

**Entwicklung, Charakterisierung und Anwendung neuer
In-vitro-Methoden zur Untersuchung des
Fremdstoffmetabolismus und der Inhibition
fremdstoffmetabolisierender Enzyme**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Michael Völker
aus Bad Salzungen

Würzburg 2013

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

am

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am

.....

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn PD Dr. Matthias Unger

Bei ihm möchte ich mich für die interessanten Fragestellungen im Bereich der Metabolismusforschung und für das in mich gesetzte Vertrauen, dass er mir immer freie Hand zum selbstständigen und eigenverantwortlichen Arbeiten gab, bedanken. Durch ihn und durch die insbesondere nach dem Umzug in die gut eingerichteten Labore des Institutsneubaus sowie die hervorragende technische Ausstattung konnten zahlreiche Versuche durchgeführt werden, die an anderer Stelle nicht möglich gewesen wären. Dabei möchte ich mich für den Zugang zu modernsten analytischen Geräten bedanken, ohne die ich niemals meine vielen Proben hätte messen können.

Bei Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe möchte ich mich bedanken, dass ich während dieser Zeit die Weiterbildung zum „Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik“ absolvieren konnte.

Mein Dank gilt ebenfalls dem Sonderforschungsbereich 630 der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der den überwiegenden Zeitraum meine Stelle finanzierte und Sachmittel zur Verfügung stellte.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises von Herrn PD Dr. Matthias Unger für die gute Zusammenarbeit. An erster Stelle möchte ich Frau Dr. Carina Rikanović nennen. Dr. Andreas Frank und Leonhard Schaefflein danke ich für ihre Vorarbeiten im β -Carbolin-Projekt, das ich in einem Teil dieser Arbeit fortgeführt habe. Unvergessen sind die Besuche des Schlachthofes mit Adrian Sievers-Engler und die anschließende Aufarbeitung der Schweineleber zur Gewinnung von Mikrosomen.

Im Folgenden sind einige Kollegen nicht zu vergessen, die ich im Laufe der Jahre kennengelernt habe und die indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ihnen gebührt ebenfalls mein Dank. In erster Linie sei dabei an Dr. Alexander Hörst, Michael Hein, Christine Büttner-Merz, Raphael Dives, Dr. Andreas Frank, Dr. Carina Rikanović, Dr. Christoph Albert, Adrian Sievers-Engler und Martin Nimczick gedacht, mit denen ich zusammen das Praktikum des 8. Semesters betreut habe. Dabei konnten wir uns immer gegenseitig aufeinander verlassen. Nicht vergessen werde ich die mehrwöchigen Projektarbeiten sowie die langen Sitzungen, in denen wir die Klausurfragen besprochen haben.

Die zahlreichen meist abendlichen fachlichen Diskussionen mit Armin Welker und Johannes Bäumert, die häufig an benachbarten Geräten arbeiteten, werden mir noch lange in Erinnerung bleiben.

Ebenso möchte ich mich bei Stefanie Bank und Katja Heinig, meinen Laborkolleginnen der Nachbararbeitsgruppe, für viele angenehme Gespräche bedanken und dass wir immer Ordnung und Sauberkeit im Labor gehalten haben.

Vielen Dank an Herrn Georg Walter und sein Werkstattteam sowie Herrn Dr. Bernd Reyer, die bei technischen Problemen zuverlässig zur Seite standen.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung bedanken.

I Einleitung	1
1 Fremdstoffmetabolismus	1
2 Ausgewählte fremdstoffmetabolisierende Enzyme	3
2.1 Cytochrom-P450-Enzyme	3
2.2 Carboxylesterasen	12
2.3 Enzyme des Glutathionstoffwechsels	16
2.3.1 Glutathion-S-Transferasen	17
2.3.2 Glutathionreduktase	22
3 Bioaktivierung	23
4 Biotoxifizierung	27
5 In-vitro-Untersuchung der Biotransformation	29
6 Enzymkinetik und Beeinflussung enzymatischer Reaktionen	33
6.1 Enzym-Substrat-Reaktion	33
6.2 Enzyminduktion	39
6.3 Enzyminhibition	40
6.3.1 Enzymrestaktivität	43
6.3.2 Inhibitionskurven und IC ₅₀ -Wert	44
6.3.3 Inhibitionsmechanismus	45
6.3.4 K _i -Wert	47
6.3.5 IC ₅₀ -Wert und Substratkonzentration	48
7 Ziele der Arbeit	51
II Ergebnisse und Diskussion	55
1 Bioaktivierung von Clopidogrel	55
1.1 Hydrolyse von Clopidogrel	56
1.2 In-vitro-Metabolismus von Clopidogrel durch humane Lebermikrosomen	57
1.3 LC/MS/MS-Assay zur Bioaktivierung von Clopidogrel	59
1.4 Biotransformation von Clopidogrel zu 2-Oxo-Clopidogrel	60
1.5 Untersuchung von CYP-Standardinhibitoren	61
1.6 Inhibition des Metabolismus von Clopidogrel durch Omeprazol	63
1.7 Inhibition von CYP-Enzymen durch Clopidogrel und Omeprazol	64

1.8 In-vitro-Metabolismus von Omeprazol durch CYP-Enzyme	65
1.8.1 LC/MS/MS-Assay zur Detektion der Omeprazolmetaboliten.....	65
1.8.2 CYP-Enzyme des Metabolismus von Omeprazol	67
1.9 Beurteilung der Interaktion von Clopidogrel und Omeprazol.....	69
2 Carboxylesterasen (CES)	71
2.1 HPLC/UV-Analyse der Hydrolyseprodukte	71
2.2 Umsetzung der Substrate durch humane Subzellfraktionen und Carboxylesterase-Enzyme	76
2.3 Hydrolyse von <i>p</i> -Nitrophenylacetat (PNPA-Assay)	78
2.3.1 Enzymkinetik.....	78
2.3.2 Inhibition durch Bis(<i>p</i> -nitrophenyl)phosphat.....	79
2.4 Inhibition durch Pflanzenextrakte.....	80
3 Cytochrom-P450-Enzyme (CYP)	82
3.1 Entwicklung von LC/MS/MS-basierten CYP-Assays.....	83
3.2 Überprüfung der Linearität der LC/MS/MS-Analysen.....	90
3.3 Bestimmung von K_m und V_{max} ausgewählter Substrate	94
3.4 Untersuchung der Isoenzymselektivität ausgewählter Substrate.....	108
3.5 Einfluss der NADPH-Konzentration auf die Enzymaktivität.....	117
3.6 Abhängigkeit der Substratumsetzung von der Inkubationszeit	119
3.7 Stabilität der CYP-Enzyme unter den Inkubationsbedingungen	123
3.8 Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die Enzymaktivität	128
3.9 Isoenzymselektivität von ausgewählten CYP-Inhibitoren.....	131
3.10 Inhibition einzelner CYP-Enzyme in humanen Lebermikrosomen durch ausgewählte CYP-Inhibitoren.....	141
3.11 Untersuchung des Einflusses der Substratkonzentration auf den IC_{50} -Wert.....	145
3.12 CYP-Inhibition durch Extrakte lebertoxischer Arzneipflanzen	151
4 Cumarin-Derivate als In-vitro-Fluoreszenzsubstrate für CYP- Inhibitionsassays.....	156
4.1 Häufig eingesetzte Cumarin-Derivate	156
4.2 Synthese und Reinigung der 7-Alkyloxycumarin-Derivate	159
4.3 Charakterisierung der 7-Hydroxycumarin-Metaboliten.....	162
4.4 LC/LC/Fluoreszenzanalyse der 7-Hydroxycumarin-Metaboliten	169

4.5 Metabolismus der 7-Alkyloxcumarin-Derivate durch CYP-Enzyme.....	175
4.5.1 Umsetzung mit Lebermikrosomen	175
4.5.1.1 LC/MS-Analysen.....	175
4.5.1.2 O-Dealkylierung	176
4.5.2 Identifizierung der CYP-Enzyme für die O-Dealkylierung	178
5 Charakterisierung von Harman-Derivaten als neue In-vitro- Fluoreszenzsubstrate für CYP-Inhibitionsassays.....	182
5.1 Harman-Derivate	182
5.2 LC/LC/Fluoreszenzmethoden zur Quantifizierung der Metaboliten.....	185
5.3 LC/MS/MS-Methoden zur Quantifizierung der Metaboliten.....	188
5.4 Aktivität einzelner CYP-Enzyme für die O-Dealkylierung.....	189
5.5 K_m -Wert-Bestimmung für die O-Dealkylierung	191
5.6 Evaluierung mit Hilfe von CYP-Standardinhibitoren.....	193
5.7 CYP2D6-Inhibition durch Arzneistoffe.....	196
5.8 Eignung der Harman-Derivate für Mikrotiterplattenassays.....	198
6 Biotoxifizierung.....	202
6.1 In-vitro-Screening auf reaktive Metaboliten.....	202
6.1.1 Optimierung der LC/MS/MS-Analytik	202
6.1.2 Inkubation ausgewählter Arznei- und Naturstoffe	205
6.2 Metabolismus und Biotoxifizierung von Clozapin und Paracetamol.....	207
6.2.1 In-vitro-Metabolismus von Clozapin	207
6.2.2 Urinuntersuchung nach Einnahme von Paracetamol	209
6.2.3 LC/MS/MS-Assays zur Biotoxifizierung von Clozapin und Paracetamol	211
6.2.4 Enzymkinetik der Biotoxifizierung von Clozapin und Paracetamol....	213
6.3 Glutathion-Derivate zum Abfangen von reaktiven Metaboliten	215
6.3.1 Synthese und Aufreinigung von N-markierten Glutathion-Derivaten.....	217
6.3.2 Inkubationen mit den markierten Glutathion-Derivaten	219
6.3.3 Einsatz von isotonenmarkiertem Glutathion.....	224
6.3.4 Konjugation der Glutathion-Derivate durch GSTs	228
6.4 Beurteilung der eingesetzten Methoden	229

7	Glutathion-S-Transferasen (GSTs)	231
7.1	In-vitro-Substrate für Glutathion-S-Transferasen	231
7.2	GST-Inhibitionsassays	234
7.2.1	HPLC/UV-basierte Assays	234
7.2.2	LC/MS/MS-basierter Assay	237
7.2.3	Aktivität verschiedener humaner subzellulärer Leberfraktionen	238
7.2.4	Enzymkinetische Untersuchungen	239
7.2.5	Einfluss des pH-Wertes und der Temperatur auf die enzymatische und nichtenzymatische Substrat-Konjugation mit Glutathion	243
7.3	Hemmung von Glutathion-S-Transferasen	246
7.3.1	Arznei- und Naturstoffe	246
7.3.2	Pflanzenextrakte	251
7.3.2.1	Screening von Rohextrakten pflanzlicher Arzneidrogen	251
7.3.2.2	Extrakte gerbstoffhaltiger Arzneidrogen	253
7.3.2.3	Extrakte lebertoxischer Arzneidrogen	253
7.3.2.4	Extrakte der Zimtrinde	255
7.3.2.5	IC ₅₀ -Werte inhibitorisch aktiver Pflanzenextrakte	257
7.3.2.6	Vergleich verschiedener Quantifizierungsmethoden der Metaboliten	258
8	Glutathionreduktase (GR)	261
8.1	HPLC/UV-Analyse von Glutathion	261
8.2	Optimierung des Glutathionreduktase-Assays	265
8.3	Inhibition der Glutathionreduktase durch Pflanzenextrakte	268
III	Zusammenfassung	271
IV	Summary	279
V	Material und Methoden	287
1	Material und Geräte	287
1.1	Geräte	287
1.1.1	HPLC/UV	287
1.1.2	LC/LC/UV/Fluoreszenz	287
1.1.3	LC/Triple-Quadrupol-Massenspektrometer	288

1.1.4 UV/VIS- und Fluoreszenzspektrometer.....	288
1.1.5 Präparative HPLC	289
1.1.6 Weitere technische Geräte.....	289
1.2 Verbrauchsmaterialien	290
1.3 Chemikalien	290
1.4 Pflanzliche Arzneidrogen	295
1.5 Enzyme	298
1.5.1 Subzelluläre Fraktionen	298
1.5.2 Carboxylesterasen	299
1.5.3 Cytochrom-P450-Enzyme (CYP-Enzyme)	299
2 Methoden	300
2.1 Herstellung der Pflanzenextrakte	300
2.1.1 Herstellung von Rohextrakten durch Mazeration	300
2.1.2 Herstellung von Trockenextrakten	301
2.2 Herstellung der Puffer- und Stopplösungen	301
2.2.1 Inkubationspuffer	302
2.2.2 Pufferlösungen zur Bestimmung der pK_S -Werte	303
2.2.3 Stopplösung für die Enzyminkubationen	304
2.3 Bioaktivierung	304
2.3.1 Isolierung von Clopidogrel.....	304
2.3.2 Darstellung von Clopidogrelat	305
2.3.3 Assay zur Untersuchung der Hydrolyse von Clopidogrel	305
2.3.4 Assay zur Untersuchung der Bioaktivierung von Clopidogrel.....	306
2.3.5 Assay zur Detektion der Omeprazolmetaboliten	307
2.4 Carboxylesterasen	309
2.4.1 Stammlösungen	309
2.4.2 In-vitro-Assays für Carboxylesterasen	310
2.5 In-vitro-Assays für Cytochrom-P450-Enzyme	312
2.5.1 Standardsubstrate.....	312
2.5.1.1 Stammlösungen.....	312
2.5.1.2 LC/MS/MS-basierte Assays	315
2.5.2 Cumarin-Derivate.....	319
2.5.2.1 Synthese und Reinigung der Cumarin-Derivate.....	319

2.5.2.2 Stammlösungen.....	321
2.5.2.3 LC/LC/Fluoreszenz-Assays zur Bestimmung der O-Dealkylierung.....	322
2.5.3 Harman-Derivate.....	324
2.5.3.1 Stammlösungen.....	324
2.5.3.2 Assays zur O-Dealkylierung der Harman-Derivate	326
2.6 Biotoxifizierung	330
2.6.1 Synthese von markierten Glutathion-Derivaten.....	330
2.6.1.1 <i>N</i> -dansyliertes Glutathion (dGSH)	330
2.6.1.2 β -Carbolin-markiertes Glutathion (β C-GSH)	331
2.6.1.3 <i>N</i> -Fluorenylmethoxycarbonyliertes Glutathion (Fmoc-GSH).....	333
2.6.1.4 <i>N</i> -biotinyliertes Glutathion (Bio-GSH)	334
2.6.2 LC/MS/MS-basierte Screening-Methode auf reaktive Metaboliten....	335
2.6.3 Assay zur Biotoxifizierung von Paracetamol	336
2.6.4 Assay zur Biotoxifizierung von Clozapin	338
2.7 Glutathion-S-Transferasen.....	339
2.7.1 Synthese und Reinigung von Glutathion-Konjugaten.....	339
2.7.2 Stammlösungen	343
2.7.3 In-vitro-Assays für Glutathion-S-Transferasen	345
2.7.4 Assay zur Konjugation mit den Glutathion-Derivaten.....	348
2.8 In-vitro-Inhibitionsassay der Glutathionreduktase	349
2.9 Auswertung der Messdaten	351
2.9.1 Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit.....	351
2.9.2 Bestimmung der inhibitorischen Aktivität	353
2.9.3 Linearisierung zur Bestimmung von pK_S -Werten	354
VI Abkürzungsverzeichnis	357
VII Veröffentlichungen	363
VIII Literaturverzeichnis	365

I EINLEITUNG

1 Fremdstoffmetabolismus

Mit der Nahrung aufgenommene sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, Arzneistoffe und andere Chemikalien, die in den Organismus gelangen, stellen Fremdstoffe (Xenobiotika) dar. Oft besitzen diese Fremdstoffe eine geringe Wasserlöslichkeit und können nur langsam eliminiert werden. Im Organismus werden diese Substanzen daher häufig biochemisch verändert, was als Metabolismus oder Biotransformation bezeichnet wird. Dabei werden die Fremdstoffe zumeist in pharmakologisch inaktive und renal oder biliär ausscheidbare Metaboliten überführt (Bioinaktivierung), um eine Akkumulation zu verhindern. In einigen Fällen werden aus inaktiven Fremdstoffen aktive Metaboliten gebildet (Bioaktivierung, s. I.3) und es können auch toxische Metaboliten (Biotoxifizierung, s. I.4) auftreten. Da der Organismus im Laufe seines Lebens mit vielen Fremdstoffen unterschiedlichster Struktur konfrontiert wird, hat sich in vielen Organismen ein Enzymsystem für den Metabolismus von Fremdstoffen entwickelt (Tab. 1).¹ Dabei besitzen einzelne Enzyme eine mehr oder weniger ausgeprägte Substratspezifität. Diese Enzyme werden v. a. in der Leber und im Dünndarm exprimiert, welche die Hauptmetabolismusorte im menschlichen Organismus darstellen. Daneben haben die Niere und die Lunge eine untergeordnete Bedeutung für den Arzneistoffmetabolismus.

Tab. 1 Wichtige Enzyme des Fremdstoffmetabolismus beim Menschen.

Phase-I-Reaktionen	Phase-II-Reaktionen
<p>Oxidoreduktasen</p> <ul style="list-style-type: none"> Cytochrom-P450-Enzyme Flavin-abhängige Monooxygenasen Monoaminoxidasen Cyclooxygenasen Dehydrogenasen <p>Hydrolasen</p> <ul style="list-style-type: none"> Amidasen Epoxidhydrolasen Esterasen Glucuronidasen 	<p>Transferasen</p> <ul style="list-style-type: none"> UDP-Glucuronosyltransferasen Sulfotransferasen N-Acetyltransferasen Methyltransferasen Acyl-CoA-Aminosäure-Acyltransferasen Glutathion-S-Transferasen

Bei der Biotransformation werden im Allgemeinen zwei Phasen unterschieden (Abb. 1).¹ Durch Phase-I-Reaktionen erfolgt in erster Linie eine Funktionalisierung der Moleküle, wodurch diese den anschließenden Phase-II-Reaktionen zugänglich gemacht werden. In den überwiegenden Fällen ist damit ebenfalls eine Erhöhung der Hydrophilie verbunden. Bei den Phase-I-Reaktionen handelt es sich v. a. um Oxidationen, Reduktionen und Hydrolysen. Die wichtigste Rolle spielen dabei die Cytochrom-P450-Enzyme, die als Monooxygenasen in ihre Substrate ein Sauerstoffatom einfügen. Bei den Phase-II-Reaktionen erfolgt eine Übertragung von körpereigenen und polaren Verbindungen, wie z. B. Glucuronsäure, Schwefelsäure, Glutathion oder Aminosäuren, auf die funktionellen Gruppen der Fremdstoffe bzw. deren Phase-I-Metaboliten. Daher werden die Phase-II-Reaktionen auch als Konjugationsreaktionen bezeichnet. Wichtige Enzyme des Phase-II-Metabolismus sind die UDP-Glucuronosyltransferasen, die Sulfotransferasen, die Glutathion-S-Transferasen und die *N*-Acetyltransferasen. Die meisten Phase-II-Metaboliten sind durch die Konjugation unter physiologischen Bedingungen geladen und besitzen eine deutlich höhere Hydrophilie, was die Ausscheidung begünstigt (Abb. 1).¹

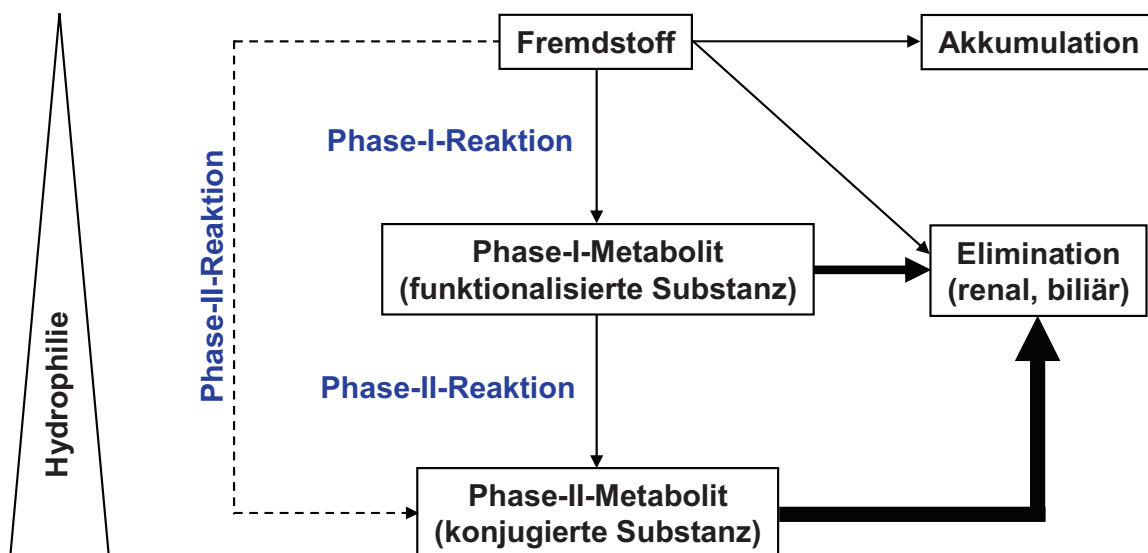


Abb. 1 Übersicht über den Fremdstoffmetabolismus.

Der Metabolismus bestimmt entscheidend die Pharmakokinetik von Arzneistoffen. Darüber hinaus können fremdstoffmetabolisierende Enzyme induziert (s. I.6.2) oder gehemmt (s. I.6.3) werden, was u. a. zu Interaktionen mit anderen Arzneistoffen führen kann. Individuelle Unterschiede in der Biotransformation, bedingt durch das

Auftreten von Polymorphismen einiger Enzyme (s. I.2.1), können Einflüsse auf die Wirksamkeit besitzen. Aus diesen Gründen haben forschende Pharmaunternehmen ein besonderes Interesse an der Untersuchung des Arzneistoffmetabolismus. Ziel dieser Unternehmen ist es, Substanzen mit gewünschten pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften zu entwickeln und solche mit ungünstigen Eigenschaften frühzeitig zu eliminieren. Darüber hinaus fordern Arzneimittelbehörden für eine Zulassung Daten über den Metabolismus und das Interaktionspotential neuer Wirkstoffe sowie Untersuchungen über die Sicherheit der Metaboliten.^{2,3}

2 Ausgewählte fremdstoffmetabolisierende Enzyme

2.1 Cytochrom-P450-Enzyme

Cytochrom-P450-Enzyme (CYP-Enzyme) sind Proteine, deren prosthetische Gruppe aus einem Protoporphyrin-IX-Ringsystem mit einem Eisen-Ion als Zentralatom besteht (Häm).^{4,5} Sie kommen mit wenigen Ausnahmen ubiquitär in allen Organismen vor. Vier Liganden des Eisens stellen die Stickstoffatome der Pyrrolreste des Porphyrins dar. Der fünfte Ligand ist das Thiolat eines Cysteinrestes des Apoproteins (Abb. 2). Bei Substratabwesenheit besitzt das Hämeisen die Oxidationszahl III und ein Wassermolekül nimmt die sechste Bindungsstelle ein. Aufgrund ihrer Färbung und der Tatsache, dass der Komplex dieser Enzyme im reduzierten Zustand mit Kohlenmonoxid als sechster Ligand im Vergleich zu anderen Hämproteinen im Differenzspektrum ein Absorptionsmaximum bei 450 nm besitzt, erhielten diese Enzyme die Bezeichnung Cytochrom-P450 (P für Pigment).^{6,7} Für den Fe(II)-CO-Komplex ist der molare Absorptionskoeffizient bei dieser Wellenlänge bekannt, so dass eine Quantifizierung der CYP-Enzyme möglich ist.⁸ CYP-Enzyme sind membranständig und im endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie den Mitochondrien lokalisiert (Abb. 2). Sie werden v. a. in der Leber und in den Enterozyten des Dünndarms exprimiert, während sie in der Niere und der Lunge in einer wesentlich geringeren Menge vorkommen.⁹ Am katalytischen Prozess ist ein benachbartes und ebenfalls in der Membran des ER verankertes Flavoprotein, die NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase, beteiligt. Mit Hilfe von Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Mononukleotid (FMN) werden zwei Elektronen des Cosubstrates NADPH schrittweise auf das CYP-Enzym übertragen (Abb. 2). Zusammen bilden diese Enzyme das sogenannte Cytochrom-P450-abhängige

Monooxygenase-System. Durch Spaltung von molekularem Sauerstoff durch die CYP-Enzyme wird ein Sauerstoff-Atom auf das Substrat übertragen und das andere zu Wasser reduziert (Abb. 2), weshalb sie auch als mischfunktionelle Oxidasen bezeichnet werden.⁴

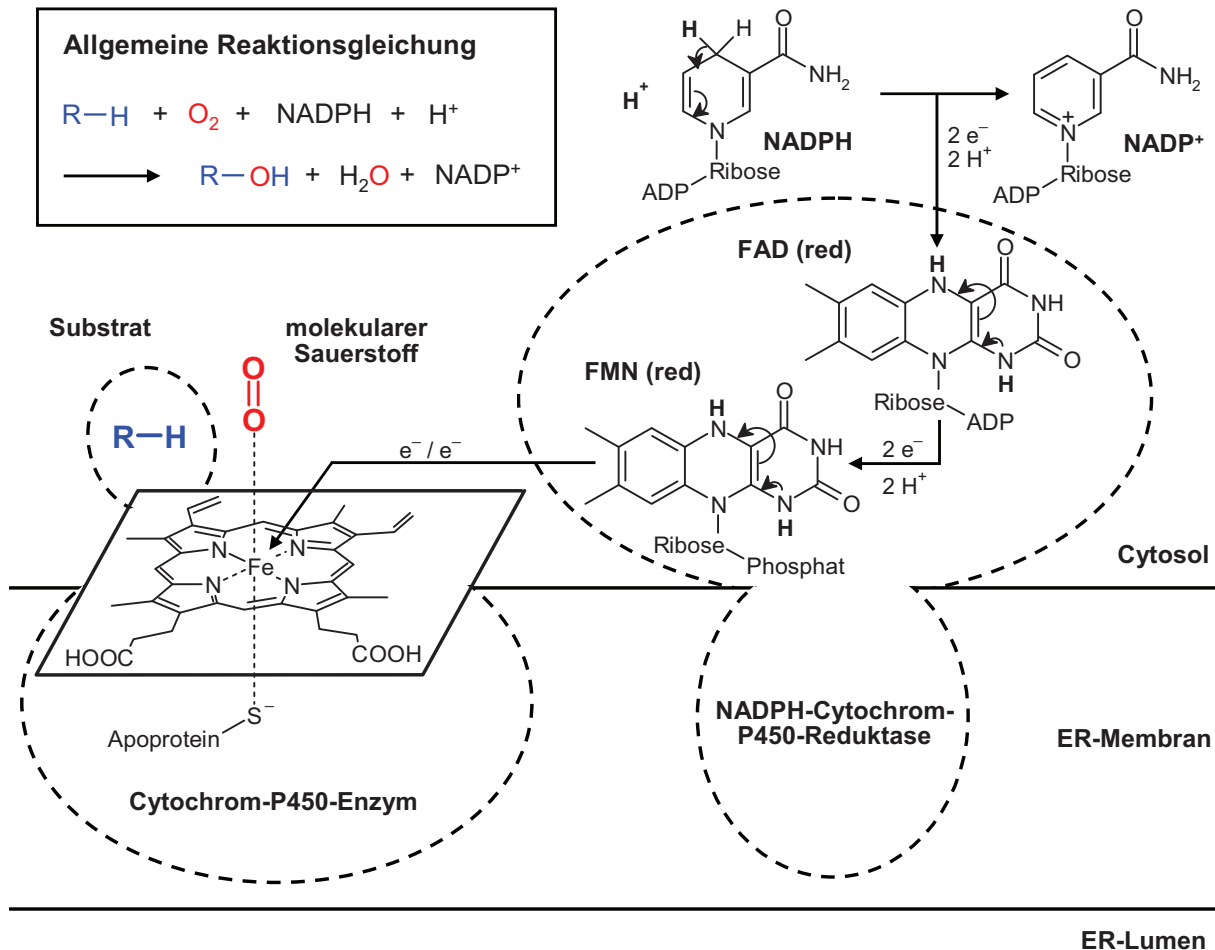


Abb. 2 Lokalisation des Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenase-Systems in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) und Elektronenübertragung durch die NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase (modifiziert nach ¹⁰).

Reaktionen

Wichtige durch CYP-Enzyme katalysierte Oxidationsreaktionen sind die Hydroxylierung von aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen, die oxidative Desalkylierung an Heteroatomen, die Oxygenierung von Heteroatomen und die Epoxidierung (Abb. 3).¹¹ Darüber hinaus können CYP-Enzyme Hydrolysen oder bei Abwesenheit von Sauerstoff auch Reduktionen katalysieren.^{12,13}

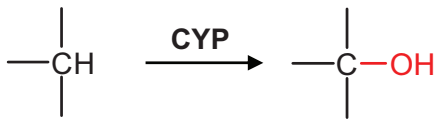
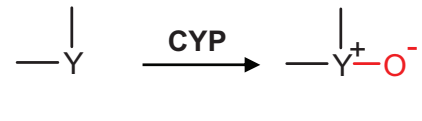
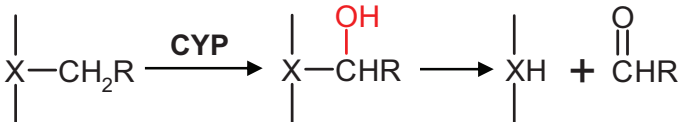
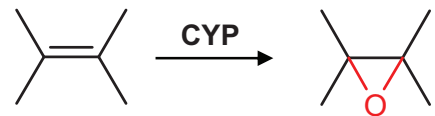
Kohlenstoff-Hydroxylierung**Heteroatom-Oxygenierung****Desalkylierung am Heteroatom****Epoxidierung**

Abb. 3 Wichtige Monooxygenase-Reaktionen, die durch CYP-Enzyme katalysiert werden (X = N, O und Y = N, S).

