro</i> Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch rekombinantes CYP2D25' aus Sf9-Zellen	150
3.3.3.7	Identifizierung des gebildeten Benzamidins mittels HPLC	150
3.3.4	OXIDATION VON 1 α -HYDROXYVITAMIN D ₃ ZU 1 α ,25-DIHYDROXYVITAMIN D ₃	152
3.3.4.1	Bisherige Methode mit UV-Detektion	152
3.3.4.2	Entwicklung einer neuen LC/MS-Methode zur Detektion von 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃	153
3.3.4.2.1	Charakterisierung des Metaboliten 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃	153
3.3.4.2.2	Charakterisierung des Substrates 1 α -Hydroxyvitamin D ₃	154
3.3.4.2.3	Charakterisierung der Verunreinigungen	154
3.3.4.2.4	Untersuchung des 1,1,1-Trichlorethans	155
3.3.4.2.5	Charakteristische Fragmentierung des 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃	156
3.3.4.3	Kalibrierung und Wiederfindung	157
3.3.4.4	<i>In vitro</i> Oxidation von 1 α -Hydroxyvitamin D ₃ zu 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃ durch Mikrosomen	158
3.3.4.5	<i>In vitro</i> Oxidation von 1 α -Hydroxyvitamin D ₃ zu 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃ durch Mitochondrien	159
3.3.4.6	<i>In vitro</i> Oxidation von 1 α -Hydroxyvitamin D ₃ zu 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃ durch rekombinante Enzyme	160
3.3.4.7	<i>In vitro</i> Oxidation von 1 α -Hydroxyvitamin D ₃ zu 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃ durch die aus Schweineleber isolierte Benzamidoxim-Reduktase	161
3.3.4.8	<i>In vitro</i> Oxidation von 1 α -Hydroxyvitamin D ₃ zu 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃ durch rekombinantes CYP2D25 (ohne coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase), V60A1 und Wildtyp W(N)	164

3.3.4.9	Identifizierung des gebildeten 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃ mittels LC/MS	166
3.3.5	<i>O</i> -DEMETHYLIERUNG VON DEXTROMETHORPHAN ZU DEXTRORPHAN	168
3.3.5.1	Kalibrierung und Wiederfindung	168
3.3.5.2	<i>In vitro O</i> -Demethylierung von Dextromethorphan zu Dextrorphan durch SLM und CYP2D25 (mit coexprimierter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase)	169
3.3.5.3	<i>In vitro O</i> -Demethylierung von Dextromethorphan zu Dextrorphan durch CYP2D25 (ohne coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase) im Vergleich zu V60A1 und Wildtyp W(N)	169
3.3.5.4	Untersuchung einer inhibitorischen Wirkung von CYP2D25 (ohne coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase), V60A1 und Wildtyp W(N) auf die <i>O</i> -Demethylierung von Dextromethorphan	171
3.3.5.5	Identifizierung des gebildeten Dextrorphanes mittels HPLC	171
3.3.6	SUBSTRATBINDUNGSSPEKTREN	172
3.3.6.1	Bindung von BAO in Schweinelebermikrosomen	172
3.3.6.2	Bindung von BAO durch CYP2D25 (ohne coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase)	173
3.4	DISKUSSION	175
3.4.1	REDUKTION VON BENZAMIDOXIM ZU BENZAMIDIN	175
3.4.2	OXIDATION VON 1 α -HYDROXYVITAMIN D ₃ ZU 1 α ,25-DIHYDROXYVITAMIN D ₃	177
3.4.3	DEMETHYLIERUNG VON DEXTROMETHORPHAN ZU DEXTRORPHAN	180
3.5	ZUSAMMENFASSUNG	182
4	CHARAKTERISIERUNG DER BENZAMIDOXIM-REDUKTASE	185
4.1	EINLEITUNG	185
4.2	METHODEN ZUR SEQUENZIERUNG DES DRITTEN PROTEINS	186

INHALTSVERZEICHNIS

4.2.1	MATERIALIEN UND GERÄTE	186
4.2.2	MALDI-MS	186
4.2.3	ESI-MS/MS	186
4.3	ERGEBNISSE	188
4.3.1	MALDI-MS	188
4.3.2	ESI-MS/MS	192
4.4	DISKUSSION	194
4.4.1	SEQUENZANALYSE	194
4.4.2	ANTIGEN-ANTIKÖRPER-REAKTIONEN	194
4.4.3	BEURTEILUNG DER UMSETZUNGSRATEN IM BENZAMIDOXIM-REDUKTASE- UND IM 1 α -HYDROXYVITAMIN D ₃ 25-HYDROXYLASE- ASSAY	195
4.4.4	SUBSTRATBINDUNGSSPEKTREN	196
4.5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	197
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	199
6	LITERATURVERZEICHNIS	203

1 EINFÜHRUNG

1.1 BIOTRANSFORMATION

1.1.1 DEFINITION UND BEDEUTUNG

Als Biotransformation wird die Umwandlung endogener (z.B. Steroidhormone, Gallensäuren) und exogener Substanzen (z.B. Arzneistoffe) durch den Organismus bezeichnet. Dabei ist besonders die Metabolisierung der als Xenobiotika bezeichneten körperfremden Stoffe von großer Bedeutung, da diese durch verschiedene Enzyme in hydrophilere und damit besser eliminierbare Produkte umgewandelt werden können [Lewis und Pratt, 1998; Mutschler, 2001]. Die meist lipophilen Xenobiotika würden sonst aufgrund ihrer guten Resorbierbarkeit und vorhandener Rückresorption über den enterohepatischen Kreislauf nur langsam aus dem Organismus eliminiert werden, wodurch es zu einer Kumulation und einer Schädigung des Körpers kommen könnte [Forth *et al.*, 2001]. Das Hauptorgan der Metabolisierung ist die Leber, da sie zum einen stark durchblutet wird und zum anderen wichtige metabolisierende Enzyme enthält. So gelangen *per oral* applizierte Arzneistoffe nach der Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt über die Pfortader in die Leber, in der sie sowohl extrahiert als auch biochemisch umgewandelt werden können, bevor sie in den systemischen Kreislauf gelangen. Diese präsystemische Elimination kann bei verschiedenen Arzneistoffen unterschiedlich stark ausgeprägt sein und ist für die Bioverfügbarkeit eines Pharmakons von entscheidender Bedeutung. Aber auch in anderen Organen wie Darm, Niere, Lunge, Haut und Blut werden Biotransformationen untergeordnet durchgeführt [Mutschler, 2001].

Diese substratspezifisch arbeitenden fremdstoffmetabolisierenden Enzyme können sowohl strukturgebunden an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums oder in den Mitochondrien lokalisiert sein, als auch in löslicher Form vorliegen. Die Biotransformationsreaktionen werden dabei in zwei Phasen unterteilt. In der als Funktionalisierungsreaktion bezeichneten Phase I entstehen durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse polare Metaboliten, die zudem in Phase II durch Konjugation mit körpereigenen Substanzen des Intermediärstoffwechsels wie z.B.

Glucuronsäure, Aminosäuren, Glutathion oder Schwefelsäure in Metabolite mit erhöhter Wasserlöslichkeit umgewandelt werden können [Testa, 1995b] (siehe Abb. 1-1). Das Ausmaß der Biotransformation ist dabei z.B. abhängig von Geschlecht, Alter, Ernährung, Tageszeit oder Interaktionen mit anderen Pharmaka.

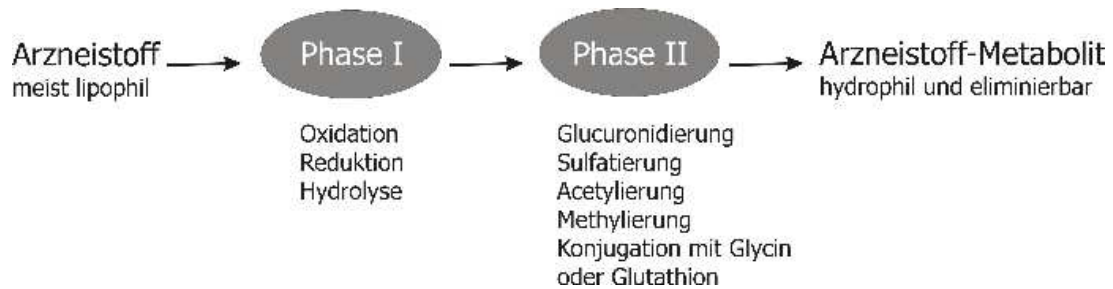


Abb. 1-1 Biotransformation eines Arzneistoffes im Organismus

Durch Funktionalisierungs- und Konjugationsreaktionen wird ein meist lipophiler Arzneistoff in einen hydrophilen und somit ausscheidbaren Metaboliten umgewandelt.

Ebenso wird die Metabolisierung eines Arzneistoffes durch Enzyminduktoren beeinflusst, die bewirken, dass exogen zugeführte Substanzen durch vermehrte Bildung metabolisierender Enzyme schneller biotransformiert werden [Auterhoff *et al.*, 1999]. Durch genetische Polymorphismen treten Gendefekte bestimmter Enzyme auf, sodass diese entweder gar nicht, nur in geringem Maße oder nicht korrekt exprimiert werden. Auch im Menschen konnten genetische Polymorphismen bei einigen biotransformierenden Isoenzymen (z.B. CYP2D6) entdeckt werden [Guengerich, 1994]. Dadurch sind einige Biotransformationsreaktionen stark eingeschränkt oder aber gar nicht möglich. Bei Vorliegen einer hohen Bindungsaffinität an diese fremdstoffmetabolisierenden Enzyme sowie bei der Metabolisierung von Substraten durch genetisch bedingte polymorphe P450-Enzyme wird die Weiterentwicklung eines potenziellen Arzneistoffes meistens abgebrochen [Venhorst *et al.*, 2000].

Oft unterliegen Arzneistoffe in Biotransformationsprozessen einer Bioinaktivierung. Es können aber auch Bioaktivierungen bzw. Toxifizierungen stattfinden (siehe Abb. 1-2) [Goeptar *et al.*, 1995; Testa, 1995a]. Im Menschen sind hauptsächlich die Isoenzyme CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 und CYP2D6 an der Biotransformation von Xenobiotika beteiligt [Smith und Jones, 1992].

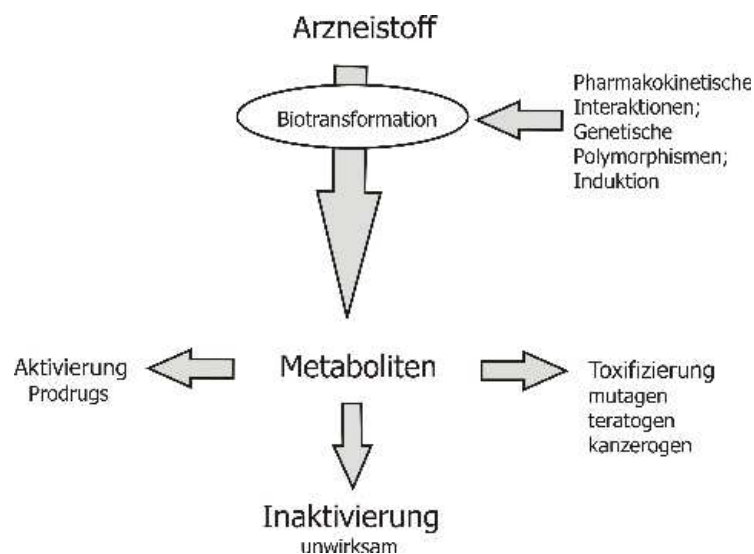


Abb. 1-2 Auswirkungen der Biotransformation auf einen Arzneistoff

Durch die Biotransformation eines Arzneistoffes entstehen hauptsächlich inaktive Metaboliten. Sie kann aber auch zu einer Bioaktivierung bzw. Biotoxifizierung führen.

Das Prinzip der Bioaktivierung wird bei der Entwicklung von sogenannten Prodrugs ausgenutzt und wurde erstmals von Tréfouel *et al.* [1935] beschrieben. Prodrugs sind inaktive Substanzen, die erst im Körper durch enzymatische bzw. nichtenzymatische Biotransformationsvorgänge in aktive Metaboliten umgewandelt werden. Die Synthese solcher Prodrugs ist dann notwendig, wenn eine verbesserte Resorbierbarkeit, längere Wirkungsdauer und erhöhte Wirkungsselektivität gewünscht sind [Mutschler, 2001]. Eine Vielzahl von Arzneistoffen ist zugelassen worden, die dieses Prinzip ausnutzt (z.B. Enalapril, Aciclovir, Simvastatin, Omeprazol) [Ettmayer *et al.*, 2004].

Da die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme des Körpers nicht unterscheiden können, ob die von ihnen gebildeten Metabolite für den Körper utilitär oder toxisch sind, kann es auch zu einer Giftung kommen [Forth *et al.*, 2001]. Diese Biotoxifizierung führt im Allgemeinen zur Bildung von reaktiven Metaboliten wie Elektrophilen oder Radikalen, die durch Angriff an Makromoleküle wie z.B. Nukleinsäuren durch genotoxische oder zytotoxische Effekte zu irreversiblen Schäden an der Struktur führen. Das Präkarzinogen β -Naphthylamin wird z.B. im Organismus durch Einführung einer Hydroxylgruppe zu α -Hydroxy- β -naphthylamin metabolisiert, welches kanzerogen ist.

1.1.2 FREMDSTOFFMETABOLISIERENDE ENZYME

1.1.2.1 ÜBERSICHT

Xenobiotika können zum Teil durch spontan ablaufende Hydrolysen wie z.B. die Spaltung von Estern im sauren Magenmilieu nichtenzymatisch metabolisiert werden, jedoch wird die Biotransformation von exogen zugeführten Substanzen überwiegend enzymatisch katalysiert. Diese fremdstoffmetabolisierenden Enzyme weisen neben einer geringen katalytischen Effizienz auch eine geringe Substratspezifität auf, sodass sie Substrate unterschiedlicher chemischer Strukturen umzusetzen vermögen [Mutschler, 2001] und auch an der Biotransformation einiger endogener Verbindungen, wie z.B. Steroidhormone und Gallensäuren, beteiligt sind [Ruckpaul, 1993].

Wie bereits erwähnt, ist die Leber der Hauptmetabolisierungsort mit höchster Enzymaktivität im Körper, während der extrahepatische Stoffwechsel eine untergeordnete Rolle spielt. Dennoch können z.B. auch Darmbakterien an der Metabolisierung von Fremdstoffen beteiligt sein, die bedingt durch das anaerobe Milieu überwiegend Reduktionen katalysieren [Forth *et al.*, 2001].

Die hepatischen Enzyme liegen überwiegend strukturgebunden an den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien vor oder sind löslich im Cytosol lokalisiert [Ruckpaul und Bernhardt, 1984]. Strukturgebunden sind sowohl Enzyme der Phase I, wie die Cytochrom P450 Monooxygenasen (EC 1.14.14.1) [Guengerich, 1987], die flavinhaltigen Monooxygenasen (FMO) (EC 1.14.13.8) [Ziegler, 1988], die Epoxidhydrolase [Forth *et al.*, 2001] und die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (EC 1.6.2.4) [Nebert und Gonzalez, 1987; Yabusaki *et al.*, 1988a], als auch Enzyme der Phase II, wie die UDP-Glucuronyltransferasen (EC 2.4.1.17) und einige Methyltransferasen (EC 2.1.1.X) [Mulder, 1990a, b]. Zu den im Cytosol löslich vorliegenden Enzymen der Phase I sind u.a. die Aldehyddehydrogenase (EC 1.2.1.3), die Alkoholdehydrogenase (EC 1.1.1.1), die Xanthinoxidase (EC 1.1.3.22) [Testa, 1995f, h, i] sowie verschiedene Esterasen und Monoaminoxidasen zu zählen. Auch an Konjugationsreaktionen beteiligte Enzyme der Phase II wie *N*-Acetyltransferasen (EC 2.3.1.X), Sulfotransferasen (EC 2.8.2.X)

und Glutathion-S-Transferasen (EC 2.5.1.18) liegen im Cytosol löslich vor [Mulder, 1990c, d, e].

1.1.2.2 DAS CYTOCHROM P450-ENZYSYSTEM

1.1.2.2.1 Vorkommen, Struktur und Funktion

Das Cytochrom P450-Enzymsystem katalysiert den Metabolismus vieler Xenobiotika und Endobiotika [Wrighton und Stevens, 1992; Honkakoski und Negishi, 2000] und hat die größte Bedeutung bei der Katalyse von oxidativen Biotransformationsprozessen [Guengerich, 2001]. Die Cytochrom P450-Superfamilie ist dabei an der Biotransformation von Arzneistoffen, Chemikalien und Schadstoffen beteiligt. Des Weiteren katalysiert sie u.a. die Biosynthese von Eicosanoiden, Cholesterol, Gallensäuren sowie Vitamin D₃ und wandelt biogene Amine um [Nelson *et al.*, 2004]. Diese in Säugern membrangebundenen Hämoproteine katalysieren dabei die meisten der Phase I-Reaktionen [Coon *et al.*, 1992] und sind ubiquitär in fast allen Organen und Geweben (z.B. Nasenschleimhaut, Niere, Lunge, Haut, Gehirn, Intestinaltrakt) lokalisiert [Warner *et al.*, 1991; Johns Cupp und Tracy, 1998], kommen aber mit erhöhter Präferenz in der Leber vor [Guengerich, 2001]. Sowohl über einen hydrophoben Anker am N-Terminus des Apoproteins als auch über eine weitere, als F-G loop bezeichnete, hydrophobe Struktur sind die Proteine an die Membran des endoplasmatischen Retikulums gebunden [Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000], während die katalytische Domäne des Proteins zum Cytoplasma zeigt. Dabei ist eine flexible Struktur der katalytischen Domäne erforderlich, damit eine Interaktion mit einem Substrat oder dem ebenfalls membrangebundenen zur Elektronenübertragung benötigten Redox-Partner, der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase, stattfinden kann [Chen *et al.*, 1997]. 75 % der NADPH-Cytochrom P450-Reduktasen sind dabei außerhalb der Membran lokalisiert (siehe Abb. 1-3) [Nebert und Gonzalez, 1987].

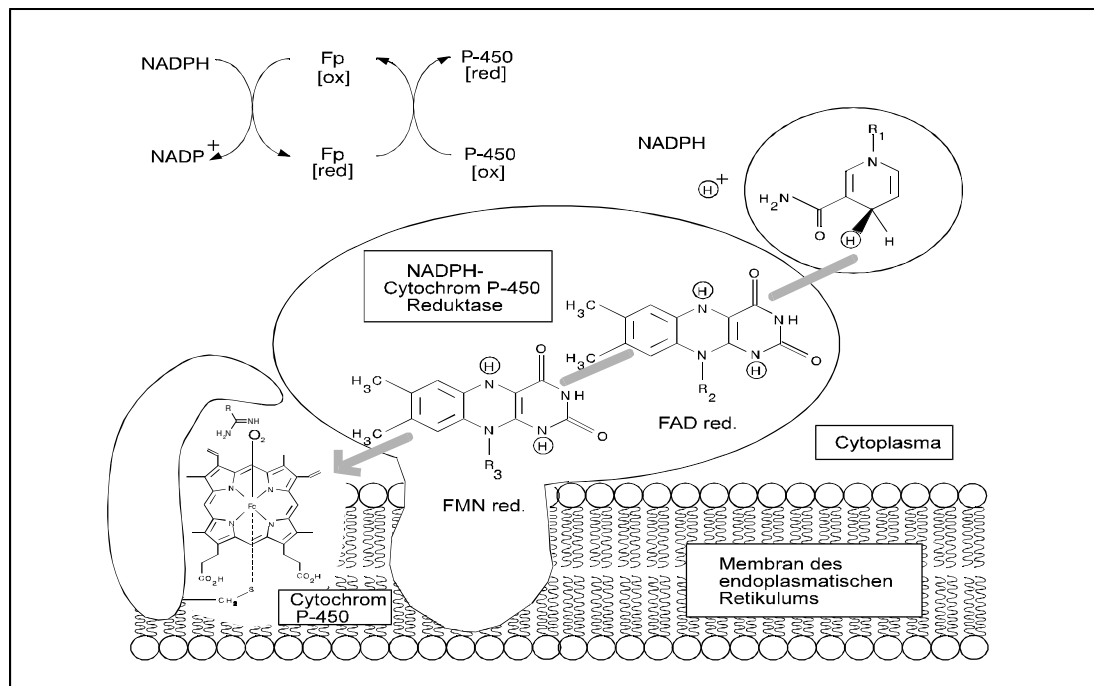


Abb. 1-3 Einbettung des P450-Enzyms und der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase in die Membran des endoplasmatischen Retikulums und die für die Monooxygenase-Aktivität erforderliche Elektronenübertragung (modifiziert nach Ruckpaul [1993])

Mittlerweile wurden auch dreidimensionale Kristallstrukturen prokaryontischer sowie eukaryontischer Cytochrom P450-Enzyme veröffentlicht, die bei der Arzneistoff-Entwicklung helfen sollen, Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Arzneistoffen vorhersagen zu können [Williams *et al.*, 2000; Kim und Guengerich, 2004]. Die Bestimmung der dreidimensionalen Kristallstrukturen aus Eukaryonten gestaltete sich zunächst schwierig, da es sich dabei um membrangebundene Enzyme handelt. Mittlerweile liegen aber die Röntgenstrukturanalysen von einigen P450-Isoenzymen aus Säugetieren einschließlich des Menschen vor [Williams *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2004].

Der Name Cytochrom P450 leitet sich davon ab, dass das Cytochrom im reduzierten Zustand im Kohlenstoffmonoxid-Differenzspektrum ein Absorptionsmaximum (Soret-Bande) bei 450 nm aufweist (Pigment 450) [Forth *et al.*, 2001]. Die Cytochrom P450-Isoenzyme besitzen ein durchschnittliches Molekulargewicht von 45-62 kDa und gehören zu der Gruppe der Hämthiolatproteine. Sie sind aus einem Apoprotein und einem als prosthetische Gruppe bezeichneten Eisen-Protoporphyrin IX aufgebaut. Die

Bindung an die fünfte Koordinationsstelle dieses Häm-Restes erfolgt über ein hochkonserviertes Cystein des Apoproteins und durch hydrophobe Wechselwirkungen. Mittlerweile zählen mehr als 500 Mitglieder unterschiedlicher Spezies zu der Cytochrom P450-Superfamilie, wobei sich die einzelnen Isoenzyme in ihrer Primärstruktur, ihren immunologischen Eigenschaften, ihrer Substratspezifität und ihrer Induzierbarkeit unterscheiden, weshalb eine Einteilung der P450-Enzyme in verschiedene Klassen mit einer vereinheitlichten Nomenklatur vorgenommen wurde. So zählen P450-Enzyme bei einer 40 %igen Sequenzidentität zu einer mit einer arabischen Zahl gekennzeichneten Familie, während die Zugehörigkeit zu einer mit einem Großbuchstaben gekennzeichneten Subfamilie durch eine 59 %ige Sequenzidentität bestimmt wird [Ruckpaul, 1993], wobei jedes einzelne Isoenzym durch eine weitere arabische Ziffer charakterisiert wird [Nebert *et al.*, 1987; Nelson *et al.*, 1996] (siehe Abb. 1-4).

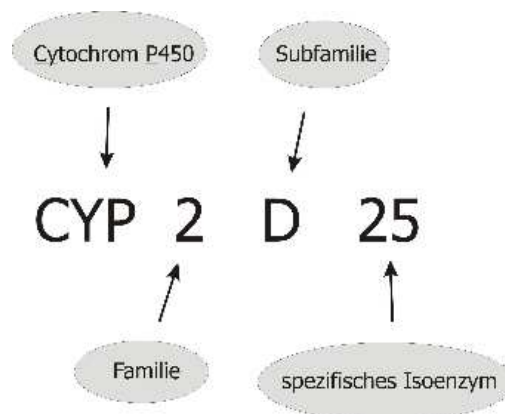


Abb. 1-4 Einteilung der P450-Enzyme in Familien, Subfamilien und Isoenzyme

P450-Enzyme katalysieren Monooxygenasereaktionen, in deren Verlauf ein Sauerstoffatom aus molekularem Sauerstoff auf das zu metabolisierende Substrat übertragen und das zweite zu Wasser reduziert wird [Ortiz de Montellano, 1986]. Unter bestimmten Voraussetzungen kann dieses Enzymsystem auch Oxidase- und Peroxidaseaktivitäten aufweisen [Guengerich, 1991] (siehe Abb. 1-5).

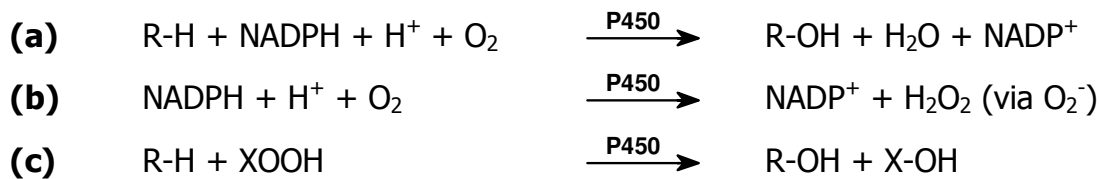


Abb. 1-5 *Durch Cytochrom P450 katalysierte Reaktionen*

Enzyme des Cytochrom P450-Systems agieren als (a) Monooxygenase, (b) Oxidase bzw. (c) Peroxidase.

Das Cytochrom P450-System weist aber überwiegend Monooxygenase-Eigenschaften auf. In Säugetieren gliedert sich das Cytochrom P450-Enzymsystem dabei in zwei große Klassen. Die in Mitochondrien vorkommenden Enzyme katalysieren spezifische Reaktionen der Steroidhormon- sowie Gallensäure-Biosynthese, während die zweite Klasse der an das endoplasmatische Retikulum gebundenen Enzyme wiederum in zwei Gruppen untergliedert werden kann. Die eine ist ebenfalls am Metabolismus von Steroidhormonen und Cholesterin beteiligt, während die andere Reaktionen im Fremdstoffmetabolismus katalysiert [Wikvall, 2001].

Der Elektronentransport vom NADPH zum Cytochrom P450-Enzym unterscheidet sich bei mitochondrialen und mikrosomalen Hydroxylasen. Die Unterschiede bei der Elektronenübertragung zwischen beiden Enzymgruppen sind in Abb. 1-6 dargestellt.

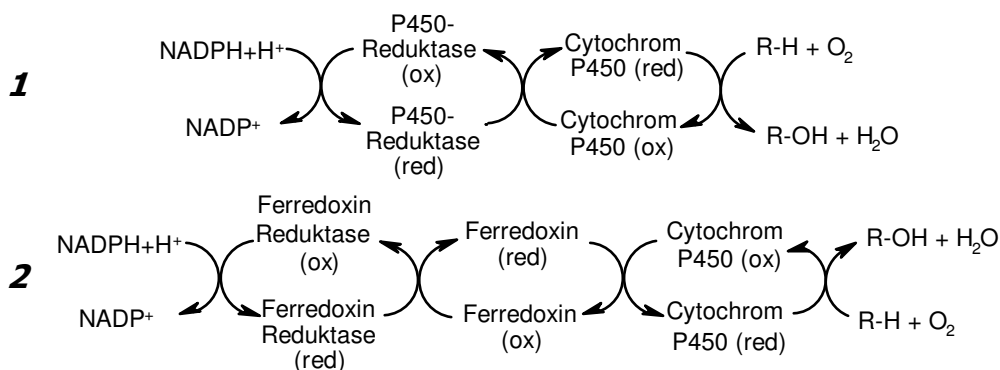


Abb. 1-6 *Mechanismen der Elektronenübertragung bei (1) mikrosomalen und (2) mitochondrialen Cytochrom P450-abhängigen Hydroxylierungen [Wikvall, 2001]*

Während die Elektronen bei mikrosomalen P450-Enzymen von dem Flavoprotein NADPH-Cytochrom P450-Reduktase übertragen werden, findet der Elektronen-

transport im mitochondrialen System über das Flavoprotein Ferredoxin-Reduktase sowie über das Eisen-Schwefel-Protein Ferredoxin statt.

Bei durch das mikrosomale P450-Enzymsystem katalysierten Oxidationen werden zwei Elektronen von den Reduktionsäquivalenten NADPH bzw. NADH über das P450-Enzym auf das Substrat übertragen. Da ein Cytochrom P450-Enzym nicht zwei Elektronen gleichzeitig aufnehmen kann, gibt die membrangebundene NADPH-Cytochrom P450-Reduktase [Tamura *et al.*, 1992], die jeweils ein Molekül FAD und FMN als prosthetische Gruppe besitzt [Vermilion und Coon, 1978b; Oprian und Coon, 1982], die ihr übertragenen Elektronen sukzessive ab. Sie besitzt ein Molekulargewicht von 76.5 kDa und weist eine membranbindende und eine hydrophile Domäne auf [Vergères *et al.*, 1989b].

Bei Anwesenheit von NADH ist es des Weiteren möglich, beide Elektronen oder bevorzugt das zweite Elektron durch die NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase und Cytochrom b_5 zu übertragen [Hildebrandt und Estabrook, 1971; Ingelman-Sundberg und Johansson, 1984].

1.1.2.2.2 Der katalytische Zyklus

Der einer oxidativen Substratumwandlung durch Cytochrom P450 zugrunde liegende Mechanismus ist in Abb. 1-7 aufgezeigt.

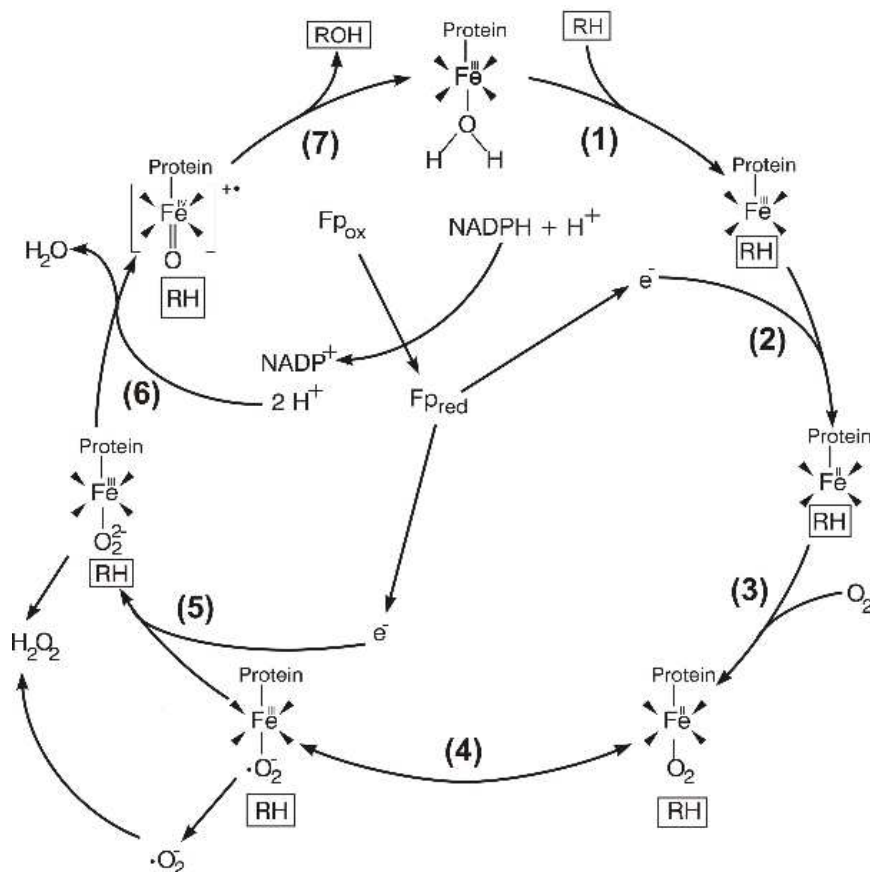


Abb. 1-7 Mechanismus der oxidativen Substratumsetzung durch Cytochrom P450 (modifiziert nach Coon et al. [1992])

Fe: Häm-Eisen im katalytischen Zentrum; RH: angelagertes Substrat; ROH: monoxygeniertes Produkt; F_p: Flavoprotein NADPH-Cytochrom P450-Reduktase.

Der katalytische Zyklus beginnt mit der Anlagerung des Substrates an eine der Substratbindungsstellen in der Nähe des aktiven Zentrums (1). Dieser Schritt bewirkt einen Übergang des Fe(III) vom *low spin*- in den *high spin*-Zustand [Renaud et al., 1996], wodurch es zu einer Verdrängung des Liganden aus der sechsten Koordinationsstelle des Häm-Eisens und zu einer Erhöhung des Redoxpotenzials kommt. Das erste zu übertragende Elektron wird dabei vom NADPH (bzw. NADH)

über die prosthetischen Gruppen FAD und FMN der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase auf das P450 übertragen [Vermilion und Coon, 1978a; Guengerich, 2001] (2). Das nun zweiwertige Eisen bindet den molekularen Sauerstoff (3), der in der Lage ist, ein Elektron vom zentralen Häm-Eisen zu übernehmen (4). Anschließend wird ein zweites Elektron vom NADPH (bzw. NADH) über die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase auf diesen aktivierten Substrat-Sauerstoff-Komplex des Hämthiolatproteins übertragen (5), wodurch es mithilfe zweier Protonen des oxidierten Flavoproteins zu einer Wasser-Abspaltung kommt (6). Der daraus entstehende reaktive Oxo-Komplex kann im nächsten Schritt das angelagerte Substrat hydroxylieren. Nach Abspaltung des monooxygenierten Produktes steht das P450-Enzym für einen erneuten Zyklus zur Verfügung (7). Vermutlich wird das Substrat durch eine Oxo-ferryl-Porphyrin^π-Kationen-Radikalstruktur monooxygeniert [Ruckpaul, 1993].

Durch nicht-aktivierbare Substratmoleküle oder einen instabilen Enzym-O₂-Komplex kann es zu einer Entkopplung des Mechanismus kommen, wodurch im Anschluss an Schritt (4) Superoxid oder (5) Wasserstoffperoxid mit einer dadurch bedingten Gewebsschädigung freigesetzt werden kann [Ruckpaul, 1993].

1.1.3 BIOTRANSFORMATION STICKSTOFFHALTIGER FUNKTIONELLER GRUPPEN

1.1.3.1 ÜBERSICHT

Sowohl aliphatische und aromatische Kohlenstoffatome als auch stickstoffhaltige funktionelle Gruppen unterliegen oxidativen, reduktiven und hydrolytischen Biotransformationsreaktionen ebenso wie Konjugationsreaktionen der Phase II [Clement *et al.*, 1998]. Da Stickstoff in vielen Xenobiotika enthalten ist und bei einer Oxidation stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen auch reaktive oder toxische Metaboliten gebildet werden können, ist die Erforschung dieser Metabolismuswege von entscheidender Bedeutung [Damani, 1982]. So werden aliphatische und aromatische Amine *N*-oxygeniert [Kiese, 1959; Coutts und Kovach, 1977; Testa, 1995e], wobei zwischen einer Bildung von Hydroxylaminen aus primären und sekundären Aminen und einer Biotransformation zu *N*-Oxiden aus tertiären Aminen

unterschieden wird [Cramer *et al.*, 1960; Cha *et al.*, 2001; Santi *et al.*, 2002]. Abb. 1-8 zeigt die Bildung von Hydroxylaminen (1) und *N*-Oxiden (2) bei Aminen sowie deren durch andere Enzymsysteme katalysierte Rückreduktion.

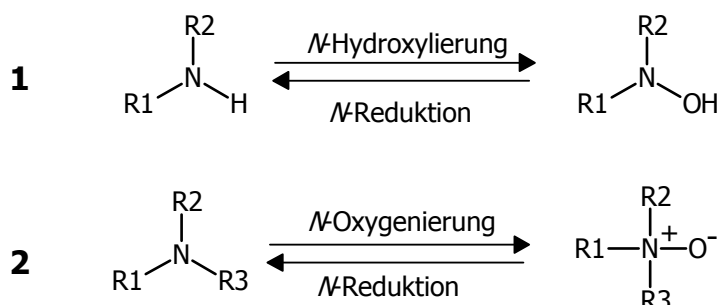


Abb. 1-8 Biotransformation zu (1) *N*-hydroxylierten Metaboliten und zu (2) *N*-Oxiden sowie deren Rückreduktion (modifiziert nach Clement [1998])

Die durch Doppelpfeile gekennzeichneten Hin- und Rückreaktionen werden durch unterschiedliche Enzyme katalysiert.

Die in Abb. 1-8 aufgezeigten Oxidationswege stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen werden überwiegend durch das Cytochrom P450-Enzymsystem oder durch flavinhaltige Monooxygenasen (FMO) katalysiert. Beide Enzymarten monooxygenieren dabei das Substrat und verwenden als Cosubstrat bevorzugt NADPH, benutzen dabei aber verschiedene Katalysemechanismen [Testa, 1995i].

Clement [1983] konnte erstmals die *N*-Oxidation verschiedener Benzamidine *in vitro* nachweisen. Bei Amidinen handelt es sich um sehr starke Basen, die bei physiologischem pH-Wert überwiegend protoniert als mesomeriestabilisierte Kationen vorliegen. Diese enzymatische Umwandlung war aufgrund dieser Eigenschaften überraschend und wurde daher intensiver untersucht. So konnte die *N*-Oxygenierung von Amidinen zu Amidoximen [Clement, 1983; Clement und Zimmermann, 1987; Clement *et al.*, 1993a], von Isothioharnstoffen zu *N*-Hydroxyisothioharnstoffen [Clement und Wissel, 1991], von Guanidinen zu *N*-Hydroxyguanidinen [Clement *et al.*, 1993b; Clement und Demesmaeker, 1997] sowie von Amidinohydrazonen zu *N*-Hydroxyamidinohydrazonen [Clement *et al.*, 1994; Clement *et al.*, 1996] nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu *N*-oxidativen Prozessen sind die Reduktionen von Xenobiotika weniger intensiv untersucht worden. Oxidation und Reduktion können oftmals als metabolische Zyklen aufgefasst werden, da die *N*-oxygenierten Metaboliten leicht zu ihren Ausgangsverbindungen rückreduziert werden können. Reduktive Aktivitäten wurden im Cytosol, im endoplasmatischen Retikulum und in Mitochondrien der Hepatozyten sowie in Bakterien der Darmflora gefunden [Hewick, 1982]. Viele untersuchte Reduktionen konnten nur unter anaeroben Bedingungen nachgewiesen werden, wodurch aber die *in vivo* Relevanz dieser Biotransformationen in Hinblick auf das sauerstoffreiche Milieu in Säugetieren in Frage gestellt wurde [Testa, 1995g]. Erstmals konnte eine Reduktion von Hydroxylaminen zu Aminen unter aeroben Bedingungen von Kadlubar und Ziegler [1974] nachgewiesen werden. Weitere von Clement durchgeführte Untersuchungen zeigten die Reduktion von *N*-hydroxylierten Derivaten stark basischer stickstoffhaltiger funktioneller Gruppen. So wurde die *N*-Reduktion von Amidoximen [Clement *et al.*, 1988b], von *N*-Hydroxyguanidinen [Clement *et al.*, 1993b] und von *N*-Hydroxyamidinohydrazonen [Clement *et al.*, 1994] nachgewiesen. Das für die Reduktion dieser *N*-hydroxylierten Verbindungen verantwortliche Enzymsystem konnte aus Schweinelebermikrosomen isoliert und identifiziert werden [Clement *et al.*, 1997]. Es besteht aus der Benzamidoxim-Reduktase, bei der es sich vermutlich um ein P450-Enzym handelt, aus Cytochrom b₅ und der NADH-Cytochrom b₅-Reduktase [Clement *et al.*, 2000]. Darüber hinaus konnten vergleichbare reduktive Aktivitäten auch in Mikrosomen extrahepatischer Organe, wie z.B. Lunge, Niere, Gehirn und Darm [Mau, 2002], nachgewiesen werden. Auch mitochondriale Präparationen zeigten hohe Umsetzungsraten bei der Reduktion *N*-hydroxylierter Verbindungen [Clement, 2002; Deters, 2002]. Die Rückreduktion solcher *N*-hydroxylierter Substanzen führt oftmals zu einer Detoxifizierung, da viele *N*-hydroxylierte Metaboliten ein genotoxisches Potenzial besitzen [Clement *et al.*, 1988a].

Der Nachweis dieser Reduktionen stellt besonders für die Entwicklung von Prodrugs bei Verbindungen mit Amidinen oder Guanidinen als funktionelle Gruppen eine wichtige Alternative dar [Clement, 2002; Kurian *et al.*, 2004]. Denn viele Arzneistoffe verfügen über eine Amidinfunktion, wobei diese unsubstituiert oder in ein Ringsystem eingebunden sein kann. Amidinstrukturen finden sich in verschiedenen

Arzneistoffkandidaten auf dem Gebiet der Gerinnungshemmer wie z.B. Thrombininhibitoren, Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten und Faktor Xa-Inhibitoren. Aber auch aromatische Diamidine wie z.B. das Pentamidin mit trypanociden und leishmaniciden Aktivitäten, das bei durch *Pneumocystis carinii* hervorgerufenen Infektionen eingesetzt wird, weisen solch eine Amidinstruktur auf. Da Amidine sehr starke organische Basen darstellen, unter physiologischen Bedingungen am doppelt gebundenen Stickstoff protoniert vorliegen und hoch mesomeriestabilisierte Kationen ausbilden, ist die orale Bioverfügbarkeit sehr schlecht [Albert *et al.*, 1948; Stürzebecher *et al.*, 1988; Gustafsson *et al.*, 2001]. Dagegen sind die *N*-hydroxylierten Derivate (Amidoxime, *N*-Hydroxyamidine) nach Einführen eines Sauerstoffatoms weniger basisch [Albert *et al.*, 1948] und liegen bei physiologischem pH-Wert überwiegend als freie Base und somit ungeladen vor [Clement, 1993; Gustafsson *et al.*, 2001]. Dies führt bei Amidoximen zu einer verbesserten oralen Bioverfügbarkeit. So konnten Clement *et al.* [1992] zeigen, dass durch Hydroxylierung des Pentamidins zu dem entsprechenden Diamidoxim die orale Bioverfügbarkeit erheblich gesteigert wurde. Das Diamidoxim wurde *in vivo* komplett zu Pentamidin reduziert. Auch an der Entwicklung neuer Arzneistoffe im Bereich der Blutgerinnung wurde intensiv geforscht und darauf das für Pentamidin entwickelte Prodrug-Prinzip übertragen. Bei Sibrafiban, einem Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten, und Ximelagatran, einem oral verfügbaren direkten Thrombininhibitoren, handelt es sich um doppelte Prodrugs. Neben der in der Wirkform vorhandenen Amidinfunktion, die durch *N*-Hydroxylierung in ein *N*-Hydroxyamidin (Amidoxim) überführt wurde, liegt außerdem eine Carbonsäurefunktion vor, die ebenfalls aufgrund schlechter oraler Verfügbarkeit in den entsprechenden Ester umgewandelt wurde [Clement und Lopian, 2003]. Mittlerweile ist Ximelagatran (Exanta[®]) sogar aufgrund sehr guter klinischer Erfolge in Europa zugelassen worden, während die Entwicklung von Sibrafiban nach Auftreten vermehrter Blutungen und mangelnder Wirksamkeit in Phase III-Studien nicht weiter verfolgt wurde [Eriksson *et al.*, 2003]. Das beruhte aber nicht auf dem Prodrug-Prinzip.

1.1.3.2 DAS BENZAMIDOXIM-REDUKTASE-SYSTEM

Das für die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin verantwortliche Enzymsystem konnte 1997 erstmals aus Schweinelebermikrosomen isoliert und *in vitro* rekonstituiert werden [Clement *et al.*, 1997]. Es besteht aus der Benzamidoxim-Reduktase (drittes Protein), auf deren Charakterisierung in Kapitel 4 näher eingegangen wird, Cytochrom b_5 und einer NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase (siehe Abb. 1-9).

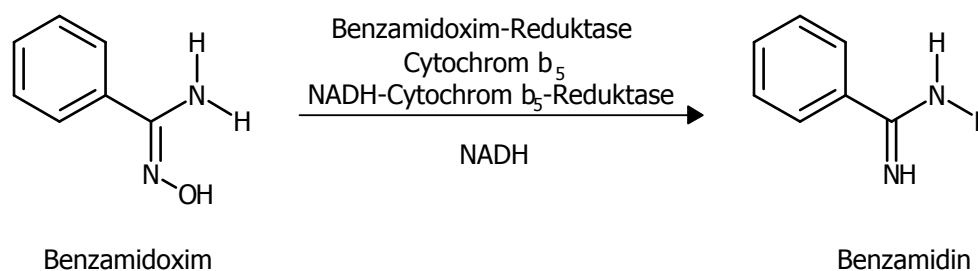


Abb. 1-9 Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch das Enzymsystem der Benzamidoxim-Reduktase

Obwohl dieses Enzymsystem auch an der Reduktion von aliphatischen und aromatischen Hydroxylaminen, *N*-Hydroxyguanidinen, *N*-Hydroxyamidinohydrazonen und anderen Amidoximen [Clement, 1998] unter aeroben Bedingungen beteiligt ist, wurde es nach der ersten nachgewiesenen Reaktion (*N*-Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin) benannt und der Name bis heute beibehalten.

In bisherigen Studien zur Benzamidoxim-Reduktase konnten nach enzymatischem Verdau drei erhaltene Bruchstücke sequenziert werden (siehe 3.1.2). Diese Peptidfragmente zeigten große Übereinstimmungen mit einem CYP2D-Enzym. Die Zugehörigkeit zur P450-Familie wurde durch ein für P450-Enzyme typisches CO-Differenzspektrum zudem bekräftigt [Omura und Sato, 1964]. Diese bisher noch nicht genau identifizierte dritte Proteinkomponente besitzt nach elektrophoretischer Auftrennung im SDS-Gel ein Molekulargewicht von ca. 50 kDa und vermag die für CYP2D-Enzyme charakteristische Markerreaktion der Dextromethorphan-*O*-Demethylierung zu katalysieren [Küpfer *et al.*, 1984; Möller, 1997]. Alle Ergebnisse bekräftigten die Annahme, dass es sich bei der Benzamidoxim-Reduktase um ein zu der Subfamilie 2D zugehöriges P450-Isoenzym handelt [Clement *et al.*, 1997],

obwohl bis zu diesem Zeitpunkt noch kein Isoenzym dieser Subfamilie in der Literatur beschrieben worden war. Im selben Jahr veröffentlichten Postlind *et al.* [1997] die Aminosäuresequenz eines weiteren, zur Subfamilie CYP2D zugehörigen, mikrosomalen P450-Enzyms aus dem Schwein. Dieses als Vitamin D₃ 25-Hydroxylase bezeichnete Enzym (CYP2D25) wies erstaunlicherweise große Ähnlichkeiten mit der dritten Komponente des Benzamidoxim-Reduktase-Systems auf, weshalb Überstimmungen zwischen beiden Enzymen genauer untersucht wurden (siehe Kapitel 3 und 4).

Für die Reduktion von Amidoximen wurde ein Mechanismus postuliert, bei dem die vom NADH stammenden Elektronen über die NADH-Cytochrom b₅-Reduktase und Cytochrom b₅ auf das *N*-hydroxylierte Substrat, das an die sechste Koordinationsstelle des P450-Enzyms gebunden ist, übertragen werden (siehe Abb. 1-10) [Clement, 2002; Karhan, 2002].

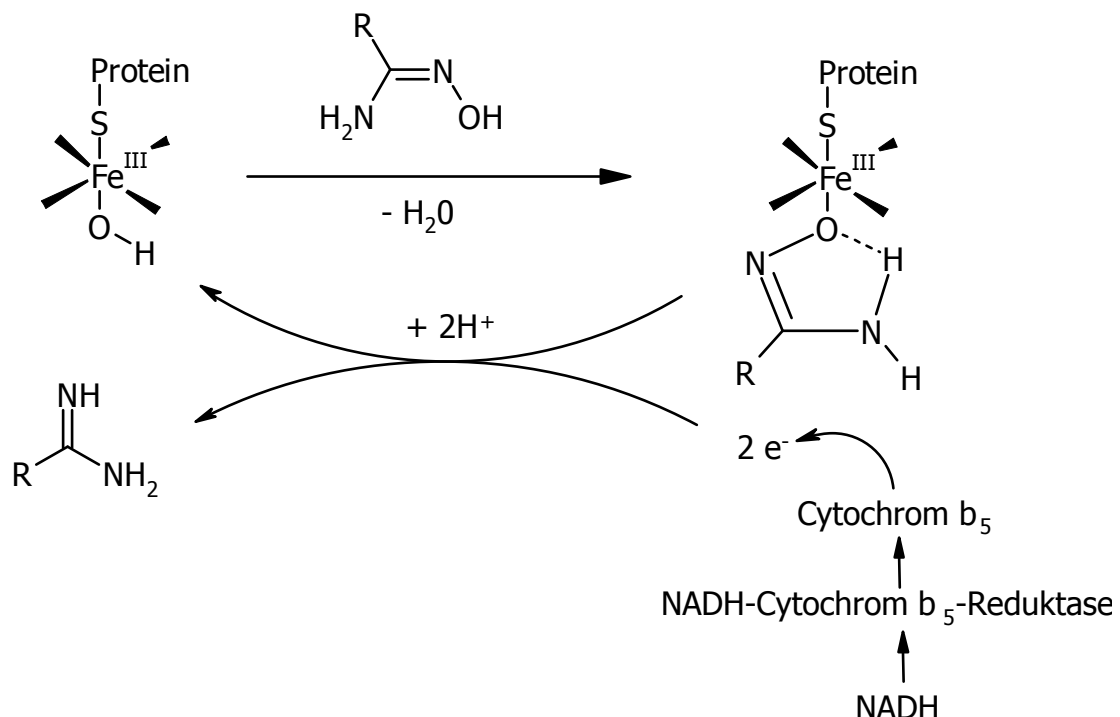


Abb. 1-10 Schematische Darstellung des Elektronentransfers bei der Reduktion von Amidoximen durch das Benzamidoxim-Reduktase-System (postuliert nach Clement [2002])

Cytochrom b_5 (EC 3.4.21.4) ist ein amphiphiles u.a. in der Leber vorkommendes Hämoprotein, das an vielen Oxidations- und Reduktionsprozessen beteiligt ist [Strittmatter *et al.*, 1972]. Es ist dabei an die äußere Membran des endoplasmatischen Retikulums gebunden [Mitoma und Ito, 1992] und weist drei verschiedene funktionale Domänen auf. Das N-terminale Ende stellt die Häm-enhaltende katalytische Domäne dar, während über die mittlere hydrophobe Komponente die Membranverankerung stattfindet und das C-terminale Ende zum endoplasmatischen Retikulum zeigt [Honsho *et al.*, 1998]. Zudem konnte aber auch ein Cytochrom b_5 in der äußeren Membran von Mitochondrien identifiziert werden [Ito, 1980], das sich genau wie das im ER vorkommende Cytochrom b_5 in drei Domänen untergliedert [Kuroda *et al.*, 1998]. Es fungiert dabei als Elektronenakzeptor der vom NADH abgegebenen Elektronen, wobei diese im Sinne einer Transportkette auf einen weiteren geeigneten Elektronenakzeptor übertragen werden. Als Ein-Elektronenakzeptor muss Cytochrom b_5 mit einem weiteren Enzym, der NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase, kooperieren, da diese zunächst beide vom NADH stammenden Elektronen aufnehmen und sie dann sukzessive an das Cytochrom b_5 übertragen kann. Weiterhin ist Cytochrom b_5 an einem Elektronentransport vom NADPH über die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase und einem Cytochrom P450-Enzym zum Substrat beteiligt. Dabei kann es sowohl als Elektronenakzeptor fungieren, indem es Elektronen vom NADPH über die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase aufnimmt als auch als Elektronendonator, indem es die Elektronen nacheinander auf die Cytochrom P450-Enzyme überträgt [Imai, 1981; Morgan und Coon, 1984].

Bei der NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase (EC 1.6.2.2) [Kubota *et al.*, 1977; Testa, 1995d] handelt es sich um eine flavinhaltige Reduktase, die beim Elektronentransport als Vermittler zwischen dem Zwei-Elektronendonator NADH und dem Ein-Elektronenakzeptor Cytochrom b_5 fungiert [Mathews und Czerwinski, 1976]. Die NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase ist überwiegend in Leber und Lunge lokalisiert und weist ein Molekulargewicht von 34.5 kDa auf [Arinç, 1991]. Es existieren zwei Formen dieser Reduktase, eine membrangebundene und eine lösliche [Shirabe *et al.*, 1991]. Während die lösliche Reduktase in Erythrozyten an der Reduktion von Methämoglobin beteiligt ist, katalysiert die an das endoplasmatische Retikulum

gebundene Reduktase Reaktionen der Cholesterin-Biosynthese und des Fremdstoffmetabolismus [Borgese *et al.*, 1982]. Weiterhin kommt sie auch in der äußeren Mitochondrienmembran und in Membranen des Golgi-Apparates vor [Borgese und Meldolesi, 1980]. Wie beim Cytochrom b_5 handelt es sich auch bei der NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase um ein amphipathisches Molekül, bei dem das hydrophile Segment die prosthetische Gruppe trägt und das hydrophobe Segment als Membrananker fungiert [Rogers und Strittmatter, 1975; Hackett und Strittmatter, 1984]. Folgender katalytischer Mechanismus wurde von Arinç [1991] postuliert: Die Elektronen werden zunächst vom NADH auf die Reduktase übertragen, indem eine Reaktion mit der oxidierten Form der Reduktase zu NAD^+ und reduzierter Reduktase stattfindet. Anschließend gibt diese nacheinander jeweils ein Elektron an zwei Moleküle Cytochrom b_5 ab. Das Eisenzentralatom wird dabei von Fe(III) zu Fe(II) reduziert, wodurch die Reduktase wieder in die oxidierte Form umgewandelt wird und für einen erneuten Elektronentransfer zur Verfügung steht [Hara und Minakami, 1971]. Im nächsten Schritt erfolgt die Freisetzung des mit der reduzierten Form der Reduktase einen Komplex bildenden NAD^+ .

Die Elektronenübertragung kann ebenfalls auch in einem langsamer ablaufenden Prozess von NADPH auf die NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase stattfinden, wobei das NADP^+ nicht in der Lage ist, den bereits erwähnten Komplex zu bilden [Strittmatter, 1958].

Die Identität des in humaner Leber für die Reduktion von Amidoximen verantwortlichen Enzymsystems konnte bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden. Die aus humaner Leber gereinigte dritte Komponente des Enzymsystems [Yun *et al.*, 1991] zeigte Homologien zum humanen Cytochrom P450-Isoenzym 2A6 [Behrens, 1999; Rieckert, 1999] und katalysierte als spezifische Markerreaktion die Cumarin 7-Hydroxylierung [Li *et al.*, 2003] unter Rekonstituierung mit NADPH und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase [Behrens, 1999; Rieckert, 1999] als auch die Reduktion verschiedener Amidoxime im Zusammenspiel mit Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase. Rekombinant gewonnenes CYP2A6 vermochte die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin nicht zu katalysieren [Lopian, 2002].

1.2 VITAMIN D₃ UND DESSEN METABOLITE

1.2.1 VORKOMMEN, STRUKTUR UND BEDEUTUNG

Vitamin D₃ wird in den Keratinozyten der Haut durch Spaltung von 7-Dehydrocholesterol unter Einwirkung von UV-Licht gebildet [Mutschler, 2001]. Zur Überführung von Vitamin D₃ in die aktive Wirkform 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) unterliegt es im Organismus zunächst einer 25-Hydroxylierung in der Leber und anschließend einer 1 α -Hydroxylierung in der Niere [Holick *et al.*, 1971; Tanaka *et al.*, 1971; Holick und DeLuca, 1971; Axén *et al.*, 1994b] (siehe Abb. 1-11). Extrarenale 1 α -Hydroxylase-Aktivitäten wurden z.B. auch in der Leber, in Keratinozyten und Makrophagen gefunden [Wikvall, 2001].

1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ sollte aufgrund seiner Bildung in einem speziellen Organ wie der Niere, die hier als endokrine Drüse agiert, des Transportes an einem Vitamin D bindenden Protein durch das Blut und der Wirkung entfernt vom Bildungsort als Hormon bezeichnet werden [Wikvall, 2001]. Da die Produktion des Hormons einem exakten Rückkopplungsmechanismus unterliegt, wird der Bedarf an Calcium und Phosphat vor allem über die Aktivität der 1 α -Hydroxylase gesteuert. Bei geringem Bedarf an Calcitriol katalysiert stattdessen CYP24 vermehrt die Bildung von 24,25-Dihydroxyvitamin D₃, das letztendlich in die biliär eliminierbare Calcitroinsäure umgewandelt wird [Jones *et al.*, 1998].

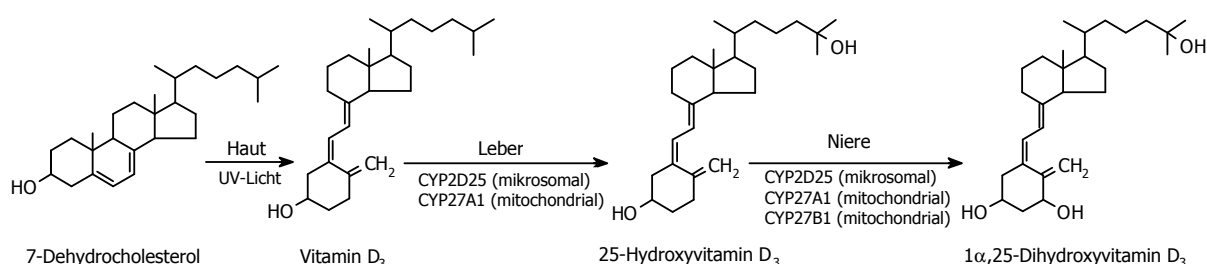


Abb. 1-11 Metabolismus des Vitamin D₃ im Schwein (modifiziert nach Wikvall [2001]; Hosseinpour *et al.* [2002])

Die physiologische Bedeutung von Vitamin D₃ bzw. seiner Hydroxylierungsprodukte liegt zusammen mit dem Parathormon in der Aufrechterhaltung der

Calciumkonzentration im Plasma [Jones *et al.*, 1998]. So werden die Blutcalciumspiegel durch eine erhöhte Calciumresorption aus dem Darm, eine gesteigerte Rückresorption von Calciumionen in den Nierentubuli und eine vermehrte Osteoklastentätigkeit in den Knochen durch ihren Einfluss erhöht [DeLuca, 1988; Ogunkolade *et al.*, 2002]. Neuere Studien zeigten, dass Vitamin D₃ sowohl die Proliferation und Differenzierung der Hautzellen stimuliert [Mutschler, 2001] als auch durch Erhöhung der Makrophagen- und Hemmung der T-Lymphozyten-Aktivität immunmodulierend wirkt [Alroy *et al.*, 1995; DeLuca und Cantorna, 2001]. Um seine biologische Wirkung entfalten zu können, bindet 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ an den nukleären Vitamin D-Rezeptor (VDR), wodurch es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors kommt [Carlberg, 1995; Bareis *et al.*, 2002]. So kann die Transkription spezifischer Vitamin D₃-regulierter Gene aktiviert bzw. unterdrückt werden [Chen *et al.*, 1998; Healy *et al.*, 2003]. Als Stimulator der Synthese des calciumbindenden Proteins (Calbindin) ist Vitamin D₃ am Transport der Calciumsalze in die Knochenmatrix beteiligt [Ammon, 2001].

1.2.2 REAKTIONEN DER VITAMIN D₃-HYDROXYLASEN

Die Aktivierung von Vitamin D₃ zu 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ wird durch Cytochrom P450-Enzyme katalysiert [Okuda *et al.*, 1995; Axén *et al.*, 1998]. Da die hepatische 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ in dieser Arbeit im Vordergrund steht, soll diese im Folgenden genauer betrachtet werden.

In den letzten Jahren gab es kontroverse Ansichten darüber, ob die 25-Hydroxylierung von nur einem oder von zwei Enzymen katalysiert wird und ob dieses P450-Enzym vorrangig in der mikrosomalen oder mitochondrialen Fraktion der Leber lokalisiert ist [Hosseinpour *et al.*, 2003].

1979 wurde erstmals ein mikrosomales Enzymsystem aus der Rattenleber beschrieben, das bei Anwesenheit von NADPH, molekularem Sauerstoff, einem Flavoprotein und einem P450-Enzym die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ katalysierte [Björkhem *et al.*, 1979; Madhok und DeLuca, 1979]. Weiterhin hydroxylierte dieses Enzym 5 β -Cholestan-3 α ,7 α -diol und 1 α -Hydroxyvitamin D₃ in Position 25 und katalysierte die 16 α -Hydroxylierung von Testosteron, während es

keine 25-Hydroxylase-Aktivität gegenüber Vitamin D₂ aufwies [Andersson *et al.*, 1983; Hayashi *et al.*, 1986]. Dieses Enzym war allerdings nur in männlichen Ratten vertreten [Dahlbäck und Wikvall, 1987]. Es zeigte immunologische und strukturelle Ähnlichkeiten mit der in männlicher Rattenleber charakterisierten Testosteron-Hydroxylase (CYP2C11) [Andersson und Jörnvall, 1986; Hayashi *et al.*, 1988a]. Diese Geschlechtsspezifität scheint nur in der Ratte vorhanden zu sein, während im Menschen kein Unterschied zwischen beiden Geschlechtern bei der 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ besteht [Wikvall, 2001]. Erst kürzlich konnte aus Rattenleber-Mikrosomen ein Enzym mit einem Molekulargewicht von 56 kDa isoliert werden, das sowohl die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ als auch von 1 α -Hydroxyvitamin D₃ katalysierte. Dieses als CYP2J3 bezeichnete Enzym kam sowohl in männlichen als auch in weiblichen Rattenlebern vor und war nicht wie CYP2C11 geschlechtsspezifisch. Des Weiteren konnten geringe mRNA-Level an CYP2J3 auch in der Niere und im Herzen gefunden werden, während CYP2C11 nur in der männlichen Rattenleber exprimiert wurde [Yamasaki *et al.*, 2004].

Es konnte ebenfalls eine mikrosomale Vitamin D₃ 25-Hydroxylase mit einem Molekulargewicht von 50.5 kDa aus der Schweineleber gereinigt werden [Axén *et al.*, 1992]. Dieses Enzym war im Gegensatz zu dem aus der Ratte isolierten weder geschlechtsspezifisch noch zeigte es 16 α -Hydroxylase-Aktivität. Es katalysierte aber die 25-Hydroxylierung sowohl von Vitamin D₃ und 1 α -Hydroxyvitamin D₃ als auch von Vitamin D₂ und 1 α -Hydroxyvitamin D₂ in Anwesenheit von NADPH-Cytochrom P450-Reduktase und NADPH [Axén *et al.*, 1994a].

Bei 1 α -Hydroxyvitamin D₃ handelt es sich um eine unphysiologische Verbindung, die als Arzneistoff zur Behandlung renaler Osteodystrophie und Hyperparathyroidismus eingesetzt wird [Kamachi *et al.*, 2001]. Es wird in der Leber schnell in 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ umgewandelt und nimmt dort alle biologischen Funktionen wahr [Fukushima *et al.*, 1978].

Ebenfalls konnte eine Aktivität der Vitamin D₃ 25-Hydroxylase gegenüber Tolterodin festgestellt werden, das ein Substrat des humanen CYP2D6 darstellt [Hosseinpour und Wikvall, 2000]. Mittlerweile konnte auch die für die porcine, mikrosomale Vitamin D₃ 25-Hydroxylase codierende cDNA isoliert werden [Postlind *et al.*, 1997]. Die Sequenzanalyse dieser cDNA ergab, dass die Vitamin D₃ 25-Hydroxylase aus

500 Aminosäuren mit einem vorausgerechneten Molekulargewicht von 56.4 kDa besteht. Sie weist eine 70-80 %ige Identität zu Mitgliedern der Subfamilie CYP2D und besonders zu dem humanen CYP2D6 auf [Hosseinpour und Wikvall, 2000] und wurde vom Nomenklatur-Komitee als CYP2D25 bezeichnet [Nelson, 2000].

Diese Ergebnisse zeigen, dass CYP2D25 nicht nur spezifisch Vitamin D₃-Verbindungen umsetzt, sondern auch in der Lage ist, andere Substrate zu hydroxylieren. Northern Blot- und RT-PCR-Experimente zeigten höhere mRNA-Level von CYP2D25 in der Leber als in der Niere. Es konnten aber auch geringe Mengen in Nebenniere, Gehirn, Herz, Darm, Lunge, Muskel, Milz und Thymus gefunden werden [Hosseinpour und Wikvall, 2000]. Das in der Schweineniere exprimierte mikrosomale CYP2D25 katalysierte dort nicht nur die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃, sondern auch die 1 α -Hydroxylierung von 25-Hydroxyvitamin D₃. Somit scheint das mikrosomale CYP2D25 die renale 1 α -Hydroxylase-Aktivität der Mitochondrien zu unterstützen [Hosseinpour *et al.*, 2002].

Auch die mitochondriale Vitamin D₃ 25-Hydroxylase konnte in den letzten Jahren ausführlich charakterisiert werden. Sie wird als CYP27A1 bezeichnet und katalysiert wichtige Reaktionen bei der Gallensäuresynthese in Anwesenheit von Ferredoxin, NADPH-Ferredoxin-Reduktase und NADPH [Björkhem *et al.*, 1980; Wikvall, 2001]. So wurden aus Lebermitochondrien verschiedener Spezies die entsprechenden Enzyme gereinigt und auf ihre katalytischen Fähigkeiten untersucht. Im Kaninchen zeigte dieses Enzym sowohl die 27-Hydroxylierung von Cholesterol und von C₂₇-Steroiden in der Gallensäuresynthese als auch die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ bzw. 1 α -Hydroxyvitamin D₃ [Wikvall, 1984; Dahlbäck, 1988; Dahlbäck und Wikvall, 1988; Masumoto *et al.*, 1988]. Eine für CYP27A1 aus Kaninchenleber codierende cDNA konnte 1989 isoliert und kloniert werden. Sie bestand aus 499 Aminosäuren und wies ein Molekulargewicht von 56.7 kDa auf [Andersson *et al.*, 1989]. Aber auch aus der Ratte [Masumoto *et al.*, 1988], aus dem Schwein [Axén *et al.*, 1994b] und dem Menschen [Oftebro *et al.*, 1981; Okuda, 1994] konnten entsprechende Enzyme gereinigt werden, die sowohl Aktivität in der 27-Hydroxylierung von C₂₇-Steroiden in der Gallensäuresynthese als auch in der 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ aufwiesen [Wikvall, 2001]. Dabei konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die mRNA dieses Enzyms nicht nur in der Leber vorhanden ist, sondern auch in der Lunge, im

Duodenum und in der Niere [Andersson *et al.*, 1989]. CYP27A-mRNA wurde außerdem nach Induktion durch Vitamin D₃ oder UVB-Strahlung in humanen Keratinocyten exprimiert [Lehmann *et al.*, 1999].

Die Rolle des hepatischen mitochondrialen CYP27A1 als physiologische Vitamin D₃ 25-Hydroxylase wurde wegen der breiten Substratspezifität und hoher K_m-Werte für die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ mehrfach diskutiert [Okuda *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1998]. So konnte bei Patienten mit zerebrotendinöser Xanthomatose (CTX), die durch Mutationen im CYP27A-Gen ausgelöst wird, ein erhöhtes Osteoporose- und Knochenbruchrisiko festgestellt werden [Berginer *et al.*, 1993]. Die Serum-Level einiger Vitamin D₃-Metabolite waren bei diesen Patienten deutlich erniedrigt. Dagegen beschrieben andere Autoren, dass diese Patienten keine verminderten 25-Hydroxyvitamin D₃-Level aufwiesen und begründeten dies mit einer kompensatorisch erhöhten mikrosomalen Vitamin D₃ 25-Hydroxylase [Rosen *et al.*, 1998; Hosseinpour und Wikvall, 2000].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass CYP2D25 und CYP27A1 sowohl Vitamin D₃ sowie 1 α -Hydroxyvitamin D₃ 25-hydroxylieren als auch die Hydroxylierung von 25-Hydroxyvitamin D₃ zu 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ und zu 25,26(27)-Dihydroxyvitamin D₃ katalysieren [Araya *et al.*, 2003]. Somit sind beide Enzyme für die Bioaktivierung von Vitamin D₃ wichtig [Hosseinpour *et al.*, 2003].

In humanen Lebermikrosomen konnte ebenfalls die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ und 1 α -Hydroxyvitamin D₃ festgestellt werden [Holmberg *et al.*, 1986], jedoch war eine eindeutige Identifizierung der humanen mikrosomalen Vitamin D₃ 25-Hydroxylase bisher nicht möglich. Keines der 14 getesteten rekombinanten Enzyme (CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9-Cys, 2C9-Arg, 2C19, 2D6-Val, 2D6-Met, 2E1, 3A4, 4A11), die in einer B-lymphoblastoiden Zell-Linie exprimiert wurden, zeigte 25-Hydroxylase-Aktivität gegenüber 1 α -Hydroxyvitamin D₃ als Substrat [Kamachi *et al.*, 2001]. Andere Autoren gingen hingegen davon aus, dass im Menschen nur eine mitochondriale Vitamin D₃ 25-Hydroxylase (CYP27A) existiert, deren mRNA-Level transkriptional durch 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ reguliert werden [Theodoropoulos *et al.*, 2003]. Jedoch scheint der Vitamin D₃-Metabolismus in gesunden Individuen genauso ausgeprägt zu sein wie bei Individuen ohne funktionstüchtiges CYP27A1. Diese Ergebnisse belegen, dass neben der

mitochondrialen auch eine mikrosomale Vitamin D₃ 25-Hydroxylase vorhanden ist, die eine nicht vorhandene mitochondriale Aktivität kompensieren kann [Cheng *et al.*, 2003]. So konnte aus Mäusen eine cDNA isoliert werden, die für das mikrosomale Enzym CYP2R1 codierte, während die Aminosäure-Sequenz des humanen Enzyms von einer cDNA erzeugt wurde, die von isolierter mRNA aus der Leber mittels PCR erhalten wurde. Beide Enzyme wiesen eine 89 %ige Identität in der Aminosäure-Sequenz auf und besaßen die Fähigkeit, 1 α -Hydroxyvitamin D₃ zu aktivieren. Die Autoren gingen daher davon aus, dass es sich bei CYP2R1 vermutlich um die mikrosomale Vitamin D₃ 25-Hydroxylase handelt [Cheng *et al.*, 2003]. So führte bei einem Patienten eine Mutation in dem CYP2R1-Gen zum Verlust der Vitamin D₃ 25-Hydroxylase-Aktivität [Cheng *et al.*, 2004].

Erst kürzlich wurden erneut 16 hepatische Cytochrom P450-Enzyme hinsichtlich ihrer 25-Hydroxylase-Aktivität getestet [Gupta *et al.*, 2004]. Dabei zeigte das in Insektenzellen exprimierte CYP3A4 die höchste Aktivität. CYP3A4 katalysierte die 25-Hydroxylierung von 1 α -Hydroxyvitamin D₂, 1 α -Hydroxyvitamin D₃ und von Vitamin D₂, während Vitamin D₃ kein Substrat von CYP3A4 darstellte. Schon in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass CYP3A4 25-Hydroxylase-Aktivität gegenüber 5 β -Cholestan-3 α ,7 α ,12 α -triol aufwies, welches ein Intermediat in der Biosynthese von primären Gallensäuren darstellt [Furster und Wikvall, 1999]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass CYP3A4 mRNA sowie CYP3A4 Protein durch 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ in humanen Caco-2-Zellen induziert wurden [Elizondo und Medina-Díaz, 2003]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei der mikrosomalen Vitamin D₃ 25-Hydroxylase evt. um CYP3A4, eines der wichtigsten fremdstoffmetabolisierenden Enzyme in humaner Leber, handelt.

1.3 THEMA UND ZIELSETZUNG

Zeitgleich wurden zwei mikrosomale CYP2D-Isoenzyme aus der Schweineleber entdeckt. Während die Arbeitsgruppe Wikvall (Uppsala, Schweden) die codierende cDNA-Sequenz der Vitamin D₃ 25-Hydroxylase (CYP2D25) publizierte [Postlind *et al.*, 1997], konnte der Arbeitskreis Clement die Benzamidoxim-Reduktase aus Schweineleber-Mikrosomen isolieren und drei Peptidfragmente dieser Reduktase genauer identifizieren [Clement *et al.*, 1997]. Beide Enzyme katalysieren unterschiedliche Reaktionen. Die Vitamin D₃ 25-Hydroxylase wandelt in der Leber in Gegenwart der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase und von NADPH das Prohormon Vitamin D₃ in 25-Hydroxyvitamin D₃ um (siehe Abb. 1-11), während die Benzamidoxim-Reduktase u.a. Benzamidoxim zu Benzamidin in Gegenwart von Cytochrom b₅, NADH-Cytochrom b₅-Reduktase und NADH reduziert (siehe Abb. 1-9). Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich daher die Frage, ob es sich bei beiden Enzymen möglicherweise um dasselbe Protein handelte, das in Gegenwart verschiedener Elektronenüberträger zur Katalyse unterschiedlicher Reaktionen fähig war. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit bestand in der Annahme, dass es sich um zwei sehr ähnliche CYP2D-Isoenzyme mit überlappenden Substratspezifitäten handelte. Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen sollte rekombinant exprimiertes CYP2D25 aus verschiedenen Expressionssystemen (Insektenzellen und Hefezellen) gewonnen werden, da bei Enzymreinigungen aus Geweben Verunreinigungen mit anderen unerwünschten Proteinen nicht ausgeschlossen werden können und dadurch eine genaue Charakterisierung erschwert würde.

Beide Enzyme sollten sowohl im Benzamidoxim-Reduktase-Assay als auch im 1 α -Hydroxyvitamin D₃ 25-Hydroxylase-Assay auf Aktivität getestet werden, um Übereinstimmungen und Unterschiede zwischen beiden Proteinen besser herausarbeiten zu können. Im Vitamin D₃-Assay wurde statt Vitamin D₃ 1 α -Hydroxyvitamin D₃ als Substrat für CYP2D25 eingesetzt, da es sehr viel effektiver als Vitamin D₃ 25-hydroxyliert wird [Wikvall, 2001] (siehe Abb. 1-12).

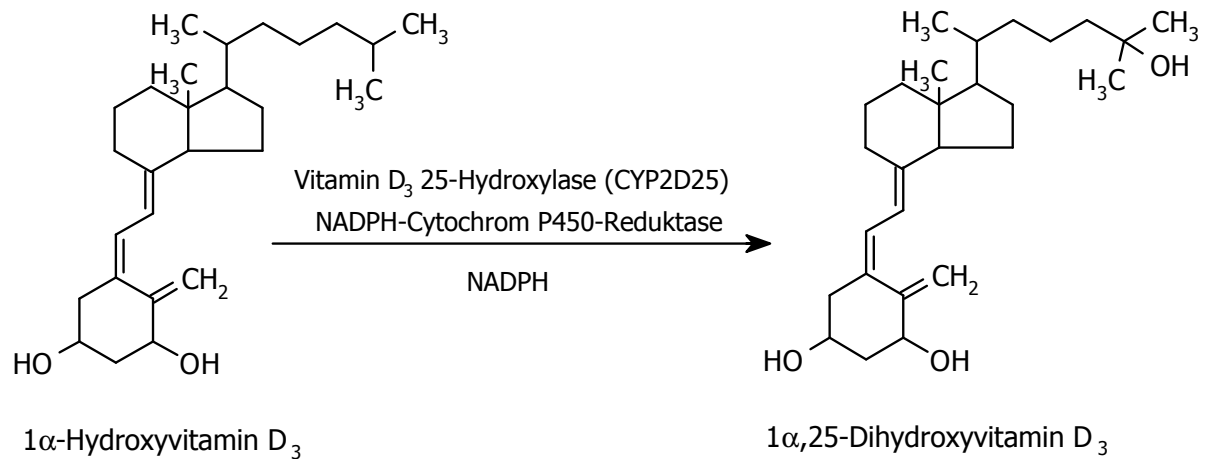


Abb. 1-12 25-Hydroxylierung von 1 α -Hydroxyvitamin D₃ durch die mikrosomale Vitamin D₃ 25-Hydroxylase (CYP2D25) in der Schweineleber

Des Weiteren sollte eine neue LC/MS-Methode zur eindeutigen Detektion und Quantifizierung des Metaboliten 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ entwickelt werden, da eine alleinige Detektion im UV-Bereich wegen einer vorhandenen Verunreinigung mit derselben Retentionszeit wie des zu bestimmenden Metaboliten nicht möglich war.

2 EXPRESSION DER PORCINEN VITAMIN D₃ 25-HYDROXYLASE

2.1 EINLEITUNG

2.1.1 *IN VITRO* BIOTRANSFORMATION

Um Cytochrom P450-vermittelte Biotransformationen endogener Stoffe und Xenobiotika *in vitro* untersuchen zu können, wurden verschiedene genetisch ausgereifte Zellsysteme entwickelt [Doehmer *et al.*, 1994]. Zum einen werden cDNAs, die z.B. für Cytochrom P450, aber auch für andere Enzyme codieren, in Vektoren kloniert und heterolog in Bakterien-, Hefe- oder Säugetierzellen exprimiert. Zum anderen setzt man bestimmte Zellsysteme ein, um daran Phase I- und II-Metabolismusstudien durchzuführen. In Verbindung mit zellspezifischen Eigenschaften können diese Zellsysteme für eine Abschätzung von metabolismusabhängigen pharmakologischen bzw. toxikologischen Effekten genutzt werden. Solche *in vitro* Experimente werden durchgeführt, um so pharmakokinetische Parameter *in vivo* vorhersagen zu können und die Zahl an Tierexperimenten zu reduzieren.

Durch die Verfügbarkeit von Antikörpern gegen spezifische P450 Isoenzyme, rekombinant gewonnenen Proteinen, gereinigten Enzymen und selektiven chemischen Inhibitoren ist es möglich, die für den Metabolismus verantwortliche P450-Isoform eindeutig identifizieren zu können [Yuan *et al.*, 2002].

2.1.1.1 *IN VITRO* SYSTEME FÜR METABOLISMUSSTUDIEN

Mittlerweile sind verschiedene *in vitro* Systeme zur Durchführung von Biotransformationsstudien etabliert worden, da dadurch die pharmakokinetischen Eigenschaften einer neu entwickelten Verbindung vorhergesagt werden können [Andersson *et al.*, 2001]. Eingesetzt werden einerseits tierische Enzympräparationen wie z.B. Schweinelebermikrosomen, da sie ohne großen Aufwand und in ausreichender Menge gewonnen werden können. Andererseits benutzt man aber

auch von humanen Geweben abgeleitete Systeme, da eine Übertragung von Ergebnissen aus tierischen *in vitro* Systemen auf den Menschen problematisch ist [Wrighton *et al.*, 1993]. Bei Auswahl der Testspezies sollte darauf geachtet werden, dass sie bezüglich des Metabolismus und der Produktion von toxischen Intermediaten dem Menschen entspricht [Yuan *et al.*, 1999].

Für solche Metabolismusstudien kommen isolierte perfundierte Organe von z.B. Leber, Niere und Herz ebenso zum Einsatz wie Leberdünnschnitte. Diese sog. „liver slices“ ähneln am meisten der *in vivo* Situation, da sie nicht nur die Enzyme der gesamten Leber beinhalten, sondern auch noch Verbindungen zwischen einzelnen Leberzellen bestehen. Die Dicke eines solchen Schnittes muss präzise gewählt werden, um so die optimale Anzahl an Zellschichten und die bestmögliche Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten [Vickers *et al.*, 1995].

Hepatozyten als ein weiteres Zellsystem besitzen alle Phase I- und II-Enzyme, sodass bei Inkubationen die gesamte Bandbreite an möglichen Metaboliten bestimmt werden kann. Mittlerweile lassen sich nicht nur frische Kulturen, sondern auch kryokonservierte Hepatozyten käuflich erwerben, wodurch ein effizienter Gebrauch dieses Zellsystems gewährleistet ist [Maurel, 1996].

Auch subzelluläre Systeme wie Mikrosomen, Mitochondrien und Cytosol verschiedener Spezies und Organe werden oft eingesetzt, da sie einfach in der Handhabung sind und die enzymatischen Aktivitäten auch nach Lagerung bei -80°C erhalten bleiben [Beaune *et al.*, 1986]. Diese subzellulären Systeme enthalten ebenfalls P450-Enzyme, wodurch die Untersuchung von inhibitorischen Interaktionen und CYP-katalysierter Metabolitenbildung ermöglicht wird [Guengerich *et al.*, 1986].

Des Weiteren hat man die Möglichkeit, das für die Studien benötigte Protein (Oxygenasen, Reduktasen, Transferasen) aus dem jeweiligen Organismus zu reinigen. Ein solcher Reinigungsprozess ist sehr kompliziert (siehe 3.2.1.5) und führt meistens nicht zu ganz reinen Produkten, weshalb die heterologe Expression von Enzymen immer mehr bevorzugt wird.

In heterologen Expressionssystemen wird ein individuelles Enzym in einer Wirtszelle exprimiert. Für die Produktion von cDNA-exprimierten Enzymen werden bakterielle Systeme wie z.B. *Escherichia coli* [Fisher *et al.*, 1992; Gillam *et al.*, 1993; Guo *et al.*, 1994], Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia*

pastoris) [Hayashi *et al.*, 1988b; Peyronneau *et al.*, 1992; Sakaki und Inouye, 2000], Säugetier-Zell-Linien [Urasaki *et al.*, 2001] und Insektenzellen [Asseffa *et al.*, 1989] eingesetzt.

2.1.1.2 REKOMBINANTE P450-ENZYME

Cytochrom P450-Enzyme sind bisher in allen unter 2.1.1.1 genannten heterologen Expressionssystemen exprimiert worden [Crespi und Miller, 1999]. Dazu stehen eine Vielzahl von Vektoren zur Verfügung, die entweder eine transiente oder stabile Genexpression ermöglichen. Auf diese Weise kann man über große Proteinmengen verfügen, die nur die gewünschten Proteinkomponenten enthalten. So werden die komplizierten Reinigungsverfahren immer mehr verdrängt, bei denen nicht immer reine Enzyme, wenn auch in ihrer natürlichen Umgebung, erhalten werden. Außerdem müssen die bei den Reinigungsverfahren eingesetzten Detergenzien anschließend mühsam entfernt werden, da sie bei Aktivitätstestungen inhibierend wirken.

Bei der Auswahl des Expressionssystems mit dem größten Nutzen muss zwischen möglicher Proteinmenge und den dafür aufzuwendenden Kosten abgewogen werden. Während in Insektenzellensystemen z.B. sehr hohe Expressionslevel von Cytochrom P450-Enzymen auch in Verbindung mit der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase erreicht werden können [Lee *et al.*, 1995], ist die bakterielle Expression dagegen sehr viel kostengünstiger [Crespi und Miller, 1999]. Außerdem muss beachtet werden, dass das exprimierte Protein in einigen Expressionssystemen posttranslationalen Prozessen, wie z.B. Glykosylierung, Phosphorylierung oder proteolytischer Spaltung, unterliegen kann [Gonzalez und Korzekwa, 1995].

In einem Vektor kann auch mehr als ein Gen in derselben Zell-Linie coexprimiert werden, um auf diese Weise gleich mehrere Stufen eines Metabolismus-Weges aufzuklären [Townsend *et al.*, 1999]. Da diese Proteine aber in Biotransformationsstudien isoliert von anderen hepatischen Enzymen betrachtet werden, wurde der prädiktive Nutzen für *in vivo* Metabolismen diskutiert. Wenn der Metabolismus einer Substanz mit einem einzigen Enzymsystem untersucht werden soll, muss beachtet werden, dass *in vivo* verschiedene Enzymsysteme

zusammenarbeiten, die in diesen Metabolismus-Wegen aktiviert werden [Rodrigues *et al.*, 1999].

2.1.2 DAS EXPRESSIONSSYSTEM *ESCHERICHIA COLI*

In der Molekularbiologie stellt *Escherichia coli* den wichtigsten Organismus für gentechnische Experimente dar, da er in der Lage ist, aus klonierten eukaryontischen cDNAs heterologe Proteine zu produzieren. Mit diesem Expressionssystem lassen sich hohe Ausbeuten erzielen, wobei es aber oft nötig ist, das N-terminale Ende zu modifizieren [Barnes *et al.*, 1991]. Gentechnische Modifikationen werden daher zunächst in diesem System ausprobiert, auch wenn sich eigentlich eines anderen Expressionssystems bedient werden soll. Für die Transformation in *E. coli* stehen daher eine Vielzahl von Vektoren zur Verfügung, um rekombinierte DNA in diesen Organismus einschleusen zu können [Dingermann, 1999].

Die Expression von eukaryontischen Proteinen in diesem prokaryontischen Expressionssystem kann aber auch dazu führen, dass die gebildeten Proteine instabil sind oder keine biologische Aktivität aufweisen und anschließend in sog. „inclusion bodies“ akkumulieren [Williams *et al.*, 1982]. Auch Toxine aus den Bakterien können das Endprodukt verunreinigen, wodurch eine pyrogene Wirkung bei Mensch und Tier verursacht wird [Glick und Pasternak, 1995]. Wenn membrangebundene Enzyme aus Säugern in bakteriellen Systemen exprimiert werden sollen, kann es zur Proteolyse der gebildeten Proteine kommen [Porter *et al.*, 1987].

2.1.3 DAS BACULOVIRUSVEKTOR-EXPRESSIONSSYSTEM (BVES)

2.1.3.1 ALLGEMEINE EINFÜHRUNG

Das Baculovirusvektor-Expressionssystem (BVES) ist eines der leistungsfähigsten und vielseitigsten eukaryontischen Expressionssysteme, das derzeit verfügbar ist [Kidd und Emery, 1993]. Insektenkultur-Systeme, wie z. B. die Zell-Linie *Spodoptera frugiperda* (*Sf*), können durch Baculoviren infiziert werden. Das am häufigsten eingesetzte Baculovirus ist das *Autographa californica* Multiple Nuclea Polyhedrosis Virus (AcMNPV). Es ist ein doppelsträngiges DNA-Virus, das verschiedene Arten von

Insekten und Larven infizieren kann. Innerhalb eines Infektionszyklus treten zwei verschiedene Virusformen auf. Zum einen werden Viren gebildet, bei denen mehrere stäbchenförmige Nukleokapside in eine Polyhedrin-Matrix eingebettet sind. Dies dient dem Schutz vor Umwelteinflüssen. Zum anderen werden Viren freigesetzt, die nur aus einem einzigen Nukleokapsid bestehen und fähig sind, andere Wirtszellen direkt zu infizieren [Jarvis, 1997].

Ein großer Vorteil dieses Systems liegt darin, dass nur Insekten mit diesen Viren infiziert werden können, wodurch ein hoher biologischer Sicherheitsstandard gewährleistet ist, da höhere Organismen davon nicht betroffen sind. Um Fremd-DNA in ein Baculovirus einzubringen, muss auf einen Transfer-Vektor zurückgegriffen werden, da das Baculovirus-Genom zu groß ist, um es direkt als Klonierungssystem einsetzen zu können. Dazu wird der Transfer-Vektor mit der AcMNPV DNA von einem Helfervirus in *Sf*-Zellen cotransfiziert, um so eine homologe Rekombination zu ermöglichen. Dadurch werden rekombinante Baculoviren erhalten, die zwar kein Polyhedrin-Gen mehr enthalten, aber dennoch von dem Promotor des Polyhedrin-Gens kontrolliert werden. Das Baculovirus-System stellt eine effiziente Variante zur Proteinexpression dar, da innerhalb von ein paar Tagen rekombinantes Protein in großen Mengen gewonnen werden kann. Die mit diesem System erhaltenen Proteine weisen die richtige posttranslationale Modifikation auf [Sakaki und Inouye, 2000], die in anderen Expressionssystemen möglicherweise nicht gewährleistet wäre [Dingermann, 1999]. So konnte gezeigt werden, dass in diesem System viele wichtige Proteine sowohl glykosyliert als auch sekretiert wurden [Wickham *et al.*, 1995]. Um optimale Expressionsergebnisse und Ausbeuten zu erzielen, müssen der Zeitraum der Virusexposition, die exogene Hämin-Zugabe während des Infektionszyklus [Asseffa *et al.*, 1989] und der Erntezeitpunkt genau kontrolliert werden.

Das BVES wurde bereits erfolgreich zur Expression verschiedener P450-Isoenzyme eingesetzt [Ohta *et al.*, 1991; Buters *et al.*, 1994; Haining *et al.*, 1996], wobei dieses System auf die exogene Hämin-Supplementierung angewiesen ist. Durch exogene Hämin-Zufuhr ins Kulturmedium konnte der P450-Gehalt um das 5- bis 6-fache gesteigert werden [Asseffa *et al.*, 1989]. Um jedoch Umsetzungsraten in oxidativen Prozessen messen zu können, muss ein rekombinant exprimiertes P450-Enzym mit

der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase rekonstituiert werden [Clarke, 1998]. Eine elegantere Lösung besteht in der Konstruktion von Fusionsproteinen, um auf diese Weise ein katalytisch unabhängiges P450-Enzym zu erhalten [Shet *et al.*, 1993].

2.1.3.2 EXPRESSION VON CYP2D25' IM BVES/SF9

Es wurden drei verschiedene Transferplasmide pVL1393/CYP_n, pAcG2T/Bac1/3 und pAcG2T/Bac2/3 kloniert, mit denen unterschiedliche CYP2D25'-Proteine erhalten werden sollten [Berger, 2002]. In dem Transferplasmid pVL1393/CYP_n lag die CYP2D25'-Sequenz unverändert vor, während es sich bei den aus mit pAcG2T/Bac1/3 und pAcG2T/Bac2/3 infizierten *Sf9*-Zellen gewonnenen Proteinen um Fusionsproteine mit der Glutathion-S-Transferase handelte. Dabei lag die CYP2D25'-Sequenz im Transferplasmid pAcG2T/Bac1/3 unverändert vor, während die Sequenz bei pAcG2T/Bac2/3 um 28 N-terminale Aminosäuren im Bereich des Membranankers verkürzt war, um ein potenziell lösliches Produkt zu erhalten (siehe Abb. 2-1). Diese Fusionsproteine sollten nach erfolgreicher Expression über eine Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose aufgereinigt werden. Durch Zugabe von Thrombin sollte dieser Anker anschließend wieder abgespalten werden [Beekman *et al.*, 1994; Sorscher und Sommerfelt, 1995; Lehr *et al.*, 1996].

Die drei Expressionsplasmide wurden freundlicherweise von K. Berger zur Verfügung gestellt.

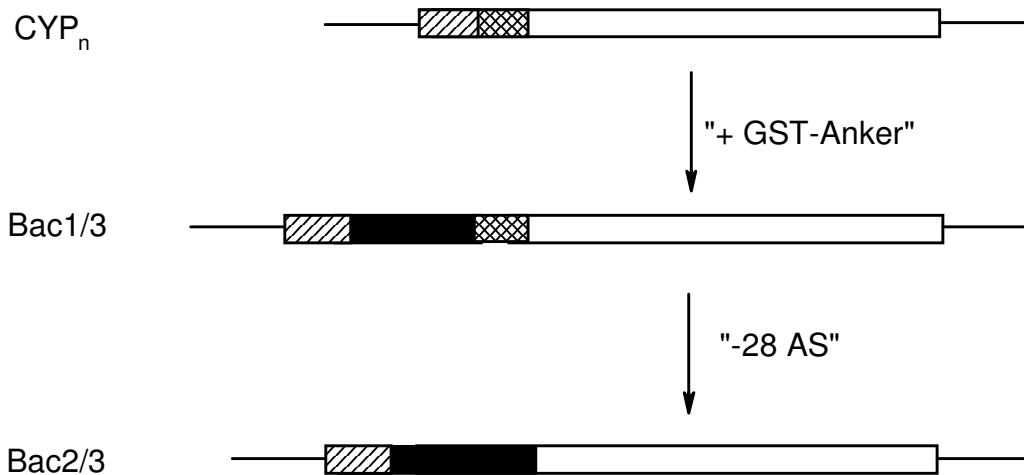


Abb. 2-1 Schematische Darstellung der drei Transferplasmide

Schraffiert: Promotorsequenz; kariert: die bei Bac2/3 fehlenden N-terminalen Aminosäuren am 5'-Ende; weiß: CYP2D25'-Sequenz; schwarz: Sequenz des GST-Ankers. CYP_n dient zur Expression des unveränderten CYP2D25'-Proteins. Bac1/3 und Bac2/3 sind GST-Fusionsproteine, wobei Bac2/3 um 28 N-terminale AS verkürzt ist.

2.1.4 DAS EXPRESSIONSSYSTEM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

2.1.4.1 ALLGEMEINE EINFÜHRUNG

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird schon seit langem als Expressionssystem eingesetzt, da sie einige Vorteile bei der Produktion von P450-Enzymen aus Säugern bietet. Sie ist im Gegensatz zu Bakterien ein Eukaryont und war der erste eukaryontische Organismus, dessen Genom vollständig sequenziert war [Dingermann, 1999]. Die Hefe wächst sehr schnell in kostengünstigem Medium und lässt sich ohne Schwierigkeiten transformieren [Pompon, 1988], sodass in relativ kurzer Zeit bemerkenswerte Proteinlevel und katalytische Aktivitäten mit diesem System erhalten werden können [Gonzalez und Korzekwa, 1995]. Die Proteinfaltung in der Hefe ähnelt der höherer Organismen sehr viel stärker als der in Prokaryonten, sodass z.B. Disulfidbrücken korrekt verbunden werden, wozu Bakterien nicht ohne weiteres fähig sind. Die Hefe ist außerdem in der Lage, posttranslationale Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen und Phosphorylierungen durchzuführen. Dabei kann es jedoch auch zu Komplikationen kommen, da die Wirtszelle selbst erkennen muss, ob das Protein posttranslational modifiziert werden muss oder nicht.

Der Einsatz der Hefe ist biologisch sicher, da sie auch in der Lebensmittelindustrie eingesetzt wird und keine Pyrogene wie z.B. bakterielle Systeme bildet. Dies ist ein wesentlicher Vorteil, da viele rekombinant hergestellte Wirkstoffe parenteral appliziert werden müssen [Dingermann, 1999].

Die Zellwand der Hefe ist aus drei verschiedenen Polysacchariden aufgebaut [Lussier *et al.*, 1997]: Die äußerste Schicht besteht aus Mannoprotein, welches für die Oberflächeneigenschaften wie Immunogenität, sexuelle Adhäsion und Flockulation verantwortlich ist. Ein β -Glucan bildet die innere Schicht eines strukturellen Netzwerkes, während das dritte Polymer Chitin die Glukan-Bruchstücke verknüpft, um sie alkali-unlöslich zu machen [Lehle und Tanner, 1995].

Die Hefe teilt viele gemeinsame regulatorische Mechanismen mit Vertebraten [Marín *et al.*, 2002] und besitzt außerdem ein eigenes endoplasmatisches Retikulum (ER), eine an das ER gebundene NADPH-Cytochrom P450-Reduktase [Aoyama *et al.*, 1984] und Cytochrom b_5 [Guengerich *et al.*, 1991], wobei die Ähnlichkeiten in der Sequenz zwischen den Redoxenzymen aus der Hefe (NADPH-Cytochrom P450-Reduktase und Cytochrom b_5) und den entsprechenden Enzymen aus humaner Leber begrenzt sind [Pompon *et al.*, 1996]. Somit konnte zwar die endogene NADPH-Cytochrom P450-Reduktase den Metabolismus von heterolog exprimierten Enzymen unterstützen [Clarke, 1998], allerdings bewirkte die Coexpression einer Säugetier-Reduktase gesteigerte katalytische Aktivitäten [Murakami *et al.*, 1986]. Auch der Austausch der Hefe-Reduktase gegen die humane Reduktase steigerte die P450-Aktivität humaner Enzyme [Urban *et al.*, 1993], sodass die Verfügbarkeit an endogener Hefe-Reduktase limitiert zu sein scheint [Kaergel *et al.*, 1990]. Diese sollte daher zusätzlich exogen hinzugesetzt werden [Del Carratore *et al.*, 2000], es sei denn, es ist die Möglichkeit einer Coexpression zur Produktion von Fusionsproteinen gegeben [Murakami *et al.*, 1987]. Die exogene Zugabe von Reduktase zu Hefemikrosomen führte zu einem 3- bis 8-fachen Anstieg der P450-Aktivität [Urban *et al.*, 1990]. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Überexpression der endogenen Hefe-Reduktase, bei der diese Sequenz zwischen einen galaktoseinduzierbaren Promotor und einen PGK-Terminator kloniert wurde [Urban *et al.*, 1990], da Murakami *et al.* [1986] auch zeigen konnten, dass die Ratten-P450-Reduktase in der Hefe nur in geringer Menge

exprimiert werden konnte. Begründet wurde dies mit der möglicherweise vorhandenen Instabilität dieser Reduktase in Hefezellen [Yabusaki *et al.*, 1988b].

Nachdem Oeda *et al.* [1985] die erste erfolgreiche heterologe Expression von P450-Enzymen aus Säugern beschrieben, wurden inzwischen viele P450-Enzyme in der Hefe exprimiert [Renaud *et al.*, 1990; Truan *et al.*, 1993]. Bei Einsatz von aus diesem System gewonnenen Mikrosomen wird aufgrund des Vorhandenseins endogener NADPH-Cytochrom P450-Reduktase, Cytochrom b₅ und des endoplasmatischen Retikulums das hepatische mikrosomale Milieu sehr gut imitiert [Guengerich *et al.*, 1991], wodurch der Einsatz von *Saccharomyces cerevisiae* als Expressionssystem an Bedeutung gewinnt.

2.1.4.2 EXPRESSION VON CYP2D25 IN DER HEFE

Hosseinpour *et al.* beschrieben bereits 2001 die Expression der porcinen mikrosomalen Vitamin D₃ 25-Hydroxylase (CYP2D25) in *Saccharomyces cerevisiae*. Sie subklonierten die CYP2D25 cDNA an den *Bam*HI und *Kpn*I Schnittstellen in den Expressionsvektor pYeDP60. Anschließend wurde das Plasmid in den Hefestamm W(R) transformiert, der gleichzeitig die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase der Hefe unter der Kontrolle eines galaktoseinduzierbaren Promotors coexprimierte [Truan *et al.*, 1993]. Daraus gewonnene Mikrosomen wurden freundlicherweise von M. Hidestrand, Stockholm zur Verfügung gestellt und auf reduktive Eigenschaften getestet (siehe 3.3.3.4.1).

Für folgende Studien sollte die Expression von CYP2D25 in dem Hefestamm W(N), der nicht die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase coexprimierte, durchgeführt werden, da die zusätzlich im Reaktionsansatz vorhandene NADPH-Cytochrom P450-Reduktase möglicherweise reduktive Umsetzungen hemmt. Sowohl der mit der CYP2D25-Sequenz klonierte Vektor, als auch der Hefestamm W(N) wurden von M. Hidestrand für diese Studien zur Verfügung gestellt.

Abb. 2-2 zeigt den für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* verwendeten multicopy Vektor pYeDP60 CYP2D25. Es handelt sich dabei um einen sog. Shuttle-Klonierungsvektor, da dieser sowohl einen Replikationsstartpunkt für *E. coli* (*ori E. coli*) als auch für die Hefe (yeast origin 2 μ m) enthält. So konnten erste

Transformationsschritte zur Überprüfung und Vervielfältigung des Vektors zunächst in *E. coli* vorgenommen werden, um dann die Transformation und Expression in der Hefe durchzuführen. Das Plasmid enthält ein Resistenzgen gegen Ampicillin (Amp^R), das ihm die Fähigkeit verleiht, in Gegenwart des Antibiotikums Ampicillin zu wachsen, da das Gen für die β -Lactamase codiert. Des Weiteren sind zwei Auxotrophie-Marker ADE 2 und URA 3 vorhanden. Die Produkte dieser Gene katalysieren Teilreaktionen bei der Biosynthese der jeweiligen Nukleotidbase Adenin bzw. Uracil, wodurch entsprechende Mutationen in dem verwendeten Hefestamm W(N) komplementiert werden konnten. Der Gebrauch eines ADE 2-Auxotrophie-Markers ist zudem sinnvoll, da Kulturmedien bei hohen Zelldichten schnell an Adenin verarmen [Pompon *et al.*, 1996]. Die als MCS bezeichnete „multiple cloning site“ nimmt die zu klonierenden DNA-Fragmente auf und enthält daher Erkennungssequenzen für verschiedene Restriktionsendonukleasen [Dingermann, 1999]. Zudem wurde in diesem Vektor ein regulierbarer GAL10-CYC1 Promotor verwendet, der erst durch die Zugabe von Galaktose induziert wird [Pompon *et al.*, 1996]. Das Produkt von GAL10 (UDP-Galaktose-Epimerase), sowie die Produkte der Gene GAL1 (Galaktokinase) und GAL7 (Galaktose-1-Phosphat-Uridyltransferase) ermöglichen die Nutzung von Galaktose als Kohlenstoffquelle in *Saccharomyces cerevisiae* [Guarente *et al.*, 1982]. Dieser Promotor liegt inaktiviert vor, solange Glukose im Medium vorhanden ist. So können große Zellzahlen in glukosehaltigem Medium erreicht werden, denn erst durch die Zugabe von Galaktose am Ende der Wachstumsphase der Zellen, wenn die Glukose gänzlich verbraucht ist und die Zellen auf das im Medium vorhandene Ethanol als Kohlenstoffquelle zum Wachstum angewiesen sind [DeRisi *et al.*, 1997], wird die Expression des gewünschten Proteins gezielt gestartet. Von diesem Zeitpunkt an steigt die Proteinbildung stetig an, während die Zelldichte nahezu konstant bleibt [Pompon *et al.*, 1996]. Durch den PGK-Terminator werden unnötig lange Transkripte vermieden, die zudem instabil wären. Die Transkriptions-Termination ist in der Hefe sehr spezifisch, weshalb Expressions-Kassetten an ihrem Ende immer ein Transkriptions-Terminations-Signal aus *Saccharomyces cerevisiae* enthalten sollten [Dingermann, 1999].

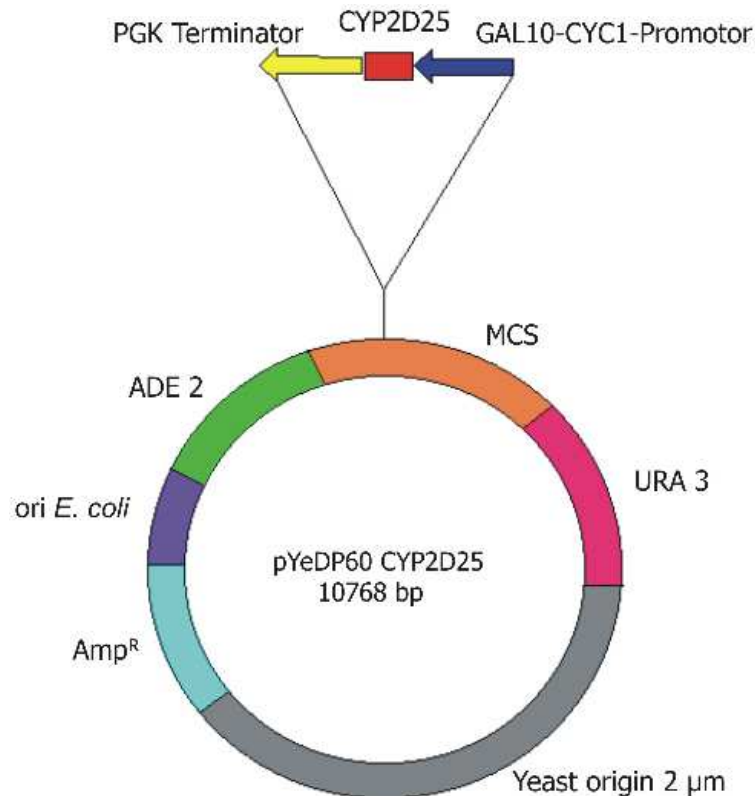


Abb. 2-2 Expressionsvektor pYeDP60 CYP2D25

Amp^R: Ampicillinresistenzgen; ADE 2 und URA 3: Auxotrophiemarker; ori *E. coli*: origin of replication als Initiationspunkt in *E. coli*; yeast origin 2 μm: Replikationsstartpunkt für die Hefe; PGK Terminator: Phosphoglycerat-Kinase Terminator; CYP2D25: klonierte cDNA-Sequenz; GAL10-CYC1 Promotor: galaktoseinduzierbarer Promotor; MCS: multiple cloning site; bp: Basenpaare (modifiziert nach Urban *et al.* [1994]).

Abb. 2-3 zeigt schematisch den groben Ablauf des durchgeführten Klonierungsverfahrens. Zunächst wurde die Ziel-DNA aus dem Schwein isoliert, enzymatisch geschnitten und in den Klonierungsvektor pYeDP60 ligiert. Anschließend wurde dieses DNA-Konstrukt durch Elektroporation in die Hefezelle transformiert. Die transformierten Hefezellen konnten über die Auxotrophie-Marker ADE 2 und URA 3 selektiert und isoliert werden. Durch Zugabe von Galaktose wurde die Expression von CYP2D25 gestartet.

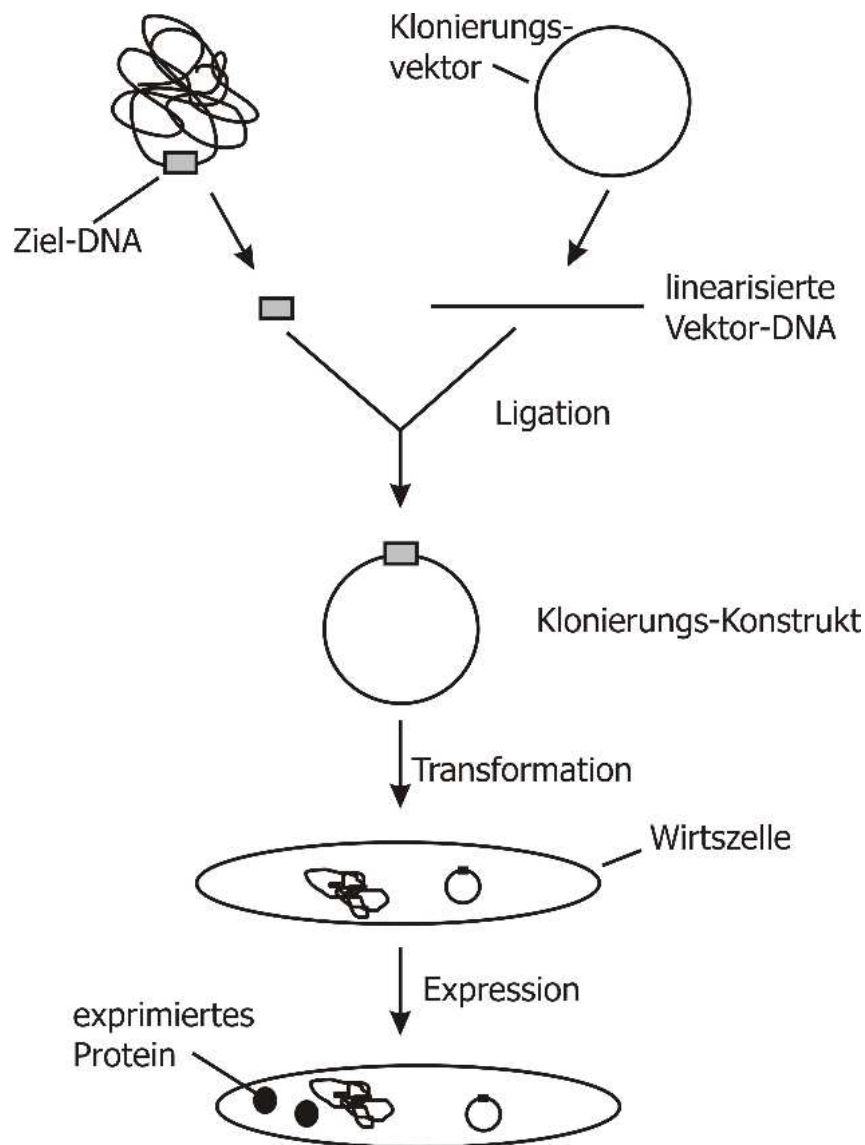


Abb. 2-3 *Schematische Darstellung des Klonierungsverfahrens (modifiziert nach Glick und Pasternak [1995])*

2.1.5 ZIELSETZUNG

Die Benzamidoxim-Reduktase zeigte große strukturelle Ähnlichkeiten mit der Vitamin D₃ 25-Hydroxylase (CYP2D25), auf die in den Kapiteln 3 und 4 noch genauer eingegangen wird. Daher sollte CYP2D25 rekombinant exprimiert werden, um so reines Protein zu erhalten und es in Bezug auf katalytische Eigenschaften mit der Benzamidoxim-Reduktase vergleichen zu können. Dabei sollte zunächst die Aktivität von rekombinantem CYP2D25 aus *Sf9*-Zellen [Berger, 2002] durch Änderung der Hämin-Supplementierung hergestellt werden. Im Verlauf dieser Arbeit sollte auf das

Expressionssystem *Saccharomyces cerevisiae* ausgewichen werden, da für dieses System bereits ein klonierter Vektor zur Verfügung stand. Zur Überprüfung der Vektoren sollte zunächst eine Transformation in *E. coli* durchgeführt werden.

Ziel war es, rekombinantes CYP2D25 zu gewinnen, bei dem die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase nicht coexprimiert war und so für reduktive Umsetzungen eingesetzt werden konnte.

2.2 METHODEN

2.2.1 ARBEITEN MIT DEM EXPRESSIONSSYSTEM BACULOVIRUS/ *Sf9*

2.2.1.1 MATERIALIEN

2.2.1.1.1 Chemikalien und verwendete Materialien

Die Angabe des Ortssitzes beteiligter Lieferfirmen erfolgt nur bei der ersten Nennung. Gewebekulturflaschen Nunclon™ Δ (25 cm², 80 cm² und 175 cm²) (Nunc, Wiesbaden), bovines Häminchlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim), Kulturkolben in Erlenmeyerform (250 ml, 500 ml) mit Metallkappen (Eydam, Kiel), PMSF (Sigma, Taufkirchen), L-Glutamin 200 mM (100x) (Gibco™ Invitrogen GmbH, Karlsruhe), Fötale Kälberserum (Gibco™ Invitrogen GmbH), Gentamicinsulfat-Lösung (Gibco™ Invitrogen GmbH), Serologische Pipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) (Sarstedt, Nümbrecht), TNM-FH-Medium ohne Glutamin (c·c·pro, Neustadt), Schraubröhren mit Spitzboden (15 ml und 50 ml) (Sarstedt), Pluronic F-68 (Gibco™ Invitrogen GmbH), Eisen(III)citrat tribasisch Monohydrat (Fluka, Buchs, Schweiz), Gewebekulturplatten für adhärente Zellen (Sarstedt), GST Expression and Purification Kit (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA), Vitamin B₁₂ (Cyanocobalamin) (Sigma), Natriumchlorid (Sigma), Kaliumdihydrogenphosphat (Fluka), Dinatriumhydrogenphosphat (Fluka), Kaliumchlorid (Fluka), Glycerol (Fluka), DTT (Merck), EDTA (Fluka), bovines Serum Albumin (BSA) (Sigma), NaOH (Fluka), Sterilfilter (Porendurchmesser 0.2 μm) (Sarstedt), Einmalspritzen 10 ml Ecoject® (Witt, Gelnhausen), δ-Aminolävulinsäure (Sigma), Eisen(III)chlorid (Fluka).

2.2.1.1.2 Verwendete Viren

AcNPV-CYP_n E

AcNPV-Bac2/3 F

AcNPV-Bac1/3 IV

[Berger, 2002]

2.2.1.1.3 Verwendeter Stamm

Spodoptera frugiperda: ATCC-Nummer: CRL-1711

2.2.1.1.4 Eingesetzte Vektoren

pVL1393 (Pharmingen): Single Promotor Transfer Vector für *Spodoptera frugiperda*; enthält den Polyhedrin-Genort samt flankierenden Regionen des AcMNPV und MCS vor dem ursprünglichen Startcodon, das in ATT geändert wurde.

pAcG2T (Pharmingen): Transfervektor für das *Sf9*-Expressionssystem; die Proteine werden als GST-Fusionsproteine exprimiert, wobei eine Thrombin-Schnittstelle für die Abspaltung des GST-Restes vorhanden ist.

[Berger, 2002]

2.2.1.2 GERÄTE

Die Angabe des Ortssitzes beteiligter Lieferfirmen erfolgt nur bei der ersten Nennung. Inkubator (Heraeus, Hanau), Spektralphotometer Uvikon 930 (Kontron Tegmenta, Rotkreuz, Schweiz), Sonifier[®] Cell Disruptor B-12 (Branson Sonic Power Company, Danbury, CT, USA), sterile Werkbank Napflow (Napco, VA, USA), Pipettierhelfer accu-jet (Eydam, Kiel), Rotationsschüttler (Infors, Einsbach), Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E mit einem Rotor JA 20 (Beckman, München), Ultrazentrifuge L7-65 mit einem Rotor Ti 45 (Beckman), Zentrifuge Sigma 3K30 mit dem Rotor Nr. 12159 (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz), Zentrifuge Universal 2S (Hettich, Tuttlingen), Wasserbad (Julabo, Seelbach), Schüttelwasserbad (GFL, Burgwedel), Zählkammer (Fuchs-Rosenthal, Faust GmbH, Halle), Mikroskop Olympus CK2 (Olympus, Hamburg).

2.2.1.3 HETEROLOGE EXPRESSION UND MIKROSOMENGEWINNUNG

2.2.1.3.1 Kultivierung der *Sf9*-Zellen

Zur Kultivierung von *Sf9*-Zellen wurde folgendes frisch hergestelltes Medium verwendet:

500 ml	TNM-FH ohne Glutamin
25 ml	FKS
500 µl	Vitamin B ₁₂
50 µg/ml	Gentamicin
10.3 ml	L-Glutamin (200 mM)

Das fötale Kälberserum diente als Quelle für Hormone und Wachstumsfaktoren [Freshney, 1990], während Gentamicin hinzugesetzt wurde, um bakterielles Keimwachstum zu verhindern. Glutamin wurde erst kurz vor Verwendung des Mediums beigefügt, da es sich bei 37°C schnell zersetzt [Morgan und Darling, 1994]. Insektenzellen können als adhärent wachsende Dauerkultur in Kulturflaschen gehalten werden. Auf dem Flaschenboden bildet sich nach Inkubation in einem Brutschrank bei 27°C ein einschichtiger Zellrasen („Monolayer“) aus, der nach spätestens sechs Tagen in frisches Medium überführt werden sollte. Die Zellen wurden dazu durch starkes Abschlagen von dem Kulturflaschenboden gelöst und in einem Splittingverhältnis von 1:4 bis 1:8 in frischem Medium aufgenommen.

2.2.1.3.2 Überführung einer Dauerkultur in eine Schüttelkultur

Um hohe Ausbeuten an Zellen zu erhalten, musste die Dauerkultur in eine Schüttelkultur überführt werden. Dazu wurden die adhärent wachsenden Zellen der Dauerkultur (Flaschengröße 175 cm², 3-4 x 10⁷ Zellen) wie unter 2.2.1.3.1 beschrieben vom Flaschenboden gelöst und in einen 250 ml-Erlenmeyerkolben mit frischem Medium (ad 100 ml) überführt. Zum Schutz vor Stoß- und Scherkräften wurde 0.1 % Pluronic F-68 in die Schüttelkultur gegeben und bei 125 rpm und 27°C für drei Tage inkubiert.

2.2.1.3.3 Gewinnung eines High-Titer-Virusstocks

Zur Herstellung eines High-Titer-Virusstocks wurden 25 ml einer Schüttelkultur (siehe 2.2.1.3.2) in 74 ml frischem Medium (siehe 2.2.1.3.1) mit 0.1 % Pluronic F-68 aufgenommen und für 24 Stunden bei 27°C und 125 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl Virussuspension [Berger, 2002] wurden die Zellen infiziert und sechs weitere Tage bei 27°C und 125 rpm geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei 10000 g für 10 min bei 4°C befanden sich die Viren im Überstand und konnten unter sterilen Bedingungen bei 4°C gelagert werden.

2.2.1.3.4 Infektion von Sf9-Schüttelkulturen und Zellernte

Zur Expression des gewünschten Proteins wurde die Schüttelkultur geteilt und bei 1000 rpm, 27°C für 7 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 5 ml Virusüberstand aufgenommen, in 0.1 % Pluronic F-68 enthaltendes Medium (ad 100 ml) gegeben und bei 27°C und 125 rpm inkubiert. Für die Kontrollzellen wurde das Pellet statt in Viruslösung in Medium aufgenommen und analog inkubiert. Nach 24 h wurde Häminchlorid in einer Konzentration von 4 µg/ml aus einer Stammlösung von 2 mg/ml in 0.4 M NaOH/Ethanol 100 % (1:1) zur Schüttelkultur gegeben und für zwei weitere Tage inkubiert. Die Zellernte erfolgte 72 Stunden *p.i.* durch Zentrifugation bei 4000 rpm, 4°C für 8 min. Das so gewonnene Pellet wurde anschließend zweimal mit PBS-Puffer (1.36 M NaCl, 15 mM KH₂PO₄, 0.2 M Na₂HPO₄, 26.8 mM KCl) gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet mit dem darin exprimierten Protein bei -80°C eingefroren.

2.2.1.3.5 Mikrosomengewinnung aus Sf9-Zellen

Folgender Lysatpuffer wurde für die Mikrosomenherstellung verwendet:

- 0.1 M Natriumphosphatpuffer, pH 7.4
- 20 % Glycerol
- 1 mM DTT
- 1 mM EDTA
- 1 mM PMSF

Die Mikrosomenherstellung erfolgte in Anlehnung an die von Tasaki *et al.* [1998] beschriebene Methode. Das nach 2.2.1.3.4 gewonnene Zellpellet (ca. $3\text{-}5 \times 10^7$ Zellen) wurde in 4 ml Lysatpuffer resuspendiert und sonifiziert (4 Impulsperioden à 20 Sekunden bei 50-60 % Intensität, zwischen den Impulsperioden Pausen von 30 Sekunden auf Eis). Alle Arbeiten wurden unter permanenter Eiskühlung durchgeführt. Das Zellysate wurde bei 9000 g für 20 min bei 4°C zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Durch Zentrifugation des Überstandes bei 100000 g für 60 min bei 4°C wurde ein Mikrosomenpellet erhalten, das in 300 µl Lysatpuffer resuspendiert und bei -80°C eingefroren wurde.

Zur Kontrolle der Expression im SDS-PAGE und Western Blot wurden Proben vom 9000 g-Überstand, 9000 g-Pellet, 100000 g-Überstand und der Mikrosomenfraktion entnommen.

2.2.1.3.6 Aufreinigung des exprimierten Proteins an Glutathion-Agarose

Das durch Infektion mit AcNPV-Bac2/3 in *Sf9*-Zellen rekombinant exprimierte Fusionsprotein verfügt über einen Glutathion-S-Transferase-Anker, der anschließend durch Inkubation des isolierten Proteins mit Thrombin proteolytisch abgespalten werden kann. Dieser GST-Affinitätsrest bietet die Möglichkeit einer Aufreinigung aus dem Zellysate, da das exprimierte Fusionsprotein an die Glutathion-Agarose-Kugeln gebunden wird, während insektenzelleigenes Protein nicht mit der Matrix in Wechselwirkung tritt. Mit dieser Methode wird sehr schnell gereinigtes Protein erhalten, ohne dass Chemikalien oder sonstige Reagenzien verwendet werden, die die biologische Integrität des rekombinanten Proteins stören könnten [Sorscher und Sommerfelt, 1995].

Zur Aufreinigung des Proteins wurde der BaculoGold™ GST Expression and Purification Kit von BD Pharmingen eingesetzt. Die Lösungen waren zum Teil fertig, zum Teil wurden sie aus Lyophilisaten frisch hergestellt. Zur Sedimentation der Glutathion-Agarose-Matrix wurden 200 µl Agarose-Kugeln bei 600 g für 5 min bei RT zentrifugiert. Zur Entfernung des vorhandenen Ethanol wurde die Matrix zweimal mit PBS-Puffer (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄,

pH 7.4) gewaschen und anschließend zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurde die Agarose-Matrix mit klarem Zelllysats befüllt. Zur Gewinnung des Zelllysats wurden verschiedene Methoden benutzt:

Zunächst wurden 2×10^7 Zellen durch Zugabe von 980 μ l Lyse-Puffer (10 mM Tris, pH 7.5, 130 mM NaCl, 1 % TritonTM X-100, 10 mM Natriumfluorid, 10 mM Natriumphosphat) und 20 μ l Protease-Inhibitor (16 μ g/ml Benzamidin-HCl, 10 μ g/ml Phenantrolin, 10 μ g/ml Aprotinin, 10 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Pepstatin A, 1 mM PMSF) auf Eis für 45 min lysiert und bei 40000 g und 4°C für 45 min zentrifugiert. 1000 μ l dieses Lysats wurden auf die vorbereitete Matrix gegeben.

Bei der zweiten Methode sollten die Zellen durch drei Einfrier- und Auftau-Zyklen auf Eis zerstört werden. Es wurde bei 40000 g und 4°C für 45 min zentrifugiert und das Lysat auf die Matrix gegeben.

Als weitere Möglichkeit des Zellaufschlusses wurden die Zellen wie bei der ersten Methode in 980 μ l Lyse-Puffer und 20 μ l Protease-Inhibitor aufgenommen und anschließend dreimal für 10 Sekunden auf Eis sonifiziert. Nach oben angegebener Zentrifugation wurde das Zelllysats auf die Matrix aufgebracht.

Das Zelllysats wurde mit der Agarose-Matrix für 30 min bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend bei 600 g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde die Matrix zweimal mit PBS-Puffer wie oben beschrieben gewaschen. Zur Elution des an die Matrix gebundenen Proteins wurde dreimal mit je 100 μ l GST Elutionspuffer (5 mM Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) 2 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 600 g und 4°C für 5 min wurde der Überstand abgenommen und die drei Fraktionen vereinigt.

Von allen bei dieser Aufreinigung erhaltenen Fraktionen wurde eine Probe von 2×10^5 Zellen entnommen, um die Bindungskapazität der Agarose-Matrix im SDS-PAGE und Western Blot zu überprüfen.

2.2.1.3.7 Variation der Hämin-Supplementierung

Da möglicherweise nicht korrekt inkorporiertes Häm für funktionsuntüchtiges CYP2D25' verantwortlich war [Berger, 2002], wurde die Hämin-Supplementierung variiert. Die Biosynthese des Häms beginnt mit Succinyl-CoA und Glycin auf dem

Shemin-Weg, woraus die δ -Aminolävulinsäure, die wichtigste Vorstufe der Porphyrine, gebildet wird. Im weiteren Verlauf der Häm-Biosynthese reagieren zwei Moleküle δ -Aminolävulinsäure zu Porphobilinogen. Durch Desaminasen und Cosynthasen wird über verschiedene Zwischenprodukte wie Präuroporphyrinogen, Uroporphyrinogen und Protoporphyrin mit anschließender Eisen-Einlagerung Häm gebildet [Karlson *et al.*, 1994].

In der unter 2.2.1.3.4 beschriebenen Methode wurden 4 $\mu\text{g/ml}$ Hämin 24 Stunden *p.i.* in das Kulturmedium gegeben. Im Vergleich dazu wurden ebenfalls 4 $\mu\text{g/ml}$ Hämin dazugegeben, allerdings zeitgleich mit der Infektion.

Da hohe Konzentrationen an Häminchlorid möglicherweise toxisch für *Sf9*-Zellen sein können, wurde die Zugabe von Häminchlorid von 4 $\mu\text{g/ml}$ auf 2 $\mu\text{g/ml}$ gesenkt und wie unter 2.2.1.3.4 verfahren, obgleich ein toxischer Effekt bei Konzentrationen im Bereich von 0.1 bis 5.0 $\mu\text{g/ml}$ nicht beobachtet werden konnte [Lee *et al.*, 1995].

Des Weiteren wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Grogan *et al.* [1995] ein Hämin-Albumin-Komplex hergestellt, da bei Zugabe des Hämins als Komplex höhere Ausbeuten des gewünschten Proteins erzielt werden konnten als bei reiner Hämin-Supplementierung. Dazu wurden 2 mg Hämin in 2 ml einer 0.1 N Natronlauge, die 35 mg/ml Na_2HPO_4 enthielt, gelöst und tropfenweise in 5 ml einer Albuminlösung (43 mg/ml) überführt. Dieser Hämin-Albumin-Komplex wurde sterilfiltriert (Porendurchmesser 0.2 μm) zu der Kultur gegeben.

Um die niedrigen endogenen Hämin-Level in Insektenzellen zu kompensieren, kann entweder wie beschrieben Hämin oder aber auch 0.5 mM δ -Aminolävulinsäure exogen hinzugefügt werden [Paine *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1998], da sie ein Zwischenprodukt bei der Häm-Biosynthese darstellt [Grennan Jones *et al.*, 1996; Guengerich *et al.*, 1997]. Dazu wurde die δ -Aminolävulinsäure in Aqua bidest. in der gewünschten Konzentration gelöst und sterilfiltriert ins Medium gegeben.

In Anlehnung an die Vorschrift von Gillam *et al.* [1995] wurden 0.1 mM δ -Aminolävulinsäure und 0.1 mM Eisen(III)chlorid sterilfiltriert ins Medium gegeben, um das Häm auf diese Weise zu supplementieren. Eine weitere Variation bestand in der Zugabe von sterilfiltrierten 0.1 mM δ -Aminolävulinsäure und 0.1 mM Eisen(III)citrat [Lee *et al.*, 1995]. Die Zufuhr dieser Häm-Vorstufen führte bei Biagini

und Celier [1996] zu höheren Proteingehalten und einem geringeren unspezifischen Absorptionspeak bei 420 nm.

Als Negativkontrolle wurden *Sf9*-Zellen gewonnen, die nicht mit Virus infiziert worden waren, aber die übliche Hämichlorid-Zugabe von 4 µg/ml erhielten.

2.2.2 ARBEITEN MIT DEM EXPRESSIONSSYSTEM *ESCHERICHIA COLI*

2.2.2.1 MATERIALIEN

2.2.2.1.1 Chemikalien und verwendete Materialien

Die Angabe des Ortssitzes beteiligter Lieferfirmen erfolgt nur bei der ersten Nennung. Trypton/Pepton aus Casein (pankreatisch verdaut) (Roth, Karlsruhe), Hefeextrakt (Roth), Natriumchlorid (Roth), Magnesiumchlorid (Merck, Darmstadt), Kaliumchlorid (Merck), Magnesiumsulfat (Merck), Lactose (Roth), Saccharose (Roth), Elektroporationsküvetten (Bio-Rad Laboratories GmbH, München), *HindIII* (QBiogene, Heidelberg), Difco Bacto Agar (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), Ampicillin (Roth), Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht), NucleoSpin Plasmid-Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren), Reaktionsgefäße 1.5 ml und 2.0 ml (Sarstedt), Inkubationspuffer II (für *HindIII*) (QBiogene), Tris (Merck), Borsäure (Roth), EDTA (Roth), Ethidiumbromid (Roth), Agarose (Roth), λ-Marker (MBBL, Molekularbiologisches & Biochemisches Labor Dr. Bartling, Bielefeld), *Escherichia coli*-Stamm XL Blue 1 (Stratagene Europe, Amsterdam, NL).

Alle angegebenen Materialien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in höchster verfügbarer Reinheit bezogen.

2.2.2.1.2 Enzyme

Restriktionsenzym: *HindIII* (10 U/µl)

2.2.2.1.3 Verwendeter Stamm

Escherichia coli-Stamm XL Blue 1: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1
lac [F' pro AB lacI^qΔZM15 Tn10 (Tet^r)]

2.2.2.1.4 Eingesetzte Plasmide

pYeDP60 V60A1 (Negativkontrolle)

pYeDP60 CYP2D25

2.2.2.2 GERÄTE

Die Angabe des Ortssitzes beteiligter Lieferfirmen erfolgt nur bei der ersten Nennung. Schüttelinkubator HT Infors Minitron (Infors AG, Bottmingen, Schweiz), Elektroporationsgerät (Bio-Rad, München), Zentrifuge GS-15R mit dem Rotor F2402H (Beckman, München), Gelsystem TM 11-14 (Bio-Rad), Laminar Air Flow Hera Safe (Heraeus, Kendro Laboratory Products, Langenselbold), Waage Sartorius excellence (Sartorius AG, Göttingen), Rühr- und Heizplatte IKA-Combimag Ret (Janke & Kunkel, Staufen), Feinwaage Sartorius MC 1 (Sartorius AG), Dampfautoklav (Webeco GmbH, Bad Schwartau), pH-Meter (Wiss.- Techn. Werkstätten, Weilheim), Drehteller mit Glasspatel (Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen), Vortexer (Merck, Darmstadt), Brutschrank (Heraeus, Willi Fischer KG, Frankfurt).

2.2.2.3 STERILISATION

Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch entweder in einem Dampfautoklaven für 20 min bei 121°C autoklaviert oder durch einen Filter mit einer Porengröße von 0.2 µm sterilfiltriert. Die verwendeten Gefäße wurden ebenfalls autoklaviert.

2.2.2.4 TRANSFORMATION VON *E. COLI*

Folgendes SOC-Medium (Angaben pro 100 ml) wurde zur Überschichtung von *E. coli*-Zellen benutzt:

2 g	Bacto-Trypton
0.5 g	Hefeextrakt
58 mg	NaCl
203 mg	MgCl ₂
18.8 mg	KCl
246 mg	MgSO ₄
360 mg	Lactose

Für die Selektionsplatten wurde LB-Medium, pH 7.2 (Angaben pro 1 l) mit Ampicillin mit folgender Zusammensetzung verwendet:

10 g	Bacto-Trypton
5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl
20 g	Agar
2 ml	Ampicillin (20 mg/ml)

Als Vorbereitung auf die Elektroporation wurden 40 µl elektrokompetenter *E. coli*-Zellen mit jeweils 0.5 µl ligierter DNA (CYP2D25 bzw. V60A1) gemischt und 30 Sekunden auf Eis inkubiert. Nach Überführen dieses Gemisches in gekühlte Elektroporationsküvetten wurde die Elektroporation mit einer Spannung von 2.5 kV, einer Kondensatorkapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ohm durchgeführt. Die Zellen wurden sofort mit 1 ml SOC-Medium zur Regeneration überschichtet und für 10 min bei RT inkubiert. Je 100 µl dieser Lösungen wurden auf Selektionsplatten aufgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden von beiden Transformanten-Arten einzelne Kolonien von den Selektionsplatten entnommen und jeweils in 2.5 ml LB-Medium mit 6.25 µl einer Ampicillin-Stammlösung (20 mg/ml) über Nacht auf dem Schüttler bei 230 rpm und 37°C inkubiert.

2.2.2.5 DNA-ISOLIERUNG AUS *E. COLI*

Für die DNA-Isolierung wurde das NucleoSpin Plasmid-Kit verwendet und nach folgendem Protokoll gearbeitet. Zunächst wurden 2 ml der das gewünschte Plasmid enthaltenden Kultur (siehe 2.2.2.4) bei 14000 rpm und RT für 1 min zentrifugiert. Das trockene Pellet wurde in 250 µl Resuspensionspuffer A1 aufgenommen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 250 µl Lysepuffer A2 zur alkalischen Lyse der Zellen. Zur Fällung der Proteine wurden 250 µl Neutralisationspuffer A3 hinzugegeben und bei 14000 rpm und RT für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Säule pipettiert, an deren Säulenmaterial die DNA gebunden werden konnte. Zur Entfernung der Pufferreste wurden 600 µl Waschpuffer A4 auf die Säule gegeben und jeweils bei 14000 rpm und RT für 1 min bzw. danach erneut für 2 min zentrifugiert. Die DNA konnte durch Zugabe von 60 µl Elutionspuffer AE und einminütiger Inkubation bei RT durch eine Zentrifugation bei 14000 rpm und RT für 1 min eluiert werden.

2.2.2.6 RESTRIKTIONSHYDROLYSE DER AUS *E. COLI* ISOLIERTEN DNA

Zur Überprüfung der aus Schweden stammenden Vektoren pYeDP60 V60A1 und pYeDP60 CYP2D25 wurde die aus *E. coli* isolierte DNA der beiden Vektoren (siehe 2.2.2.5) mit dem Restriktionsenzym *Hind*III geschnitten. Dazu wurden 14 µl Aqua bidest. zusammen mit 3 µl Inkubationspuffer II, 3 µl der nach 2.2.2.5 isolierten DNA und 1 µl *Hind*III bei 37°C für 1 Stunde inkubiert.

2.2.2.7 KONTROLLE DER RESTRIKTIONSHYDROLYSE MITTELS GELELEKTROPHORESE

Zur Herstellung des Agarose-Geles sowie zur Flutung der Elektrophoresekammer wurde ein TBE-Puffer (10 x), pH 8.3 mit folgender Zusammensetzung verwendet:

1 M	Tris-HCl
1 M	Borsäure
20 mM	EDTA

Vor dem Gebrauch wurde der TBE-Puffer (10x) 1:10 mit Aqua dem. verdünnt.

Zur Probenvorbereitung wurde folgender Gel-Ladepuffer verwendet:

- 40 % Saccharose
- 50 mM EDTA
- 0.001 % Bromphenolblau

Für das Gel wurden 1 g Agarose mit 100 ml TBE-Puffer (1x) vermischt und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung erhitzt. Nach Abkühlen auf ca. 70°C wurden 10 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel gegossen. Nach Festwerden des Geles und Flutung der Elektrophoresekammer konnten die Taschen des Geles befüllt werden.

Bei der Probenvorbereitung des Markers wurden 2 µl λ-Marker mit 8 µl Aqua bidest. und 2 µl Gel-Ladepuffer vermischt, während zu den nach 2.2.2.6 inkubierten Proben lediglich 2 µl Gel-Ladepuffer hinzugegeben wurde. Die Gelelektrophorese wurde für 2 Stunden bei 100 V durchgeführt.

2.2.3 ARBEITEN MIT DEM EXPRESSIONSSYSTEM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

2.2.3.1 MATERIALIEN

2.2.3.1.1 Chemikalien und verwendete Materialien

Die Angabe des Ortssitzes beteiligter Lieferfirmen erfolgt nur bei der ersten Nennung. Primer KM1 und KM2 (MWG, Ebersberg), D(+)-Glukose Monohydrat für die Mikrobiologie (Merck, Darmstadt), Yeast nitrogen base without amino acids (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), GSA-Becher (Beckman, München), Lithiumacetat (Sigma, Taufkirchen), DTT (Qbiogene, Heidelberg), D-Sorbitol (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg), SS34-Becher (Beckman), Bacto Casamino Acids (Difco), Wasser für die Molekularbiologie, DEPC-behandelt (Roth, Karlsruhe), 100 bp DNA-Marker (MBBL, Bielefeld), Incubation Mix T. Pol + MgCl₂ (10x) (Qbiogene), dNTPs Mix (5 mM) (Qbiogene), *Taq* DNA Polymerase (5 U/µl) (Qbiogene), L-Lysin (Sigma-Aldrich, Steinheim), L-Histidin (Sigma), L-Leucin (Sigma), Adenin (Sigma), Uracil (Sigma), Tryptophan (Sigma), MOPS (Roth), PMSF (Sigma), Glycerol (Roth),

KCl (Merck), MES (Biomol, Hamburg), Sterilfilter Porengröße 0.2 µm (Eydam), Einmalspritzen 5 ml und 20 ml Norm-Ject (Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen), Quantazyme ylgTM aus *Oerskovia xanthineolytica* (Qbiogene), Cytohelicase aus *Helix pomatia* (Sigma), Zymolyase-20T aus *Arthrobacter luteus* 20000 U/gm (ICN Biomedicals, Inc., Aurora, OH, USA), Glasperlen ungewaschen (Durchmesser 425-600 µm) (Sigma), PEG 4000 (Merck), NaCl, D(+)-Galaktose für biochemische Zwecke (Merck), Petrischalen 92 x 16 mm mit Nocken (Sarstedt, Nümbrecht), Tris Ultra Qualität (Roth), Mikroschraubröhren 1.5 ml (Sarstedt), Desinfektionsmittel für Flächen Meliseptol (B. Braun AG, Melsungen), Sterillium für die Hände (Bode Chemie, Hamburg), Baktolin-Waschlotion (Bode Chemie), Küvetten 10 x 4 x 45 mm (Sarstedt), Röhre 50 ml, 114 x 28 mm (Sarstedt), Ethanol Rotipuran[®] (Roth), LiCl (Fluka), 1.5 ml und 2.0 ml Reagiergefäße (Sarstedt).

Hier nicht aufgeführte Materialien sind bereits unter 2.2.2.1.1 beschrieben. Alle angegebenen Materialien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in höchster verfügbarer Reinheit bezogen.

2.2.3.1.2 Verwendete Stämme

S 150: a, his 3, leu 2-3, leu 2-12, ura 3-52

PSY 142: wt, ura 3, leu 2, lys + CIT 2-lac Z Reportergen

W(N): α, ade 2-1, his 3-11, -15, leu 2-3, -112, trp 1, ura 3-1, can^R, cyr⁺

2.2.3.1.3 Eingesetzte Plasmide

pYeDP60 V60A1 (Negativkontrolle) mit 9265 bp

pYeDP60 CYP2D25 mit 10768 bp

CYP2D25-Sequenz-Größe: 1503 bp

2.2.3.1.4 Verwendete Primer

Oligo	Start in CYP2D25-Sequenz	Länge [bp]	T _M [°C]	gc [%]	Sequenz
Linker Primer: KM1	508	20	59.4	55	5'-gcaagaagtcggttgaggag-3'
Rechter Primer: KM2	914	20	55.3	45	5'-tttcatttcgtccaggaagg-3'

Produktgröße: 407 bp

2.2.3.2 GERÄTE

Die Angabe des Ortssitzes beteiligter Lieferfirmen erfolgt nur bei der ersten Nennung. Beckman Coulter Avanti™ J-20XP Zentrifuge mit den Rotoren JLA 16250 und JLA 2550 (Beckman, München), Zentrifuge GS-15R (Beckman), Wasserbad (GFL, Burgwedel), Minicycler™ MJ Research bzw. PTC-100™ (MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA), Thermoblock^{TB1} (Biometra, Göttingen), Thomazählkammer (Fuchs-Rosenthal, Faust GmbH, Halle), Zweistrahlphotometer Uvicon 930 (Kontron, Neufahrn), DOUNCE Gewebehomogenisator (VWR, Darmstadt), Beckman Coulter Allegra™ 2IR centrifuge mit den Rotoren C0650 und F2402H (Beckman), Erlenmeyerkolber 250 ml, 500 ml, 1000 ml (Schott, Mainz), Messzylinder aus Plastik (Kartell, Noviglio, Italien), Reference®-Pipetten 10 µl, 20 µl, 1000 µl, 3000 µl (Eppendorf, Hamburg), Inkubator (Mettler, Schwabach), Kamera Typ VarioCam (Phase, Lübeck), Transilluminator (Phase), Mikrowelle (Severin, Sundern), Elektroporationsgerät (Bio-Rad, München), BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg), Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht).