Mechanismus der Katalyse

Der Katalysezyklus der CYP-Enzyme (Abb. 4) beginnt damit, dass durch die Bindung eines Substratmoleküls das Wassermolekül von der 6. Koordinationsstelle des Hämeisens verdrängt wird, was zur Ausbildung eines High-Spin-Fe(III)-Komplexes führt.^{11,13} Dadurch kann die Übertragung eines Elektrons durch die NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase leichter stattfinden. Nach der Reduktion zum Fe(II)-Komplex wird molekularer Sauerstoff als sechster Ligand des Eisens gebunden. Durch eine intramolekulare Elektronenverschiebung wird das Zentralatom wieder in die Oxidationsstufe III überführt. Anschließend wird ein weiteres Elektron durch die NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase oder durch die NADH-Cytochrom-b₅-Reduktase über Cytochrom-b₅ übertragen und ein Superoxid-Intermediat gebildet, woraus durch Aufnahme eines Protons das entsprechende Hydroperoxid entsteht. Nach der Spaltung der Peroxidbindung wird mit Hilfe eines Protons Wasser eliminiert. Zurück bleibt ein Eisen-Sauerstoff-Komplex, der das Substrat oxygeniert. Bei einer Hydroxylierungsreaktion ist hierfür zunächst eine homolytische Spaltung der CH-Bindung des Substrates notwendig. Nach Abdissoziation des Produktes und der Aufnahme eines Wassermoleküls liegt das CYP-Enzym wieder im Ausgangszustand vor. Durch die Reaktion des Enzym-Substrat-Komplexes mit einem Hydroperoxid, wie z. B. Wasserstoffperoxid, ist die Substratumsetzung auch ohne eine Elektronenübertragung und molekularen Sauerstoff möglich (Peroxid-Shunt).¹¹

stärksten exprimierten CYP-Enzyme (Abb. 5). CYP3A4 ist darüber hinaus das bedeutendste intestinale CYP-Enzym. Aufgrund der Induzierbarkeit der Enzyme und dem Auftreten von Polymorphismen können sich starke interindividuelle Unterschiede im Gehalt und dem Anteil der einzelnen Isoenzyme ergeben.^{17,18} Alle CYP-Enzyme zusammen haben einen Anteil von etwa 80 % am Phase-I-Metabolismus aller sich auf dem Markt befindenden Arzneistoffe (Abb. 5).⁴ Die restlichen 20 % fallen auf alle anderen Phase-I-Enzyme, darunter die Alkohol- / Aldehyd-Dehydrogenasen und die Carboxylesterasen. Die meisten Arzneistoffe werden durch CYP3A (ca. 40 %) metabolisiert. CYP2D6 (ca. 15 %) und CYP2C9 (ca. 10 %) haben ebenfalls einen bedeutenden Anteil (Abb. 5).⁴

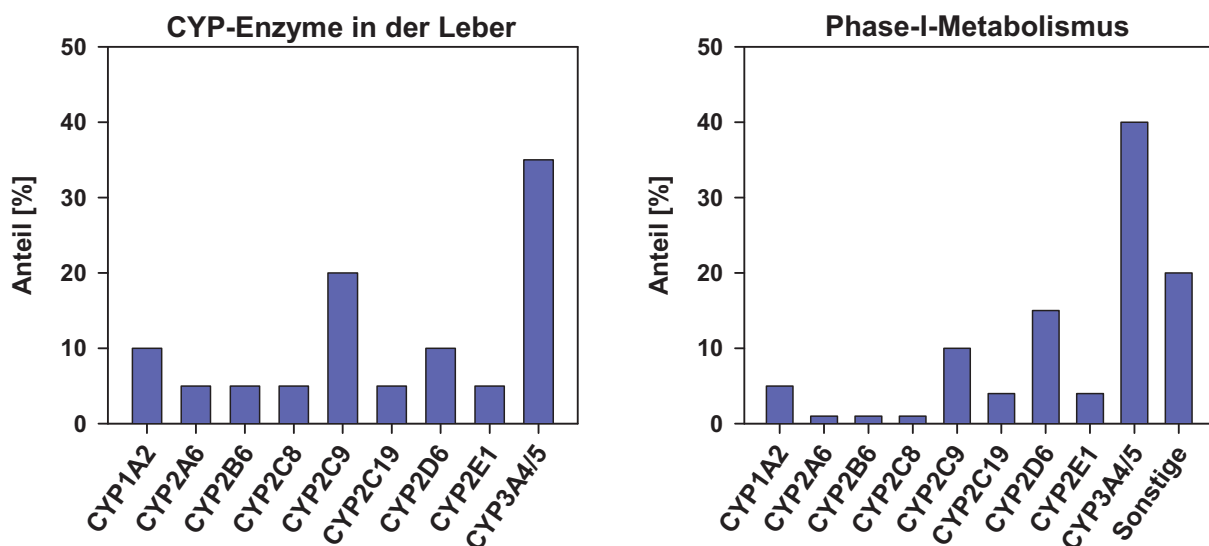


Abb. 5 Anteile der fremdstoffmetabolisierenden CYP-Enzyme an den CYP-Enzymen der Leber (links) und Anteile einzelner CYP-Enzyme am Phase-I-Metabolismus aller auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe (rechts).⁴

Substrate, Inhibitoren und Induktoren

Die einzelnen CYP-Enzyme des Arzneistoffmetabolismus besitzen eine unterschiedlich ausgeprägte Substratspezifität und -affinität, so dass ein Arzneistoff nur durch wenige oder im Extremfall nur durch ein CYP-Enzym verstoffwechselt wird. Dabei metabolisieren einige CYP-Enzyme vorzugsweise Substrate mit bestimmten Strukturmerkmalen. Bis heute ist eine Vielzahl von Arzneistoffen bekannt, die CYP-Enzyme inhibieren.⁹ Durch eine Substanz werden in den meisten Fällen nur einzelne

Tab. 2 Ausgewählte Substrate, Inhibitoren und Induktoren wichtiger CYP-Enzyme des Fremdstoff-metabolismus.⁹

Enzym	Substrat	Inhibitor	Induktor
CYP1A2	Clozapin Coffein Phenacetin Tacrin Theophyllin Tizanidin	Ciprofloxacin Fluvoxamin Furafyllin α -Naphthoflavon Rofecoxib	Dioxin gegrilltes Fleisch Kaffee Omeprazol PAK Tabakrauch
CYP2A6	Cumarin Nicotin	8-Methoxypsoralen Tranlylcypromin	Ethinylestradiol Phenobarbital
CYP2B6	Bupropion Cyclophosphamid Efavirenz Propofol	Clopidogrel ThioTEPA Ticlopidin	Carbamazepin Metamizol Phenobarbital Rifampicin
CYP2C8	Amodiaquin Paclitaxel Repaglinid Rosiglitazon	Gemfibrozil(glucuronid) Montelukast Trimethoprim	Rifampicin
CYP2C9	Diclofenac Flurbiprofen Naproxen Phenprocoumon Phenytoin Tolbutamid S-Warfarin	Amiodaron Fluconazol Fluvoxamin Sulfaphenazol	Carbamazepin Johanniskraut Phenobarbital Phenytoin Rifampicin
CYP2C19	Diazepam S-Mephenytoin Omeprazol Proguanil	Fluconazol Fluvoxamin Omeprazol Ticlopidin	Johanniskraut Phenobarbital Rifampicin
CYP2D6	Amitriptylin Bufuralol Codein Debrisoquin Dextromethorphan Diphenhydramin Imipramin Metoprolol	Chinidin Fluoxetin Paroxetin Terbinafin	keine bekannt
CYP2E1	Anilin Chlorzoxazon Halothan	Disulfiram Pyridin	Ethanol Isoniazid Tabakrauch
CYP3A4	Ciclosporin Felodipin Midazolam Nifedipin Simvastatin Terfenadin Testosteron	Bergamottin Clarithromycin Itraconazol Ketoconazol Ritonavir Troleandomycin Verapamil	Carbamazepin Dexamethason Johanniskraut Metamizol Phenobarbital Phenytoin Rifampicin

Isoenzyme gehemmt. Darüber hinaus kann die Expression vieler CYP-Enzyme durch verschiedene Induktoren gesteigert werden (s. I.6.2). In Tab. 2 sind ausgewählte Substrate, Inhibitoren und Induktoren der einzelnen CYP-Enzyme angegeben.

CYP1A2 metabolisiert vorzugsweise planare Moleküle¹⁹, wie z. B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), und Moleküle mit einem Stickstoffheterozyklus, wie z. B. Clozapin (*N*-Demethylierung)²⁰ oder Tacrin (1-Hydroxylierung).²¹ Als Markerreaktionen für CYP1A2 können die *O*-Dealkylierung von Phenacetin²² oder die *N*-Demethylierung an Position 3 von Coffein und Theophyllin²³ dienen. Einen Hemmstoff stellt das strukturverwandte Furafyllin dar.²⁴ Durch CYP2A6 werden nur wenige Arzneistoffe metabolisiert. Substrate dieses Enzyms sind die Naturstoffe Cumarin (7-Hydroxylierung)²⁵ und Nicotin (5'-Hydroxylierung).²⁶ Bedeutende Hemmstoffe sind der Monoaminoxidase-Inhibitor Tranylcypromin und das bei der Photochemotherapie eingesetzte 8-Methoxy-psoralen.²⁷ CYP2B6 ist am Metabolismus von hauptsächlich lipophilen, nicht-planaren und neutralen bzw. schwach basischen Molekülen beteiligt.²⁸ Wichtige Substrate sind das Narkotikum Propofol (4-Hydroxylierung)²⁹, das Antidepressivum Bupropion (*C*-Hydroxylierung)³⁰ und der Reverse-Transkriptase-Inhibitor Efavirenz (8-Hydroxylierung).³¹ Darüber hinaus spielt dieses Enzym eine wichtige Rolle bei der Bioaktivierung von Cyclophosphamid (4-Hydroxylierung).³² Starke und selektive Inhibitoren dieses Enzyms sind die Thienopyridin-Derivate Ticlopidin und Clopidogrel.³³ Beispiele für CYP2C8-Substrate sind Amodiaquin (*N*-Dealkylierung)³⁴ und Paclitaxel (6 α -Hydroxylierung).³⁵ Das Auftreten von lebensbedrohlichen Rhabdomyolysen nach einer gleichzeitigen Einnahme des inzwischen obsoleten Lipidsenkers Cerivastatin mit Gemfibrozil lassen sich auf eine CYP2C8-Inhibition durch Gemfibrozil bzw. dessen Glucuronids und den damit verbundenen verminderten Abbau von Cerivastatin zurückführen.^{36,37} Substrate von CYP2C9 sind überwiegend saure Substanzen³⁸, wie das nichtsteroidale Analgetikum Diclofenac (4'-Hydroxylierung)³⁹, das Antikoagulans Phenprocoumon (6-, 7-Hydroxylierung)⁴⁰ und das Antidiabetikum Tolbutamid (Methylhydroxylierung).⁴¹ CYP2C19 spielt eine wichtige Rolle bei der Bioaktivierung von Clopidogrel und der Biotransformation von Omeprazol.^{42,43} Das hoch polymorphe CYP2D6 katalysiert hauptsächlich *N*- und *O*-Desalkylierungen von basischen Arzneistoffen, wie Codein⁴⁴, Dextromethorphan⁴⁵ und Diphenhydramin.⁴⁶ Substrate für dieses Enzym gehören vielen verschiedenen

Arzneistoffgruppen an, wie z. B. den Antidepressiva (Imipramin⁴⁷, Amitriptylin⁴⁸), den β -Blockern (Metoprolol)⁴⁹ oder den Antiarrhythmika (Propafenon).⁵⁰ Bei multimorbiden Patienten ergibt sich daher ein hohes Interaktionspotential. CYP2E1 metabolisiert hauptsächlich Substanzen mit einem niedrigen Molekulargewicht, wie Ethanol, Anilin oder Narkotika.⁵¹ Durch CYP3A4, das Enzym mit dem höchsten Gehalt in Leber und Dünndarm, wird eine Vielzahl von Arzneistoffen unterschiedlichster Struktur metabolisiert. Markersubstrate sind Testosteron (6 β -Hydroxylierung), Midazolam (1'-Hydroxylierung) oder Nifedipin (Oxidation).² Demzufolge existieren viele Substanzen, die dieses Enzym kompetitiv, quasi-irreversibel (Azolantimykotika)⁵² oder mechanismusbasiert (Furanocumarine im Grapefruitsaft)^{53,54} hemmen.

Polymorphismen

Beim Ausmaß des Fremdstoffmetabolismus durch CYP-Enzyme wurden interindividuelle Unterschiede festgestellt. Historische Beispiele hierfür sind die 4-Hydroxylierung von Debrisoquin⁵⁵ und die *N*-Oxidation von Spartein⁵⁶ durch CYP2D6. Für das Auftreten verschiedener Phänotypen sind unterschiedliche Genvarianten des Enzyms verantwortlich, was als Polymorphismus bezeichnet wird. Als polymorph wird ein Enzym allerdings nur dann angesehen, wenn mindestens zwei Genvarianten mit einer Häufigkeit von > 1 % auftreten. Die Ursache für Polymorphismen ist häufig der Austausch einer DNA-Base (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). In der Regel führt die dadurch veränderte Aminosäure des Proteins zu einer verminderten Enzymaktivität. Darüber hinaus können die für das Enzym codierenden DNA-Abschnitte mehrfach vorliegen (Genamplifizierung), was zu einer erhöhten Expression des entsprechenden Enzyms führt. Bis heute sind von allen CYP-Enzymen verschiedene Genvarianten bekannt.⁵⁷ Allerdings sind aufgrund ihrer Häufigkeit nur Polymorphismen von CYP2C9, CYP2C19 und CYP2D6 klinisch relevant. Zwischen den Bevölkerungsgruppen verschiedener ethnischer Herkunft bestehen z. T. große Unterschiede in der Häufigkeit der einzelnen Phänotypen. Bei CYP2C9 sind neben dem Wildtyp (CYP2C9*1) zwei weitere bedeutende Genvarianten mit einer verminderten Enzymaktivität bekannt, die jeweils auf einen SNP zurückzuführen sind.⁵⁸ Bei CYP2C9*2 wurde Arginin an Stelle 144 durch Cystein ersetzt, was zu einer verminderten maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit führt. Bei CYP2C9*3 ist gegenüber dem Wildtyp Isoleucin an Position 359 durch ein

Leucin ausgetauscht, wodurch eine verminderte Affinität des Substrates zu dem Enzym resultiert. Ebenso existieren für CYP2C19 neben dem Wildtyp zwei weitere relevante Genvarianten (CYP2C19*2 und CYP2C19*3), die Substrate für dieses Enzym wesentlich langsamer umsetzen.⁵⁷ Bei CYP2D6 wurden bisher über 50 verschiedene Gene entdeckt (Debrisoquin/Spartein-Polymorphismus), weshalb dieses Enzym als hoch polymorph anzusehen ist.^{57,59} Aufgrund des genetischen Polymorphismus können verschiedene Phänotypen unterschieden werden. Schnelle Metabolisierer (extensive metabolizer, EM) besitzen zwei Wildtyp-Allele und haben daher eine normale Enzymaktivität. Heterozygote Träger eines teilfunktionellen Allels werden als intermediäre Metabolisierer (intermediate metabolizer, IM) bezeichnet. Liegen zwei teilfunktionelle Allele vor, handelt es sich um einen langsamen Metabolisierer (poor metabolizer, PM). Angehörige dieser beiden Phänotypen besitzen eine eingeschränkte metabolische Aktivität. Um Plasmaspiegel oberhalb des therapeutischen Bereiches zu vermeiden, kann eine Dosiserniedrigung erforderlich sein. Liegen mehrere Genkopien des gesunden Allels vor, handelt es sich um ultraschnelle Metabolisierer (ultrarapid metabolizer, UM). Aufgrund der erhöhten Enzymaktivität, muss bei ihnen eine Dosissteigerung vorgenommen oder ein kürzeres Dosierungsintervall gewählt werden, um eine therapeutische Konzentration des Arzneistoffes zu erreichen. Die Anteile der einzelnen Phänotypen können sich regional stark unterscheiden. Bei der kaukasischen Bevölkerung sind die Anteile der CYP2D6-Phänotypen etwa 5-10 % PM, 10-15 % IM, 80 % EM und 3 % UM.⁶⁰

Festgestellt werden kann ein Polymorphismus zum einen durch eine In-vivo-Phänotypisierung, bei der eine Aktivitätsbestimmung nach der Applikation einer Testsubstanz vorgenommen wird.^{60,61} Beispielsweise können für CYP2C9 Tolbutamid (Methylhydroxylierung), für CYP2C19 S-Mephenytoin (4'-Hydroxylierung) und für CYP2D6 Dextromethorphan (O-Demethylierung) eingesetzt werden. Eine Testsubstanz sollte vorwiegend nur zu einem Metaboliten biotransformiert werden und die Umsetzung zu diesem Metaboliten sollte nur durch ein Isoenzym erfolgen. Einige Stunden nach der Einnahme wird der Metabolit und die Ausgangssubstanz mit einem geeigneten analytischen Verfahren im Urin, Plasma oder Speichel quantifiziert. Anhand der metabolischen Rate, dem Quotienten der Ausgangssubstanz und des Metaboliten (metabolic ratio), kann eine Zuordnung zu einem Phänotyp erfolgen. Für PMs werden daher höhere Zahlenwerte erhalten.⁶⁰ Eine

andere Möglichkeit ist die Genotypisierung. Hierbei wird die DNA nach der Extraktion aus einer Blutprobe durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt und anschließend mit Hilfe der Gelelektrophorese analysiert.⁶²

2.2 Carboxylesterasen

Carboxylesterasen (CES) gehören zu den α,β -Serinhydrolase-Enzymen und kommen in vielen Säugetieren vor.^{63,64} Sie katalysieren die Hydrolyse von Estern, Thioestern, Amiden oder Carbamaten. Da durch die Reaktion die beiden verbundenen funktionellen Gruppen des Substrates freigesetzt werden, zählen die CES zu den Enzymen des Phase-I-Metabolismus. CES sind membrangebunden und befinden sich an der luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) (Abb. 6). Sie sind dort mit ihren C-terminalen Aminosäuren (HXEL-COOH) an den KDEL-Rezeptor gebunden, der in der Membran verankert ist. Produkte der CES stellen Substrate der Glucuronosyltransferasen dar, die ebenfalls an der Innenseite des ER lokalisiert sind (Abb. 6). Es wird daher eine Interaktion dieser beiden Enzyme vermutet.⁶³

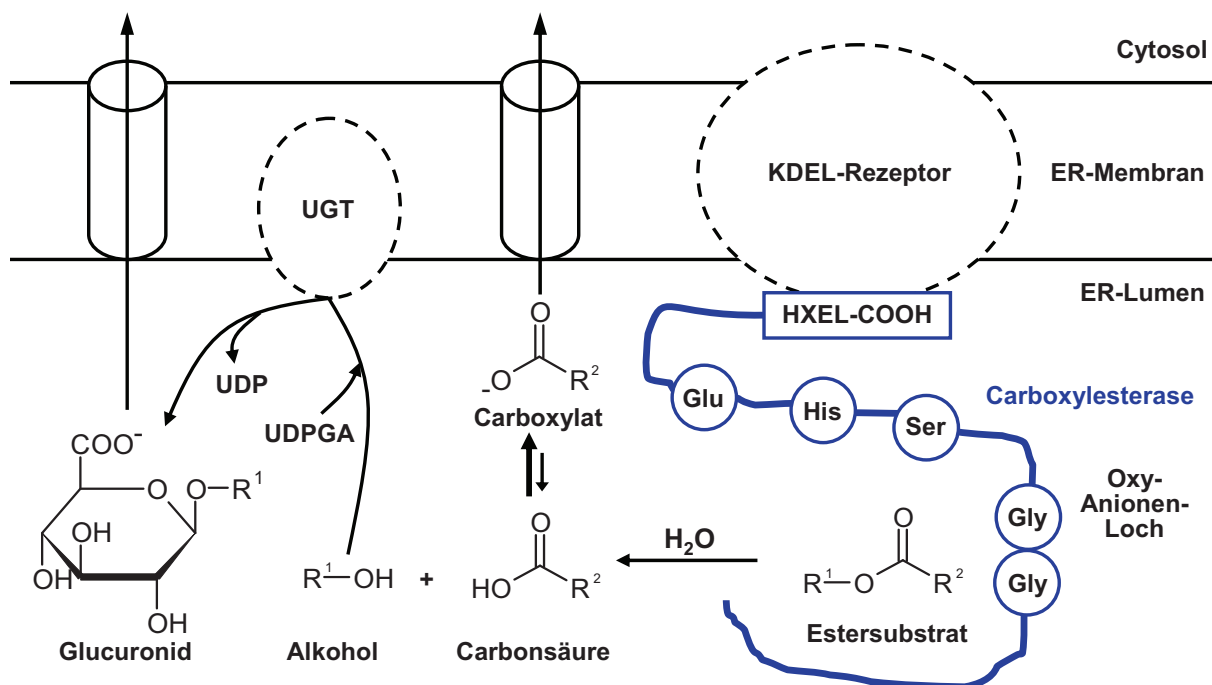


Abb. 6 Lokalisation der Carboxylesterasen an der Innenseite des endoplasmatischen Retikulums (ER) und Konjugation der Produkte durch Glucuronosyltransferasen (UGT) (modifiziert nach⁶³).

CES-Isoenzyme

Die Einteilung der CES erfolgt anhand der Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz in Familien, Subfamilien und einzelne Gene.^{63,65} Derzeit sind 5 Familien bekannt. Die bedeutendsten Familien sind CES1 und CES2, zu denen die meisten CES-Enzyme gehören. CES sind ubiquitär und werden v. a. in Leber, Dünndarm, Niere und Lunge exprimiert. Die Enzyme der Familie CES1 und CES2 kommen in den einzelnen Organen in unterschiedlicher Menge vor (Tab. 3).⁶⁴ Beispielsweise ist beim Menschen der CES1-Gehalt in der Leber deutlich höher als der CES2-Gehalt. Andererseits wird CES2 im Dünndarm stark exprimiert, während CES1 dort nicht zu finden ist. Bei dieser Verteilung existieren Unterschiede in der Expression zwischen verschiedenen Spezies. Darüber hinaus kann die Expression u. a. durch Phenobarbital, Aminophenazon oder Glucocorticoide, wie z. B. Dexamethason, induziert werden.⁶³

Tab. 3 Expression von Carboxylesterasen in verschiedenen humanen Geweben.⁶⁴ Nicht nachweisbar (-), schwach (+), moderat (++) und stark (+++).

Enzym	Leber	Dünndarm	Niere	Lunge
CES1	+++	-	+	+++
CES2	+	+++	+++	-

Substrate

CES1 und CES2 zeigen eine unterschiedliche Substratspezifität.⁶⁴ CES1 hydrolysiert vorzugsweise Substrate mit einer kleinen Alkoholgruppe und einer großen Acylgruppe. Beispiele hierfür sind Methylphenidat⁶⁶ oder der Methylester des Cocains (Abb. 7).⁶⁷ Andererseits werden Substrate mit einer großen Alkoholgruppe und einer kleinen Acylgruppe hauptsächlich durch CES2 umgesetzt, wie z. B. der Benzoyl ester des Cocains (Abb. 7).^{67,68} CES spielen daher beim Metabolismus und der Bioaktivierung von Arzneistoffen eine wichtige Rolle. Ein bedeutendes Beispiel ist das Prodrug Irinotecan (Abb. 7), das zur Behandlung des Kolonkarzinoms eingesetzt wird. Durch die CES2-katalysierte Hydrolyse des Carbaminsäureesters wird der aktive Metabolit SN-38 gebildet, der eine wesentlich höhere inhibitorische Aktivität gegenüber der Topoisomerase-I aufweist.⁶⁹ Darüber hinaus gehören CES zu den Enzymen, die u. a. endogene Triacylglyceride und Cholesterylester hydrolysieren und daher eine Bedeutung für den Transport von Lipiden besitzen. Bei In-vitro-

Untersuchungen zur Bestimmung der Aktivität wird eine Reihe von unspezifischen kolorimetrischen Modellsubstraten eingesetzt, mit denen eine Unterscheidung zwischen CES und anderen Esterasen oft nicht möglich ist.⁷⁰

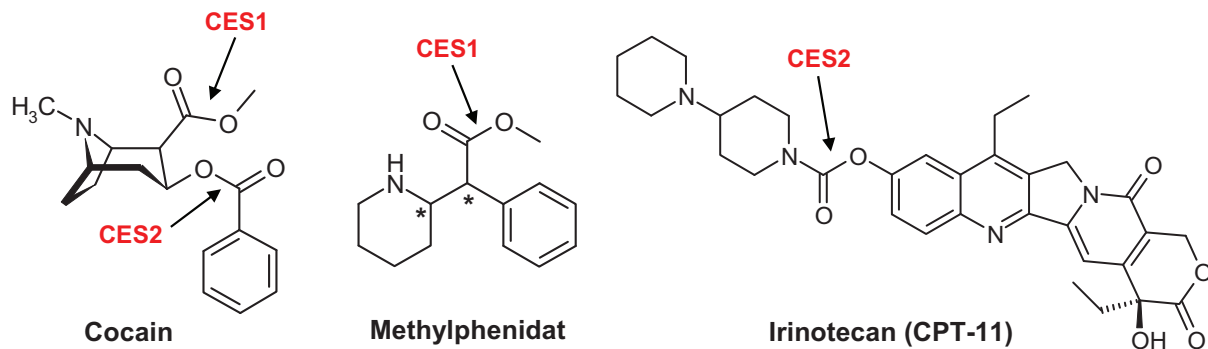


Abb. 7 Beispiele für Reaktionen, die durch die CES1- und CES2-Familie katalysiert werden.