Hier nicht aufgeführte Geräte sind bereits unter 2.2.2.2 beschrieben.

2.2.3.3 TRANSFORMATION VON S 150

Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch entweder autoklaviert (20 min, 121°C) oder sterilfiltriert. Die verwendeten Gefäße wurden ebenfalls autoklaviert.

Für die Vor- und Hauptkultur wurde YPD-Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet:

1 %	Hefeextrakt
2 %	Pepton
2 %	Glukose

Für die Selektionsplatten wurde YNBD-Medium, pH 5.5 (Angaben pro 100 ml) mit den entsprechenden Aminosäuren in folgender Zusammensetzung verwendet:

0.67 g	Yeast nitrogen base without amino acids
2 g	Glukose
2 g	Agar
20 mg	Histidin
20 mg	Leucin

Zur Herstellung der Vorkultur wurden 50 ml YPD-Medium in sterilisierten 250 ml Kolben vorgelegt und mit 2-4 Kolonien des Hefestammes S150 angeimpft und für 24 Stunden bei 30°C und 250 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Um die Hauptkultur zu erhalten, wurde die gesamte Vorkultur in 300 ml YPD-Medium überführt und 3 Stunden bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C für 10 min wurde das Pellet in 15 ml Aqua bidest. resuspendiert und mit 10 ml 10x TE-Puffer (100 mM Tris-Base, 10 mM EDTA, pH 7.5) vermischt. Nach Zugabe von 10 ml 1 M LiAc-Lösung, pH 7.5 wurde für 45 min bei 30°C und 100 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2.5 ml 1 M DTT. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 30°C und 100 rpm wurden alle nachfolgenden Schritte auf Eis durchgeführt. Die Kultur wurde dann ad 500 ml mit kaltem Aqua bidest. aufgefüllt und bei 5000 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut mit 250 ml Aqua bidest. gewaschen und unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Nachdem das Pellet in 30 ml kaltem 1 M Sorbitol

resuspendiert worden war, erfolgte erneut eine Zentrifugation. Abschließend wurde das Pellet in 0.5 ml kaltem 1 M Sorbitol aufgenommen.

50 µl dieser elektrokompenten Zellen wurden mit jeweils 100 ng DNA (siehe 2.2.2.5) gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde unter denselben Bedingungen, wie unter 2.2.2.4 beschrieben, durchgeführt und die Zellen anschließend sofort mit 1 ml kaltem 1 M Sorbitol überschichtet. Als Negativkontrolle wurde statt DNA Aqua bidest. verwendet. 100 µl dieser drei Zell-Chargen (CYP2D25, V60A1 und Wasserkontrolle) wurden auf die Selektionsplatten mit YNBD-Medium und den entsprechenden Aminosäuren aufgebracht und 4-6 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.3.4 TRANSFORMATION VON PSY 142

Bereits vorhandene kompetente Zellen des Hefestammes PSY 142 wurden wie unter 2.2.2.4 und 2.2.3.3 beschrieben nach Zugabe der DNA bzw. Aqua bidest. für die Negativkontrolle elektroporiert und sofort mit 1 ml 1 M Sorbitol überschichtet. Je 100 µl dieser Zellen wurden auf YNBD-Selektionsagar ausplattiert, der speziell für PSY 142 geeignet war. Aufgrund der zu S 150 verschiedenen Auxotrophie-Marker setzte sich das YNBD-Medium, pH 5.5 (Angaben pro 100 ml) folgendermaßen zusammen:

0.67 g	Yeast nitrogen base without amino acids
2 g	Glukose
2 g	Agar
40 mg	Lysin
20 mg	Leucin

2.2.3.5 KULTIVIERUNG DES HEFESTAMMES W(N)

Zur Kultivierung des Hefestammes W(N) wurde YNBD-Medium, pH 5.5 (Angaben pro 250 ml) mit folgender Zusammensetzung verwendet:

1.675 g	Yeast nitrogen base without amino acids
5 g	Glukose
5 g	Agar
50 mg	Leucin
50 mg	Histidin
100 mg	Tryptophan
25 mg	Uracil
50 mg	Adenin

Die Aminosäuren wurden erst nach dem Autoklavieren sterilfiltriert ins Medium gegeben.

100 µl des Hefestammes W(N) wurden auf YNBD-Agar ausplattiert und anschließend bei 29°C für 4-6 Tage inkubiert.

2.2.3.6 TRANSFORMATION VON W(N)

Elektrokompetente Zellen von W(N) wurden nach der unter 2.2.3.3 beschriebenen Methode erhalten. Für die Elektroporation wurden je 50 µl Zellen mit 100 ng DNA (CYP2D25 bzw. V60A1) bzw. Aqua bidest. als Negativkontrolle gemischt. Die Elektroporation wurde mit einer Spannung von 1.5 kV, einer Kondensatorkapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ohm (4.2-4.9 msec Puls) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml kaltem 1 M Sorbitol überschichtet. Je 100 µl dieser Zellen wurden auf YNBD-Selektionsagar, pH 5.5 ausplattiert, der sich in Anpassung an die Auxotrophie-Marker dieses Hefestammes folgendermaßen zusammensetzte (Angaben pro 250 ml):

1.675 g	Yeast nitrogen base without amino acids
5 g	Glukose
5 g	Agar
50 mg	Leucin
50 mg	Histidin
100 mg	Tryptophan
50 mg	Adenin

Danach erfolgte eine Inkubation dieser Platten bei 29°C für 4-6 Tage.

2.2.3.7 PRIMERKONTROLLE MITTELS PCR

Zur Überprüfung der gelieferten Primer wurde eine PCR nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

10x PCR-Puffer + MgCl ₂	5 µl
dNTP Mix	0.5 µl
Primer KM1 (5 pmol/µl)	1 µl
Primer KM2 (5 pmol/µl)	1 µl
<i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl)	0.2 µl
DNA (CYP2D25, V60A1 bzw. H ₂ O)	1 µl
Aqua bidest.	ad 50 µl

Die als Lyophilisate gelieferten Primer wurden zuvor durch Zugabe von Aqua bidest. auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt und vor der PCR nochmals 1:20 verdünnt.

Die nach 2.2.2.5 isolierte DNA wurde vor der Verwendung 1:1000 mit doppelt autoklaviertem Aqua bidest. verdünnt.

Das PCR-Programm gliederte sich folgendermaßen:

1. Denaturierung der DNA bei 94°C für 2 min
2. 25 Zyklen mit folgenden Schritten:
 - Denaturierung bei 94°C für 30 Sekunden
 - Annealing bei 55°C für 30 Sekunden
 - Extension bei 72°C für 1 min (beim letzten Zyklus 5 min)
3. Hold bei 10°C

Die so erhaltenen Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Das Gel setzte sich aus 0.3 g Agarose, 30 ml TBE (1x) und 1 µl Ethidiumbromid zusammen (siehe 2.2.2.7). Für die Vorbereitung des Markers wurden 2 µl eines 100 bp DNA-Markers mit 1 µl Gel-Ladepuffer (siehe 2.2.2.7) und 8 µl Aqua bidest. versetzt. Die Wasserkontrolle setzte sich aus 10 µl PCR-Produkt (Aqua bidest.) und 1 µl Gel-Ladepuffer zusammen, während die Proben 10 µl PCR-Produkt (CYP2D25

bzw. V60A1) und 1 µl Gel-Ladepuffer enthielten. Die Gelelektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt.

2.2.3.8 ÜBERPRÜFUNG DER TRANSFORMANTEN MITTELS PCR

Die auf dem Selektionsagar gewachsenen Transformanten wurden dahingehend untersucht, ob sie bei Verwendung von pYeDP60 CYP2D25 über das entsprechende Insert verfügten oder im Falle von pYeDP60 V60A1 erwartungsgemäß nicht. Dazu wurden verschiedene Kolonien der beiden Transformanten-Chargen zur Hälfte mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und jeweils in 100 µl Aqua bidest. resuspendiert. Nach 5-minütigem Kochen bei 95°C im Heizblock wurde 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert und 5 µl des Überstandes für die PCR eingesetzt.

Folgendes Pipettierschema wurde verwendet:

10x PCR-Puffer + MgCl ₂	5 µl
dNTP Mix	0.5 µl
Primer KM1 (5 pmol/µl)	1 µl
Primer KM2 (5 pmol/µl)	1 µl
<i>Taq</i> Polymerase (5 U/µl)	0.2 µl
DNA (CYP2D25, V60A1 bzw. H ₂ O)	5 µl
Aqua bidest.	ad 50 µl

Das PCR-Programm gliederte sich in folgende Schritte:

1. Denaturierung der DNA bei 94°C für 2 min
2. 39 Zyklen mit folgenden Schritten:
 - Denaturierung bei 94°C für 1 min
 - Annealing bei 55°C für 1 min
 - Extension bei 72°C für 30 Sekunden (beim letzten Zyklus 5 min)
3. Hold bei 10°C

Die so erhaltenen Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht (siehe 2.2.3.7).

Die andere Hälfte der jeweils überprüften und geeigneten Transformanten wurde auf frischen Selektionsagarplatten mit YNBD-Medium (+ Leu, Ade, Trp, His), pH 5.5

(siehe 2.2.3.6) mit einer ausgeglühten Impföse ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 29°C für 4-6 Tage.

2.2.3.9 EXPRESSION VON CYP2D25 IN W(N)

Zur Expression wurden Medien mit folgender Zusammensetzung verwendet:

SGI-Medium (500 ml):

0.5 g Casamino acids
3.5 g Yeast Nitrogen base w/o amino acids
10 g Glukose
10 mg Tryptophan

YPGE-Medium (1l):

10 g Yeast extract
10 g Bacto Pepton
5 g Glukose
2 % Ethanol ⇒ Zugabe erfolgte nach dem Autoklavieren

SLI-Medium (500 ml):

0.5 g Casamino acids
3.5 g Yeast Nitrogen base w/o amino acids
10 g Galaktose
10 mg Tryptophan

Für die Expression von CYP2D25 wurde eine ausgestrichene Kolonie mit einer Fläche von 2 x 2 cm der gewünschten Transformante in 17.5 ml SGI-Medium mit der ausgeglühten Impföse abgestreift und für 24 Stunden bei 250 rpm und 28°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach einer OD₆₀₀-Bestimmung, deren Wert bei ca. 7 liegen sollte, wurden zur Vorkultur 222.5 ml YPGE-Medium gegeben und für 24 Stunden bei 250 rpm und 28°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneuter OD₆₀₀-Bestimmung, deren Wert nun zwischen 10 und 13 liegen sollte, wurde die Expression durch

Überführen der Hauptkultur in SLI-Medium induziert. Dazu wurden die Zellen zunächst bei 7000 rpm und 20°C für 4 min zentrifugiert. Nach Waschen des Pellets mit Aqua bidest. und erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in SLI-Medium resuspendiert. Nach 16-stündiger Inkubation bei 250 rpm und 28°C auf dem Schüttler sollte eine OD₆₀₀ von 30-40 erreicht werden.

Als Negativkontrollen wurden sowohl pYeDP60 V60A1 enthaltende Transformanten als auch Kolonien des gentechnisch unveränderten Hefestammes W(N) eingesetzt.

2.2.3.10 MIKROSOMENGEWINNUNG AUS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

2.2.3.10.1 Enzymatischer Zell-Aufschluss mit einem zellwandlysierenden Enzym (Quantazyme ylgTM)

Die Mikrosomenherstellung wurde in Anlehnung an die Vorschriften von Urban *et al.* [1994] und Cullin und Pompon [1988] durchgeführt. Dazu wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

TEK-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4

2 mM EDTA

0.1 M KCl

TES-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4

2 mM EDTA

0.6 M Sorbitol

TEG-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4

1 mM EDTA

20 % Glycerol

TEKD-Puffer

0.1 M Tris-HCl, pH 8
5 mM EDTA
0.1 M KCl
5 mM DTT

MES-Puffer

20 mM MES, pH 6 ⇒ mit Trisbase eingestellt
1.5 M Sorbitol

MOPS-Puffer

20 mM MOPS, pH 7 ⇒ mit Trisbase eingestellt
0.6 M Sorbitol
1 mM PMSF

Protease-Inhibitor-Lösung

1 Tablette Protease-Inhibitor in 50 ml TES-Puffer

Nach Zentrifugation der Zellkultur bei 7000 rpm und 4°C für 4 min wurde das Pellet mit 30 ml Aqua bidest. gewaschen und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Nach Resuspendieren des Pellets in 30 ml TEK-Puffer, wurde für 5 min bei RT inkubiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet (8.5 g) wurde in 2.5 ml Protease-Inhibitor-Lösung aufgenommen, bevor 40 ml TEK-D-Puffer hinzugegeben wurden und für 10 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Kultur geteilt und das Pellet in 20 ml MES-Puffer resuspendiert. 1×10^{10} Zellen wurden mit 1000 U eines zellwandlyisierenden Enzyms (Quantazyme ylgTM) versetzt und die Spheroplasten-Bildung durch Absorptionsänderung bei 600 nm gemessen. Es folgte eine Zentrifugation der Spheroplasten und das Waschen des Pellets in MES-Puffer. Die Zelllyse wurde in 3 ml MOPS-Puffer durch Sonifizierung (3 x 30 sec, 60 W) durchgeführt. Das Lysat wurde zunächst 5 min bei 1100 g, dann 20 min bei 14000 g zentrifugiert. CaCl₂ wurde in einer Endkonzentration von 18 mM zu dem Überstand gegeben und für 15 min auf Eis

inkubiert. Die Mikrosomen wurden durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 14000 g geerntet und in TEG-Puffer resuspendiert.

2.2.3.10.2 Enzymatischer Zell-Aufschluss mit Zymolyase und Cytohelicase

Die Mikrosomenherstellung wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Pompon *et al.* [1996] durchgeführt. Dazu wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

TEK-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4
1 mM EDTA
0.1 M KCl

TES-Puffer A

50 mM Tris-HCl, pH 7.4
1 mM EDTA
1.5 M Sorbitol

TES-Puffer B

50 mM Tris-HCl, pH 7.4
1 mM EDTA
0.6 M Sorbitol

TEG-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4
1 mM EDTA
20 % Glycerol

TSG-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4
0.6 M Sorbitol
20 % Glycerol
1 mM EDTA

TMS-Puffer

20 mM MES, pH 6.3 ⇒ mit Trisbase eingestellt
1.5 M Sorbitol
2 mM EDTA

TEM-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4
1 mM EDTA
71 mM 2-Mercaptoethanol

Nach Bestimmung der Zellzahl mit einer Thomazählkammer wurden 5×10^9 Zellen durch eine Zentrifugation bei 7000 rpm und 4°C für 4 min geerntet. Nach Waschen des Pellets mit 30 ml Wasser und erneuter Zentrifugation, wurden die Zellen in 25 ml TEK-Puffer aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in TEM-Puffer aufgenommen, sodass eine Zelldichte von $2-3 \times 10^8$ Zellen/ml erreicht wurde und für 5-10 min bei RT inkubiert. 15 mg Cytohelicase und 5 mg Zymolyase wurden zunächst in 5 ml TMS gelöst und zu dem in 3 ml TMS resuspendierten Pellet gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 28°C und 130 rpm auf dem Schüttler. Alle 10 min wurde ein 10 µl-Aliquot dieser Zellsuspension entnommen, um die Absorptionsänderung bei 600 nm zu verfolgen. Nach max. 40-minütiger Inkubationszeit wurden die Spheroplasten durch eine Zentrifugation bei 7000 rpm und 4°C für 4 min geerntet. Da die Spheroplasten sehr labil sind, wurden alle nachfolgenden Schritte auf Eis durchgeführt. Nachdem die Spheroplasten mit 30 ml TES A gewaschen und bei 7000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert wurden, erfolgte die Spheroplasten-Lyse durch Resuspendieren in 10 ml TES B und anschließendem Vortexen für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit. Nach Sonifizierung (3 x 30 sec bei 60 W) wurden die Zellen für 5 min auf Eis gestellt und für 4 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Im Pellet befanden sich nucleäre Fraktionen und intakte Zellen. Der Überstand wurde erneut bei 9500 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert, um intakte Mitochondrien abzutrennen. Zum Überstand wurde CaCl_2 bis zu einer Endkonzentration von 17 mM hinzugefügt und für 15 min auf Eis

inkubiert. Nach einer abschließenden Zentrifugation bei 9500 rpm und 4°C für 10 min konnte das Mikrosomenpellet in ca. 1 ml TEG resuspendiert werden.

Alternativ dazu wurden die Mikrosomen auch in Anlehnung an die Vorschrift von Hosseinpour *et al.* [2001] gewonnen. Nach der Sonifizierung erfolgte die Mikrosomengewinnung durch differentielle Zentrifugation. Nach einer Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C für 20 min wurde der Überstand erneut bei 42000 rpm und 4°C für 60 min zentrifugiert und das Pellet in TEG-Puffer aufgenommen.

2.2.3.10.3 Mechanischer Zell-Aufschluss mit der Glasperlenmethode

Für diese Art der Mikrosomengewinnung wurden in Anlehnung an die Vorschrift von Pompon *et al.* [1996] folgende Puffer verwendet:

TEK-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4

1 mM EDTA

0.1 M KCl

TES-Puffer B

50 mM Tris-HCl, pH 7.4

1 mM EDTA

0.6 M Sorbitol

TEG-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4

1 mM EDTA

20 % Glycerol

Protease-Inhibitor-Lösung

1 Tablette Protease-Inhibitor in 50 ml TES B-Puffer

Diese Methode ist für eine Hefekultur mit einer Zelldichte von $2-5 \times 10^8$ Zellen ausgelegt. Zunächst wurden die Zellen durch eine Zentrifugation bei 7000 rpm und

4°C für 4 min geerntet. Nach Waschen des Pellets mit 30 ml Wasser und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 30 ml TEK-Puffer aufgenommen und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 2.5 ml Protease-Inhibitor-Lösung wurden Glaskugeln mit einem Durchmesser von 425-600 µm in der Menge hinzugefügt, dass der obere Rand der Flüssigkeit auf gleicher Höhe mit den Glaskugeln war. Für 9 min wurde die Zellsuspension mit der Hand geschüttelt, wobei die Suspension jeweils nach 3 min für 5 min auf Eis gekühlt wurde. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgezogen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, damit anschließend die Glasperlen durch Zugabe von 5 ml TES B-Puffer von adhärentem Protein gereinigt werden konnten. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und alle Fraktionen gepoolt. Es folgte eine Zentrifugation bei 15000 rpm und 4°C für 15 min, um intakte Zellen, Zellkerne und zerstörte Mitochondrien abzutrennen. Der Überstand wurde 1:1 mit TES B-Puffer verdünnt, um eine Kontamination durch cytolösliche Proteine möglichst gering zu halten. Das Protein wurde in einer 15-minütigen Inkubation auf Eis durch Zugabe von NaCl in einer Endkonzentration von 0.15 M und PEG 4000 in einer Endkonzentration von 0.1 g/ml gefällt. Die Mikrosomen wurden durch eine Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C für 10 min gewonnen. Das Pellet wurde in 2 ml TEG-Puffer resuspendiert und aliquotiert. Bei Fällung des Proteins mit Polyethylenglykol bleibt die biologische Aktivität des Proteins zwar erhalten, jedoch fällt PEG aus verdünnten Lösungen meist nur unvollständig [England und Seifert, 1990].

Deshalb wurden alternativ dazu die Mikrosomen in Anlehnung an die Vorschrift von Hosseinpour *et al.* [2001] hergestellt. Nachdem die Zellen durch die Glasperlen zerstört und die Glasperlen mit TES B-Puffer gereinigt worden waren, erfolgte eine Zentrifugation bei 20000 g und 4°C für 10 min. Nach 1:1-Verdünnung des Überstandes mit TES B-Puffer wurde abschließend bei 100000 g und 4°C für 60 min zentrifugiert. Das die Mikrosomen enthaltende Pellet wurde mithilfe eines Gewebehomogenisators in 2 ml TEG-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 mM EDTA, 20 % Glycerol) resuspendiert.

2.2.3.11 OD₆₀₀-BESTIMMUNG

Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde die Absorption von in Aqua bidest. hergestellten 1:10- bzw. 1:100-Verdünnungen der Zellsuspensionen bei 600 nm am Photometer bestimmt.

2.2.4 BIOCHEMISCHE METHODEN

2.2.4.1 MATERIALIEN

Die Angabe des Ortssitzes beteiligter Lieferfirmen erfolgt nur bei der ersten Nennung. Glycin (Merck, Darmstadt), Natriumdodecylsulfat (SDS) (Merck), Acrylamid (Serva, Heidelberg), APOD (Serva), Bisacrylamid (Serva), Bromphenolblau (Serva), *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Serva), Coomassie Brilliant Blue R 250 (Roth, Karlsruhe), β -Mercaptoethanol (Roth), Molekulargewichtsstandard Prestained Protein Marker (6-175 kDa) (New England Biolabs, Beverly, MA, USA), BM Chromogenic Western Blotting Kit[®] (AP, Mouse/Rabbit) (Roche, Mannheim), Ponceau S (Sigma, Taufkirchen), Tween[®] 20 (Sigma), Nitrocellulose-Membran Protan BA 85 (Schleicher & Schüll MicroScience GmbH, Dassel), Blotting Papier GB 002 200 x 200 mm (Schleicher & Schüll), Maleinsäure (Merck), DEPC (Sigma), Phenol (Roth), Lithiumchlorid (Fluka, Buchs, Schweiz), Chloroform (Roth), Isoamylalkohol (Roth), Ethanol Rotipuran[®] (Roth), Ammoniumacetat (Merck), Formaldehyd (Roth), Formamid (Roth), Nylonmembran (Gene Screen NEN[™] Life Science Products, Boston, MA, USA), Whatmanpapier (VWR, Darmstadt), DECAprimell[™] Kit (Ambion, Austin), Natriumacetat (Merck), Ficoll 40 (Boehringer, Mannheim), Polyvinylpyrrolidon (Boehringer).

Hier nicht aufgeführte Materialien sind bereits unter 2.2.2.1.1 und 2.2.3.1.1 beschrieben. Alle angegebenen Materialien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in höchster verfügbarer Reinheit bezogen.

2.2.4.2 GERÄTE

Die Angabe des Ortssitzes beteiligter Lieferfirmen erfolgt nur bei der ersten Nennung. Blotting-Apparatur für Western Blots (Fröbel-Laborgeräte, Lindau), vertikale Gelelektrophoresekammer Modell 2001 mit Zubehör (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), Stromversorger Macrodrive 2301 (Pharmacia), Gelrockner 2003 mit Zubehör (LKB, Bromma, Schweden), Kälteumwältzthermostat F 20 (Julabo, Seelbach), 50 µl Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz), Taumelschüttler BEAX (Heidolph, Kelheim), Vortexer VF2 (Janke & Kunkel, Staufen), Wasserbad (Julabo), Stratalinker (Stratagene Europe, Amsterdam, NL), Speed Vack Univapo 100 H (MS Laborgeräte, Heidelberg).

Hier nicht aufgeführte Geräte sind bereits unter 2.2.2.2 und 2.2.3.2 beschrieben.

2.2.4.3 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurde in Anlehnung an die von Laemmli [1970] beschriebene Methode durchgeführt. Es wurden zur Analyse von Proteinen und Molekulargewichtsbestimmungen 7.5 %ige bzw. 10 %ige Gele verwendet.

2.2.4.3.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Sammelgelpuffer	0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 0.4 % (w/v) SDS
Trenngelpuffer	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 0.4 % (w/v) SDS
Probenauftragspuffer	2.5 ml Trenngelpuffer 0.2 g SDS 1 ml Glycerol 500 µl β-Mercaptoethanol 200 µl einer 0.05 %igen (w/v) Stammlösung von Bromphenolblau ad 10 ml Aqua bidest

EXPRESSION VON CYP2D25

Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung	30 % (w/v) Acrylamid 0.8 % (w/v) Bisacrylamid
Elektrodenpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8.3 0.1 % (w/v) SDS 195 mM Glycin
APOD-Stammlösung	20 % (w/v) APOD
Coomassie-Färbelösung	2 % (w/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

2.2.4.3.2 Zusammensetzung der Gele

Lösungen/Puffer	Trenngel 7.5 %	Trenngel 10 %	Sammelgel 3.6 %
Sammelpuffer	-	-	5 ml
Trenngelpuffer	14 ml	14 ml	-
Acrylamid-Lösung	7 ml	9.3 ml	1.2 ml
Aqua bidest.	6.9 ml	4.6 ml	3.7 ml
TEMED	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml
APOD	0.1 ml	0.1 ml	0.03 ml

Die Herstellung der Gele erfolgte in einer für die Gelelektrophorese üblichen Apparatur. Parallel wurden zwei Gele gegossen, wovon das eine im Anschluss an die elektrophoretische Trennung mit Coomassie gefärbt wurde. Das andere Gel wurde für eine Antikörperreaktion im Western Blot (siehe 2.2.4.4) verwendet.

2.2.4.3.3 Probenvorbereitung und Probenauftrag

Für die Probenvorbereitung der Insektenzellen wurden 500000 Zellen in 100 µl Probenauftragspuffer aufgenommen, wobei 10 µl dieses Gemisches auf das Gel aufgetragen wurden. Den Hefemikrosomen wurde so viel Probenauftragspuffer

zugegeben, dass 50 µg Protein auf das Gel aufgetragen werden konnten. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 100°C denaturiert. Nach Aufkochen des Markers wurden 8 µl aufgetragen.

2.2.4.3.4 Durchführung der Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung der Proteingemische wurde über Plattengele (Dicke 1.5 mm) in einer vertikalen Kammer durchgeführt. Als Molekulargewichtsstandard diente ein Gemisch definierter Proteine in einem Bereich von 6-175 kDa. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 50 mA gestartet und nach 30 min auf 100 mA erhöht. Nach einer Laufstrecke von 6 cm im Trenngel wurde die Gelelektrophorese beendet.

2.2.4.3.5 Färben und Entfärben des Geles

Das Trenngel wurde im Anschluss an die Elektrophorese auf einem Schüttler für 2 Stunden in der Färbelösung inkubiert. Nach Waschen des Geles mit Aqua dem. wurde es für 1 Stunde in Entfärbelösung auf den Schüttler gelegt. Nach erneutem Waschen mit Aqua dem. wurde das Gel über Nacht in frischer Entfärbelösung entfärbt.

2.2.4.4 WESTERN BLOT

Durch den Western Blot können elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (siehe 2.2.4.3) im elektrischen Feld mit dem „semi-dry“-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und anschließend immunochemisch nachgewiesen werden.

2.2.4.4.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Transferpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8.3
	114 mM Glycin
	10 % (v/v) Methanol

TBS-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7.5 150 mM NaCl
TBST-Puffer	0.075 % (v/v) Tween [®] 20 in TBS-Puffer
Ponceau S-Lösung	0.1 % (w/v) Ponceau S 5 % (v/v) Essigsäure
Maleinsäure-Puffer	100 mM Maleinsäure, pH 7.5 150 mM NaCl
Blocking-Reagenz	Blocking-Reagenz aus dem BM Chromogenic Western Blotting Kit [®] 1:10 mit Maleinsäure-Puffer verdünnt
1. Antikörper (MAK 4D12)	1:1 mit Blocking-Reagenz verdünnt
2. Antikörper	Anti-mouse Ig G/ anti-rabbit Ig G , gekoppelt an alkalische Phosphatase aus dem BM Chromogenic Western Blotting Kit [®] 1:300 mit Blocking-Reagenz verdünnt

2.2.4.4.2 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung erfolgte wie unter 2.2.4.3.3 beschrieben.

2.2.4.4.3 Durchführung des Western Blots und Detektion

Vor Durchführung des Western Blots wurde die Nitrocellulose-Membran für 1 Stunde in Aqua bidest. gelegt, während das Blottingpapier in Transferpuffer getränkt wurde. Der luftblasenfreie Aufbau zwischen den beiden Elektroden in der Blotting-Apparatur wurde folgendermaßen durchgeführt: sechs Lagen Blottingpapier, Nitrocellulose-Membran, Trenngel, drei Lagen Blottingpapier. Bei einer konstanten Stromstärke von 90-100 mA erfolgte der Proteintransfer für 45 min, wobei die Spannung von anfänglich 4 V auf maximal 14 V anstieg. Zur Überprüfung des vollständigen Proteintransfers wurde die Membran für 5 min in Ponceau S-Lösung gelegt und anschließend durch ausgiebiges Spülen mit Aqua dem. wieder entfärbt. Diese Färbung war reversibel und vertrug sich mit der anschließenden Immunfärbung. Nach einer 30-minütigen Inkubation mit Blocking Reagenz auf dem Schüttler zur

Blockade der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte für den immunochemischen Nachweis die Zugabe des 1. Antikörpers 4D12 (siehe 2.2.5) für 1 Stunde bei RT auf dem Schüttler. Nach 6 x 5-minütigem Waschen der Membran mit TBST-Puffer folgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper für 1 Stunde bei RT auf dem Schüttler. Nach erneutem Waschen der Membran mit TBST-Puffer für 6 x 5 min wurden die Proteinbanden, die mit dem MAK 4D12 reagierten, durch Zugabe des Substrates NBT/X-Phosphat nach ca. 15 min violett angefärbt.

2.2.4.5 GESAMT-RNA-ISOLIERUNG AUS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* UND NORTHERN BLOT

Zur Überprüfung der Bildung eines Transkriptes in der Hefe nach Induktion mit Galaktose wurde eine Gesamt-RNA-Isolierung mit anschließendem Northern Blot und radioaktiver Markierung durchgeführt.

2.2.4.5.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Lösungen und Materialien wurden vor Gebrauch zweifach autoklaviert.

Folgende Puffer und Lösungen wurden für die Gesamt-RNA-Isolierung eingesetzt:

DEPC-Wasser	100 ml Aqua bidest. mit 100 µl DEPC
RNA-Lysepuffer	0.2 M Natriumborat 30 mM EDTA 1 % (w/v) SDS
MOPS-Puffer (10x)	0.2 M MOPS, pH 7.0 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA
4 M LiCl in DEPC-Wasser	
8 M Ammoniumacetat in DEPC-Wasser	
Denhardt's (50x)	5 g Ficoll 40 5 g Polyvinylpyrrolidon 5 g BSA in 500 ml Aqua bidest.

SSPE-Puffer (20x)	3.6 M NaCl, pH 7.4 0.02 M EDTA 0.2 M Natriumphosphat
Nicht autoklaviert wurden:	
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Mischung der drei Reagenzien im Verhältnis 25:24:1
Chloroform-Isoamylalkohol	Mischung der beiden Reagenzien im Verhältnis 24:1

2.2.4.5.2 Durchführung der Gesamt-RNA-Isolierung und Detektion

Für die Gesamt-RNA-Isolierung wurden Hefekulturen wie unter 2.2.3.9 beschrieben angezchtet und induziert. Zum Vergleich wurde bei einigen Kulturen keine Galaktose hinzugegeben. Nach der Zellernte und der Zerstörung der Zellwände mit Glasperlen (siehe 2.2.3.10.3) wurden die Zelltrümmer mit 2 ml kochendem RNA-Lysepuffer und 60°C heißem Phenol gemischt und bei 5500 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde insgesamt dreimal phenolisiert. Zum Überstand wurden 2 ml Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min. Der Überstand wurde mit 2 ml Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und zentrifugiert. Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 1/10-Volumen Ammoniumacetat-Lösung und 2 Volumina Ethanol absolutus gefällt und für mind. 20 min bei -80°C gelagert. Nach einer Zentrifugation bei 5500 rpm und 4°C für 15 min wurde das Pellet mit 3 ml 70 %igem Ethanol überschichtet, vorsichtig geschüttelt und zentrifugiert. Nachdem das Pellet in 5 ml DEPC-Wasser gelöst worden war, erfolgte die Zugabe von 5 ml LiCl-Lösung und eine Lagerung bei 4°C über Nacht. Nach einer Zentrifugation wurde das Pellet mit 2 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 150 µl DEPC-Wasser resuspendiert und der Nukleinsäure-Gehalt am Photometer bestimmt.

Zur Kontrolle der RNA-Isolierung wurde ein 1 %iges Agarose-Gel unter Zugabe von 10 % MOPS-Puffer (10x) und 16 % filtriertem Formaldehyd gegossen. Für die Probenvorbereitung wurden jeweils 30 µg aufgearbeitete RNA mit 12.5 µl Formamid,

4.2 µl Formaldehyd und 1.2 µl MOPS-Puffer (10x) gemischt und zum Auflösen der Sekundärstrukturen für 10 min bei 65°C erhitzt. Nach 5 min auf Eis wurden die Proben mit 2 µl Gel-Ladepuffer vermischt und auf das mit MOPS-Puffer (1x) geflutete Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt. Zur Detektion wurde das Gel für 20 min in Ethidiumbromid-Lösung angefärbt und anschließend für 2 Stunden in Wasser entfärbt und fotografiert.

2.2.4.6 NORTHERN BLOT

Zur Vorbereitung des Northern Blots wurde Whatmanpapier in Gelgröße in SSPE-Puffer (20x) getränkt. Folgender luftblasenfreier Aufbau ergab sich in der Blotting-Apparatur: zwei Lagen Whatmanpapier, RNA-Gel, Nylonmembran, zwei Lagen Whatmanpapier, Filterpapierstapel. Über Nacht wurde so die RNA auf die Nylonmembran übertragen. Anschließend wurde die Membran direkt auf zwei Lagen mit SSPE-Puffer (2x) angefeuchtetem Whatmanpapier gelegt und im Stratalinker mit UV-Licht (1200 µJ x 100) bestrahlt, wodurch die RNA kovalent gebunden wurde. Im Anschluss daran wurde die Membran im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet.

2.2.4.7 HYBRIDISIERUNG MIT DECAPRIME-MARKIERUNG

Zum Nachweis membrangebundener RNA dienen radioaktiv markierte Nukleinsäure-Sonden.

2.2.4.7.1 Verwendete Puffer und Lösungen

Hybridisierungspuffer, pH 7.5	37.5 ml Formamid
	18.75 ml SSPE-Puffer (20x)
	3.75 ml 20 %iges SDS
	7.5 ml Denhardt's (50x)
	7.5 ml Aqua bidest.
Waschpuffer	250 ml SSPE-Puffer (5x)
	10 ml 20 %iges SDS
	740 ml Aqua bidest.

TE-Puffer (10x), pH 7.5

100 mM Tris-Base

10 mM EDTA

2.2.4.7.2 Durchführung

Die getrocknete Membran wurde in einer Hybridisierungsflasche im Wärmeschrank bei 37°C für 2-3 Stunden in 50 ml Hybridisierungspuffer vorinkubiert. Währenddessen wurde eine mit TE-Puffer befüllte Sephadex-Säule angefertigt. Die radioaktive Markierung erfolgte unter Verwendung eines DECAprimell™ Kits, wofür 100 ng linearisierte DNA, die nach der unter 2.2.2.5 beschriebenen Methode aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert worden war, mit 2.5 µl Decamer-Lösung (10x) vermischt und 5 min bei 100°C gekocht wurde. Nach Gefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen erfolgte die Zugabe von 5 µl Reaktionspuffer (5x), 3.5 µl Aqua bidest., 3 µl [α ³²P]-dCTP und 1 µl Exonuklease-freiem Klenow-Fragment. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 37°C erfolgte die Zugabe von 60 µl Dextranblau-Lösung. Diese Sonde wurde anschließend über die Sephadex-Säule gereinigt und das blaue Eluat bei 100°C für 10 min aufgeköcht. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde die radioaktiv markierte Sonde auf die Membran gegeben und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Mit vorgewärmtem Waschpuffer wurde die Membran für 10 min bei 55°C inkubiert, während die zweite Waschung bei 65°C für 10 min stattfand. Die Membran wurde getrocknet und mit Klarsichtfolie umwickelt in eine Expositionskassette mit einem Röntgenfilm gelegt. Nach Exponieren bei -80°C für 2 Tage wurde der Röntgenfilm in der Dunkelkammer entwickelt.

2.2.5 VERWENDUNG EINES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS

Für den immunochemischen Nachweis beim Western Blot (siehe 2.2.4.4) wurde ein monoklonaler Antikörper (MAK) eingesetzt, der von durch Fusion von B-Lymphozyten und Myelomzellen entstandenen Hybridomzellen produziert wurde. Es konnten nach der Immunisierung einer Balb/c-Maus mit einer aus der Schweineleber gereinigten Fraktion der Benzamidoxim-Reduktase verschiedene antikörperproduzierende

Hybridomaklone isoliert werden, wobei für die Studien der Klon 4D12 ausgewählt wurde, da dieser die Benzamidoxim-Reduktase spezifisch detektierte [Berger, 2002]. Der MAK wurde freundlicherweise von K. Berger für die Western Blot-Analysen zur Verfügung gestellt.

Auch die Spezifität des MAK wurde mittels SDS-PAGE und parallel bearbeitetem Western Blot überprüft. Dazu wurden jeweils 100 µg rekombinanter P450-Enzyme (CYP2C19, CYP2A6, CYP2E1, CYP2D6, CYP27A1 und CYP3A4) auf das Gel aufgetragen. Die rekombinanten Enzyme CYP2C19, CYP2A6, CYP2E1, CYP2D6 und CYP3A4 wurden von der Firma Gentest Cooperation, Woburn, MA, USA/BD Biosciences, Heidelberg bezogen. CYP27A1 wurde freundlicherweise von I. Pikuleva, Nashville, TN, USA zur Verfügung gestellt.

2.3 ERGEBNISSE

2.3.1 EXPRESSION VON CYP2D25' IN Sf9-ZELLEN

In allen drei CYP2D25'-Varianten, bei denen es sich zum einen um das Gesamtprotein ohne Modifikation, zum anderen um das Gesamtprotein mit GST-Fusion bzw. um das im N-terminalen Bereich um 28 AS verkürzte Protein mit GST-Anker handelte (siehe 2.1.3.2), lagen fünf Nukleotidaustausche gegenüber der CYP2D25-Originalsequenz [Postlind *et al.*, 1997] vor, die auch alle eine Änderung der Aminosäuresequenz zur Folge hatten. Aus diesem Grund wurde die veränderte Sequenz als CYP2D25' bezeichnet. Prüfungen der Struktur-Funktionalitäts-Beziehungen ergaben, dass die fünf Aminosäureaustausche weder in einer der sechs möglichen Substrat-Erkennungs-Regionen von CYP2-Enzymen [Gotoh, 1992], noch in der stark konservierten Häm- bzw. Sauerstoff-Bindungsstelle von Cytochrom P450-Enzymen [Koymans *et al.*, 1993] lagen. Daher wurde beschlossen, keine Korrektur der fünf veränderten Nukleotide vorzunehmen und mit dieser leicht veränderten CYP2D25'-Sequenz weiterzuarbeiten [Berger, 2002]. Aufgrund der Änderungen in der Primärstruktur waren die CYP2D25'-Varianten wahrscheinlich nicht in der Lage, das Häm korrekt zu inkorporieren, wodurch die enzymatische Aktivität verloren ging. Aus diesem Grund wurde statt Hämin u.a. δ -Aminolävulinsäure hinzugesetzt, in der Hoffnung, dass die Zellen durch eine eigene Häm-Biosynthese enzymatisch aktives Enzym produzierten.

2.3.1.1 AUFREINIGUNG DES EXPRIMIERTEN CYP2D25' AN GLUTATHION-AGAROSE

An den nach der Expression geernteten Sf9-Zellen wurden verschiedene Zell-Aufschluss-Methoden (siehe 2.2.1.3.6) getestet, da nur das rekombinant exprimierte Protein lysierter Zellen an der Glutathion-Matrix durch eine Affinitätschromatographie aufgereinigt werden kann. Weder die alleinige Zugabe von Lysepuffer, noch die Auftau- und Einfrier-Zyklen führten zu einer Zerstörung der Zellwände. Erst durch die nach Zugabe von Lysepuffer erfolgte Sonifizierung konnten die Zellen lysiert werden.

Die Aufreinigung an der Glutathion-Agarose fand nach der unter 2.2.1.3.6 beschriebenen Methode statt. Anhand des Western Blots mit den während der Reinigung entnommenen Proben konnte festgestellt werden, dass zwar einerseits geringe Mengen Protein in der letzten Fraktion eluiert werden konnten, andererseits aber die Bindungskapazität der Matrix so gering war, dass von Anfang an nur wenig Protein gebunden wurde. Der größte Teil des aufgetragenen Proteins wurde bereits ungebunden durch den ersten Zentrifugationsschritt abgetrennt.

2.3.1.2 VARIIERTE HÄMIN-SUPPLEMENTIERUNG

Die Zusätze von δ -Aminolävulinsäure, u.a. in Kombination mit Eisen(III)chlorid und Eisen(III)citrat sowie einem Hämin-Albumin-Komplex im Vergleich zu der zuvor verwendeten direkten Hämin-Zugabe, sollten zum gewünschten korrekten Häm-Einbau führen. Wie aus Abb. 2-4 ersichtlich wird, wurde bei allen Hämin-Varianten Protein gebildet, das durch den immunochemischen Nachweis mit dem monoklonalen Antikörper 4D12 (siehe 2.2.5) nachgewiesen werden konnte.

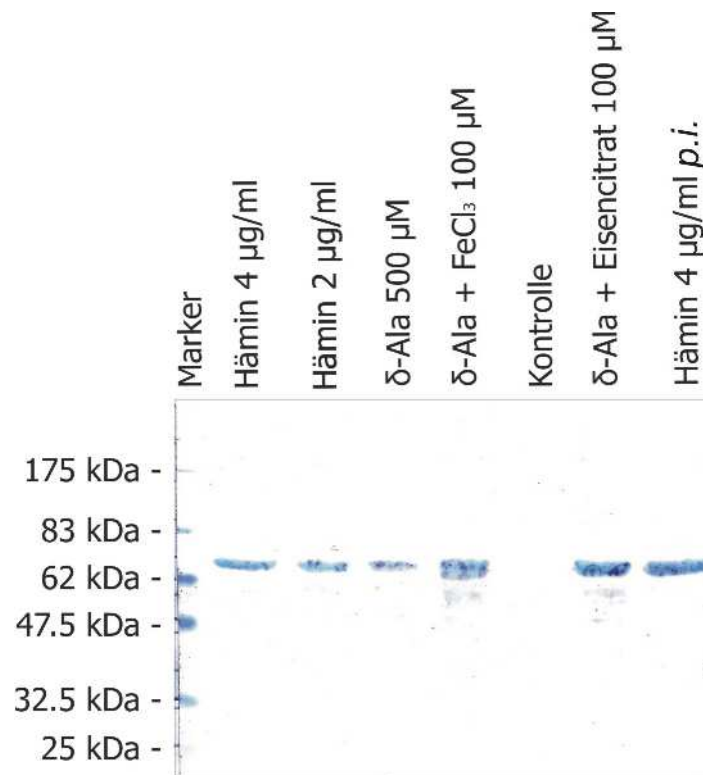


Abb. 2-4 Western Blot-Analyse von AcNPV/Bac1/3-infizierten Sf9-Zellen

Bei allen Variationen der Hämin-Supplementierung konnte Protein gebildet werden, das der MAK erkannte. Bei der Kontrolle handelte es sich um nicht infizierte Sf9-Zellen.

2.3.1.3 BESTIMMUNG DES CYTOCHROM P450-GEHALTS

Die Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts wurde nach der unter 3.2.2.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Dabei wurden von allen Mikrosomenfraktionen, die durch den Zusatz verschiedener Hämin-Supplementierungen in AcNPV/Bac1/3-infizierten Sf9-Zellen gewonnen wurden, CO-Differenzspektren aufgenommen, von denen zwei repräsentativ in den Abb. 2-5 und Abb. 2-6 gezeigt werden. Beide Zellfraktionen zeigen ein Maximum bei 420 nm, während das erwartete Maximum bei 450 nm nicht zu detektieren war.

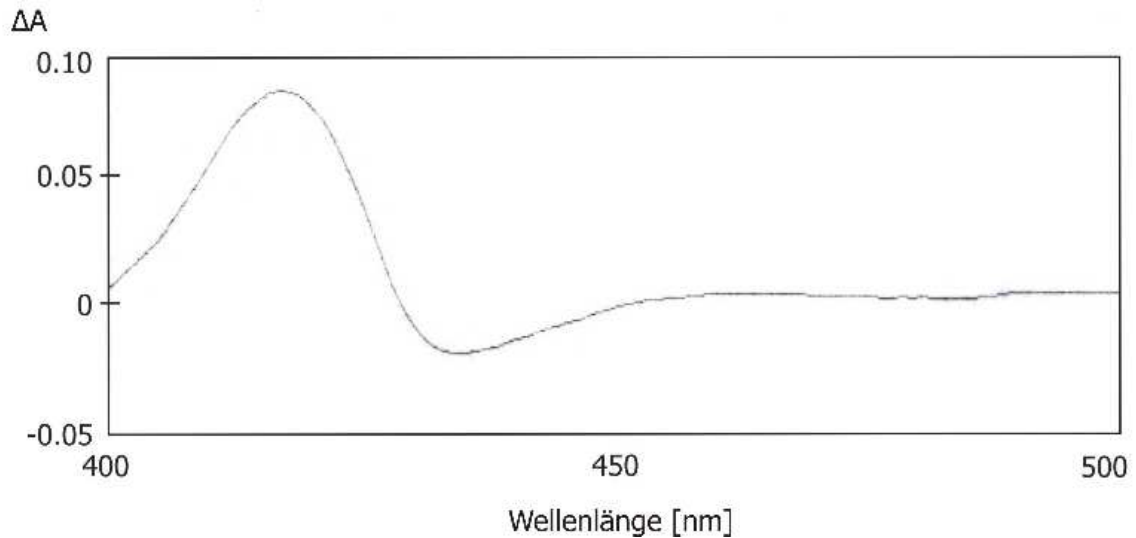


Abb. 2-5 *P450-Spektrum von AcNPV/Bac1/3-infizierten Sf9-Zellen nach Hämin-Zugabe*

Die Hämin-Zugabe in einer Konzentration von 4 $\mu\text{g/ml}$ erfolgte 24 Stunden nach der Infektion.

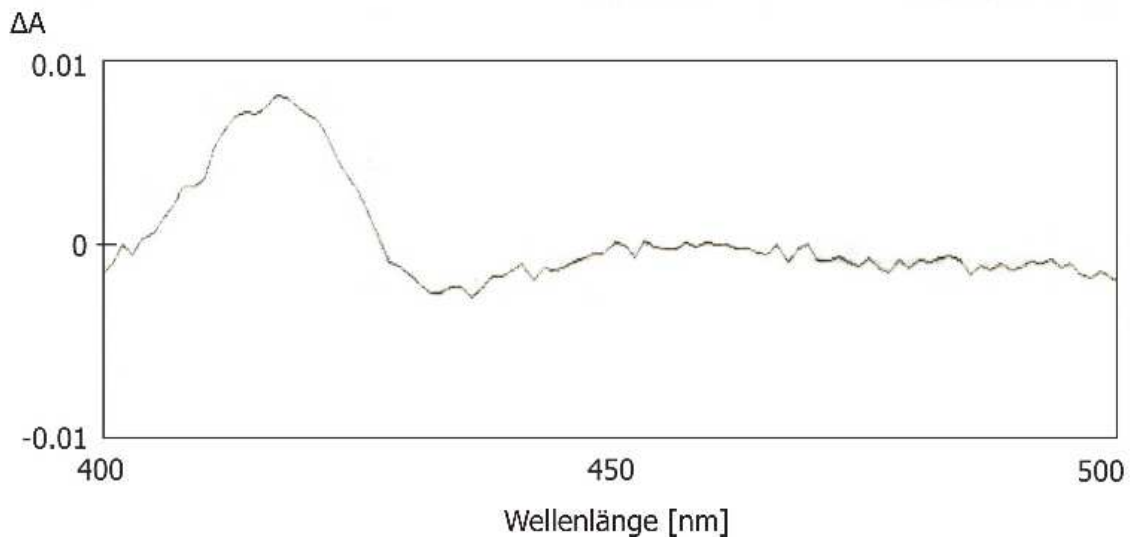


Abb. 2-6 *P450-Spektrum von AcNPV/Bac1/3-infizierten Sf9-Zellen nach Zugabe von δ -Aminolävulinsäure in Kombination mit Eisen(III)citrat*

δ -ALA und Eisen(III)citrat wurden jeweils in einer Konzentration von 0,1 mM 24 Stunden *p.i.* sterilfiltriert zu der Sf9-Kultur gegeben.

2.3.2 TRANSFORMATION IN *E. COLI*

Zur Kontrolle der beiden aus Schweden zugesandten Plasmide, die für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* erhalten wurden, erfolgte zunächst eine Transformation in *E. coli*. Dabei wurde die *in vitro* neu kombinierte DNA passiv, d.h. auf physikalischem Wege durch Elektroporation in die Zelle eingeschleust. Diese Transformation diente der Überprüfung der Resistenzmarker, Antibiotika-Resistenzen, Restriktionsstellen und Größe der Vektoren.

2.3.2.1 DNA-MENGENBESTIMMUNG

Die aus *E. coli* aufgereinigte DNA (siehe 2.2.2.5) aus pYeDP60 CYP2D25 wies einen DNA-Gehalt von 627.2 µg/ml auf, während die aus pYeDP60 V60A1 isolierte DNA einen Gehalt von 621.3 µg/ml besaß.

2.3.2.2 GRÖßENVERGLEICH BEIDER PLASMIDE

Zum Vergleich der unterschiedlichen Plasmidgrößen wurde mit der aus *E. coli* isolierten DNA eine Restriktionshydrolyse mit *HindIII* (siehe 2.2.2.6) und anschließender Gelelektrophorese (siehe 2.2.2.7) durchgeführt. Die Restriktionsendonuklease schneidet den Vektor pYeDP60 CYP2D25 fünfmal, während der Vektor pYeDP60 V60A1 nur viermal geschnitten wird, da sich eine Schnittstelle innerhalb der eingefügten CYP2D25-Sequenz befindet, die in diesem Vektor nicht vorhanden ist (siehe Abb. 2-7).

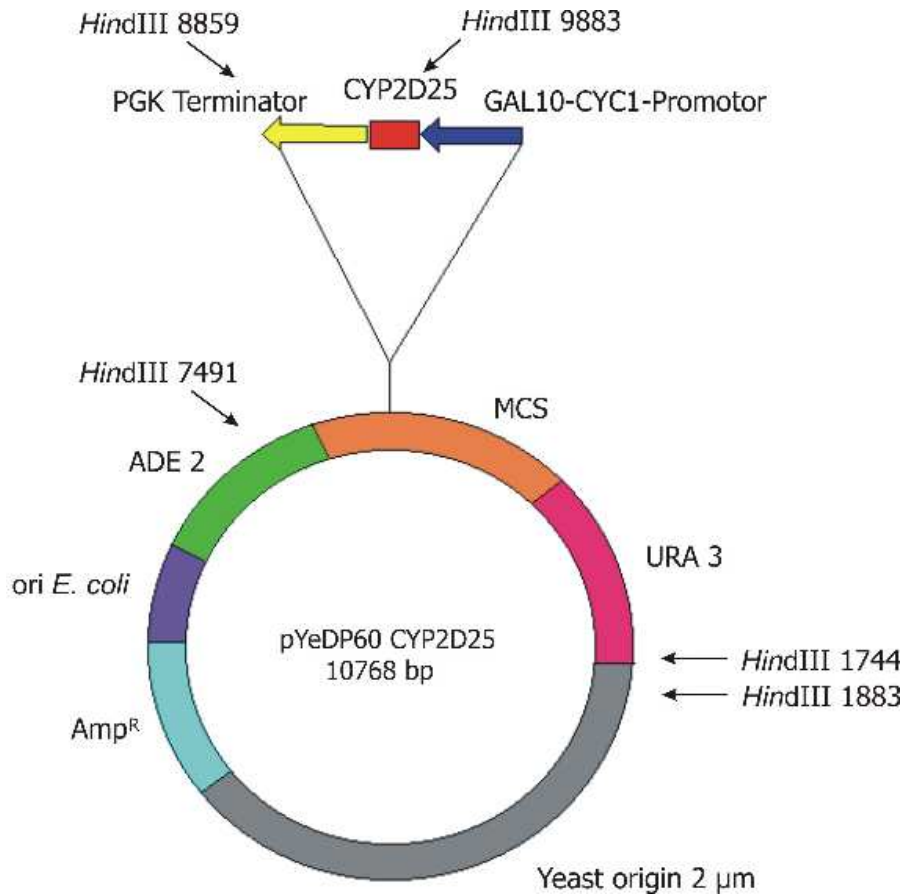


Abb. 2-7 HindIII-Schnittstellen in pYeDP60 CYP2D25

Die Zahlen hinter dem Restriktionsenzym kennzeichnen die Schnittstelle im Vektor durch *HindIII*. Amp^R: Ampicillinresistenzgen; ADE 2 und URA 3: Auxotrophiemarker; ori *E. coli*: origin of replication als Initiationspunkt in *E. coli*; yeast origin 2 μm: Replikationsstartpunkt für die Hefe; PGK Terminator: Phosphoglycerat-Kinase Terminator; CYP2D25: klonierte cDNA-Sequenz; GAL10-CYC1 Promotor: galaktoseinduzierbarer Promotor; MCS: multiple cloning site; bp: Basenpaare (modifiziert nach Urban *et al.* [1994]).

Durch diese Restriktionshydrolyse entstanden bei pYeDP60 CYP2D25 Fragmente mit einer Größe von 5608 bp, 2629 bp, 1368 bp, 1024 bp und 139 bp, während pYeDP60 V60A1 Fragmentgrößen von 5608 bp, 2150 bp, 1368 bp und 139 bp aufwies. Somit war eine Unterscheidung der beiden Vektoren durch eine sich der Restriktionshydrolyse anschließende Gelelektrophorese möglich. Abb. 2-8 zeigt ein Foto der nach der Restriktionshydrolyse durchgeführten Gelelektrophorese. Die Fragmente 1, 3 und 5 sind in beiden Vektoren identisch, während bei Fragment 2 in pYeDP60 erwartungsgemäß ein kleineres Fragment als bei pYeDP60 CYP2D25 entstanden ist. Die Banden 3 und 4 konnten bei pYeDP60 CYP2D25 im Gel nicht

ausreichend getrennt werden, da sie sich in ihrer Fragmentgröße nur wenig unterscheiden.

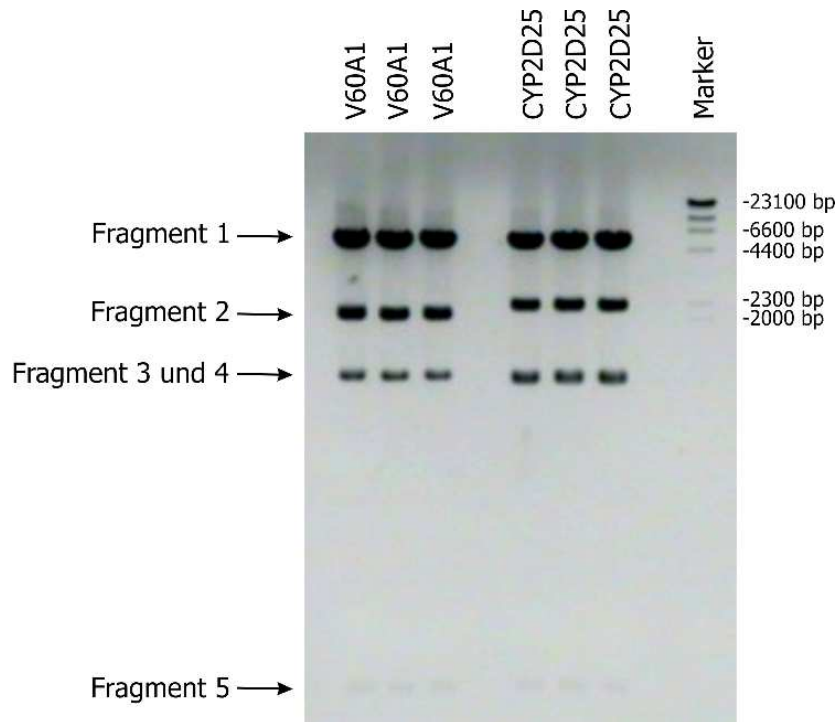


Abb. 2-8 Foto der nach der Restriktionshydrolyse mit HindIII durchgeführten Gelelektrophorese

Die ersten drei Bahnen mit V60A1 1-3 zeigen den geschnittenen Vektor ohne klonierte CYP2D25-Sequenz, während auf den Bahnen mit pYeDP60 CYP2D25 4-6 der geschnittene Vektor mit Insert zu sehen ist. Fragment 1 = 5608 bp; Fragment 2 = 2150 bp (pYeDP60 V60A1) bzw. 2629 bp (pYeDP60 CYP2D25); Fragment 3 = 1368 bp; Fragment 4 = 1024 bp (pYeDP60 CYP2D25); Fragment 5 = 139 bp.

2.3.2.3 PRIMERKONTROLLE

Abb. 2-9 zeigt einen Ausschnitt der cDNA- und Aminosäuresequenz von CYP2D25 [Postlind *et al.*, 1997] sowie die Bindungsstellen der verwendeten Primer KM1 und KM2. Die von den Primern eingeschlossene Produktgröße betrug 407 bp.

```

301 ACCTCCGACCGCCACCTGTGTTTCATCTTAGAGCACCTGGGTTACGGGCGCGCTCCGAAGGAGTGATCCTGGCG 375
101 T S D R P P V F I L E H L G Y G P R S E G V I L A 125
                                     KM1
376 CGCTACGGGAAAGCGTGGCGCGAGCAGCGGCGCTTCTCGGTGTCCACCTTGCGCAACTTTGGCCTGGGCAAGAAG 450
126 R Y G K A W R E Q R R F S V S T L R N F G L G K K 150
    KM1
451 TCGTTGAGGAGTGGGTGACCCAAGAGGCCTCGTGCCTTTGTGCCGCTTCGCCGACCAGGCTGGACGCCCTTT 525
151 S L E E W V T Q E A S C L C A A F A D Q A G R P F 175
526 AGCCCTAACAACTTCTGAATAAAGCGGTGAGCAACGTGATCGCCTCCCTCACCTTCGCGCGCCGCTTCGAGTAC 600
176 S P N N L L N K A V S N V I A S L T F A R R F E Y 200
601 AACGACCTCGCATGTCTAAGCTTCTGGACCTAGTGTGGAAGGACTGAAGGAGGAAGTGGCCCTCATGCCCCAG 675
201 N D P R M L K L L D L V L E G L K E E V G L M R Q 225
676 GTGCTGGAAGCAATGCCGTTTCTCAGGCATATCCCGGGGCTGTGTGCCAAGCTCTTCCCAAGGCAGAAGGCCTTC 750
226 V L E A M P V L R H I P G L C A K L F P R Q K A F 250
751 TTGGTCATGATAGATGAGCTGATCACAGAGCACAAGATGACCCGGGACCTGGCCCAGCCCCCGGAGACTTGACG 825
251 L V M I D E L I T E H K M T R D L A Q P P R D L T 275
    KM2
826 GATGCCTTCTGGACGAAATGAAAGAGGCCAAGGGGAACCCCGAGAGCAGCTTCAATGATGAGAACCTCCGCCTG 900
276 D A F L D E M K E A K G N P E S S F N D E N L R L 300
901 GTGGTGGCTCACCTGTCTCCGCTGGGATGATCACCACCTCGACCACGCTGGCCTGGGCTCTCCTCCTCATGATC 975
301 V V A H L F S A G M I T T S T T L A W A L L L M I 325

```

Abb. 2-9 Bindungsstellen der beiden Primer in der cDNA- und Aminosäuresequenz von CYP2D25

Dargestellt ist ein Ausschnitt der cDNA- und Aminosäuresequenz von CYP2D25, um die Bindungsstellen von KM1 und KM2 zu verdeutlichen.

Aus Abb. 2-10 wird ersichtlich, dass die Primer nur an der aus pYeDP60 CYP2D25 isolierten DNA binden konnten. Wurde hingegen pYeDP60 V60A1 als Matrize eingesetzt, zeigten die Primer keine Bindung. Die von den Primern eingeschlossene Produktgröße lag erwartungsgemäß bei 407 bp.

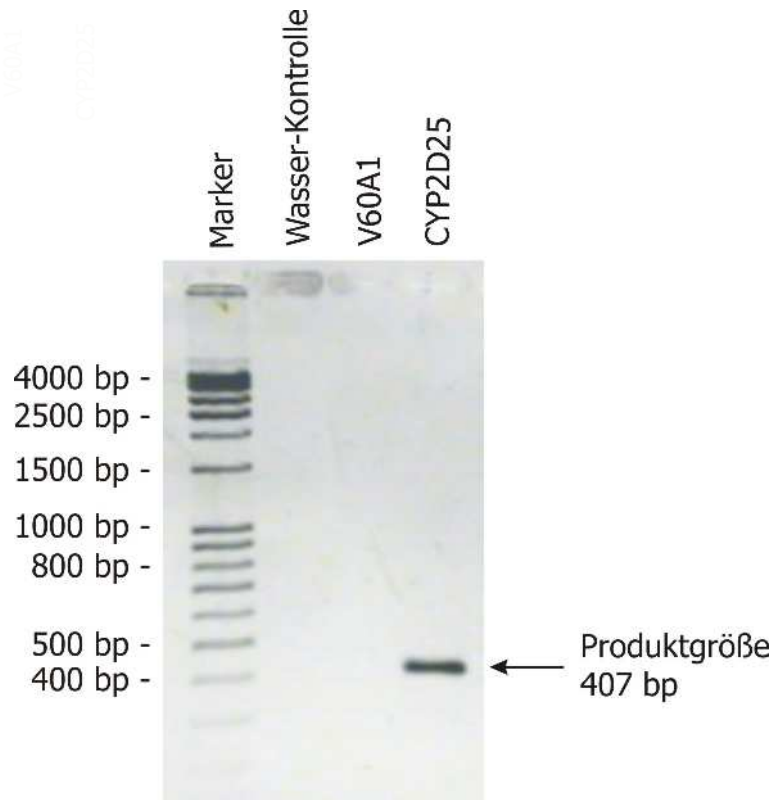


Abb. 2-10 *Primerkontrolle mittels PCR*

Die Wasserkontrolle und pYeDP60 V60A1 (Negativkontrolle) zeigten erwartungsgemäß keine Bindung mit den Primern, während bei pYeDP60 CYP2D25 eine Bande mit der von den Primern eingeschlossenen Produktgröße von 407 bp zu detektieren war.

2.3.3 **EXPRESSION VON CYP2D25 IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

2.3.3.1 **S 150 UND PSY 142**

Nach erfolgreicher Transformation von pYeDP60 CYP2D25 bzw. V60A1 in den Hefestamm S 150 wurde festgestellt, dass S 150 vermutlich aufgrund jahrelanger Kultivierung auf Vollmedium seine URA-Mutation verloren hatte. Daher wurde der Hefestamm PSY 142 für weitere Transformationen ausgewählt. Jedoch erwies sich auch dieser Stamm als ungeeignet, da er nicht auf galaktosehaltigem Medium wachsen konnte.

2.3.3.2 DER HEFESTAMM W(N)

Daher wurde der Hefestamm W(N) für die Expression von CYP2D25 ausgewählt, da ein von diesem Hefestamm abgewandelter Stamm W(R) bereits für die Expression von CYP2D25 erfolgreich eingesetzt wurde [Hosseinpour *et al.*, 2001]. Abb. 2-11 zeigt den durch eine OD₆₀₀-Messung bestimmten Verlauf einer Wachstumskurve einer Hefekultur. In den ersten fünf Stunden befand sich diese Hefekultur in der sog. Anlauf (lag)-Phase, um dann in die exponentielle (lg)-Phase überzugehen. Am Ende der Wachstumsphase bzw. zu Beginn der stationären Phase wurde die Expression durch Überführung der Zellen in galaktosehaltiges Medium induziert.

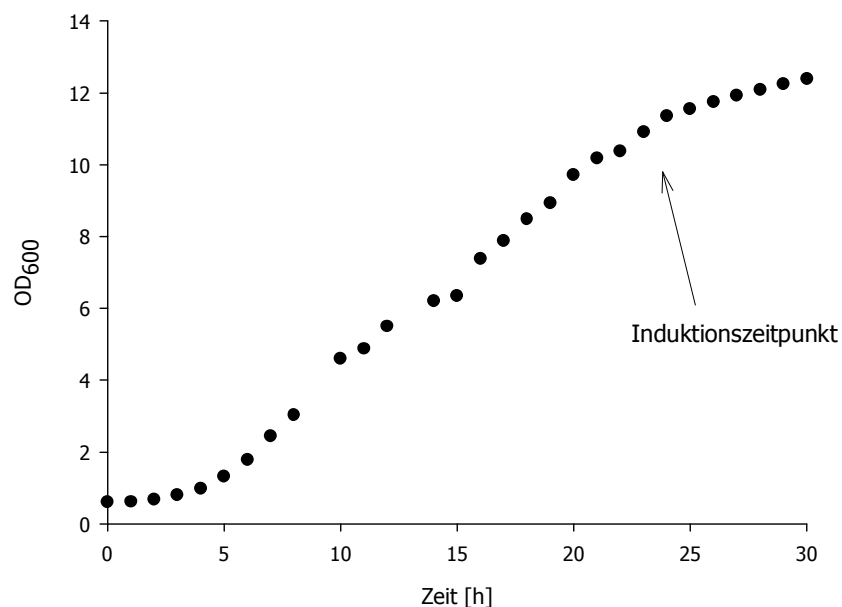


Abb. 2-11 *Typische Wachstumskurve einer Hefekultur*

Die Induktion erfolgte nach 24-stündigem Wachstum durch Zugabe von Galaktose am Ende der Wachstumsphase, wobei die OD₆₀₀ zwischen 10 und 13 liegen sollte.

2.3.3.2.1 Transformation von W(N)

Um die erfolgreiche Transformation zu überprüfen, wurde die unter 2.2.3.8 beschriebene PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Abb. 2-12 zeigt, dass sowohl die Wasserkontrolle als auch die pYeDP60 V60A1 enthaltenden Transformanten keine Bindung mit den Primern eingingen. Wurden hingegen die pYeDP60 CYP2D25 enthaltenden Transformanten als Matrize eingesetzt, konnte ein

Amplifikat detektiert werden. Diese geprüften Transformanten wurden auf separaten Platten selektiert und für spätere Expressionen eingesetzt.

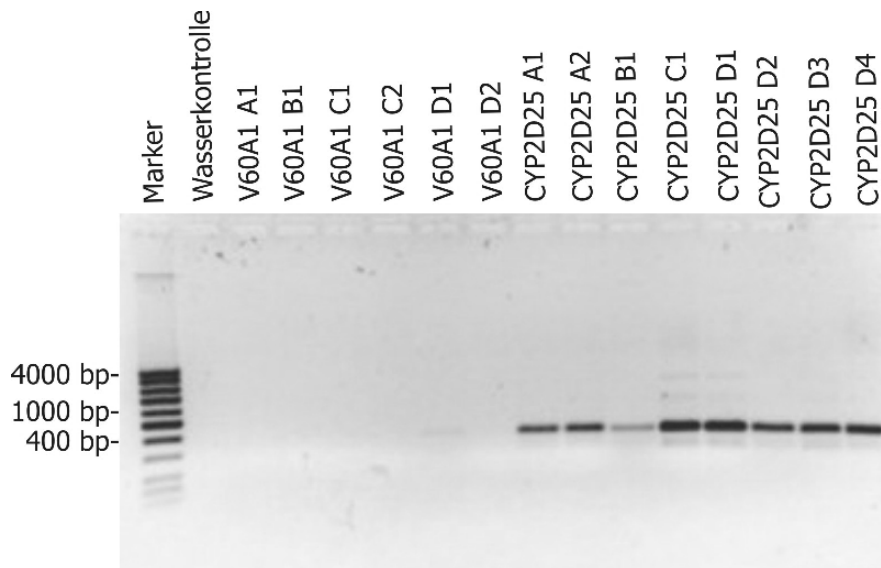


Abb. 2-12 Transformantenkontrolle mittels PCR

Nur an die pYeDP60 CYP2D25 enthaltenden Transformanten konnten die Primer KM1 und KM2 binden. Die Wasserkontrolle sowie die pYeDP60 V60A1 enthaltenden Transformanten wiesen keine Amplifikat-Bildung auf.

2.3.3.2.2 Expression von CYP2D25

Die Expression wurde gemäß 2.2.3.9 durchgeführt und über einen galaktoseinduzierbaren Promotor kontrolliert. Die mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine der drei verschiedenen Transformanten-Arten CYP2D25, V60A1 und Wildtyp W(N) (Abb. 2-13) unterschieden sich erst im parallel bearbeiteten Western Blot durch die Reaktion des monoklonalen Antikörpers 4D12 (Abb. 2-14). Nur das in den Transformanten exprimierte CYP2D25 zeigte im Vergleich zu V60A1 und dem Wildtyp W(N) eine Reaktion mit dem MAK. Eine Bande der elektrophoretisch aufgetrennten Benzamidoxim-Reduktase (3. Protein) reagierte ebenfalls mit dem Antikörper.

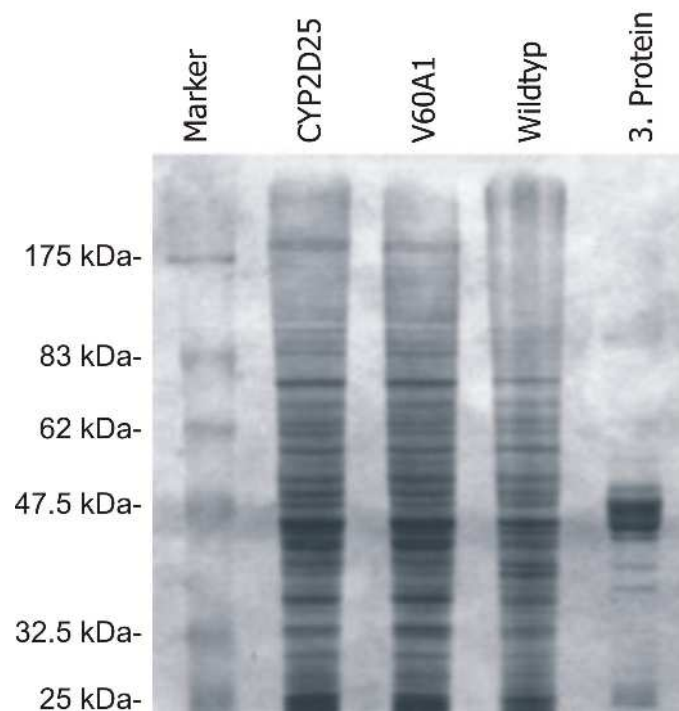


Abb. 2-13 *SDS-Gel von Mikrosomen aus pYeDP60 CYP2D25, pYeDP60 V60A1 und dem Wildtyp W(N) im Vergleich zur Benzamidoxim-Reduktase*

Auf dem SDS-Gel unterscheiden sich die drei Mikrosomen-Arten nur wenig. Bei Auftrennung der aus der Schweineleber gereinigten BAO-Reduktase werden mehrere Proteinbanden sichtbar.

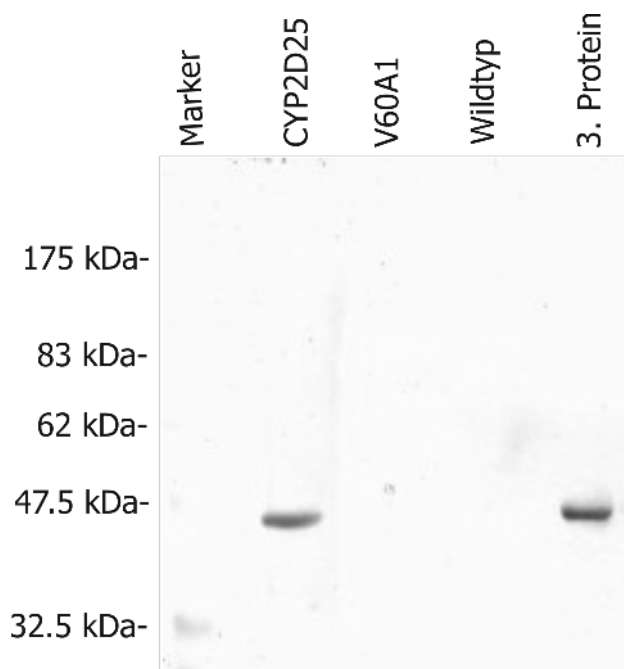


Abb. 2-14 Western Blot verschiedener Mikrosomenfraktionen aus W(N) im Vergleich zur Benzamidoxim-Reduktase

Der MAK erkennt nur das in den CYP2D25-Mikrosomen enthaltene Protein. V60A1 und der Wildtyp W(N) reagieren erwartungsgemäß nicht. Eine Bande der BAO-Reduktase wird ebenfalls erkannt.

2.3.3.2.3 Mikrosomenherstellung

Die Polyglycan-Zellwände der Hefe mussten für eine erfolgreiche Mikrosomenherstellung zunächst zerstört werden. Dazu wurden drei verschiedene Methoden ausprobiert (siehe 2.2.3.10), wobei zunächst der Zellwand-Aufschluss durch Zugabe eines zellwandlyisierenden Enzyms (Quantazyme ylgTM) mit anschließender Sonifizierung getestet wurde. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine β -1,3-Glucanase, die rekombinant aus *Oerskovia xanthineolytica* gewonnen wurde. Nach mikroskopischer Überprüfung wurde festgestellt, dass der größte Teil der Zellen durch diese Behandlung nicht zerstört worden war, weshalb alternativ die Zugabe von Cytohelicase und Zymolyase zum frisch geernteten Zellpellet getestet wurde. Durch eine derartige Enzymbehandlung wurden Protoplasten erhalten, deren Bildung durch eine Absorptionsänderung bei 600 nm photometrisch bestimmt werden konnte (Abb. 2-15).

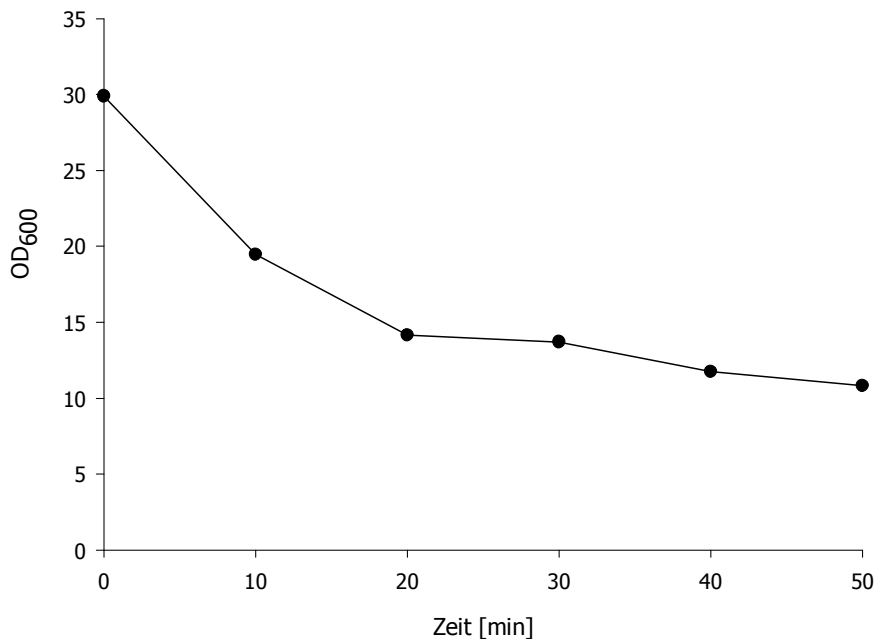


Abb. 2-15 *Absorptionsabnahme bei 600 nm durch Protoplastenbildung*

Die OD₆₀₀ wurde durch Vermessung von 10 µl-Aliquots einer Hefekultur (1:100-Verdünnung) bei 600 nm bestimmt.

Nach Abnahme der OD₆₀₀ auf einen Wert von ca. 10 sollten die Zellen durch eine anschließende Sonifizierung zerstört werden. Aber auch bei dieser Methode wurde festgestellt, dass die Zellwände für eine Mikrosomenherstellung mit hoher Ausbeute nur ungenügend aufgeschlossen worden waren.

Daher wurde versucht, die Zellwände mechanisch aufzuschließen. Durch Zugabe von Glasperlen wurden die Zellwände durch Scherkräfte zerstört. Das Ergebnis wurde unter einem Mikroskop kontrolliert (siehe Abb. 2-16). Auf dem linken Foto sind unzerstörte Hefezellen abgebildet. Nach 9-minütigem Schütteln ist die Zerstörung der Zellwände deutlich zu erkennen, da kaum noch intakte Zellen, sondern überwiegend Zelltrümmer und freigesetzte Zellbestandteile vorhanden sind.

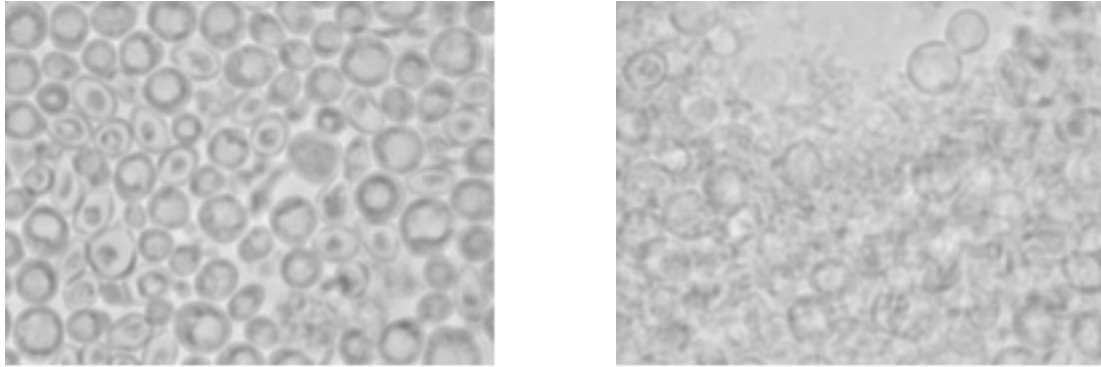


Abb. 2-16 *Zerstörung der Zellwände durch mechanischen Aufschluss*

Auf dem linken Foto sind native Hefezellen mit intakter Zellwand und auf dem rechten Foto zerstörte Hefezellen mit Zelltrümmern abgebildet.

Die sich daran anschließende Mikrosomengewinnung erfolgte durch differentielle Zentrifugation, da die Proteinausbeute mit dieser Methode sehr viel höher als bei der Proteinfällung durch Zugabe von NaCl und Polyethylenglykol war.

2.3.3.3 P450-SPEKTREN DER MIKROSOMENFRAKTIONEN

Durch Bindung von Kohlenmonoxid an die sechste Koordinationsstelle des Eisens von Cytochrom P450-Enzymen in der reduzierten Form entsteht ein Komplex, der ein Absorptionsmaximum bei 450 nm aufweist. Für die Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts wurden von allen Mikrosomenfraktionen CO-Differenzspektren aufgenommen. Die Aufnahme von P450-Spektren wurde nach der unter 3.2.2.2 beschriebenen Methode durchgeführt.

2.3.3.3.1 CYP2D25 und V60A1 im Vergleich

In Abb. 2-17 sind die P450-Spektren einer CYP2D25 enthaltenden Mikrosomenfraktion im Vergleich zu einer Präparation, die nach Transformation von pYeDP60 V60A1 gewonnen wurde, dargestellt. Bei CYP2D25 konnte ein Maximum bei 450 nm detektiert werden, während das P450-Spektrum von V60A1 erwartungsgemäß kein Maximum bei 450 nm aufwies.

Die berechneten P450-Gehalte der in den Messungen (siehe Kapitel 3) verwendeten Mikrosomenpräparationen sind in Tab. 3-3 aufgeführt.

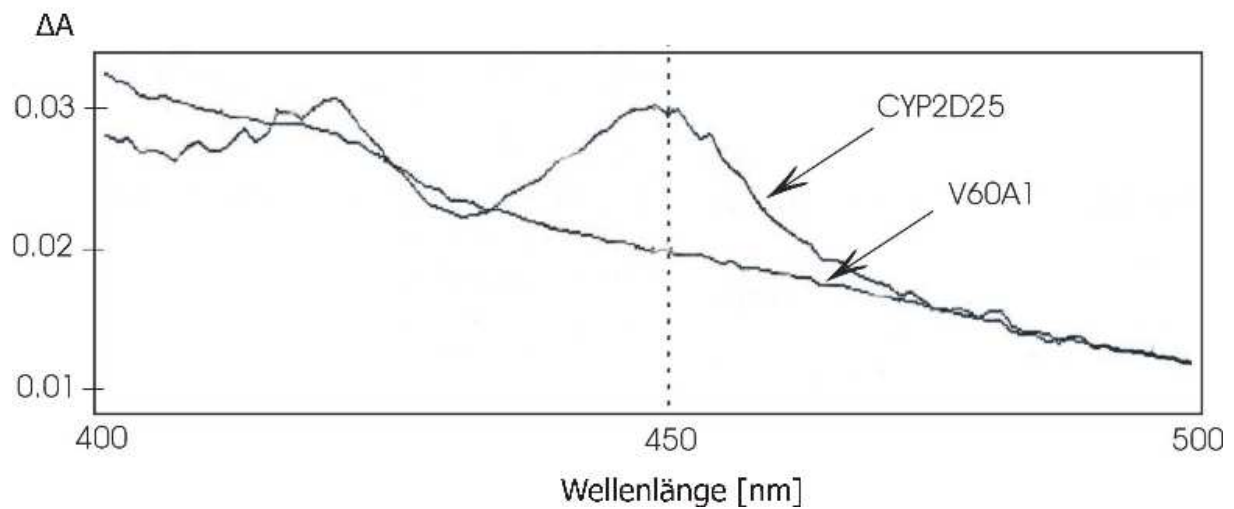


Abb. 2-17 *P450-Spektren einer CYP2D25 enthaltenden Mikrosomenfraktion im Vergleich zu einer Präparation, die nur den Vektor ohne CYP2D25-Sequenz enthielt*

Die CYP2D25 enthaltende Mikrosomenfraktion wies ein Maximum bei 450 nm auf, während bei der V60A1 enthaltenden Präparation kein Maximum zu detektieren war.

2.3.3.3.2 CYP2D25 und Wildtyp W(N) im Vergleich

Zudem wurden ebenfalls CO-Differenzspektren von Mikrosomenfraktionen, die aus dem gentechnisch unveränderten Hefestamm W(N) gewonnen wurden, vermessen. Abb. 2-18 zeigt, dass die aus dem Wildtyp gewonnene Präparation kein Maximum bei 450 nm aufwies.

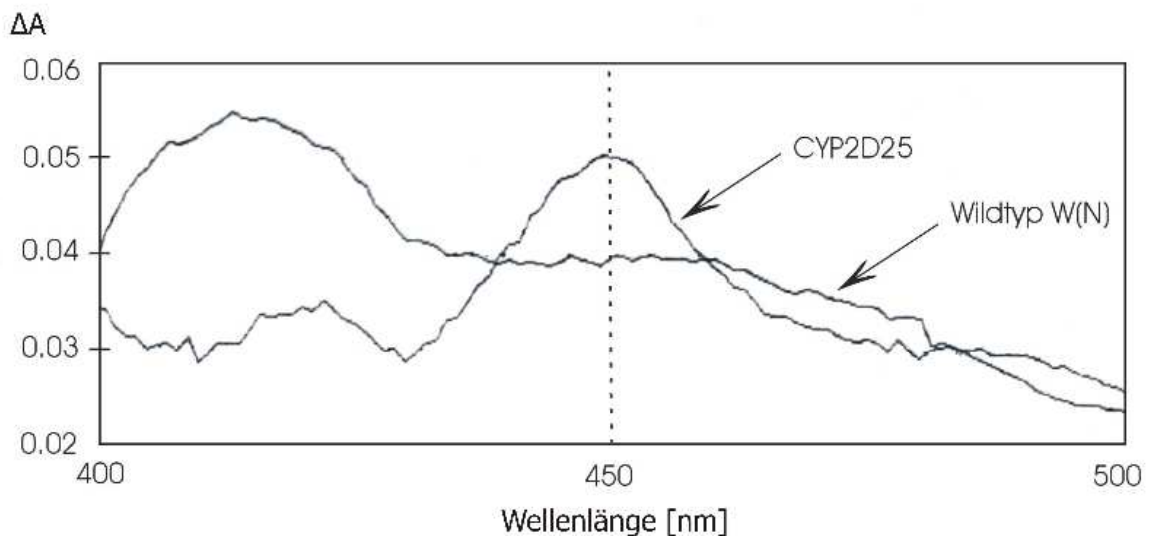


Abb. 2-18 *P450-Spektren einer CYP2D25 enthaltenden Mikrosomenfraktion im Vergleich zu einer aus dem Wildtyp W(N) gewonnenen Präparation*

Die aus dem Wildtyp W(N) erhaltene Präparation wies kein Maximum bei 450 nm auf.

2.3.3.4 GESAMT-RNA-ISOLIERUNG, NORTHERN BLOT UND HYBRIDISIERUNG

Die aus rRNA, tRNA und mRNA bestehende Gesamt-RNA konnte erfolgreich aus der Hefe nach der unter 2.2.4.5.2 beschriebenen Methode isoliert werden. Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten RNA-Fragmente wurden durch einen Northern Blot (siehe 2.2.4.6) auf einer Nylonmembran fixiert, um durch eine folgende Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde einzelne RNA-Fragmente spezifisch nachweisen zu können. Dabei wurden zwei CYP2D25 enthaltende Kulturen mit einer nicht induzierten Kultur als Negativkontrolle verglichen. In beiden induzierten Kulturen konnte ein Transkript nachgewiesen werden, während in der nicht induzierten Kultur erwartungsgemäß kein Transkript gebildet wurde.

2.3.3.5 SPEZIFITÄT DES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS

Auch die Reaktivität des monoklonalen Antikörpers wurde mit verschiedenen rekombinanten P450-Enzymen mittels SDS-PAGE und Western Blot getestet (siehe 2.2.5). Der MAK erkannte weder CYP2C19, CYP2A6, CYP2E1, CYP2D6, CYP27A1 noch

CYP3A4. Lediglich die Benzamidoxim-Reduktase und das in Hefe rekombinant exprimierte CYP2D25 reagierten spezifisch mit dem MAK.

2.4 DISKUSSION

2.4.1 EXPRESSION VON CYP2D25' IN Sf9-ZELLEN

Drei unterschiedliche Transferplasmide wurden konstruiert, um zum einen das unveränderte CYP2D25 und zum anderen zwei verschiedene GST-Fusionsproteine zu erhalten, die anschließend über eine Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose aufgereinigt werden sollten. Das aus AcNPV-Bac1/3-infizierten *Sf9*-Zellen gewonnene Protein verfügte über die CYP2D25-Sequenz und einen GST-Anker, während das aus AcNPV-Bac2/3-infizierten *Sf9*-Zellen gewonnene Protein zusätzlich um 28 N-terminale Aminosäuren verkürzt war.

Kyte und Doolittle [1982] entwickelten ein Computerprogramm, das systematisch die hydrophilen und hydrophoben Bereiche einer Polypeptidkette berechnete, während nach White und Wimley [1999] auch die Peptidbindungen und der Doppelschicht-Effekt miteinbezogen werden sollten, um die mit der Membran interagierenden Aminosäure-Sequenzen besser feststellen zu können [Suárez *et al.*, 2000]. Jeder Aminosäure wurde dabei ein Wert bezüglich ihrer hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften zugeordnet, wobei dieses System inzwischen weiter optimiert wurde [Klevanik, 2001]. In Vertebraten vorkommende mikrosomale Cytochrom P450-Enzyme sind membrangebundene Enzyme, die über einen Anker tief in die Membran-Matrix eingebettet sind [Ruan *et al.*, 2002]. Jedoch wird kontrovers diskutiert, ob das P450-Enzym dabei über zwei NH₂-terminale transmembranäre Helices an die Membran gebunden wird [Nelson und Strobel, 1988], oder ob der Membrananker nur einmal durch die Matrix ragt und die sich extramembranär befindende Hauptmasse des Enzyms zum Cytoplasma ausgerichtet ist [Vergères *et al.*, 1989a]. Dabei besteht das für die Verankerung verantwortliche N-terminale Segment aus genau oder weniger als 29 Resten [Vergères *et al.*, 1989b]. Nach Ansicht von Shank-Retzlaff *et al.* [1998] ist sowohl eine transmembranäre Helix als auch eine die Membran nicht umspannende Bindungsstelle für die Verankerung in der Matrix verantwortlich, die in der Literatur auch als F-G loop bezeichnet wird [Headlam *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003]. Bei der Expression von CYP2E1 in *E. coli* konnten Larson *et al.* [1991] feststellen, dass das im N-terminalen Bereich verkürzte Protein dennoch vornehmlich

an die Bakterienmembran gebunden war. Somit scheint das N-terminale hydrophobe Segment nicht allein für eine Membranverankerung verantwortlich zu sein. Ruan *et al.* [2002] konnten bei der Untersuchung einer Prostaglandin I₂-Synthase feststellen, dass die ersten 25 Reste des N-terminalen Endes die Membrananker-Domäne ausbilden. Dabei interagieren die hydrophoben Reste 1-20 mit der Innenseite der Phospholipid-Doppelschicht des endoplasmatischen Retikulums, während die hydrophilen Reste 21-25 zum wässrigen Milieu des Cytoplasmas zeigen.

Abb. 2-19 zeigt den Hydrophobizitätsplot von CYP2D25 nach Kyte und Doolittle, wobei die ersten 30 Aminosäuren einen stark hydrophoben Bereich kennzeichnen, bei dem es sich um die Membranankerregion handeln könnte [<http://us.expasy.org>].

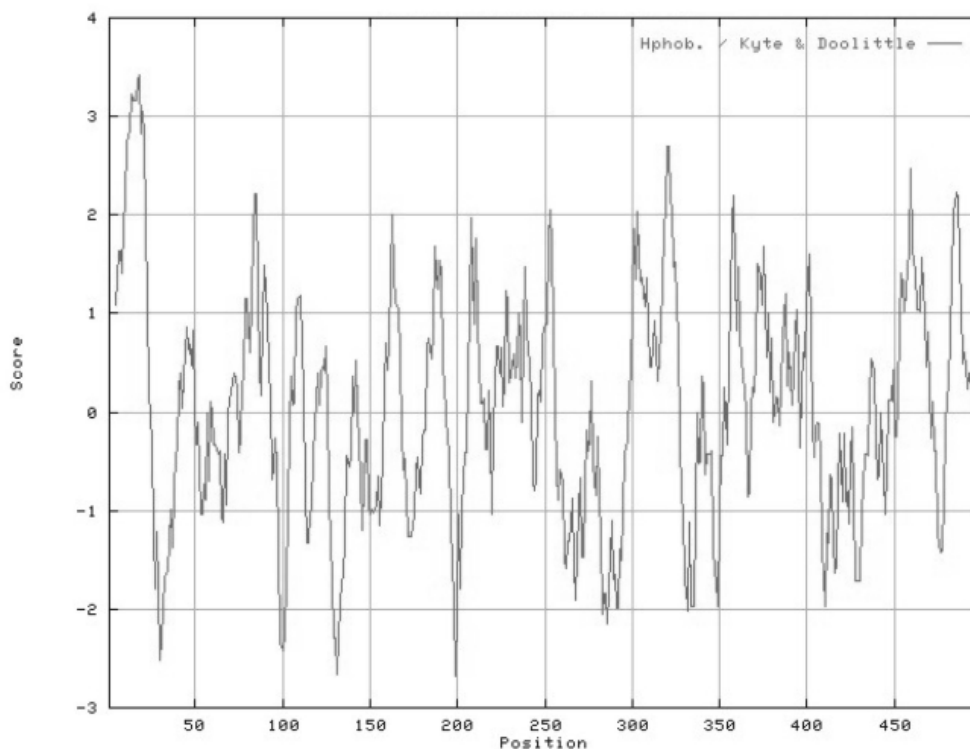


Abb. 2-19 Hydrophobizitätsplot von CYP2D25 nach Kyte und Doolittle
[<http://us.expasy.org>]

Die ersten 30 Aminosäuren kennzeichnen einen stark hydrophoben Bereich.

Aus diesen Gründen wurden die ersten N-terminalen 28 Aminosäuren der CYP2D25-Sequenz entfernt, um so eine Membranverankerung zu unterbinden und gleichzeitig ein lösliches Protein zu erhalten.

Für die Produktion funktionstüchtigen P450-Enzyms ist das Hinzufügen von Hämin ins Kulturmedium erforderlich [Patten und Koch, 1995], da gezeigt werden konnte, dass eine exogene Hämin-Zugabe nach 72-stündiger Infektion der *Sf9*-Zellen zu einem 6-fachen Anstieg an aktivem P450-Enzym führte. Kurz nach der Infektion trat dabei im CO-Differenzspektrum ein 420 nm-Peak auf, der sich nach längerer Infektionszeit bei gleichzeitigem Anstieg des P450-Gehalts verringerte [Asseffa *et al.*, 1989]. Auch Barnes *et al.* [1994] beschrieben, dass der Bedarf an Häm während der Infektionsphase mit rekombinantem Baculovirus und der Produktion von Apocytochrom P450 die biosynthetischen Kapazitäten der *Sf9*-Zellen überschreitet. Die *Sf9*-Zellen sind nicht in der Lage, *de novo* genügend Häm zu synthetisieren und es an den erhöhten Bedarf bei der Expression anzupassen [Gonzalez *et al.*, 1991]. Sowohl die Konzentration des exogen zugeführten Hämins als auch der Erntezeitpunkt beeinflussen die P450-Expression [Chen *et al.*, 1996]. Da die Zugabe an Häminchlorid für *Sf9*-Zellen toxisch sein kann, sollte die Häminchlorid-Konzentration in einem Bereich von 0.1 bis 5 µg/ml liegen [Lee *et al.*, 1995]. Die Zufuhr sollte 24 Stunden nach der Infektion erfolgen, da eine frühere Zufuhr in geringeren Proteinmengen und auftretender Zytotoxizität resultierte [Ong *et al.*, 1998]. Das Häm soll außerdem eine Rolle bei der Ausbildung der Substrat-Bindungstasche spielen, weshalb eine Änderung der Elektronendichte am Häm-Eisen die katalytische Aktivität beeinflusst [Modi *et al.*, 1995].

Aus diesen Gründen wurde die exogene Zufuhr von 4 µg/ml Hämin 24 Stunden nach der Infektion gewählt (siehe 2.2.1.3.4). Unter diesen Bedingungen konnte im CO-Differenzspektrum nur ein Maximum bei 420 nm und keines bei 450 nm festgestellt werden, wodurch eine nicht korrekte Hämin-Einlagerung belegt war. Daher konnte auch keine P450-Aktivität detektiert werden [Berger, 2002]. Weitergehende Überlegungen führten zu einer schrittweisen Änderung dieser Bedingungen, um einen korrekten Häm-Einbau zu gewährleisten. Aber auch nach der Variation der Hämin-Supplementierung, bei der z.B. statt Hämin δ -Aminolävulinsäure zusammen mit Eisen(III)chlorid oder ein Hämin-Albumin-Komplex eingesetzt wurden (siehe 2.2.1.3.7), konnte der monoklonale Antikörper zwar an das exprimierte Protein in einer Western Blot-Analyse binden (siehe 2.3.1.2), dennoch erfolgte die Inkorporierung des Häm-Gerüsts in das Apoprotein nicht korrekt. Statt eines

erwarteten Maximums bei 450 nm im CO-Differenzspektrum konnte nur ein Maximum bei 420 nm detektiert werden (siehe 2.3.1.3). Dies wird mit der unspezifischen Bindung des Hämins an zelluläres Protein begründet [Asseffa *et al.*, 1989; Buters *et al.*, 1995].

Der in einer Zeitreihe bestimmte Erntezeitpunkt der Zellen von 72 Stunden nach der Infektion erwies sich als optimal [Berger, 2002] und bedurfte keiner Variation, da auch in der Literatur eine Übereinstimmung mit diesem Vorgehen gefunden werden konnte [Tamura *et al.*, 1992; Schwarz *et al.*, 2001].

Die Reinigung von sowohl in prokaryontischen als auch eukaryontischen Systemen exprimierten Proteinen durch eine Einschnitt-Affinitätschromatographie wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben [Smith und Johnson, 1988; Abdullah *et al.*, 1995; Ciccaglione *et al.*, 1998; Bichet *et al.*, 2000]. Die rekombinanten Proteine wurden dabei als Fusionsproteine an einer geeigneten Matrix aufgereinigt [Sorscher und Sommerfelt, 1995], wobei die Proteine z.B. an Glutathion-S-Transferase gekoppelt wurden, um anschließend eine Aufreinigung an Glutathion-Agarose durchführen zu können. Der GST-Anker kann im Anschluss an die Aufreinigung durch proteolytischen Verdau abgespalten werden [Peng *et al.*, 1993]. Eine weitere Möglichkeit der Aufreinigung von in Insektenzellen exprimierten Proteinen besteht in der Synthese von Hexa-His-Fusionsproteinen mit anschließender Aufreinigung an einer Nickelchelat-Matrix [Ruggli *et al.*, 1995]. Die Einschnittchromatographie an Glutathion-Agarose bietet zwar die Möglichkeit einer schonenden Aufreinigung, dennoch ist dieses System nur bei löslichen rekombinanten Proteinen anwendbar. Hartman *et al.* [1992] konnten zeigen, dass in *E. coli* der Anteil des löslichen Proteins entweder durch Induktion bei geringerer Temperatur oder durch eine Solubilisation des in sog. „inclusion bodies“ gepackten Proteins mit Harnstoff erhöht werden konnte. Ein weiterer Nachteil dieses Systems besteht in dem Bedarf an hohen Konzentrationen von reduziertem Glutathion, um das gebundene Protein effizient eluieren zu können [Chen *et al.*, 1999]. Durch das Vorhandensein der beiden Transferplasmide pAcG2T/Bac1/3 und pAcG2T/Bac2/3 war es möglich, CYP2D25' als GST-Fusionsprotein zu exprimieren und im Anschluss daran an Glutathion-Agarose aufzureinigen. Es konnte gezeigt werden, dass geringe Mengen an aufgereinigtem Protein eluiert werden konnten, jedoch war die Bindungskapazität der Glutathion-

Agarose-Matrix zu gering (siehe 2.3.1.1). Die eluierte Proteinmenge reichte nicht für eine Durchführung von Aktivitätstests im 1α -Hydroxyvitamin D₃-Assay aus. Da auch nach der variierten Hämin-Supplementierung bei der Bestimmung des P450-Gehalts kein Maximum bei 450 nm detektiert werden konnte, wurde dieses Verfahren nicht weiter optimiert.

2.4.2 EXPRESSION VON CYP2D25 IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

In der Literatur wurde bereits mehrfach die erfolgreiche Expression verschiedener P450-Enzyme mit dem Vektor pYeDP60 beschrieben [Oscarson *et al.*, 1997; Urban *et al.*, 1997; Hosseinpour *et al.*, 2001]. Daher wurde dieser Vektor für die Expression von CYP2D25 ausgewählt. Anhand der im Western Blot nachgewiesenen immunochemischen Reaktion des in dieser Arbeit exprimierten Proteins und anhand der P450-Spektren mit einem Maximum bei 450 nm konnte die erfolgreiche Expression von CYP2D25 in dem Hefestamm W(N) gezeigt werden. Sowohl der gentechnisch unveränderte Hefestamm W(N) als auch die Expression von pYeDP60 V60A1 führten erwartungsgemäß weder zu einer Reaktion mit dem monoklonalen Antikörper im Western Blot noch zu einem Maximum bei 450 nm. Die bei der Mikrosomenherstellung durch enzymatischen Zellaufschluss aufgetretenen Probleme konnten mit einer mechanischen Zellwand-Zerstörung durch Zugabe von Glasperlen gelöst werden. Somit standen drei verschiedene Proteinquellen zur Verfügung, mit denen Aktivitätstestungen sowohl im 25-Hydroxylase- als auch im Benzamidoxim-Reduktase-Assay durchgeführt werden konnten (siehe Kapitel 3).

Jedoch kann es bei der oxidativen Rekonstitution in Kombination mit der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase und in einigen Fällen zusätzlich mit Cytochrom b₅ [Pompon, 1988] von in der Hefe exprimierten Proteinen Schwierigkeiten geben, da die Menge an endogener P450-Reduktase in der Hefe begrenzt ist und exogen hinzugesetzt werden muss [Pompon *et al.*, 1996]. Weiterhin beschreiben Truan *et al.* [1993], dass humanes CYP3A4 die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase der Hefe nur schlecht als Reaktionspartner erkannte und nicht in der Lage war, Reaktionen mit endogenem Cytochrom b₅ aus der Hefe zu katalysieren. Durch den geringen endogenen Gehalt an P450-Reduktase in der Hefe wurde gleichzeitig die

Monooxygenase-Aktivität des exprimierten Proteins vermindert [Murakami *et al.*, 1990]. Aus diesen Gründen ist eine Coexpression mit P450-Reduktase als Fusionsprotein bei der Untersuchung oxidativer Umsetzungen sicherlich zu empfehlen, jedoch lassen sich dabei relative stöchiometrische Verhältnisse der Enzyme kaum beeinflussen [Pompon *et al.*, 1996]. Da in dieser Arbeit vornehmlich die von einem P450-Enzym katalysierte Reduktion untersucht werden sollte und sich die coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase als potenziell inhibitorisch erwies (siehe 3.3.3.4.4), wurde auf eine Expression eines Fusionsproteins verzichtet und die Expression in dem Hefestamm W(N) vorgenommen, der die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase nicht coexprimierte.

Die in rekombinanten Hefezellen gefundenen Expressionslevel variieren sehr stark und sind abhängig von dem jeweiligen exprimierten Isoenzym [Bellamine *et al.*, 1994]. Vermutlich ist dabei die Membranverankerung des P450-Isoenzym in das endoplasmatische Retikulum entscheidend. Hsu *et al.* [1993] gingen davon aus, dass die Art der Membranverankerung von der Länge der den ersten 23 Aminosäuren entsprechenden N-terminalen hydrophoben Domäne im Protein abhängt, während Cullin [1992] sich für eine zweite Membran-Bindungsstelle innerhalb des Proteins aussprach. Da zunächst nur geringe Expressionslevel von CYP2D25 in *Saccharomyces cerevisiae* detektiert werden konnten, wurde Gesamt-RNA aus galaktoseinduzierten Kulturen isoliert. Die Existenz eines Transkriptes konnte durch den Nachweis der CYP2D25-Sequenz mittels radioaktiv markierter Sonden nachgewiesen werden. Somit war der Grund für die geringe Expression und nicht vorhandene Aktivität des heterolog exprimierten Proteins auf posttranskriptionaler Ebene zu suchen. So kann z.B. die posttranslationale Glykosylierung in der Hefe die Eigenschaften des exprimierten Proteins beeinflussen [Dingermann, 1999]. In der Hefe ist zum einen eine im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte N-Glykosylierung an Asparaginresten und zum anderen eine O-Glykosylierung an Serin- bzw. Tyrosin-Hydroxylresten möglich [Lehle und Tanner, 1995]. Die O-Glykosylierung beginnt auch zunächst im ER und wird im Golgi-Apparat fortgeführt [Proszynski *et al.*, 2004]. Bei der Glykosylierung in der Hefe werden Mannosereste als Oligosaccharidketten an das exprimierte Protein geheftet [Gopal und Ballou, 1987]. Weiterhin unterscheidet sich die Glykosylierung in der Hefe von der anderer Eukaryonten, weshalb die in der

Hefe produzierten Glykoproteine meist nicht mit den gewünschten Proteinen anderer Organismen übereinstimmen. Allerdings findet eine Glykosylierung nur bei sezernierten Proteinen statt [Dingermann, 1999]. Bei Vorhandensein von hydrophoben transmembranären Domänen wird die Sekretion verhindert, sodass die heterolog exprimierten Proteine am endoplasmatischen Retikulum, am Golgi-Apparat oder an der Cytoplasmamembran gebunden bleiben [Schuster *et al.*, 2000]. Somit konnte eine die Eigenschaften von CYP2D25 beeinflussende Glykosylierung in der Hefe ausgeschlossen werden, da es sich bei CYP2D25 um ein an die Membran des endoplasmatischen Retikulums gebundenes P450-Enzym handelt.

Eine andere Erklärung für geringe Expressionslevel könnte der unterschiedliche Codongebrauch von *Saccharomyces cerevisiae* und *Sus scrofa* sein, da die Codon-Zusammensetzung des normalerweise im Schwein exprimierten Proteins möglicherweise nicht mit der optimalen Codonbenutzung der Hefe übereinstimmte. Die Nukleotidverknüpfung der einzelnen Codons wurde von der Natur so gewählt, dass Fehler in der Übersetzung bzw. Mutationen in den resultierenden Proteinen minimiert werden [Freeland *et al.*, 2000], da solche Translationsfehler den Energieverbrauch unnötig erhöhen würden [Akashi, 2003]. Der genetische Code scheint dabei derart organisiert zu sein, dass, wenn einzelne Nukleotidaustausche in einem Aminosäureaustausch resultieren, die neue Aminosäure der eigentlich zu translatierenden Aminosäure sehr ähnlich ist [Zhu *et al.*, 2003]. Bevorzugt werden in der P450-Familie Codons benutzt, die an der dritten Position auf C oder G enden [Porter, 1995]. Verschiedene Codons, die zwar durch den degenerierten genetischen Code in allen Organismen für dieselbe Aminosäure codieren, werden dennoch von den verschiedenen Wirtszellen statistisch nicht gleich häufig verwendet, sodass verschiedene Organismen unterschiedliche Codons bevorzugen [McHardy *et al.*, 2004]. Daher kann sich der unterschiedliche Codon-Gebrauch auf das Ausmaß der Proteinbiosynthese auswirken. Die Expression des gewünschten Proteins kann für *Saccharomyces cerevisiae* optimiert werden, indem die Nukleotidabfolge so verändert wird, dass sie einen für die Hefe optimalen Codongebrauch darstellt [Dingermann, 1999]. Daraufhin wurde der Codongebrauch vom Schwein mit dem der Hefe verglichen und dahingehend untersucht, ob für eine optimale Expression bestimmte Codons durch andere ersetzt werden müssten. In Tab. 2-1 ist der prozentuale

Codongebrauch von Schwein und Hefe jedem einzelnen Codon zugeordnet. Außerdem wurde die CYP2D25-Sequenz dahingehend untersucht, wie oft jeweils jedes einzelne Codon in dieser Sequenz verwendet wurde. Die fettgedruckten Codons kennzeichnen die mit einer höheren Präferenz verwendeten Codons in *Sus scrofa* gegenüber *Saccharomyces cerevisiae*. Nur die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Codons sollten gegen ein in *Saccharomyces cerevisiae* mit höherer Präferenz verwendetes Codon ausgetauscht werden, um so eine effiziente Proteinexpression zu gewährleisten.

Tab. 2-1 Codongebrauch in Schwein und Hefe mit der Verteilung in CYP2D25

Die fettgedruckten Codons kennzeichnen die mit einer höheren Präferenz verwendeten Codons in *Sus scrofa* gegenüber *Saccharomyces cerevisiae*. Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Codons sollten gegen ein Codon mit höherer Präferenz in *Saccharomyces cerevisiae* ausgetauscht werden. Die Daten des prozentualen Codongebrauchs wurden der Codon Usage Database (www.kazusa.or.jp/codon) entnommen. Die Codierung der einzelnen Aminosäuren erfolgte in Anlehnung an Freeland und Hurst [2004].

<i>Sus scrofa</i> [%]	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> [%]	Aminosäure	Abk.	Codon	Anzahl in CYP2D25 Sequenz	Prozentsatz in Sequenz [%]	Austausch gegen Codon
0.96	2.39	Glycin	G	GGU	5	1.0	
2.51	0.98			GGC	7	1.4	
1.57	1.09			GGA	4	0.8	
1.75	0.60			GGG	14	2.8	*
1.70	2.11	Alanin	A	GCU	7	1.4	
3.16	1.26			GCC	20	4.0	*
1.24	1.62			GCA	2	0.4	
0.85	0.62			GCG	7	1.4	
0.93	2.20	Valin	V	GUU	1	0.2	
1.80	1.16			GUC	7	1.4	
0.54	1.18			GUA	1	0.2	
3.34	1.07			GUG	27	5.4	*
0.54	2.62	Leucin	L	UUA	2	0.4	
1.13	2.71			UUG	8	1.6	
1.14	1.22			CUU	4	0.8	
2.32	0.54			CUC	20	4.0	*
0.56	1.34			CUA	2	0.4	
4.66	1.04			CUG	36	7.2	*
1.34	3.01	Isoleucin	I	AUU	1	0.2	
2.57	1.71			AUC	15	3.0	*
0.61	1.78			AUA	3	0.6	
1.20	2.35	Serin	S	UCU	2	0.4	
1.85	1.42			UCC	7	1.4	
0.84	1.87			UCA	3	0.6	
0.45	0.86			UCG	5	1.0	

0.91	1.42			AGU	0	0	
1.96	0.97			AGC	9	1.8	*
1.13	2.03	Threonin	T	ACU	2	0.4	
2.32	1.26			ACC	14	2.8	*
1.21	1.78			ACA	4	0.8	
0.78	0.79			ACG	3	0.6	
1.86	3.77	Aspartinsäure	D	GAU	7	1.4	
2.86	2.03			GAC	15	3.0	*
2.37	4.58	Glutaminsäure	E	GAA	8	1.6	
4.13	1.92			GAG	21	4.2	*
1.46	3.59	Asparagin	N	AAU	3	0.6	
2.27	2.49			AAC	10	2.0	
0.99	2.74	Glutamin	Q	CAA	5	1.0	
3.48	1.22			CAG	18	3.6	*
2.04	4.21	Lysin	K	AAA	3	0.6	
3.39	3.08			AAG	14	2.8	
0.40	0.65	Arginin	R	CGU	1	0.2	
1.19	0.26			CGC	25	5.0	*
0.54	0.30			CGA	2	0.4	
1.16	0.17			CGG	6	1.2	
1.03	2.13			AGA	0	0	
1.12	0.92			AGG	3	0.6	
0.82	1.37	Hisitidin	H	CAU	3	0.6	
1.54	0.77			CAC	10	2.0	*
1.59	2.61	Phenylalanin	F	UUU	6	1.2	
2.52	1.83			UUC	28	5.6	*
0.93	0.80	Cystein	C	UGU	4	0.8	
1.46	0.47			UGC	3	0.6	
1.53	1.35	Prolin	P	CCU	5	1.0	
2.15	0.68			CCC	15	3.0	*
1.40	1.82			CCA	10	2.0	
0.83	0.53			CCG	5	1.0	
1.10	1.88	Tyrosin	Y	UAU	1	0.2	
1.97	1.47			UAC	5	1.0	
1.53	1.03	Tryptophan	W	UGG	6	1.2	
2.23	2.09	Methionin	M	AUG	16	3.2	

Abb. 2-20 zeigt die cDNA-Sequenz der porcinen Vitamin D₃ 25-Hydroxylase mit der entsprechenden Aminosäuresequenz [Postlind *et al.*, 1997]. Dabei werden die fettgedruckten Aminosäuren in *Saccharomyces cerevisiae* bevorzugt mit einer anderen Codonkombination verwendet. Die zusätzlich kursiv gekennzeichneten Aminosäuren sollten durch eine jeweils andere, für die Hefe optimale Codonkombination ersetzt werden, um so die Ausbeute an Protein zu erhöhen. Denn Sinclair und Choy [2002] konnten zeigen, dass bei Anpassung des optimalen Codongebrauchs für *Pichia pastoris* die Luciferase-Aktivität um das 7.5- bis 10.6-fache gesteigert werden konnte. Die kursiv gedruckten Aminosäuren bilden knapp 60 % der gesamten Aminosäuresequenz von CYP2D25, sodass ein Austausch sinnvoll erscheint.

```

1 ATGGGTCTGCTGACTGGGGATTACTGGGGATCCTGGCCTTGCCATGGTCATCTTCTGCTCCTGGTGGACTTG 75
1 M G L L T G D L L G I L A L A M V I F L L L V D L 25

76 ATGCACCGGCGCTCACGCTGGGCTCCACGCTACCCACCGGGCCCATGCCACTGCCTGGGCTGGGTAACCTGCTA 150
26 M H R R S R W A P R Y P P G P M P L P G L G N L L 50

151 CAAGTGAACTTCCAAGACCCACGTCTCAGCTTATCCAGCTGCGGGCCGCTTTGGGGATGTATTCAGCCTGCAG 225
51 Q V N F Q D P R L S F I Q L R R R F G D V F S L Q 75

226 CAGATCTGGAGGCCCGTGGTCTGTGCTCAATGGGCTGGCGGCTGTGCGGGAGGCCTGGTGTCCACAGCCATGAA 300
76 Q I W R P V V V L N G L A A V R E A L V S H S H E 100

301 ACCTCCGACCGCCACCTGTGTTTCATCTTAGAGCACCTGGGTACGGGCGCGCTCCGAAGGAGTGATCCTGGCG 375
101 T S D R P P V F I L E H L G Y G P R S E G V I L A 125

376 CGCTACGGGAAAGCGTGGCGCGAGCAGCGGCGCTTCTCGGTGTCCACCTTGGCCTGGGCAAGAAG 450
126 R Y G K A W R E Q R R F S V S T L R N F G L G K K 150

451 TCGTTGGAGGAGTGGGTGACCCAAGAGGCCCTCGTGCCTTTGTGCCGCTTCGCCGACCAGGCTGGACGCCCTTT 525
151 S L E E W V T Q E A S C L C A A F A D Q A G R P F 175

526 AGCCCTAACCACTTCTGAATAAAGCGGTGAGCAACGTGATCGCCTCCCTCACCTTCGCGCGCCGCTTCGAGTAC 600
176 S P N N L L N K A V S N V I A S L T F A R R F E Y 200

601 AACGACCCTCGCATGCTCAAGCTTCTGGACCTAGTGTGGAAGGACTGAAGGAGGAAGTGGCCTCATGCGCCAG 675
201 N D P R M L K L L D L V L E G L K E E V G L M R Q 225

676 GTGCTGGAAGCAATGCCGGTTCAGGCATATCCCGGGGCTGTGTGCCAAGCTTCCCAAGGCAGAAGGCCTTC 750
226 V L E A M P V L R H I P G L C A K L F P R Q K A F 250

751 TTGGTCATGATAGATGAGCTGATCACAGAGCACAAGATGACCCGGGACCTGGCCCAGCCCCCGAGACTTGACG 825
251 L V M I D E L I T E H K M T R D L A Q P P R D L T 275

826 GATGCCTTCTGGACGAAATGAAAGAGGCCAAGGGGAACCCCGAGAGCAGCTTCAATGATGAGAACCTCCGCCTG 900
276 D A F L D E M K E A K G N P E S S F N D E N L R L 300

901 GTGGTGGCTCACCTGTTCTCCGCTGGGATGATCACCACCTCGACCACGCTGGCCTGGGCTCTCCTCCTCATGATC 975
301 V V A H L F S A G M I T T S T T L A W A L L L M I 325

976 CTGCACCCAGACGTGCAGCGACGCTCCAACAGGAAATCGATGAGGTGATAGGGCACGTGCGGCAACCCGGAGATA 1050
326 L H P D V Q R R V Q Q E I D E V I G H V R Q P E I 350

1051 AAGGATCAGGCCCTCATGCCCTTACCTTGGCCGTGCTCCATGAGGTGCAGCGCTTTGGGGACATCGTCCCACTG 1125
351 K D Q A L M P F T L A V L H E V Q R F G D I V P L 375

1126 GGCGTGGCCACATGACATCTTGTGACATTGAAGTGCAGGGTTTCTCATCCCCAAGGGGACCACACTTATCACC 1200
376 G V A H M T S C D I E V Q G F L I P K G T T L I T 400

```

```

1201 AACCTGACGTCAGTGCTGAAGGACGAGACTGTCTGGAAGAAGCCCTTCGGCTTCTATCCAGAGCACTTCCTGGAC 1275
401 N L T S V L K D E T V W K K P F R F Y P E H F L D 425
1276 GCCCAGGGCCGCTTACCAAGCAGGAGGCCCTTCATGCCCTTCTCAGCAGGCCGCCGCTCTTGCCTCGGGGAGCCC 1350
426 A Q G R F T K Q E A F M P F S A G R R S C L G E P 450
1351 CTGGCCCGCATGGAGCTCTTCCTCTTCTTACCACCTCCTGCAGGCGTTTCAGCTTCTCGGTGCCACAGGACAG 1425
451 L A R M E L F L F F T T L L Q A F S F S V P T G Q 475
1426 CCTTGCCCCAGCGACCACGGTGTCTTTGCCCTTCTGCTGTTCCCATCCCCCTACCAGCTCTGTGCTGTGCCCCGC 1500
476 P C P S D H G V F A F L L F P S P Y Q L C A V P R 500
1501 TAGggGGAGGCacccatGCCcccaGCCttcgcttcagcagtaGCCctGGCatgcaataaagctgtccGGCagctcc 1575
501 * 501

```

Abb. 2-20 cDNA-Sequenz von CYP2D25 mit der entsprechenden Aminosäuresequenz nach Postlind et al. [1997]

Die fettgedruckten Aminosäuren werden in *Saccharomyces cerevisiae* bevorzugt mit einer anderen Codonkombination gebildet. Die zusätzlich kursiv gekennzeichneten Aminosäuren sollten für eine optimale Proteinexpression durch eine für die Hefe optimale Codonkombination ersetzt werden.

2.5 ZUSAMMENFASSUNG

Die drei verschiedenen im Baculovirus-Expressionssystem produzierten CYP2D25'-Chargen zeigten zwar auch nach einer Variation der Hämin-Supplementierung, bei der die Hämin-Zugabe in einer Konzentration von 4 µg/ml durch Zusatz von z.B. δ-Aminolävulinsäure in Kombination mit Eisen(III)chlorid bzw. Eisen(III)citrat ersetzt wurde, im Western Blot mit dem monoklonalen Antikörper nachweisbare Proteinlevel, dennoch waren sie nicht in der Lage, die für Cytochrom P450-Enzyme notwendige Häm-Einlagerung korrekt durchzuführen. Außerdem waren die bereits von Berger [2002] beschriebenen fünf Nukleotidaustausche nach wie vor in der CYP2D25'-Sequenz vorhanden, die zu einer Änderung der Primärstruktur führten. Aus diesen Gründen wurde für folgende Studien auf das Expressionssystem *Saccharomyces cerevisiae* für die Expression von CYP2D25 zurückgegriffen.

In dem Hefestamm W(N) konnte die erfolgreiche Expression von CYP2D25 gezeigt werden. Da mit diesem Enzym vornehmlich Reduktionen untersucht werden sollten, wurde auf die Coexpression der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase verzichtet. Als Negativkontrollen für analytische Studien standen ebenfalls aus V60A1 und dem gentechnisch unveränderten Hefestamm W(N) gewonnene Mikrosomen zur Verfügung.

Für eine Erhöhung der Proteinexpressionslevel eines porcinen Enzyms in der Hefe könnte der Codongebrauch für *Saccharomyces cerevisiae* optimiert werden. Dazu müssten die in der Abb. 2-20 kursiv gedruckten Aminosäuren durch Codons mit erhöhter Präferenz von *Saccharomyces cerevisiae* ausgetauscht werden.

3 IN VITRO BIOTRANSFORMATIONSSTUDIEN MIT DER BENZAMIDOXIM-REDUKTASE UND DER VITAMIN D₃ 25-HYDROXYLASE

3.1 VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR BENZAMIDOXIM-REDUKTASE UND ZUR 1 α -HYDROXYVITAMIN D₃ 25-HYDROXYLASE

3.1.1 EINLEITUNG

Substanzen mit stark basischen Stickstoff-Funktionen können *in vivo* leicht im Sinne von Phase I Reaktionen in *N*-hydroxylierte und *N*-oxygenierte Metaboliten umgewandelt werden. Die auf diese Weise entstehenden Verbindungen sind hydrophiler und somit auch besser ausscheidbar. Dabei ist es aber auch möglich, dass durch *N*-Oxygenierungen Produkte mit genotoxischem Potenzial entstehen [Clement *et al.*, 1988a]. Die Reduktion solcher Verbindungen ist daher von entscheidender Bedeutung. An Detoxifizierungsreaktionen dieser mutagenen Verbindungen ist u.a. die Benzamidoxim-Reduktase beteiligt.

Die mikrosomale Vitamin D₃ 25-Hydroxylase katalysiert in der Leber den ersten Schritt der metabolischen Aktivierung von Vitamin D₃ zu 25-Hydroxyvitamin D₃, das dann anschließend in der Niere in seine hormonelle Wirkform 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ umgewandelt wird.

Offensichtlich haben beide Enzyme ganz unterschiedliche physiologische Aufgaben. Dennoch weisen sie Ähnlichkeiten in Teilen der Aminosäuresequenz auf, sodass eine weitere Untersuchung bezüglich Übereinstimmungen, Unterschieden und Substratspezifitäten erforderlich erschien, um so die Benzamidoxim-Reduktase genau charakterisieren zu können [Clement *et al.*, 1997; Postlind *et al.*, 1997].

3.1.2 BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN

Zeitgleich wurden drei Peptidfragmente der porcinen Benzamidoxim-Reduktase und die komplette cDNA- und Proteinsequenz der Vitamin D₃ 25-Hydroxylase (CYP2D25) veröffentlicht [Clement *et al.*, 1997; Postlind *et al.*, 1997]. Beide Enzyme zeigten überraschender Weise eine hohe Ähnlichkeit mit der von Tsuneoka *et al.* [1992] publizierten Struktur eines P450-Enzyms der Subfamilie 2D. Zuvor waren noch keine CYP2D-Isoenzyme aus dem Schwein beschrieben worden. Beim Vergleich der drei sequenzierten Peptidbruchstücke der Benzamidoxim-Reduktase mit der veröffentlichten Aminosäuresequenz von CYP2D25 und mit dem humanen Isoenzym CYP2D6 (Tab. 3-1) konnte eine 98 %ige Homologie zu CYP2D25 festgestellt werden. Lediglich die Aminosäure Isoleucin bei CYP2D25 war in der Benzamidoxim-Reduktase gegen Methionin im dritten Peptid ausgetauscht. Die Sequenz von CYP2D6 unterschied sich in sieben Aminosäuren in den Peptiden 1 und 3, weshalb man hier nur noch von einer 84 %igen Homologie zwischen beiden Isoenzymen sprechen kann. Peptid 2 war bei allen drei Isoenzymen gleich.

Tab. 3-1 Vergleich der Aminosäuresequenzen der drei Peptidfragmente der Benzamidoxim-Reduktase mit den entsprechenden Bereichen der Vitamin D₃ 25-Hydroxylase (CYP2D25) und des CYP2D6

Die Peptidfragmente der Benzamidoxim-Reduktase wurden nach Bromcyanspaltung und anschließender HPLC-Trennung gewonnen. Die Sequenzierung führte Firma TopLab in München durch. Hervorgehoben ist der einzige Aminosäureaustausch in Peptid 3 im Vergleich zu CYP2D25, der bei dieser Sequenzierung festgestellt wurde.

¹[Clement *et al.*, 1997], ²[Postlind *et al.*, 1997], ³[Gonzalez *et al.*, 1988], - : identische Aminosäure wie in den Peptidfragmenten der Benzamidoxim-Reduktase.

Spezies	Fragment	Aminosäuresequenz															
S. scrofa	Peptid 1¹	M	L	K	L	L	D	L	V	L	E	G	L	K	E	E	
S. scrofa	CYP2D25 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H. sapiens	CYP2D6 ³	F	-	R	-	-	-	-	A	Q	-	-	-	-	-	-	
S. scrofa	Peptid 2¹	M	I	L	H	P	D	V	Q	R	R	V	Q	Q	E	I	D
S. scrofa	CYP2D25 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H. sapiens	CYP2D6 ³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. scrofa	Peptid 3¹	D	E	V	I	G	H	V	R	Q	P	E	M				
S. scrofa	CYP2D25 ²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I				
H. sapiens	CYP2D6 ³	-	D	-	-	-	Q	-	-	R	-	-	-				

3.1.3 ZIELSETZUNG

Bei Vorliegen einer so hohen Homologie zwischen der porcinen Benzamidoxim-Reduktase und CYP2D25 könnte es sich entweder um dasselbe Enzym handeln, das sowohl die Oxidation von 1 α -Hydroxyvitamin D₃ zu 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ als auch die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin katalysiert. Es könnte sich aber auch um zwei CYP2D Varianten handeln, die aufgrund ihrer hohen strukturellen Ähnlichkeit überlappende Substratspezifitäten aufweisen, aber dennoch nicht vollständig identisch sind. In dieser Arbeit sollten daher rekombinant exprimiertes CYP2D25 auf reduktive Eigenschaften und das aus Schweineleber gereinigte dritte Protein auf oxidative Eigenschaften in dem jeweiligen Assay untersucht werden.

3.2 METHODEN

3.2.1 GEWINNUNG DER EINZELNEN ENZYMPRÄPARATIONEN

3.2.1.1 MATERIALIEN

Die Angabe des Ortssitzes beteiligter Lieferfirmen erfolgt nur bei der ersten Nennung. Dikaliumhydrogenphosphat (Fluka, Buchs, Schweiz), Kaliumdihydrogenphosphat (Fluka), EDTA (Fluka), Saccharose (Merck, Darmstadt), DTT (Merck), NaCl (Sigma, Taufkirchen), Natriumcholat (Sigma), Glycerol (Fluka), Thesit (Fluka), Triton X-100 (Merck), KOH (Fluka), NADH (Fluka), Tris (Fluka), Natriumacetat (Riedel-de Haën, Seelze), Essigsäure (Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Niederlande), Calbiosorb[®] (Calbiochem, CA, USA), Sephadex G-25 (NAP[™] 25; Pharmacia, Freiburg), DEAE-Cellulose (Serva, Heidelberg), Sephadex G-100 (Pharmacia), 5'-AMP-Sepharose (Pharmacia), Fractogel[®] EMD TMAE 650 (Merck), Octyl-Sepharose CL-4B (Amersham Biosciences, Freiburg), Rinderserumalbumin-Standard (Pierce, IL, USA), BCA-Protein-Assay-Reagent (Pierce), Halb-Mikro-Küvetten 10 x 4 mm und Küvetten 10 x 10 mm (Sarstedt, Nümbrecht), Natriumdithionit (Merck), Kaliumhexacyanoferrat (III) (Merck), 1.5 und 2 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt).

3.2.1.2 GERÄTE

Die Angabe des Ortssitzes beteiligter Lieferfirmen erfolgt nur bei der ersten Nennung. Metrohm pH-Meter E632 (Metrohm, Filderstadt) mit den Elektroden Flushtrode P und Biotrode (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) zur pH-Wert-Bestimmung; Fleischwolf (Jupiter, Typ: 885) und Gewebehomogenisator (Braun, Melsungen) zur Zerkleinerung der Lebern; Hochleistungszentrifuge J2-21 M/E mit den Rotoren JA 10 und 14 (Beckman, München) und Ultrazentrifuge L7-65 mit einem Rotor Ti 45 (Beckman) zur Mikrosomengewinnung; Ultrafiltrations-Rührzellen und Ultrafiltrations-Membranscheiben YM (Amicon, Witten) zur Aufkonzentrierung; Schlauchpumpe Econo Pump (Bio-Rad, München), Standard-Glaschromatographiesäulen (Bio-Rad), Überkopfschüttler (Heidolph, Kehlheim) und Fraktionssammler Redi frac (Amersham Biosciences, Freiburg) für die Enzymreinigung; Zweistrahlphotometer Uvicon 930

(Kontron, Neufahrn), Photodiodenarray-Spektralphotometer DU 7500 (Beckman) und Schüttelwasserbad GFL 1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) zur Protein- und Aktivitätsbestimmung, Reference[®]-Pipetten mit den entsprechenden Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg).

3.2.1.3 GEWINNUNG DER MIKROSOMEN

3.2.1.3.1 Schweinelebermikrosomen

Zur Gewinnung von Schweinelebermikrosomen wurden pro Charge in der Regel zwei Schweinelebern von einem ortsansässigen Schlachter besorgt. Die Herstellung der Mikrosomen erfolgte nach den Vorschriften von Ziegler *et al.* [1966] und Clement *et al.* [1996] mit leichten Modifizierungen. Der Transport der frisch herausgetrennten Lebern erfolgte in eisgekühltem Standardpuffer (20 mM Kaliumphosphat, 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, pH 7.4). Alle darauf folgenden Schritte wurden bei 0-4°C im Kühlraum bzw. unter Eiskühlung durchgeführt. Die Leberlappen wurden mit BAC-Puffer (50 mM Phosphat, 1 mM EDTA, pH 7.4) gewaschen und perfundiert, anschließend in kleine Stücke geschnitten und durch einen Fleischwolf passiert. Dieses Rohhomogenat wurde mit einem Phosphatpuffer (20 mM Kaliumphosphat, 250 mM Saccharose, pH 7.4) verdünnt und mit einem Gewebehomogenisator gepottert. Die Gewinnung der SLM erfolgte durch differentielle Zentrifugation: Zunächst wurde das Homogenat für 30 min bei 9000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand nach Kolieren durch Verbandmull für 60 min bei 100000 g und 4°C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in oben genanntem Phosphatpuffer resuspendiert und erneut ultrazentrifugiert. Aliquots des resuspendierten Pellets wurden bei -80°C eingefroren.

3.2.1.3.2 Humane Lebermikrosomen

Die gepoolten humanen Lebermikrosomen wurden bei der Firma BD Gentest, MA, USA gekauft. Die Donoren waren überwiegend Kaukasier beider Geschlechter im Alter von 23 Monaten bis 74 Jahren, Raucher und Nichtraucher; die Todesursache war jeweils unterschiedlich. Die HLM wurden bei -80°C gelagert.

3.2.1.3.3 Porcine und humane Nierenmikrosomen

Die Nierenmikrosomen beider Spezies waren bereits im Arbeitskreis vorhanden und wurden mir freundlicherweise für meine *in vitro* Biotransformationsstudien überlassen. Die Schweinenieren stammten vom örtlichen Schlachthof. Die humanen Nieren wurden von Tumor-Patienten, die in der Uniklinik Kiel behandelt wurden, nach persönlicher Einwilligung und Begutachtung durch die Ethikkommission zur Verfügung gestellt. Die Gewinnung erfolgte in Anlehnung an die Herstellung von Schweinelebermikrosomen bzw. humanen Lebermikrosomen mit leichten Modifizierungen [Mau, 2002].

3.2.1.4 GEWINNUNG DER MITOCHONDRIEN

Die in dieser Arbeit eingesetzten Mitochondrien aus Schweineleber bzw. -niere sowie aus humaner Leber bzw. Niere wurden nach den Vorschriften von Beatti [1968] und Kline *et al.* [1986] mit einigen Modifizierungen [Deters, 2002] gewonnen. Sie wurden mir freundlicherweise von S. Deters zur Verfügung gestellt.

3.2.1.5 ISOLIERUNG DER DREI KOMPONENTEN DES REKONSTITUIERTEN SYSTEMS AUS SLM

Die Benzamidoxim-Reduktase, die NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase und Cytochrom b_5 wurden aus solubilisierten Schweinelebermikrosomen (siehe 3.2.1.3.1) in Anlehnung an die Vorschriften von Kling *et al.* [1985] und Clement *et al.* [1997] gereinigt.

3.2.1.5.1 Isolierung der Benzamidoxim-Reduktase (3. Protein)

Die solubilisierten SLM wurden durch eine hydrophobe Interaktionschromatographie an Octyl-Sepharose und anschließender Elution mittels eines Stufengradienten aus unterschiedlichen Salz- und Detergenzienkonzentrationen in einzelne Proteinfractionen getrennt. Die Benzamidoxim-Reduktase, die sich nun zusammen in einer Fraktion mit der NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase befand, wurde in

Ultrazentrifugationszellen einkonzentriert. Beide Bestandteile dieser Fraktion wurden durch eine Anionenaustauschchromatographie an Fractogel[®] EMD TMAE getrennt. Nach Umpufferung wurde die die Benzamidoxim-Reduktase enthaltende Fraktion durch Bioaffinitätschromatographie an einer UDP-Hexanolamin-Sepharose-Säule weiter aufgereinigt. Nach erneuter Einkonzentrierung, Entsalzung und Entfernung der Detergenzien wurde sie bei -80°C eingefroren.

3.2.1.5.2 Isolierung der NADH-Cytochrom b₅-Reduktase

Die nach der HIC gewonnene NADH-Cytochrom b₅-Reduktase-haltige Fraktion wurde durch Bioaffinitätschromatographie an einer 5'-AMP-Sepharose-Säule isoliert [Möller, 1997; Lopian, 2002]. Diese aufgereinigte Fraktion wurde einkonzentriert, umgepuffert und nach Entfernung der Detergenzien mittels Calbiosorb[®] bei -80°C gelagert.

3.2.1.5.3 Isolierung des Cytochrom b₅

Die zweite durch die HIC gewonnene Cytochrom b₅-haltige Fraktion wurde nach der Vorschrift von Taniguchi *et al.* [1984] durch eine Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose weiter aufgereinigt. Nach Umpufferung an einer Sephadex G-100[®]-Säule wurde die Fraktion eingengt und in Aliquots bei -80°C eingefroren.

3.2.2 BESTIMMUNGSMETHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMQUELLEN

3.2.2.1 PROTEINBESTIMMUNG NACH DER BCA-METHODE

Der Proteingehalt der einzelnen Präparationen wurde nach der BCA-Methode bestimmt [Smith *et al.*, 1985]. Das benutzte BCA Protein Assay Reagenz A setzt sich aus Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, 2,2'-Bis(4-aminophenyl)propan-5-ol, 2,2'-Bis(4-aminophenyl)propan-5-ol, Natriumtartrat in 0.1 N Natronlauge zusammen; Reagenz B besteht aus 4 %iger Kupfersulfat-Lösung. Vor der Bestimmung wurden beide Reagenzien im Verhältnis

51:1 miteinander vermischt. Das zu quantifizierende Protein wird dabei in alkalischer Lösung durch die Cu^{2+} -Ionen im Sinne einer Biuret-Reaktion komplexiert. Vermutlich bilden die durch Reduktion entstehenden Cu^+ -Ionen mit der BCA einen violett gefärbten Komplex [Wiechelman *et al.*, 1988]. Der Test ist schnell durchzuführen und mit einer Nachweisgrenze von 0.5 μg sehr empfindlich [Rehm, 2002].

Die Proteinbestimmung wurde nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

Reagenz	Probenwert [μl]	Blindwert [μl]
Proteinlösung	x	-
Aqua bidest	100 - x	100
BCA-Reagenz	900	900

Das Volumen der Proteinlösung betrug meistens 10 μl , wobei bei hoch konzentrierten Proben eine 1:10- bzw. 1:100-Vorverdünnung erforderlich war. In einem Schüttelwasserbad wurden die Proben 30 min bei 60°C inkubiert, in Eiswasser abgestoppt und innerhalb von 3 min gegen den Blindwert bei 562 nm spektralphotometrisch vermessen. Parallel wurde eine Kalibriergerade mit fünf verschiedenen Konzentrationen an Rinderserumalbumin-Standard (2.0 mg/ml in einer 0.9 %igen wässrigen NaCl-Lösung mit 0.05 % Natriumazid; Vorverdünnung 1:10) ermittelt, mit der anschließend die Proteingehalte berechnet werden konnten.

3.2.2.2 BESTIMMUNG DES CYTOCHROM P450-GEHALTS

Die Bestimmung des Cytochrom P450-Gehalts erfolgte nach der Vorschrift von Omura und Sato [1964] anhand des Differenzspektrums von reduziertem Cytochrom P450-CO-Komplex und reduziertem Cytochrom P450. Abhängig von der Enzympräparation wurden meistens 100 μl in einem Gesamtvolumen von 2 ml 50 mM Phosphatpuffer, pH 7.4 eingesetzt. Bei hoch konzentrierten Präparationen war eine 1:10-Vorverdünnung erforderlich. Die Bestimmung der in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierten Mikrosomen (CYP2D25, V60A1, Wildtyp W(N)) erfolgte durch Zugabe von 250 μl Proteinlösung und 100 μl einer 0.2 %igen

Triton X-100 Lösung in einem Gesamtvolumen von 1 ml 50 mM Phosphatpuffer, pH 7.4. Durch Zugabe von Natriumdithionit wurde das zu bestimmende P450-Enzym in seine reduzierte Form überführt. Nach 2 min wurde das erste Spektrum bei 400-500 nm gegen einen Blindwert aufgenommen. Nach zwei weiteren Minuten wurde Kohlenmonoxid für 1 min eingeleitet, erneut 2 min gewartet und erst dann das zweite Spektrum gegen Phosphatpuffer als Referenz aufgenommen. Durch Subtraktion der beiden Spektren wurde das Differenzspektrum erhalten. Mithilfe des empirisch ermittelten Absorptionskoeffizienten von $91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und der Differenz der Absorptionswerte von 450 nm und 490 nm wurde der Cytochrom P450-Gehalt der jeweiligen Enzympräparation berechnet.

3.2.2.3 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER NADH-CYTOCHROM B₅-REDUKTASE

Die Aktivitätsbestimmung der NADH-Cytochrom b₅-Reduktase erfolgte nach der Vorschrift von Mihara und Sato [1978] spektralphotometrisch durch Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat (III).

3.2.2.4 BESTIMMUNG DES CYTOCHROM B₅-GEHALTS

Der Cytochrom b₅-Gehalt wurde in Anlehnung an das von Estabrook und Werringloer [1978] entwickelte Verfahren durch Messung eines Differenzspektrums von reduzierter und oxidiertes Form des Cytochrom b₅ bestimmt.

3.2.3 REDUKTION VON BENZAMIDOXIM ZU BENZAMIDIN

3.2.3.1 MATERIALIEN

Die Angabe des Ortssitzes beteiligter Lieferfirmen erfolgt nur bei der ersten Nennung. Benzamidoxim, Benzamidin (Aldrich-Chemie, Steinheim), NADH (Fluka, Buchs, Schweiz), Lichrospher[®] RP-select und Vorsäule RP-select B (Merck, Darmstadt), DLPC (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), Natriumoctylsulfonat (Sigma-Aldrich), Acetonitril in HPLC-Qualität (LGC Promochem GmbH, Wesel), Kaliumchlorid (Fluka), Sorbitol (Fluka), Complete[®] Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (Roche Diagnostics GmbH,

Mannheim), CHAPS (Sigma, Taufkirchen), PS (Sigma), DOPC (Sigma), Glutathion (Merck), HEPES (Biochrom AG, Berlin), CYP2E1 aus humanen Lymphoblasten (Gentest Cooperation, Woburn, MA, USA/BD Biosciences, Heidelberg), rekombinantes Cytochrom b₅ (MBL, Woburn, MA, USA).