Mechanismus der Katalyse

Die Hydrolyse von Substraten durch Carboxylesterasen erfolgt nach einem mehrstufigen katalytischen Mechanismus, der bei allen CES-Enzymen gleich verläuft.⁶⁴ Dabei bilden Serin-203, Glutaminsäure-336 und Histidin-450 eine katalytische Triade. Weiterhin spielt Glycin-123 und Glycin-124 im sogenannten Oxy-Anionen-Loch eine Rolle (Abb. 8). Im ersten Schritt bindet ein Estersubstrat an das aktive Zentrum und der Sauerstoff der Hydroxylgruppe des Serins greift die Carbonylgruppe nukleophil an. Erleichtert wird dies durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem freien Carboxylat-Anion der Glutaminsäure und dem Histidin, sowie zwischen Histidin und Serin. Anschließend wird ein tetraedrischer Übergangszustand gebildet, bei dem der ursprüngliche Carbonylsauerstoff als Oxy-Anion vorliegt. Stabilisiert wird dieses Ion durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zu den benachbarten Glycin-123 und Glycin-124. Im nächsten Schritt wird die Esterbindung gelöst und das Proton des Imidazolium-Ions auf die abgehende Alkoholfunktion übertragen. Zurück bleibt der Acylrest, der nun an das Serin-203 des Enzyms gebunden ist und den Enzym-Acyl-Komplex bildet. Zur Regeneration des Enzyms greift ein Wassermolekül die Carbonylfunktion des acylierten Serins nukleophil an und der Imidazolrest des Histidins nimmt ein Proton des Wassers auf. Wiederum wird ein tetraedrischer Übergangszustand gebildet. Anschließend wird das Proton des Imidazolium-Ions auf den Sauerstoff des

Serin-203 übertragen und der Acylrest als Carbonsäure freigesetzt. Das Enzym liegt nun wieder in seinem Ausgangszustand vor. Anstelle eines Wassermoleküls kann der Enzym-Acyl-Komplex mit einem weiteren Alkohol reagieren. Dies führt zu einer Übertragung dieses Alkohols auf den Acylrest (Transacylierung), was eine weitere mögliche Reaktion der CES darstellt und u. a. bei Cocain beobachtet werden konnte.⁶⁷

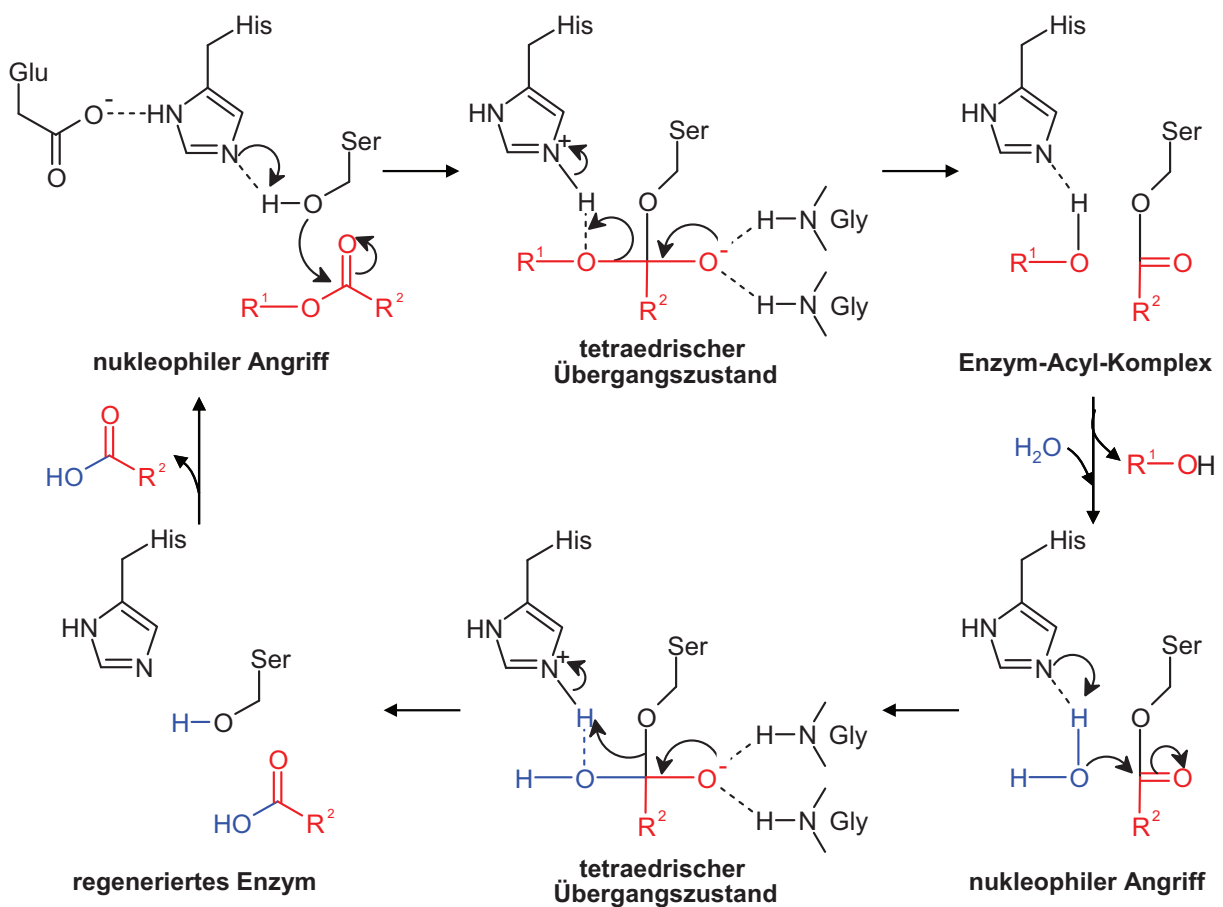


Abb. 8 Katalytischer Mechanismus der Carboxylesterasen (modifiziert nach ⁶⁴).

Inhibitoren

Es sind einige Substanzen bekannt, die CES-Enzyme hemmen.⁷¹ Als Positivkontrolle wird häufig Bis(*p*-nitrophenyl)phosphat (BNPP) verwendet (Abb. 9), das keine Isoenzymselektivität besitzt.^{72,73} Loperamid (Abb. 9) hemmt hingegen selektiv CES2.⁷³ Weitere Hemmstoffe der CES sind aromatische Dione, wie z. B. Benzil (Abb. 9), oder verschiedene Benzylsulfonamide.^{74,75} Der Mechanismus der CES-Hemmung durch diese Substanzen ist vorwiegend kompetitiv und reversibel. Bei

Arzneistoffen, die Substrate der CES sind, besteht die Gefahr von Arzneimittelinteraktionen.⁷⁶ Eine Hemmung intestinaler CES kann zu einer erhöhten Bioverfügbarkeit führen, da dann die applizierten Arzneistoffe in größerem Umfang absorbiert werden können. Handelt es sich dagegen um ein Prodrug, führt eine Hemmung zu niedrigeren Plasmaspiegeln der wirksamen Substanz.

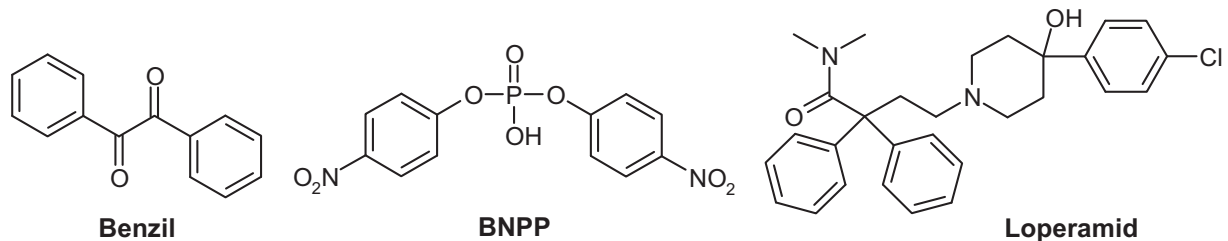


Abb. 9 Beispiele für CES-Inhibitoren.

2.3 Enzyme des Glutathionstoffwechsels

L-Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin, GSH) ist ein endogenes Tripeptid und kommt in Leberzellen in einer Konzentration bis zu 10 mM vor.⁷⁷ Es wird in zwei Stufen aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin gebildet (Abb. 10). Zunächst erfolgt durch die γ -Glutamylcysteinsynthase die Synthese von γ -Glutamylcystein. Anschließend entsteht daraus mit Hilfe der Glutathionsynthase und Glycin das Tripeptid GSH. GSH besitzt eine freie Thiolgruppe, die bereits ohne enzymatische Katalyse mit elektrophilen Verbindungen reagieren kann. Zudem besitzt es aufgrund dieser Thiolgruppe antioxidative Eigenschaften. Es existiert ein Redoxkreislauf, bei dem GSH eine wichtige Rolle spielt und mehrere glutathionabhängige Enzyme beteiligt sind (Abb. 10).^{77,78,79} Die Glutathionperoxidase katalysiert neben der Katalase und der Superoxid-Dismutase die Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies, wie z. B. Wasserstoffperoxid oder Lipidperoxide. Dabei entsteht aus zwei Molekülen GSH durch Ausbildung einer Disulfidbrücke die oxidierte Form (GSSG). Das oxidierte Glutathion wird anschließend durch die Glutathionreduktase mit Hilfe des Cosubstrates NADPH wieder in GSH überführt. Zum anderen ist GSH das Cosubstrat der Glutathion-S-Transferasen, die hauptsächlich durch die Bildung von Glutathion-S-Konjugaten die Entgiftung von elektrophilen Verbindungen katalysieren. Da bei diesen Reaktionen GSH verbraucht wird, kann die Belastung des Organismus mit einer hohen Menge toxischer

Substanzen zu einer Erschöpfung des gespeicherten Glutathions führen. Diese überschüssigen reaktiven Verbindungen können dann mit Proteinen oder Nukleinsäuren reagieren, was zur Dysfunktion bzw. zum Zelltod führen kann. Die entstandenen Glutathion-Konjugate können anschließend durch ATP-abhängige Effluxpumpen aus den Zellen transportiert werden. Häufig werden Glutathion-Konjugate vor ihrer Elimination aus dem Organismus durch weitere Enzyme modifiziert. Dabei werden sie durch die γ -Glutamyl-Transpeptidase und die Cystein-Glycinase zu Cystein-Konjugaten abgebaut. Im Folgenden werden durch *N*-Acetyltransferasen die entsprechenden *N*-Acetylcystein-Konjugate (Mercaptursäuren) gebildet, die renal bzw. biliär eliminiert werden (Abb. 10).⁷⁷

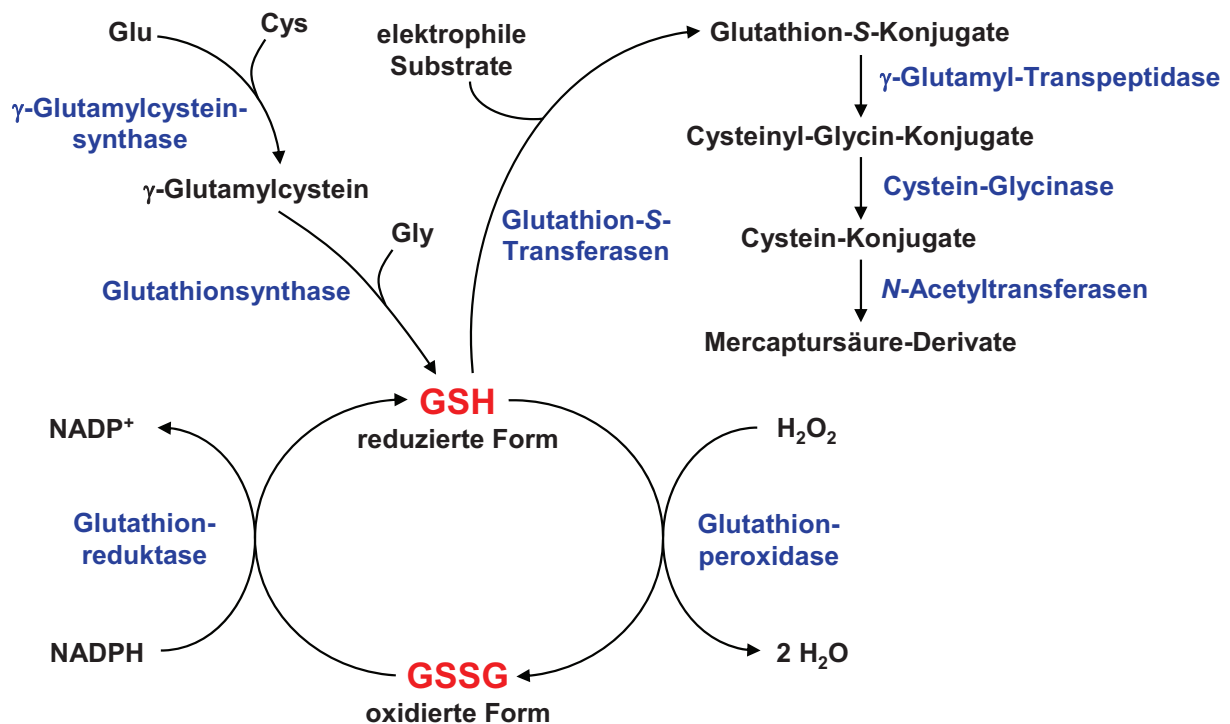


Abb. 10 Übersicht über den Glutathionstoffwechsel mit den beteiligten Enzymen (modifiziert nach ^{77,78}). Cystein (Cys), Glutaminsäure (Glu), Glutathion (GSH), Glutathiondisulfid (GSSG), Glycin (Gly).

2.3.1 Glutathion-S-Transferasen

Glutathion-S-Transferasen (GSTs) sind eine Supergen-Familie von Enzymen, die in erster Linie die Konjugation des Tripeptids Glutathion an elektrophile Substrate katalysieren und daher zu den Enzymen des Phase-II-Metabolismus zählen. Sie stellen einen wichtigen Entgiftungsmechanismus dar und schützen Zellen vor der

schädigenden Wirkung dieser Substanzen. GSTs kommen in vielen Organismen vor und werden beim Menschen in allen Geweben exprimiert. Sie können in drei Familien eingeteilt werden. Die cytosolischen und mikrosomalen GSTs gehören zu den löslichen Enzymen. Daneben existiert mit den membrangebundenen GSTs eine dritte Familie, die auch MAPEG-Enzyme (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) genannt werden. Am N-terminalen Ende befindet sich eine konservierte Domäne mit α,β -Faltblattstruktur, an die Glutathion spezifisch bindet (G-site). Die Domäne am C-terminalen Ende, an der die hydrophoben Substrate binden können, besitzt eine alpha-helikale Struktur und ist wesentlich variabler (H-site).^{80,81}

GST-Isoenzyme

Anhand der Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz werden verschiedene Klassen unterschieden (Tab. 4). Innerhalb einer Klasse beträgt diese > 40 % und zwischen den Klassen < 25 %. Die löslichen GSTs der Säugetiere werden in die Klassen alpha, my, pi, theta, sigma, kappa, zeta und omega eingeteilt, die mit den Großbuchstaben A, M, P, T, S, K, Z und O abgekürzt werden.⁸¹ Die mitochondrialen GSTs gehören der Klasse kappa an, während die anderen Klassen sich im Cytosol befinden. Cytosolische und mitochondriale GSTs kommen als Dimere vor. Mikrosomale GSTs bilden Trimere. Die Untereinheiten innerhalb derselben Klasse werden mit arabischen Zahlen in der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert. Die dimeren Enzyme können dabei aus zwei gleichen Untereinheiten (Homodimere) oder zwei unterschiedliche Untereinheiten (Heterodimere) bestehen. Beispielsweise ergibt sich für das Homodimer 1 der GST der Klasse my die Bezeichnung GSTM1-1 und für das Heterodimer, bestehend aus den Untereinheiten 1 und 2 der GST der Klasse alpha die Bezeichnung GSTA1-2.⁸² Verschiedene Allele werden mit kleinen Buchstaben gekennzeichnet und dabei z. B. GSTM1a-1b erhalten. Von den GSTs ist eine Reihe von Polymorphismen bekannt, die u. a. für eine Tumorgenese und die Entstehung von inflammatorischen Erkrankungen verantwortlich gemacht werden. Am besten sind hierbei die GSTs der Klassen my, pi und theta untersucht.⁸⁰

Tab. 4 Klassifizierung humaner Glutathion-S-Transferasen anhand ihrer Aminosäuresequenz und ihr Vorkommen in den einzelnen Zellkompartimenten.⁸¹

Vorkommen	Klasse	GST-Isoenzyme
Cytosol	α (alpha)	A1-1, A2-2, A3-3, A4-4, A5-5
	μ (my)	M1-1, M2-2, M3-3, M4-4, M5-5
	π (pi)	P1-1
	θ (theta)	T1-1, T2-2
	ζ (zeta)	Z1-1
	ω (omega)	O1-1, O2-2
	σ (sigma)	S1-1
Mitochondrien	κ (kappa)	K1-1
Mikrosomen	MAPEG	MGST1, MGST2, MGST3

Reaktionen und Substrate

Typische durch die GSTs katalysierte Reaktionen, bei denen GSH mit seiner Thiolgruppe auf das Substrat übertragen wird, sind die nukleophile Substitution, die Michael-Addition und die nukleophile Addition an Epoxide (Abb. 11).^{81,83} Durch diese Reaktionen können in den Organismus gelangte Arzneistoffe, Pestizide und andere Chemikalien entgiftet werden. In vielen Fällen stellen die aus den Fremdstoffen entstandenen reaktiven Metaboliten Substrate der GSTs dar. Darüber hinaus besitzen die GSTs eine Peroxidase-Aktivität und können die Isomerisierung von Doppelbindungen katalysieren (Abb. 11). Neben dem Fremdstoffmetabolismus existieren auch endogene Substrate der GSTs.⁸⁰ Beispielsweise wirken GSTs durch Isomerisierung von Doppelbindungen an der Biosynthese von Steroiden mit und entgiften Produkte des oxidativen Lipidabbaues, wie Lipidhydroperoxide oder 4-Hydroxynonenal. GSTs besitzen eine breite und meist überlappende Substratspezifität.⁸⁰ Einige Substrate werden vorzugsweise durch bestimmte Klassen metabolisiert. Die Isomerisierung von Doppelbindungen der Steroide wird v. a. durch die Klasse alpha katalysiert. Dem gegenüber kommen in vielen Klassen Enzyme vor, die das Substrat 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol konjugieren. Neben der Katalyse von Reaktionen mit GSH können an die GSTs verschiedene hydrophobe Substanzen binden, wie z. B. Bilirubin, Häm oder Steroide. GSTs werden daher auch als Ligandin bezeichnet und übernehmen wichtige Aufgaben im intrazellulären Transport dieser Substanzen.^{80,81}

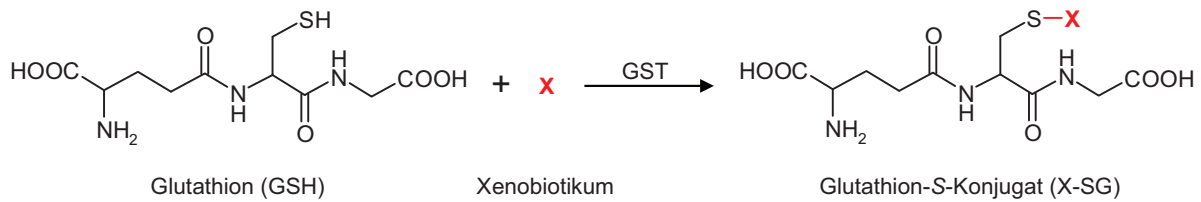
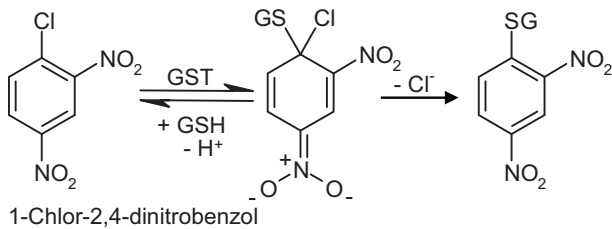
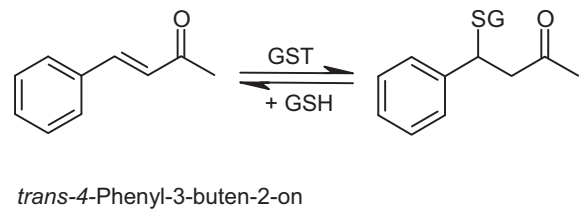
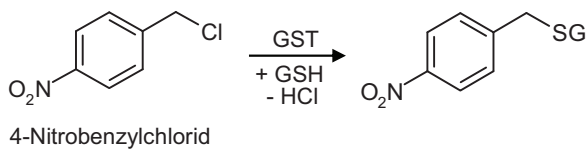
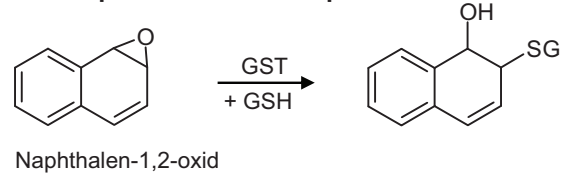
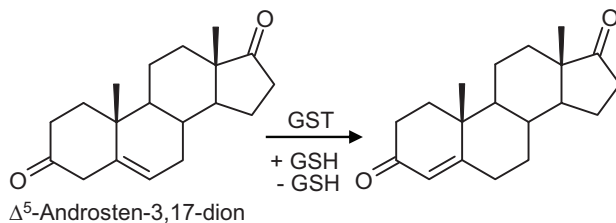
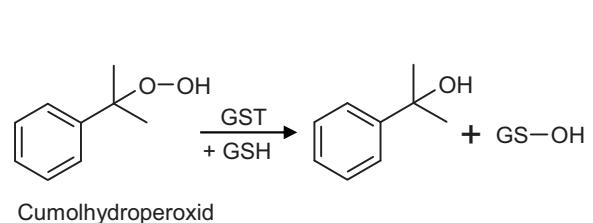
**Nukleophile aromatische Substitution****Michael-Addition****Nukleophile aliphatische Substitution****Nukleophile Addition an Epoxiden****Isomerisierung von Doppelbindungen****Reduktion von Hydroperoxiden**

Abb. 11 Wichtige durch Glutathion-S-Transferasen katalysierte Reaktionen anhand von ausgewählten Substraten (modifiziert nach ⁸³).

Mechanismus der Katalyse

Das Prinzip der GST-vermittelten Konjugation ist neben der Bindung des lipophilen Substrates die Aktivierung des Glutathions, in dem der pK_S -Wert der freien Thiol-Gruppe erniedrigt wird. Diese liegt nach der Bindung des Glutathions an das Enzym als Thiolat-Anion vor und kann mit den elektrophilen Substraten leichter reagieren. In Abb. 12 ist der postulierte katalytische Mechanismus für die Umsetzung von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol durch die GSTM1a-1a dargestellt, der über einen Additions-Eliminations-Mechanismus erfolgt.^{79,84} Durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zu einer Aminosäure in der Nähe des N-Terminus wird zunächst die Thiolgruppe des Glutathions aktiviert. Während die Aktivierung bei Enzymen der

Klassen alpha, my, pi und sigma durch einen Tyrosinrest (Tyrosin-6) erfolgt, übernimmt dies bei Enzymen der Klasse theta und zeta ein Serinrest, sowie bei Enzymen der Klasse omega ein Cysteinrest.⁸¹ Der protonierte Imidazolrest des Histidin-107 bildet eine Wasserstoffbrücke zur *o*-Nitrogruppe des Substrates aus. Das Chloratom des Substrates befindet sich zwischen Tyrosin-6 und Tyrosin-115. Im nächsten Schritt greift das Thiolat-Anion den Aromaten nukleophil an und es wird ein σ -Komplex (Meisenheimer-Salz) als Übergangszustand gebildet. Nun entstehen Wasserstoffbrücken zwischen der *o*-Nitrogruppe und den beiden Tyrosinresten sowie dem Histidin-107. Anschließend wird nach Elimination eines Chlorid-Ions das entsprechende Glutathion-S-Konjugat erhalten (Abb. 12).^{79,84}

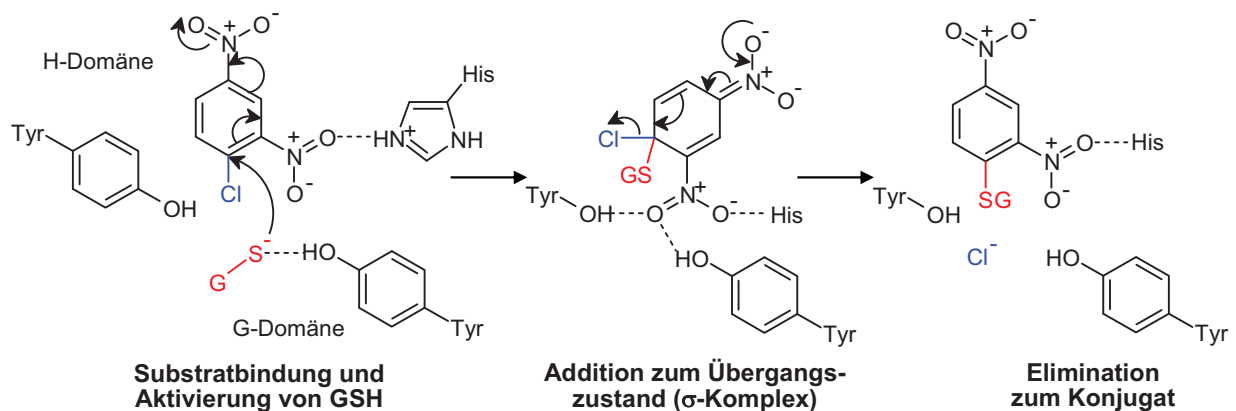


Abb. 12 Katalytischer Mechanismus der Konjugation von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol mit Glutathion durch die GSTM1a-1a (modifiziert nach ^{79,84}).

Inhibitoren

Es sind einige Inhibitoren von GSTs bekannt bzw. gezielt entwickelt worden.⁸³ Ein seit langem beschriebener und recht unselektiver GST-Inhibitor ist die Etacrynsäure. Weitere Hemmstoffe sind Sulfasalazin, Bromosulfophthalein, Derivate des 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazols und trizyklische Antidepressiva, wie z. B. Imipramin oder Amitriptylin. Von den Naturstoffen hemmen z. B. Polyphenole, wie das Flavonoid Quercetin oder Curcumin, die GSTs. Bei den GSTs wird häufig eine Produktinhibition beobachtet, was zur Entwicklung von Glutathion-S-Konjugaten und peptidomimetischen GSH-Derivaten als Inhibitoren führte. Für GST-Inhibitoren sind einige therapeutische Anwendungen denkbar. Aufgrund einer Überexpression von GSTs in Tumorgewebe kann es zur Resistenz gegenüber einer Zytostatikatherapie kommen. Weiterhin sind GSTs Targets zur Behandlung verschiedener parasitärer Krankheiten.

Beispielsweise besitzt *Plasmodium falciparum*, der Erreger der Malaria tropica, nur ein GST-Enzym (PfGST), für dessen selektive Hemmung Inhibitoren entwickelt wurden.⁸⁵

2.3.2 Glutathionreduktase

Die Glutathionreduktase (GR) ist ein Flavoenzym und gehört zu den Pyridinnukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen.^{79,86} Sie katalysiert spezifisch die Umsetzung von oxidiertem Glutathion (GSSG) in seine reduzierte Form (GSH). Als Redoxäquivalent dient dabei NADPH, welches u. a. durch die Glucose-6-phosphatdehydrogenase, die 6-Phosphogluconatdehydrogenase oder die Isocitratdehydrogenase bereitgestellt wird. Die GR kommt in vielen Organismen vor. In den Zellen ist sie v. a. im Cytosol und in den Mitochondrien lokalisiert. Die GR bildet ein Homodimer mit etwa 100-120 kDa, das eine schmetterlingsförmige Konformation einnimmt. Jede Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für FAD und eine für NADPH. Die GSSG-Bindungsstelle wird unter Beteiligung beider Untereinheiten ausgebildet, weshalb die GR nur als Homodimer katalytisch aktiv ist. Bei der humanen GR sind die beiden Untereinheiten über eine Disulfidbrücke verknüpft.^{79,86}

Mechanismus der Katalyse

In Abb. 13 ist schematisch der katalytische Zyklus der GR dargestellt.^{79,87} Nach dem Wegklappen des Phenolringes des Tyrosin-197 kann NADPH an das oxidierte Enzym (E_{ox}) binden und anschließend FAD reduzieren. Im nächsten Schritt wird die Disulfidbrücke der sich zwischen dem Flavinring und der GSSG-Bindungsstelle befindenden Cystein-63 und Cystein-58 durch das Flavin reduziert und ein Ladungstransfer-Komplex zwischen dem Thiolat-Ion des Cystein-63 und dem oxidierten Flavin ausgebildet. Das inzwischen oxidierte $NADP^+$ wird durch ein neues NADPH ersetzt. Anschließend wird GSSG gebunden und seine Disulfidbindung durch die von Glutamin-472 und Histidin-467 aktivierte Thiolgruppe des Cystein-58 nukleophil angegriffen. Es entsteht ein gemischtes Disulfid zwischen dem Cystein-58 und einem Monomer des GSSG (glutathionyliertes Enzym). Das zweite Monomer liegt nun als reduziertes Glutathion vor und wird freigesetzt. Anschließend wird die Disulfidbrücke zwischen Cystein-58 und Cystein-63 wiederhergestellt, wobei auch das erste Monomer als reduziertes Glutathion abgegeben wird (Abb. 13).

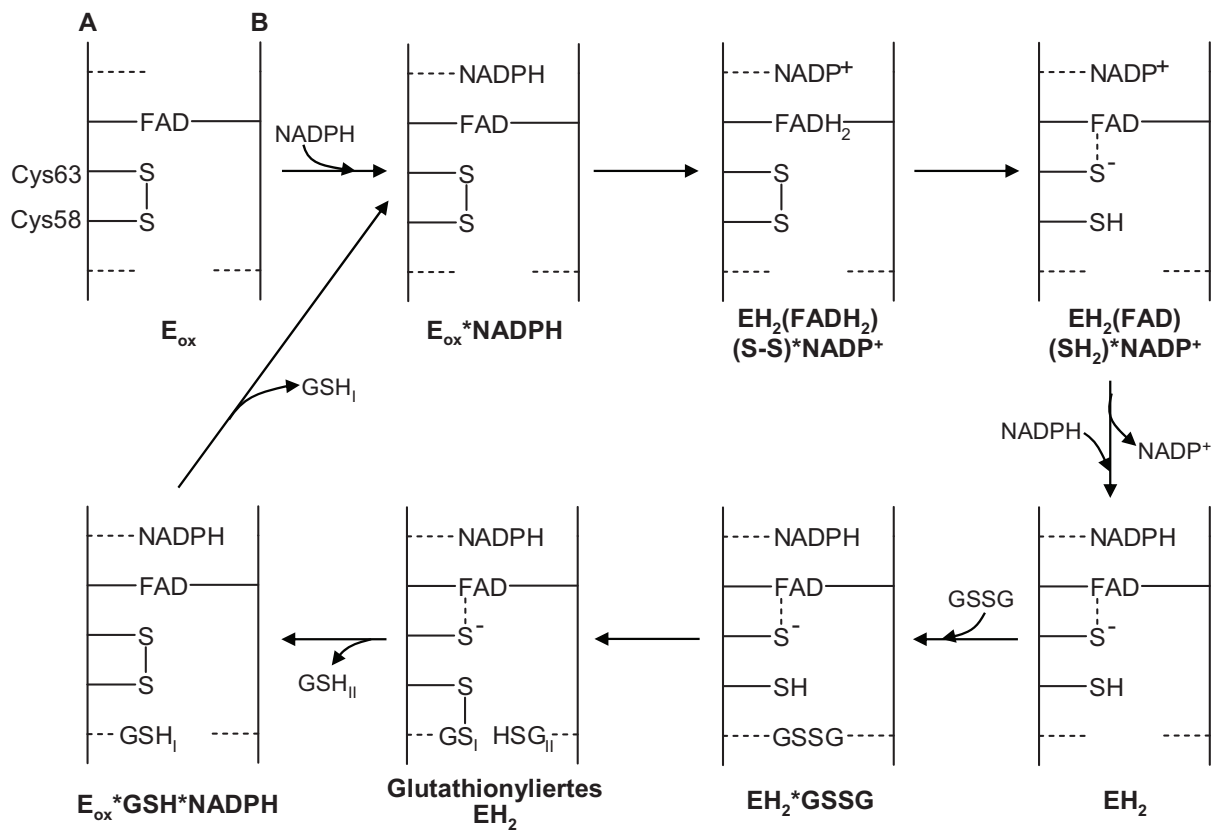


Abb. 13 Katalytischer Zyklus der Reduktion von oxidiertem Glutathion durch die Glutathionreduktase unter Beteiligung der beiden Untereinheiten A und B (modifiziert nach ^{79,87}).