Benzamidoxim stand bereits im Arbeitskreis für die *in vitro* Biotransformationsstudien zur Verfügung. Es wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Krüger [1885] aus Benzonitril und Hydroxylamin synthetisiert.

An dieser Stelle nicht aufgeführte Materialien und Geräte sind bereits unter 3.2.1.1 bzw. 3.2.1.2 vermerkt.

3.2.3.2 GERÄTE

Die Angabe des Ortssitzes beteiligter Lieferfirmen erfolgt nur bei der ersten Nennung. InoLab pH-Meter pH Level 1 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim), Vibrationsmischer IKA Vibrax VXR (Jahnke & Kunkel, Staufen), Mikroliterzentrifuge EBA 12 (Hettich, Tuttlingen), Zentrifuge Hettich Universal 2S (Hettich), Schüttelwasserbad GFL 1083 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel), Vortexer VF2 (Jahnke & Kunkel), Ultraschallbad Sonorex Super RK 106 (Bandelin, Berlin), Sartorius[®] Vakuumfiltrationseinheiten (Sartorius, Göttingen), Sartorius[®] Membranfilter (Porendurchmesser 0.45 µm) (Sartorius).

Die speziell für die HPLC-Analytik verwendete Anlage wird detailliert unter 3.2.3.3 beschrieben.

3.2.3.3 HPLC-ANALYTIK ZUR DETEKTION VON BENZAMIDIN

Die HPLC-Analytik erfolgte in Anlehnung an das von Wohlers [1994] entwickelte Verfahren und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Octylsulfonat-Lösung wurde vor Zugabe des Acetonitrils mithilfe einer Vakuumfiltrationseinheit filtriert. Zur Entfernung des Sauerstoffs wurde das Fließmittel für 15 min im Ultraschallbad entgast.

HPLC-Pumpe	Waters [™] 600
	Waters [™] 600 Controller

Autosampler	Waters™ 717 plus
Detektor	Waters™ 2487 Dual λ Absorbance Detector
Integrator	EZChrom™ Elite Software, Version 2.8.3
Stationäre Phase	LiChrospher® 60 RP-select B, 250x4 mm, 5 μ m; Vorsäule: RP-select B, 4x4 mm, 5 μ m
Mobile Phase	10 mM Natriumoctylsulfonat / Acetonitril 83:17 (v/v)
Helium-Begasung	20 ml/min
Flussrate	1.0 ml/min
Detektion	UV-Detektor: 229 nm
Detektoreinstellungen	Aufs = 0.5
Laufzeit	30 min
Injektionsvolumen	10 μ l
Retentionszeiten	Benzamidoxim: 6.5 \pm 0.2 min Benzamidin: 21.9 \pm 0.5 min

3.2.3.4 *IN VITRO* INKUBATIONSBEDINGUNGEN

3.2.3.4.1 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Quantifizierung von Benzamidin wurde eine 7-Punkt-Kalibrierung erstellt, wobei definierte Konzentrationen des BA im Bereich von 0.5 bis 50 μ M in einem Gesamtvolumen von 300 μ l 100 mM Phosphatpuffer, pH 6.3 vermessen wurden.

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde zeitgleich mit der Kalibrierung durchgeführt. Diese Ansätze enthielten die bei der Kalibrierung eingesetzten Konzentrationen des BA sowie Substrat und hitzedenaturierte Schweinelebermikrosomen. Die Inkubation mit anschließender Aufarbeitung erfolgte wie unter 3.2.3.4.2 beschrieben.

3.2.3.4.2 Mikrosomales rekonstituiertes System aus dem Schwein

Die Inkubationen wurden in einem Schüttelwasserbad bei 37°C unter aeroben Bedingungen in 1.5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Ansätze setzten sich in Anlehnung an die von Möller [1997] beschriebenen optimierten Bedingungen wie folgt zusammen: Ein typischer Inkubationsansatz enthielt 0.5-1.0 U NADH-Cytochrom b₅-Reduktase, 100 pmol Cytochrom b₅, 5 µg gereinigte Benzamidoxim-Reduktase, 40 µM DLPC und 0.5 mM Benzamidoxim in 300 µl 100 mM Phosphatpuffer, pH 6.3. Nach dreiminütiger Vorinkubation im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 300 µl eisgekühltem Methanol abgestoppt, für 5 min geschüttelt und bei 10000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde per HPLC vermessen.

In Anlehnung an die Vorschrift von Stiborová *et al.* [2001] wurde zur Rekonstitution folgende Abwandlung der herkömmlichen Methode gewählt: Ein typischer Inkubationsansatz enthielt 0.35 U/ml NADH-Cytochrom b₅-Reduktase, 75 pmol rekombinantes Cytochrom b₅, 75 µg CHAPS, 5 µg DLPC, 5 µg PS, 5 µg DOPC, 3 mM Glutathion, 5 µg gereinigte Benzamidoxim-Reduktase und 0.5 mM Benzamidoxim in 150 µl 50 mM HEPES-Puffer, pH 6.3. Auch hier wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet.

Die Liposomen (DLPC, PS und DOPC), das CHAPS und das Glutathion wurden als Komplettmix (10x) in HEPES-Puffer vorgefertigt.

3.2.3.4.3 Rekombinante Enzympräparationen

Die Durchführung der Inkubation und die Aufarbeitung der Ansätze erfolgte wie unter 3.2.3.4.2 beschrieben. Ein typischer Inkubationsansatz enthielt 0.5-1.0 U NADH-Cytochrom b₅-Reduktase, 100 pmol Cytochrom b₅, 0.5 mg rekombinant exprimiertes Enzym und 0.5 mM Benzamidoxim in 300 µl 100 mM Phosphatpuffer, pH 6.3. Auch hier wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet.

In Anlehnung an die Vorschrift von Stiborová *et al.* [2001] wurde zur Rekonstitution folgende Abwandlung der herkömmlichen Methode gewählt: Ein typischer Inkubationsansatz enthielt 0.35 U/ml NADH-Cytochrom b₅-Reduktase, 75 pmol

rekombinantes Cytochrom b₅, 75 µg CHAPS, 5 µg DLPC, 5 µg PS, 5 µg DOPC, 3 mM Glutathion, 0.25 mg rekombinant exprimiertes Enzym und 0.5 mM Benzamidoxim in 150 µl 50 mM HEPES-Puffer, pH 6.3. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM NADH gestartet.

3.2.3.4.4 Mikrosomale und mitochondriale Enzympräparationen

Ein Inkubationsansatz setzte sich typischerweise aus 0.5 mg mikrosomalem bzw. mitochondrialem Protein und 0.5 mM Benzamidoxim in 300 µl 100 mM Phosphatpuffer, pH 6.3 zusammen. Durch Zugabe von 1 mM NADH wurde die Reaktion gestartet.

3.2.4 OXIDATION VON 1 α -HYDROXYVITAMIN D₃ ZU 1 α ,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃

3.2.4.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

Die Angabe des Ortssitzes beteiligter Lieferfirmen erfolgt nur bei der ersten Nennung. 1 α -Hydroxyvitamin D₃ (Leo Pharma, Kopenhagen, Dänemark), 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (Solvay-Duphar, Weesp, Niederlande), NADPH (Fluka, Buchs, Schweiz), gereinigte humane NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (rekombinant) (Gentest Cooperation, Woburn, MA, USA/BD Biosciences, Heidelberg), humane NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-Mikrosomen (Gentest/BD Biosciences), *n*-Hexan (Mallinckrodt Baker B. V., Deventer, Niederlande), Isopropanol LiChrosolv[®] (Merck, Darmstadt), Dichlormethan LiChrosolv[®] (Merck), Methanol (Mallinckrodt Baker B. V.), 1,1,1-Trichlorethan (Merck), Reagenzgläser mit Gewinde, 13x100 (VWR, Darmstadt), Säulenmaterialien (Merck), Glasgefäße und Spitzgefäße (Eydam). ESQUIRE~LC Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen), EsquireControl Software, Version 4.0 zur Datenübertragung und DataAnalysis, Version 3.0 zur Datenanalyse.

An dieser Stelle nicht aufgeführte Materialien und Geräte sind bereits unter 3.2.1.1 bzw. 3.2.1.2 vermerkt.

3.2.4.2 HPLC-ANALYTIK MIT UV-DETEKTION

Die HPLC-Analytik erfolgte in Anlehnung an das bei Axén *et al.* [1992] beschriebene Verfahren mit leichten Modifizierungen und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Auf eine radioaktive Markierung der Substanzen zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde verzichtet. Da die 25-Hydroxylase-Aktivität von CYP2D25 gegenüber 1α -Hydroxyvitamin D₃ sehr viel höher ist als gegenüber Vitamin D₃ [Postlind und Wikvall, 1988], wurde 1α -Hydroxyvitamin D₃ als Substrat eingesetzt.

Angaben zur NP-HPLC:

HPLC-Pumpe	Waters™ 600 Waters™ 600 Controller
Autosampler	Waters™ 717 plus
Detektor	Waters™ 2487 Dual λ Absorbance Detector
Integrator	EZChrom™ Elite Software, Version 2.8.3
Stationäre Phase	LiChrosorb® Si 60, 125x4 mm, 5 μ m Vorsäule: LiChrospher® Si 60, 4x4 mm, 5 μ m
Mobile Phase	<i>n</i> -Hexan/Isopropanol (9:1, v/v)
Flussrate	0.7 ml/min
Detektion	UV-Detektor: 265 nm
Detektoreinstellungen	Aufs = 0.5
Laufzeit	25 min
Injektionsvolumen	100 μ l
Retentionszeiten	1α -Hydroxyvitamin D ₃ : 8.0 \pm 0.5 min $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D ₃ : 16.5 \pm 0.5 min

Angaben zur RP-HPLC:

HPLC-Pumpe	Waters™ 600 Waters™ 600 Controller
Autosampler	Wisp 710B, Millipore
Detektor	Waters™ 2487 Dual λ Absorbance Detector
Integrator	EZChrom™ Software, Version 6.7
Stationäre Phase	LiChrosorb® RP-18, 125x4 mm, 5 μ m Vorsäule: RP-select B, 4x4 mm, 5 μ m

Mobile Phase	Methanol/Wasser (85:15, v/v)
Flussrate	0.5 ml/min
Detektion	UV-Detektor: 265 nm
Detektionseinstellungen	Aufs = 0.005
Laufzeit	60 min
Injektionsvolumen	100 µl
Retentionszeiten	1 α -Hydroxyvitamin D ₃ : 48.0 \pm 0.5 min 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃ : 9.0 \pm 0.5 min

3.2.4.3 *IN VITRO* INKUBATIONSBEDINGUNGEN

3.2.4.3.1 Kalibrierung und Wiederfindung

Die quantitative Bestimmung des Metaboliten 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ erfolgte mithilfe einer 4-Punkt-Kalibrierung, wobei definierte Konzentrationen des Metaboliten im Bereich von 2-10 pmol in einem Gesamtvolumen von 1 ml eines 50 mM Trisacetatpuffers, pH 7.4 vermessen wurden. Dazu wurde eine 4 mM Stammlösung des Metaboliten (gelöst in Isopropanol) zunächst 1:10000 mit Isopropanol verdünnt. Alle weiteren Verdünnungsschritte wurden mit RP-Fließmittel durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 100 µl.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate enthielten die Ansätze die bei der Kalibrierung eingesetzten Konzentrationen des 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ sowie 1 α -Hydroxyvitamin D₃ und hitzedenaturierte Schweinelebermikrosomen. Die Inkubation und anschließende Aufarbeitung erfolgten wie unter 3.2.3.4.2, 3.2.4.4 und 3.2.4.5 beschrieben.

3.2.4.3.2 Mikrosomale Enzympräparationen

Inkubationspuffer:	50 mM Trisacetatpuffer, pH 7.4
	20 % Glycerol
	0.1 mM EDTA

Der pH-Wert des Inkubationspuffers wurde mit konzentrierter Essigsäure eingestellt.

Die Inkubationen wurden in einem Schüttelwasserbad bei 37°C unter aeroben Bedingungen in Glasgefäßen durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz setzte sich aus 1 mg Protein (SLM bzw. rekombinantes CYP2D25 mit coexprimierter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase) und 40 µg 1 α -Hydroxyvitamin D₃ in einem Gesamtvolumen von 1 ml Trisacetatpuffer, pH 7.4 zusammen. Nach einer dreiminütigen Vorinkubation im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 1.2 µmol NADPH gestartet. Nach 30 min wurde die Umsetzung durch Zugabe von 5 ml eines Gemisches aus 1,1,1-Trichlorethan/Methanol (2:1, v/v) abgestoppt.

3.2.4.4 PROBENAUFBEREITUNG

Nach Abstoppen der Reaktion wurden die Ansätze 1 min gevortext und 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Die organische Phase wurde quantitativ mit einer Pipette abgezogen. Anschließend wurden erneut 5 ml des Gemisches aus 1,1,1-Trichlorethan/Methanol (2:1, v/v) zur wässrigen Phase hinzugegeben, gevortext und zentrifugiert. Beide organischen Phasen wurden in einem Spitzgefäß vereinigt und unter N₂-Begasung bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 130 µl NP-Fließmittel aufgenommen, kurz gevortext und kurz zentrifugiert. 100 µl dieser Probe wurden mittels NP-HPLC vermessen.

3.2.4.5 HPLC-TRENNUNG

Zunächst wurde eine erste Auftrennung der Substanzen über eine NP-HPLC durchgeführt. Mithilfe eines Standards wurde die Retentionszeit des Metaboliten bestimmt und eine Fraktion aufgefangen, die im Bereich der Retentionszeit \pm 2 min lag. Nach Eindampfen unter N₂-Begasung wurde der Rückstand in 130 µl RP-Fließmittel aufgenommen, kurz gevortext und der RP-HPLC zugeführt. Das Injektionsvolumen betrug wieder 100 µl. Auch hier wurde die Retentionszeit mithilfe eines Standards überprüft.

3.2.5 LC/MS-ANALYTIK ZUR BESTIMMUNG DES METABOLITEN $1\alpha,25$ -DIHYDROXYVITAMIN D_3

Das unter 3.2.4.2 beschriebene Verfahren wurde durch eine anschließende MS-Analytik erweitert, um den Metaboliten quantitativ bestimmen zu können. Die NP-HPLC wurde entsprechend 3.2.4.2 durchgeführt. Bei der RP-HPLC ergaben sich folgende Änderungen:

HPLC-Pumpe	HP Series 1100 Binary Pump
Entgaser	HP Series 1100 Degasser
Injektor	Rheodyne 100 μ l Probenschleife
Detektor	HP Series 1100 Detector
Detektion	UV-Detektion bei 265 nm
Mobile Phase	A: Methanol/Wasser (85:15, v/v) B: Methanol (100 %)

Gradientenprofil	Laufzeit [min]	A [%]	B [%]
	0-12	100	0
	12-15	linearer Gradient auf 100 % B	
	15-18	0	100
	18-20	linearer Gradient auf 100 % A	
	20-25	100	0

Laufzeit	25 min
Retentionszeiten	1α -Hydroxyvitamin D_3 : 21.3 ± 0.5 min $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 : 9.0 ± 0.5 min

Angaben zum Massenspektrometer:

Massenspektrometer	ESQUIRE~LC
Interface	APCI
Nebulizer	7 psi
Dry Gas	4 l/min
Dry Temperatur	300°C
APCI Temperatur	450°C

3.2.5.1 IN VITRO INKUBATIONSBEDINGUNGEN

3.2.5.1.1 Direktkalibrierung, Kalibrierung und Wiederfindung

Zunächst wurde eine Direktkalibrierung an der LC/MS durchgeführt. Dazu wurden definierte Konzentrationen (2, 5, 8 und 10 pmol) in RP-Fließmittel hergestellt und direkt, d.h. ohne jegliche Aufarbeitung, in die RP-HPLC-Anlage eingespritzt. Der Vergleich dieser Direktkalibrierung mit der Kalibrierung und Wiederfindung, deren Ansätze jeweils aufgearbeitet wurden (siehe 3.2.5.1.2, 3.2.5.2 und 3.2.5.3), sollte verdeutlichen, wie hoch der Verlust an Metabolit allein durch das Ausschütteln, Eindampfen und Auffangen ist.

Die quantitative Bestimmung des Metaboliten $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ erfolgte mithilfe einer 4-Punkt-Kalibrierung, wobei definierte Konzentrationen des Metaboliten im Bereich von 2-10 pmol in einem Gesamtvolumen von 1 ml eines 50 mM Trisacetatpuffers, pH 7.4 vermessen wurden. Dazu wurde eine 4 mM Stammlösung des Metaboliten (gelöst in Isopropanol) zunächst 1:10000 mit Isopropanol verdünnt. Alle weiteren Verdünnungsschritte wurden mit NP-Fließmittel durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug 100 µl. Die Kalibrierung wurde genauso inkubiert und aufgearbeitet wie ein Ansatz der Wiederfindung.

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate erfolgte wie unter 3.2.4.3.1 beschrieben. Die Inkubation und anschließende Aufarbeitung erfolgten wie unter 3.2.5.1.2, 3.2.5.2 und 3.2.5.3 beschrieben.

3.2.5.1.2 Mikrosomale und mitochondriale Enzympräparationen aus verschiedenen Organen und Spezies

Die Inkubationen wurden in Anlehnung an die Vorschrift von Hosseinpour *et al.* [2001] durchgeführt. Sie wurden unter aeroben Bedingungen in einem Schüttelwasserbad bei 37°C in Glasgefäßen inkubiert. Ein typischer Inkubationsansatz setzte sich aus 0.5 mg bzw. 1 mg Protein und 10 µM 1α -Hydroxyvitamin D₃ in einem Gesamtvolumen von 1 ml Trisacetatpuffer, pH 7.4 zusammen. Auch hier wurde die Reaktion nach einer fünfminütigen Vorinkubation im Schüttelwasserbad durch Zugabe von 1 mM NADPH gestartet.

3.2.5.1.3 Rekombinante mikrosomale Enzympräparationen

Bei Ansätzen mit rekombinantem CYP2D25 aus Hefezellen, bei dem keine NADPH-Cytochrom P450-Reduktase coexprimiert wurde, musste die Reduktase exogen hinzugefügt werden. Hier erfolgte zusätzlich zu dem unter 3.2.5.1.2 beschriebenen Ansatz die Zugabe von 1 U humaner NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-Mikrosomen bzw. gereinigter humaner NADPH-Cytochrom P450-Reduktase. Die Expression dieser Reduktasen erfolgte in Insektenzellen, die durch Baculoviren infiziert worden waren. Die daraus isolierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase wurde durch eine Affinitätschromatographie nach der Methode von Yasukochi und Masters [1976] gereinigt.

Bei den Ansätzen mit rekombinantem CYP2A13, das in *Sf9*-Zellen exprimiert wurde, wurde analog verfahren. CYP2A13 wurde freundlicherweise von X. Zhang, New York, USA zur Verfügung gestellt.

3.2.5.1.4 Mikrosomales rekonstituiertes System aus dem Schwein

Die Durchführung der Inkubation erfolgte wie unter 3.2.5.1.2 beschrieben. Ein typischer Inkubationsansatz setzte sich aus 50 µg gereinigter Benzamidoxim-Reduktase, 10 µM 1 α -Hydroxyvitamin D₃, 1 U humaner NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-Mikrosomen bzw. gereinigter humaner NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (rekombinant), 40 µM DLPC (gelöst in 50 mM Trisacetatpuffer, pH 7.4) und 1 mM NADPH in einem Gesamtvolumen von 1 ml Trisacetatpuffer, pH 7.4 zusammen.

Bei einigen Ansätzen wurde auch 1 U der aus Schweineleber gereinigten NADPH-Cytochrom P450-Reduktase eingesetzt, um so ein vollständig porcines rekonstituiertes Enzymsystem zu erhalten. Diese Reduktase wurde freundlicherweise von S. Friedrich zur Verfügung gestellt.

3.2.5.1.5 Mitochondriale rekombinante Enzympräparation

Die Zusammensetzung der Ansätze erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Pikuleva *et al.* [1997]. Neben 0.1 nmol humanem CYP27A waren im Ansatz noch

2 nmol Adrenodoxin, 0.4 nmol NADPH-Adrenodoxin-Reduktase und 30 μ M 1 α -Hydroxyvitamin D₃ in einem Gesamtvolumen von 1 ml eines 40 mM Phosphatpuffers enthalten. Die Reaktion wurde nach einer fünfminütigen Vorinkubation im Schüttelwasserbad bei 37°C durch Zugabe von 1 mM NADPH gestartet.

Alle in diesen Inkubationsansätzen verwendeten Enzyme wurden freundlicherweise von I. Pikuleva, Nashville, TN, USA für diese Metabolismusstudien zur Verfügung gestellt.

3.2.5.2 PROBENAUFBEREITUNG

Bei dieser Methode erfolgte das Abstoppen der 30-minütigen Inkubation durch Zugabe von 5 ml Dichlormethan/Methanol (2:1, v/v). Die Ansätze wurden 2 min gevortext und anschließend 5 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Die organische Phase wurde mit einer Pipette quantitativ abgezogen und in ein Einwegreagenzglas mit Gewinde überführt. Anschließend wurde die organische Phase unter N₂-Begasung bis zur Trockne eingedampft, in 110 μ l NP-Fließmittel aufgenommen, 30 sec gevortext, kurz zentrifugiert und der NP-HPLC zugeführt. Das Injektionsvolumen betrug 100 μ l.

3.2.5.3 LC/MS

Die HPLC-Trennung wurde wie unter 3.2.4.5 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurde die RP-HPLC mit einem Massenspektrometer gekoppelt, um den Metaboliten eindeutig bestimmen zu können. Die Ionisierung der Probe erfolgte durch die APCI-Technik.

3.2.6 O-DEMETHYLIERUNG VON DEXTROMETHORPHAN ZU DEXTROPHAN

3.2.6.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

Die Angabe des Ortssitzes beteiligter Lieferfirmen erfolgt nur bei der ersten Nennung. Dextrophan (Sigma, Taufkirchen), Dextromethorphan (Sigma).

An dieser Stelle nicht aufgeführte Materialien und Geräte sind bereits unter 3.2.1.1, 3.2.1.2, 3.2.3.1, 3.2.3.2 bzw. 3.2.4.1 vermerkt.

3.2.6.2 HPLC-ANALYTIK ZUR DETEKTION VON DEXTRORPHAN

Die HPLC-Analytik wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Möller [1997] und Harsdorf [1998] durchgeführt. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

HPLC-Pumpe	Waters™ 600 Waters™ 600 Controller
Autosampler	Waters™ 717 plus
Detektor	Waters™ 474 Scanning Fluorescence Detector
Integrator	EZChrom™ Elite Software, Version 2.8.3
Stationäre Phase	Symmetry™ C18 (Waters); 250x4.6 mm, 5 µm; Vorsäule: Phenomenex® C18, 4x3 mm
Mobile Phase	1% Essigsäure in Aqua bidest., pH 4.5 (eingestellt mit konz. NH ₃) / Acetonitril 70:30 (v/v)
Flussrate	0.9 ml/min
Detektion	Fluoreszenzdetektor: Ex 227 nm, Em 311 nm
Detektoreinstellungen	Gain: 100, Attenuation: 128
Laufzeit	20 min
Injektionsvolumen	10 µl
Retentionszeiten	Dextrorphan: 4.3 ± 0.2 min Dextromethorphan: 8.5 ± 0.4 min

Das Essigsäure-Aqua bidest.-Gemisch wurde mithilfe einer Vakuumfiltrationseinheit filtriert (Porendurchmesser 0.45 µm). Zur Entfernung des Sauerstoffs wurde das Fließmittel nach Zugabe des Acetonitrils in einem Ultraschallbad für 15 min entgast.

3.2.6.3 *IN VITRO* INKUBATIONSBEDINGUNGEN

3.2.6.3.1 Kalibrierung und Wiederfindung

Zur Quantifizierung des Metaboliten Dextrorphan wurde eine 11-Punkt-Kalibrierung erstellt, wobei definierte Konzentrationen des Metaboliten im Bereich von 0.1-50 μM in einem Gesamtvolumen von 300 μl 100 mM Phosphatpuffer, pH 7.4 vermessen wurden.

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde zeitgleich mit der Kalibrierung durchgeführt. Diese Ansätze enthielten die bei der Kalibrierung eingesetzten Konzentrationen des Dextrorphans sowie Dextromethorphan und hitzedenaturierte Schweinelebermikrosomen. Die Inkubation und anschließende Aufarbeitung erfolgten wie unter 3.2.6.3.2 beschrieben.

3.2.6.3.2 Mikrosomale und rekombinante Enzympräparationen

Die Inkubationen wurden in einem Schüttelwasserbad bei 37°C unter aeroben Bedingungen in 1.5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein typischer Inkubationsansatz enthielt 0.5 mg SLM und 60 μM Dextromethorphan in einem Gesamtvolumen von 300 μl 100 mM Phosphatpuffer, pH 7.4. Nach fünfminütiger Vorinkubation im Wasserbad wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 mM NADPH gestartet. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 300 μl eisgekühltem Methanol abgestoppt, für 5 min geschüttelt und bei 10000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde per HPLC vermessen.

Bei rekombinanten Enzympräparationen bestand ein Inkubationsansatz für gewöhnlich aus 0.5 mg rekombinantes Protein, 60 μM Substrat, 0.5 U NADPH-Cytochrom P450-Reduktase und 1mM NADPH in einem Gesamtvolumen von 300 μl 100 mM Phosphatpuffer, pH 7.4.

3.2.7 AUFNAHME VON SUBSTRATBINDUNGSSPEKTREN

3.2.7.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

Natriumdithionit (Fluka, Buchs, Schweiz), DMSO (Merck, Darmstadt), 70 µl UV-Küvetten mikro (Brand, Wertheim);

Spectrophotometer Carey 50 Bio (Varian, Darmstadt).

An dieser Stelle nicht aufgeführte Materialien und Geräte sind bereits unter 3.2.1.1, 3.2.1.2, 3.2.3.1, 3.2.3.2 bzw. 3.2.4.1 vermerkt.

3.2.7.2 SUBSTRATBINDUNGSSPEKTREN MIT SCHWEINELEBERMIKROSOMEN

Zur Aufnahme von Substratbindungsspektren mit SLM wurden diese zunächst in 100 mM Phosphatpuffer, pH 7.4 auf eine Endkonzentration von 1 µM verdünnt. Das Substrat Benzamidoxim wurde in demselben Puffer gelöst und daraus eine Lösung mit einer Konzentration von 100 mM hergestellt.

Die Aufnahme von Bindungsspektren wurde nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

Probe	Referenzwert
70 µl Enzympräparation	70 µl Enzympräparation
+ 1 µl Substratlösung	+ 1 µl Phosphatpuffer, pH 7.4
+ 1 µl Substratlösung	+ 1 µl Phosphatpuffer, pH 7.4
+ 1 µl Substratlösung	+ 1 µl Phosphatpuffer, pH 7.4
+ 5 µl Substratlösung	+ 5 µl Phosphatpuffer, pH 7.4

Zu Beginn der Messungen wurde ein Absolutspektrum der jeweiligen Enzympräparation gegen 100 mM Phosphatpuffer in einem Wellenlängenbereich von 360 bis 500 nm bei Raumtemperatur aufgenommen. Nach Ermittlung der Basislinie wurde Substratlösung nach oben aufgeführtem Pipettierschema in die Probenküvette pipettiert und anschließend ein Differenzspektrum gegen die Referenzküvette, in die

statt Benzamidoxim in steigender Menge Phosphatpuffer gegeben wurde, aufgenommen.

3.2.7.3 SUBSTRATBINDUNGSSPEKTREN MIT REKOMBINANTEM CYP2D25 (OHNE COEXPRIMIERTER NADPH-CYTOCHROM P450-REDUKTASE)

Die Zusammensetzung der Ansätze und die Vermessung erfolgten wie unter 3.2.7.2 beschrieben, allerdings besaßen die Enzympräparationen eine Endkonzentration von 0.6 µM.

3.3 ERGEBNISSE

3.3.1 VERGLEICH VON CYP2D-ISOENZYMEN UNTERSCHIEDLICHER SPEZIES

In Tab. 3-2 werden die Aminosäuresequenzen weiterer CYP2D-Isoenzyme verschiedener Spezies in den entsprechenden Abschnitten zu den Peptiden der BAO-Reduktase miteinander verglichen. In Maus und Ratte sind noch weitere CYP2D-Isoenzyme bekannt; in dieser Tabelle wird aber nur jeweils ein Isoenzym der jeweiligen Spezies beispielhaft herausgegriffen. CYP2D2 (Ratte) und CYP2D9 (Maus) katalysieren jeweils Reaktionen sowohl im Lipid-, Steroid- bzw. Fettsäuremetabolismus als auch den Abbau von Xenobiotika [Wong *et al.*, 1989; Hiroi *et al.*, 2002]. Beim Vergleich der einzelnen Peptidfragmente fällt auf, dass Peptid 1 deutliche Unterschiede innerhalb der verschiedenen Säugetierarten zeigt. Während die Fragmente des CYP2D25 und der Benzamidoxim-Reduktase zwar identisch sind, sind die Fragmente aus Maus und Ratte bis auf wenige Aminosäuren völlig verschieden. Hingegen sind die Fragmente aus Mensch und Affe in diesem Bereich einander sehr ähnlich und unterscheiden sich lediglich in vier Aminosäuren. Peptid 2 hingegen ist bei fast allen Isoenzymen identisch. Lediglich CYP2D2 zeigt zwei Aminosäureaustausche. Das spricht für einen stark konservierten Bereich innerhalb der CYP2D-Isoenzyme in allen Spezies.

Im dritten Peptid sind die Unterschiede weniger gravierend als im ersten. Meist sind nur drei Aminosäuren gegenüber den Fragmenten des dritten Proteins ausgetauscht. Affe und Mensch unterscheiden sich in diesem Fragment sogar nur in einer einzigen Aminosäure. Nach neuesten Erkenntnissen liegt im dritten Peptidfragment der BAO-Reduktase kein Austausch des Isoleucins gegen Methionin mehr vor (siehe 4.3.1). Somit besteht eine 100 %ige Homologie zwischen den aufgeführten Peptiden der BAO-Reduktase und CYP2D25. Auffällig ist, dass alle anderen Isoenzyme der verschiedenen Spezies an dieser Position ein Methionin aufweisen.

Daraus lässt sich schließen, dass die Fragmente der Benzamidoxim-Reduktase eine hohe Homologie zu CYP2D-Isoenzymen verschiedener Spezies aufweisen, wodurch eine eindeutige Zuordnung zu CYP2D möglich ist [Clement *et al.*, 1997]. Nach dieser

Sequenzanalyse sind CYP2D25 und die Benzamidoxim-Reduktase völlig identisch, sodass angenommen werden kann, dass beide Enzyme dieselben Reaktionen katalysieren können.

Tab. 3-2 Vergleich der Aminosäuresequenzen der drei Peptidfragmente der Benzamidoxim-Reduktase mit den entsprechenden Bereichen anderer CYP2D-Isoenzyme verschiedener Spezies

Sus scrofa = Schwein; Homo sapiens = Mensch; Mus musculus = Maus; Rattus norvegicus = Ratte; Macaca fascicularis = Affe; -: identische Aminosäure wie in den Peptidfragmenten der Benzamidoxim-Reduktase.

Genbank Accession Numbers: ^a O46658; ^b O4HUD1; ^c P11714 ; ^d P10634; ^e Q29488

Spezies	Fragment	Aminosäuresequenz															
S. scrofa	Peptid 1	M	L	K	L	L	D	L	V	L	E	G	L	K	E	E	
S. scrofa	CYP2D25 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
H. sapiens	CYP2D6 ^b	F	-	R	-	-	-	-	A	Q	-	-	-	-	-	-	
M. musculus	CYP2D9 ^c	L	I	R	M	-	K	V	L	E	Q	S	-	T	-	V	
R. norvegicus	CYP2D2 ^d	F	N	R	M	-	K	T	L	K	-	S	F	G	-	D	
M. fascicularis	CYP2D17 ^e	F	-	R	-	F	-	-	T	H	-	A	-	-	-	-	
S. scrofa	Peptid 2	M	I	L	H	P	D	V	Q	R	R	V	Q	Q	E	I	D
S. scrofa	CYP2D25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H. sapiens	CYP2D6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. musculus	CYP2D9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R. norvegicus	CYP2D2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	H	E	-	-	-
M. fascicularis	CYP2D17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S. scrofa	Peptid 3	D	E	V	I	G	H	V	R	Q	P	E	I				
S. scrofa	CYP2D25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
H. sapiens	CYP2D6	-	D	-	-	-	Q	-	-	R	-	-	M				
M. musculus	CYP2D9	-	-	-	-	-	Q	-	-	H	-	-	M				
R. norvegicus	CYP2D2	-	-	-	-	-	Q	-	-	R	-	-	M				
M. fascicularis	CYP2D17	-	-	-	-	-	Q	-	-	R	-	-	M				

3.3.2 CHARAKTERISIERUNG DER ENZYMQUELLEN

3.3.2.1 SPEZIFISCHE CYTOCHROM P450-GEHALTE UND PROTEINGEHALTE DER VERWENDETEN ENZYMPRÄPARATIONEN

Nach der Gewinnung der einzelnen Enzympräparationen wurden sowohl der Proteingehalt nach der unter 3.2.2.1 beschriebenen BCA-Methode als auch der P450-Gehalt (siehe 3.2.2.2) nach Omura und Sato [1964] bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-3 zusammengefasst.

Tab. 3-3 *Charakterisierung der verwendeten Enzympräparationen*

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus je zwei separaten Messungen. S: Schwein, H: Human, L: Leber, N: Niere; n.d.: nicht detektierbar. Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Werte sind Literaturwerte [Deters, 2002 bzw. Mau, 2002]. Die HL-Mikrosomen wurden bei der Firma Gentest/BD Biosciences käuflich erworben. °: Angaben des Herstellers; #: Präparation von M. Hidestrand, Stockholm, Karolinska Institut. Bei diesen Mikrosomen ist die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase coexprimiert. Die Gehalte wurden in Stockholm bestimmt.

Enzympräparation	Proteingehalt [mg/ml]	spez. Cytochrom P450-Gehalt [nmol/mg]
SL-Mikrosomen	37.50	0.102
SN-Mikrosomen	44.40*	0.22*
SL-Mitochondrien	56.13*	0.19*
SN-Mitochondrien	50.06*	0.36*
HL-Mikrosomen	20.00°	0.42°
HL-Mitochondrien	21.29*	0.31*

Rekombinante Enzympräparation	Proteingehalt [mg/ml]	spez. Cytochrom P450-Gehalt [pmol/mg]
CYP2D25 [#]	7.0	33.00
CYP2D25 D3 (010404)	12.5	79.84
CYP2D25 B1 (010404)	14.5	96.45
V60A1 D2 (010404)	5.2	n.d.
Wildtyp W(N) (010404)	14.4	n.d.

3.3.2.2 CHARAKTERISIERUNG DES GEREINIGTEN DRITTEN PROTEINS

Das nach der unter 3.2.1.5.1 beschriebenen Methode gereinigte dritte Protein wies einen Proteingehalt von 2.7 mg/ml und einen spezifischen Cytochrom P450-Gehalt von 2.72 nmol/mg auf.

3.3.2.3 BESTIMMUNG DER NADH-CYTOCHROM B₅-REDUKTASE-AKTIVITÄT

Die nach 3.2.1.5.2 gereinigte NADH-Cytochrom b₅-Reduktase wies eine Aktivität (siehe 3.2.2.3) von 0.182 U/μl und einen Proteingehalt von 1.842 mg/ml auf.

3.3.2.4 BESTIMMUNG DES PROTEINGEHALTS VON CYTOCHROM B₅

Der Proteingehalt des Cytochrom b₅ wurde nach der unter 3.2.2.1 beschriebenen Methode bestimmt und betrug 2.18 mg/ml.

Das in *E. coli* rekombinant exprimierte humane Cytochrom b₅ der Firma MBL wies einen Proteingehalt von 0.8 mg/ml mit einer spezifischen Aktivität von 60 nmol/mg auf.

3.3.2.5 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER NADPH-CYTOCHROM P450-REDUKTASE

Die humanen NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-Mikrosomen und die gereinigte humane NADPH-Cytochrom P450-Reduktase wurden bei der Firma Gentest/BD Biosciences gekauft. Die Aktivität der Mikrosomen betrug 21.01 U/ml, die der gereinigten humanen Reduktase 555.6 U/ml.

Die aus der Schweineleber gereinigte Reduktase zeigte eine Aktivität von 14.7 U/ml [Friedrich, 2003].

3.3.3 REDUKTION VON BENZAMIDOXIM ZU BENZAMIDIN

3.3.3.1 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG

Zur quantitativen Bestimmung des aus Benzamidoxim gebildeten Benzamidins wurde eine Kalibrierung und Wiederfindung mit der unter 3.2.3.3 beschriebenen HPLC-Analytik durchgeführt. Abb. 3-1 zeigt die durch jeweils lineare Regression erhaltene Ausgleichsgerade der Kalibrierung und der Wiederfindung. Alle Funktionen der Kalibrierungen und Wiederfindungen waren in dem untersuchten Konzentrationsbereich linear.

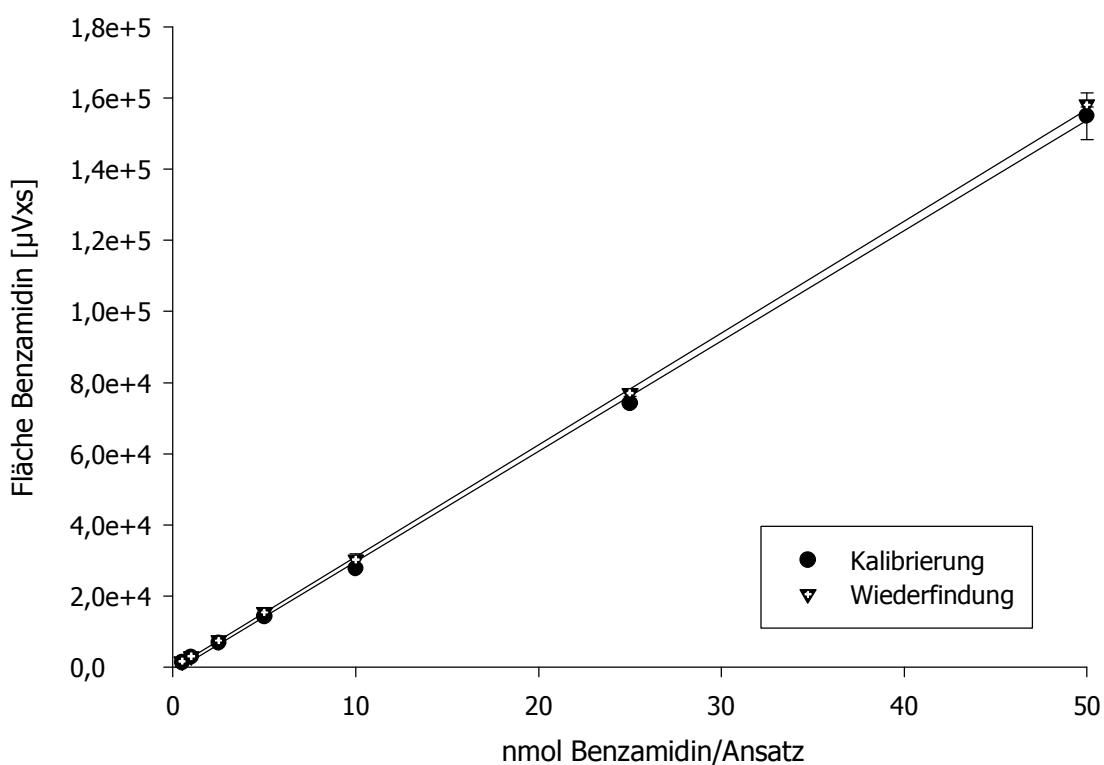


Abb. 3-1 *Kalibrierung und Wiederfindung von Benzamidin*

Die Signalflächen sind die Mittelwerte \pm SD aus $n = 2$ Inkubationen, jeweils 2x vermessen; Kalibrierung $r = 0.998$; Wiederfindung $r = 0.999$.

3.3.3.2 *IN VITRO* REDUKTION VON BENZAMIDOXIM ZU BENZAMIDIN DURCH MIKROSOMEN UND MITOCHONDRIEN AUS DER SCHWEINELEBER

Die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin wurde zunächst mit mikrosomalen und mitochondrialen Präparationen aus dem Schwein überprüft. Sowohl SL-Mikrosomen als auch SL-Mitochondrien reduzierten Benzamidoxim (siehe Tab. 3-4). Die Umsetzungsrate konnte durch Zusatz von gereinigter NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase und Cytochrom b_5 sogar um 60 % gesteigert werden, wodurch eine Beteiligung beider Enzyme bestätigt wird.

Tab. 3-4 *Reduktion von Benzamidoxim durch verschiedene Präparationen aus der Schweineleber*

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die jeweils 2x vermessen wurden.

Inkubationsansatz	nmol Benzamidin * min^{-1} * mg Protein^{-1}
SL-Mikrosomen komplett	18.38 \pm 1.22
SL-Mikrosomen ohne NADH	1.47 \pm 0.61
SL-Mikrosomen + b_5 -Reduktase + b_5	29.46 \pm 0.73
SL-Cytosol komplett	1.92 \pm 0.04
SL-Mitochondrien komplett	16.95 \pm 0.85

3.3.3.3 *IN VITRO* REDUKTION VON BENZAMIDOXIM ZU BENZAMIDIN DURCH DAS REKONSTITUIERTE SYSTEM AUS DEM SCHWEIN

Auch die Aktivität des rekonstituierten Systems im Benzamidoxim-Reduktase-Assay musste getestet werden und gewährleistet sein, um es auch für andere Assays, wie z.B. im 1α -Hydroxyvitamin D_3 25-Hydroxylase-Assay, einsetzen zu können. Die Ansätze setzten sich wie unter 3.2.3.4.2 beschrieben zusammen. Wie aus Tab. 3-5 ersichtlich wird, zeigte das komplette rekonstituierte System, bestehend u.a. aus der Benzamidoxim-Reduktase, Cytochrom b_5 und der NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase, hohe Umsetzungsraten. Ansätze, denen entweder eines der drei Enzyme fehlte oder

die kein Cosubstrat NADH enthielten, zeigten keine oder nur sehr geringe Umsetzungsraten. Zur Berechnung der Umsetzungsraten wurde der Gesamtproteingehalt, der sich z.B. beim Komplettansatz aus allen drei Enzymen zusammensetzte, herangezogen.

Tab. 3-5 *Reduktion von Benzamidoxim durch das rekonstituierte System aus der Schweineleber*

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die jeweils 2x vermessen wurden.

Inkubationsansatz	nmol Benzamidin * min ⁻¹ * mg Protein ⁻¹
rekonst. System komplett	24.23 \pm 3.16
ohne Cytochrom b ₅	n.d.
ohne Cytochrom b ₅ -Reduktase	2.86 \pm 0.09
ohne Benzamidoxim-Reduktase	0.049 \pm 0.003
ohne NADH	n.d.

Nach Stiborová *et al.* [2001] wurde eine Methode entwickelt, bei der das dritte Protein zusammen mit Cytochrom b₅, NADH-Cytochrom b₅-Reduktase und einem Gemisch aus Liposomen, CHAPS und Glutathion in HEPES-Puffer rekonstituiert wurde (siehe 3.2.3.4.2). Wie aus Tab. 3-6 hervorgeht, wurde durch das rekonstituierte System sowohl in Phosphatpuffer als auch in HEPES-Puffer unter Zusatz des Gemisches Benzamidin gebildet, jedoch waren die Umsetzungsraten in HEPES-Puffer gegenüber Phosphatpuffer um den Faktor 4 verringert. Wurde dabei eine Proteinkomponente bzw. das Cosubstrat durch HEPES-Puffer ersetzt, konnte keine Benzamidin-Bildung detektiert werden.

Tab. 3-6 Reduktion von Benzamidoxim durch das rekonstituierte System aus der Schweineleber nach Stiborová et al. [2001]

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die jeweils 2x vermessen wurden.

Der „Mix“ setzte sich aus Liposomen, CHAPS und Glutathion zusammen.

Inkubationsansatz	nmol Benzamidin * min ⁻¹ * mg Protein ⁻¹
rekonst. System komplett in Phosphatpuffer + DLPC	7.98 \pm 0.15
rekonst. System komplett in Phosphatpuffer + Mix	10.48 \pm 0.23
rekonst. System komplett in HEPES-Puffer + DLPC	4.69 \pm 0.08
rekonst. System komplett in HEPES-Puffer + Mix	2.38 \pm 0.08
ohne Cytochrom b ₅	n.d.
ohne Cytochrom b ₅ -Reduktase	n.d.
ohne Benzamidoxim-Reduktase	n.d.
ohne NADH	n.d.
	nmol Benzamidin * min ⁻¹
ohne Protein	n.d.

3.3.3.4 IN VITRO REDUKTION VON BENZAMIDOXIM ZU BENZAMIDIN DURCH REKOMBINANTES CYP2D25 MIT COEXPRIMIERTER NADPH-CYTOCHROM P450-REDUKTASE

3.3.3.4.1 Umsetzungen von Benzamidoxim mit rekombinantem CYP2D25

Bei einer so großen strukturellen Ähnlichkeit zwischen der Benzamidoxim-Reduktase und der Vitamin D₃ 25-Hydroxylase (CYP2D25) (siehe 3.3.1) lag die Vermutung nahe, dass es sich bei beiden Enzymen um dasselbe Protein handeln könnte oder dass zumindest überlappende Substratspezifitäten vorhanden sein müssten, wenn es sich um zwei einander sehr ähnliche Enzyme handelte. Daher wurde auch die Aktivität des rekombinanten CYP2D25, das freundlicherweise von M. Hidestrand für diese Studien zur Verfügung gestellt wurde, im Benzamidoxim-Reduktase-Assay getestet.

Bei diesem CYP2D25 war die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase coexprimiert, d.h. sie war auch bei den reduktiven Umsetzungen immer im Reaktionsansatz vorhanden, obwohl sie eigentlich nur bei oxidativen Untersuchungen enthalten sein muss. Ansonsten setzten sich die Ansätze wie unter 3.2.3.4.3 beschrieben zusammen. Abb. 3-2 fasst die Ergebnisse der reduktiven Umsetzung von Benzamidoxim in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Inkubationsansatzes zusammen.

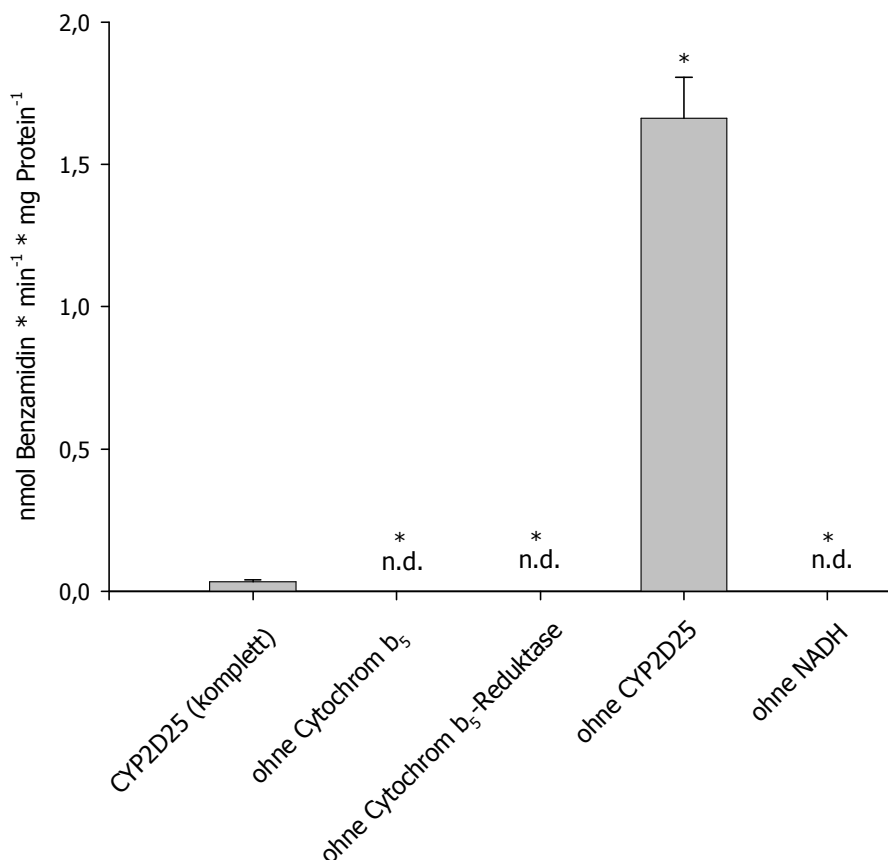


Abb. 3-2 Reduktion von Benzamidoxim durch rekombinantes CYP2D25 mit coexprimierter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase

Die Umsetzungsraten sind die Mittelwerte \pm SD aus je 2 Inkubationen, jeweils 2x vermessen. * Statistisch signifikanter Unterschied zu Komplettansätzen $P < 0.001$ (Student's t-Test für ungleiche Varianzen).

Der komplette Ansatz zeigte kaum Reduktase-Aktivität. Verzichtete man hingegen auf die Zugabe von CYP2D25, erhielt man deutlich höhere Umsetzungsraten. Vermutlich sind die gereinigten Fraktionen des Cytochrom b₅ und der NADH-Cytochrom b₅-Reduktase in geringen Mengen mit drittem Protein verunreinigt,

sodass dennoch geringe Umsetzungen detektiert werden können. Es war aber schon von Clement *et al.* [1997] entdeckt worden, dass auch Cytochrom b₅ und NADH-Cytochrom b₅-Reduktase allein in der Lage sind, diese Reduktion zu katalysieren. Wurde entweder Cytochrom b₅, die NADH-Cytochrom b₅-Reduktase oder das Cosubstrat NADH durch Puffer ersetzt, konnte keine Reduktion zu Benzamidin detektiert werden. Der deutliche Unterschied zwischen den Umsetzungsraten des Komplettansatzes im Vergleich zum Ansatz ohne CYP2D25 belegt eine Hemmung der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch CYP2D25-Mikrosomen.

3.3.3.4.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Reduktion von Benzamidoxim

Der für die BAO-Reduktion ermittelte optimale pH-Wert liegt bei 6.3 [Möller, 1997]. Eine Testreihe beim physiologischen pH-Wert 7.4 konnte keine Steigerung in der Umsetzung bewirken (Tab. 3-7).

Tab. 3-7 Reduktion von Benzamidoxim durch CYP2D25 mit coexprimierter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase bei unterschiedlichen pH-Werten

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte ± SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die jeweils 2x vermessen wurden.

Inkubationsansatz	pH 6.3	pH 7.4
	nmol Benzamidin * min ⁻¹ * mg Protein ⁻¹	
Komplettansatz (0.5 mg)	0.076 ± 0.054	0.041 ± 0.009
Komplettansatz (1.0 mg)	0.046 ± 0.037	0.031 ± 0.007
ohne Cytochrom b ₅ -Reduktase	0.015 ± 0.004	0.010 ± 0.002
ohne CYP2D25	1.321 ± 0.004	0.844 ± 0.130
ohne NADH	n.d.	n.d.

3.3.3.4.3 Einfluss von Superoxid-Dismutase und Tetrahydrobiopterin

Es lag die Vermutung nahe, dass möglicherweise die in dem Reaktionsansatz vorhandene coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase einen inhibitorischen Effekt auf die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin haben könnte. Daher wurde den unter 3.2.3.4.3 beschriebenen Inkubationsansätzen 150 U SOD hinzugefügt, um einen Effekt zu unterbinden, der auf in Gegenwart von Reduktase gebildetes Superoxidradikalanion zurückzuführen ist. Es konnte keine Steigerung in der Umsetzungsrate detektiert werden. Sie wurde sogar um die Hälfte verringert. Denkbar war auch das Fehlen möglicher Aktivatoren, die bei der BAO-Reduktase automatisch mitgereinigt wurden und daher wahrscheinlich in den Inkubationsansätzen mit gereinigtem dritten Protein vorhanden waren. Deshalb wurde zu den Inkubationsansätzen mit rekombinanten Enzympräparationen (siehe 3.2.3.4.3) 10 µM Tetrahydrobiopterin (BH₄) hinzugegeben. Es konnte keine Steigerung in der Umsetzungsrate verzeichnet werden.

3.3.3.4.4 Inhibitorischer Effekt der CYP2D25-Mikrosomen mit coexprimierter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase

Um den vermuteten inhibitorischen Effekt dieser CYP2D25-Mikrosomen zu untersuchen (siehe 3.3.3.4.1), wurden zunächst SL-Mikrosomen allein und dann in Kombination mit CYP2D25 inkubiert. Wie aus Abb. 3-3 ersichtlich wird, hemmte die CYP2D25-Präparation signifikant.

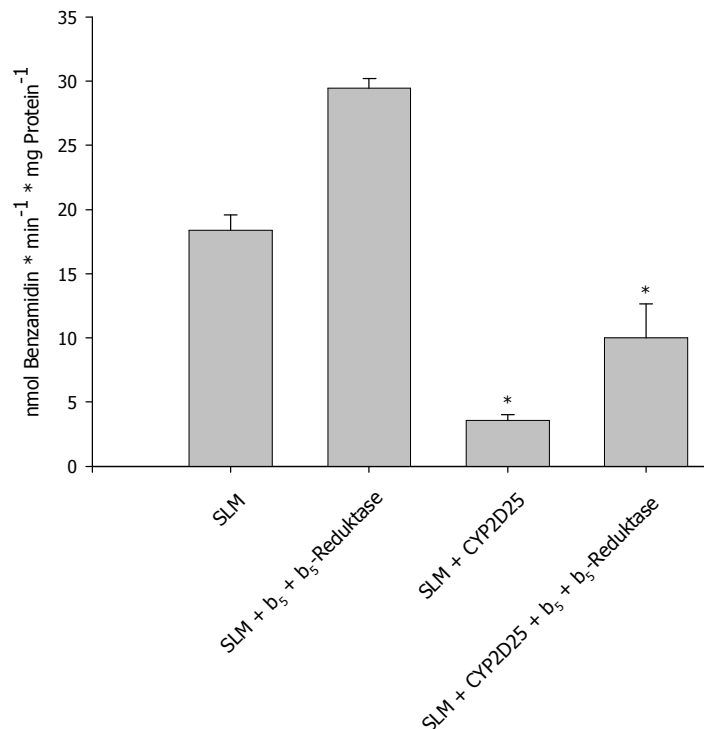


Abb. 3-3 *Reduktion von Benzamidoxim durch SL-Mikrosomen allein und in Kombination mit CYP2D25*

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die jeweils 2x vermessen wurden. * Statistisch signifikanter Unterschied zu dem jeweiligen Komplettansatz $P < 0.001$ (Student's t-Test für ungleiche Varianzen); SLM: Schweinelebermikrosomen.

3.3.3.4.5 Untersuchung möglicher Inhibitoren

Es wurde der Einfluss verschiedener Reagenzien, die zur Gewinnung der CYP2D25-Mikrosomen verwendet wurden, in Kombination mit SL-Mikrosomen getestet. Zu den unter 3.2.3.4.4 beschriebenen Inkubationsansätzen wurde jeweils ein Reagenz in der in den CYP2D25-Mikrosomen vorkommenden Konzentration hinzugegeben: 50 mM Tris, 20 % Glycerol, 1 mM EDTA, 0.6 M Sorbitol bzw. 100 mM KCl. Abb. 3-4 zeigt, dass die untersuchten Reagenzien keinen inhibitorischen Effekt auf die Reduktion aufwiesen.

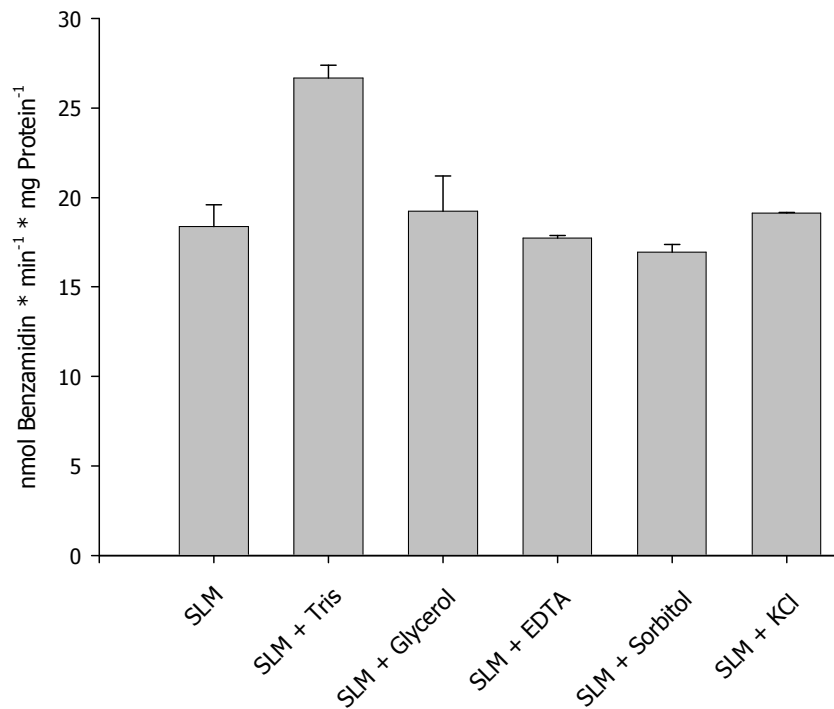


Abb. 3-4 *Auswirkung möglicher Inhibitoren auf die Reduktion durch SLM*

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die jeweils 2x vermessen wurden.

Weiterhin wurde der Einfluss des Proteasen-Inhibitoren-Cocktails Complete[®] auf die Reduktion von BAO durch SLM getestet (siehe Abb. 3-5). Dazu wurde eine Tablette in 50 ml Aqua bidest. und eine andere in 100 mM Phosphatpuffer, pH 6.3 gelöst. Den unter 3.2.3.4.4 aufgeführten Inkubationsansätzen wurde der Protease-Inhibitor in verschiedenen Mengen zugesetzt. Es konnte keine Hemmung in der Umsetzung durch Zugabe des Inhibitors festgestellt werden.

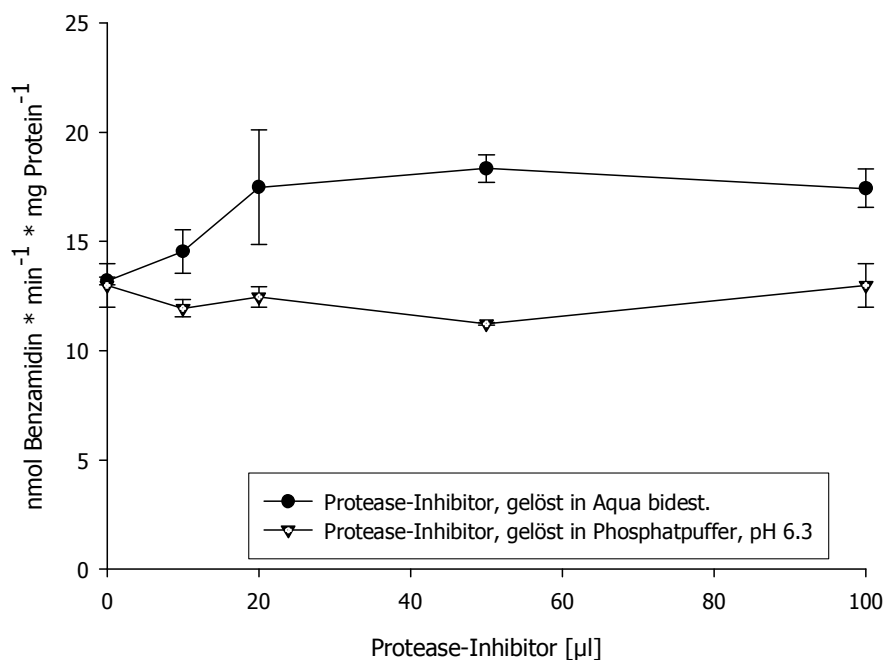


Abb. 3-5 *Reduktion von BAO durch SLM in Anwesenheit des Proteasen-Inhibitoren-Cocktails Complete®*

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die jeweils 2x vermessen wurden.

3.3.3.5 *IN VITRO* REDUKTION VON BENZAMIDOXIM ZU BENZAMIDIN DURCH REKOMBINANTES CYP2D25 AUS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

3.3.3.5.1 Umsetzung von Benzamidoxim mit rekombinantem CYP2D25 ohne coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase

Des Weiteren wurden auch CYP2D25-Mikrosomen auf reduktive Eigenschaften getestet, die keine coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase enthielten. Die Ergebnisse sind in Tab. 3-8 zusammengefasst. Auch in diesen Mikrosomen fand keine Umsetzung von Benzamidoxim zu Benzamidin statt. Sowohl CYP2D25 B1* als auch Mikrosomen, die aus V60A1 D2 gewonnen wurden und kein CYP2D25 enthielten, zeigten vergleichbare Umsetzungsraten. Auch beim Wildtyp W(N), der ebenfalls kein CYP2D25 exprimierte, konnte keine Umsetzung von BAO zu BA detektiert werden. Fehlte entweder Cytochrom b₅, die NADH-Cytochrom b₅-Reduktase oder das Cosubstrat, konnte keine Umsetzung registriert werden. Setzte man hingegen nur

Cytochrom b₅ und die NADH-Cytochrom b₅-Reduktase und kein drittes Protein hinzu, waren die Umsetzungsraten deutlich höher.

Tab. 3-8 Reduktion von Benzamidoxim durch CYP2D25 (ohne coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase), V60A1 und Wildtyp W(N)

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte ± SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die jeweils 2x vermessen wurden. Die einzelnen Buchstaben und Ziffern hinter der Mikrosomenbezeichnung geben die Bezeichnung der jeweiligen Transformante wieder. V60A1 und der Wildtyp W(N) enthalten beide kein CYP2D25; -: nicht untersucht.

Inkubationsansatz	CYP2D25 B1*	V60A1 D2	Wildtyp W(N)
	nmol Benzamidin * min ⁻¹ * mg Protein ⁻¹		
Komplettansatz	0.072 ± 0.010	0.072 ± 0.002	0.036 ± 0.001
mit DLPC	0.040 ± 0.003	-	-
ohne Cytochrom b ₅	n.d.	n.d.	n.d.
ohne Cytochrom b ₅ - Reduktase	n.d.	n.d.	n.d.
ohne CYP2D25 B1*	0.662 ± 0.057	0.868 ± 0.171	0.842 ± 0.055
ohne NADH	n.d.	n.d.	n.d.

Aus anderen Transformanten gewonnene CYP2D25-Mikrosomen wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Reduktase-Aktivität untersucht. Auch hier fand keine Reduktion zu Benzamidin statt.

Außerdem wurde die Reduktase-Aktivität der aus pYeDP60 CYP2D25 gewonnenen Mikrosomen in Anwesenheit eines Gemisches aus Liposomen, CHAPS und Glutathion (siehe 3.2.3.4.3) in HEPES-Puffer untersucht. Wie aus Tab. 3-9 hervorgeht, konnte auch durch den Zusatz des Gemisches keine Benzamidin-Bildung detektiert werden. Vergleicht man diese Werte mit denen aus Tab. 3-8, sind die Umsetzungsraten in HEPES-Puffer sogar um den Faktor 10 verringert.

Tab. 3-9 Reduktion von Benzamidoxim durch rekombinantes CYP2D25 nach Stiborová et al. [2001]

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die jeweils 2x vermessen wurden.

Der „Mix“ setzte sich aus Liposomen, CHAPS und Glutathion zusammen; n.d.: nicht detektierbar.

Inkubationsansatz	CYP2D25 B1	V60A1 C1
	nmol Benzamidin * min ⁻¹ * mg Protein ⁻¹	
Komplettansatz	0.004 \pm 0.002	n.d.
Komplettansatz + Mix	0.008 \pm 0.002	n.d.
ohne Cytochrom b ₅	n.d.	n.d.
ohne Cytochrom b ₅ -Reduktase	0.003 \pm 0.001	n.d.
ohne CYP2D25 B1	n.d.	n.d.
ohne NADH	n.d.	n.d.
ohne Benzamidoxim	n.d.	n.d.

3.3.3.5.2 Einfluss steigender Konzentrationen an Cytochrom b₅, NADH-Cytochrom b₅-Reduktase bzw. rekombinatem Protein auf die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine Konzentrationsänderung von Cytochrom b₅, NADH-Cytochrom b₅-Reduktase bzw. rekombinatem Protein eine Auswirkung auf die Reduktion von Benzamidoxim zeigt. Bei Erhöhung der Cytochrom b₅-Konzentration blieb die Umsatzrate unbeeinflusst (Abb. 3-6). Auch nach steigender Zugabe von NADH-Cytochrom b₅-Reduktase konnte keine vermehrte Reduktion zu Benzamidin gemessen werden (Abb. 3-7).

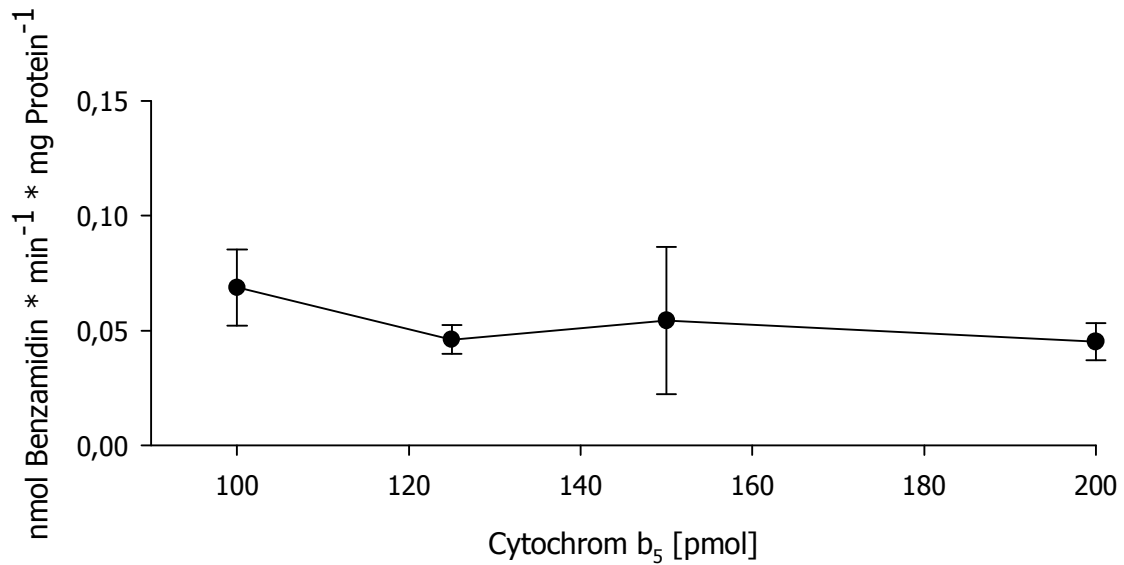


Abb. 3-6 *Reduktion von Benzamidoxim durch rekombinantes CYP2D25 durch steigende Konzentrationen von Cytochrom b_5*

Die Inkubationen und Aufarbeitungen erfolgten nach der unter 3.2.3.4.3 beschriebenen Methode.

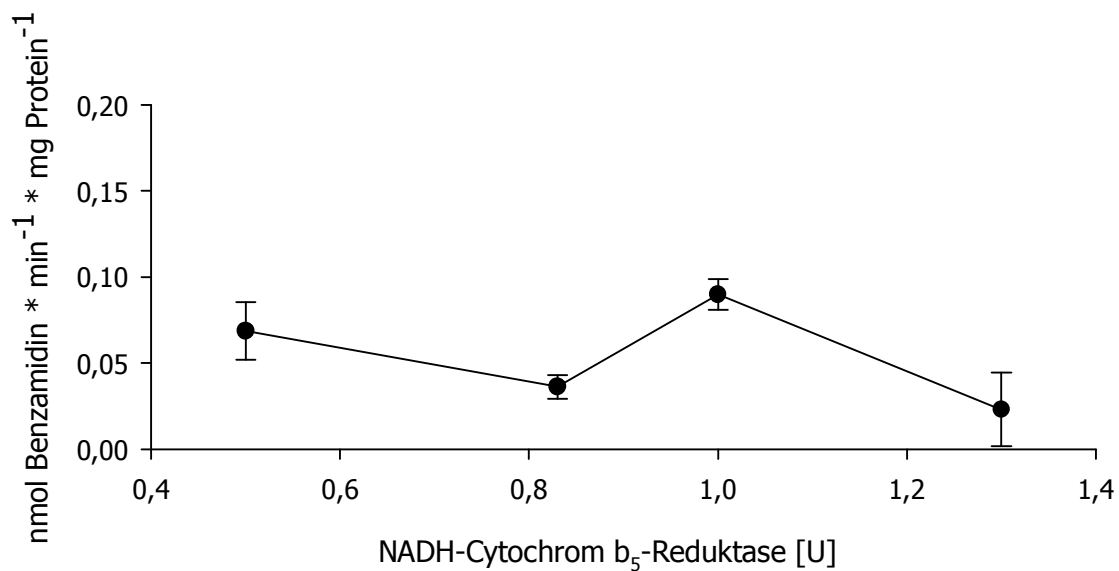


Abb. 3-7 *Reduktion von Benzamidoxim durch rekombinantes CYP2D25 durch steigende Konzentrationen von NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase*

Die Inkubationen und Aufarbeitungen erfolgten nach der unter 3.2.3.4.3 beschriebenen Methode.

Nach Abb. 3-8 bewirkte eine Erhöhung der Proteinmenge an CYP2D25 auch eine Steigerung der Umsetzungsrate. Wurde jedoch im Vergleich dazu die aus dem Wildtyp gewonnene Proteinmenge erhöht, konnten ebenfalls steigende Umsetzungsraten detektiert werden.

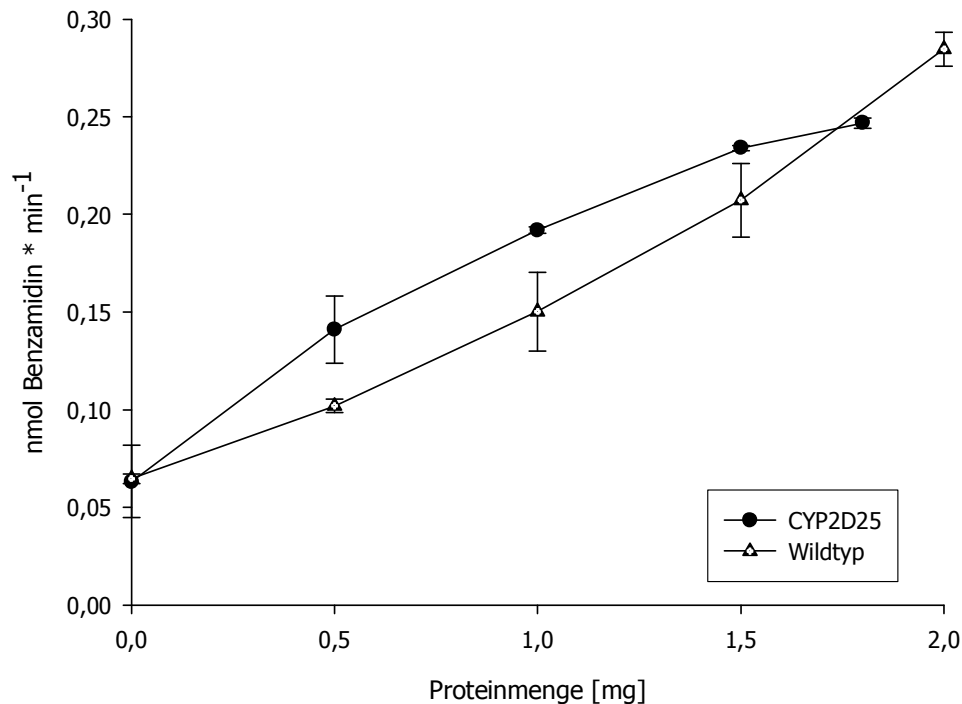


Abb. 3-8 *Reduktion von Benzamidoxim durch rekombinantes CYP2D25 in steigenden Konzentrationen im Vergleich zu steigenden Proteinkonzentrationen aus dem Wildtyp*

3.3.3.5.3 Testung auf einen inhibitorischen Effekt durch CYP2D25-Mikrosomen aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die aus Schweden stammenden Mikrosomen zeigten einen inhibitorischen Effekt bei einer gemeinsamen Inkubation mit SL-Mikrosomen (siehe 3.3.3.4.4). Auch die CYP2D25-Mikrosomen ohne NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-Coexpression wurden auf ihren potenziell hemmenden Effekt getestet (siehe Tab. 3-10). Es konnte keine Hemmung bei der Umsetzung von BAO durch SLM bei gleichzeitiger Anwesenheit von CYP2D25-Mikrosomen festgestellt werden.

Tab. 3-10 Reduktion von Benzamidoxim durch SLM in Anwesenheit von CYP2D25 (ohne coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase)

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die jeweils 2x vermessen wurden. Die Angaben erfolgen in der Einheit [nmol BA * min⁻¹], um aufgrund des unterschiedlichen Gesamtproteingehalts eine Vergleichbarkeit der Werte zu erzielen.

Inkubationsansatz	nmol Benzamidin * min ⁻¹
SLM komplett	9.999 \pm 0.622
SLM + CYP2D25 D3	9.751 \pm 0.036
SLM + CYP2D25 B1	9.564 \pm 0.008
SLM + V60A1 D2	11.678 \pm 0.021

3.3.3.5.4 Coinkubation mit CYP2E1

Es sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit sowohl von CYP2D25 als auch von CYP2E1 (siehe 4.3.1) erforderlich ist, BAO zu reduzieren. Dazu wurden beide Isoenzyme einmal separat und einmal zusammen inkubiert (Tab. 3-11), um die Werte miteinander vergleichen zu können. Es konnte keine Steigerung in der Umsatzungsrate erzielt werden.

Tab. 3-11 Coinkubation von CYP2D25 mit CYP2E1

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die jeweils 2x vermessen wurden.

Inkubationsansatz	nmol Benzamidin * min ⁻¹ * mg Protein ⁻¹
CYP2D25 komplett	0.055 \pm 0.003
CYP2E1 komplett	0.041 \pm 0.007
CYP2D25 + CYP2E1 komplett	0.026 \pm 0.003

3.3.3.6 *IN VITRO* REDUKTION VON BENZAMIDOXIM ZU BENZAMIDIN DURCH REKOMBINANTES CYP2D25' AUS *SF9*-ZELLEN

Auch das in Insektenzellen exprimierte CYP2D25' (siehe 2.2.1.3.4 und 2.2.1.3.7) wurde auf die Fähigkeit der Reduktion von Benzamidoxim getestet. Es konnte keine Benzamidin-Bildung detektiert werden.

3.3.3.7 IDENTIFIZIERUNG DES GEBILDETEN BENZAMIDINS MITTELS HPLC

Benzamidin konnte im Anschluss an die Inkubation und Aufarbeitung mittels HPLC nachgewiesen werden, wobei ein Vergleich mit dem synthetisch hergestellten Standard die Identität des im Ansatz gebildeten Benzamidins bestätigte. Abb. 3-9 zeigt HPLC-Chromatogramme einer Inkubation von Benzamidoxim mit der BAO-Reduktase im rekonstituierten System im Vergleich zu Ansätzen mit CYP2D25 bzw. V60A1. Der Unterschied in den Umsetzungsraten bei Einsatz verschiedener Enzympräparationen wird hier deutlich. Während im rekonstituierten System mit der BAO-Reduktase Benzamidin gebildet wird, sind die Umsetzungsraten bei CYP2D25 und V60A1 nahezu identisch und zu dem sehr gering.

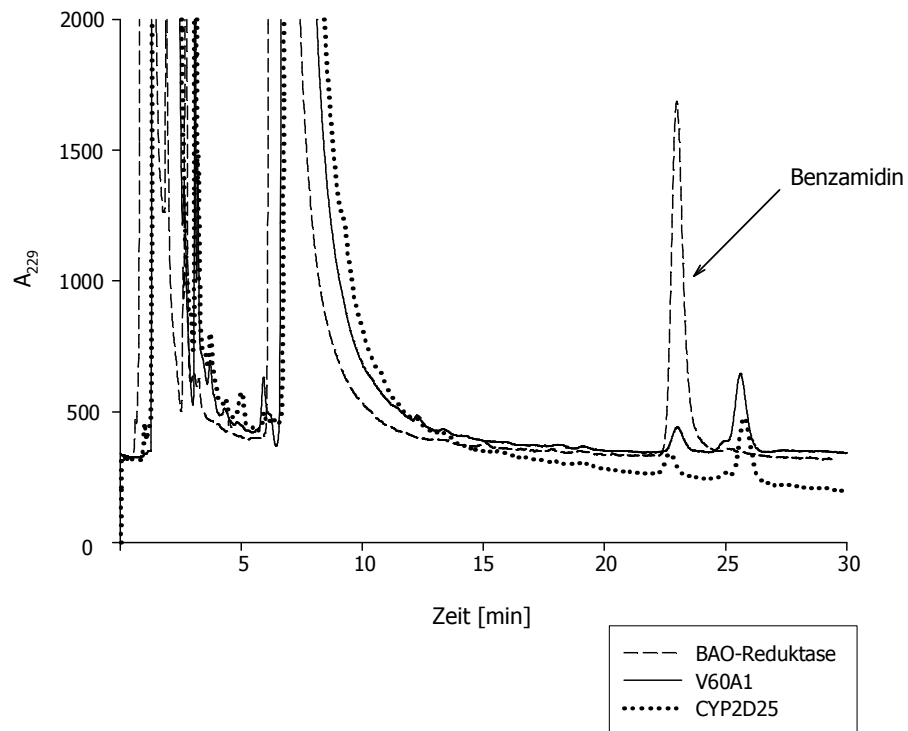


Abb. 3-9 HPLC-Chromatogramme von Inkubationen mit BAO-Reduktase im rekonstituierten System im Vergleich mit V60A1 bzw. CYP2D25 enthaltenden Ansätzen

Die Inkubationen und Aufarbeitungen erfolgten nach der unter 3.2.3.4.2 und 3.2.3.4.3 beschriebenen Methode.

3.3.4 OXIDATION VON 1 α -HYDROXYVITAMIN D₃ ZU 1 α ,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃

3.3.4.1 BISHERIGE METHODE MIT UV-DETEKTION

Bei der bisherigen Analytik zur Detektion von 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ [Axén *et al.*, 1992] wurden zwei aufeinander folgende HPLC-Trennungen eingesetzt (siehe 3.2.4.2). Der entstehende Metabolit wurde durch die NP-HPLC zunächst von anderen lipophilen, auch ausschüttelbaren Substanzen getrennt. Durch die sich anschließende Trennung mittels RP-HPLC erfolgte dann die Quantifizierung des Metaboliten.

Neben dem Metabolitenpeak war eine Verunreinigung mit derselben Retentionszeit vorhanden (siehe Abb. 3-10), die nicht durch die NP-HPLC abgetrennt werden konnte. Somit war die Quantifizierung des Metaboliten nicht möglich.

Aus diesem Grund wurde die bestehende Methode durch Kopplung des zweiten HPLC-Systems mit einem Massenspektrometer weiterentwickelt.

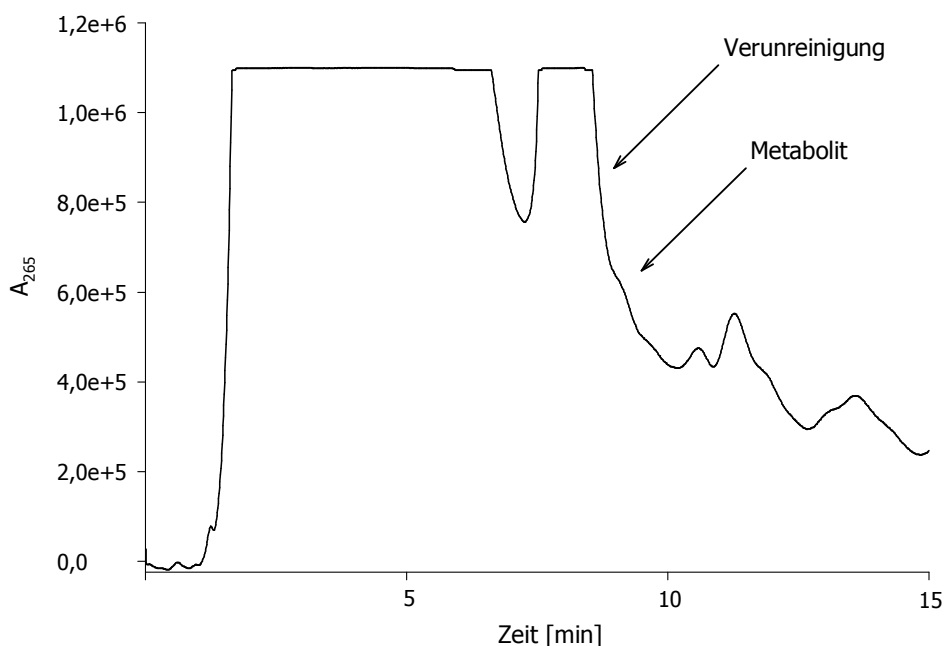


Abb. 3-10 Repräsentatives RP-HPLC-Chromatogramm einer Inkubation von 1 α -Hydroxyvitamin D₃ mit CYP2D25 (mit coexprimierter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase) nach UV-Detektion bei 265 nm

Die Inkubation und Aufarbeitung erfolgten nach der unter 3.2.4.3.2 und 3.2.4.4 beschriebenen Methode.

3.3.4.2 ENTWICKLUNG EINER NEUEN LC/MS-METHODE ZUR DETEKTION VON $1\alpha,25$ -DIHYDROXYVITAMIN D_3

3.3.4.2.1 Charakterisierung des Metaboliten $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3

Zur Identifizierung des $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 wurden aus den jeweils aufgenommenen Massenspektren drei Ionenchromatogramme ausgewählt, die den Metaboliten kennzeichnen. Drei Ionen mit m/z 399, 381 und 363 wurden ausgewertet, da sie für das $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 charakteristisch sind (Abb. 3-11).

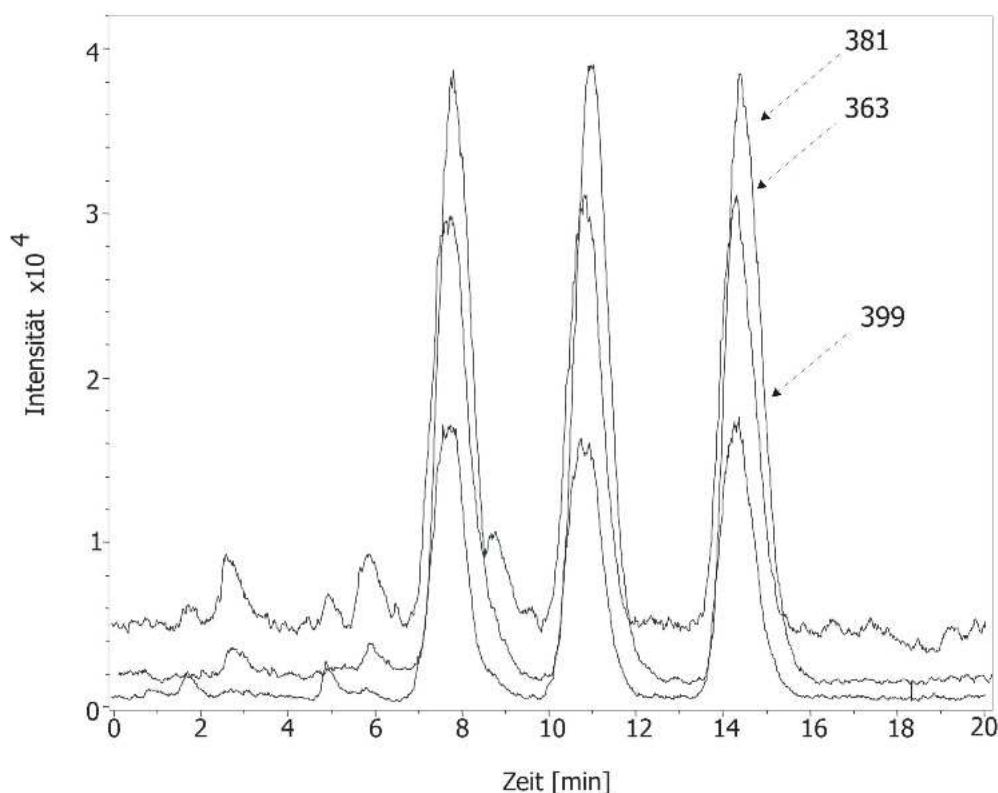


Abb. 3-11 Ionen-Chromatogramm zur Charakterisierung des Metaboliten $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3

Vermessen wurden 10 pmol eines synthetisch hergestellten Standards. Die Ionen mit m/z 399, 381 und 363 sind für den Metaboliten charakteristisch.

Da auch Verunreinigungen zur gleichen Zeit wie der Metabolit eluiert wurden, wurden zur eindeutigen Charakterisierung neben den drei Ionen auch die relativen Intensitäten der Ionen zueinander betrachtet. Wie aus Abb. 3-12 hervorgeht, wies

das Ion mit m/z 399 die geringste Intensität auf, während die Ionen mit m/z 363 und 381 eine deutlich höhere Intensität zeigten. Das Ion mit m/z 381 besaß im Vergleich die höchste Intensität. War dieses Ionenverhältnis gegeben, konnten alle drei Ionenspuren zur quantitativen Auswertung herangezogen werden.

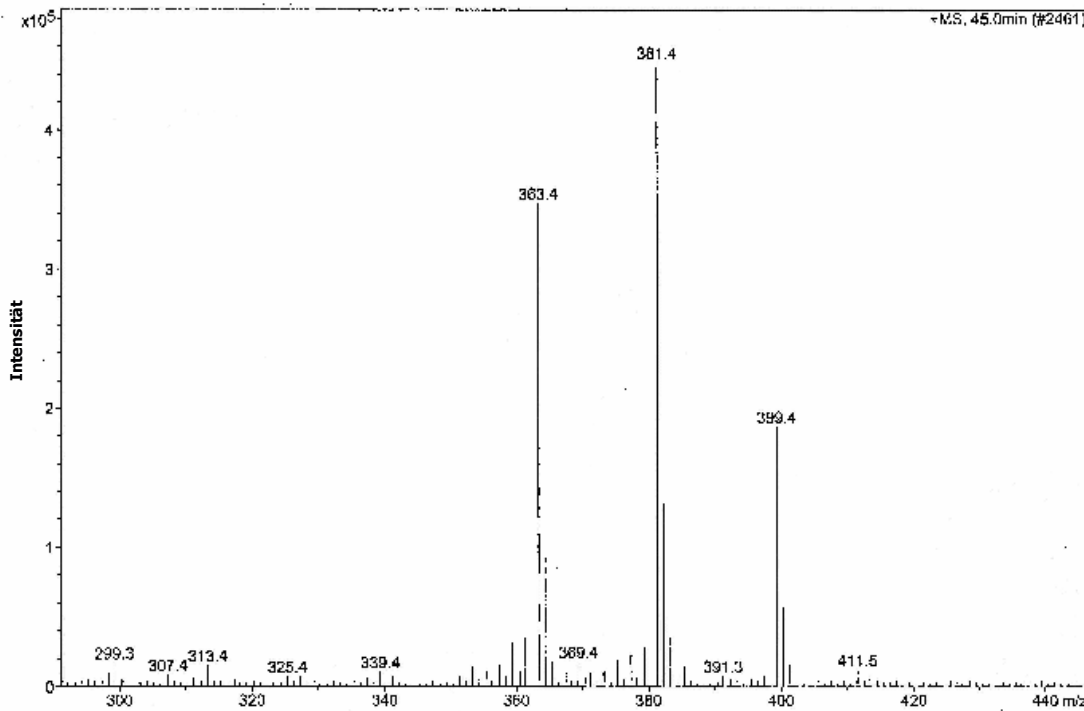


Abb. 3-12 APCI-Massenspektrum des Metaboliten $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3

Vermessen wurden 10 pmol eines synthetisch hergestellten Standards. Das Verhältnis der drei Ionen zueinander ist für die quantitative Auswertung entscheidend.

3.3.4.2.2 Charakterisierung des Substrates 1α -Hydroxyvitamin D_3

Auch für das Substrat konnten drei charakteristische Ionen mit m/z 401, 383 und 365 gefunden werden, indem synthetisch hergestellter Standard in definierten Konzentrationen, gelöst in Isopropanol bzw. RP-FM, vermessen wurde.

3.3.4.2.3 Charakterisierung der Verunreinigungen

Im HPLC-Chromatogramm der Abb. 3-10 ist bei ca. 8 min deutlich ein Verunreinigungspeak zu erkennen, der eine Quantifizierung mittels UV-Detektion

unmöglich macht. Diesem Verunreinigungspeak konnten verschiedene Ionen zugeordnet werden: zum einen das Ion mit m/z 335, zum anderen die Ionen mit m/z 282 und 268. Daraufhin wurden Substrat, Metabolit, Isopropanol und RP-FM auf mögliche Verunreinigungen untersucht.

Die Verunreinigung mit m/z 335 konnte einer Verunreinigung aus dem Lösungsmittel Isopropanol zugeordnet werden. Diese Verunreinigung konnte im UV nicht detektiert werden, sodass Messung und Auswertung dadurch nicht behindert wurden. Die Verunreinigungen mit m/z 282 bzw. 268 konnten weder dem Substrat, Metaboliten, Isopropanol noch dem RP-FM zugeordnet werden. Erst nach Aufarbeitung der inkubierten Ansätze traten sie auf. Vermutlich stammten diese Verunreinigungen aus den Enzympräparationen und waren daher immer im Inkubationsansatz vorhanden. Durch die massenspektrometrische Detektion ist es möglich, nur den Metaboliten durch m/z 399, 381 und 363 zu quantifizieren.

3.3.4.2.4 Untersuchung des 1,1,1-Trichlorethans

Im Rahmen der Validierung der analytischen Methode wurde herausgefunden, dass das verwendete TCE nur eine Reinheit von ca. 95 % besaß und zahlreiche Verunreinigungen enthielt. Des Weiteren wurde beim Vermessen von Inkubationsansätzen festgestellt, dass das Verhältnis der Ionenintensitäten zueinander nicht dem des synthetischen Standards entsprach. Dies sprach für eine koeluiierende Verunreinigung, die auch Ionen mit m/z 381 lieferte. Daraufhin wurde ein TCE/MeOH-Gemisch (2:1) per APCI-MS vermessen, wodurch das Auftreten einer erhöhten Intensität des Ions 381 bei ca. 9 min verifiziert werden konnte. Aus diesem Grund wurde 1,1,1-Trichlorethan durch Dichlormethan ersetzt und ein DCM/MeOH-Gemisch (2:1) ebenfalls auf die drei Ionenspuren untersucht. Das Dichlormethan zeigte keine Ionenbildung mit m/z 399, 381 oder 363 und war ebenso in der Lage, $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 aus der wässrigen Phase zu extrahieren. Somit wurde zum Ausschütteln der Ansätze bei der Aufarbeitung statt 1,1,1-Trichlorethan Dichlormethan eingesetzt.

3.3.4.2.5 Charakteristische Fragmentierung des 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃

Abb. 3-13 zeigt die durch APCI mögliche Bildung der charakteristischen Fragmente des Metaboliten. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ lagert zunächst ein H⁺ aus dem Methanol an. Dieses nun gebildete Molekülkation ist instabil und fragmentiert unter den angegebenen APCI-Bedingungen vollständig, wobei entweder ein, zwei oder drei Wasser-Moleküle abgespalten werden können. So lassen sich die Ionenspuren 399, 381 und 363 erklären, die zur quantitativen Bestimmung des gebildeten Metaboliten herangezogen wurden.

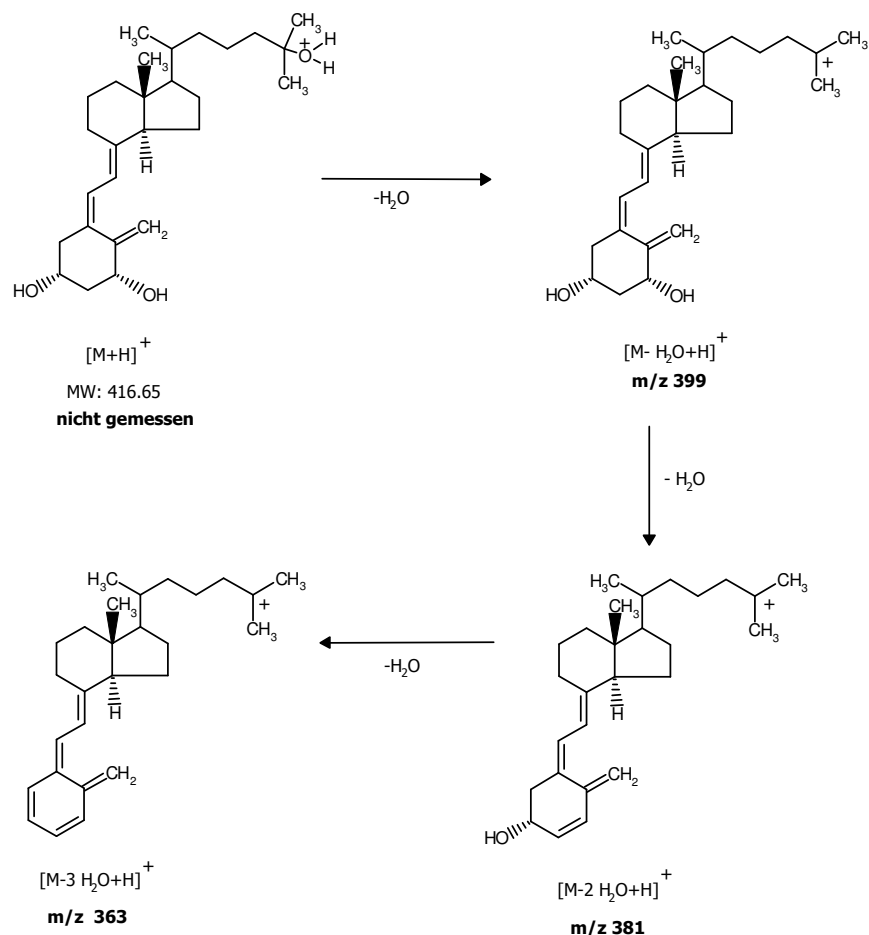


Abb. 3-13 Mögliche Fragmentierung von 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃

Durch Abspaltung von ein, zwei oder drei Wassermolekülen können Molekülkationen mit m/z 399, 381 und 363 detektiert werden.

3.3.4.3 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG

Zur quantitativen Bestimmung des $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 wurde eine Direktkalibrierung, Kalibrierung und Wiederfindung mit der unter 3.2.5.3 beschriebenen HPLC-Analytik durchgeführt. Abb. 3-14 zeigt die durch jeweils lineare Regression erhaltene Ausgleichsgerade der Direktkalibrierung, Kalibrierung und der Wiederfindung. Alle Funktionen der Direktkalibrierungen, Kalibrierungen und Wiederfindungen waren in dem untersuchten Konzentrationsbereich linear. Für die Direktkalibrierung wurden definierte Konzentrationen des Metabolitenstandards ohne Aufarbeitung in die zweite HPLC-Anlage injiziert und mittels LC/MS vermessen, während die Ansätze der Kalibrierung bzw. Wiederfindung wie unter 3.2.4.4 beschrieben aufgearbeitet wurden.

Durch den Unterschied in den Steigungen der Direktkalibrierung und der Kalibrierung bzw. Wiederfindung wird deutlich, dass eine sehr große Menge an Metabolit durch die Aufarbeitung verloren geht und somit der Detektion entzogen wird.

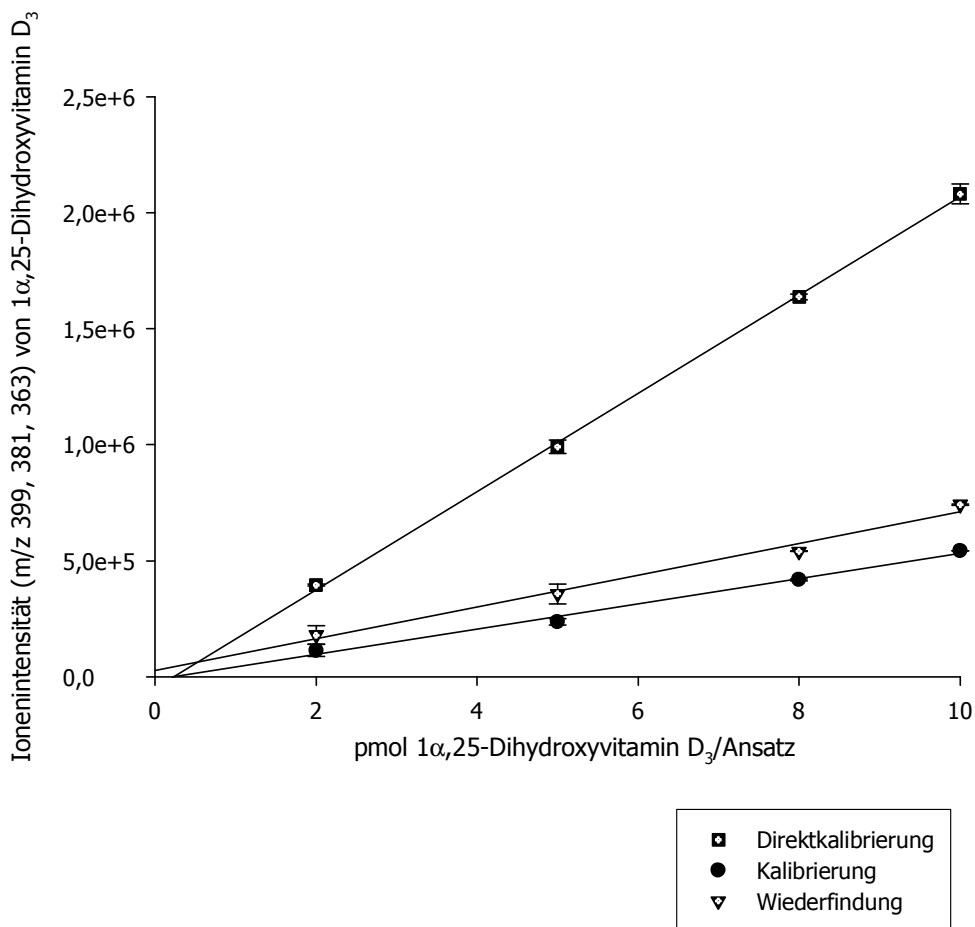


Abb. 3-14 *Kalibrierung und Wiederfindung von 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃*

Die Bestimmungen verliefen im Konzentrationsbereich von 2-10 pmol/Ansatz linear. Die Signalfächen sind die Mittelwerte ± SD aus n = 2 verschiedenen Inkubationen; Direktkalibrierung r = 0.998; Kalibrierung r = 0.987; Wiederfindung r = 0.976.

3.3.4.4 *IN VITRO* OXIDATION VON 1α-HYDROXYVITAMIN D₃ ZU 1α,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃ DURCH MIKROSOMEN

Abb. 3-15 zeigt einen Vergleich der Umsetzung von 1α-Hydroxyvitamin D₃ durch Mikrosomen verschiedener Spezies und Organe.

Die humanen Lebermikrosomen führten zu signifikant höheren Umsetzungsraten als die aus dem Schwein isolierten Mikrosomen. In Schweinenieren-Mikrosomen konnte ebenfalls eine Umsetzung zu 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ detektiert werden. Die Umsetzungsrate war jedoch geringer als bei den aus porciner bzw. humaner Leber gewonnenen Mikrosomen. Wurde das Cosubstrat NADPH gegen Puffer ersetzt, konnte keine Metabolisierung zu 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ festgestellt werden.

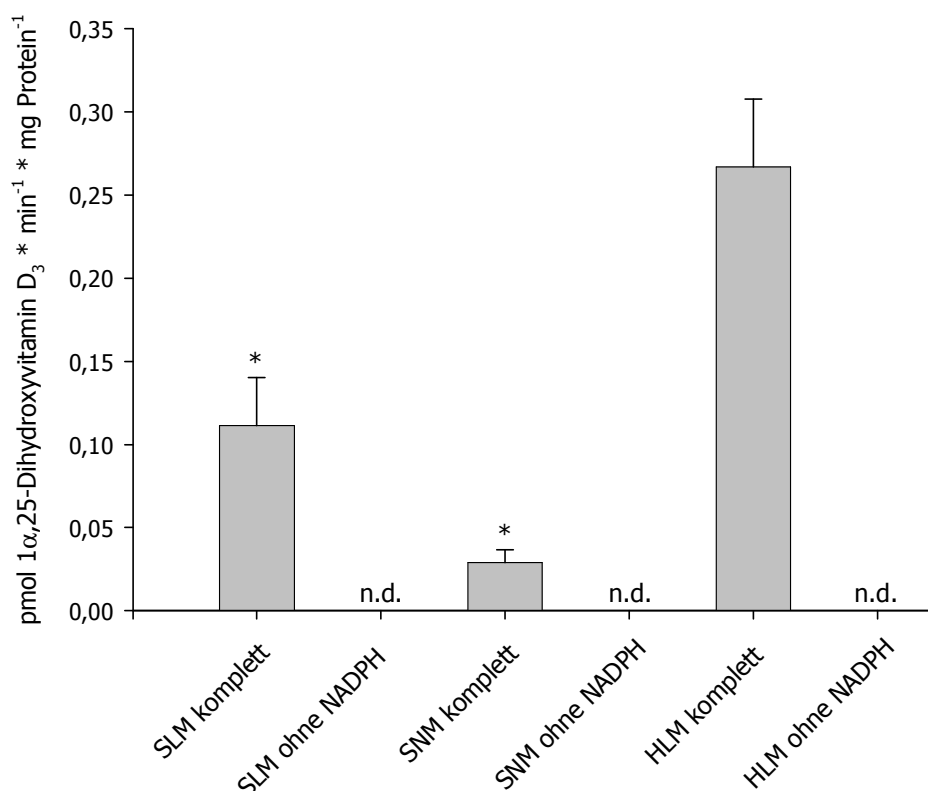


Abb. 3-15 Bildung von 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ durch Mikrosomen verschiedener Spezies und Organe

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte ± SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und die Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. * Statistischer Unterschied zu Inkubationsansätzen mit humanen Lebermikrosomen $P < 0.001$ (Student's t-Test für ungleiche Varianzen); SLM: Schweinelebermikrosomen; SNM: Schweinenierenmikrosomen; HLM: Humane Lebermikrosomen.

3.3.4.5 IN VITRO OXIDATION VON 1α-HYDROXYVITAMIN D₃ ZU 1α,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃ DURCH MITOCHONDRIEN

1α-Hydroxyvitamin D₃ wird auch durch Mitochondrien in 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ umgewandelt. Abb. 3-16 fasst die Umsetzungsraten der enzymatisch katalysierten Reaktionen in Abhängigkeit von der Organ- bzw. Speziesquelle zusammen.

Schweinelebermitochondrien zeigten signifikant höhere Umsetzungsraten als Mitochondrien aus porciner Niere bzw. aus humaner Leber. Wurde kein NADPH

hinzugesetzt, konnte bei keiner der Mitochondrienpräparationen eine Umsetzung detektiert werden.

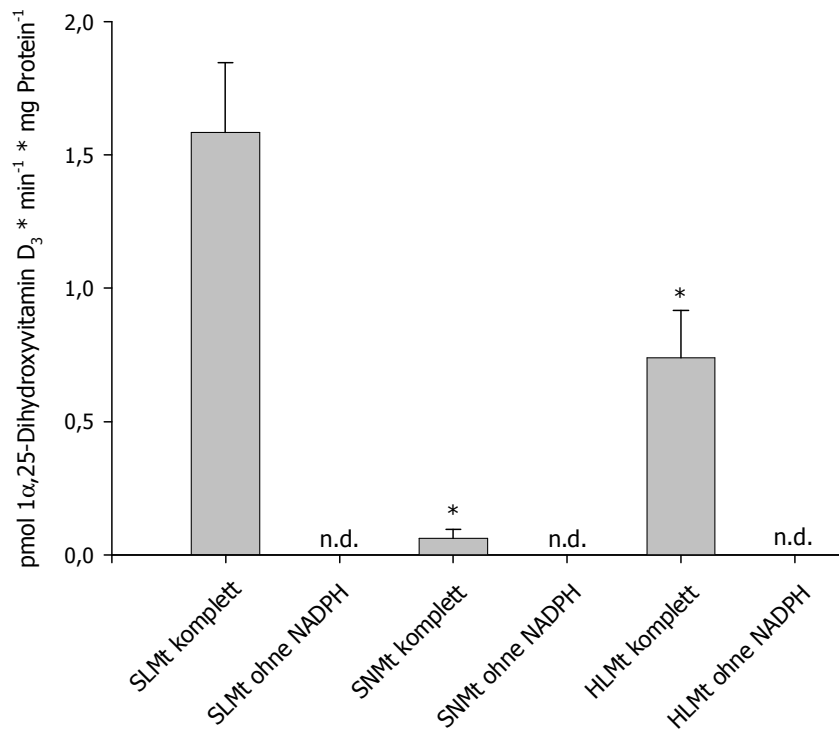


Abb. 3-16 Bildung von 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ durch Mitochondrien verschiedener Spezies und Organe

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte ± SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und die Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. * Statistischer Unterschied zu Inkubationsansätzen mit SL-Mitochondrien P < 0.001 (Student's t-Test für ungleiche Varianzen). SLMt: Schweinelebermitochondrien; SNMt: Schweinenierenmitochondrien; HLMt: Humane Lebermitochondrien.

3.3.4.6 IN VITRO OXIDATION VON 1α-HYDROXYVITAMIN D₃ ZU 1α,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃ DURCH REKOMBINANTE ENZYME

Auch rekombinant exprimierte Enzyme wie CYP2D25 (mit coexprimierter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase), CYP27A1, CYP2D25' (aus Insektenzellen) und CYP2A13 wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, 1α-Hydroxyvitamin D₃ an der Position C₂₅ zu hydroxylieren. Tab. 3-12 fasst die Ergebnisse zusammen.

Das mitochondriale Enzym CYP27A1 zeigt eine fast 70000-fach höhere Umsetzungsrate als das mikrosomale CYP2D25. Die Bildung von 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ durch CYP2A13 konnte hingegen nicht detektiert werden.

Tab. 3-12 Oxidation von 1 α -Hydroxyvitamin D₃ durch verschiedene rekombinante Enzyme

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die mit der neu entwickelten LC/MS-Methode vermessen wurden. Die Inkubationsbedingungen und die Aufarbeitung sind unter 3.2.5.1.3 und 3.2.5.2 beschrieben.

Rekombinantes Enzym	pmol 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D ₃ * min ⁻¹ * mg Protein ⁻¹
CYP2D25 (Hefe)	0.94 \pm 0.17
CYP2D25 ohne NADPH	n.d.
CYP27A1	63800 \pm 3700
CYP27A1 ohne NADPH	n.d.
CYP2D25' (<i>Sf9</i> -Zellen)	n.d.
CYP2A13	n.d.
CYP2A13 ohne NADPH	n.d.

3.3.4.7 IN VITRO OXIDATION VON 1 α -HYDROXYVITAMIN D₃ ZU 1 α ,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃ DURCH DIE AUS SCHWEINELEBER ISOLIERTE BENZAMIDOXIM-REDUKTASE

Das aus Schweinelebermikrosomen gereinigte dritte Protein wurde nach Zusatz verschiedener NADPH-Cytochrom P450-Reduktasen hinsichtlich der 25-Hydroxylase-Aktivität untersucht. Die Inkubationsbedingungen und die Aufarbeitung erfolgten nach der unter 3.2.5.1.4 und 3.2.5.2 beschriebenen Methode. Wie Tab. 3-13 zeigt, ergaben sich deutliche Unterschiede in den Umsetzungsraten in Abhängigkeit von der eingesetzten Reduktase. Wurden Mikrosomen der in Insektenzellen exprimierten NADPH-Cytochrom P450-Reduktase verwendet, konnte keine 25-Hydroxylase-Aktivität gemessen werden. Als jedoch die aus diesen Zellen aufgereinigte humane Reduktase den Inkubationsansätzen zugefügt wurde, zeigte das dritte Protein

25-Hydroxylase-Aktivität. Nach Komplettierung des porcinen rekonstituierten Systems konnte auch eine Umsetzung zu $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 detektiert werden.

Ohne das Cosubstrat NADPH war die Benzamidoxim-Reduktase nicht in der Lage, unabhängig von der eingesetzten NADPH-Cytochrom P450-Reduktase, 1α -Hydroxyvitamin D_3 zu hydroxylieren.

Wurde die Benzamidoxim-Reduktase durch Puffer ersetzt, konnte nur bei der gereinigten porcinen NADPH-Cytochrom P450-Reduktase eine Umsetzung detektiert werden. Diese war allerdings deutlich höher als bei dem äquivalenten Ansatz, bei dem die Benzamidoxim-Reduktase im Ansatz vorhanden war (Daten nicht aufgeführt).

Tab. 3-13 Umsetzung von 1α -Hydroxyvitamin D_3 durch die Benzamidoxim-Reduktase nach Zusatz verschiedener NADPH-Cytochrom P450-Reduktasen

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die mit der neu entwickelten LC/MS-Methode vermessen wurden.

Inkubationsansatz	pmol $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 * min ⁻¹ * mg Protein ⁻¹
3. Protein mit Reduktase-Mikrosomen (human)	n.d.
3. Protein mit gereinigter Reduktase (human)	2.41 \pm 0.23
3. Protein mit gereinigter Reduktase (porcin)	1.733 \pm 0.005
3. Protein ohne NADPH	n.d.
3. Protein ohne Reduktase	n.d.
	pmol $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 * min ⁻¹
ohne 3. Protein, nur Reduktase-Mikrosomen (human)	n.d.
ohne 3. Protein, nur gereinigte Reduktase (human)	n.d.
ohne 3. Protein, nur gereinigte Reduktase (porcin)	0.25 \pm 0.09

Abb. 3-17 zeigt zwei HPLC-Chromatogramme im Vergleich, die nach Inkubation von drittem Protein zum einen mit humanen Reduktase-Mikrosomen und zum anderen mit gereinigter humaner NADPH-Cytochrom P450-Reduktase nach der ersten HPLC-Trennung erhalten wurden. Deutlich ist die Bildung des Metaboliten durch das dritte Protein in Kombination mit der aufgereinigten Reduktase zu erkennen, während nach

Zusatz von Reduktase-Mikrosomen kaum eine Bildung von $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ zu detektieren war.

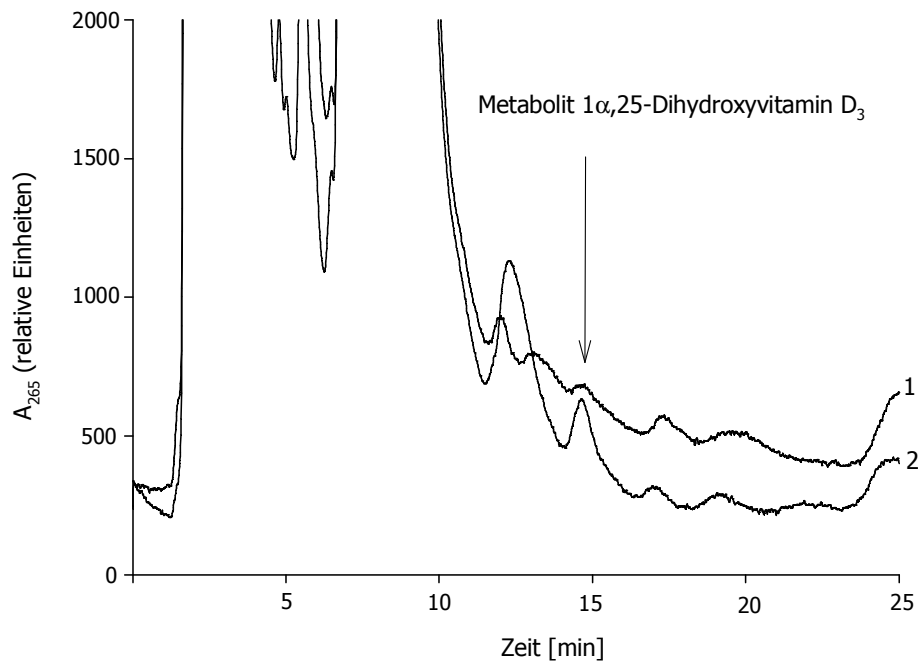


Abb. 3-17 HPLC-Chromatogramme nach der nur durch Normalphase getrennten Inkubationen von drittem Protein mit (1) humanen Reduktase-Mikrosomen und (2) gereinigter humaner Reduktase

Die Zusammensetzung des Inkubationsansatzes sowie die Aufarbeitung erfolgten nach der unter 3.2.5.1.4 beschriebenen Methode.

3.3.4.8 IN VITRO OXIDATION VON 1α -HYDROXYVITAMIN D₃ ZU $1\alpha,25$ -DIHYDROXYVITAMIN D₃ DURCH REKOMBINANTES CYP2D25 (OHNE COEXPRIMIERTE NADPH-CYTOCHROM P450-REDUKTASE), V60A1 UND WILDTYP W(N)

Bei der Umsetzung von 1α -Hydroxyvitamin D₃ mit rekombinantem CYP2D25, bei dem die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase nicht coexprimiert worden war und aus diesem Grund exogen hinzugesetzt werden musste, konnte 25-Hydroxylase-Aktivität festgestellt werden (Abb. 3-18). In Abhängigkeit von der verwendeten Transformante konnten unterschiedliche Umsetzungsraten gemessen werden. Es ergaben sich auch Unterschiede bezüglich der Aktivität durch die Wahl der Reduktase

und der eingesetzten Proteinmenge. Beim Einsatz von 1 mg Protein (Ansatz 1 in Abb. 3-18) zeigte sich eine deutlich höhere Umsetzungsrate als bei Ansätzen, in denen nur 0.5 mg Protein verwendet worden waren (Ansätze 2-6 in Abb. 3-18). Die Ansätze 3 und 4 unterschieden sich nur in der zugegebenen Reduktase. In Ansatz 3 wurden Reduktase-Mikrosomen eingesetzt, während in Ansatz 4 die gereinigte humane Reduktase verwendet wurde. Der Wechsel der unterschiedlichen Reduktase führte zu einer höheren Umsetzungsrate in Ansatz 4.

Sowohl die aus V60A1 als auch die aus dem Wildtyp W(N) gewonnenen Mikrosomen zeigten keine 25-Hydroxylase-Aktivität. Somit ergab sich für die CYP2D25 enthaltenden Mikrosomen eine signifikant höhere Umsetzungsrate als für die Mikrosomen, die keine Vitamin D₃ 25-Hydroxylase enthielten.

Wurde NADPH in den Inkubationsansätzen gegen Puffer ersetzt, konnte bei keiner der Enzympräparationen eine Umsetzung zu 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ detektiert werden (Daten nicht aufgeführt).

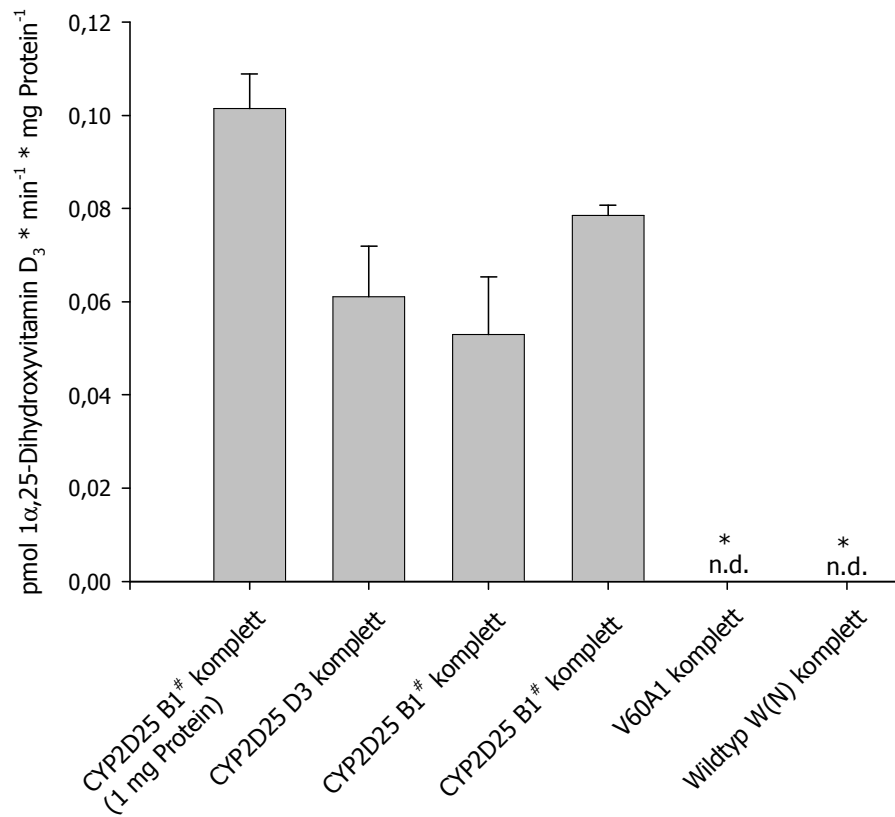


Abb. 3-18 Bildung von 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ durch rekombinantes CYP2D25 (ohne coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase), V60A1 und Wildtyp W(N)

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte ± SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben. Die Inkubationsbedingungen und die Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben. * Statistischer Unterschied zu Komplettansätzen mit CYP2D25 B1# P < 0.1 (Student's t-Test für ungleiche Varianzen).

3.3.4.9 IDENTIFIZIERUNG DES GEBILDETEN 1α,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃ MITTELS LC/MS

Durch *in vitro* Studien unter Verwendung mikrosomaler und mitochondrialer Enzympräparationen verschiedener Organe und Spezies konnte die Metabolisierung von 1α-Hydroxyvitamin D₃ zu 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ mit der neu entwickelten LC/MS-Methode nachgewiesen werden.

Abb. 3-19 zeigt ein repräsentatives Chromatogramm eines kompletten Inkubationsansatzes nach Umsetzung von 1α-Hydroxyvitamin D₃ mit humanen

Lebermitochondrien mit den drei für den Metaboliten charakteristischen Ionenspuren 399, 381 und 363. Die Retentionszeit des synthetisch hergestellten $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 stimmt mit der des Metaboliten überein. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 wies eine Retentionszeit von 9.0 ± 0.5 min auf, während das Substrat 1α -Hydroxyvitamin D_3 durch den Gradienten bereits bei 21.3 ± 0.5 min eluiert wurde.

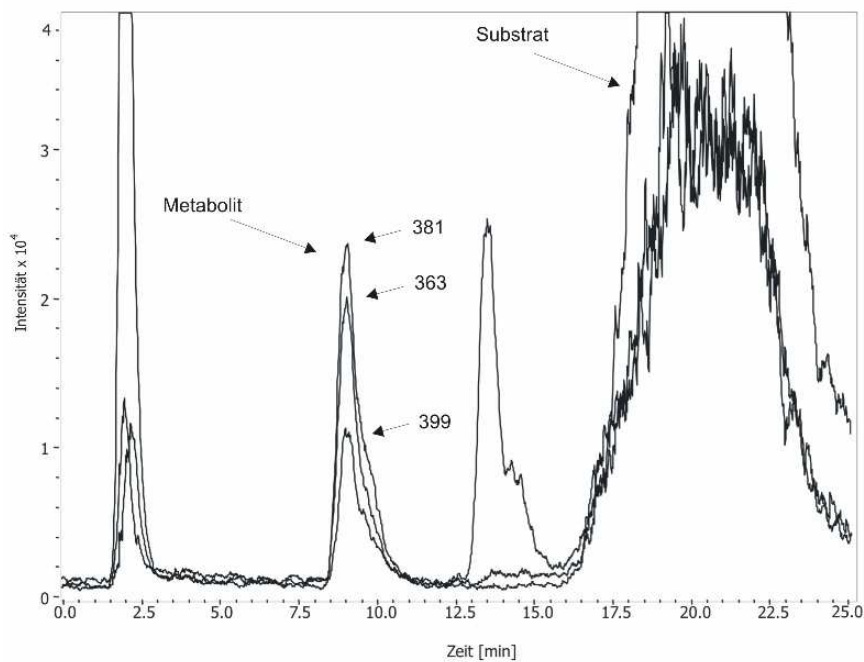


Abb. 3-19 Repräsentatives Chromatogramm nach Inkubation von 1α -Hydroxyvitamin D_3 mit humanen Lebermitochondrien

Die Zusammensetzung des Inkubationsansatzes sowie die Aufarbeitung erfolgten nach der unter 3.2.5.1.2 und 3.2.5.2 beschriebenen Methode.

3.3.5 O-DEMETHYLIERUNG VON DEXTROMETHORPHAN ZU DEXTRORPHAN

3.3.5.1 KALIBRIERUNG UND WIEDERFINDUNG

Zur Quantifizierung des aus Dextromethorphan durch O-Demethylierung gebildeten Dextrorphan wurde eine Kalibrierung und Wiederfindung mit der unter 3.2.6.2 beschriebenen HPLC-Analytik durchgeführt. Abb. 3-20 zeigt die durch jeweils lineare Regression erhaltene Ausgleichsgerade der Kalibrierung und der Wiederfindung. Alle Funktionen der Kalibrierungen und Wiederfindungen waren in dem untersuchten Konzentrationsbereich linear.

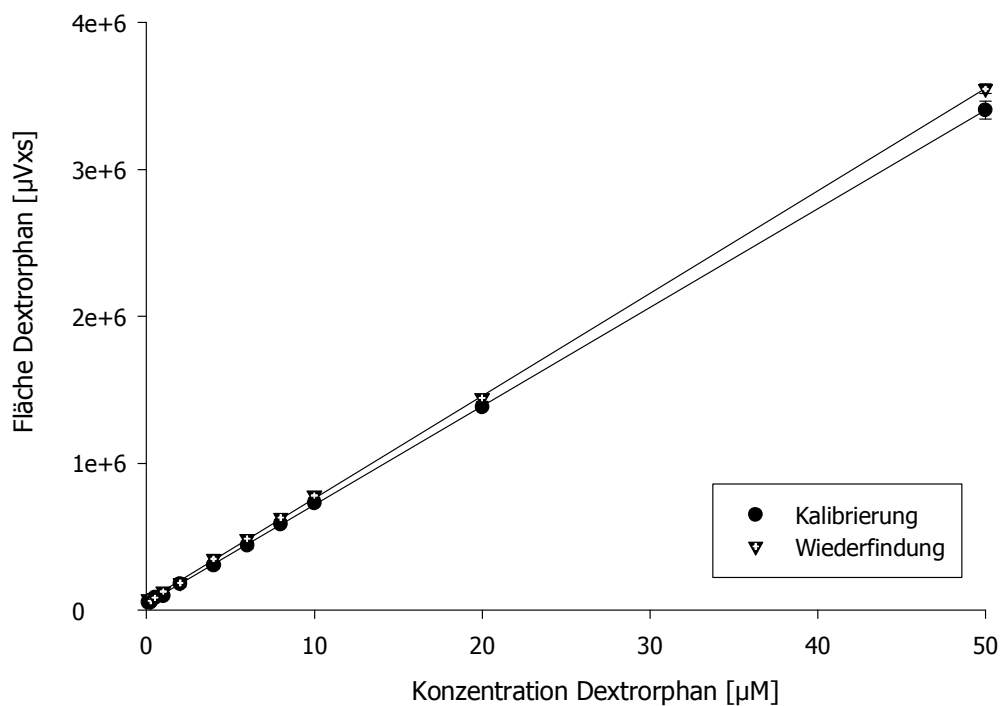


Abb. 3-20 Kalibrierung und Wiederfindung von Dextrorphan

Die Signalfächen sind die Mittelwerte \pm SD aus $n = 2$ Inkubationen, jeweils 2x vermessen; Kalibrierung $r = 0.9995$; Wiederfindung $r = 0.9996$.

3.3.5.2 *IN VITRO* O-DEMETHYLIERUNG VON DEXTROMETHORPHAN ZU DEXTRORPHAN DURCH SLM UND CYP2D25 (MIT COEXPRIMIERTER NADPH-CYTOCHROM P450-REDUKTASE)

Um die bereits etablierte HPLC-Analytik zu testen, wurden Inkubationen mit SLM und rekombinantem CYP2D25 mit coexprimierter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase *in vitro* mit Dextromethorphan und NADPH vermessen. Dextromethorphan wird sowohl von SLM als auch von CYP2D25 zu Dextrorphan umgesetzt, während die Bildung des Metaboliten bei Ersatz des Cosubstrates durch Puffer nur in geringem Maße detektiert werden konnte (Tab. 3-14).

Tab. 3-14 *O*-Demethylierung von Dextromethorphan durch SLM und CYP2D25 (mit coexprimierter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase)

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die jeweils 2x vermessen wurden. Die Inkubation und die Aufarbeitung erfolgten wie unter 3.2.6.3.2 beschrieben; SLM: Schweinelebermikrosomen.

Inkubationsansatz	nmol Dextrorphan * min ⁻¹ * mg Protein ⁻¹
SLM	2.289 \pm 0.076
SLM ohne NADPH	0.062 \pm 0.005
CYP2D25	1.544 \pm 0.092
CYP2D25 ohne NADPH	0.081 \pm 0.013

3.3.5.3 *IN VITRO* O-DEMETHYLIERUNG VON DEXTROMETHORPHAN ZU DEXTRORPHAN DURCH CYP2D25 (OHNE COEXPRIMIERTE NADPH-CYTOCHROM P450-REDUKTASE) IM VERGLEICH ZU V60A1 UND WILDTYP W(N)

Abb. 3-21 zeigt die Umsetzungsraten im Dextromethorphan-Assay, die nach Einsatz von rekombinantem CYP2D25, V60A1 und Wildtyp W(N) erhalten wurden. Bei allen Ansätzen musste die humane NADPH-Cytochrom P450-Reduktase exogen hinzugesetzt werden, um auf diese Weise das Enzymsystem zu rekonstituieren. CYP2D25-Präparationen zeigten im Vergleich zu aus V60A1 bzw. Wildtyp W(N)

gewonnenen Mikrosomen signifikant höhere Umsetzungsraten. Wurde auf den Zusatz von NADPH verzichtet, wurden die Umsetzungsraten signifikant geringer.

Mikrosomen aus V60A1 zeigten sowohl im Komplettansatz als auch ohne Cosubstrat vergleichbare Umsetzungsraten. Beim Wildtyp hingegen konnte keine Umsetzung von Dextromethorphan zu Dextrorphan detektiert werden.

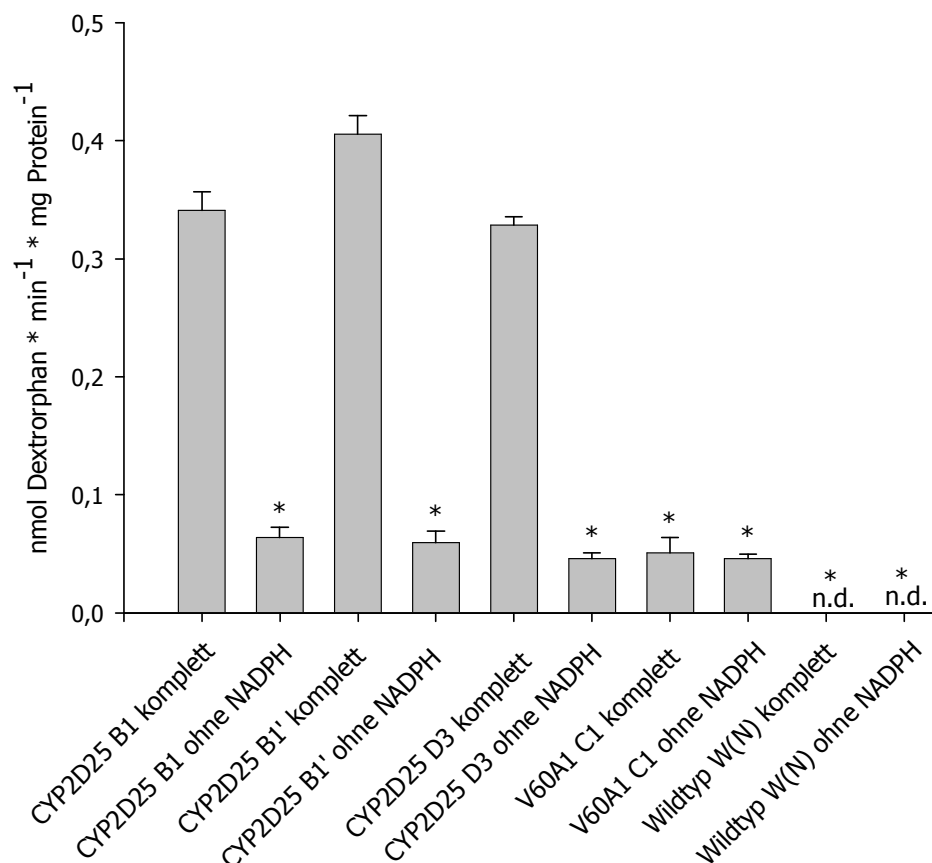


Abb. 3-21 Umsetzung zu Dextrorphan durch CYP2D25, V60A1 und Wildtyp W(N)

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die jeweils 2x vermessen wurden. Die Inkubationsbedingungen und die Aufarbeitung sind im Methodenteil beschrieben.

* Statistischer Unterschied zu Inkubationsansätzen mit CYP2D25 P < 0.001 (Student's t-Test für ungleiche Varianzen). Die Buchstaben- und Zahlenkombination hinter der jeweiligen Präparation gibt die Transformante an, aus der die Mikrosomen gewonnen wurden.

3.3.5.4 UNTERSUCHUNG EINER INHIBITORISCHEN WIRKUNG VON CYP2D25 (OHNE COEXPRIMIERTER NADPH-CYTOCHROM P450-REDUKTASE), V60A1 UND WILDTYP W(N) AUF DIE O-DEMETHYLIERUNG VON DEXTROMETHORPHAN

Bei einer Inkubation von SLM zusammen mit den in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierten Enzympräparationen konnte gezeigt werden, dass die Umsetzung zu Dextrophan nicht inhibiert wird (Tab. 3-15). Nach Zusatz von CYP2D25 und V60A1 war sie sogar erhöht, wobei durch CYP2D25 mehr Dextrophan pro Minute gebildet wurde als bei Verwendung von V60A1. Bei Zusatz von Mikrosomen, die aus dem Wildtyp der Hefe gewonnen wurden, konnte eine leicht verringerte Umsetzungsrate detektiert werden.

Tab. 3-15 O-Demethylierung von Dextromethorphan durch SLM in Anwesenheit von CYP2D25 (ohne coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase), V60A1 und Wildtyp W(N)

Die Umsetzungsraten sind als Mittelwerte \pm SD von mindestens zwei separaten Inkubationsansätzen angegeben, die jeweils 2x vermessen wurden. Die Angaben erfolgten in der Einheit [nmol Dextrophan * min⁻¹], um die Werte besser miteinander vergleichen zu können, da sie sich im Gesamtproteingehalt unterscheiden.

Inkubationsansatz	nmol Dextrophan * min ⁻¹
SLM komplett	1.387 \pm 0.003
SLM +CYP2D25	1.947 \pm 0.071
SLM + V60A1	1.585 \pm 0.068
SLM + Wildtyp W(N)	1.019 \pm 0.025

3.3.5.5 IDENTIFIZIERUNG DES GEBILDETEN DEXTROPHANS MITTELS HPLC

Im Anschluss an die Inkubationen von Dextromethorphan mit rekombinantem CYP2D25 konnte Dextrophan mittels HPLC anhand der Retentionszeit als Metabolit nachgewiesen werden, wobei ein Vergleich mit einem synthetisch hergestellten Standard die Identität bestätigte. Abb. 3-22 zeigt zwei repräsentative Chromatogramme nach Inkubationen von Dextromethorphan mit CYP2D25 bzw.

V60A1, wobei deutlich wird, dass der Metabolit Dextrorphan nur in Anwesenheit von CYP2D25 gebildet wird. Wurde dagegen V60A1 in den Inkubationsansätzen eingesetzt, konnte keine Umsetzung detektiert werden.

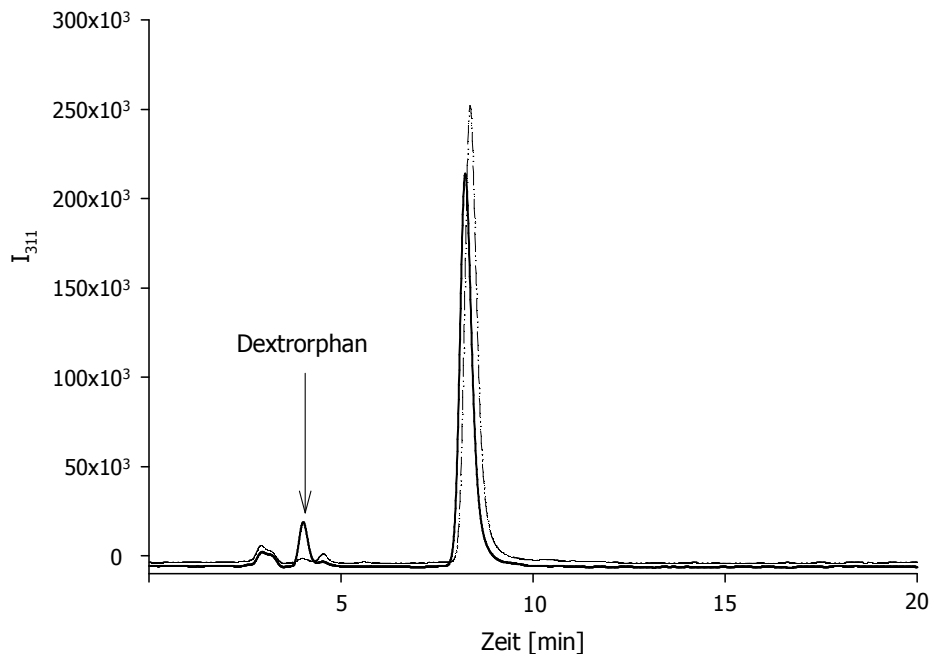


Abb. 3-22 *Repräsentative HPLC-Chromatogramme, erhalten nach Inkubationen von Dextromethorphan mit CYP2D25 (ohne coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase) im Vergleich zu V60A1*

Die Inkubationen und Aufarbeitungen erfolgten nach der unter 3.2.6.3.2 beschriebenen Methode. Die gepunktete feine Linie stellt das nach Inkubation mit V60A1 erhaltene Chromatogramm dar, die durchgezogene Linie das nach Inkubation mit CYP2D25 detektierte Chromatogramm.

3.3.6 SUBSTRATBINDUNGSSPEKTREN

3.3.6.1 BINDUNG VON BAO IN SCHWEINELEBERMIKROSOMEN

Die Aufnahme von Bindungsspektren mit Benzamidoxim als Substrat erfolgte nach der unter 3.2.7.2 aufgeführten Methode. In Abb. 3-23 ist das Substratbindungsspektrum in SLM nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von Benzamidoxim dargestellt. Es ergab sich ein Mischspektrum mit einem Maximum bei

408 nm und einem Minimum bei 424 nm bei einer Absorptionsdifferenz von 0.017, das keine klare Zuordnung zu einem bestimmten Typ I- bzw. Typ II-Spektrum erlaubt [Testa, 1995c]. Wie aus Abb. 3-23 ersichtlich wird, war schon bei 1.4 μM BAO die Sättigungskonzentration erreicht.

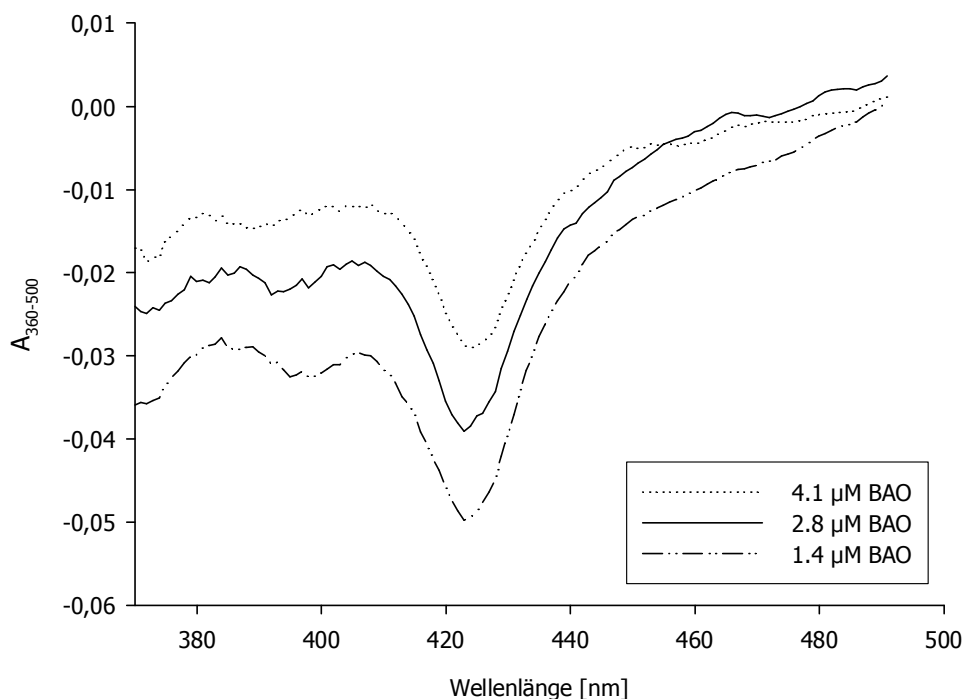


Abb. 3-23 *Substratbindungsspektren in Schweinelebermikrosomen*

Bildung eines Differenzspektrums nach Zugabe von 1.4, 2.8 und 4.1 μM Benzamidoxim. Es konnte ein Maximum bei 408 nm und ein Minimum bei 424 nm detektiert werden.

3.3.6.2 BINDUNG VON BAO DURCH CYP2D25 (OHNE COEXPRIMIERTER NADPH-CYTOCHROM P450-REDUKTASE)

Auch die rekombinant exprimierte Vitamin D₃ 25-Hydroxylase wurde hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit von BAO untersucht (Abb. 3-24). Steigende Konzentrationen von BAO wurden zu den Probenküvetten hinzugegeben, aber selbst bei einer Konzentration von 10.3 μM BAO konnte weder ein Maximum noch ein Minimum detektiert werden.