Inhibitoren

Die GR und die verwandte Thioredoxinreduktase von *Plasmodium falciparum*, die für das Überleben des Parasiten notwendig sind, stellen neue Targets für die Bekämpfung der Malaria dar. Hierfür wurden spezifische Hemmstoffe, wie z. B. Naphthochinon-Derivate, entwickelt.⁸⁸

3 Bioaktivierung

Bei etwa 5-7 % der Arzneistoffe handelt es sich um sogenannte Prodrugs.⁸⁹ Ein Prodrug ist eine Substanz, die selbst keine pharmakologische Aktivität besitzt und im Körper entweder durch eine chemische oder durch eine enzymatische Reaktion in die wirksame Verbindung umgewandelt wird.⁸⁹ Diesen Vorgang nennt man Bioaktivierung. Es können klassische Prodrugs (carrier-linked prodrugs) und Bioprecursoren unterschieden werden.^{89,90} Bei klassischen Prodrugs wurde, ausgehend von der aktiven Substanz, durch Knüpfung einer kovalenten, aber hydrolysierbaren Bindung, eine Molekülveränderung vorgenommen. Bioprecursoren

besitzen keine solchen sogenannten Transportergruppen. Bei ihnen erfolgt die Bioaktivierung v. a. durch Oxidations- und Reduktionsreaktionen. Darüber hinaus werden auch Substanzen fälschlich als Prodrugs bezeichnet, die selbst aktiv sind, deren Wirkung aber hauptsächlich auf die Metaboliten zurückzuführen ist (limited prodrugs). Ein weiteres Konzept ist die kovalente Verknüpfung mehrere Arzneistoffe mit meist unterschiedlichen Wirkungsmechanismen zu einem Hybrid-Molekül (co-drug), das dann in die Ausgangssubstanzen metabolisiert wird.⁸⁹ Ein Beispiel hierfür ist Sultamicillin (Abb. 14), das sich aus dem Penicillin-Derivat Ampicillin und dem β -Lactamase-Inhibitor Sulbactam zusammensetzt.⁹⁰

Während früher häufig erst nach Markteinführung erkannt wurde, dass es sich um ein Prodrug handelt, werden Prodrugs heute gezielt entwickelt.⁹¹ Dabei werden v. a. Carbonsäureester, Carbonate, Carbamate, Amide oder Phosphate gebildet.⁸⁹ Für den Einsatz eines Prodrugs können verschiedene Gründe verantwortlich sein. In erster Linie sollen dadurch die pharmakokinetischen Eigenschaften verbessert werden, wenn pharmazeutisch-technologische Möglichkeiten ausgeschöpft sind. Einige Wirkstoffe sind schwer wasserlöslich, wogegen die Einführung eines Phosphatrestes helfen kann, wie z. B. beim Fosphenytoin, Fospropofol (Abb. 14) oder Prednisolonphosphat.⁸⁹ Andererseits kann die Bildung eines Esters die Penetrationsfähigkeit hydrophiler Arzneistoffe erhöhen, was zu einer wesentlich besseren Bioverfügbarkeit führt. Als Beispiele seien Bacampicillin, Dabigatranetexilat, Enalapril (Abb. 14) und Oseltamivir zu nennen.⁸⁹⁻⁹¹ Durch die Molekülveränderungen kann ein Depoteffekt erzielt werden, der v. a. durch eine Speicherung im tiefen Kompartiment zustande kommt. Durch Ester von Steroidhormonen, wie z. B. Testosteron, mit Fettsäuren (Abb. 14), die intramuskulär appliziert werden, kann das Dosierungsintervall verlängert und gleichmäßige Plasmaspiegel erreicht werden. Ein weiteres Ziel durch die Gabe eines Prodrugs ist eine targetorientierte Therapie.⁸⁹ Bei dem Prodrug handelt es sich lediglich um eine Transportform, die sich am Wirkort, z. B. einer Krebszelle, anreichert und dort in die Wirkform umgewandelt wird. Man erhofft sich dadurch eine erhöhte Ansprechrate und eine Dosisreduktion, so dass toxische Nebenwirkungen des Wirkstoffes gemindert werden. Ein Sonderfall stellt Levodopa (Abb. 14) dar, das mit Hilfe eines Aminosäuretransporters die Blut-Hirn-Schranke passieren kann und anschließend zu dem wirksamen Dopamin decarboxyliert wird.^{90,91} Weiterhin kann ein schlechter

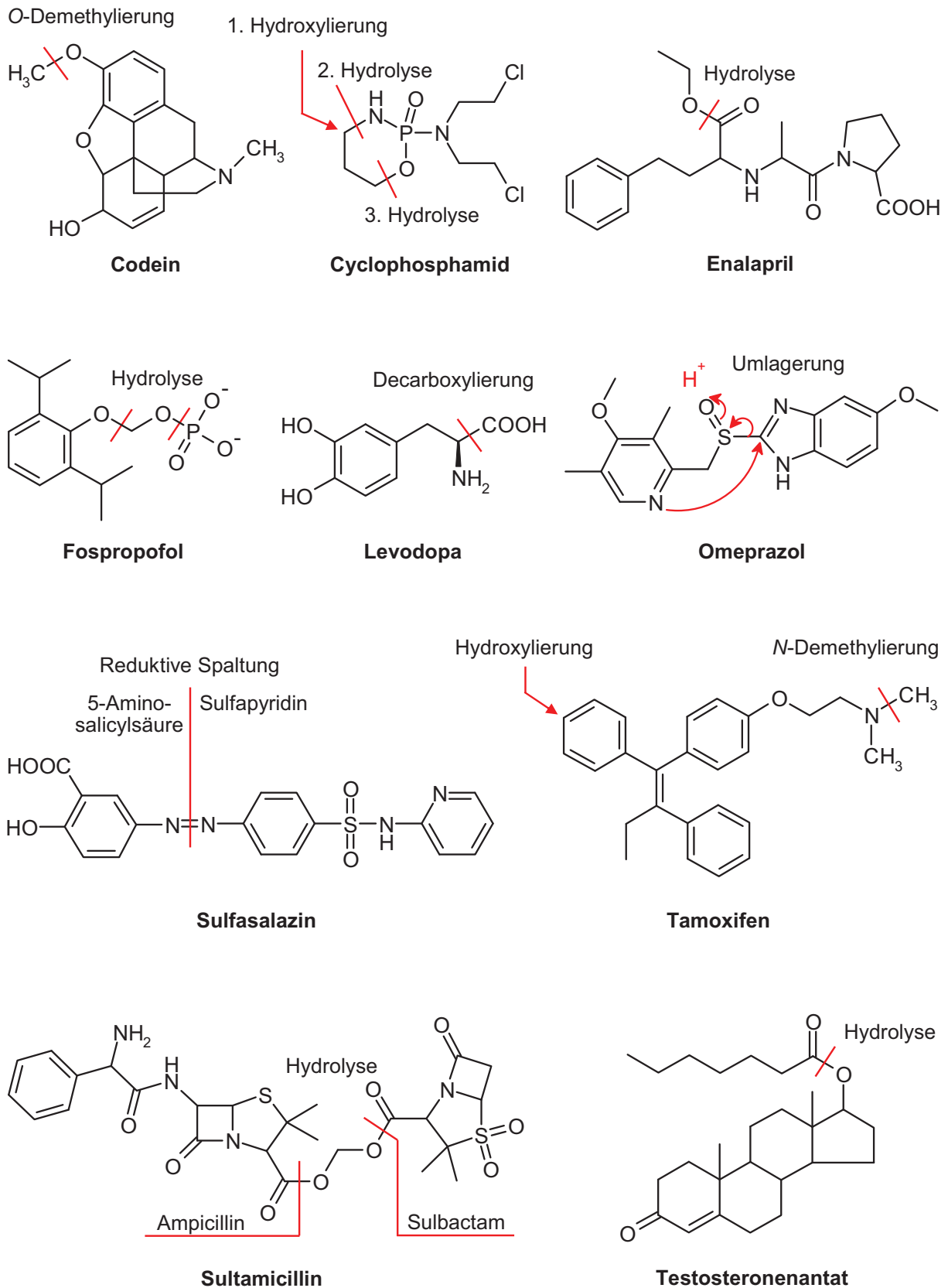


Abb. 14 Beispiele für Prodrugs, die im Körper in ihre Wirkform überführt werden.

Geschmack oder Geruch durch die Bildung eines Prodrugs beseitigt und dadurch die Compliance verbessert werden.

Bei der Bioaktivierung können viele verschiedene Enzyme zum Einsatz kommen.^{90,91} Neben den für den Fremdstoffmetabolismus verantwortlichen Enzymen, wie z. B. CYP-Enzymen oder Carboxylesterasen, können auch Enzyme des Primärstoffwechsels, wie z. B. Lipasen oder Phosphatasen an der Bioaktivierung beteiligt sein. Neben den körpereigenen Enzymen können die im Menschen vorkommenden Mikroorganismen für eine Bioaktivierung genutzt werden. Ein Beispiel hierfür ist das bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzte Sulfasalazin (Abb. 14).⁹⁰ Darüber hinaus kann die Bioaktivierung durch eine nichtenzymatische Reaktion erfolgen, wie z. B. beim Omeprazol (Abb. 14), das sich in Anwesenheit von Säure zu dem aktiven Sulfensäure-Derivat umlagert.^{90,91} Damit wirksame Plasmaspiegel erhalten werden, muss die Aktivierung von Prodrugs ausreichend schnell erfolgen. Mit der Verabreichung eines Prodrugs können allerdings auch Risiken verbunden sein. Aus einigen Prodrugs entstehen toxische Spaltprodukte. Beispielsweise wird bei der Bioaktivierung von Cyclophosphamid (Abb. 14) als Nebenprodukt Acrolein gebildet, das krankhafte Blasenveränderungen verursacht.⁹¹ Daneben sind Formaldehyd und Acetaldehyd zu nennen, die bei Desalkylierungen entstehen, wie z. B. bei der Bioaktivierung von Codein (Abb. 14) zu Morphin.^{90,91} Treten bei den Enzymen, die für die Bioaktivierung verantwortlich sind, Polymorphismen auf, besteht die Gefahr, dass es sich bei langsamen Metabolisierern um Non-Responder handelt. Polymorphismen werden in der Literatur für das Versagen der Therapie mit z. B. Clopidogrel (CYP2C19) und Tamoxifen (Abb. 14, CYP2D6) verantwortlich gemacht.⁹¹ Weiterhin können die an der Bioaktivierung beteiligten Enzyme durch gleichzeitig eingenommene Arzneistoffe oder Nahrungsmittel gehemmt werden und dadurch erniedrigte Plasmaspiegel des aktiven Metaboliten resultieren. Ein aktuelles Beispiel ist die in klinischen Studien beobachtete erhöhte Rehospitalisierungs- und Todesrate, wenn neben dem zur Prophylaxe eingesetzten Clopidogrel zusätzlich Omeprazol verabreicht wird.⁹² Aus diesem Grund wurde in einem Teil dieser Arbeit die Beeinflussung der Bioaktivierung von Clopidogrel durch Omeprazol anhand von In-vitro-Versuchen untersucht (s. II.1).

4 Biotoxifizierung

In einigen Fällen können bei der Biotransformation von Fremdstoffen Metaboliten entstehen, die wesentlich reaktiver sind als die Ausgangsverbindungen (Biotoxifizierung). In der Literatur findet man hierfür ebenfalls die Bezeichnung Bioaktivierung, die auch für die Biotransformation von Prodrugs verwendet wird. Solche reaktiven Metaboliten können kovalent an Zellbestandteile, wie z. B. Proteine oder DNA, binden und Funktionsstörungen verursachen. Als Folge können u. a. Allergien, Mutationen und Karzinome entstehen. Von den geschädigten Organen ist am häufigsten die Leber betroffen, da die Biotransformation überwiegend dort stattfindet. Eine von Arzneistoffen ausgelöste Lebertoxizität ist mit etwa 25 % eine häufige Ursache für die Marktrücknahme von Medikamenten, was einen erheblichen wirtschaftlichen Schaden für den pharmazeutischen Unternehmer darstellt.⁹³ Einige Beispiele aus den letzten Jahren sind Bromfenac, Sitaxentan, Troglitazon und Ximelagatran.^{93,94} Bei einer arzneimittelbedingten Lebertoxizität kann die intrinsische und die idiosynkratische Form unterschieden werden.⁹⁵ Die intrinsische Lebertoxizität ist vorhersagbar und dosisabhängig. Ein Beispiel hierfür ist Paracetamol, das für etwa 50 % aller Fälle von akutem Leberversagen verantwortlich ist.⁹⁶ Dem gegenüber sind nach einer längeren Latenzzeit auftretende idiosynkratische Nebenwirkungen nicht vorhersagbar und der vorliegende Mechanismus ist weitgehend unbekannt. Es muss eine große Anzahl von Patienten behandelt werden, bis Erkrankungsfälle auftreten. Häufig ist dies erst nach der Markteinführung eines Arzneimittels der Fall.

Reaktive Metaboliten

Bei vielen Arzneistoffen, die eine Lebertoxizität aufweisen, konnten reaktive Metaboliten detektiert werden, weshalb reaktive Metaboliten als Indikator für eine Lebertoxizität angesehen werden können.⁹³ Aus diesem Grund besteht ein großes Interesse forschender Pharmaunternehmen Wirkstoffe frühzeitig auf die Bildung reaktiver Metaboliten zu untersuchen. Neben Arzneistoffen, wie z. B. Carbamazepin, Clozapin, Estradiol, Diclofenac, Paracetamol, Sulfamethoxazol und Valproinsäure, können auch Phytopharmaka eine Lebertoxizität verursachen. Wichtige Beispiele hierfür sind Kava-Kava (*Piper methysticum*), Schöllkraut (*Chelidonium majus*), Echter Gamander (*Teucrium chamaedrys*), Traubensilberkerze (*Cimicifuga racemosa*) und

pyrrolizidinalkaloidhaltige Arzneipflanzen, wie z. B. Greiskraut (*Senecio spec.*), Beinwell (*Symphytum officinale*) oder Huflattich (*Tussilago farfara*).^{97,98} Es konnten bereits reaktive Metaboliten einiger dieser Pflanzen gefunden werden.^{99,100} Bei der Entstehung von reaktiven Metaboliten spielen v. a. die CYP-Enzyme eine bedeutende Rolle.¹⁰¹ Die beim Metabolismus entstehenden reaktiven Verbindungen sind z. B. Epoxide, Chinone, Chinonimine, Hydroxylamine und Aldehyde.^{102,103}

Detektion von reaktiven Metaboliten

Für eine Detektion von reaktiven Metaboliten gibt es verschiedene In-vitro-Ansätze.^{104,105} Problematisch ist, dass reaktive Metaboliten häufig sehr kurzlebig sind und daher nicht direkt detektiert werden können. Eine Möglichkeit ist die Inkubation des radioaktiv markierten Arzneistoffes mit humanen Lebermikrosomen oder Hepatozyten. Um die an Proteine gebundenen reaktiven Metaboliten zu detektieren, kann nach einer Proteinfällung die Radioaktivität des Proteinpellets bzw. die nach Extraktion verbleibende Radioaktivität gemessen werden.^{104,106} Einige reaktive Metaboliten binden direkt nach ihrer Entstehung an das aktive Zentrum des Enzyms und inaktivieren dieses irreversibel. Solch eine zeitabhängige, mechanismusbasierte Inhibition stellt eine weitere Möglichkeit der Detektion von reaktiven Metaboliten dar.¹⁰⁴ Am weitesten verbreitet ist allerdings der Einsatz von geeigneten Reagenzien, die mit den reaktiven Metaboliten stabile Addukte bilden.¹⁰⁶ Zum Abfangen der elektrophilen Metaboliten werden v. a. Thiole, Amine oder Cyanid-Ionen verwendet (Abb. 15). Die harten Nukleophile Semicarbazid und Cyanid reagieren hauptsächlich mit harten Elektrophilen, wie z. B. Aldehyden oder Iminium-Ionen. Ein häufig eingesetztes Reagenz zum Screening auf reaktive Metaboliten ist Glutathion, was ein weiches Nukleophil darstellt und mit einem Großteil der reaktiven Metaboliten reagiert. Die entstandenen Glutathion-Addukte werden anschließend durch LC/MS/MS-Analysen untersucht, bei der charakteristische Fragmente entstehen.¹⁰⁵ Näheres hierzu wird in Kapitel II.6.1.1 beschrieben. Probleme hierbei stellen v. a. die niedrige Massensensitivität der Glutathion-Addukte, falsch positive MS-Signale und das Fehlen des entsprechenden charakteristischen Fragmentes bei einigen Addukten dar. Um diese Nachteile zu beseitigen, werden in jüngster Zeit markierte GSH-Derivate verwendet oder die hochauflösende Massenspektrometrie eingesetzt.^{107,108} Darüber hinaus gestaltet sich eine

quantitative Bestimmung der reaktiven Metaboliten aufgrund fehlender Referenzsubstanzen schwierig.

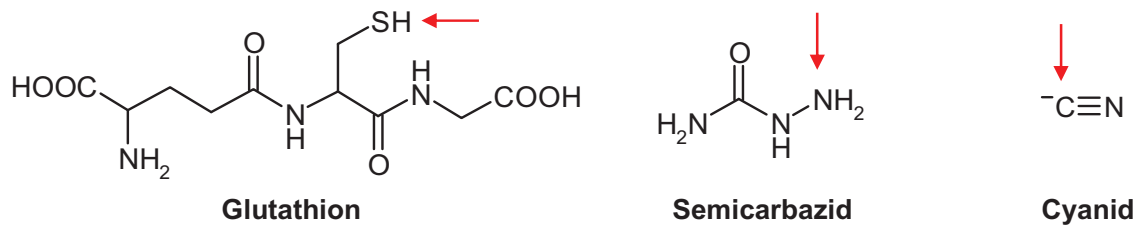


Abb. 15 Nukleophile Reagenzien zur In-vitro-Detektion von reaktiven Metaboliten.

5 In-vitro-Untersuchung der Biotransformation

Kenntnisse über den Metabolismus sind heutzutage für die Zulassung neuer Arzneimittel unerlässlich, genauso wie Untersuchungen zur Inhibition fremdstoffmetabolisierender Enzyme.² Bereits in frühen Entwicklungsstufen ist der Einsatz von In-vitro-Methoden aufgrund der besseren Handhabbarkeit, der geringeren Kosten und der ethischen Vertretbarkeit möglich.^{109,110} Hierfür werden aus Gewebe gewonnene Materialien verwendet, in denen die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme stark exprimiert werden. Im Vordergrund stehen dabei die Leber und der Dünndarm. Aus eigener Erfahrung sind in jedem Fall vom Menschen stammende Materialien den tierischen vorzuziehen, da sich bei z. B. Maus, Ratte und Hund aufgrund der unterschiedlichen Enzymausstattung abweichende Metabolitenmuster ergeben können.¹¹¹ Wichtige In-vitro-Testsysteme sind Leberschnitte, Hepatozyten, subzelluläre Fraktionen sowie gereinigte und rekombinante Enzyme.^{110,112} Bei Leberschnitten und Hepatozyten bleiben die Zellen erhalten, was mit der In-vivo-Situation vergleichbar ist. Problematisch sind die geringe Lebensdauer, die eingeschränkte Lagerfähigkeit und die niedrige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit diesen Modellen. Steht kein Labor für eine Kultivierung zur Verfügung, können subzelluläre Fraktionen verwendet werden.

Subzelluläre Fraktionen

Subzelluläre Fraktionen werden durch differentielle Ultrazentrifugation des homogenisierten Gewebes gewonnen (Abb. 16).¹¹³ Bei dieser Aufarbeitung, für die eine Kühlung auf etwa 1 °C erforderlich ist, behalten die Enzyme ihre Funktion.

Durch Zentrifugation mit 9000 x g werden größere Zellorganellen, wie z. B. die Zellkerne oder die Mitochondrien, abgetrennt (Abb. 16). Der Überstand wird als S9-Fraktion bezeichnet und enthält membranständige und lösliche Enzyme.¹¹⁰ Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 100000 x g kann die S9-Fraktion in die mikrosomale Fraktion und das Cytosol aufgetrennt werden (Abb. 16). Das Cytosol enthält die nicht abzentrifugierbaren, löslichen Enzyme. Wichtige Familien fremdstoffmetabolisierender Enzyme, die sich hauptsächlich in der cytosolischen Fraktion befinden, sind die Glutathion-S-Transferasen, die Sulfotransferasen und die *N*-Acetyltransferasen.¹¹⁰ Ein wichtiges Zellkompartiment für den Fremdstoffmetabolismus ist das endoplasmatische Retikulum, das die so genannten membranständigen Enzyme, wie z. B. die CYP-Enzyme, die Glucuronosyltransferasen und die Carboxylesterasen, enthält. Durch die Aufarbeitung wird das Membransystem teilweise zerrissen und bildet neue vesikuläre Strukturen, die sich nach Zentrifugation bei 100000 x g im Sediment befinden und als Mikrosomen bezeichnet werden.¹¹⁰ Handelt es sich bei dem ursprünglichen Material um Leberstücke des Menschen, werden diese dann humane Lebermikrosomen (HLM) und im Falle von Dünndarmgewebe humane intestinale Mikrosomen (HIM) genannt. Anschließend wird der Proteingehalt bestimmt und dieser durch Zugabe von Pufferlösung auf einen bestimmten Gehalt eingestellt. Hierdurch werden eine Vergleichbarkeit verschiedener Präparationen und eine Bezugsgröße für die Bestimmung von Umsetzungsgeschwindigkeiten erhalten. Für die CYP-Enzyme ist eine Bestimmung des Gesamtgehaltes durch photometrische Analyse nach Komplexbildung mit Kohlenmonoxid möglich.⁸ Die gewonnenen Fraktionen weisen bei -80 °C eine hohe Lagerstabilität von bis zu mehreren Jahren auf.¹¹⁴ Solche Präparationen können heute recht kostengünstig und in einer gleichbleibenden Qualität kommerziell erworben werden. Da z. B. das Geschlecht, die ethnische Herkunft oder auftretende Polymorphismen der Enzyme einen Einfluss auf den Metabolismus besitzen, empfiehlt es sich, gepoolte Präparationen zu verwenden.¹¹⁰ Andererseits kann mit Mikrosomen einzelner Spender der Metabolismus verschiedener Phänotypen gezielt untersucht werden. Für eine In-vitro-Metabolismusuntersuchung wird dann eine definierte Menge dieser Fraktion in einer Pufferlösung nach Zugabe des entsprechenden Fremdstoffes und der erforderlichen Cofaktoren, wie z. B. NADPH, inkubiert. Neben der Untersuchung des Metabolitenmusters ermöglicht der Einsatz von subzellulären Fraktionen eine exakte

Bestimmung kinetischer Parameter für die Umsetzung und die Ermittlung der inhibitorischen Aktivität von Testsubstanzen auf die Enzyme. Es können vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Für Inhibitionsassays werden spezifische Markersubstrate eingesetzt, die nur von bestimmten Enzymen umgesetzt werden. Die Beteiligung einzelner Enzyme am Metabolismus kann durch den Einsatz selektiver Inhibitoren oder spezifischer Antikörper ermittelt werden.¹⁰⁹ Mit diesen Fraktionen ist auch eine Gewinnung der Metaboliten als Referenzsubstanzen möglich (Bioreaktor). Hierfür sollte allerdings zur Steigerung der Ausbeute Material von Ratten oder Mäusen verwendet werden, die zuvor mit Enzyminduktoren, wie z. B. Phenobarbital oder Rifampicin, behandelt worden sind.

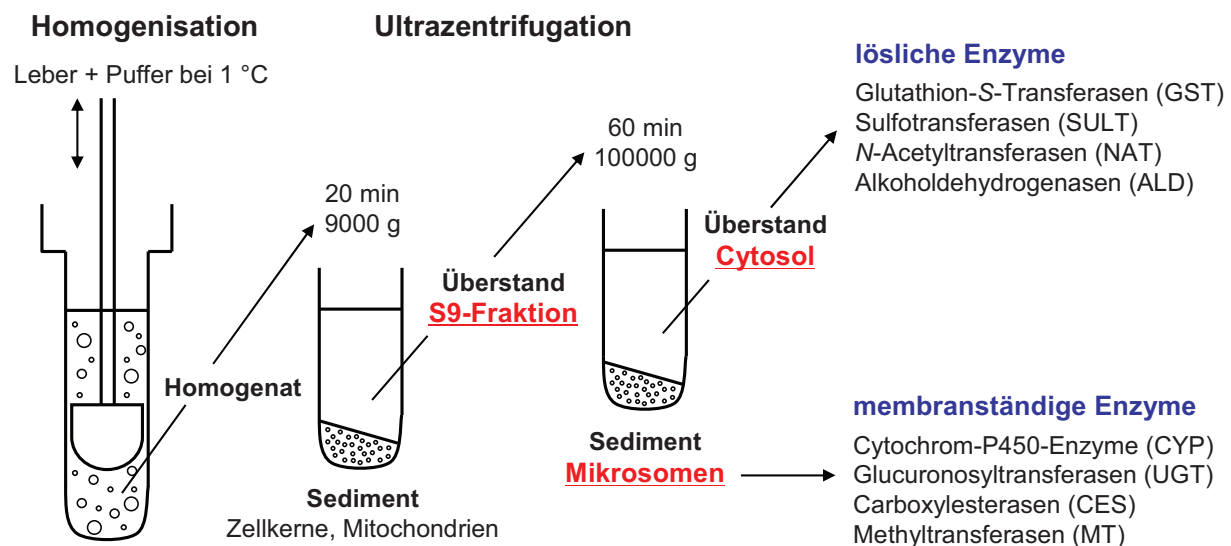


Abb. 16 Präparation subzellulärer Fraktionen und darin hauptsächlich vorkommende fremdstoff-metabolisierende Enzyme (modifiziert nach ¹¹⁵).

Rekombinante Enzyme

Einzelne gentechnisch gewonnene Enzyme stellen eine weitere Möglichkeit für In-vitro-Metabolismusuntersuchungen dar. Hierfür wird die cDNA des entsprechenden Enzyms in einen Vektor eingebracht (z. B. Baculovirus, Plasmid) und in Wirtszellen transfiziert (z. B. Insektenzellen, Hefezellen oder *E. coli*).¹¹⁶ Durch das zusätzliche Einschleusen von z. B. eines Antibiotikaresistenzgens können transfizierte Zellen selektiert werden. Bei CYP-Enzymen wird häufig eine Co-Expression mit der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase vorgenommen. Anschließend werden aus den Zellkulturen die Subzellfraktionen hergestellt. Durch den Einsatz von rekombinanten

Enzymen können die am Metabolismus beteiligten Enzyme leicht herausgefunden werden. Hierfür können die Umsetzungsgeschwindigkeiten einzelner Enzyme gegenübergestellt werden. Ein Problem ist allerdings die eingeschränkte In-vivo-Übertragbarkeit. Zu beachten ist, dass die einzelnen CYP-Enzyme in der Leber in stark unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen (s. I.2.1). Die gemessenen Umsetzungsgeschwindigkeiten müssen daher nicht die tatsächlichen Anteile, die diese Enzyme am Metabolismus besitzen, widerspiegeln. Ein Vorteil rekombinanter Enzyme ist allerdings, dass bei Inhibitionsuntersuchungen die Isoenzymselektivität der Substrate keine Rolle spielt.