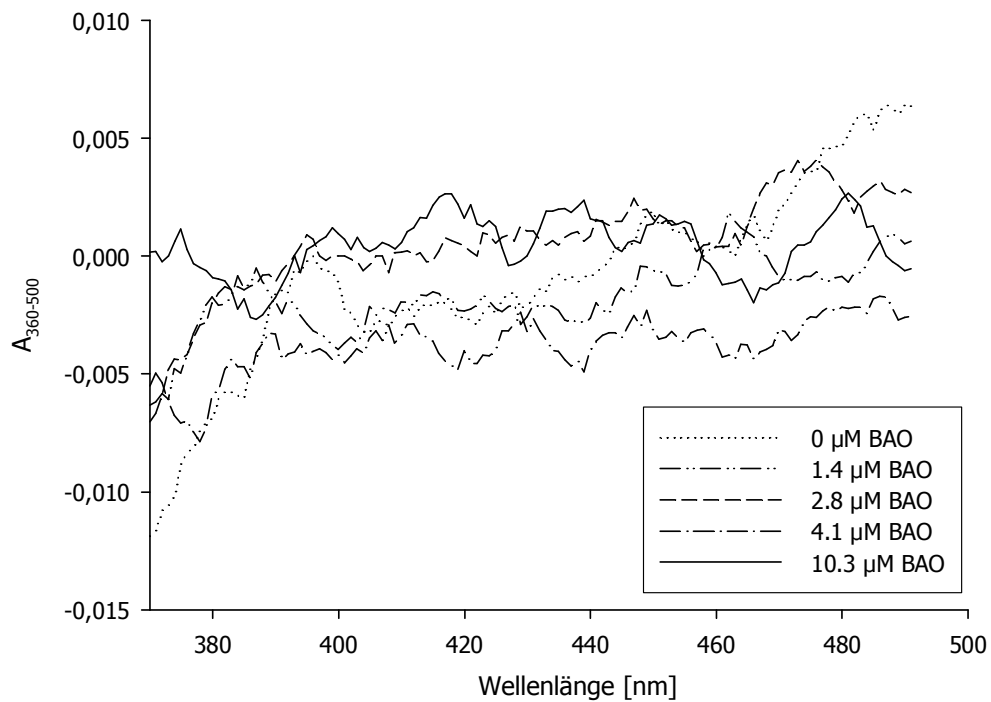


Abb. 3-24 Substratbindungsspektren mit CYP2D25

Bildung eines Differenzspektrums nach Zugabe von 0, 1,4, 2,8, 4,1 und 10,3 µM Benzamidoxim. Es konnte weder ein Maximum noch ein Minimum detektiert werden.

3.4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Benzamidoxim-Reduktase mit der Vitamin D₃ 25-Hydroxylase identisch ist oder ob es sich bei diesen beiden Enzymen aufgrund möglicher überlappender Substratspezifitäten um zwei sehr ähnliche CYP2D-Varianten handeln könnte. In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die drei untersuchten Peptidfragmente der Benzamidoxim-Reduktase eine 98 %ige Homologie zu CYP2D25 aufwiesen [Möller, 1997; Berger, 2002]. Die Fragestellung erschien umso interessanter, als der in den neuesten Sequenzierungen gefundene Aminosäureaustausch von Isoleucin gegen Methionin nicht wieder bestätigt werden konnte (siehe Kapitel 4).

3.4.1 REDUKTION VON BENZAMIDOXIM ZU BENZAMIDIN

Zunächst wurde rekombinantes CYP2D25 mit coexprimierter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase nach erfolgreicher Aktivitätstestung im 1 α -Hydroxyvitamin D₃-Assay auf seine reduktiven Eigenschaften im Benzamidoxim-Reduktase-Assay getestet. Überraschenderweise konnte keine Umsetzung zu Benzamidin detektiert werden. Stattdessen wurde ein inhibitorischer Effekt durch die eingesetzten CYP2D25-Mikrosomen bei einer Coinkubation mit SLM festgestellt. Daher stellte sich die Frage, ob die coexprimierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase einen inhibitorischen Effekt auf die Reduktion haben könnte, da sie normalerweise nur bei oxidativen Umsetzungen hinzugesetzt werden muss. Sowohl nach Zusatz von Superoxid-Dismutase, die den hemmenden Einfluss der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase auf die Reduktion von BAO zu BA unterbinden soll [Clement *et al.*, 1997], als auch von einem potenziellen Aktivator Tetrahydrobiopterin konnte die Umsetzungsrate nicht gesteigert werden. Zudem wurden verschiedenste Reagenzien getestet, die bei der Aufarbeitung und Mikrosomenherstellung von CYP2D25 verwendet wurden, aber auch hier konnten keine hemmenden Eigenschaften dieser Reagenzien aufgezeigt werden.

Aus diesen Gründen wurde mit der Expression von CYP2D25 ohne die Coexpression der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase in *Saccharomyces cerevisiae* begonnen, um

auf diese Weise den möglichen inhibitorischen Effekt der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase zu unterbinden. Parallel dazu wurden Mikrosomen aus Hefezellen gewonnen, die zum einen gentechnisch unverändert geblieben waren (Wildtyp W(N)), zum anderen aber wie im ersten Fall aus transformierten Hefen gewonnen wurden, die allerdings nur den Vektor pYeDP60 V60A1 ohne die CYP2D25-Sequenz inkorporiert hatten. Aber auch mit diesen Mikrosomen zeigte sich dasselbe Bild: Rekombinantes CYP2D25 vermochte kein Benzamidoxim zu reduzieren. Wurde auf rekombinantes Enzym ganz verzichtet und nur Cytochrom b₅ und NADH-Cytochrom b₅-Reduktase eingesetzt, waren die Umsetzungsraten ungefähr zehnmal höher. Dies ließ einen inhibitorischen Effekt auch dieser rekombinanten Mikrosomen vermuten. Eine Coinkubation mit SLM zeigte jedoch, dass die durch SLM gebildete Benzamidin-Menge, von biologischen Schwankungen abgesehen, konstant blieb. Auch eine Coinkubation mit rekombinant exprimiertem humanem CYP2E1 führte nicht zu einer Reduktion von Benzamidoxim. Selbst die Steigerung der Menge an Cytochrom b₅, NADH-Cytochrom b₅-Reduktase bzw. an Substrat in den unter 3.2.3.4.3 beschriebenen Inkubationsansätzen hatte auf die Umsetzung von Benzamidoxim zu Benzamidin keinen Einfluss. Eine Erhöhung der Proteinmenge erweckte zunächst den Anschein vermehrter Benzamidin-Bildung. Als die aus dem gentechnisch unveränderten Wildtyp W(N) gewonnene Proteinmenge erhöht wurde, konnte ebenfalls eine gesteigerte Benzamidin-Bildung gemessen werden. Offensichtlich sind in der Hefe selbst Enzyme aktiv, oder es sind die für die Gewinnung der Enzympräparationen verwendeten Detergenzien daran beteiligt, diese Reaktion bei erhöhter Proteinmenge zu katalysieren.

Des Weiteren wurde die Reduktion von Benzamidoxim nach Zusatz eines Gemisches aus Liposomen, CHAPS und Glutathion in HEPES-Puffer getestet. Die in diesem System gemessenen Umsetzungsraten der Benzamidoxim-Reduktase waren geringer als im optimierten Ansatz in Phosphatpuffer. Stiborová *et al.* [2001] rekonstituierten mit diesem Gemisch die P450-Aktivität von CYP1A1 aus der Ratte und CYP1A2 aus dem Menschen, während Shaw *et al.* [1997] damit die Aktivität von rekombinantem CYP3A4 testeten. Auch Gillam *et al.* [1993] beschrieben die Rekonstitution von rekombinantem CYP3A4 unter Zusatz des Liposomengemisches aus DLPC, DOPC und PS im Verhältnis 1:1:1, Natriumcholat und Glutathion, während Yamazaki *et al.*

[1996] zusätzlich mit Magnesiumchlorid arbeiteten. Daher wurde auch rekombinantes CYP2D25 unter Zusatz des von Stiborová *et al.* [2001] genannten Gemisches rekonstituiert, wodurch aber keine vermehrte Benzamidin-Bildung detektiert werden konnte.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Vitamin D₃ 25-Hydroxylase neben einigen anderen Proteinen in der aus Schweineleber aufgearbeiteten Benzamidoxim-Reduktase vorhanden ist (siehe Kapitel 4), aber offensichtlich kein Benzamidoxim zu Benzamidin reduzieren vermag. Vielmehr scheint das Zusammenspiel mehrerer Enzyme bzw. mitgereinigter Aktivatoren für eine erfolgreiche Reduktion erforderlich zu sein.

3.4.2 OXIDATION VON 1 α -HYDROXYVITAMIN D₃ ZU 1 α ,25-DIHYDROXYVITAMIN D₃

Rekombinant exprimiertes CYP2D25 konnte nach exogenem Zusatz von NADPH-Cytochrom P450-Reduktase erfolgreich mit der neu entwickelten LC/MS-Methode auf 25-Hydroxylase-Aktivität getestet werden. Wurden hingegen aus V60A1 bzw. Wildtyp gewonnene Mikrosomen, die beide keine Vitamin D₃ 25-Hydroxylase exprimiert hatten, in diesem Assay eingesetzt, konnte erwartungsgemäß keine Umsetzung von 1 α -Hydroxyvitamin D₃ zu 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ detektiert werden. Die Umsetzungsraten von CYP2D25 nach exogenem Zusatz der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase waren geringer als bei dem CYP2D25, bei dem die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase coexprimiert worden war. CYPs zeigen in der Regel höhere Umsetzungsraten, wenn die Redoxpartner coexprimiert worden sind [Crespi und Miller, 1999].

Erst durch die sich an die beiden HPLC-Trennungen anschließende MS war es möglich, den Metaboliten 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ auch in Gegenwart anderer Verunreinigungen mit derselben Retentionszeit eindeutig quantitativ zu bestimmen. Dazu wurden drei Ionenspuren ausgewählt, die den Metaboliten eindeutig charakterisierten. Die dem Metaboliten entsprechenden Peakflächen unter den Ionenspuren 399, 381 und 363 wurden für die quantitative Auswertung herangezogen, wobei das Verhältnis der drei Ionenspuren zueinander (1:2:2) von

entscheidender Bedeutung war. Während die Ionenspuren 381 und 363 nahezu gleich groß waren, war die Ionenspur 399 nur halb so groß. Lag nun eine Verunreinigung mit der dem Metaboliten entsprechenden Retentionszeit vor, die zudem eine Verschiebung des oben genannten Ionenverhältnisses verursachte, konnten nicht mehr alle drei Ionenspuren zur Auswertung herangezogen werden, sondern nur noch die, die eindeutig dem $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 zugeordnet werden konnten.

Zur Extraktion des gebildeten Metaboliten aus der wässrigen Phase wurde statt 1,1,1-Trichlorethan Dichlormethan verwendet, da einerseits der Metabolit mit Dichlormethan genauso gut ausgeschüttelt werden konnte und andererseits das 1,1,1-Trichlorethan in den Chromatogrammen einen Störpeak der Ionenspur 381 mit der dem Metaboliten äquivalenten Retentionszeit verursachte. Außerdem schien ein Austausch aus toxikologischer Sicht durchaus sinnvoll, da 1,1,1-Trichlorethan stark wassergefährdend ist und zum Abbau der Ozonschicht führt [ICSC: 0079]. Des Weiteren konnte in Tests gezeigt werden, dass ein einmaliges Ausschütteln der wässrigen Phase für eine quantitative Überführung des Metaboliten in das organische Lösungsmittel ausreichend ist (Daten im Ergebnisteil nicht aufgeführt).

Bei der in der Literatur beschriebenen Methode mit UV-Detektion wurde zur Bestimmung der Wiederfindung radioaktiv markiertes $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 eingesetzt und damit eine Wiederfindungsrate von 60 % ermittelt [Axén *et al.*, 1992]. Mit der neu entwickelten LC/MS-Methode konnte eine Wiederfindungsrate von 144 %, bezogen auf die ebenfalls aufgearbeitete Kalibrierung, berechnet und auf den Einsatz radioaktiv markierter Substanzen verzichtet werden. Wird die Wiederfindung allerdings auf die Direktkalibrierung bezogen, errechnet sich daraus eine Wiederfindungsrate von nur noch 37.5 %. Aus diesen Daten wird deutlich, dass ein Teil des Metaboliten allein durch die Aufarbeitung verloren geht und so der Detektion entzogen wird.

Verschiedene mikrosomale und mitochondriale Fraktionen unterschiedlicher Spezies und Organe wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, 1α -Hydroxyvitamin D_3 an C_{25} zu hydroxylieren. Demnach ist die mikrosomale Umsetzungsrate in Menschenleber höher als in Schweineleber bzw. -niere, allerdings muss beim Vergleich der Umsetzungsraten beachtet werden, dass das in Schweineleber

vorkommende mikrosomale Enzym (CYP2D25) ein anderes ist als jenes, das in der humanen Leber die 25-Hydroxylierung katalysiert. Nach neuesten Forschungserkenntnissen soll es sich bei der humanen mikrosomalen 25-Hydroxylase möglicherweise um CYP3A4 [Gupta *et al.*, 2004] bzw. CYP2R1 [Cheng *et al.*, 2004] handeln.

In den mitochondrialen Fraktionen wurden durch das in der Schweineleber vorkommende CYP27, das u. a. die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃-Substraten katalysiert [Axén *et al.*, 1994b], höhere Umsetzungsraten als mit humanen Lebermitochondrien erzielt. Weiterhin wird in SL-Mitochondrien eine fast 15-fach höhere Umsetzung zu 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ im Vergleich zu SL-Mikrosomen erzielt. Besonders auffällig wurde dieser Unterschied in der 25-Hydroxylase-Aktivität bei Einsatz rekombinanter Enzyme, die *in vitro* rekonstituiert wurden: Rekombinant exprimiertes CYP27A1 setzte 1 α -Hydroxyvitamin D₃ fast 70000-fach besser um als rekombinantes CYP2D25.

Daher stellte sich die Frage, welches der beiden Enzyme *in vivo* diese Reaktion in der porcinen Leber katalysiert oder ob vielleicht beide Enzyme, ein mitochondriales und ein mikrosomales, an der 25-Hydroxylierung beteiligt sind. In den letzten Jahren wurde sogar die Rolle des mitochondrialen CYP27A1 als Vitamin D₃ 25-Hydroxylase in Frage gestellt, da einige Patienten mit zerebrotendinöser Xanthomatose, die durch Mutationen im CYP27A1 Gen ausgelöst wird [Cali *et al.*, 1991; Clayton *et al.*, 2002], keine wesentlich verminderten Konzentrationen an 25-Hydroxyvitamin D₃ besaßen [Rosen *et al.*, 1998]. Außerdem zeigte CYP27A1 sehr hohe K_m-Werte von 54 μ M für 1 α -Hydroxyvitamin D₃ in Rattenlebermitochondrien [Masumoto *et al.*, 1988] und von 10 μ M für Vitamin D₃ in Kaninchenlebermitochondrien [Dahlbäck und Wikvall, 1988]. Für die aus Schweineleber gereinigte mikrosomale Vitamin D₃ 25-Hydroxylase (CYP2D25) wurde hingegen ein sehr viel geringerer K_m-Wert von 0.1 μ M für die 25-Hydroxylierung von Vitamin D₃ gefunden [Hosseinpour und Wikvall, 2000]. Nach Studien an Hepatozyten kamen Hosseinpour *et al.* [2003] allerdings zu dem Schluss, dass sowohl CYP27A1 als auch CYP2D25 eine 25-Hydroxylierung bewirken und beide Enzyme für die Bioaktivierung von Vitamin D₃ wichtig sind.

Die aus Schweineleber gereinigte Benzamidoxim-Reduktase musste umgekehrt auf 25-Hydroxylase-Aktivität getestet werden, da bei mehreren Sequenzierungen mittels

MALDI-MS und MS/MS die von dem MAK erkannte Bande als CYP2D25 identifiziert werden konnte (siehe Kapitel 4). Die 25-Hydroxylase-Aktivität wurde durch Rekonstitution mit humanen NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-Mikrosomen und nach Zugabe von NADPH getestet (siehe 3.2.5.1.4). Erstaunlicherweise konnte keine Bildung von $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 aus 1α -Hydroxyvitamin D_3 detektiert werden. Es lag die Vermutung nahe, dass das Zusammenspiel eines porcinen mit einem humanen Enzym nicht optimal sei. Wurde die aus Insektenzellen aufgereinigte humane NADPH-Cytochrom P450-Reduktase eingesetzt, konnten Umsetzungsraten von 2.409 ± 0.203 pmol $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 * min^{-1} * mg^{-1} bestimmt werden. Nach Komplettierung des porcinen Systems durch Zusatz gereinigter porciner NADPH-Cytochrom P450-Reduktase waren die Umsetzungsraten mit den eben genannten vergleichbar. Wurde hingegen nur die porcine NADPH-Cytochrom P450-Reduktase ohne die Benzamidoxim-Reduktase inkubiert, zeigten sich deutlich höhere Umsetzungsraten. Vermutlich war diese Reduktase mit drittem Protein verunreinigt, sodass daher $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 gebildet werden konnte. Bei Verwendung der käuflich erworbenen Reduktasen allein konnte hingegen keine Umsetzung detektiert werden.

3.4.3 DEMETHYLIERUNG VON DEXTROMETHORPHAN ZU DEXTROPHAN

Neben der Oxidation von 1α -Hydroxyvitamin D_3 wurde auch die Demethylierung von Dextromethorphan mit den in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierten CYP2D25-, V60A1- und Wildtyp-Mikrosomen getestet (siehe 3.2.6.3.2). Dextromethorphan ist ein Markersubstrat für humanes CYP2D6 [Koymans *et al.*, 1992] wie auch für CYP2D1 aus der Ratte [Tyndale *et al.*, 1999]. Inzwischen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CYP2D25 Dextromethorphan zu demethylieren vermag [Friedrich, 2003] (Abb. 3-25). Diese Methode hatte im Vergleich zur 1α -Hydroxyvitamin D_3 -Analytik zwei Vorteile: Zum einen lag der Messbereich nicht wie bei der Oxidation von 1α -Hydroxyvitamin D_3 im pmol-, sondern im nanomolaren Bereich. Zum anderen war diese Analytik weniger kompliziert und verlustreich, sodass mit dieser Methode eine weitere Möglichkeit der Aktivitätstestung des rekombinanten CYP2D25 zur Verfügung stand.

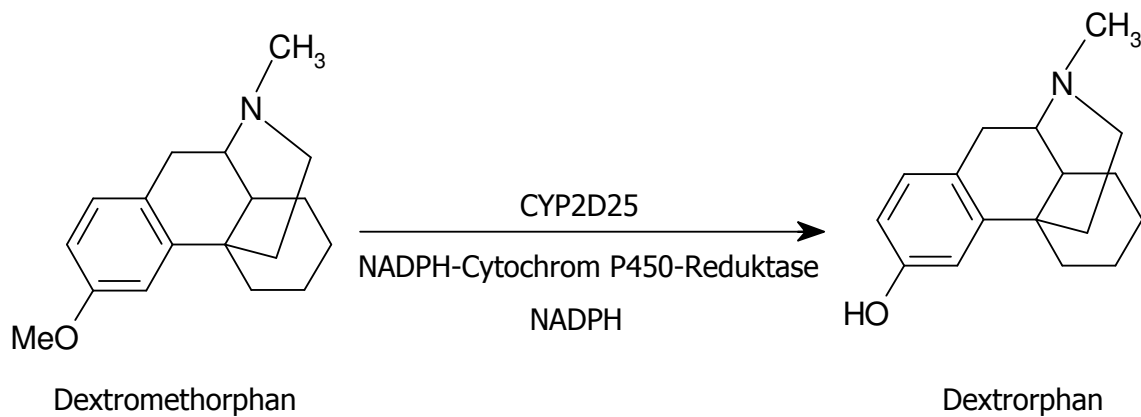


Abb. 3-25 O-Demethylierung von Dextromethorphan zu Dextrorphan

Nur rekombinant exprimiertes CYP2D25 verschiedener Transformanten katalysierte die Umsetzung von Dextromethorphan zu Dextrorphan. Sowohl V60A1 als auch der Wildtyp W(N) waren nicht in der Lage, diese Reaktion zu katalysieren. Damit war die Aktivität der in Hefe exprimierten CYP2D25-Mikrosomen bewiesen. Somit konnten sie in dem Benamidoxim-Reduktase-Assay zur Testung der Reduktion eingesetzt werden.

3.5 ZUSAMMENFASSUNG

CYP2D25 mit coexprimierter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase zeigte sowohl im 1α -Hydroxylase-Assay als auch im Dextromethorphan-Assay Aktivität. Eine Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin konnte hingegen nicht detektiert werden. Allerdings wiesen diese Mikrosomen bei Coinkubation mit SLM eine signifikante Hemmung der Reduktion auf. Nach Testung der Reagenzien und Zusätze, die für die Expression und Mikrosomenherstellung dieses Enzyms erforderlich waren, wurde die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase als potenzieller Inhibitor vermutet. Die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase wird für oxidative Umsetzungen benötigt, könnte aber das Zusammenspiel von Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase bei reduktiven Umsetzungen möglicherweise inhibieren.

Aus diesem Grund wurde CYP2D25 ohne die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase exprimiert, da nach erfolgreicher Aktivitätstestung vornehmlich die Reduktion von Benzamidoxim untersucht werden sollte. Das in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierte CYP2D25 vermochte sowohl 1α -Hydroxyvitamin D_3 zu $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 zu hydroxylieren als auch Dextromethorphan zu Dextrorphan zu demethylieren. Aus Hefezellen gewonnene Mikrosomen, in die nur der Vektor pYeDP60 V60A1 transformiert worden war und Mikrosomen, die aus den gentechnisch unveränderten Hefezellen des Wildtyps W(N) stammten, zeigten signifikant geringere bzw. gar keine Umsetzungen in den beiden Assays. Beim Vergleich der Umsetzungsraten im Dextromethorphan-Assay von SLM allein mit Coinkubationen von SLM zusammen mit den aus der Hefe exprimierten Enzympräparationen konnte keine Hemmung mehr festgestellt werden. Im Gegenteil, nach Zusatz von CYP2D25 und V60A1 zu den SLM war sogar eine Erhöhung der Umsetzungsrate messbar. Mit diesem Ergebnis kann bestätigt werden, dass die zuvor aufgetretene Hemmung der BAO-Reduktion bei Coinkubation von SLM mit CYP2D25 (mit coexprimierter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase) möglicherweise durch die im Ansatz vorhandene NADPH-Cytochrom P450-Reduktase verursacht wurde.

Somit konnte mit diesen Enzympräparationen die Reduktion von Benzamidoxim getestet werden. Allerdings zeigten die CYP2D25-Mikrosomen nach Rekonstitution mit Cytochrom b_5 und NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase keine Reduktion von

Benzamidoxim. Auch der Zusatz eines Gemisches aus Liposomen, CHAPS und Glutathion zum rekonstituierten Ansatz führte nicht zu einer vermehrten Benzamidin-Bildung.

Dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei der Benzamidoxim-Reduktase und der Vitamin D₃ 25-Hydroxylase um sehr ähnliche CYP2D-Enzyme handelt, die z.T. die gleichen Reaktionen katalysieren, aber durchaus auch unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen.

4 CHARAKTERISIERUNG DER BENZAMIDOXIM-REDUKTASE

4.1 EINLEITUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob es sich bei der Benzamidoxim-Reduktase um die mikrosomale Vitamin D₃ 25-Hydroxylase (CYP2D25) handelt. In vorangegangenen Studien wurden bereits drei Peptide der Benzamidoxim-Reduktase nach Bromcyanspaltung und anschließender HPLC-Auftrennung sequenziert (siehe 3.1.2). Diese Peptidfragmente zeigten nach Abgleichung mit einer Proteindatenbank eine 98 %ige Homologie zu CYP2D25 [Clement *et al.*, 1997]. Lediglich in einem Fragment (339-350) war eine Aminosäure im Vergleich zur CYP2D25-Sequenz ausgetauscht. In der Benzamidoxim-Reduktase wurde ein Methionin statt eines in der CYP2D25-Sequenz an der Position 350 vorhandenen Isoleucins detektiert. Um weiter zur Strukturaufklärung der Benzamidoxim-Reduktase beizutragen, wurden zwölf Fragmente der Benzamidoxim-Reduktase mittels MALDI-MS und Tandem-MS sequenziert.

4.2 METHODEN ZUR SEQUENZIERUNG DES DRITTEN PROTEINS

4.2.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

Die Angabe des Ortssitzes beteiligter Lieferfirmen erfolgt nur bei der ersten Nennung.

MALDI: Voyager DE-STR Massenspektrometer (Applied Biosystems, Boston, MA, USA); Standardpeptide (Calmix 2, Applied Biosystems).

ESI: Hybrid-Massenspektrometer API Q-STAR Pulsar i (Applied Biosystems), Nanoelektrospray (MDS Protana, Odense, Dänemark).

4.2.2 MALDI-MS

Zunächst wurde das dritte Protein durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die Bande aus dem Gel herausgeschnitten, die eine Reaktion mit dem Antikörper auf dem parallel bearbeiteten Western Blot zeigte. Anschließend wurde das eluierte Protein mit der Protease Trypsin verdaut, welche Proteine an der carboxyterminalen Seite von Lysin- und Argininresten spaltet. Arg-Pro- bzw. Lys-Pro-Verknüpfungen sind trypsinresistent [Rehm, 2002]. Die Ionisierung erfolgte mittels MALDI im positiven Ion-Mode und die Ermittlung der Peptidmassen massenspektrometrisch. Als Matrix wurde 2,5-Dihydroxybenzoesäure verwendet. Die externe Kalibrierung wurde mit Standardpeptiden durchgeführt.

Die auf diese Weise erhaltenen Fragmentmassen (Peptid-Mass-Fingerprint) wurden dann mit tryptisch verdauten Proteinen aus Datenbanken abgeglichen, wodurch eine Identifizierung des untersuchten Proteins möglich wurde [Jungblut und Thiede, 1997; Mann *et al.*, 2001].

4.2.3 ESI-MS/MS

Weitere Peptidbruchstücke des Proteins, bei dem es sich laut Datenbankergebnis um CYP2D25 handelte, wurden dahingehend untersucht, ob eventuell an anderen Positionen Aminosäureaustausche gegenüber der Originalsequenz von CYP2D25 vorliegen. Dazu wurde das Gel-separierte Protein mit Trypsin verdaut, die Peptide

(1.5 µl der Peptide, gelöst in ACN:H₂O (60:40) mit 1 % Ameisensäure) mittels ESI ionisiert und die entstandenen Fragmente im MS analysiert. Geeignete Ionen wurden dann für eine MS/MS-Analyse selektiert und durch weitere Fragmentierung des Peptides sequenziert (Abb. 4-1). Auf diese Weise erhält man Sequenzen mit einer typischen Länge von 5-20 Aminosäuren.

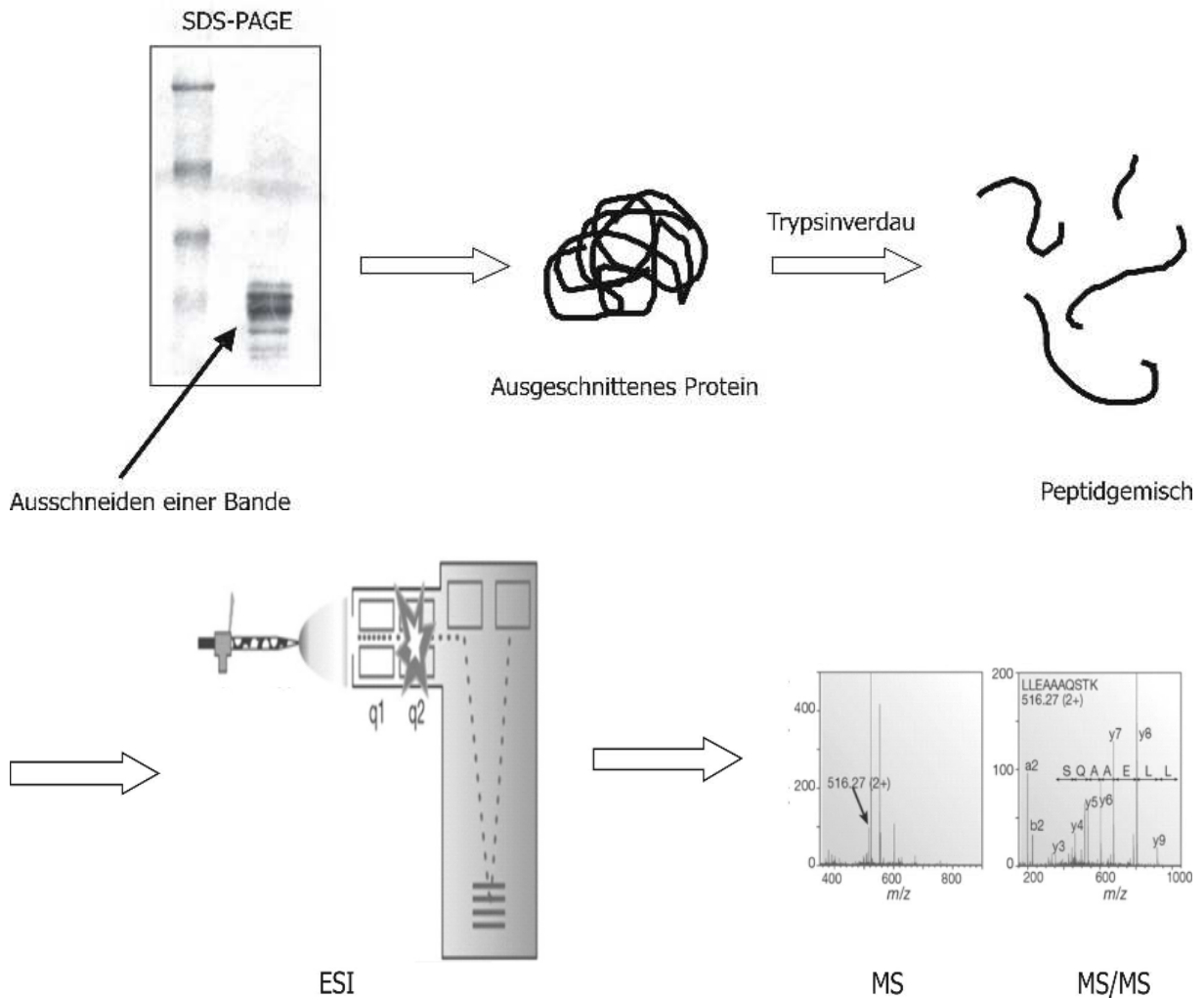


Abb. 4-1 Proteinidentifikation mittels Tandem-MS (modifiziert nach Aebersold et al. [2003])

Die Bestimmung der genauen Masse von proteolytischen Fragmenten eines aus einem SDS-Gel isolierten Proteins erfolgte durch Analyse im MS und anschließender Peptidsequenzierung durch Fragmentierung im Tandem-MS.

4.3 ERGEBNISSE

4.3.1 MALDI-MS

Bei der durch MALDI-MS untersuchten Bande des dritten Proteins handelte es sich um CYP2D25. Dabei wurden die theoretischen Massen, die nach Spaltung von CYP2D25 entstehen, mit denen aus dem gemessenen MALDI-MS Spektrum verglichen. Die in der Abb. 4-2 mit einem Stern (*) gekennzeichneten Massen konnten eindeutig dem CYP2D25 zugeordnet werden. 33 % der gemessenen Massen stimmten mit den Peptidmassen der CYP2D25-Sequenz überein. Somit kann dieses Ergebnis als gesichert angesehen werden [Planton GmbH, 2003].

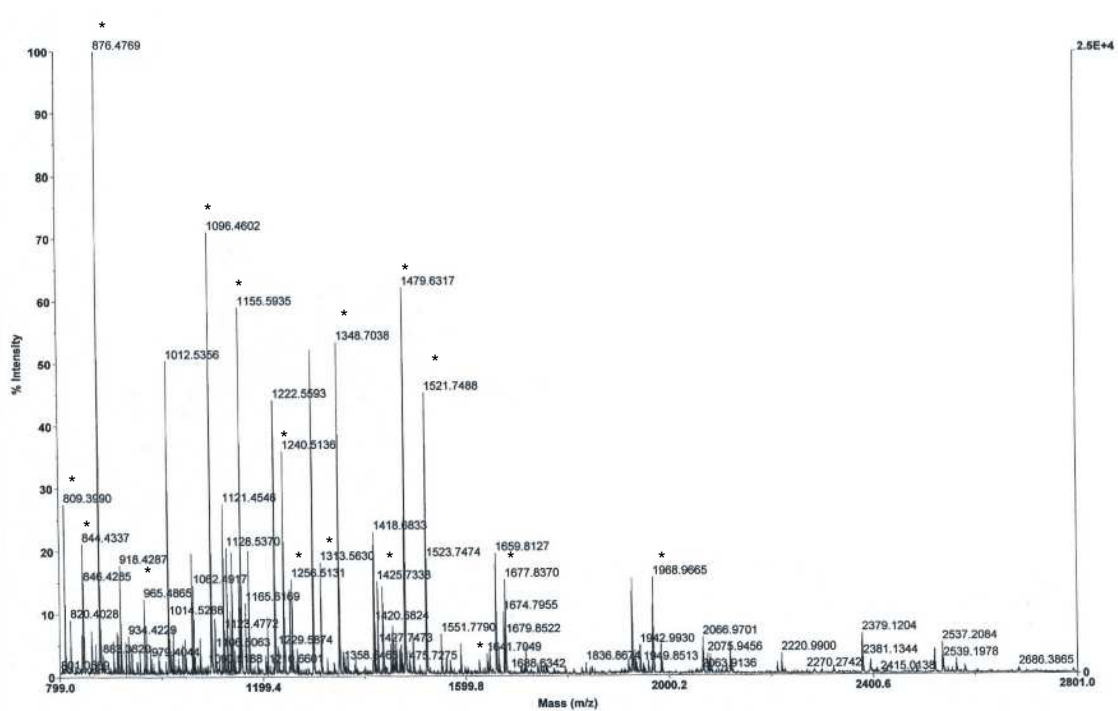


Abb. 4-2 *Massenspektrum der durch den Antikörper identifizierte Bande*

Die in dem Massenspektrum mit einem Stern (*) gekennzeichneten Fragmente konnten eindeutig dem CYP2D25 zugeordnet werden. Die Messungen wurden von der Firma Planton GmbH, Kiel durchgeführt.

Die vermutete Modifikation der Aminosäure an der Position 350 [Clement *et al.*, 1997] konnte allerdings nicht erneut bestätigt werden. Der Austausch des Isoleucins gegen Methionin an dieser Stelle würde beim tryptischen Verdau von CYP2D25 zu signifikanten Änderungen des Peptidmusters führen. Durch diesen Aminosäureaustausch wäre ein Massenshift um ca. 18 Da der Peptide mit den Teilsequenzen 334-351 und 347-368 (Abb. 4-3) zu erwarten. Im MALDI-MS Spektrum konnte nur das nicht modifizierte Peptid 347-368 mit einem Molekulargewicht von 2562.4 Da gemessen werden. Das durch Methionin modifizierte Analogon mit einem Molekulargewicht von 2580.3 Da wurde hingegen nicht detektiert.

1	M	G	L	L	T	G	D	L	L	G	I	L	A	L	A	M	V	I	F	L	L	L	V	D	L	25
26	M	H	R	R	S	R	W	A	P	R	Y	P	P	G	P	M	P	L	P	G	L	G	N	L	L	50
51	Q	V	N	F	Q	D	P	R	L	S	F	I	Q	L	R	R	R	F	G	D	V	F	S	L	Q	75
76	Q	I	W	R	P	V	V	V	L	N	G	L	A	A	V	R	E	A	L	V	S	H	S	H	E	100
101	T	S	D	R	P	P	V	F	I	L	E	H	L	G	Y	G	P	R	S	E	G	V	I	L	A	125
126	R	Y	G	K	A	W	R	E	Q	R	R	F	S	V	S	T	L	R	N	F	G	L	G	K	K	150
151	S	L	E	E	W	V	T	Q	E	A	S	C	L	C	A	A	F	A	D	Q	A	G	R	P	F	175
176	S	P	N	N	L	L	N	K	A	V	S	N	V	I	A	S	L	T	F	A	R	R	F	E	Y	200
201	N	D	P	R	M	L	K	L	L	D	L	V	L	E	G	L	K	E	E	V	G	L	M	R	Q	225
226	V	L	E	A	M	P	V	L	R	H	I	P	G	L	C	A	K	L	F	P	R	Q	K	A	F	250
251	L	V	M	I	D	E	L	I	T	E	H	K	M	T	R	D	L	A	Q	P	P	R	D	L	T	275
276	D	A	F	L	D	E	M	K	E	A	K	G	N	P	E	S	S	F	N	D	E	N	L	R	L	300
301	V	V	A	H	L	F	S	A	G	M	I	T	T	S	T	T	L	A	W	A	L	L	M	I	325	
326	L	H	P	D	V	Q	R	R	[V	Q	Q	E	I	D	E	V	I	G	H	V	R	(Q	P	E	I	350
351	K]	D	Q	A	L	M	P	F	T	L	A	V	L	H	E	V	Q	R)	F	G	D	I	V	P	L	375
376	G	V	A	H	M	T	S	C	D	I	E	V	Q	G	F	L	I	P	K	G	T	T	L	I	T	400
401	N	L	T	S	V	L	K	D	E	T	V	W	K	K	P	F	R	F	Y	P	E	H	F	L	D	425
426	A	Q	G	R	F	T	K	Q	E	A	F	M	P	F	S	A	G	R	R	S	C	L	G	E	P	450
451	L	A	R	M	E	L	F	L	F	F	T	T	L	L	Q	A	F	S	F	S	V	P	T	G	Q	475
476	P	C	P	S	D	H	G	V	F	A	F	L	L	F	P	S	P	Y	Q	L	C	A	V	P	R	500

Abb. 4-3 Aminosäuresequenz von CYP2D25

Die in der Aminosäuresequenz mit verschiedenen Klammern gekennzeichneten Peptide VQQEIDEVIGHVRQPEIK und QPEIKDQALMPFTLAVLHEVQR in den Bereichen 334-351 und 347-368 zeigten keinen Massenshift um 18 Da. Daher konnte ein Aminosäureaustausch an der Position 350 nicht bestätigt werden.

Insgesamt wurden vier Banden des dritten Proteins mittels MALDI-MS analysiert, wobei nur Bande 3 eine Reaktion mit dem monoklonalen Antikörper zeigte (siehe Abb. 4-4).

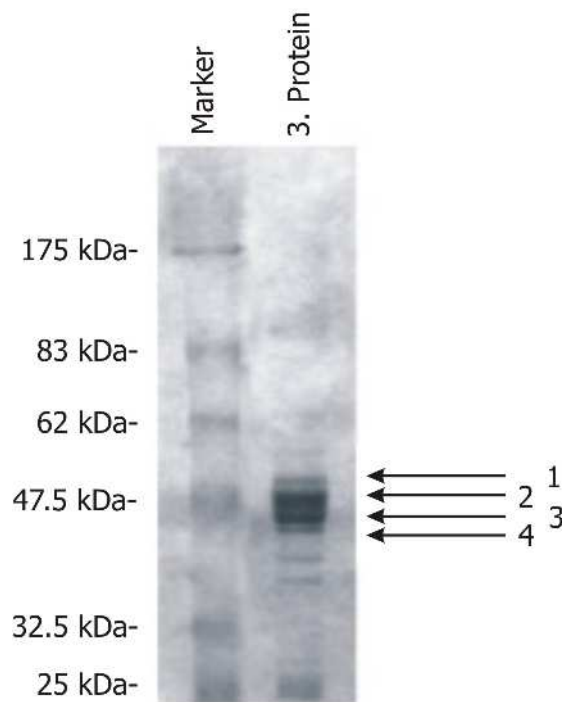


Abb. 4-4 10 %iges SDS-PAGE-Gel mit elektrophoretisch aufgetrenntem 3. Protein

Bei Bande 1 handelte es sich möglicherweise um die Succinyl-CoA-Ligase, bei Bande 2 um CYP2E1. Bande 3 konnte als CYP2D25 identifiziert werden und zeigte eine Reaktion mit dem MAK. Bei Bande 4 handelte es sich ebenfalls um CYP2D25.

Die massenspektrometrische Analyse der Bande 1 ergab, dass es sich um die Succinyl-CoA-Ligase handeln könnte, wobei dieses Ergebnis als nicht gesichert zu betrachten ist. Vielmehr deuteten die vorliegenden MS-Daten auf ein Gemisch verschiedener Proteine hin, die eine Zuordnung zu einem einzelnen Protein unmöglich machten (Daten nicht gezeigt).

Des Weiteren wurde Bande 2 mit einem Molekulargewicht von ca. 57 kDa ebenfalls ausgeschnitten, proteolytisch verdaut und mittels MALDI-MS analysiert. Diese Bande wurde durch die elektrophoretische Auftrennung des aus Schweineleber gereinigten dritten Proteins im SDS-Gel sichtbar, zeigte allerdings keine Reaktion mit dem Antikörper. Dabei wurden 16 Peptidmassen gefunden, die dem CYP2E1 zugeordnet werden konnten (Tab. 4-1).

Tab. 4-1 Übereinstimmungen der gemessenen tryptischen Peptide der zweiten isolierten Bande mit CYP2E1

837.4834	1722.9179
1155.6162	1729.8028
1198.6584	1798.9162
1326.7534	1814.9111
1359.7524	2066.0971
1450.7542	2070.0442
1459.7334	2086.0391
1503.7708	2563.2819

Bei Bande 3, die als einzige eine Reaktion mit dem Antikörper zeigte, handelte es sich eindeutig um CYP2D25 (siehe 4.3.2). Weiterhin konnten Peptidfragmente von Begleitproteinen, die zusätzlich in dieser Bande vorhanden waren, der UDP-Glucuronosyltransferase 2B6 und der 6-Phosphofruktokinase zugeordnet werden. UDP-Glucuronosyltransferasen sind im ER lokalisiert und katalysieren die Bildung von Glucuronsäure-Konjugaten von vielen körpereigenen Stoffen sowie von Xenobiotika [Forth *et al.*, 2001].

Das MALDI-MS der Bande 4 zeigte Signale, die ebenfalls CYP2D25 zugeordnet werden konnten. Die Vitamin D₃ 25-Hydroxylase lag allerdings hier in einer deutlich geringeren Konzentration vor als bei Bande 3 und war im SDS-PAGE-Gel um einige Kilodalton kleiner.

Außerdem wurde nochmals eine Bande, die eine Antikörperreaktion im Western Blot zeigte, einer weiteren aus porciner Leber gereinigten Charge des dritten Proteins wie oben beschrieben untersucht. Die im MALDI-MS erhaltenen Massenbruchstücke deuteten auf ein Gemisch von CYP2D25 und einer Dimethylanilinmonooxygenase (FMO 3) mit einem Molekulargewicht von 59 kDa hin. Dieser Befund gilt als gesichert.

4.3.2 ESI-MS/MS

Mittels Tandem-MS konnten zwölf zweifach geladene Peptide komplett sequenziert werden. Die erhaltenen Aminosäuresequenzen sind in Tab. 4-2 aufgeführt. Bis auf das Peptid 8 konnten die ermittelten γ - und β -Serien der Tandem-MS-Spektren zu einer vollständigen Aminosäure-Sequenz zusammengefügt werden. Die bei Peptid 8 gefundene Teilsequenz (Fettdruck) wird durch die Masse des zweifach geladenen Mutterions abgesichert. Die sequenzierten Peptide sind ausnahmslos der Vitamin D₃ 25-Hydroxylase (CYP2D25) zuzuordnen. Änderungen in der Peptidsequenz gegenüber CYP2D25 konnten nicht detektiert werden. Somit sind bisher ca. 29 % der Benzamidoxim-Reduktase, bezogen auf die Aminosäuresequenz von CYP2D25, sequenziert worden.

Tab. 4-2 Massenspektrometrische Sequenzierung von zwölf Peptiden des dritten Proteins

Die Peptidbestimmung wurde von der Firma Planton GmbH, Kiel durchgeführt.

Peptid-Nr.	$[M+2 H]^{2+}$	Aminosäuresequenz	Theoretisches MG [Da]	Position in der CYP2D25-Sequenz
1	405.2	FSVSTLR	808.4443	137-143
2	438.8	LSFIQLR	875.5229	59-65
3	548.8	RFEYNDPR	1095.5098	197-204
4	578.3	QVLEAMPVLR	1154.6482	225-234
5	649.3	DLTDAFLDEMK	1296.5706	273-283
6	675.5	AVSNVIASLTFAR	1347.7510	184-196
7	740.5	FYPEHFLDAQGR	1478.6943	418-429
8	761.5	VQQEIDEVIGHVR	1520.7947	334-346
9	829.5	AFLVMIDELITEHK	1657.8749	249-262
10	964.5	LLDLVLEGLKEEVGLMR	1926.0860	208-224
11	984.5	DQALMPFTLAVLHEVQR	1967.0299	352-368
12	1060.5	GTTLITNLTSVLKDETVWK	2118.1572	395-413

Weiterhin waren Peptide mit den Molekülmassen von 1011.5 Da, 1012.6 Da, 1416.8 Da und 1424.8 Da vorhanden, die nicht dem CYP2D25 zugeordnet werden konnten. Diese vier Fragmentbruchstücke deuteten auf das Vorhandensein eines weiteren Proteins als Verunreinigung hin, wobei es sich mit einer Wahrscheinlichkeit von über 98 % um die UDP-Glucuronosyltransferase 2B5 bzw. 2B8 mit einem Molekulargewicht von 60.8 kDa handelte (siehe 4.3.1).

4.4 DISKUSSION

4.4.1 SEQUENZANALYSE

In einer vorangegangenen Studie [Möller, 1997] wurden drei Peptidfragmente der Benzamidoxim-Reduktase sequenziert und mit verschiedenen P450-Isoenzymen der Subfamilie CYP2D verglichen. Bei der Sequenzierung des dritten Peptids wurde ein Austausch der in der CYP2D25-Sequenz enthaltenen Aminosäure Isoleucin gegen Methionin festgestellt. Die anderen beiden sequenzierten Peptide 1 und 2 zeigten eine 100 %ige Homologie zu CYP2D25. Außerdem wurden diese Sequenzen mit dem humanen CYP2D6 [Gonzalez *et al.*, 1988] verglichen. Peptid 2 der Benzamidoxim-Reduktase unterschied sich nicht von CYP2D6, wohingegen die Peptide 1 und 3 doch deutliche Unterschiede in der Sequenz zeigten. Bei der Überprüfung der Übereinstimmungen von CYP2D25 und CYP2D6 konnte eine 77 %ige Identität zwischen beiden Enzymen festgestellt werden [Hosseinpour *et al.*, 2000].

Bei der hier durchgeführten Sequenzierung mittels Tandem-MS konnte kein einziger Aminosäureaustausch zwischen der Benzamidoxim-Reduktase und der Vitamin D₃ 25-Hydroxylase festgestellt werden. Zwölf sequenzierte Peptide zeigten eine 100 %ige Homologie zwischen beiden Enzymen. Somit kann als gesichert angesehen werden, dass es sich bei der durch den Antikörper erkannten Bande um CYP2D25 handelt.

4.4.2 ANTIGEN-ANTIKÖRPER-REAKTIONEN

Eine Bande der gereinigten Benzamidoxim-Reduktase wurde im Western Blot eindeutig durch den monoklonalen Antikörper (Klon 4D12) erkannt. Diese Bande befand sich elektrophoretisch auf gleicher Höhe mit dem in Hefe exprimierten CYP2D25, das ebenfalls eine deutliche Reaktion mit dem MAK zeigte. Demnach könnte es sich um identische Enzyme handeln. Bei früheren Untersuchungen mit einem spezifischen Antikörper gegen CYP2D25 konnte allerdings keine Kreuzaktivität mit der Benzamidoxim-Reduktase gefunden werden [Wikvall, 2002]. Daher ging man bisher von zwei Varianten von CYP2D Enzymen mit sehr hoher Ähnlichkeit aus. Eine

mögliche Erklärung der Reaktivität des hier verwendeten monoklonalen Antikörpers sowohl mit der Benzamidoxim-Reduktase als auch mit der Vitamin D₃ 25-Hydroxylase besteht darin, dass der MAK ein auf beiden Proteinen vorhandenes gleiches Epitop erkennt.

4.4.3 BEURTEILUNG DER UMSETZUNGSRATEN IM BENZAMIDOXIM-REDUKTASE- UND IM 1 α -HYDROXYVITAMIN D₃ 25-HYDROXYLASE- ASSAY

Sollte es sich bei der Benzamidoxim-Reduktase und der Vitamin D₃ 25-Hydroxylase um ein und dasselbe Enzym handeln, würden beide Enzyme Aktivitäten in beiden Assays zeigen. Wie bereits in Kapitel 3 beschrieben, zeigte zwar das gereinigte dritte Protein Enzymaktivitäten in beiden Assays (siehe 3.3.3.3 und 3.3.4.7), jedoch katalysierte das rekombinante CYP2D25 lediglich die Umsetzung von 1 α -Hydroxyvitamin D₃ zu 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ (siehe 3.3.4.8). Eine Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin durch CYP2D25 konnte hingegen nicht detektiert werden (siehe 3.3.3.5.1).

Sowohl diese Ergebnisse als auch das Ergebnis der Sequenzanalyse lassen den Schluss zu, dass es sich bei der Bande der Benzamidoxim-Reduktase, die durch den Antikörper erkannt wird, tatsächlich um CYP2D25 handelt, diese aber nicht für die Reduktion von Benzamidoxim verantwortlich ist. Das würde bedeuten, dass an der Reduktion kein CYP2D Enzym beteiligt ist, sondern ein bisher nicht identifiziertes Protein, das zusammen mit Cytochrom b₅ und der NADH-Cytochrom b₅-Reduktase die Umwandlung von Benzamidoxim zu Benzamidin katalysiert. Möglich ist aber auch, dass die aus Schweineleber gereinigte Benzamidoxim-Reduktase eine Variante von CYP2D25 oder ein weiteres Isoenzym der Subfamilie 2D darstellt. Das würde erklären, warum keine Reduktion von BAO durch CYP2D25 katalysiert wird. Auffällig ist, dass BAO durch gereinigte Fraktionen reduziert werden kann, jedoch bei Einsatz rekombinanter Enzyme eine solche Reduktion nicht stattfindet. Möglicherweise sind in den rekombinanten Enzymen Substanzen vorhanden, die die Reduktion hemmen, jedoch auf die Oxidation, die durch rekombinantes CYP2D25 erfolgreich katalysiert wurde, keinen Einfluss haben. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte sein, dass der Zusatz bisher unbekannter Faktoren zu rekombinanten Enzymen erforderlich ist, die

bei den gereinigten Präparationen mit aufgearbeitet werden und somit bereits vorliegen. Auch wäre denkbar, dass sich durch Konformationsänderungen bei rekombinanten Enzymen teilweise andere Tertiär- oder Quartärstrukturen als bei den nativen Enzymen ausbilden, die die reduktiven Eigenschaften beeinflussen können. Eine gegenüber dem Schwein veränderte posttranslationale Modifikation in der Hefe bei der Produktion von rekombinantem CYP2D25 ist ebenfalls vorstellbar, wodurch die möglicherweise vorhandene Fähigkeit zur Reduktion eingeschränkt sein könnte. Bei der elektrophoretischen Auftrennung der Benzamidoxim-Reduktase werden mehrere Banden sichtbar, da es sehr schwierig ist, eine elektrophoretisch reine Fraktion zu erhalten. Die zweite intensiv durch Coomassie gefärbte Bande konnte als CYP2E1 identifiziert werden. Aber sowohl die Inkubation von rekombinantem humanem CYP2E1 allein mit BAO als auch in Kombination mit rekombinantem porcinem CYP2D25 zeigte keine Reduktion zu BA (siehe 3.3.3.5.4). In der Schweineleber ist ebenfalls ein Isoenzym 2E1 (Registriernummer: GenEMBL AB000885.1) vorhanden [Babol *et al.*, 1998; Lejus *et al.*, 2002], das in der Aminosäuresequenz eine 80 %ige Homologie zum humanen CYP2E1 aufweist. Ein Unterschied von 20 % kann aber durchaus dafür verantwortlich sein, dass sich die katalytischen Eigenschaften eines Enzyms stark verändern, sodass es sinnvoll erscheint, diese Reaktionen auch mit porcinem CYP2E1 zu testen.

4.4.4 SUBSTRATBINDUNGSSPEKTREN

Die Bindungsspektren (siehe 3.3.6.2) zeigten, dass die in Hefezellen exprimierten CYP2D25-Mikrosomen nicht in der Lage waren, BAO zu binden. Dagegen ließ sich für die Schweinelebermikrosomen eine eindeutige Anlagerung von BAO mit einem Minimum bei $\lambda_{\min} = 424$ nm und einem Maximum bei $\lambda_{\max} = 408$ nm (siehe 3.3.6.1) bestimmen. Dieses Ergebnis erklärt, warum keine Reduktion von BAO durch die CYP2D25-Mikrosomen möglich war.

4.5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Durch die Sequenzierung von zwölf Peptiden der durch den MAK erkannten Bande der Benzamidoxim-Reduktase (Bande 3) kann als gesichert angesehen werden, dass es sich dabei um CYP2D25 handelt. Eine Variation in der Aminosäuresequenz konnte nicht bestätigt werden, sodass von einer 100 %igen Homologie zwischen beiden Enzymen ausgegangen werden kann. Das dritte Protein und das in Hefe exprimierte CYP2D25 wiesen im SDS-Gel die gleiche elektrophoretische Größe auf. Das in Insektenzellen exprimierte CYP2D25 zeigte dagegen bei der Gelelektrophorese ein von der Benzamidoxim-Reduktase abweichendes Molekulargewicht [Berger, 2002], wofür möglicherweise eine unterschiedliche posttranslationale Modifikation in beiden Organismen verantwortlich ist.

Umso überraschender war es, dass das in Hefezellen exprimierte CYP2D25 keine Reduktion von BAO katalysierte. Wie die Bindungsspektren bewiesen, konnte BAO von dem rekombinanten CYP2D25 nicht gebunden werden. Möglicherweise wird zwar CYP2D25 bei der Aufarbeitung porciner Leber immer mitgereinigt, ist aber letztendlich nicht für die Umsetzung von Benzamidoxim zu Benzamidin verantwortlich. Es kann sich bei der Benzamidoxim-Reduktase und der Vitamin D₃ 25-Hydroxylase aber auch um Varianten mit einer leicht unterschiedlichen Aminosäuresequenz oder um zwei verschiedene Isoenzyme der Subfamilie 2D handeln, die daher unterschiedliche katalytische Fähigkeiten besitzen.

Auch das ebenfalls in der gereinigten Fraktion der Benzamidoxim-Reduktase identifizierte CYP2E1 zeigte keine Aktivität im rekonstituierten Benzamidoxim-Reduktase-Assay (siehe 3.3.3.5.4). Daher wäre es sinnvoll, weitere Testungen mit porcinem CYP2E1 durchzuführen.

Die Reinigung der Benzamidoxim-Reduktase ist sehr komplex. Dennoch wäre es wünschenswert, diese so aufzuarbeiten, dass sie elektrophoretisch rein ist. Erst nach erfolgreicher Aktivitätstestung sollte eine komplette Sequenzierung erfolgen, um so die Benzamidoxim-Reduktase eindeutig charakterisieren zu können. Um die Fraktion des dritten Proteins in elektrophoretischer Reinheit zu erhalten, könnte man eine präparative SDS-PAGE-Reinigung mit einer „Prep Cell“ (Firma Bio-Rad) an die eigentliche Reinigung des dritten Proteins (siehe 3.2.1.5.1) anschließen. Mit dieser Methode ist es möglich, Proteine voneinander zu trennen, die sich im

Molekulargewicht um nur 2 % unterscheiden [Roth *et al.*, 1996]. In der Literatur wurde diese präparative Reinigung bereits für membrangebundene Proteine erfolgreich angewendet [Martinez Murillo und Stolz, Bio-Rad US/EG Bulletin 2028].

Eine zweite Möglichkeit zur weiteren Aufreinigung des dritten Proteins wäre eine Liganden-Affinitätschromatographie, bei der der monoklonale Antikörper als spezifischer Ligand für das dritte Protein über einen Spacer an eine Matrix gekoppelt werden könnte, um so das im dritten Protein vorhandene CYP2D25 selektiv zu binden. Nach ausgiebigem Waschen der Säule könnte das gebundene CYP2D25 mit dem gleichen Liganden des Proteins wieder eluiert werden [Hsu *et al.*, 1985].

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Aufgrund der in vorangegangenen Studien festgestellten strukturellen Ähnlichkeiten zwischen der Benzamidoxim-Reduktase und der porcinen, mikrosomalen Vitamin D₃ 25-Hydroxylase [Möller, 1997; Berger, 2002], wurde rekombinantes CYP2D25 auf dessen katalytische Eigenschaften im Hinblick auf die Reduktionsfähigkeit von Benzamidoxim untersucht.

Daher wurde zunächst rekombinantes CYP2D25 in Insektenzellen exprimiert. Die für die Klonierung verwendete cDNA wies allerdings gegenüber der von Postlind *et al.* [1997] publizierten CYP2D25-Sequenz fünf Aminosäureaustausche auf und wurde aus diesem Grund als CYP2D25' bezeichnet. Drei verschiedene Transferplasmide standen zur Verfügung, mit denen neben der Produktion von unverändertem Protein auch die Expression von Fusionsproteinen mit Glutathion-S-Transferase durchgeführt werden konnte. Das exprimierte Fusionsprotein war zum einen unverändert mit GST verknüpft. Zum anderen lag eine im N-terminalen Bereich um 28 Aminosäuren verkürzte Struktur vor, um so ein potenziell lösliches Protein zu erhalten. Durch diese Fusionsproteine sollte eine Isolierung an Glutathion-Agarose im Sinne einer Affinitätschromatographie ermöglicht werden. Nachdem bei Vorarbeiten weder das für P450-Enzyme typische Absorptionsmaximum bei 450 nm im CO-Differenzspektrum noch die für CYP2D25 charakteristische Metabolisierung von 1 α -Hydroxyvitamin D₃ zu 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ detektiert werden konnte [Berger, 2002], wurde durch Variation der Hämin-Supplementierung versucht, einen korrekten Häm-Einbau zu ermöglichen. Der Ersatz der Hämin-Zugabe durch δ -Aminolävulinsäure in Kombination mit Eisen(III)citrat bzw. Eisen(III)chlorid oder als Hämin-Albumin-Komplex führte zwar im Western Blot zu mit einem monoklonalen Antikörper nachweisbaren Proteinleveln, ein Absorptionsmaximum des CO-Komplexes bei 450 nm war jedoch nicht detektierbar. So war auch die nicht vorhandene Aktivität im Vitamin D₃ 25-Hydroxylase-Assay nicht überraschend.

Daher wurde für die Expression von CYP2D25 auf einen bereits vorhandenen klonierten Vektor aus dem Arbeitskreis von Ingelman-Sundberg, Stockholm zurückgegriffen, mit dem funktionstüchtiges CYP2D25 in *Saccharomyces cerevisiae*

erzeugt werden konnte. In dem verwendeten Hefestamm W(N) wurde die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase nicht coexprimiert, da mit dem daraus gewonnenen Protein vornehmlich die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin getestet werden sollte. Als Negativkontrollen für analytische Studien standen ebenfalls Mikrosomen aus dem gentechnisch unveränderten Hefestamm W(N) und aus den nicht zur Expression von CYP2D25 fähigen V60A1-Transformanten zur Verfügung.

Die Aktivität des exprimierten Proteins konnte sowohl durch die 25-Hydroxylierung von 1α -Hydroxyvitamin D₃ zu $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ mit einer neu entwickelten LC/MS-Analytik als auch durch die Demethylierung von Dextromethorphan zu Dextrorphan nach exogen hinzugefügter NADPH-Cytochrom P450-Reduktase bestätigt werden. Mit diesen Enzympräparationen wurde die Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin unter Zusatz von aus Schweineleber gereinigten Cytochrom b₅ und NADH-Cytochrom b₅-Reduktase untersucht. Rekombinantes CYP2D25 vermochte kein Benzamidoxim zu Benzamidin zu reduzieren. Auch der Zusatz von Liposomen, CHAPS und Glutathion neben Cytochrom b₅ und NADH-Cytochrom b₅-Reduktase zur Rekonstitution führte zu keiner Bildung von Benzamidin.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem die Benzamidoxim-Reduktase mittels MALDI-MS genauer untersucht und zwölf Peptide des dritten Proteins mittels ESI-MS/MS sequenziert. Dazu wurde die aus der Schweineleber gereinigte Benzamidoxim-Reduktase elektrophoretisch aufgetrennt und die Bande genauer untersucht, die im parallel bearbeiteten Western Blot eine Reaktion mit dem monoklonalen Antikörper zeigte. Alle zwölf aus dieser Proteinbande isolierten Peptidfragmente wiesen eine 100 %ige Homologie zu CYP2D25 auf. Die bei Clement *et al.* [1997] beschriebene Variation in der Aminosäuresequenz an der Position 350 konnte nicht bestätigt werden. Somit handelt es sich bei der in der Benzamidoxim-Reduktase untersuchten Bande um CYP2D25.

Offensichtlich wird bei der Reinigung des dritten Proteins aus porciner Leber immer CYP2D25 mitgereinigt, welches aber nicht die Umwandlung von Benzamidoxim zu Benzamidin katalysieren kann. Auch die mit rekombinantem CYP2D25 durchgeführten Bindungsspektren bewiesen zusätzlich, dass CYP2D25 nicht in der

Lage war, Benzamidoxim im katalytischen Zentrum zu binden. Somit ist möglicherweise an der Reduktion kein CYP2D Enzym beteiligt, sondern ein bisher noch unbekanntes Protein, das zusammen mit Cytochrom b_5 und der NADH-Cytochrom b_5 -Reduktase die Umwandlung von Benzamidoxim zu Benzamidin katalysiert. Denkbar wäre aber auch, dass es sich bei dem gereinigten dritten Protein um eine Variante von CYP2D25 oder um ein weiteres Isoenzym der Subfamilie 2D handelt. Das würde erklären, warum CYP2D25 nicht in der Lage war, Benzamidoxim zu reduzieren.

Bei den durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der Reduktionsfähigkeit von Benzamidoxim (siehe Kapitel 3) konnten nur aus dem Schwein gereinigte Fraktionen das Substrat zu Benzamidin umwandeln, während rekombinant gewonnenes Enzym diese Reaktion nicht katalysierte. Möglicherweise sind in rekombinanten Enzymen auf die Reduktion inhibierend wirkende Substanzen vorhanden, die auf oxidative Umwandlungen keinen störenden Einfluss haben. Auch wäre der Zusatz bisher unbekannter Faktoren zu rekombinant gewonnenen Enzympräparationen denkbar. Solche Faktoren werden möglicherweise bei der Enzymreinigung automatisch mit aufgearbeitet. Außerdem können rekombinant gewonnene Proteine gegenüber den nativen Enzymen veränderte Tertiär- oder Quartärstrukturen aufweisen, wodurch die reduktiven Eigenschaften beeinflusst werden. Eine gegenüber dem Schwein veränderte posttranslationale Modifikation in der Hefe würde ebenfalls die nicht vorhandene Reduktionsfähigkeit erklären.

Um die Struktur der Benzamidoxim-Reduktase letztendlich aufklären zu können, ist eine elektrophoretische Reinheit erforderlich. An die aufwendige Reinigung aus der Schweineleber könnte sich zur Isolierung des dritten Proteins eine präparative SDS-PAGE-Reinigung anschließen, um so Proteine mit sehr ähnlichem Molekulargewicht voneinander trennen zu können. Erst nach erfolgreicher Aktivitätstestung der elektrophoretisch reinen Benzamidoxim-Reduktase sollte eine komplette Sequenzierung erfolgen.

Um die Proteinlevel des porcinen CYP2D25 in der Hefe zu erhöhen, könnte der Codon-Gebrauch für *Saccharomyces cerevisiae* optimiert werden. Dazu müssten die im Schwein mit erhöhter Präferenz benutzten Codons durch hefetypische ausgetauscht werden.

Durch die erfolgreiche Expression von CYP2D25 in *Saccharomyces cerevisiae* steht nun eine Proteinquelle zur Verfügung, mit der auch in Zukunft rekombinantes CYP2D25 für weitere Testungen bei der Strukturaufklärung der Benzamidoxim-Reduktase gewonnen werden kann.

6 LITERATURVERZEICHNIS

ABDULLAH, K.M.; LEGER, S.; PERRIER, H.; CROMLISH, W.A.; KENNEDY, B.; GRESSER, M.
Purification of baculovirus-overexpressed cytosolic phospholipase A2 using a single-step affinity column chromatography. *Protein Expr. Purif.* **6** (1995), 291-297

AEBERSOLD, R.; MANN, M.
Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422** (2003), 198-207

AKASHI, H.
Translational selection and yeast proteome evolution. *Genetics* **164** (2003), 1291-1303

ALBERT, A.; GOLDACRE, R.; PHILIPPS, J.
The strength of heterocyclic bases. *J. Chem. Soc.* (1948), 2240-2249

ALROY, I.; TOWERS, T.L.; FREEDMAN, L.P.
Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D₃: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol. Cell. Biol.* **15** (1995), 5789-5799

AMMON, H.P.T.
Arzneimittelneben- und -wechselwirkungen. 4.Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001

ANDERSSON, S.; DAVIS, D.L.; DAHLBÄCK, H.; JÖRNVALL, H.; RUSSELL, D.W.
Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. *J. Biol. Chem.* **264** (1989), 8222-8229

ANDERSSON, S.; HOLMBERG, I.; WIKVALL, K.
25-Hydroxylation of C₂₇-steroids and vitamin D₃ by a constitutive cytochrome P-450 from rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **258** (1983), 6777-6781

ANDERSSON, S.; JÖRNVALL, H.
Sex differences in cytochrome P-450-dependent 25-hydroxylation of C₂₇-steroids and vitamin D₃ in rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **261** (1986), 16932-16936

ANDERSSON, T.B.; SJÖBERG, H.; HOFFMANN, K.-J.; BOOBIS, A.R.; WATTS, P.; EDWARDS, R.J.; LAKE, B.G.; PRICE, R.J.; RENWICK, A.B.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J.; CASTELL, J.V.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; HIDESTRAND, M.; GOLDFARB, P.S.; LEWIS, D.F.V.; CORCOS, L.; GUILLOUZO, A.; TAAVITSAINEN, P.; PELKONEN, O.
An assessment of human liver-derived *in vitro* systems to predict the *in vivo* metabolism and clearance of almokalant. *Drug Metab. Dispos.* **29** (2001), 712-720

AOYAMA, Y.; YOSHIDA, Y.; SATO, R.
Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14 α -demethylation. II. Lanosterol metabolism by purified P-450_{14DM} and by intact microsomes. *J. Biol. Chem.* **259** (1984), 1661-1666

ARAYA, Z.; HOSSEINPOUR, F.; BODIN, K.; WIKVALL, K.
Metabolism of 25-hydroxyvitamin D₃ by microsomal and mitochondrial vitamin D₃ 25-hydroxylases (CYP2D25 and CYP27A1): a novel reaction by CYP27A1. *Biochim. Biophys. Acta* **1632** (2003), 40-47

ARINÇ, E.

Essential features of NADH dependent cytochrome b₅-reductase and cytochrome b₅ of liver and lung microsomes. In: *Proceedings of a NATO Advanced Study Institute on Molecular Aspects of Monooxygenases and Bioactivation of Toxic Compounds* (Hrsg. E. Arinç, J.B. Schenkman, E. Hodgson), Plenum Press, New York, 1991, S. 149-170

ASSEFFA, A.; SMITH, S.J.; NAGATA, K.; GILLETTE, J.; GELBOIN, H.V.; GONZALEZ, F.J.

Novel exogenous heme-dependent expression of mammalian cytochrome P450 using baculovirus. *Arch. Biochem. Biophys.* **274** (1989), 481-490

AUTERHOFF, H.; KNABE, J.; HÖLTJE, H.-D.

Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie. 14. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1999, S. 38-50

AXÉN, E.; BERGMAN, T.; WIKVALL, K.

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

AXÉN, E.; BERGMAN, T.; WIKVALL, K.

Microsomal 25-hydroxylation of vitamin D₂ and vitamin D₃ in pig liver. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **51** (1994a), 97-106

AXÉN, E.; HARMEYER, J.; WIKVALL, K.

Renal and hepatic 1 α -hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃ in piglets suffering from pseudo vitamin D-deficiency rickets, type I. *Biochim. Biophys. Acta* **1407** (1998), 234-242

AXÉN, E.; POSTLIND, H.; SJÖBERG, H.; WIKVALL, K.

Liver mitochondrial cytochrome P450 CYP27 and recombinant-expressed human CYP27 catalyze 1 α -hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D₃. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** (1994b), 10014-10018

BABOL, J.; SQUIRES, E.J.; LUNDSTRÖM, K.

Hepatic metabolism of skatole in pigs by cytochrome P4502E1. *J. Anim. Sci.* **76** (1998), 822-828

BAREIS, P.; KÁLLAY, E.; BISCHOF, M.G.; BISES, G.; HOFER, H.; PÖTZI, C.; MANHARDT, T.; BLAND, R.; CROSS, H.S.

Clonal differences in expression of 25-hydroxyvitamin D₃-1 α -hydroxylase, of 25-hydroxyvitamin D₃-24-hydroxylase, and of the vitamin D receptor in human colon carcinoma cells: Effects of epidermal growth factor and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Exp. Cell Res.* **276** (2002), 320-327

BARNES, H.J.; ARLOTTO, M.P.; WATERMAN, M.R.

Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 α -hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (1991), 5597-5601

BARNES, H.J.; JENKINS, C.M.; WATERMAN, M.R.

Baculovirus expression of bovine cytochrome P450c17 in Sf9 cells and comparison with expression in yeast, mammalian cells, and *E. coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **315** (1994), 489-494

BEATTIE, D.S.

Enzyme localization in the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31** (1968), 901-907

BEAUNE, P.H.; KREMERS, P.G.; KAMINSKY, L.S.; DE GRAEVE, J.; ALBERT, A.; GUENGERICH, F.P.