Analysestrategie der inkubierten Proben

Nach der Inkubation des Arzneistoffes mit den Enzymen erfolgt die Analyse der Probe (Abb. 17). Häufig ist eine Probenvorbereitung erforderlich, bei der v. a. die Flüssig-Flüssig- oder die Festphasen-Extraktion zum Einsatz kommen.¹¹⁷ Die Festphasen-Extraktion ist auch automatisch durchführbar, was eine reproduzierbarere Wiederfindung und eine schnellere Durchführung ermöglicht.¹¹⁸ Die Auswahl der Säulenmaterialien, der Lösungsmittel sowie der Extraktionsbedingungen, wie z. B. der pH-Wert, orientiert sich an den chemischen Eigenschaften der Metaboliten und sollte zuvor mit Standardsubstanzen optimiert werden. Die Probenvorbereitung dient der Entfernung von Matrixbestandteilen und in einigen Fällen der Aufkonzentrierung der Analyten. Bei Verwendung von subzellulären Fraktionen oder rekombinanten Enzymen ist häufig aufgrund der weniger komplexen Matrix eine Proteinfällung ausreichend.¹¹⁷ Hierfür können organische Lösungsmittel zugegeben werden oder eine pH-Verschiebung durch den Zusatz von z. B. Trifluoressigsäure oder Tris-Base erzielt werden. Dies ermöglicht einen wesentlich höheren Probendurchsatz als bei Anwendung anderer Methoden. Darüber hinaus können in diesen Proben Phase-II-Metaboliten, die aufgrund ihrer hohen Polarität schlecht extrahierbar sind, direkt analysiert werden. Eine vorherige chemische oder enzymatische Hydrolyse muss nicht durchgeführt werden. Anschließend erfolgt eine chromatographische Trennung. Hierbei kommen v. a. die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und seltener die Gaschromatographie zum Einsatz.¹¹⁹ Eine Trennung kann selbst bei einer massenspektrometrischen Detektion erforderlich sein, da bei den Metaboliten Isomere mit denselben Molekülmassen auftreten können. Aufgrund der oft geringen

Metabolitenkonzentration sind empfindliche Detektionsmethoden erforderlich. In dieser Arbeit wurden die UV-, die Fluoreszenz- und die massenselektive Detektion mit Hilfe eines Triple-Quadrupol-Detektors nach Elektrosprayionisation angewendet. Stehen Referenzsubstanzen der Metaboliten zur Verfügung, ist eine eindeutige qualitative und quantitative Bestimmung möglich. Für eine Strukturaufklärung unbekannter Metaboliten können die hochauflösende Tandem-Massenspektrometrie und die NMR-Spektroskopie, für die allerdings eine wesentlich größere Substanzmenge erforderlich ist, eingesetzt werden. Ein weiteres Mittel zur Erleichterung der Detektion der Metaboliten sind radioaktive oder stabile Isotope.¹⁰⁷ Zur Funktionsweise der analytischen Geräte sei an dieser Stelle auf entsprechende Lehrbücher der analytischen Chemie verwiesen.

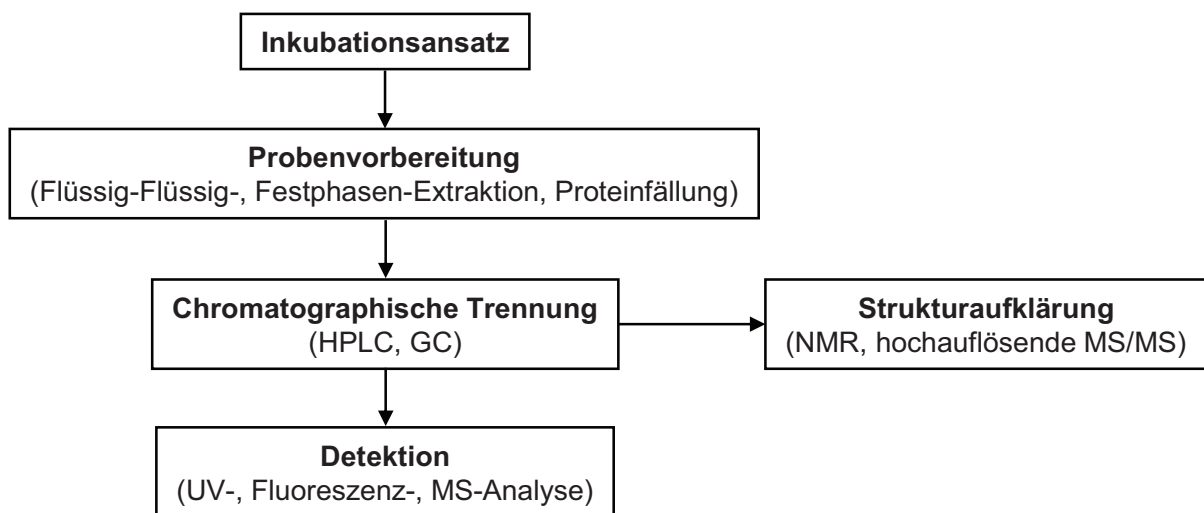


Abb. 17 Analyse des In-vitro-Inkubationsansatzes zur Untersuchung des Metabolismus.

6 Enzymkinetik und Beeinflussung enzymatischer Reaktionen

6.1 Enzym-Substrat-Reaktion

Enzyme katalysieren chemische Reaktionen in Organismen durch die Erniedrigung der Aktivierungsenergie und werden daher auch als Biokatalysatoren bezeichnet. Die Enzymkinetik beschäftigt sich mit der Zeit- und der Konzentrationsabhängigkeit dieser Umsetzungen. Durch die reversible Bindung des Substrates an das aktive Zentrum des Enzyms wird zunächst ein Enzym-Substrat-Komplex (ES) gebildet, der anschließend irreversibel in das Enzym und das Produkt zerfällt.

Klassische Sättigungskinetik

Der noch bei niedrigen Substratkonzentrationen annähernd lineare Anstieg der Umsetzungsgeschwindigkeit wird bei hohen Substratkonzentrationen immer kleiner und die Umsetzungsgeschwindigkeit nähert sich einem Maximalwert (V_{\max}) an. In diesem Fall sind alle Enzymmoleküle mit Substrat gesättigt. Trägt man die Umsetzungsgeschwindigkeit gegenüber der Substratkonzentration auf, ergibt sich in der Regel ein hyperboler Kurvenverlauf (Abb. 18). Dieser Kurvenverlauf wird durch die Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben (Gl. 1).¹²⁰ Die darin enthaltene Konstante (K_m) wird als Michaelis-Menten-Konstante bezeichnet. Der K_m -Wert gibt die Substratkonzentration an, bei der die halbmaximale Umsetzungsgeschwindigkeit erreicht wird. Liegt ein niedriger K_m -Wert vor, besitzt das Substrat eine hohe Affinität zu dem Enzym. Er ist daher eine charakteristische Größe jeder Enzym-Substrat-Reaktion. Die Umsetzungsgeschwindigkeit V ergibt sich aus der entstandenen Metabolitenmenge pro Zeiteinheit. Für eine bessere Vergleichbarkeit wird diese häufig auf die eingesetzte Enzymmenge oder die Proteinkonzentration bezogen. Für In-vitro-Untersuchungen zum Metabolismus und zur Inhibition fremdstoff-metabolisierender Enzyme sind Kenntnisse über die Affinität der Substrate zu den Enzymen wichtig. Verwendet man eine zu niedrige Konzentration der Substrate,

$$V = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{Gl. 1})$$

$$V = \frac{V_{\max} \times [S]^{n_H}}{K_m^{n_H} + [S]^{n_H}} \quad (\text{Gl. 2})$$

$$V = \frac{V_{\max 1} \times [S]}{K_{m1} + [S]} + \frac{V_{\max 2} \times [S]}{K_{m2} + [S]} \quad (\text{Gl. 3})$$

$$V = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[S]} + \frac{[S]}{K_i}} \quad (\text{Gl. 4})$$

V = Umsetzungsgeschwindigkeit

V_{\max} = maximale Umsetzungsgeschwindigkeit

$[S]$ = Substratkonzentration

K_m = Michaelis-Menten-Konstante

n_H = Hill-Koeffizient

K_i = Inhibitionskonstante

findet kaum eine Umsetzung statt. Zudem können mehrere anwesende Substrate sich gegenseitig beeinflussen. Dabei wird die Umsetzung von Substraten mit geringer Affinität durch Substrate mit hoher Affinität gehemmt. Darüber hinaus hängt die in Anwesenheit eines Inhibitors gemessene Umsetzungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration ab (s. I.6.3.5).

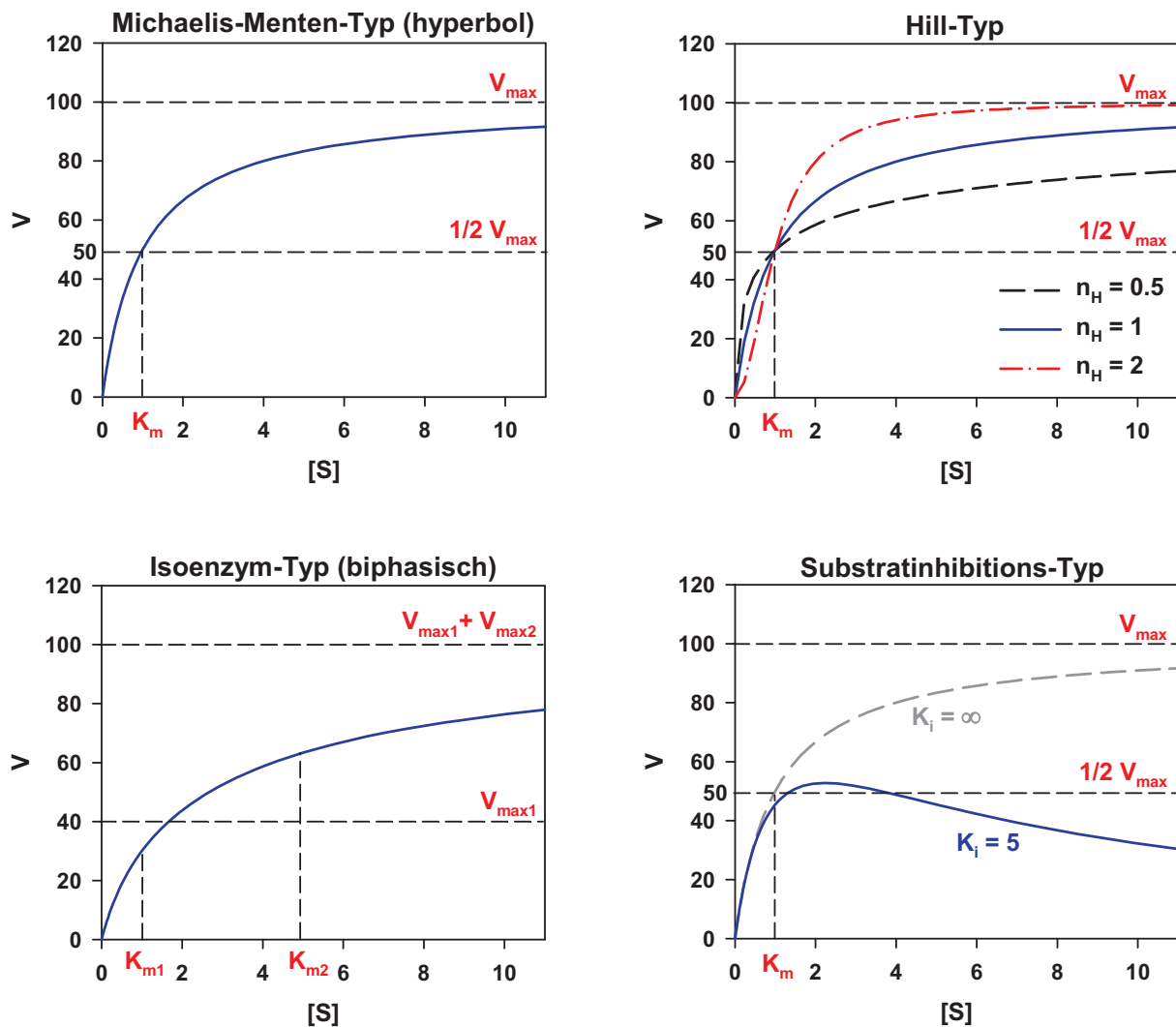


Abb. 18 Verschiedene Verlaufsformen von Substratsättigungskurven und ihre Parameter Umsetzungsgeschwindigkeit (V), maximale Umsetzungsgeschwindigkeit (V_{max}) und Michaelis-Menten-Konstante (K_m).

Atypische Sättigungskinetik

Neben einer hyperbolen Verlaufsform der Substratsättigungskurve können eine Reihe abweichender Kurvenverläufe auftreten, was u. a. bei CYP-Enzymen beobachtet werden konnte.^{121,122,123} Man spricht in diesen Fällen von einer

atypischen oder nicht-Michaelis-Menten-Kinetik. Eine Ursache hierfür ist, dass Enzyme häufig mehrere katalytische Zentren besitzen. Die nach der Bindung eines Substratmoleküls auftretende Konformationsänderung kann zu einer Affinitätssteigerung oder einer Affinitätsminderung benachbarter katalytischer Untereinheiten führen, was als Kooperativität bezeichnet wird. Zur Beschreibung solcher Sättigungskurven wurde der Exponent n_H (Hill-Koeffizient) in die Michaelis-Menten-Gleichung eingeführt (Gl. 2).^{122,124} Er ist ein Maß für die Steilheit der Kurve. Während der Hill-Koeffizient bei Vorliegen einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik 1 beträgt, ergeben sich bei Werten größer 1 sigmoidale Substratsättigungskurven (Abb. 18). In diesem Fall wird durch die Bindung eines Substratmoleküls die Bindung eines weiteren Moleküls erleichtert (positive Kooperativität). Im Gegensatz dazu ist bei $n_H < 1$ die Bindung eines weiteren Substratmoleküls erschwert (negative Kooperativität). Handelt es sich um ein Enzym mit zwei Substratbindungsstellen, die voneinander unabhängig sind und zu denen das Substrat eine unterschiedliche Affinität besitzt, wird eine biphasische Substratsättigungskurve erhalten (Gl. 3). Solch eine Kurve besitzt zwei K_m -Werte und strebt bei hohen Substratkonzentrationen nach der Summe der beiden maximalen Umsetzungsgeschwindigkeiten (Abb. 18). Ebenfalls kann diese Form beim Einsatz von Enzymgemischen auftreten. Dies ist z. B. bei humanen Lebermikrosomen, die alle in der Leber vorkommenden CYP-Enzyme enthalten, denkbar. Aus diesem Grund wird dieser Kurvenverlauf auch als Isoenzym-Typ bezeichnet.^{122,123} Weiterhin kann der erste Teil der Substratsättigungskurve einer klassischen Michaelis-Menten-Kurve gleichen. Bei höheren Substratkonzentrationen nimmt die Umsetzungsgeschwindigkeit allerdings wieder ab (Abb. 18). Hier liegt eine Hemmung der Umsetzung durch das Substrat vor, man spricht daher von einem Substratinhibitions-Typ (Gl. 4).^{122,123} Die berechnete maximale Umsetzungsgeschwindigkeit ist in diesem Fall nur eine fiktive Größe. Die Substratinhibition ist ein Sonderfall der unkompetitiven Inhibition, da ein weiteres, als Inhibitor fungierendes, Substratmolekül an den Enzym-Substrat-Komplex bindet.

Ermittlung von K_m und V_{max}

Für eine Substratsättigungskurve muss die Umsetzungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen mit derselben Enzymmenge ermittelt werden. Dabei sollte jeweils die Anfangsgeschwindigkeit bestimmt werden.

Anderenfalls muss überprüft werden, ob während der gesamten Reaktionszeit eine gleichbleibende Umsetzungsgeschwindigkeit vorliegt.^{122,123}

Um aus den Datenpunkten den K_m - und V_{max} -Wert zu erhalten, wurden in der Vergangenheit eine Reihe von Linearisierungsverfahren entwickelt (Abb. 19) und durch Umformungen der Michaelis-Menten-Gleichung verschiedene Geradengleichungen erhalten.¹²⁵ Somit sind diese Auswertungsmethoden nur bei Vorliegen einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik anwendbar, da sich bei den anderen Kurventypen in diesen Darstellungen keine Geraden ergeben. Nach Durchführung einer linearen Regression können K_m und V_{max} aus den Schnittpunkten der Gerade mit den Koordinatenachsen bzw. aus deren Steigung erhalten werden. Aufgrund der modifizierten Koordinatenachsen können diese Werte allerdings stark fehlerbehaftet sein.¹²⁵ Die am weitesten verbreitete Darstellung ist die doppelt reziproke Auftragung ($1/V-1/[S]$ -Diagramm) nach Lineweaver-Burk.¹²⁶ Weiterhin finden die Darstellungen nach Eadie-Hofstee ($V-V/[S]$ -Diagramm)^{127,128}, nach Scatchard ($V/[S]-V$ -Diagramm)¹²⁹ und nach Hanes-Woolf ($[S]/V-V$ -Diagramm)¹³⁰ Verwendung. Für die durch Umformung der Hill-Gleichung stammende doppeltlogarithmische Darstellung ($\log V_{max}/(V_{max}-V)-\log [S]$ -Diagramm) ist allerdings die Kenntnis der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit erforderlich. Im Gegensatz zu den anderen Verfahren können hierdurch neben der hyperbolen Verlaufsform auch Sättigungskurven kooperativer Substrate linearisiert werden. Die Steigung der erhaltenen Geraden (Hill-Koeffizient, n_H) nimmt bei Vorliegen einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik den Wert 1 an. Die entsprechenden Geradengleichungen, die Kurvenverläufe und die charakteristischen Punkte der einzelnen Linearisierungsverfahren können Abb. 19 entnommen werden.

Heutzutage erfolgt die Ermittlung von K_m und V_{max} hauptsächlich durch nichtlineare Regression mit Hilfe von geeigneten Computerprogrammen, wie z. B. dem Enzymkinetikmodul der Software SigmaPlot (Systat Software, Chicago, USA). Solche Programme führen mit den Messdaten Regressionsanalysen unter Verwendung der Gleichungen für die einzelnen Kurventypen durch. Der vorliegende Typ der Sättigungskurve kann anschließend anhand verschiedener Scoring-Parameter, wie z. B. dem Bestimmtheitsmaß (R^2), ermittelt werden. Zutreffend ist der K_m - und V_{max} -Wert des Modells mit dem höchsten R^2 -Wert, da hier die gemessenen Datenpunkte am nächsten an der berechneten Substratsättigungskurve liegen.

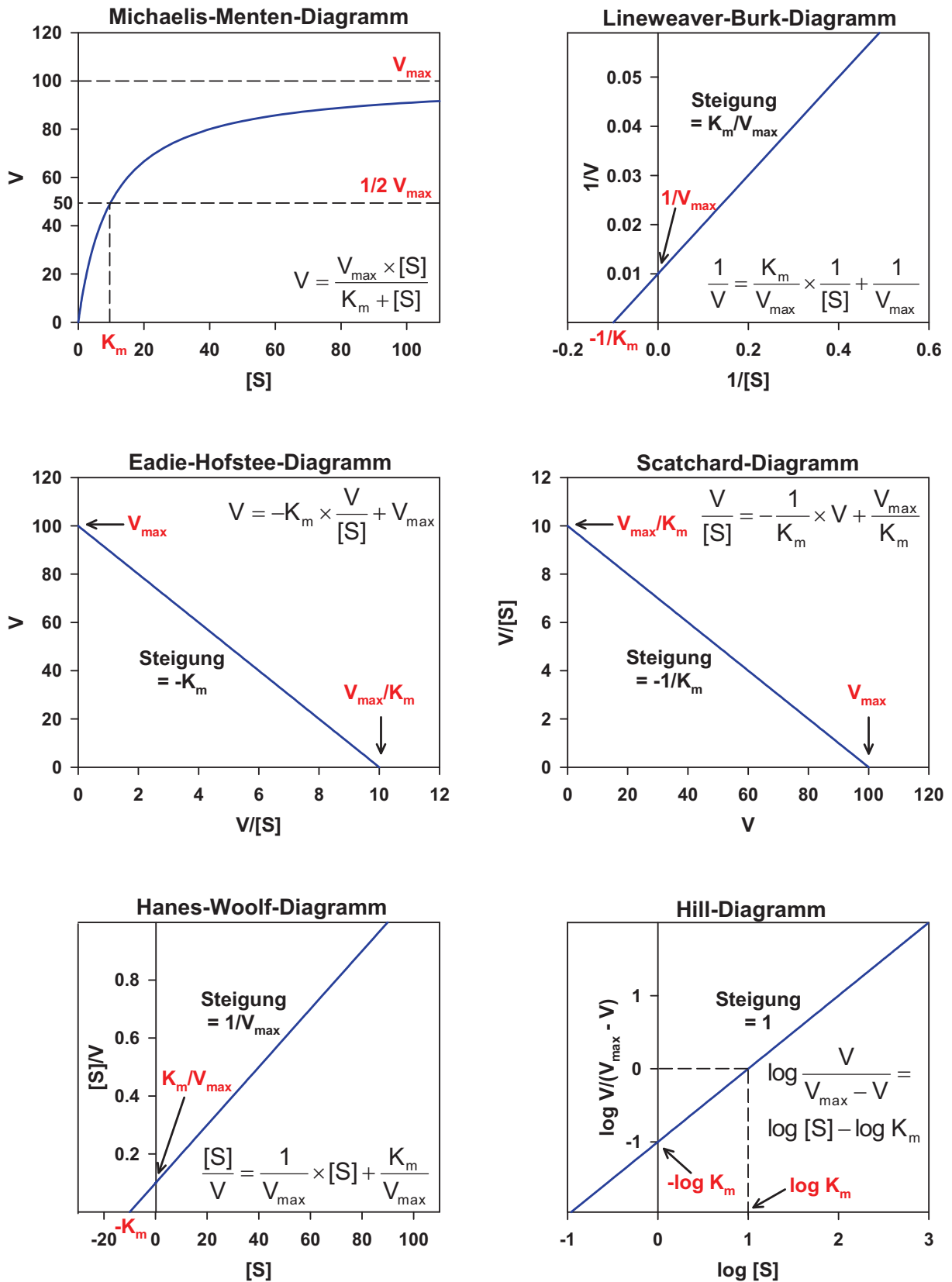


Abb. 19 Verläufe einer hyperbolen Substratsättigungskurve in den Darstellungen nach Michaelis-Menten, Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Scatchard, Hanes-Woolf und Hill mit einem K_m -Wert von 10 und einer maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit (V_{\max}) von 100.

6.2 Enzyminduktion

Unter Enzyminduktion versteht man eine durch Fremdstoffe verursachte vermehrte Expression der Enzyme, die zu einer beschleunigten Biotransformation führt. Dabei kann ein Fremdstoff seinen eigenen Metabolismus ankurbeln (Autoinduktion), wie z. B. Carbamazepin.¹³¹ Wird die Induktion des Metabolismus einer Substanz durch einen zweiten Stoff verursacht, spricht man von einer Fremd- bzw. Heteroinduktion. Ein relevantes Beispiel hierfür ist die Beschleunigung der Hydroxylierung des als Kontrazeptivum eingesetzten Ethinylestradiols durch hyperforinhaltige Johanniskraut-extrakte, was zu Durchbruchblutungen und ungewollten Schwangerschaften führen kann.¹³² Von der Einnahme des Induktors bis zum Anstieg der metabolischen Aktivität können einige Tage vergehen. Nach einer erfolgten Enzyminduktion kann häufig eine Hypertrophie des Lebergewebes und des ER beobachtet werden.¹³³

Induktionsmechanismen

Es können verschiedene Induktionsmechanismen unterschieden werden, die nach prominenten Vertretern benannt wurden. Am bedeutendsten ist die Induktion vom Phenobarbital- und vom 3-Methylcholanthren-Typ. Eine Enzyminduktion wird durch verschiedene nukleäre Rezeptoren vermittelt. In der Regel bindet der in die Zelle aufgenommene Fremdstoff an den sich im Cytoplasma befindlichen und mit einem Hitzeschockprotein assoziierten Rezeptor. Nach der Abdissoziation des Hitzeschockproteins bildet der Induktor-Rezeptor-Komplex mit einem weiteren Protein ein Heterodimer. Dieses Heterodimer gelangt anschließend in den Zellkern und bindet an die Promotorregion der DNA. Die Folge ist eine vermehrte Expression des für das entsprechende Enzym codierenden Gens. Während die Induktion vom 3-Methylcholanthren-Typ über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) vermittelt wird, erfolgt eine Induktion vom Phenobarbital-Typ hauptsächlich über den konstitutiven Androstan- (CAR) und den Pregnan-X-Rezeptor (PXR). Die induzierten Enzyme können verschiedenen Klassen, wie z. B. CYP-Enzymen, Glucuronosyltransferasen oder Glutathion-S-Transferasen, angehören. Die Induktion durch einen Fremdstoff betrifft meist nur ausgewählte Isoenzyme. Beispielsweise wird durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, die u. a. in gegrilltem Fleisch enthalten sind, überwiegend die Expression von Enzymen der Unterfamilie CYP1A gesteigert. Demgegenüber werden durch Antiepileptika vorzugsweise Enzyme der Unterfamilie CYP2B, CYP2C und CYP3A induziert.^{9,133}

6.3 Enzyminhibition

Bindet ein Ligand spezifisch an eine definierte Stelle eines Enzyms und wird dadurch die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion herabgesetzt, spricht man von Enzymhemmung oder Enzyminhibition. Die Hemmung von Enzymen stellt ein wichtiges Target für die Entwicklung neuer Wirkstoffe dar. Zum anderen kann die Hemmung von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen zu einer Verlangsamung des Abbaus von Arzneistoffen führen, was die Bioverfügbarkeit erhöht und die Elimination aus dem Organismus verzögert. Durch die Hemmung der abbauenden Enzyme werden besonders bei Arzneistoffen mit einer geringen therapeutischen Breite, wie z. B. Theophyllin oder Phenprocoumon, schnell toxische Plasmaspiegel erreicht und schwerwiegende Nebenwirkungen beobachtet. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass zwei oder mehrere gleichzeitig eingenommene Arzneistoffe ihren Metabolismus gegenseitig beeinflussen, in dem sie durch dasselbe Enzym verstoffwechselt werden oder ein Arzneistoff das abbauende Enzym eines anderen Arzneistoffes hemmt. Dies kann allerdings auch in der Arzneimitteltherapie genutzt werden. Ein Beispiel hierfür ist die Kombination von HIV-Proteaseinhibitoren mit Ritonavir (Boosterung), das CYP3A4 sowie P-Glykoprotein hemmt und so die Bioverfügbarkeit der HIV-Proteaseinhibitoren erhöht. Dadurch kann die Dosis erniedrigt werden und es ist nur noch eine einmal tägliche Einnahme erforderlich. Aufgrund solcher pharmakokinetischer Interaktionsmöglichkeiten werden Daten zur Inhibition fremdstoffmetabolisierender Enzyme, insbesondere von CYP-Enzymen, für die Zulassung von neuen Arzneimitteln durch die verantwortlichen Behörden gefordert.²

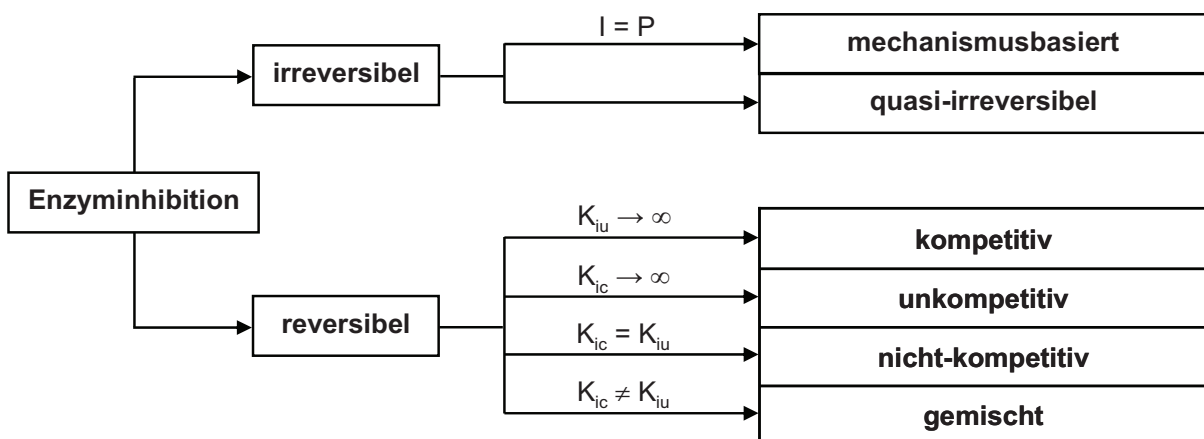


Abb. 20 Mögliche Formen der Enzyminhibition (Auswahl).

Enzyminhibitoren können an das aktive Zentrum (orthosterisch) oder an eine andere Stelle des Enzyms (allosterisch) binden. Das Ausmaß der Hemmung hängt von der Affinität des Inhibitors zur Bindungsstelle (K_i -Wert) und von der Inhibitorkonzentration ab. Aufgrund der Art der Bindung können verschiedene Formen der Enzyminhibition unterschieden werden (Abb. 20).¹²⁵ Als **irreversibel** wird die Hemmung bezeichnet, wenn der Inhibitor nicht mehr vom Enzym abgelöst oder verdrängt werden kann. Die Hemmung hält an, bis die Enzyme neu synthetisiert werden. Aus diesem Grund besitzen solche Inhibitoren eine größere klinische Relevanz. Ein Sonderfall der irreversiblen Inhibition stellt die **mechanismusbasierte** Inhibition (MBI) dar. Durch das Enzym wird zunächst der Inhibitor zu einem reaktiven Metaboliten umgesetzt, der anschließend kovalent an das aktive Zentrum bindet (Suizidsubstrat). Mechanismusbasierte Inhibitoren von CYP-Enzymen sind z. B. die im Grapefruitsaft enthaltenen Furanocumarine, wie Bergamottin⁵³, oder Verbindungen mit endständigen Dreifachbindungen, wie z. B. Ethinylestradiol.¹³⁴ In der letzten Zeit konnte von vielen Arzneistoffen eine mechanismusbasierte CYP-Inhibition nachgewiesen werden.^{54,135} Für eine Unterscheidung zwischen reversibler und irreversibler Inhibition gibt es verschiedene Methoden.¹³⁵ Lässt sich nach Abtrennung des Inhibitors, z. B. durch Dialyse oder Ultrafiltration, die ursprüngliche Enzymaktivität wiederherstellen, liegt eine reversible Inhibition vor. Eine weitere Möglichkeit ist die Bestimmung der Zeitabhängigkeit der inhibitorischen Aktivität. Handelt es sich um einen reversiblen Inhibitor, kann eine sofortige Absenkung der Enzymaktivität beobachtet werden, die sich zeitlich nicht verändert. Im Gegensatz dazu erfolgt bei Vorliegen einer irreversiblen Inhibition eine exponentielle zeitliche Abnahme der Enzymaktivität. Bei CYP-Enzymen wird hierfür im In-vitro-Versuch eine Vorinkubation von Enzym und Inhibitor in An- und Abwesenheit des Cosubstrates NADPH durchgeführt. Ist nach Substratzugabe die Enzymaktivität der Proben niedriger, die bei der Vorinkubation NADPH enthielten, liegt eine mechanismusbasierte Inhibition vor. In diesen Fällen erfolgt eine Verschiebung der Inhibitionskurve nach links (IC_{50} -Shift-Experiment).¹³⁵ Häufig werden mechanismusbasierte Inhibitoren durch die maximale Inaktivierungsgeschwindigkeit (k_{inact}) und die Inhibitorkonzentration für eine halbmaximale Inaktivierungsgeschwindigkeit (K_i) charakterisiert.^{135,136} Darüber hinaus gibt es Liganden, die eine extrem starke nicht-kovalente Bindung mit dem aktiven Zentrum des Enzyms eingehen. Diese können praktisch nicht wieder vom Enzym abdiffundieren und werden daher als **quasi-irreversible** Inhibitoren

bezeichnet. Beispiele hierfür sind die Azolantimykotika, deren Imidazolrest als sechster Ligand des Eisen-Zentralatoms im aktiven Zentrum der CYP-Enzyme fungiert.⁵²

Reversible Inhibitoren erschweren die Bindung des Substrates und können wieder vom Enzym abdiffundieren oder verdrängt werden. Die reversible Inhibition kann in die kompetitive, die unkompetitive, die nicht-kompetitive und die gemischte Hemmung unterteilt werden (Abb. 20). Die **kompetitive** Inhibition ist dadurch charakterisiert, dass der Hemmstoff mit dem Substrat um dieselbe Bindungsstelle im aktiven Zentrum konkurriert. Die Dissoziationskonstante für die Bindung eines kompetitiven Inhibitors wird als kompetitive Hemmkonstante (K_{ic}) bezeichnet (Abb. 21). Kompetitive Inhibitoren weisen häufig eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Substrat auf, müssen allerdings vom Enzym nicht umgesetzt werden. Bei der Anwesenheit von zwei Substraten eines Enzyms liegt ebenfalls eine kompetitive Inhibition vor. Beispielsweise ist bei der gleichzeitigen Einnahme von Diazepam und Omeprazol die Plasmahalbwertszeit von Diazepam verlängert, da beide Arzneistoffe durch CYP2C19 abgebaut werden.¹³⁷ Bei der **unkompetitiven** Inhibition erfolgt die Bindung des Hemmstoffes nur an den Enzym-Substrat-Komplex, da die Bindungsstelle des Inhibitors erst nach der Bindung eines Substratmoleküls entsteht. Die Bindung des Inhibitors an den Enzym-Substrat-Komplex wird durch die unkompetitive Hemmkonstante (K_{iu}) charakterisiert (Abb. 21). Ein **nicht-kompetitiver** Inhibitor bindet außerhalb des aktiven Zentrums (allosterisch). Die Substratumsetzung wird durch die dabei ausgelöste Konformationsänderung gehemmt (Abb. 21). Erfolgt die Bindung des Substrates und des Inhibitors unabhängig voneinander ($K_{ic} = K_{iu}$), wird von einer reinen nicht-kompetitiven Inhibition gesprochen. Im anderen Fall ($K_{ic} \neq K_{iu}$) liegt eine **gemischte** Inhibition vor.¹²⁵

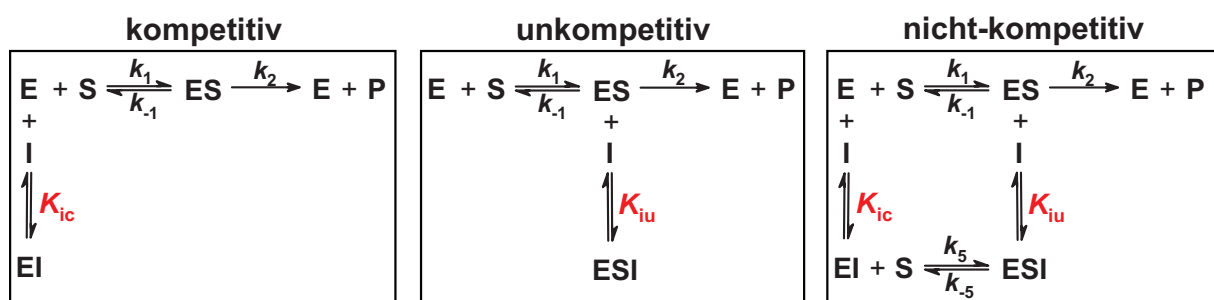


Abb. 21 Reaktionsgleichungen verschiedener reversibler Inhibitionsmechanismen.

6.3.1 Enzymrestaktivität

Eine einfache und schnelle Feststellung eines inhibierenden Effektes durch eine Testsubstanz ist die Ermittlung der Restaktivität in einem Enzymassay (Abb. 22). Hierbei müssen Ansätze mit Inhibitor (Probe) und ohne Inhibitor (Kontrolle) in einem Versuch gemacht werden. Dabei ist zu beachten, dass bis auf den Inhibitor die Ansätze dieselbe Zusammensetzung besitzen und gleich behandelt werden. Im Anschluss an die Inkubation wird die entstandene Metabolitenkonzentration mit einem geeigneten analytischen Verfahren bestimmt. Da die Kontrollprobe unter diesen Bedingungen die maximal mögliche Metabolitenkonzentration enthält, wird für diese eine Aktivität von 100 % angenommen. Bei den Proben mit Inhibitor wird der Metabolitenanteil bezogen auf die Kontrolle in Prozent berechnet, was als Restaktivität bezeichnet wird. Bei Assays, in denen eine kontinuierliche Bestimmung der Metabolitenkonzentration erfolgt, können die Kurvenanstiege im Konzentrations-Zeit-Diagramm zur Bestimmung der Restaktivität verwendet werden. Die gemessene Restaktivität hängt allerdings von den Versuchsbedingungen ab. In erster Linie spielt dabei die Konzentration der Testsubstanz und des Testsubstrates eine Rolle. Darüber hinaus sollte die Umsetzungsgeschwindigkeit während der Inkubationszeit konstant sein.^{122,123} Die Bestimmung der Restaktivität ist ein geeignetes Verfahren zum Screening von Substanzen. Unter gleichbleibenden Assaybedingungen können erste Hinweise auf die Stärke der inhibitorischen Aktivität gewonnen und einzelne

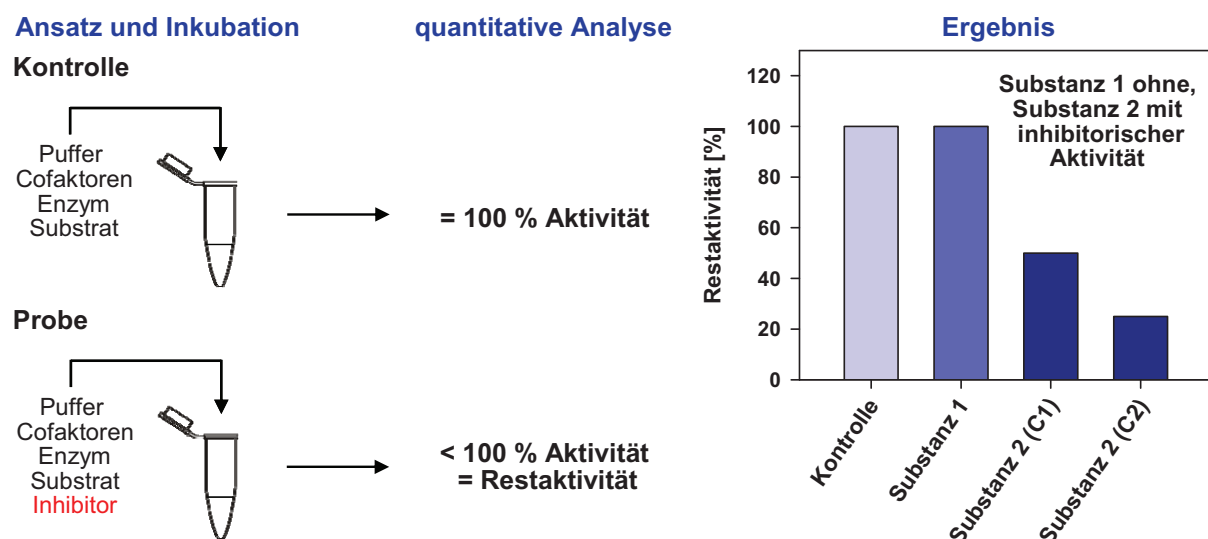


Abb. 22 Screening von Testsubstanzen auf Inhibition durch Bestimmung der Restaktivität in einem Enzymassay (C1, Konzentration 1; C2, Konzentration 2; C1 < C2).

Substanzen miteinander verglichen werden. Anschließend kann eine Grenze gesetzt werden (cut-off), ab der eine Testsubstanz aufgrund einer zu geringen inhibitorischen Aktivität für weitere Untersuchungen nicht mehr in Betracht kommt.

6.3.2 Inhibitionskurven und IC_{50} -Wert

Als Maß für die inhibitorische Aktivität eines Hemmstoffes wird häufig dessen IC_{50} -Wert angegeben. Der IC_{50} -Wert ist die Inhibitorkonzentration, die notwendig ist, um die Enzymaktivität auf 50 % herabzusetzen. Er wird deshalb auch mittlere inhibitorische Konzentration genannt. Für eine experimentelle Bestimmung des IC_{50} -Wertes muss der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors auf die Enzymaktivität untersucht werden. Anstelle der Umsetzungsgeschwindigkeit sind für eine Ermittlung des IC_{50} -Wertes die Restaktivitäten im Vergleich zur Kontrolle, die keinen Inhibitor enthält, ausreichend (s. I.6.3.1). Anschließend können durch graphische Auftragung der Restaktivität gegenüber der Inhibitorkonzentration Inhibitionskurven erhalten werden (Abb. 23). Die Inhibitionskurven werden durch den IC_{50} -Wert und die Steigung, die als Hill-Koeffizient (n_H) bezeichnet wird, charakterisiert. Die zugrundeliegende mathematische Beschreibung der Inhibitionskurven ist die Hill-Gleichung (Gl. 5).¹²⁴ Der Kurvenverlauf in der Darstellung mit linearen Achsen (Abb. 23) weist daher Ähnlichkeiten mit den Substratsättigungskurven (Abb. 18) auf. Der Unterschied besteht darin, dass bei Auftragung der Restaktivität eine negative Steigung erhalten wird. Häufig werden Inhibitionskurven in der halblogarithmischen Darstellung abgebildet, in der sigmoidale Kurven mit einem Wendepunkt bei einer Restaktivität von 50 % erhalten werden (Abb. 23). Die x-Koordinate des Wendepunktes der Kurve ist daher der

$$\text{Restaktivität [\%]} = \frac{100 \times [I]^{n_H}}{IC_{50}^{n_H} + [I]^{n_H}} \quad (\text{Gl. 5})$$

$$\log \frac{\text{Restaktivität [\%]}}{100 - \text{Restaktivität [\%]}} = n_H \times \log [I] - n_H \times \log IC_{50} \quad (\text{Gl. 6})$$

[I] = Inhibitorkonzentration

IC_{50} = Inhibitorkonzentration für eine 50%ige Hemmung der Enzymaktivität

n_H = Hill-Koeffizient

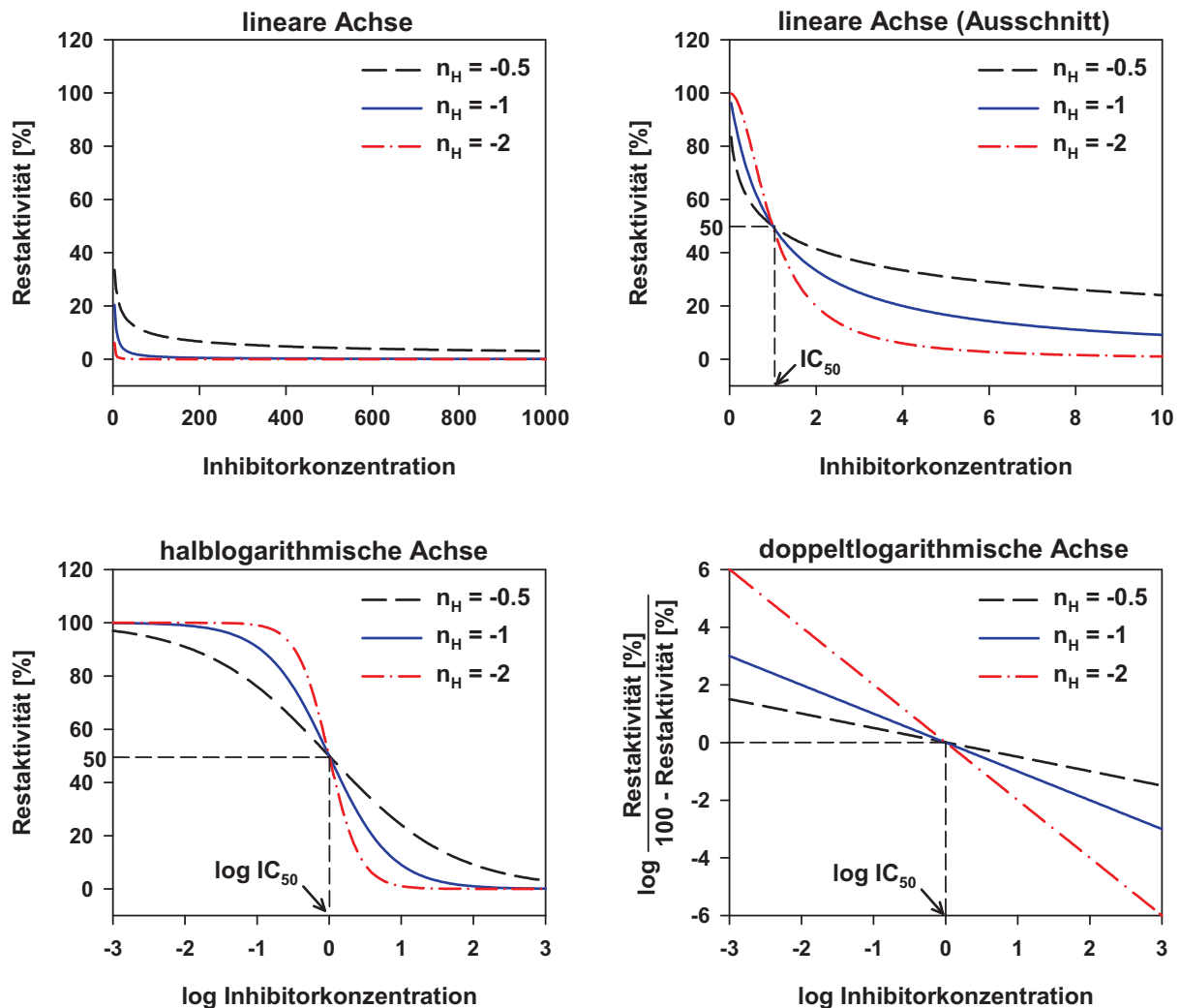


Abb. 23 Verlauf von Inhibitionskurven mit unterschiedlichen Hill-Koeffizienten (n_H) und einem IC_{50} -Wert von 1 in verschiedenen graphischen Darstellungen.

Logarithmus des IC_{50} -Wertes. Für diese Darstellung und die Berechnung des IC_{50} -Wertes aus den Messpunkten ist ein Computerprogramm erforderlich, das eine nichtlineare Regression durchführen kann. Darüber hinaus kann die Inhibitionskurve durch eine doppellogarithmische Auftragung linearisiert werden (Gl. 6). Es ergibt sich eine Gerade, deren Steigung dem Hill-Koeffizienten und deren Nullstelle dem Logarithmus des IC_{50} -Wertes entsprechen (Abb. 23).

6.3.3 Inhibitionsmechanismus

Zur Ermittlung des Mechanismus eines reversiblen Inhibitors muss die Substratsättigungskurve der Testreaktion ohne Inhibitor und mit mindestens einer InhibitorKonzentration aufgenommen werden. Dabei sollte die Substrat- und die

Inhibitor-Konzentration im Bereich von einem Zehntel bis etwa dem Zehnfachen des K_m - bzw. des K_i -Wertes variiert werden.¹²⁵ In der direkten Darstellung nach Michaelis und Menten werden in Anwesenheit eines Inhibitors Kurven erhalten, die unterhalb der ursprünglichen Sättigungskurve verlaufen (Abb. 24). Da eine Erkennung des Inhibitionsmechanismus in diesem Diagramm nur schwer möglich ist, eignet sich die doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver und Burk ($1/V$ - $1/[S]$ -Diagramm).¹²⁶ Man erhält für jede Inhibitor-Konzentration eine Gerade. Aus der Lage der Geraden zueinander, die von der Änderung der Parameter K_m und V_{max} in Anwesenheit des Inhibitors verursacht wird, lässt sich auf den Inhibitionsmechanismus schließen. Bei einer kompetitiven Inhibition kann durch Erhöhung der Substratkonzentration der Inhibitor vom Enzym verdrängt werden. Dadurch erhöht sich der scheinbare K_m -Wert, während V_{max} unverändert bleibt. Die erhaltene Gerade besitzt eine größere Steigung und die Geraden mit verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen schneiden sich auf der y-Achse (Abb. 24). Bei Vorliegen einer unkompetitiven Inhibition wird K_m und V_{max} so verändert, dass parallele Geraden erhalten werden (Abb. 24). Bei der reinen nicht-kompetitiven Inhibition ist die Bindung von Substrat und Inhibitor unabhängig

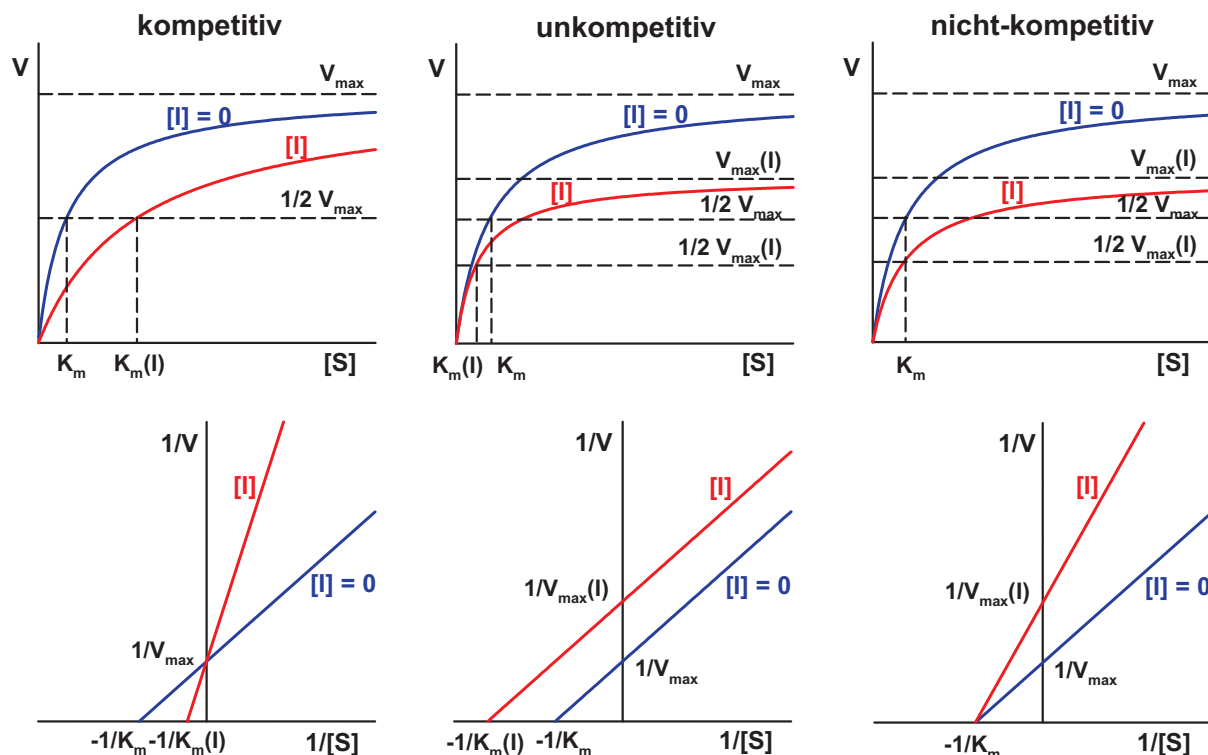


Abb. 24 Kurvenverläufe in den Darstellungen nach Michaelis-Menten (oben) und Lineweaver-Burk (unten) bei verschiedenen reversiblen Inhibitionsmechanismen.

voneinander. Es erfolgt daher keine Änderung von K_m , allerdings eine Erniedrigung von V_{max} . Die Geraden schneiden sich demzufolge auf der x-Achse (Abb. 24). Liegt eine gemischte Inhibition vor, befindet sich dieser Schnittpunkt oberhalb (für $K_{ic} < K_{iu}$) oder unterhalb (für $K_{ic} > K_{iu}$) der x-Achse.¹²⁵

6.3.4 K_i -Wert

Für die Bestimmung der Inhibitionskonstanten (K_i -Wert) können u. a. die Auswertungen nach Dixon ($1/V$ -[I]-Diagramm)¹³⁸ und nach Cornish-Bowden ($[S]/V$ -[I]-Diagramm)¹³⁹ verwendet werden (Abb. 25). Bei diesen Darstellungen wird die Inhibitorkonzentration variiert und für jede eingesetzte Substratkonzentration eine Gerade erhalten, wobei die jeweilige x-Koordinate des Schnittpunktes dieser Geraden dem negativen K_i -Wert entspricht. Während durch die Auswertung nach Dixon die kompetitive Hemmkonstante (K_{ic}) gewonnen wird, erhält man aus der Darstellung nach Cornish-Bowden die Bindungskonstante der unkompetitiven Inhibition (K_{iu}).¹³⁹ Bei einer kompetitiven bzw. einer unkompetitiven Inhibition befindet sich dieser Schnittpunkt im 2. Quadranten (Abb. 25) und bei einer gemischten

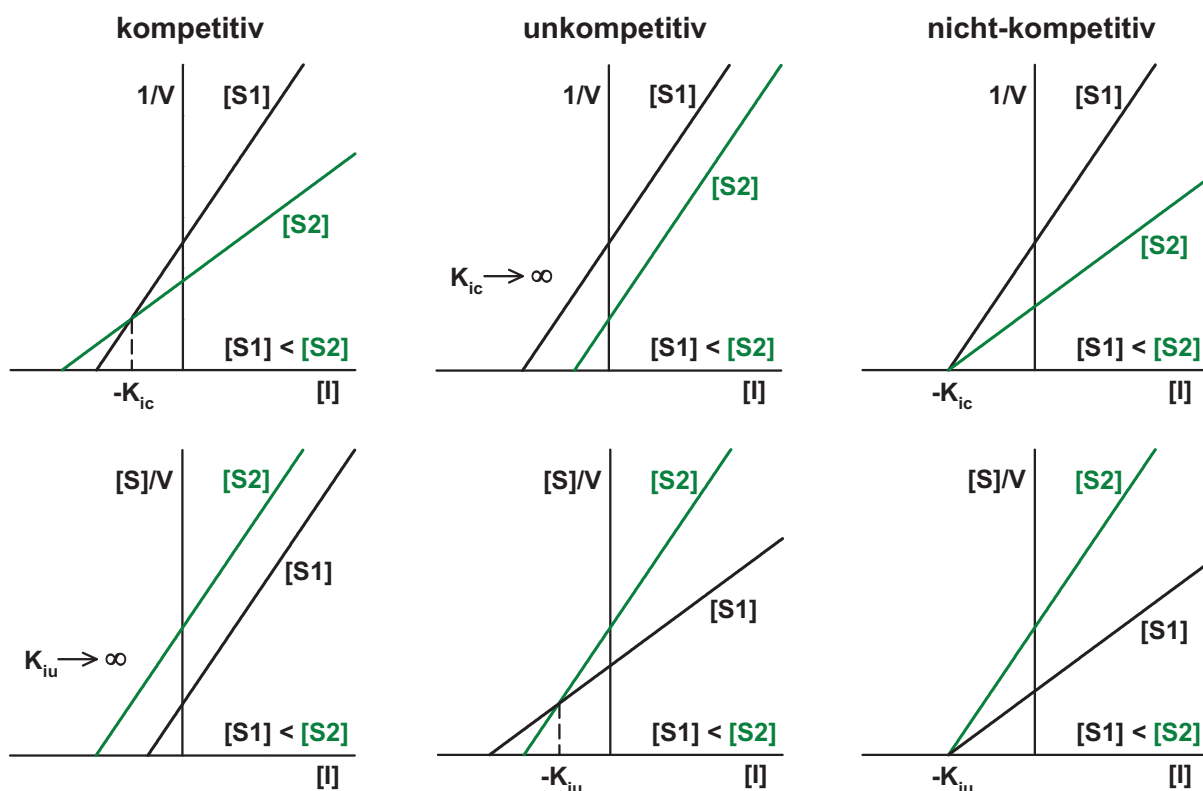


Abb. 25 Kurvenverläufe in den Darstellungen nach Dixon (oben) und Cornish-Bowden (unten) bei verschiedenen reversiblen Inhibitionsmechanismen zur Bestimmung der K_i -Werte.