Comparison of monooxygenase activities and cytochrome P-450 isozyme concentrations in human liver microsomes. *Drug. Metab. Dispos.* **14** (1986), 437-442

- BEEKMAN, J.M.; COONEY, A.J.; ELLISTON, J.F.; TSAI, S.Y.; TSAI, M.J.
A rapid one-step method to purify baculovirus-expressed human estrogen receptor to be used in the analysis of the oxytocin promoter. *Gene* **146** (1994), 285-289
- BEHRENS, D.
Reduktion von *N*-hydroxylierten Verbindungen durch Cytochrom P450-Isoenzyme aus Schweineleber und humaner Leber. *Dissertation*, Kiel, 1999
- BELLAMINE, A.; GAUTIER, J.-C.; URBAN, P.; POMPON, D.
Chimeras of the human cytochrome P450 1A family produced in yeast. *Eur. J. Biochem.* **225** (1994), 1005-1013
- BERGER, K.
Vergleichende Charakterisierung zweier CYP2D-Enzyme. *Dissertation*, Kiel, 2002
- BERGINER, V.M.; SHANY, S.; ALKALAY, D.; BERGINER, J.; DEKEL, S.; SALEN, G.; TINT, G.S.; GAZIT, D.
Osteoporosis and increased bone fractures in cerebrotendinous xanthomatosis. *Metabolism* **42** (1993), 69-74
- BIAGINI, C.; CELIER, C.
cDNA-directed expression of two allelic variants of cytochrome P450 2C11 using COS1 and Sf21 insect cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **326** (1996), 298-305
- BICHET, P.; MOLLAT, P.; CAPDEVILA, C.; SARUBBI, E.
Endogenous glutathione-binding proteins of insect cell lines: Characterization and removal from glutathione S-transferase (GST) fusion proteins. *Protein Expression Purif.* **19** (2000), 197-201
- BJÖRKHEM, I.; HANSSON, R.; HOLMBERG, I.; WIKVALL, K.
25-Hydroxylation of vitamin D₃ by a reconstituted system from rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90** (1979), 615-622
- BJÖRKHEM, I.; HOLMBERG, I.; OFTEBRO, H.; PEDERSEN, J.I.
Properties of a reconstituted vitamin D₃ 25-hydroxylase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **255** (1980), 5244-5249
- BORGESE, N.; MACCONI, D.; PAROLA, L.; PIETRINI, G.
Rat erythrocyte NADH-cytochrome b₅-reductase. Quantitation and comparison between the membrane-bound and soluble forms using an antibody against the rat liver enzyme. *J. Biol. Chem.* **257** (1982), 13854-13861
- BORGESE, N.; MELDOLESI, J.
Localization and biosynthesis of NADH-cytochrome b₅-reductase, an integral membrane protein, in rat liver cells. I. Distribution of the enzyme activity in microsomes, mitochondria, and golgi complex. *J. Cell. Biol.* **85** (1980), 501-515
- BUTERS, J.T.M.; KORZEKWA, K.R.; KUNZE, K.L.; OMATA, Y.; HARDWICK, J.P.; GONZALEZ, F.J.
cDNA-directed expression of human cytochrome P450 CYP3A4 using baculovirus. *Drug Metab. Dispos.* **22** (1994), 688-692
- BUTERS, J.T.M.; SHOU, M.; HARDWICK, J.P.; KORZEKWA, K.R.; GONZALEZ, F.J.
cDNA-directed expression of human cytochrome P450 CYP1A1 using baculovirus. Purification, dependency on NADPH-P450 oxidoreductase, and reconstitution of catalytic properties without purification. *Drug Metab. Dispos.* **23** (1995), 696-701

- CALI, J.J.; HSIEH, C.-L.; FRANCKE, U.; RUSSELL, D.W.
Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis. *J. Biol. Chem.* **266** (1991), 7779-7783
- CARLBERG, C.
Mechanisms of nuclear signalling by vitamin D₃. Interplay with retinoid and thyroid hormone signalling. *Eur. J. Biochem.* **231** (1995), 517-527
- CHA, C.-J.; DOERGE, D.R.; CERNIGLIA, C.E.
Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (2001), 4358-4360
- CHEN, C.-D.; DORAY, B.; KEMPER, B.
Efficient assembly of functional cytochrome P450 2C2 requires a spacer sequence between the N-terminal signal anchor and catalytic domains. *J. Biol. Chem.* **272** (1997), 22891-22897
- CHEN, H.-M.; LUO, S.-L.; CHEN, K.-T.; LI, C.-K.
Affinity purification of *Schistosoma japonicum* glutathione-S-transferase and its site-directed mutants with glutathione affinity chromatography and immobilized metal affinity chromatography. *J. Chromatogr. A.* **852** (1999), 151-159
- CHEN, S.; WU, J.; HSIEH, J.-C.; WHITFIELD, G.K.; JURUTKA, P.W.; HAUSSLER, M.R.; GARDNER, D.G.
Suppression of ANP gene transcription by liganded vitamin D receptor: Involvement of specific receptor domains. *Hypertension* **31** (1998), 1338-1342
- CHEN, W.; PETER, R.M.; MCARDLE, S.; THUMMEL, K.E.; SIGLE, R.O.; NELSON, S.D.
Baculovirus expression and purification of human and rat cytochrome P450 2E1. *Arch. Biochem. Biophys.* **355** (1996), 123-130
- CHENG, J.B.; LEVINE, M.A.; BELL, N.H.; MANGELSDORF, D.J.; RUSSELL, D.W.
Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin D 25-hydroxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (2004), 7711-7715
- CHENG, J.B.; MOTOLA, D.L.; MANGELSDORF, D.J.; RUSSELL, D.W.
De-orphanization of cytochrome P450 2R1. *J. Biol. Chem.* **278** (2003), 38084-38093
- CICCAGLIONE, A.R.; MARCANTONIO, C.; EQUESTRE, M.; JONES, I.M.; RAPICETTA, M.
Secretion and purification of HCV E1 protein forms as glutathione-S-transferase fusion in the baculovirus insect cell system. *Virus Res.* **55** (1998), 157-165
- CLARKE, S.E.
In vitro assessment of human cytochrome P450. *Xenobiotica* **28** (1998), 1167-1202
- CLAYTON, P.T.; VERRIPS, A.; SISTERMANS, E.; MANN, A.; MIELI-VERGANI, G.; WEVERS, R.
Mutations in the sterol 27-hydroxylase gene (CYP27A) cause hepatitis of infancy as well as cerebrotendinous xanthomatosis. *J. Inher. Metab. Dis.* **25** (2002), 501-513
- CLEMENT, B.
The *N*-oxidation of benzamidines *in vitro*. *Xenobiotica* **13** (1983), 467-473
- 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 94/00756 (1994), weltweite Anmeldung, Europa (0708640, 16.09.1998), USA (5, 786, 383; 28.06.1998)

- CLEMENT, B.; DEMESMAEKER, M.
Microsomal catalyzed *N*-hydroxylation of guanfacine and reduction of *N*-hydroxyguanfacine. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **330** (1997), 303-306
- CLEMENT, B.
Oxidation and reduction of nitrogen via CYP450: Importance of the reduction of genotoxic *N*-hydroxylated functional groups. *Drug Metabolism: Towards the Next Millenium* (1998), 59-71
- CLEMENT, B.
Reduction of *N*-hydroxylated compounds: amidoximes (*N*-hydroxyamidines) as pro-drugs of amidines. *Drug Metab. Rev.* **34** (2002), 565-579
- CLEMENT, B.; BEHRENS, D.; MÖLLER, W.
Reduction of hydroxylamines by NADH-benzamidoxime reductase. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **331** (1998), 38
- CLEMENT, B.; BEHRENS, D.; MÖLLER, W.; CASHMAN, J.R.
Reduction of amphetamine hydroxylamine and other aliphatic hydroxylamines by benzamidoxime reductase and human liver microsomes. *Chem. Res. Toxicol.* **13** (2000), 1037-1045
- 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.; IMMEL, M.; SCHMITT, S.; STEINMANN, U.
Biotransformations of benzamidine and benzamidoxime *in vivo*. *Arch. Pharm.* **326** (1993a), 807-812
- 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.; 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.; LOPIAN, K.
Characterization of *in vitro* biotransformation of new, orally active, direct thrombin inhibitor ximelagatran, an amidoxime and ester prodrug. *Drug Metab. Dispos.* **31** (2003), 645-651
- 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** (1988a), 363-368
- CLEMENT, B.; SCHMITT, S.; ZIMMERMANN, M.
Enzymatic reduction of benzamidoxime to benzamidine. *Arch. Pharm.* **321** (1988b), 955-956
- CLEMENT, B.; SCHULTZE-MOSGAU, M.-H.; RICHTER, P.H.; BESCH, A.
Cytochrome P450-dependent *N*-hydroxylation of an aminoguanidine (amidinohydrazone) and microsomal retroreduction of the *N*-hydroxylated product. *Xenobiotica* **24** (1994), 671-688
- CLEMENT, B.; SCHULTZE-MOSGAU, M.-H.; WOHLERS, H.
Cytochrome P450-dependent *N*-hydroxylation of a guanidine (debrisoquine), microsomal catalysed reduction and further oxidation of the *N*-hydroxyguanidine metabolite to the urea derivative. *Biochem. Pharmacol.* **46** (1993b), 2249-2267

CLEMENT, B.; ZIMMERMANN, M.

Characteristics of the microsomal *N*-hydroxylation of benzamidine to benzamidoxime. *Xenobiotica* **17** (1987), 659-667

CLEMENT, B.; WISSEL, S.

Studies on the microsomal *N*-oxygenation of isothiourreas. *Progress in Pharmacology and Clinical Pharmacology* **8** (1991), 219-226

COON, M.J.; DING, X.X.; PERNECKY, S.J.; VAZ, A.D.

Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J.* **6** (1992), 669-673

COUTTS, R.T.; KOVACH, S.H.

Metabolism *in vitro* of *N*-methylamphetamine with rat liver homogenates. *Biochem. Pharmacol.* **26** (1977), 1043-1049

CRAMER, J.W.; MILLER, J.A.; MILLER, E.C.

N-Hydroxylation: A new metabolic reaction observed in the rat with the carcinogen 2-acetylaminofluorene. *J. Biol. Chem.* **235** (1960), 885-888

CRESPI, C.L.; MILLER, V.P.

The use of heterologously expressed drug metabolizing enzymes-state of the art and prospects for the future. *Pharmacol. Ther.* **84** (1999), 121-131

CULLIN, C.

Two distinct sequences control the targeting and anchoring of the mouse P450 1A1 into the yeast endoplasmic reticulum membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184** (1992), 1490-1495

CULLIN, C.; POMPON, D.

Synthesis of functional mouse cytochromes P-450 P1 and chimeric P-450 P3-1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **65** (1988), 203-217

DAHLBÄCK, H.

Characterization of the liver mitochondrial cytochrome P-450 catalyzing the 26-hydroxylation of 5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α -triol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157** (1988), 30-36

DAHLBÄCK, H.; WIKVALL, K.

25-Hydroxylation of vitamin D₃ in rat liver: Roles of mitochondrial and microsomal cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142** (1987), 999-1005

DAHLBÄCK, H.; WIKVALL, K.

25-Hydroxylation of vitamin D₃ by a cytochrome P-450 from rabbit liver mitochondria. *Biochem. J.* **252** (1988), 207-213

DAMANI, L.A.

Oxidation at nitrogen centers. In: *Metabolic basis of detoxication* (Hrsg.: W.B. Jakoby, J.R. Bend, J. Caldwell), Academic Press, New York, 1982, S. 127-149

DEL CARRATORE, M.R.; MEZZATESTA, C.; HIDESTRAND, M.; NEVE, P.; AMATO, G.; GERVASI, P.G.

Cloning and expression of rat CYP2E1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Detection of genotoxicity of *N*-alkylformamides. *Environ. and Mol. Mutagen.* **36** (2000), 97-104

DELUCA, H.F.

The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J.* **2** (1988), 224-236

- DELUCA, H.F.; CANTORNA, M.T.
Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J.* **15** (2001), 2579-2585
- DERISI, J.L.; LYER, V.R.; BROWN, P.O.
Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278** (1997), 680-686
- DETERS, S.
Aktivierung von *N*-hydroxylierten Prodrugs durch mitochondriale Enzyme. *Dissertation*, Kiel, 2002
- DINGERMANN, T.
Gentechnik, Biotechnik: Prinzipien und Anwendungen in Pharmazie und Medizin. 1. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1999
- DOEHMER, J.; SCHMALIX, W.A.; GREIM, H.
Genetically engineered *in vitro* systems for biotransformation studies. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **16** (1994), 513-518
- ELIZONDO, G.; MEDINA-DÍAZ, I.M.
Induction of CYP3A4 by $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ in HepG2 cells. *Life Sci.* **73** (2003), 141-149
- ENGLARD, S.; SEIFTER, S.
Precipitation techniques. *Methods Enzymol.* **182** (1990), 285-300
- ERIKSSON, B.I.; AGNELLI, G.; COHEN, A.T.; DAHL, O.E.; MOURET, P.; ROSENCHER, N.; ESKILSON, C.; NYLANDER, I.; FRISON, L.; OGREN, M.
Direct thrombin inhibitor melagatran followed by oral ximelagatran in comparison with enoxaparin for prevention of venous thromboembolism after total hip or knee replacement. *Thromb. Haemost.* **89** (2003), 288-296
- ESTABROOK, R.W.; WERRINGLOER, J.
The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Methods Enzymol.* **52** (1978), 212-220
- ETTMAYER, P.; AMIDON, G. L.; CLEMENT, B.; TESTA, B.
Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem.* **47** (2004), 2393-2404
- FISHER, C.W.; SHET, M.S.; CAUDLE, D.L.; MARTIN-WIXTROM, C.A.; ESTABROOK, R.W.
High-level expression in *Escherichia coli* of enzymatically active fusion proteins containing the domains of mammalian cytochromes P450 and NADPH-P450 reductase flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992), 10817-10821
- FORTH, W.; HENSCHLER, D.; RUMMEL, W.; FÖRSTERMANN, U.; STARKE, K.
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 2001
- FREELAND, S.J.; HURST, L.D.
Evolution encoded. *Sci. Am.* **290** (2004), 56-63
- FREELAND, S.J.; KNIGHT, R.D.; LANDWEBER, L.F.; HURST, L.D.
Early fixation of an optimal genetic code. *Mol. Biol. Evol.* **17** (2000), 511-518
- FRESHNEY, R.I.
Tierische Zellkulturen - Ein Methodenhandbuch. De Gruyter, Berlin, New York, 1990, S. 75-84

FRIEDRICH, S.

Aktivität und Kinetik eines mikrosomalen CYP2D-Enzyms. *Dissertation*, Kiel, 2003

FUKUSHIMA, M.; NISHII, Y.; SUZUKI, M.; SUDA, T.

Comparative studies on the 25-hydroxylations of cholecalciferol and 1 α -hydroxycholecalciferol in perfused rat liver. *Biochem. J.* **170** (1978), 495-502

FURSTER, C.; WIKVALL, K.

Identification of CYP3A4 as the major enzyme responsible for 25-hydroxylation of 5 β -cholestane-3 α , 7 α , 12 α -triol in human liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1437** (1999), 46-52

GILLAM, E.M.J.; BABA, T.; KIM, B.-R.; OHMORI, S.; GUENGERICH, F.P.

Expression of modified human cytochrome P450 3A4 in *Escherichia coli* and purification and reconstitution of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **305** (1993), 123-131

GILLAM, E.M.J.; GUO, Z.; MARTIN, M.V.; JENKINS, C.M.; GUENGERICH, F.P.

Expression of cytochrome P450 2D6 in *Escherichia coli*, purification, and spectral and catalytic characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* **319** (1995), 540-550

GLICK, B.R.; PASTERNAK, J.J.

Molekulare Biotechnologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin, Oxford, 1995, S. 19-59

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

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

GONZALEZ, F.J.; KIMURA, S.; TAMURA, S.; GELBOIN, H.V.

Expression of mammalian cytochrome P450 using baculovirus. *Methods Enzymol.* **206** (1991), 93-99

GONZALEZ, F.J.; KORZEKWA, K.R.

Cytochromes P450 expression systems. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35** (1995), 369-390

GONZALEZ, F.J.; SKODA, R.C.; KIMURA, S.; UMENO, M.; ZANGER, U.M.; NEBERT, D.W.; GELBOIN, H.V.; HARDWICK, J.P.; MEYER, U.A.

Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* **331** (1988), 442-446

GOPAL, P.K.; BALLOU, C.E.

Regulation of the protein glycosylation pathway in yeast: Structural control of N-linked oligosaccharide elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** (1987), 8824-8828

GOTOH, O.

Substrate recognition sites in cytochrome P450 family 2 (CYP2) proteins inferred from comparative analyses of amino acid and coding nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.* **267** (1992), 83-90

GRENNAN JONES, F.; WOLSTENHOLME, A.; FOWLER, S.; SMITH, S.; ZIEMNICKA, K.; BRADBURY, J.; FURMANIAK, J.; REES SMITH, B.

High-level expression of recombinant immunoreactive thyroid peroxidase in the High Five insect cell line. *J. Mol. Endocrinol.* **17** (1996), 165-174

GROGAN, J.; SHOU, M.; ANDRUSIAK, E.A.; TAMURA, S.; BUTERS, J.T.M.; GONZALEZ, F.J.; KORZEKWA, K.R. Cytochrome P450 2A1, 2E1, and 2C9 cDNA-expression by insect cells and partial purification using hydrophobic chromatography. *Biochem. Pharmacol.* **50** (1995), 1509-1515

- GUARENTE, L.; YOCUM, R.R.; GIFFORD, P.
A GAL10-CYC1 hybrid yeast promoter identifies the GAL4 regulatory region as an upstream site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79** (1982), 7410-7414
- GUENGERICH, F.P.
Enzymology of rat liver cytochromes P-450. In: *Mammalian cytochromes P-450* (Hrsg.: F.P. Guengerich), CRC Press Inc., Florida, 1987, S. 2ff.
- GUENGERICH, F.P.
Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. *J. Biol. Chem.* **266** (1991), 10019-10022
- GUENGERICH, F.P.
Analysis and characterization of enzymes. In: *Principles and methods of toxicology* (Hrsg.: A. Wallace Hayes), Raven Press, New York, 1994, S. 1259-1312
- GUENGERICH, F.P.
Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **14** (2001), 611-650
- GUENGERICH, F.P.; BRIAN, W.R.; SARI, M.-A.; ROSS, J.T.
Expression of mammalian Cytochrome P450 enzymes using yeast-based vectors. *Methods Enzymol.* **206** (1991), 130-145
- GUENGERICH, F.P.; MARTIN, M.V.; BEAUNE, P.H.; KREMERS, P.; WOLFF, T.; WAXMAN, D.J.
Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J. Biol. Chem.* **261** (1986), 5051-5060
- GUENGERICH, F.P.; PARIKH, A.; JOHNSON, E.F.; RICHARDSON, T.H.; VON WACHENFELDT, C.; COSME, J.; JUNG, F.; STRASSBURG, C.P.; MANNS, M.P.; TUKEY, R.H.; PRITCHARD, M.; FOURNEL-GIGLEUX, S.; BURCHELL, B.
Heterologous expression of human drug-metabolizing enzymes. *Drug Metab. Dispos.* **25** (1997), 1234-1241
- GUO, Z.; GILLAM, E.M.J.; OHMORI, S.; TUKEY, R.H.; GUENGERICH, F.P.
Expression of modified human cytochrome P450 1A1 in *Escherichia coli*: effects of 5' substitution, stabilization, purification, spectral characterization, and catalytic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* **312** (1994), 436-446
- GUPTA, R.P.; HOLLIS, B.W.; PATEL, S.B.; PATRICK, K.S.; BELL, N.H.
CYP3A4 is a human microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *J. Bone Miner. Res.* **19** (2004), 680-688
- GUSTAFSSON, D.; NYSTROM, J.; CARLSSON, S.; BREDBERG, U.; ERIKSSON, U.; GYZANDER, E.; ELG, M.; ANTONSSON, T.; HOFFMANN, K.; UNGELL, A.; SORENSEN, H.; NAGARD, S.; ABRAHAMSSON, A.; BYLUND, R.
The direct thrombin inhibitor melagatran and its oral prodrug H 376/95: intestinal absorption properties, biochemical and pharmacodynamic effects. *Thromb. Res.* **101** (2001), 171-181
- HACKETT, C.S.; STRITTMATTER, P.
Covalent cross-linking of the active sites of vesicle-bound cytochrome b₅ and NADH-cytochrome b₅-reductase. *J. Biol. Chem.* **259** (1984), 3275-3282
- HAINING, R.L.; HUNTER, A.P.; VERONESE, M.E.; TRAGER, W.F.; RETTIE, A.E.
Allelic variants of human cytochrome P450 2C9: Baculovirus-mediated expression, purification, structural characterization, substrate stereoselectivity, and prochiral selectivity of the wild-type and I359L mutant forms. *Arch. Biochem. Biophys.* **333** (1996), 447-458

HARA, T.; MINAKAMI, S.

On functional role of cytochrome b₅: NADH-linked cytochrome c-reductase in microsomes. *J. Biochem.* **69** (1971), 317-324

HARSDORF, A.

In vitro Biotransformationsstudien von *N*-Hydroxyguanidinen und Amidoximen. *Dissertation*, Kiel, 1998

HARTMANN, J.; DARAM, P.; FRIZZELL, R.A.; RADO, T.; BENOS, D.J.; SORSCHER, E.J.

Affinity purification of insoluble recombinant fusion proteins containing glutathione-S-transferase. *Biotech. Bioeng.* **39** (1992), 828-832

HAYASHI, S.-I.; MOROHASHI, K.-I.; YOSHIOKA, H.; OKUDA, K.; OMURA, T.

Expression of a rat liver microsomal cytochrome P-450 catalyzing testosterone 16 α -hydroxylation in *Saccharomyces cerevisiae*: Vitamin D₃ 25-hydroxylase and testosterone 16 α -hydroxylase are distinct forms of cytochrome P-450. *J. Biochem.* **103** (1988b), 858-862

HAYASHI, S.-I.; NOSHIRO, M.; OKUDA, K.

Isolation of a cytochrome P-450 that catalyzes the 25-hydroxylation of vitamin D₃ from rat liver microsomes. *J. Biochem.* **99** (1986), 1753-1763

HAYASHI, S.-I.; OMURA, T.; WATANABE, T.; OKUDA, K.

Immunochemical evidence for the catalysis of vitamin D₃ 25-hydroxylation and testosterone 16 α -hydroxylation by homologous forms of cytochrome P-450 in rat liver microsomes. *J. Biochem.* **103** (1988a), 853-857

HEADLAM, M.J.; WILCE, M.C.J.; TUCKEY, R.C.

The F-G loop region of cytochrome P450_{sc} (CYP11A1) interacts with the phospholipid membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **1617** (2003), 96-108

HEALY, K.D.; ZELLA, J.B.; PRAHL, J.M.; DELUCA, H.F.

Regulation of the murine renal vitamin D receptor by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (2003), 9733-9737

HEWICK, D.S.

Reductive metabolism of nitrogen-containing functional groups. In: *Metabolic Basis of Detoxication* (Hrsg. W.B. Jakob, J.R. Bend, J. Caldwell), Academic Press, New York, 1982, S. 151-170

HILDEBRANDT, A.; ESTABROOK, R.W.

Evidence for the participation of cytochrome b₅ in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **143** (1971), 66-79

HIROI, T.; CHOW, T.; IMAOKA, S.; FUNAE, Y.

Catalytic specificity of CYP2D isoforms in rat and human. *Drug Metab. Dispos.* **30** (2002), 970-976

HOLICK, M.F.; DELUCA, H.F.

A new chromatographic system for vitamin D₃ and its metabolites: resolution of a new vitamin D₃ metabolite. *J. Lipid Res.* **12** (1971), 460-465

HOLICK, M.F.; SCHNOES, H.K.; DELUCA, H.F.

Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a form of vitamin D₃ metabolically active in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68** (1971), 803-804

HOLMBERG, I.; BERLIN, T.; EWERTH, S.; BJÖRKHEM, I.

25-Hydroxylase activity in subcellular fractions from human liver. Evidence for different rates of mitochondrial hydroxylation of vitamin D₂ and D₃. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **46** (1986), 785-790

- HONKAKOSKI, P.; NEGISHI, M.
Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem. J.* **347** (2000), 321-337
- HONSHO, M.; MITOMA, J.-Y.; ITO, A.
Retention of cytochrome b₅ in the endoplasmic reticulum is transmembrane and luminal domain-dependent. *J. Biol. Chem.* **273** (1998), 20860-20866
- HOSSEINPOUR, F.; HIDESTRAND, M.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; WIKVALL, K.
The importance of residues in substrate recognition site 3 for the catalytic function of CYP2D25 (vitamin D 25-hydroxylase). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288** (2001), 1059-1063
- HOSSEINPOUR, F.; IBRANOVIC, I.; TANG, W.; WIKVALL, K.
25-Hydroxylation of vitamin D₃ in primary cultures of pig hepatocytes: Evidence for a role of both CYP2D25 and CYP27A1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303** (2003), 877-883
- HOSSEINPOUR, F.; NORLIN, M.; WIKVALL, K.
Kidney microsomal 25- and 1 α -hydroxylase in vitamin D metabolism: catalytic properties, molecular cloning, cellular localization and expression during development. *Biochim. Biophys. Acta* **1580** (2002), 133-144
- HOSSEINPOUR, F.; WIKVALL, K.
Porcine microsomal vitamin D₃ 25-hydroxylase (CYP2D25). *J. Biol. Chem.* **275** (2000), 34650-34655
- HSU, H.H.T.; MUNOZ, P.A.; BARR, J.; OPPLIGER, I.; MORRIS, D.C.; VAANANEN, H.K.; TARKENTON, N.; ANDERSON, H.C.
Purification and partial characterization of alkaline phosphatase of matrix vesicles from fetal bovine epiphyseal cartilage. Purification by monoclonal antibody affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **260** (1985), 1826-1831
- HSU, L.-C.; HU, M.-C.; CHENG, H.-C.; LU, J.-C.; CHUNG, B.-C.
The N-terminal hydrophobic domain of P450c21 is required for membrane insertion and enzyme stability. *J. Biol. Chem.* **268** (1993), 14682-14686
- IMAI, Y.
The roles of cytochrome b₅ in reconstituted monooxygenase systems containing various forms of hepatic microsomal cytochrome P-450. *J. Biochem.* **89** (1981), 351-362
- INGELMAN-SUNDBERG, M.; JOHANSSON, I.
Electron flow and complex formation during cytochrome P-450-catalyzed hydroxylation reactions in reconstituted membrane vesicles. *Acta Chem. Scand. B* **38** (1984), 845-851
- ITO, A.
Cytochrome b₅-like hemoprotein of outer mitochondrial membrane; OM cytochrome b. I. Purification of OM cytochrome b from rat liver mitochondria and comparison of its molecular properties with those of cytochrome b₅. *J. Biochem.* **87** (1980), 63-71
- JARVIS, D.L.
Baculovirus expression vectors. In: *The Baculoviruses* (Hrsg. L.K. Miller), Plenum Press, New York, 1997, S. 389-394
- JOHNS CUPP, M.; TRACY, T.S.
Cytochrome P450: New nomenclature and clinical implications. *Am. Fam. Physician* **57** (1998), 107-116
- JONES, G.; STRUGNELL, S.A.; DELUCA, H.F.
Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol. Rev.* **78** (1998), 1193-1231

JUNGBLUT, P.; THIEDE, B.

Protein identification from 2-DE gels by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **16** (1997), 145-162

KADLUBAR, F.F.; ZIEGLER, D.M.

Properties of a NADH-dependent *N*-hydroxy amine reductase isolated from pig liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **162** (1974), 83-92

KAERGEL, E.; AOYAMA, Y.; SCHUNCK, W.H.; MUELLER, H.G.; YOSHIDA, Y.

Comparative study on cytochrome P-450 of yeasts using specific antibodies to cytochromes P-450_{alk} and P-450_{14DM}. *Yeast* **6** (1990), 61-67

KAMACHI, S.; SUGIMOTO, K.; YAMASAKI, T.; HIROSE, N.; IDE, H.; OHYAMA, Y.

Metabolic activation of 1 α -hydroxyvitamin D₃ in human liver microsomes. *Xenobiotica* **31** (2001), 701-712

KARHAN, W.

Charakterisierung, Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und Mechanismus eines mikrosomalen, *N*-reduktiven Biotransformationssystems. *Dissertation*, Kiel, 2002

KARLSON, P.; DOENECKE, D.; KOOLMAN, J.

Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14. Aufl., Thieme, Stuttgart, 1994, S. 215-218

KIDD, I.M.; EMERY, V.C.

The use of baculoviruses as expression vectors. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **42** (1993), 137-159

KIESE, M.

Oxidation of aniline to nitrosobenzene in dogs. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **235** (1959), 354-359

KIM, D.; GUENGERICH, F.P.

Selection of human cytochrome P450 1A2 mutants with enhanced catalytic activity for heterocyclic amine *N*-hydroxylation. *Biochemistry* **43** (2004), 981-988

KLEVANIK, A.V.

Hydrophobicity and prediction of the secondary structure of membrane proteins and peptides. *Membr. Cell Biol.* **14** (2001), 673-697

KLINE, E.S.; BRANDT, R.B.; LAUX, J.E.; SPAINHOUR, S.E.; HIGGINS, E.S.; ROGERS, K.S.; TINSLEY, S.B.; WATERS, M.G.

Localization of L-lactate dehydrogenase in mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **246** (1986), 673-680

KLING, L.; LEGRUM, W.; NETTER, K.J.

Induction of liver cytochrome P-450 in mice by warfarin. Comparison of warfarin-, phenobarbitone-, and cobalt-induced hepatic microsomal protein patterns by PAGE after partial purification on octyl-sepharose CL-4B. *Biochem. Pharmacol.* **34** (1985), 85-91

KOYMANS, L.; DONNÉ-OP DEN KELDER, G.M.; TE KOPPELE, J.M.; VERMEULEN, N.P.E.

Cytochromes P450: Their active-site structure and mechanism of oxidation. *Drug Metab. Rev.* **25** (1993), 325-387

KOYMANS, L.; VERMEULEN, N.P.E.; VAN ACKER, S.A.B.E.; TE KOPPELE, J.M.; HEYKANTS, J.J.P.; LAVRIJSEN, K.; MEULDERMANS, W.; DONNÉ-OP DEN KELDER, G.M.

A predictive model for substrates of cytochrome P450-debrisoquine (2D6). *Chem. Res. Toxicol.* **5** (1992), 211-219

- KRÜGER, P.
Über Abkömmlinge des Benzenylamidoxims. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **18** (1885), 1055-1060
- KUBOTA, S.; YOSHIDA, Y.; KUMAOKA, H.
Studies on the microsomal electron-transport system of anaerobically grown yeast. IV. Purification and characterization of NADH-cytochrome b₅-reductase. *J. Biochem.* **81** (1977), 187-195
- KÜPFER, A.; SCHMID, B.; PREISIG, R.; PFAFF, G.
Dextromethorphan as a safe probe for debrisoquine hydroxylation polymorphism. *Lancet* **2** (1984), 517-518
- KURIAN, J.R.; BAJAD, S.; MILLER, J.L.; CHIN, N.A.; TREPANIER, L.A.
NADH-cytochrome b₅-reductase and cytochrome b₅ catalyze the microsomal reduction of xenobiotic hydroxylamines and amidoximes in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (2004), Epub ahead of print
- KURODA, R.; IKENOUE, T.; HONSHO, M.; TSUJIMOTO, S.; MITOMA, J.-Y.; ITO, A.
Charged amino acids at the carboxyl-terminal portions determine the intracellular locations of two isoforms of cytochrome b₅. *J. Biol. Chem.* **273** (1998), 31097-31102
- KYTE, J.; DOOLITTLE, R.F.
A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157** (1982), 105-132
- LAEMMLI, U.K.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (1970), 680-685
- LARSON, J.R.; COON, M.J.; PORTER, T.D.
Alcohol-inducible cytochrome P-450IIE1 lacking the hydrophobic NH₂-terminal segment retains catalytic activity and is membrane-bound when expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266** (1991), 7321-7324
- LEE, C.A.; KADWELL, S.H.; KOST, T.A.; SERABJIT-SINGH, C.J.
CYP3A4 expressed by insect cells infected with a recombinant baculovirus containing both CYP3A4 and human NADPH-cytochrome P450 reductase is catalytically similar to human liver microsomal CYP3A4. *Arch. Biochem. Biophys.* **319** (1995), 157-167
- LEHLE, L.; TANNER, W.
Protein glycosylation in yeast. In: *Glycoproteins* (Hrsg. J. Montreuil, H. Schachter, J. Vliegenthart), Elsevier Science, 1995, 475-509
- LEHMANN, B.; TIEBEL, O.; MEURER, M.
Expression of vitamin D₃ 25-hydroxylase (CYP27) mRNA after induction by vitamin D₃ or UVB radiation in keratinocytes of human skin equivalents-a preliminary study. *Arch. Dermatol. Res.* **291** (1999), 507-510
- LEHR, R.V.; MA, Y.G.; KRATZ, D.; BRAKE, P.G.; WANG, S.; FALTYNEK, C.R.; WANG, X.-M.; STEVIS, P.E.
Production, purification and characterization of non-myristylated human T-cell protein tyrosine kinase in a baculovirus expression system. *Gene* **169** (1996), 275-279
- LEJUS, C.; FAUTREL, A.; MALLÉDANT, Y.; GUILLOUZO, A.
Inhibition of cytochrome P450 2E1 by propofol in human and porcine liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **64** (2002), 1151-1156
- LEWIS, D.F.V.; PRATT, J.M.
The P450 catalytic cycle and oxygenation mechanism. *Drug Metab. Rev.* **30** (1998), 739-786

- LI, X.-Q.; BJÖRKMAN, A.; ANDERSSON, T.B.; GUSTAFSSON, L.L.; MASIMIREMBWA, C.M.
 Identification of human cytochrome P₄₅₀s that metabolise anti-parasitic drugs and predictions of *in vivo* drug hepatic clearance from *in vitro* data. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **59** (2003), 429-442
- LOPIAN, K.
 Enzymatische Grundlagen der Aktivierung des Amidoxim- und Ester-Prodrugs Ximelagatran. *Dissertation*, Kiel, 2002
- LUSSIER, M.; WHITE, A.-M.; SHERATON, J.; DI PAOLO, T.; TREADWELL, J.; SOUTHARD, S.B.; HORENSTEIN, C.I.; CHEN-WEINER, J.; RAM, A.F.J.; KAPTEYN, J.C.; ROEMER, T.W.; VO, D.H.; BONDOC, D.C.; HALL, J.; ZHONG, W.W.; SDICU, A.-M.; DAVIES, J.; KLIS, F.M.; ROBBINS, P.W.; BUSSEY, H.
 Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147** (1997), 435-450
- MADHOK, T.C.; DELUCA, H.F.
 Characteristics of the rat liver microsomal enzyme system converting cholecalciferol into 25-hydroxycholecalciferol. Evidence for the participation of cytochrome P-450. *Biochem. J.* **184** (1979), 491-499
- MANN, M.; HENDRICKSON, R.C.; PANDEY, A.
 Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* **70** (2001), 437-473
- MARÍN, S.; MANSILLA, S.; GARCÍA-REYERO, N.; ROJAS, M.; PORTUGAL, J.; PIÑA, B.
 Promoter-specific inhibition of transcription by daunorubicin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **368** (2002), 131-136
- MARTINEZ MURILLO, F.; STOLZ, J.F.
 Preparative native PAGE purification of membrane bound active nitrate reductase from *Geobacter metallireducens* using a modified model 491 prep cell. *US/EG Bulletin 2028*, Firma Bio-Rad
- MASUMOTO, O.; OHYAMA, Y.; OKUDA, K.
 Purification and characterization of vitamin D 25-hydroxylase from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **263** (1988), 14256-14260
- MATHEWS, F.S.; CZERWINSKI, E.D.
 Cytochrome b₅ and cytochrome b₅-reductase from chemical and X-Ray-diffraction viewpoint. In: *The Enzymes of Biological Membranes* (Hrsg. A. Martonosi), Plenum Press, New York, 1976, S. 142-197
- MAU, S.
 Studien zur extrahepatischen Reduktion verschiedener *N*-hydroxylierter Verbindungen. *Dissertation*, Kiel, 2002
- MAUREL, P.
 The use of adult human hepatocytes in primary culture and other *in vitro* systems to investigate drug metabolism in man. *Adv. Drug Del. Rev.* **22** (1996), 105-132
- McHARDY, A.C.; PÜHLER, A.; KALINOWSKI, J.; MEYER, F.
 Comparing expression level-dependent features in codon usage with protein abundance: An analysis of 'predictive proteomics'. *Proteomics* **4** (2004), 46-58
- MIHARA, K.; SATO, R.
 Detergent-solubilized NADH-cytochrome b₅-reductase. *Methods Enzymol.* **52** (1978), 102-108
- MITOMA, J.; ITO, A.
 The carboxy-terminal 10 amino acid residues of cytochrome b₅ are necessary for its targeting to the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **11** (1992), 4197-4203

- MODI, S.; PRIMROSE, W.U.; LIAN, L.-Y.; ROBERTS, G.C.K.
Effect of replacement of ferriprotoporphyrin IX in the haem domain of cytochrome P-450 BM-3 on substrate binding and catalytic activity. *Biochem. J.* **310** (1995), 939-943
- MÖLLER, W.
Enzymatische Grundlagen der *N*-reduktiven Biotransformation: Isolierung und Charakterisierung eines mikrosomalen Enzymsystems. *Dissertation*, Kiel, 1997
- MORGAN, E.T.; COON, M.J.
Effects of cytochrome b₅ on cytochrome P-450-catalyzed reactions. Studies with manganese-substituted cytochrome b₅. *Drug Metab. Dispos.* **12** (1984), 358-364
- MORGAN, S.J.; DARLING, D.C.
Kultur tierischer Zellen. In: *Focus*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994, S. 49-61
- MULDER, G.J.
Conjugation reactions in drug metabolism: An integrated approach. (Hrsg.: G.J. Mulder), Taylor & Francis, London, New York, Philadelphia, 1990
a) S. 52-53
b) S. 194-195, 234-235, 252-253
c) S. 164-167
d) S. 108-109
e) S. 308-309
- MURAKAMI, H.; YABUSAKI, Y.; OHKAWA, H.
Expression of rat NADPH-cytochrome P-450-reductase cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA* **5** (1986), 1-10
- MURAKAMI, H.; YABUSAKI, Y.; SAKAKI, T.; SHIBATA, M.; OHKAWA, H.
A genetically engineered P450 monooxygenase: Construction of the functional fused enzyme between rat cytochrome P450c and NADPH-cytochrome P450-reductase. *DNA* **6** (1987), 189-197
- MURAKAMI, H.; YABUSAKI, Y.; SAKAKI, T.; SHIBATA, M.; OHKAWA, H.
Expression of cloned yeast NADPH-cytochrome P450-reductase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* **108** (1990), 859-865
- MUTSCHLER, E.; GEISSLINGER, G.; KROEMER, H.K.; SCHÄFER-KORTING, M.
Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001
- NEBERT, D.W.; GONZALEZ, F.J.
P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **56** (1987), 945-993
- NEBERT, D.W.; ADESNIK, M.; COON, M.J.; ESTABROOK, R.W.; GONZALEZ, F.J.; GUENGERICH, F.P.; GUNSALUS, I.C.; JOHNSON, E.F.; KEMPER, B.; LEVIN, W.; PHILLIPS, I.R.; SATO, R.; WATERMAN, M.R.
The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* **6** (1987), 1-11
- NELSON, D.R.
[<http://drnelson.utmem.edu/nelsonhomepage.html>], 2000
- NELSON, D.R.; KOYMANS, L.; KAMATAKI, T.; STEGEMAN, J.J.; FEYEREISEN, R.; WAXMAN, D.J.; WATERMAN, M.R.; GOTOH, O.; COON, M.J.; ESTABROOK, R.W.; GUNSALUS, I.C.; NEBERT, D.W.
P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6** (1996), 1-42

NELSON, D.R.; STROBEL, H.W.

On the membrane topology of vertebrate cytochrome P-450 proteins. *J. Biol. Chem.* **263** (1988), 6038-6050

NELSON, D.R.; ZELDIN, D.C.; HOFFMAN, S.M.G.; MALTAIS, L.J.; WAIN, H.M.; NEBERT, D.W.

Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* **14** (2004), 1-18

OEDA, K.; SAKAKI, T.; OHKAWA, H.

Expression of rat liver cytochrome P-450MC cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA* **4** (1985), 203-210

OFTEBRO, H.; SAAREM, K.; BJÖRKHEM, I.; PEDERSEN, J.I.

Side chain hydroxylation of C₂₇-steroids and vitamin D₃ by a cytochrome P-450 enzyme system isolated from human liver mitochondria. *J. Lipid Res.* **22** (1981), 1254-1264

OGUNKOLADE, B.-W.; BOUCHER, B.J.; PRAHL, J.M.; BUSTIN, S.A.; BURRIN, J.M.; NOONAN, K.; NORTH, B.V.; MANNAN, N.; McDERMOTT, M.F.; DELUCA, H.F.; HITMAN, G.A.

Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes* **51** (2002), 2294-2300

OHTA, D.; MATSU-URA, Y.; SATO, R.

Expression and characterization of a rabbit liver cytochrome P450 belonging to P450IIB subfamily with the aid of the baculovirus expression vector system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175** (1991), 394-399

OKUDA, K.-I.; USUI, E.; OHYAMA, Y.

Recent progress in enzymology and molecular biology of enzymes involved in vitamin D metabolism. *J. Lipid Res.* **36** (1995), 1641-1652

OKUDA, K.-I.

Liver mitochondrial P450 involved in cholesterol catabolism and vitamin D activation. *J. Lipid Res.* **35** (1994), 361-372

OMURA, T.; SATO, R.

The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **239** (1964), 2370-2378

ONG, C.E.; MINERS, J.O.; BIRKETT, D.J.; BHASKER, C.R.

Baculovirus-mediated expression of cytochrome P4502C8 and human NADPH-cytochrome P450-reductase: optimization of protein expression. *Xenobiotica* **28** (1998), 137-152

OPRIAN, D.D.; COON, M.J.

Oxidation-reduction states of FMN and FAD in NADPH-cytochrome P-450-reductase during reduction by NADPH. *J. Biol. Chem.* **257** (1982), 8935-8944

ORTIZ DE MONTELLANO, P.R.

Oxygen activation and transfer. In: *Cytochrome P-450* (Hrsg. P.R. Ortiz de Montellano), Plenum Press, New York, 1986, S. 217-257

OSCARSON, M.; HIDESTRAND, M.; JOHANSSON, I.; INGELMAN-SUNDBERG, M.

A combination of mutations in the CYP2D6*17 (CYP2D6Z) allele causes alterations in enzyme function. *Mol. Pharmacol.* **52** (1997), 1034-1040

- PAINE, M.J.I.; GILHAM, D.; ROBERTS, G.C.K.; WOLF, C.R.
Functional high level expression of cytochrome P450 CYP2D6 using baculoviral expression systems. *Arch. Biochem. Biophys.* **328** (1996), 143-150
- PATTEN, C.J.; KOCH, P.
Baculovirus expression of human P450 2E1 and cytochrome b₅: Spectral and catalytic properties and effect of b₅ on the stoichiometry of P450 2E1-catalyzed reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **317** (1995), 504-513
- PENG, S.; SOMMERFELT, M.; LOGAN, J.; HUANG, Z.; JILLING, T.; KIRK, K.; HUNTER, E.; SORSCHER, E.
One-step affinity isolation of recombinant protein using the baculovirus/insect cell expression system. *Protein Expr. Purif.* **4** (1993), 95-100
- PEYRONNEAU, M.-A.; RENAUD, J.-P.; TRUAN, G.; URBAN, P.; POMPON, D.; MANSUY, D.
Optimization of yeast-expressed human liver cytochrome P450 3A4 catalytic activities by coexpressing NADPH-cytochrome P450-reductase and cytochrome b₅. *Eur. J. Biochem.* **207** (1992), 109-116
- PIKULEVA, I.A.; BJÖRKHEM, I.; WATERMAN, M.R.
Expression, purification, and enzymatic properties of recombinant human cytochrome P450c27 (CYP27). *Arch. Biochem. Biophys.* **343** (1997), 123-130
- POMPON, D.
cDNA cloning and functional expression in yeast *Saccharomyces cerevisiae* of β -naphthoflavone-induced rabbit liver P-450 LM4 and LM6. *Eur. J. Biochem.* **177** (1988), 285-293
- POMPON, D.; LOUERAT, B.; BRONINE, A.; URBAN, P.
Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol.* **272** (1996), 51-64
- PORTER, T.D.
Correlation between codon usage, regional genomic nucleotide composition, and amino acid composition in the cytochrome P-450 gene superfamily. *Biochim. Biophys. Acta* **1261** (1995), 394-400
- PORTER, T.D.; WILSON, T.E.; KASPER, C.B.
Expression of a functional 78,000 dalton mammalian flavoprotein, NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase, in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **254** (1987), 353-367
- POSTLIND, H.; AXÉN, E.; BERGMAN, T.; WIKVALL, K.
Cloning, structure, and expression of a cDNA encoding vitamin D₃ 25-hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **241** (1997), 491-497
- POSTLIND, H.; WIKVALL, K.
Purification of a cytochrome P-450 from pig kidney microsomes catalysing the 25-hydroxylation of vitamin D₃. *Biochem. J.* **253** (1988), 549-552
- PROSZYNSKI, T.J.; SIMONS, K.; BAGNAT, M.
O-glycosylation as a sorting determinant for cell surface delivery in yeast. *Mol. Biol. Cell* **15** (2004), 1533-1543
- REHM, H.
Proteinbiochemie/ Proteomics. 4. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg ; Berlin, 2002, S. 140-207
- RENAUD, J.-P.; DAVYDOV, D.R.; HEIRWEGH, K.P.; MANSUY, D.; HUI BON HOA, G.
Thermodynamic studies of substrate binding and spin transitions in human cytochrome P-450 3A4 expressed in yeast microsomes. *Biochem. J.* **319** (1996), 675-681

- RENAUD, J.-P.; CULLIN, C.; POMPON, D.; BEAUNE, P.; MANSUY, D.
Expression of human liver cytochrome P450 IIIA4 in yeast. A functional model for the hepatic enzyme. *Eur. J. Biochem.* **194** (1990), 889-896
- RIECKERT, W.
In vivo und *in vitro* Biotransformation von Pentamidinderivaten. *Dissertation*, Kiel, 1999
- RODRIGUES, A.D.
Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping. Attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **57** (1999), 465-480
- ROGERS, M.J.; STRITTMATTER, P.
The interaction of NADH-cytochrome b₅-reductase and cytochrome b₅ bound to egg lecithin liposomes. *J. Biol. Chem.* **250** (1975), 5713-5718
- ROSEN, H.; RESHEF, A.; MAEDA, N.; LIPPOLDT, A.; SHPIZEN, S.; TRIGER, L.; EGGERTSEN, G.; BJÖRKHEM, I.; LEITERSDORF, E.
Markedly reduced bile acid synthesis but maintained levels of cholesterol and vitamin D metabolites in mice with disrupted sterol 27-hydroxylase gene. *J. Biol. Chem.* **273** (1998), 14805-14812
- ROTH, U.; SCHÖNFELD, G.; SCHRÖDER, B.; SCHRATTENHOLZ, A.
Membrane protein subunit fractionation by means of inverse pore gradient elution polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **233** (1996), 67-70
- RUAN, K.-H.; SO, S.-P.; ZHENG, W.; WU, J.; LI, D.; KUNG, J.
Solution structure and topology of the N-terminal membrane anchor domain of a microsomal cytochrome P450: prostaglandin I₂ synthase. *Biochem. J.* **368** (2002), 721-728
- RUCKPAUL, K.
Cytochrom P450 abhängige Enzyme - Targetenzyme für die Arzneistoffentwicklung. *Pharm. Unserer Zeit* **22** (1993), 296-304
- RUCKPAUL, K.; BERNHARDT, R.
Biochemical aspects of the monooxygenase system in the endoplasmic reticulum of mammalian liver. In: *Cytochrome P-450* (Hrsg.: K. Ruckpaul & H. Rein), Akademie-Verlag, Berlin, 1984, S. 9-57
- RUGGLI, N.; MOSER, C.; MITCHELL, D.; HOFMANN, M.; TRATSCHIN, J.D.
Baculovirus expression and affinity purification of protein E2 of classical swine fever virus strain Alfort/187. *Virus Genes* **10** (1995), 115-126
- SAKAKI, T.; INOUE, K.
Practical application of mammalian cytochrome P450. *J. Biosci. Bioeng.* **90** (2000), 583-590
- SANTI, A.; ANFOSSI, P.; COLDHAM, N.G.; CAPOLONGO, F.; SAUER, M.J.; MONTESISSA, C.
Biotransformation of benzydamine by microsomes and precision-cut slices prepared from cattle liver. *Xenobiotica* **32** (2002), 73-86
- SCHUSTER, M.; EINHAUER, A.; WASSERBAUER, E.; SÜSSENBACHER, F.; ORTNER, C.; PAUMANN, M.; WERNER, G.; JUNGBAUER, A.
Protein expression in yeast; comparison of two expression strategies regarding protein maturation. *J. Biotechnol.* **84** (2000), 237-248
- SCHWARZ, D.; KISSELEV, P.; HONECK, H.; CASCORBI, I.; SCHUNCK, W.-H.; ROOTS, I.
Co-expression of human cytochrome P4501A1 (CYP1A1) variants and human NADPH-cytochrome P450-reductase in the baculovirus/insect cell system. *Xenobiotica* **31** (2001), 345-356

- SHANK-RETZLAFF, M.L.; RANER, G.M.; COON, M.J.; SLIGAR, S.G.
Membrane topology of cytochrome P450 2B4 in Langmuir-Blodgett monolayers. *Arch. Biochem. Biophys.* **359** (1998), 82-88
- SHAW, P.M.; HOSEA, N.A.; THOMPSON, D.V.; LENIUS, J.M.; GUENGERICH, F.P.
Reconstitution premixes for assays using purified recombinant human cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450-reductase, and cytochrome b₅. *Arch. Biochem. Biophys.* **348** (1997), 107-115
- SHET, M.S.; FISHER, C.W.; HOLMANS, P.L.; ESTABROOK, R.W.
Human cytochrome P450 3A4: Enzymatic properties of a purified recombinant fusion protein containing NADPH-P450 reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (1993), 11748-11752
- SHIRABE, K.; YUBISUI, T.; NISHINO, T.; TAKESHITA, M.
Role of cysteine residues in human NADH-cytochrome b₅-reductase studied by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **266** (1991), 7531-7536
- SINCLAIR, G.; CHOY, F.Y.M.
Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **26** (2002), 96-105
- SMITH, D.A.; JONES, B.C.
Speculations on the substrate structure-activity relationship (SSAR) of cytochrome P450 enzymes. *Biochem. Pharmacol.* **44** (1992), 2089-2098
- SMITH, D.B.; JOHNSON, K.S.
Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67** (1988), 31-40
- SMITH, G.; MODI, S.; PILLAI, I.; LIAN, L.-Y.; SUTCLIFFE, M.J.; PRITCHARD, M.P.; FRIEDBERG, T.; ROBERTS, G.C.K.; WOLF, C.R.
Determinants of the substrate specificity of human cytochrome P-450 CYP2D6: Design and construction of a mutant with testosterone hydroxylase activity. *Biochem. J.* **331** (1998), 783-792
- SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C.
Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150** (1985), 76-85
- SORSCHER, E.J.; SOMMERFELT, M.A.
Purification of recombinant protein derived from the baculovirus expression system using glutathione affinity agarose. *Methods Mol. Biol.* **39** (1995), 337-348
- STIBOROVÁ, M.; FREI, E.; WIESSLER, M.; SCHMEISER, H.H.
Human enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristolochic acids: evidence for reductive activation by cytochromes P450 1A1 and 1A2. *Chem. Res. Toxicol.* **14** (2001), 1128-1137
- STRITTMATTER, P.
The interaction of nucleotides with microsomal cytochrome reductase. *J. Biol. Chem.* **233** (1958), 748-753
- STRITTMATTER, P.; ROGERS, M.J.; SPATZ, L.
The binding of cytochrome b₅ to liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **247** (1972), 7188-7194
- STÜRZEBECKER, J.; HORN, H.; WALSMANN, P.; VOIGT, B.; MARKWARDT, F.; WAGNER, G.
Synthetische Inhibitoren der Serinproteinasen. *Pharmazie* **43** (1988), 782-783

- SUÁREZ, T.; GALLAHER, W.R.; AGIRRE, A.; GOÑI, F.M.; NIEVA, J.L.
 Membrane interface-interacting sequences within the ectodomain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: putative role during viral fusion. *J. Virol.* **74** (2000), 8038-8047
- TAMURA, S.; KORZEKWA, K.R.; KIMURA, S.; GELBOIN, H.V.; GONZALEZ, F.J.
 Baculovirus-mediated expression and functional characterization of human NADPH-P450 oxidoreductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **293** (1992), 219-223
- TANAKA, Y.; DELUCA, H.F.; OMDAHL, J.; HOLICK, M.F.
 Mechanism of action of 1,25-dihydroxycholecalciferol on intestinal calcium transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68** (1971), 1286-1288
- TANIGUCHI, H.; IMAI, Y.; SATO, R.
 Role of the electron transfer system in microsomal drug monooxygenase reaction catalyzed by cytochrome P-450. *Arch. Biochem. Biophys.* **232** (1984), 585-596
- TASAKI, T.; NAKAMURA, A.; ITOH, S.; OHASHI, K.; YAMAMOTO, Y.; MASUDA, M.; IWATA, H.; KAZUSAKA, A.; KAMATAKI, T.; FUJITA, S.
 Expression and characterization of dog CYP2D15 using baculovirus expression system. *J. Biochem.* **123** (1998), 162-168
- TESTA, B.
 Biochemistry of redox reactions. (Hrsg. B.Testa & J. Caldwell), Academic Press, London, 1995
 (a) S. 1-10
 (b) S. 19-22
 (c) S. 92-94
 (d) S. 103-106
 (e) S. 164-202
 (f) S. 323-326
 (g) S. 415-434
 (h) S. 193-272
 (i) S. 107-162
- THEODOROPOULOS, C.; DEMERS, C.; PETTIT, J.-L.; GASCON-BARRÉ, M.
 High sensitivity of rat hepatic vitamin D₃-25 hydroxylase CYP27A to 1,25-dihydroxyvitamin D₃ administration. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284** (2003), 138-147
- TOWNSEND, A.J.; KININGHAM, K.K.; ST. CLAIR, D.; TEPHLY, T.R.; MORROW, C.S.; GUENGERICH, F.P.
 Symposium overview: Characterization of xenobiotic metabolizing enzyme function using heterologous expression systems. *Toxicol. Sci.* **48** (1999), 143-150
- TRÉFOUEL, J.; TRÉFOUEL, MME F.; NITTI, F.; BOVET, D.
 Activité du p-Aminophenylsulfamide sur les Infections Streptococciques Expérimentales de la Souris et du Lapin. *C. R. Séances Soc. Biol.* **120** (1935), 756-758
- TRUAN, G.; CULLIN, C.; REISDORF, P.; URBAN, P.; POMPON, D.
 Enhanced *in vivo* monooxygenase activities of mammalian P450s in engineered yeast cells producing high levels of NADPH-P450 reductase and human cytochrome b₅. *Gene* **125** (1993), 49-55
- TSUNEOKA, Y.; MATSUO, Y.; HIGUCHI, R.; ICHIKAWA, Y.
 Characterization of the cytochrome P-450IID subfamily in bovine liver. Nucleotide sequences and microheterogeneity. *Eur. J. Biochem.* **208** (1992), 739-746
- TYNDALE, R.F.; LI, Y.; LI, N.-Y.; MESSINA, E.; MIKSYS, S.; SELLERS, E.M.
 Characterization of cytochrome P-450 2D1 activity in rat brain: high-affinity kinetics for dextromethorphan. *Drug Metab. Dispos.* **27** (1999), 924-930

- URASAKI, Y.; LACO, G.; TAKEBAYASHI, Y.; BAILLY, C.; KOHLHAGEN, G.; POMMIER, Y.
Use of camptothecin-resistant mammalian cell lines to evaluate the role of topoisomerase I in the antiproliferative activity of the indolocarbazole, NB-506, and its topoisomerase I binding site. *Cancer Res.* **61** (2001), 504-508
- URBAN, P.; CULLIN, C.; POMPON, D.
Maximizing the expression of mammalian cytochrome P450 monooxygenase activities in yeast cells. *Biochimie* **72** (1990), 463-472
- URBAN, P.; MIGNOTTE, C.; KAZMAIER, M.; DELORME, F.; POMPON, D.
Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related *Arabidopsis thaliana* NADPH-cytochrome P450-reductases with P450 CYP73A5. *J. Biol. Chem.* **272** (1997), 19176-19186
- URBAN, P.; TRUAN, G.; GAUTIER, J.C.; POMPON, D.
Xenobiotic metabolism in humanized yeast: Engineered yeast cells producing human NADPH-cytochrome P-450-reductase, cytochrome b₅, epoxide hydrolase and P-450s. *Biochem. Soc. Trans.* **21** (1993), 1028-1034
- URBAN, P.; WERCK-REICHHART, D.; TEUTSCH, H.G.; DURST, F.; REGNIER, S.; KAZMAIER, M.; POMPON, D.
Characterization of recombinant plant cinnamate 4-hydroxylase produced in yeast. Kinetic and spectral properties of the major plant P450 of the phenylpropanoid pathway. *Eur. J. Biochem.* **222** (1994), 843-850
- VENHORST, J.; ONDERWATER, R.C.A.; MEERMAN, J.H.N.; COMMANDEUR, J.N.M.; VERMEULEN, N.P.E.
Influence of *N*-substitution of 7-methoxy-4-(aminomethyl)-coumarin on cytochrome P450 metabolism and selectivity. *Drug Metab. Dispos.* **28** (2000), 1524-1532
- VERGÈRES, G.; WINTERHALTER, K.H.; RICHTER, C.
Identification of the membrane anchor of microsomal rat liver cytochrome P-450. *Biochemistry* **28** (1989a), 3650-3655
- VERGÈRES, G.; WINTERHALTER, K.H.; RICHTER, C.
Microsomal cytochrome P-450: substrate binding, membrane interactions, and topology. *Mutat. Res.* **213** (1989b), 83-90
- VERMILION, J.L.; COON, M.J.
Identification of the high and low potential flavins of liver microsomal NADPH-cytochrome P-450-reductase. *J. Biol. Chem.* **253** (1978a), 8812-8819
- VERMILION, J.L.; COON, M.J.
Purified liver microsomal NADPH-cytochrome P-450-reductase. Spectral characterization of oxidation-reduction states. *J. Biol. Chem.* **253** (1978b), 2694-2704
- VICKERS, A.E.M.; FISHER, R.L.; BRENDDEL, K.; GUERTLER, J.; DANNECKER, R.; KELLER, B.; FISCHER, V.
Sites of biotransformation for the cyclosporin derivative SDZ IMM 125 using human liver and kidney slices and intestine. Comparison with rat liver slices and cyclosporin A metabolism. *Drug Metab. Dispos.* **23** (1995), 327-333
- WARNER, M.; AHLGREN, R.; ZAPHIROPOULOS, P.G.; HAYASHI, S.; GUSTAFSSON, J.A.
Identification and localization of cytochromes P450 expressed in brain. *Methods Enzymol.* **206** (1991), 631-640
- WERCK-REICHHART, D.; FEYEREISEN, R.
Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* **1** (2000), 1-9

WHITE, S.H.; WIMLEY, W.C.

Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28** (1999), 319-365

WICKHAM, T.J.; NEMEROW, G.R.; WOOD, H.A.; SHULER, M.L.

Comparison of different cell lines for the production of recombinant baculovirus proteins. *Methods Mol. Biol.* **39** (1995), 385-395

WIECHELMAN, K.J.; BRAUN, R.D.; FITZPATRICK, J.D.

Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.* **175** (1988), 231-237

WIKVALL, K.

Hydroxylations in biosynthesis of bile acids. Isolation of a cytochrome P-450 from rabbit liver mitochondria catalyzing 26-hydroxylation of C₂₇-steroids. *J. Biol. Chem.* **259** (1984), 3800-3804

WIKVALL, K.

Persönliche Mitteilung (2002)

WIKVALL, K.

Cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of vitamin D to its hormonal form (Review). *Int. J. Mol. Med.* **7** (2001), 201-209

WILLIAMS, D.C.; VAN FRANK, R.M.; MUTH, W.L.; BURNETT, J.P.

Cytoplasmic inclusion bodies in *Escherichia coli* producing biosynthetic human insulin proteins. *Science* **215** (1982), 687-689

WILLIAMS, P.A.; COSME, J.; SRIDHAR, V.; JOHNSON, E.F.; MCRREE, D.E.

Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Mol. Cell* **5** (2000), 121-131

WILLIAMS, P.A.; COSME, J.; VINKOVIĆ, D.M.; WARD, A.; ANGOVE, H.C.; DAY, P.J.; VONRHEIN, C.; TICKLE, I.J.; JHOTI, H.

Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science* **305** (2004), 683-686

WILLIAMS, P.A.; COSME, J.; WARD, A.; ANGOVE, H.C.; VINKOVIĆ, D.M.; JHOTI, H.

Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature* **424** (2003), 464-468

WOHLERS, H.

Studien zur Biotransformation von Guanidinen und Amidinen mit Hepatozyten und Mikrosomen. *Dissertation*, Kiel, 1994

WONG, G.; ITAKURA, T.; KAWAJIRI, K.; SKOW, L.; NEGISHI, M.

Gene family of male-specific testosterone 16 α -hydroxylase (C-P-450_{16 α}) in mice. Organization, differential regulation, and chromosome localization. *J. Biol. Chem.* **264** (1989), 2920-2927

WRIGHTON, S.A.; STEVENS, J.C.

The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.* **22** (1992), 1-21

WRIGHTON, S.A.; VANDENBRANDEN, M.; STEVENS, J.C.; SHIPLEY, L.A.; RING, B.J.; RETTIE, A.E.; CASHMAN, J.R.

In vitro methods for assessing human hepatic drug metabolism: their use in drug development. *Drug Metab. Rev.* **25** (1993), 453-484

- WU, J.; SO, S.-P.; RUAN, K.-H.
Determination of the membrane contact residues and solution structure of the helix F/G loop of prostaglandin I₂ synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **411** (2003), 27-35
- WU, S.; CHEN, W.; MURPHY, E.; GABEL, S.; TOMER, K.B.; FOLEY, J.; STEENBERGEN, C.; FALCK, J.R.; MOOMAW, C.R.; ZELDIN, D.C.
Molecular cloning, expression, and functional significance of a cytochrome P450 highly expressed in rat heart myocytes. *J. Biol. Chem.* **272** (1997), 12551-12559
- YABUSAKI, Y.; MURAKAMI, H.; OHKAWA, H.
Primary structure of *Saccharomyces cerevisiae* NADPH-cytochrome P450-reductase deduced from nucleotide sequence of its cloned gene. *J. Biochem.* **103** (1988a), 1004-1010
- YABUSAKI, Y.; MURAKAMI, H.; SAKAKI, T.; SHIBATA, M.; OHKAWA, H.
Genetically engineered modification of P450 monooxygenases: Functional analysis of the amino-terminal hydrophobic region and hinge region of the P450/reductase fused enzyme. *DNA* **7** (1988b), 701-711
- YAMASAKI, T.; IZUMI, S.; IDE, H.; OHYAMA, Y.
Identification of a novel rat microsomal vitamin D₃ 25-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **279** (2004), 22848-22856
- YAMAZAKI, H.; NAKANO, M.; IMAI, Y.; UENG, Y.-F.; GUENGERICH, F.P.; SHIMADA, T.
Roles of cytochrome b₅ in the oxidation of testosterone and nifedipine by recombinant cytochrome P450 3A4 and by human liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **325** (1996), 174-182
- YASUKOCHI, Y.; MASTERS, B.S.S.
Some properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c (cytochrome P-450) reductase purified by biospecific affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* **251** (1976), 5337-5344
- YUAN, R.; MADANI, S.; WEI, X.-X.; REYNOLDS, K.; HUANG, S.-M.
Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study *in vitro* drug interactions. *Drug Metab. Dispos.* **30** (2002), 1311-1319
- YUAN, R.; PARMELEE, T.; BALIAN, J.D.; UPPOOR, R.S.; AJAYI, F.; BURNETT, A.; LESKO, L.J.; MARROUM, P.
In vitro metabolic interaction studies: experience of the Food and Drug Administration. *Clin. Pharmacol. Ther.* **66** (1999), 9-15
- YUN, C.H.; SHIMADA, T.; GUENGERICH, F.P.
Purification and characterization of human liver microsomal cytochrome P-450 2A6. *Mol. Pharmacol.* **40** (1991), 679-685
- ZHU, C.-T.; ZENG, X.-B.; HUANG, W.-D.
Codon usage decreases the error minimization within the genetic code. *J. Mol. Evol.* **57** (2003), 533-537
- ZIEGLER, D.M.
Flavin-containing monooxygenases: catalytic mechanism and substrate specificities. *Drug Metab. Rev.* **19** (1988), 1-32
- ZIEGLER, D.M.; PETTIT, F.H.
Microsomal oxidases. I. The isolation and dialkylarylamine oxygenase activity of pork liver microsomes. *Biochemistry* **5** (1966), 2932-2938

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Prof. Dr. B. Clement.

Ich möchte mich besonders bei meinem Doktorvater für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für die Überlassung des überaus interessanten Themas, durch das ich die Möglichkeit hatte, in die „molekularbiologische Welt“ einzutauchen und für die mir in zahlreichen Diskussionen gebotenen Anregungen bezüglich des dritten Proteins ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin

Herrn Prof. Dr. F. Kempken.

Seine kompetente Unterstützung in allen molekularbiologischen Fragen, die ständige Diskussionsbereitschaft und die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe stellte für mich eine große Bereicherung dar. Seine Anregungen und sein Engagement bezüglich der Expression von funktionstüchtigem CYP2D25 weiß ich sehr zu schätzen.

Bei Uli möchte ich mich ganz besonders für die Hilfe bei der Entwicklung der LC/MS-Methode in der Vitamin D3-Analytik bedanken. Seine Kompetenz in den Bereichen der Masse, NMR und Lehrverpflichtungserklärungen hat mich nicht nur in dieser Arbeit vorangebracht.

Matthias, Kerstin, Silke, Ilka, Christina und vor allem Hanna danke ich für die Einarbeitung bei molekularbiologischen Techniken und die aufmunternde Unterstützung bei der Expression. Besonders freut mich, dass in so kurzer Zeit durch regelmäßige private Treffen unsere Freundschaften immer enger geworden sind.

Ganz herzlich sei an dieser Stelle auch Mats Hidestrand gedankt, der so manches Expressionsproblem per e-mail lösen konnte.

Für die gute Zusammenarbeit im 8. Semester möchte ich mich ganz herzlich bei Kiki, Julia, Uli, Nina, Uwe, Friederike und Melissa bedanken.

Bei Sven bedanke ich mich für die praktische Unterstützung und die kompetente Hilfe in allen die HPLC betreffenden Fragen.

Für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit und die überaus hilfreichen Anmerkungen danke ich Andi, Ilk, Uli, Silke A., Sven S. und meiner Mutter.

Vor allem bei Andi möchte ich mich für unsere enge Freundschaft und für die mir mit unermüdlicher Geduld zuteil gewordene Unterstützung in allen Computerangelegenheiten von den Anfängen bis zu den „fortgeschrittenen“ Fragen bedanken. Besonders freut es mich, dass ich so manches Mal den Kampf gegen das Futon gewinnen konnte.

Auch bei Kiki, Steph, Ilk und San möchte ich mich für das Heranführen an rohen Fisch mit amüsanten Videobeiträgen ganz herzlich bedanken. Besonders Kiki und Ilk sei an dieser Stelle für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre besondere Freundschaft gedankt.

All meinen Freunden außerhalb des Institutes, besonders Thede, Steffi und Kirsten, die mich mit ihrem Interesse an meiner Arbeit und an mir sowie zahlreichen Treffen unterstützt haben, möchte ich ganz herzlich danken.

Holger danke ich für seine großartige Liebe, seinen emotionalen Beistand und dafür, dass er einfach immer für mich da ist, wenn ich ihn brauche.

Mein innigster Dank gebührt meinen Eltern und Großeltern. Bei meinen Großeltern möchte ich mich besonders für das unermüdliche Daumendrücken bei allen Prüfungen während des Studiums und der Promotion bedanken. Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen, ihre Anteilnahme an meiner Arbeit und dafür, dass sie immer für mich da sind. Besonders meiner Mutter danke ich für ihre wundervolle Liebe.

PERSÖNLICHE DATEN

Vor- und Familienname	Katrin Matschke
Geburtsdatum	17.10.1975
Geburtsort	Winsen/Luhe
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULAUSSBILDUNG

1982 bis 1986	Grundschule
1986 bis 1988	Orientierungsstufe
1988 bis 1995	Gymnasium Winsen/Luhe

STUDIUM

WS 1995/96 bis SS 1999	Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
September 1997	1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 1999	2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Januar 2000 bis Juni 2000	Pharmaziepraktikum in der Hirsch-Apotheke, Friedrichsort
Juli 2000 bis Dezember 2000	Praktikum im Human BioMolecular Research Institute, San Diego, CA, USA
24. Januar 2001	3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
02. Februar 2001	Erteilung der Approbation

PROMOTION

seit dem 01. April 2001	Wissenschaftliche Angestellte am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Bernd Clement
-------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------