Inhibition entweder im 2. oder im 3. Quadranten. Liegt eine reine nicht-kompetitive Inhibition vor, schneiden sich die Geraden auf der x-Achse (Abb. 25). Ist die entsprechende Inhibitionskonstante unendlich groß, werden parallele Geraden erhalten.¹³⁹

6.3.5 IC₅₀-Wert und Substratkonzentration

Während es sich bei dem K_i-Wert eines Inhibitors um eine Konstante handelt, hängt der IC₅₀-Wert von der eingesetzten Konzentration des Testsubstrates ab. Für die einzelnen Inhibitionsmechanismen ergeben sich unterschiedliche Kurvenverläufe, wenn der IC₅₀-Wert gegenüber der Substratkonzentration aufgetragen wird (Abb. 26). Der Kurvenverlauf in diesem Diagramm kann durch die von Cheng und Prusoff hergeleiteten Gleichungen für eine kompetitive (Gl. 7), eine unkompetitive (Gl. 8) und eine nicht-kompetitive (Gl. 9) Inhibition beschrieben werden.¹⁴⁰ Bei der kompetitiven Inhibition steigt der IC₅₀-Wert proportional mit der Substratkonzentration an. Die Inhibitionskurven werden dadurch nach rechts verschoben (Abb. 26). Liegt ein unkompetitiver Inhibitionsmechanismus vor, nähert sich der IC₅₀-Wert bei einer Erhöhung der Substratkonzentration einem konstanten Wert an. Die Inhibitionskurven verschieben sich entsprechend nach links (Abb. 26). Bei einer reinen nicht-kompetitiven Inhibition verändert sich der IC₅₀-Wert nicht. Die Inhibitionskurven sind daher deckungsgleich (Abb. 26).

$$IC_{50} = K_{ic} \times \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) \quad (\text{Gl. 7})$$

$$IC_{50} = K_{iu} \times \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right) \quad (\text{Gl. 8})$$

$$IC_{50} = \frac{K_m + [S]}{\frac{K_m}{K_{ic}} + \frac{[S]}{K_{iu}}} \quad (\text{Gl. 9})$$

IC₅₀ = Inhibitorkonzentration für eine 50%ige Hemmung der Enzymaktivität

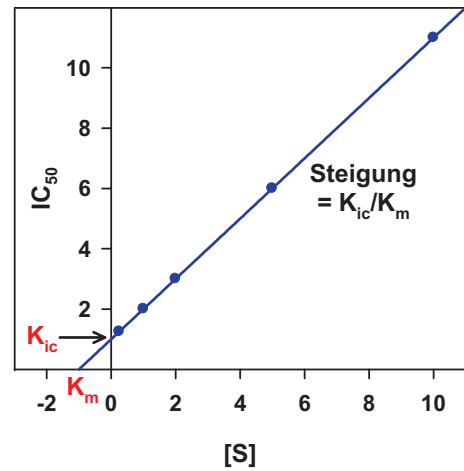
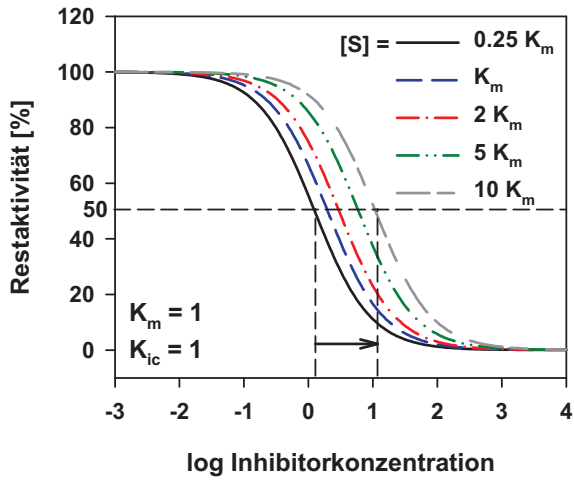
[S] = Substratkonzentration

K_m = Michaelis-Menten-Konstante der Substratreaktion

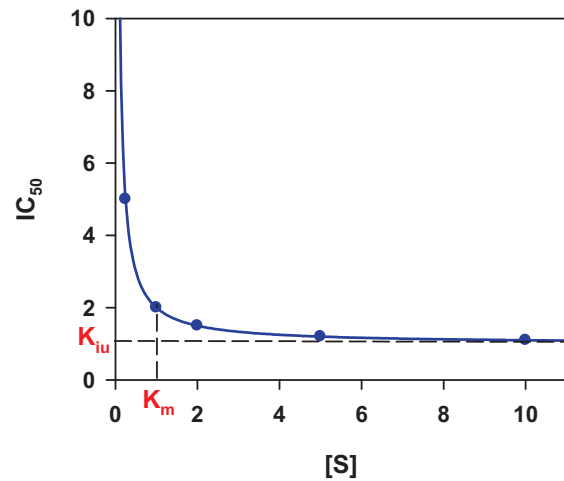
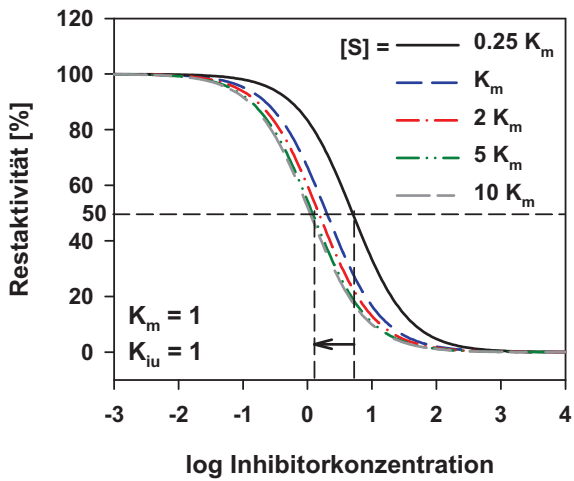
K_{ic} = kompetitive Hemmkonstante

K_{iu} = unkompetitive Hemmkonstante

kompetitive Inhibition



unkompetitive Inhibition



nicht-kompetitive Inhibition

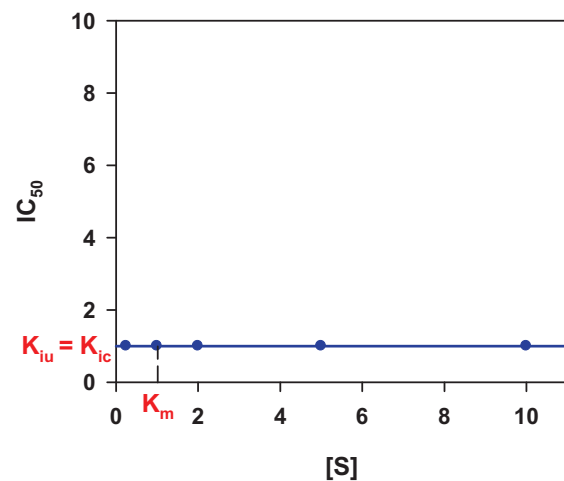
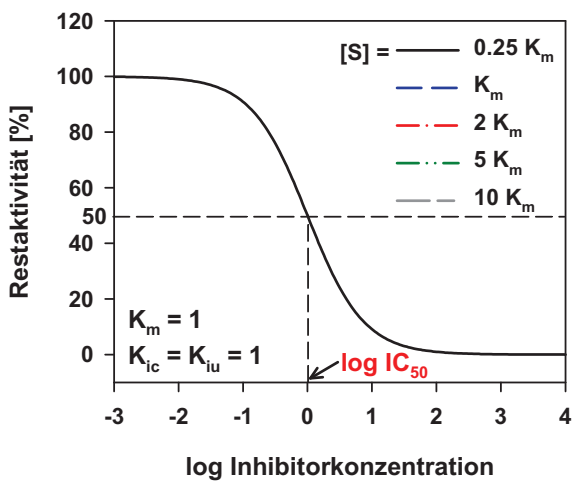


Abb. 26 Inhibitionskurven ($n_H = -1$) bei verschiedenen Substratkonzentrationen (links) und Abhängigkeit des IC_{50} -Wertes von der Substratkonzentration (rechts) bei Vorliegen eines kompetitiven (oben), unkompetitiven (Mitte) und nicht-kompetitiven (unten) Inhibitionsmechanismus.

Substratkonzentration im Inhibitionsassay

Aus den Beziehungen von Cheng und Prusoff¹⁴⁰ lassen sich die in Tab. 5 angegebenen Tendenzen des IC_{50} -Wertes im Verhältnis zum K_i -Wert bei den verschiedenen Inhibitionsmechanismen ableiten, wenn eine sehr kleine Substratkonzentration weit unterhalb des K_m -Wertes, eine Substratkonzentration, die dem K_m -Wert entspricht, und eine sehr hohe Substratkonzentration für den Inhibitionsassay verwendet wird.¹⁴¹ Bei einer nicht-kompetitiven Inhibition hat die Substratkonzentration keinen Einfluss auf den IC_{50} -Wert, der dann auch der Inhibitionskonstanten entspricht. Stark erhöht ist der IC_{50} -Wert bei einer kompetitiven Inhibition und einer hohen Substratkonzentration, sowie bei einer unkompetitiven Inhibition und einer sehr kleinen Substratkonzentration (Tab. 5). Aufgrund der teilweise starken Änderung des IC_{50} -Wertes mit der Substratkonzentration bietet es sich an, eine Substratkonzentration zu verwenden, die dem K_m -Wert entspricht. Hierdurch lassen sich Hemmdaten vergleichen, die mit unterschiedlichen Testsubstraten erhalten wurden. Zusätzlich wird die Einordnung von bereits vorhandenen Literaturdaten erleichtert. Darüber hinaus stellt die Ermittlung der IC_{50} -Werte bei verschiedenen Substratkonzentrationen eine weitere Möglichkeit der Bestimmung des K_i -Wertes dar.

Tab. 5 Abhängigkeit des IC_{50} -Wertes von der eingesetzten Substratkonzentration ($[S]$) bei verschiedenen reversiblen Inhibitionsmechanismen und Zusammenhang mit der Michaelis-Menten-Konstanten (K_m), der kompetitiven Hemmkonstanten (K_{ic}) und der unkompetitiven Hemmkonstanten (K_{iu}).^{140,141}

Inhibitions- mechanismus	$[S] \ll K_m$	$[S] = K_m$	$[S] \gg K_m$
kompetitiv ($K_{iu} \rightarrow \infty$)	$IC_{50} \rightarrow K_{ic}$	$IC_{50} = 2 K_{ic}$	$IC_{50} \rightarrow \infty$
unkompetitiv ($K_{ic} \rightarrow \infty$)	$IC_{50} \rightarrow \infty$	$IC_{50} = 2 K_{iu}$	$IC_{50} \rightarrow K_{iu}$
nicht-kompetitiv ($K_{ic} = K_{iu}$)	$IC_{50} = K_{ic} = K_{iu}$	$IC_{50} = K_{ic} = K_{iu}$	$IC_{50} = K_{ic} = K_{iu}$
gemischt ($K_{ic} \neq K_{iu}$)	$IC_{50} \rightarrow K_{ic}$	$IC_{50} = \frac{2}{\frac{1}{K_{ic}} + \frac{1}{K_{iu}}}$	$IC_{50} \rightarrow K_{iu}$

7 Ziele der Arbeit

Neben der Untersuchung des Metabolismus von Wirkstoffen, sind Kenntnisse über die Inhibition fremdstoffmetabolisierender Enzyme von besonderer Bedeutung, um Arzneimittelinteraktionen erkennen und vorhersagen zu können. Dabei werden in erster Linie In-vitro-Experimente mit Subzellfraktionen und einzelnen Enzymen durchgeführt. Im Fokus der Arbeitsgruppe steht v. a. die Beeinflussung der Enzyme durch Naturstoffe und Phytopharmaka. Hierfür sind geeignete und leistungsfähige Methoden erforderlich, mit denen die Metaboliten selektiv detektiert werden können. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, Substrate mit optimalen Eigenschaften zu entwickeln, die für die In-vitro-Untersuchung der Enzyminhibition eingesetzt werden können. Während sich bisherige Arbeiten^{142,143} mit CYP-Enzymen und UDP-Glucuronosyltransferasen beschäftigten, soll durch die vorliegende Arbeit das vorhandene Methodenspektrum auf weitere Enzyme, wie z. B. Glutathion-S-Transferasen oder Carboxylesterasen, erweitert werden. Hinzu kommt die Umstellung bereits vorhandener Methoden mit einfacher massenspektrometrischer Detektion auf die wesentlich selektivere und empfindlichere Tandem-MS-Analyse. Mit Hilfe der entwickelten Methoden soll die Inhibition dieser Enzyme durch Naturstoffe und Extrakte ausgewählter Arzneipflanzen untersucht werden. Weitere Projekte sind die Bioaktivierung von Prodrugs und die Detektion von reaktiven Metaboliten.

Bioaktivierung von Clopidogrel und Einfluss von Omeprazol

Berichte über eine Wechselwirkung des Thrombozytenaggregationshemmers Clopidogrel mit dem Protonenpumpeninhibitor Omeprazol sind ein aktueller Anlass für eine genauere Untersuchung.⁹² Clopidogrel ist ein Prodrug, das durch CYP-Enzyme in zwei Stufen bioaktiviert wird. Das gleichzeitig eingenommene Omeprazol soll insbesondere durch eine Hemmung von CYP2C19 die Bildung des aktiven Metaboliten vermindern, was als Ursache für das Therapieversagen mit Clopidogrel angesehen wird. Nach einer Methodenentwicklung zur Detektion der Metaboliten sollen die folgenden Fragen geklärt werden: Welche CYP-Enzyme sind am Metabolismus dieser beiden Arzneistoffe beteiligt? Welche CYP-Enzyme werden durch diese Arzneistoffe gehemmt? Ist eine Beeinflussung der Bioaktivierung von Clopidogrel durch Omeprazol messbar?

Carboxylesterasen

Zur Untersuchung der Inhibition der Carboxylesterasen sollen zunächst verschiedene Substrate ausgewählt und HPLC/UV-Methoden zur Detektion der Metaboliten entwickelt werden. Anschließend soll untersucht werden, welche humanen Subzellfraktionen und CES-Enzyme diese Substrate umsetzen. Im Anschluss an die Assay-Optimierung soll die Beeinflussung der CES durch Pflanzenextrakte untersucht werden.

CYP-Enzyme

CYP-Enzyme stellen eine bedeutende Gruppe fremdstoffmetabolisierender Enzyme dar. Für eine In-vitro-Untersuchung der Inhibition der einzelnen CYP-Enzyme werden in der Literatur verschiedene Arzneistoffe als Markersubstrate vorgeschlagen.² Nach Inkubation dieser Substrate mit den Enzymen wird der Metabolit in der Regel durch eine HPLC-Analyse abgetrennt und quantitativ bestimmt. Aufgrund der hierbei entstehenden geringen Metabolitenkonzentrationen sind empfindliche Detektionsmethoden, wie z. B. die Massenspektrometrie erforderlich. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Substraten, deren Metaboliten fluorimetrisch analysiert werden können. Hierfür kommen v. a. Modellsubstrate, wie z. B. Cumarin-, Resorufin- oder Fluorescein-Derivate zum Einsatz.¹⁴⁴ Häufig werden die Inkubation und die Detektion der Metaboliten direkt in einer Mikrotiterplatte durchgeführt, was ein Hochdurchsatz-Screening ermöglicht. Allerdings können hierbei die Messergebnisse durch Quenching oder durch Eigenfluoreszenz des zu untersuchenden Inhibitors beeinflusst werden.¹⁴³ Eine vorherige chromatographische Abtrennung des Metaboliten ist bei der Untersuchung von Proben mit komplexer Matrix, wie z. B. Pflanzenextrakten, unbedingt erforderlich.

In dieser Arbeit sollen LC/MS/MS-basierte Methoden entwickelt werden, die die Untersuchung der Inhibition aller wichtigen CYP-Enzyme anhand der Umsetzung mit ausgewählten Markersubstraten ermöglichen. Darüber hinaus soll eine Charakterisierung der Substrate vorgenommen werden. Hierbei stehen die Untersuchung der Isoenzymselektivität und die Bestimmung von enzymkinetischen Parametern, wie der K_m - und der V_{max} -Wert, im Vordergrund. Darüber hinaus sollen verschiedene Versuchsbedingungen, wie z. B. die Zeitabhängigkeit der Umsetzung,

der Lösungsmittelgehalt der Probe, die Stabilität der CYP-Enzyme oder die NADPH-Konzentration untersucht werden.

Zur Identifizierung der für den Metabolismus eines Arzneistoffes verantwortlichen CYP-Enzyme und als Positivkontrolle für die Assays werden verschiedene Substanzen als sogenannte Standardinhibitoren vorgeschlagen.² Während für die Hemmung des entsprechenden CYP-Enzyms Daten in der Literatur vorhanden sind, ist oft von der Beeinflussung anderer CYP-Enzyme wenig bekannt. Inhibitionsuntersuchungen mit Hilfe der entwickelten Methoden sollen daher Aufschluss über die CYP-Isoenzymselektivität ausgewählter Inhibitoren geben. Anhand der Ergebnisse soll eine geeignete Konzentration abgeleitet werden, bei der durch den entsprechenden Inhibitor nur ein CYP-Enzym gehemmt wird.

Neben den Markersubstraten sollen in dieser Arbeit Fluoreszenzsubstrate für CYP-Enzyme, wie 7-Alkyloxycumarin-Derivate und β -Carbolin-Derivate, untersucht werden. Für eine Detektion ist zunächst die Ermittlung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Metaboliten notwendig. Im Anschluss sollen HPLC/Fluoreszenz- und LC/MS/MS-Methoden zur Quantifizierung der Metaboliten entwickelt werden. Wie bereits bei den Markersubstraten soll eine Charakterisierung bezüglich der Isoenzymselektivität erfolgen und enzymkinetische Parameter bestimmt werden. Mit Hilfe von geeigneten Inhibitoren soll ein Vergleich mit den Markersubstraten vorgenommen werden.

Biotoxifizierung von Fremdstoffen

Neben der Entgiftung können bei der Biotransformation von Arzneistoffen reaktive Metaboliten entstehen, die Arzneimittelnebenwirkungen verursachen können. Die Detektion solcher Metaboliten ist daher Bestandteil der modernen Arzneistoffentwicklung. Basierend auf der Literatur sollen Methoden entwickelt werden, bei denen die reaktiven Metaboliten abgefangen und die Addukte durch eine LC/MS/MS-Analyse detektiert werden können. Für eine Optimierung der Methoden sollen zunächst Arzneistoffe, von denen reaktive Metaboliten bekannt sind, verwendet werden. Neben dem Einsatz des natürlichen GSH als Fängerreagenz können z. B. mit einem Fluoreszenzmarker ausgestattete GSH-Derivate Vorteile bei der Detektion bieten. Daher sollen einige markierte GSH-Derivate synthetisiert und getestet

werden. Vor- und Nachteile der erhaltenen Methoden sollen erörtert werden und die Methoden bezüglich eines Einsatzes zur Detektion reaktiver Metaboliten von Pflanzenextrakten beurteilt werden.

Enzyme des Glutathion-Stoffwechsels

Glutathion-S-Transferasen (GSTs) spielen eine Rolle bei der Entgiftung von Fremdstoffen. Die Bestimmung der Aktivität und die Untersuchung der Inhibition erfolgt bis heute mit Hilfe von photometrischen Assays.¹⁴⁵ Derzeit sind keine Methoden verfügbar, die eine selektive Detektion des Metaboliten, z. B. bei Untersuchungen mit Pflanzenextrakten, ermöglichen. Aus diesem Grund sollen in dieser Arbeit unter Verwendung ausgewählter und literaturbekannter Testsubstrate HPLC- bzw. LC/MS-basierte Methoden entwickelt werden. Für eine Kalibrierung ist eine Synthese der entsprechenden GSH-Konjugate aus den Substraten erforderlich. Anschließend soll eine Assay-Optimierung durchgeführt werden. Bei den HPLC-Assays muss zunächst ein Verfahren zum Abstoppen der bei vielen Substraten ebenfalls nichtenzymatisch ablaufenden Reaktion gefunden werden. Neben der Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten mit humanen Subzellfraktionen müssen der pH-Wert des Inkubationspuffers und die Inkubationstemperatur zur Unterdrückung der nichtenzymatischen Reaktion angepasst werden. Im Anschluss sollen Arzneistoffe und Pflanzenextrakte auf Inhibition der GSTs untersucht werden. Ein Vergleich der Ergebnisse mit denen des bisherigen photometrischen Assays soll Aufschluss über die Leistungsfähigkeit der neuen Methoden geben.

Zur Detektion des durch die Glutathionreduktase (GR) entstehenden Glutathions wird häufig 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (Ellmans-Reagenz) eingesetzt.¹⁴⁶ Basierend auf dieser Reaktion soll ein HPLC/UV-Assay etabliert werden. Mit diesem Assay soll anschließend die Inhibition der humanen GR durch lebertoxische Pflanzenextrakte untersucht werden.

II ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1 Bioaktivierung von Clopidogrel

Die Bioaktivierung des Prodrugs Clopidogrel erfolgt über CYP-Enzyme in zwei Stufen. Zunächst wird Clopidogrel zum 2-Hydroxyclopidogrel metabolisiert, das zum 2-Oxo-Derivat tautomerisiert, wodurch ein weiteres Stereozentrum im Molekül entsteht. Im zweiten Schritt erfolgt eine S-Oxygenierung des Thiolactons und nach anschließender Hydrolyse wird eine Sulfensäure erhalten (Abb. 27).¹⁴⁷ Anstelle der Sulfensäure wird auch das Thiol-Derivat als aktiver Metabolit postuliert.¹⁴⁸ Der aktive Metabolit kann dann kovalent an den P2Y₁₂-ADP-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche binden. Aufgrund der hohen Reaktivität des aktiven Metaboliten kann dieser nicht direkt detektiert werden. Bei In-vitro-Inkubationen muss daher eine Derivatisierung durchgeführt werden. Als Derivatisierungsreagenz für die aktiven Metaboliten der Thrombozytenaggregationshemmer vom Thienopyridin-Typ, wie

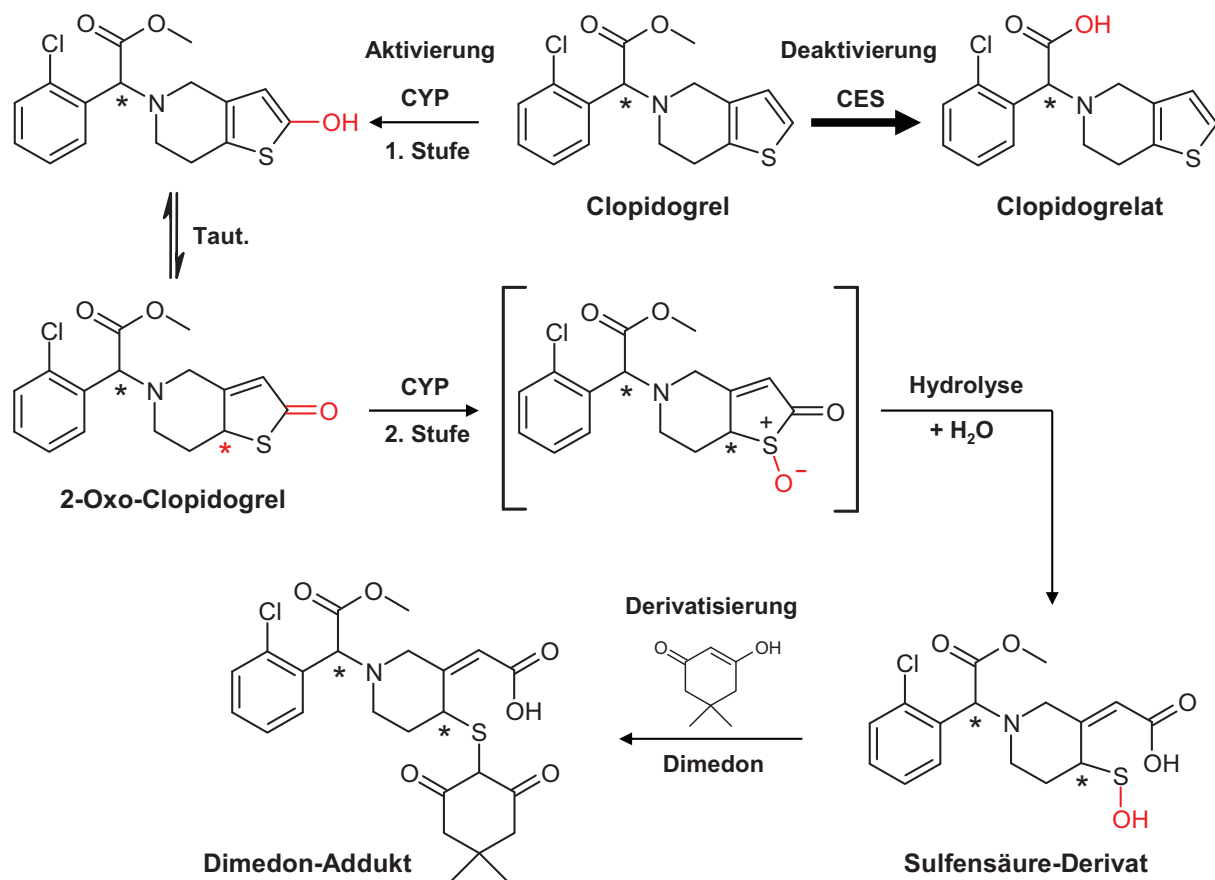


Abb. 27 Metabolismus von Clopidogrel beim Menschen und Derivatisierung mit Dimedon (modifiziert nach ¹⁴⁷).

Ticlopidin, Clopidogrel und Prasugrel wurden bisher u. a. Acrylnitril^{147,149}, 2-Brom-3'-methoxyacetophenon^{148,150}, Dimedon¹⁴⁷, *N*-Ethylmaleinimid^{150,151}, Thiole^{147,151}, wie z. B. Mercaptoethanol, *N*-Acetylcystein oder Glutathion, und 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)¹⁵² verwendet. In Abb. 27 ist die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte direkte Derivatisierung der Sulfensäure mit Dimedon in Anlehnung an Dansette *et al.* (2009) dargestellt.¹⁴⁷ Neben dem Metabolismus durch CYP-Enzyme wird der Großteil des verabreichten Clopidogrels durch Carboxylesterasen zum inaktiven Clopidogrelat metabolisiert.^{153,154}

1.1 Hydrolyse von Clopidogrel

Zur Untersuchung der Hydrolyse von Clopidogrel wurde der Arzneistoff mit humanen Leber- bzw. Dünndarmsubzellfraktionen und mit humanen rekombinanten Carboxylesterase-Enzymen umgesetzt und die Proben mit Hilfe einer HPLC/UV-Analyse untersucht (Abb. 28). Für die Überprüfung der Linearität der HPLC/UV-Analyse und der Ermittlung der Umsetzungsgeschwindigkeit wurde eine Kalibrierung mit dem zuvor synthetisierten Clopidogrelhydrochlorid durchgeführt (Abb. 28). Mit humanen Lebermikrosomen wurde eine hyperbole Substratsättigungskurve mit einem K_m -Wert von $11.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$ und einer maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit von $7.94 \pm 0.07 \text{ nmol/mg/min}$ erhalten (Abb. 28). Die gemessene Aktivität für die Esterhydrolyse liegt damit weit über der für die Bioaktivierung mit CYP-Enzymen bestimmten Aktivität. Daher handelt es sich bei dem inaktiven Clopidogrelat um den Hauptmetaboliten und es werden nur sehr niedrige Plasmaspiegel von Clopidogrel erreicht.¹⁵⁴ Die Untersuchung verschiedener Subzellfraktionen zeigte, dass die Aktivität von humanen Lebermikrosomen wesentlich höher ist als die von humanem Lebercytosol (Abb. 28). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass Clopidogrel v. a. durch die membrangebundenen Carboxylesterasen hydrolysiert wird. Die rekombinanten Carboxylesterase-Enzyme CES1b und CES1c setzen Clopidogrel mit einer vergleichbaren Geschwindigkeit um, wie die humanen Lebermikrosomen. Die vorrangig intestinal vorkommende CES2 hydrolysiert Clopidogrel hingegen kaum, was die fehlende Aktivität der humanen intestinalen Mikrosomen erklärt (Abb. 28). Ähnliche Ergebnisse zur Hydrolyse von Clopidogrel sind in der Literatur zu finden.¹⁵³

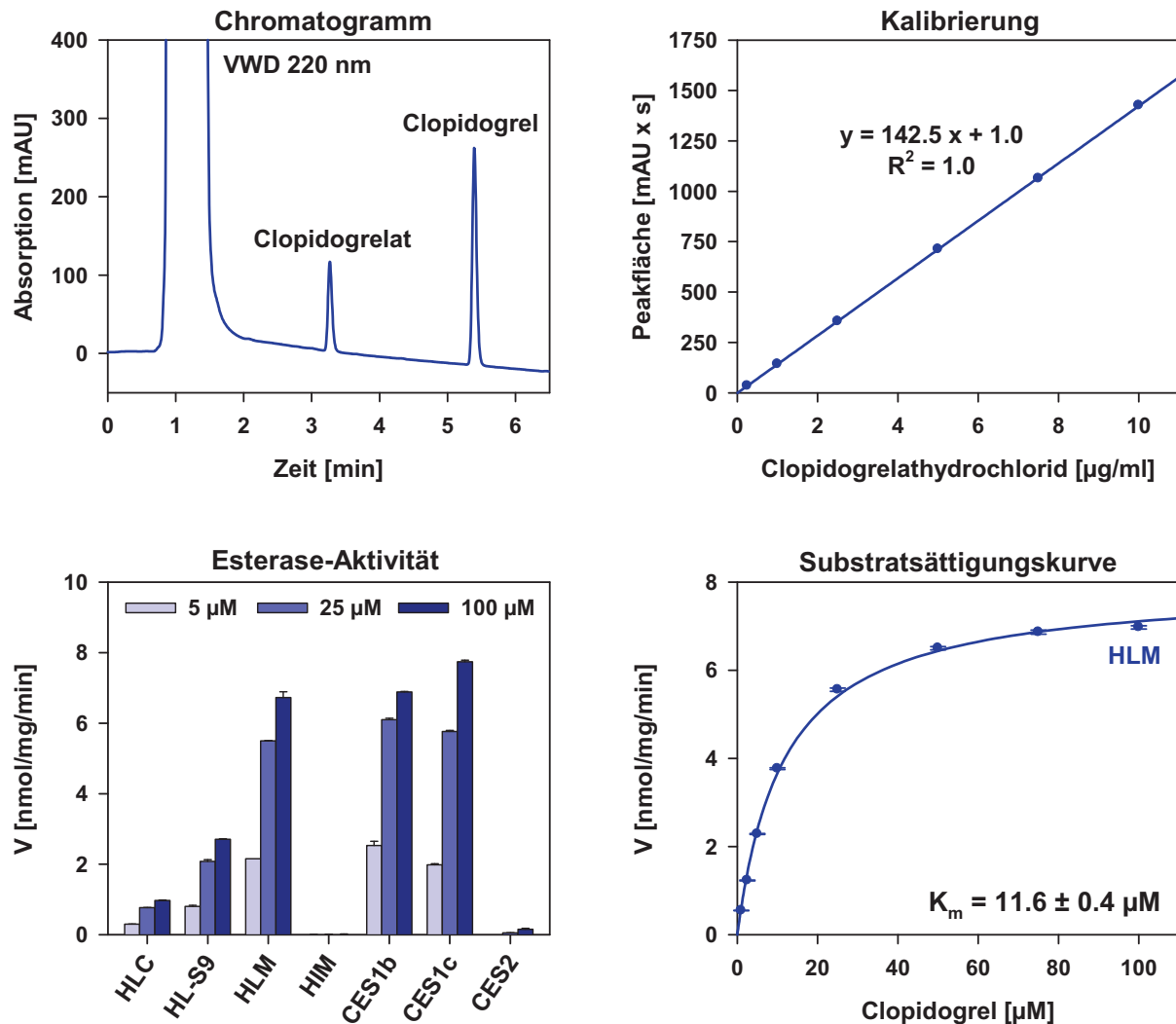


Abb. 28 Enzymatische Hydrolyse von Clopidogrel zum Clopidogrelat. HPLC/UV-Chromatogramm (links oben), Kalibriergerade mit Clopidogrelhydrochlorid (rechts oben), Aktivitäten verschiedener humaner Subzellfraktionen bzw. rekombinanter Carboxylesterase-Enzyme (links unten) und Substratsättigungskurve mit humanen Lebermikrosomen (rechts unten).

1.2 In-vitro-Metabolismus von Clopidogrel durch humane Lebermikrosomen

Für die Analyse der Metaboliten des Clopidogrels wurde der Arzneistoff mit humanen Lebermikrosomen und NADPH in Anwesenheit von Dimedon als Derivatisierungsreagenz inkubiert. Die Probe wurde anschließend durch eine LC/MS-Analyse im positiven Full-Scan-Modus unter Anwendung eines Fließmittelgradienten untersucht (Abb. 29). Durch Extraktion von Ionenspielen (EIC) mit ausgewählten m/z -Werten aus dem Totalionenstrom (TIC) lassen sich die Signale der einzelnen Substanzen

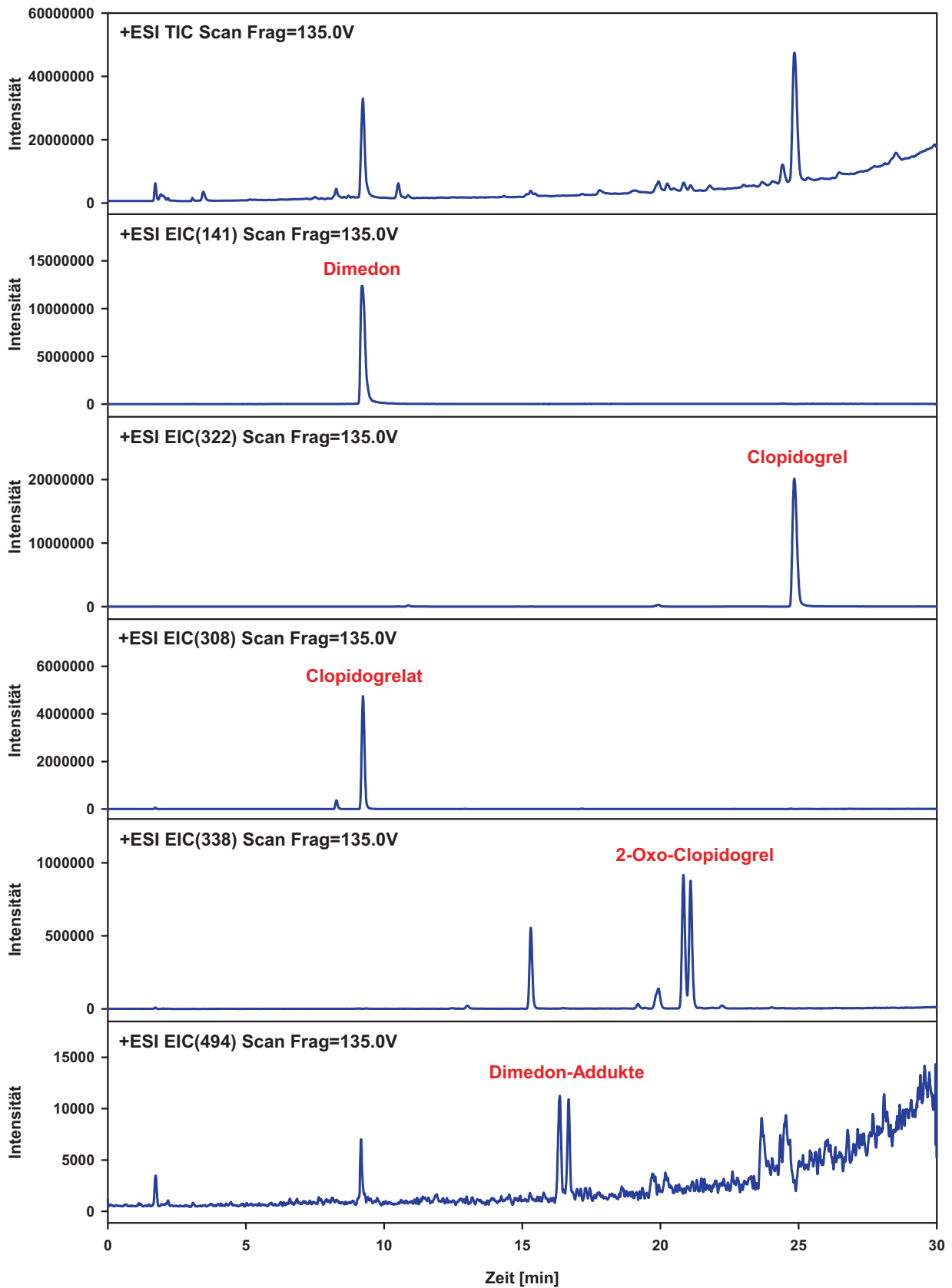


Abb. 29 LC/MS-Chromatogramm der Inkubation von Clopidogrel mit humanen Lebermikrosomen und Dimedon als Derivatisierungsreagenz im positiven Full-Scan-Modus.

zuordnen. Für Clopidogrel (m/z 322, Retentionszeit 24.8 min) und das im Überschuss eingesetzte Derivatisierungsreagenz Dimedon (m/z 141, Retentionszeit 9.2 min) wurden Peaks mit einer hohen Signalintensität erhalten. Das durch Hydrolyse entstehende Clopidogrelat (m/z 308) coeluierte mit dem Derivatisierungsreagenz. Im extrahierten Ionenchromatogramm mit dem m/z -Wert von 338, was der Masse des um ein Sauerstoffatom schwereren Clopidogrels entspricht, sind mehrere Peaks zu erkennen, d. h. es entstehen mehrere Metaboliten durch CYP-Enzyme. Auffällig sind zwei benachbarte Peaks mit den Retentionszeiten von 20.8 und 21.2 min, die dem 2-Oxo-Clopidogrel zugeordnet werden konnten. Im Chromatogramm mit einem m/z -Wert von 494 wurden ebenfalls zwei Peaks detektiert, bei denen es sich um die Dimedon-Addukte der Metaboliten des zweiten Bioaktivierungsschrittes handelt und deren Signalintensität deutlich schwächer ausfiel als für die anderen Metaboliten (Abb. 29). In Proben ohne Derivatisierungsreagenz konnte kein Signal bei dem m/z -Wert der Sulfensäure-Derivate detektiert werden. Die Erklärung für das Auftreten von jeweils zwei Peaks für 2-Oxo-Clopidogrel und dem Dimedon-Addukt liegt in der Stereochemie der Substanzen. Clopidogrel wird enantiomerenrein eingesetzt, wobei das chirale C-Atom in α -Stellung zur Carbonsäureesterfunktion die S-Konfiguration besitzt. Durch das nach Hydroxylierung und anschließender Tautomerisierung entstandene weitere Stereozentrum handelt es sich beim 2-Oxo-Clopidogrel um ein Diastereomerenpaar, das chromatographisch getrennt werden kann. In der Literatur liegen bereits Untersuchungen zur Stereoisomerie der Metaboliten von Clopidogrel vor.¹⁴⁹

1.3 LC/MS/MS-Assay zur Bioaktivierung von Clopidogrel

Für eine Bestimmung der Beteiligung einzelner CYP-Enzyme an der Bioaktivierung von Clopidogrel und deren Hemmung ist eine selektive und empfindliche Detektion der Metaboliten erforderlich, wofür die Tandem-Massenspektrometrie im MRM-Modus besonders geeignet ist. Im Folgenden wurden Produktionenscans der Precursor-Ionen der Analyten durchgeführt. Als intensivste und als Quantifier ausgewählte Übergänge wurden für 2-Oxo-Clopidogrel m/z 338 \rightarrow 183 und für die Dimedon-Addukte m/z 494 \rightarrow 323 ermittelt, was mit den Literaturangaben übereinstimmt.^{147,154} Nach der Optimierung der Kollisionsenergien wurde die Analysenzeit durch Anpassung des Fließmittelgradienten und einer Halbierung der

Säulenlänge auf 11 min verkürzt. Der Chromatographielauf wurde in mehrere Zeitsegmente eingeteilt, so dass für einzelne Analyten verschiedene Elektronenmultiplierspannungen gewählt werden konnten. Da keine Referenzsubstanzen zur Verfügung standen, kann kein absoluter Gehalt der Inkubationsprobe ermittelt werden. Für Inhibitionsuntersuchungen wird lediglich die Enzymrestaktivität bezogen auf eine Kontrollprobe bestimmt, was ohne eine Kalibrierung mit der Referenzsubstanz möglich ist. Die erforderliche Linearität der Methode konnte durch Analyse von verschiedenen Verdünnungen einer Kontrollinkubation (100 %) mit einer Blindprobe gleicher Zusammensetzung, der bereits vor der Inkubation die Abstopplösung zugesetzt wurde, überprüft werden, da höhere Probenkonzentrationen ohnehin nicht vorkommen. Für die Auswertung wurden die Peakflächen beider Diastereomere addiert. Die Auftragung der Area Ratios aus dem jeweiligen Analyten und des internen Standards Ticlopidin gegenüber dem Verdünnungsgrad ergab für 2-Oxo-Clopidogrel und die Dimedon-Addukte Kalibriergeraden mit gutem Bestimmtheitsmaß (Abb. 30).

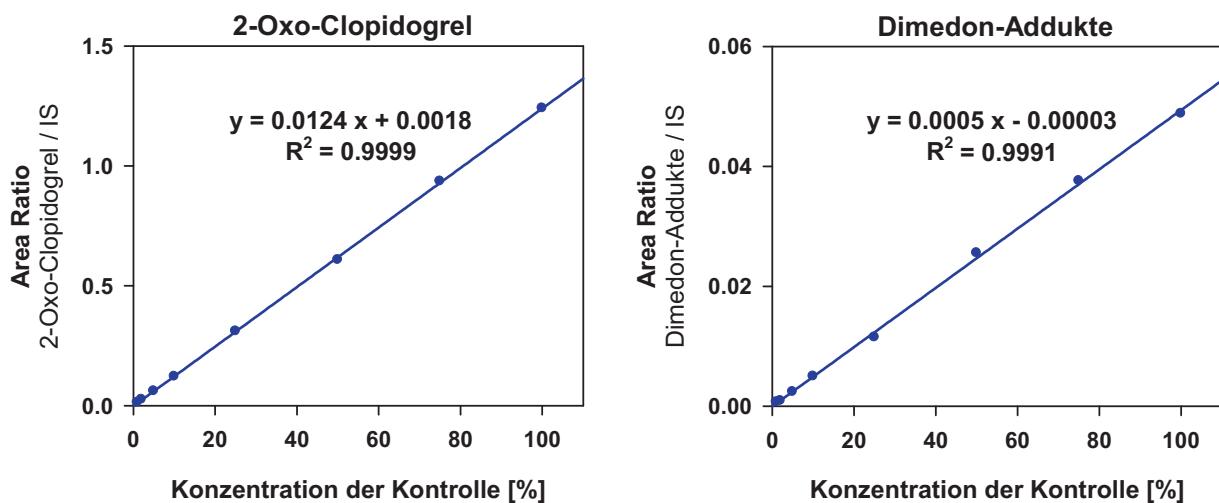


Abb. 30 Überprüfung der Linearität der LC/MS/MS-Methode zur Bestimmung der Metaboliten von Clopidogrel. Analyse von Verdünnungen der mit humanen Lebermikrosomen und Clopidogrel inkubierten Probe.

1.4 Biotransformation von Clopidogrel zu 2-Oxo-Clopidogrel

Zur Ermittlung der CYP-Enzyme, die Clopidogrel zum 2-Oxo-Clopidogrel metabolisieren, wurden verschiedene rekombinante CYP-Enzyme (10 pmol/ml) mit drei verschiedenen Clopidogrelkonzentrationen (1, 5, 25 μ M) inkubiert. Für einen

Vergleich der Aktivitäten wurde jeweils das Peakflächenverhältnis von 2-Oxo-Clopidogrel und dem als internen Standard zugesetzten Ticlopidin gebildet. Aus Abb. 31 kann entnommen werden, dass eine Reihe von CYP-Enzymen für die Bildung des 2-Oxo-Clopidogrels verantwortlich sind. Für CYP-Enzyme mit einer ausgeprägten Aktivität wurden anschließend Substratsättigungskurven aufgenommen (Abb. 31). Die höchsten maximalen Umsetzungsgeschwindigkeiten besaßen CYP1A2 und CYP3A4. Clopidogrel besitzt mit K_m -Werten von unter $10\ \mu\text{M}$ eine hohe Affinität zu den Enzymen CYP1A2 ($K_m = 8.9\ \mu\text{M}$), CYP2B6 ($K_m = 3.2\ \mu\text{M}$) und CYP2C19 ($K_m = 6.3\ \mu\text{M}$). Eine Ausnahme bildet CYP3A4, für das mit $49.8\ \mu\text{M}$ ein höherer K_m -Wert ermittelt wurde und bei dem eine Substratinhibitionskinetik vorliegt. Zwischenzeitlich wurden durch Mitarbeiter des Herstellers von Prasugrel Ergebnisse zur Bioaktivierung von Clopidogrel durch CYP-Enzyme veröffentlicht.¹⁵⁵ Für die Biotransformation zum 2-Oxo-Clopidogrel konnten sie ebenfalls CYP1A2, CYP2B6 und CYP2C19 identifizieren und gaben K_m -Werte zwischen 1 und $2\ \mu\text{M}$ an.

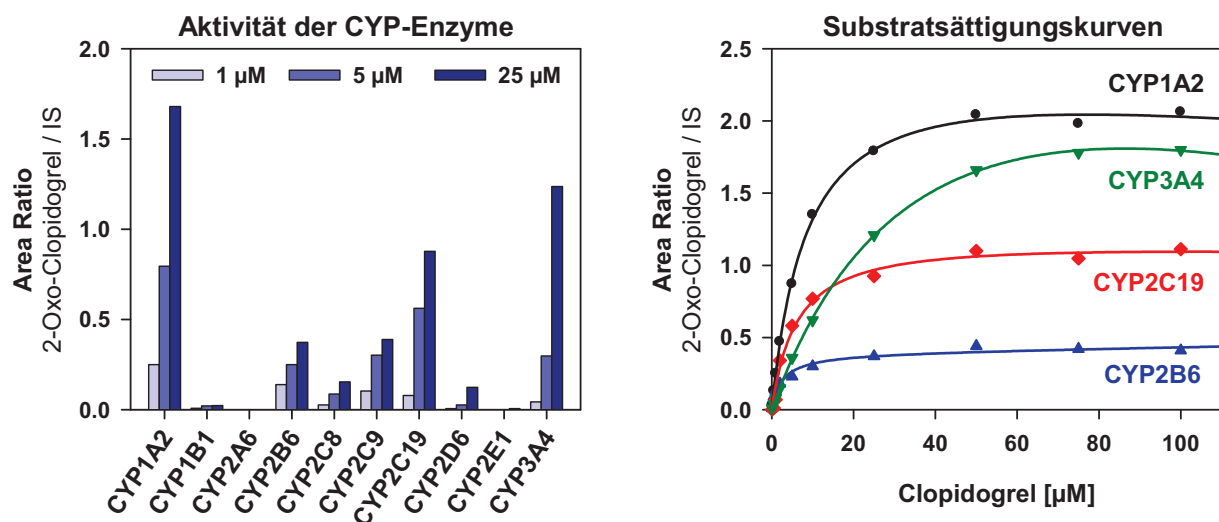


Abb. 31 Metabolismus von Clopidogrel zu 2-Oxo-Clopidogrel. Untersuchung von rekombinanten CYP-Enzymen (links) und Substratsättigungskurven ausgewählter CYP-Enzyme (rechts).

1.5 Untersuchung von CYP-Standardinhibitoren

Da der Metabolit 2-Oxo-Clopidogrel nicht zur Verfügung stand, konnte der zweite Bioaktivierungsschritt nicht mit Hilfe von rekombinanten CYP-Enzymen untersucht werden. Eine Alternative zur Ermittlung der dafür verantwortlichen CYP-Enzyme ist der Einsatz von spezifischen Inhibitoren, die dem Inkubationsansatz von Clopidogrel

mit humanen Lebermikrosomen zugesetzt werden. So wurde für jeden Inhibitor die Restaktivität für die Umsetzung zum 2-Oxo-Clopidogrel und der Dimedon-Addukte gegenüber der Kontrolle ohne Inhibitor bestimmt (Abb. 32). Die Bildung von 2-Oxo-Clopidogrel konnte mit Ausnahme von Quercetin durch keinen Inhibitor um mehr als 25 % gehemmt werden. Eine Steigerung der Clopidogrelkonzentration führte in den meisten Fällen zu einer Erhöhung der Restaktivität. Spätere Untersuchungen zeigten, dass einige dieser Inhibitoren nicht nur ein CYP-Enzym hemmen (s. II.3.9). Quercetin und Sertralin sind recht unselektive Inhibitoren. Durch Tranylcypromin wurden bei der hier verwendeten Konzentration ebenfalls mehrere CYP-Enzyme gehemmt. Nach Ausschaltung von nur einem CYP-Enzym durch selektive Inhibitoren wurde keine starke Beeinträchtigung der Biotransformation zum 2-Oxo-Clopidogrel beobachtet (Abb. 32). Daher muss diese Reaktion von mehreren CYP-Enzymen katalysiert werden, was die Ergebnisse mit den rekombinanten Enzymen bestätigt. Die Restaktivitäten für die Bildung der Dimedon-Addukte sind bei den meisten Inhibitoren niedriger als für die Biotransformation zum 2-Oxo-Clopidogrel (Abb. 32). Auch hier fällt die Hemmung bei einer höheren Clopidogrelkonzentration schwächer aus. Auffällig ist die deutliche Beeinträchtigung durch Ketoconazol, was darauf

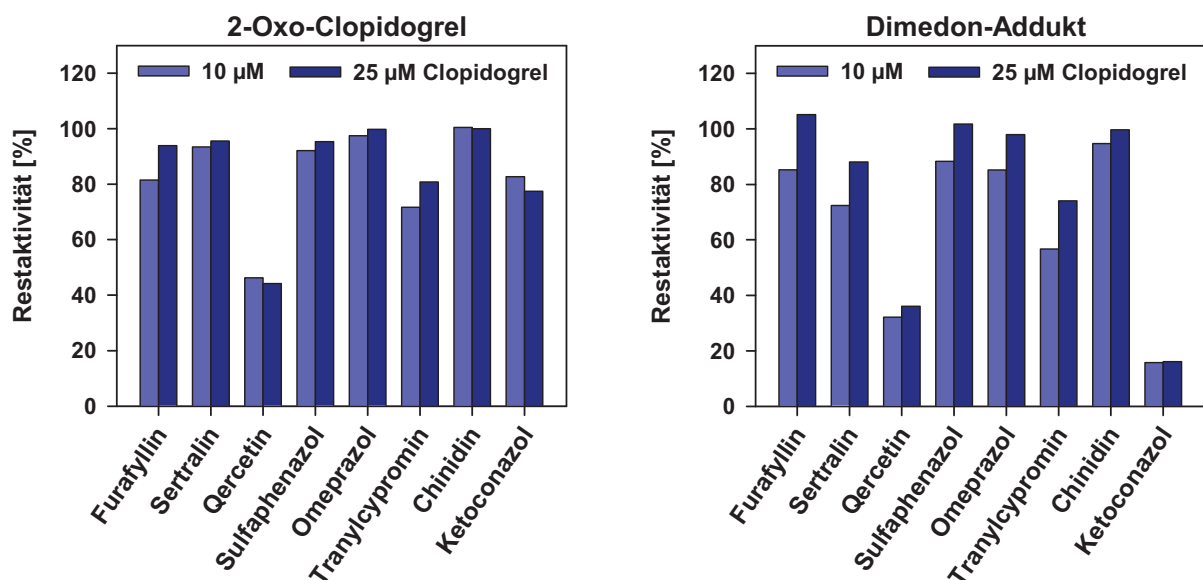


Abb. 32 Einfluss von ausgewählten Standardinhibitoren einzelner CYP-Enzyme auf die Bioaktivierung von Clopidogrel. Inhibition von CYP1A2 (10 µM Furafyllin), CYP2B6 (2.5 µM Sertralin), CYP2C8 (10 µM Quercetin), CYP2C9 (2.5 µM Sulfaphenazol), CYP2C19 (25 µM Omeprazol bzw. 25 µM Tranylcypromin), CYP2D6 (100 nM Chinidin) und CYP3A4 (1 µM Ketoconazol).

hindeutet, dass der zweite Schritt der Bioaktivierung hauptsächlich durch CYP3A4 erfolgt. Neben CYP3A4 wird in der Literatur ebenfalls CYP2B6, CYP2C9 und CYP2C19 für die Bildung des aktiven Metaboliten aus 2-Oxo-Clopidogrel angegeben.¹⁵⁵ Allerdings wurde dort eine hohe Konzentration von 2-Oxo-Clopidogrel (200 μM) eingesetzt und 3-Methoxyphenacylbromid als Derivatisierungsreagenz verwendet. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Umsetzung von Clopidogrel fällt nur eine sehr geringe Konzentration von 2-Oxo-Clopidogrel an, die unter 1 μM liegen dürfte. Bei geringen Substratkonzentrationen scheint CYP3A4 einen hohen Anteil an der Umsetzung von 2-Oxo-Clopidogrel zum aktiven Metaboliten zu besitzen.

1.6 Inhibition des Metabolismus von Clopidogrel durch Omeprazol

In klinischen Studien wurde teilweise beobachtet, dass bei einer Therapie mit Clopidogrel durch die zusätzliche Gabe von Omeprazol die Krankenhauseinweisungen und die Todesrate aufgrund von akutem Koronarsyndrom ansteigen.^{92,156} Als Ursache wird eine Inhibition des am ersten Bioaktivierungsschritt beteiligten polymorphen CYP2C19 durch Omeprazol vermutet. Um solch eine Interaktion nachzuweisen, wurde der Einfluss von Omeprazol auf den Metabolismus des Clopidogrels im In-vitro-Versuch untersucht. Hierzu wurde Clopidogrel mit verschiedenen Omeprazolkonzentrationen inkubiert und die Restaktivität für die Umsetzung zum 2-Oxo-Clopidogrel durch CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19 und CYP3A4 mit Hilfe des LC/MS/MS-Assays bestimmt (Abb. 33). Die Aktivität von

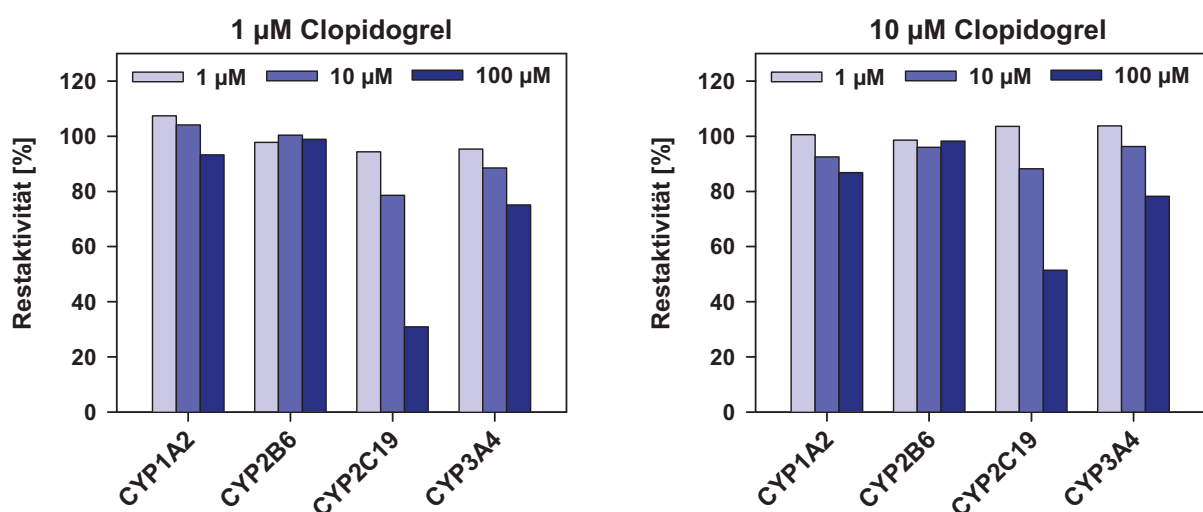


Abb. 33 Inhibition des Metabolismus von Clopidogrel zu 2-Oxo-Clopidogrel durch Omeprazol.

CYP1A2 und CYP2B6 wurde durch Omeprazol kaum beeinflusst. Am stärksten wurde CYP2C19 gehemmt, dessen Aktivität durch 100 μM Omeprazol auf 31 % zurückging. Bei Vorliegen einer höheren Clopidogrelkonzentration vermag Omeprazol die Umsetzung durch CYP2C19 nicht so stark zu hemmen. Die Inhibition von CYP3A4 fiel schwächer aus als die von CYP2C19 (Abb. 33). Es stellte sich somit heraus, dass Omeprazol von den für die Biotransformation zum 2-Oxo-Clopidogrel beteiligten CYP-Enzymen v. a. CYP2C19 hemmt.

1.7 Inhibition von CYP-Enzymen durch Clopidogrel und Omeprazol

Arzneistoffe, die CYP-Enzyme hemmen und gleichzeitig mit Clopidogrel verabreicht werden, können die Bildung des aktiven Metaboliten beeinflussen und so zu einem Wirkungsverlust des Clopidogrels führen. Aus diesem Grund wurde mit Hilfe der bereits etablierten Assays (s. II.3.1) die Inhibition einzelner CYP-Enzyme durch Clopidogrel und Omeprazol bestimmt (Abb. 34). Clopidogrel ist mit einem IC_{50} -Wert von $6.1 \pm 0.7 \text{ nM}$ ein sehr starker Inhibitor des Enzyms CYP2B6. Ebenfalls wird die Aktivität von CYP2C19 ($\text{IC}_{50} = 0.38 \pm 0.04 \mu\text{M}$) und CYP1A2 ($\text{IC}_{50} = 2.79 \pm 0.13 \mu\text{M}$) erheblich beeinflusst. Alle anderen CYP-Enzyme werden wesentlich schwächer gehemmt (IC_{50} -Werte $> 10 \mu\text{M}$). Bei den am stärksten beeinflussten Enzymen

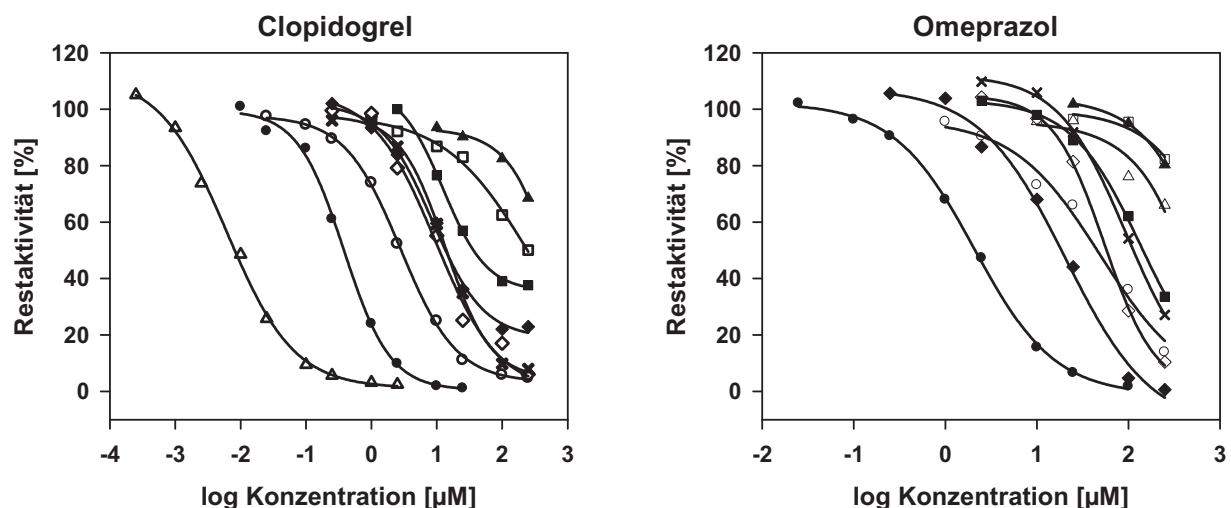


Abb. 34 Inhibition der einzelnen humanen rekombinanten CYP-Enzyme durch Clopidogrel (links) und Omeprazol (rechts). Verwendet wurden folgende Isoenzyme und Standardsubstrate: CYP1A2 (\circ , 10 μM Phenacetin), CYP2A6 (\square , 1 μM Cumarin), CYP2B6 (Δ , 75 μM Bupropion), CYP2C8 (\diamond , 0.5 μM Amodiaquin), CYP2C9 (\times , 100 μM Tolbutamid), CYP2C19 (\bullet , 30 μM S-Mephenytoin), CYP2D6 (\blacksquare , 0.7 μM Dextromethorphan), CYP2E1 (\blacktriangle , 500 μM Chlorzoxazon), CYP3A4 (\blacklozenge , 1 μM Midazolam).

handelt es sich gleichzeitig um die für den Metabolismus des Clopidogrels verantwortlichen CYP-Enzyme (s. II.1.4), für die eine Hemmung zu erwarten war. Vergleichbare Ergebnisse zur CYP-Inhibition durch Clopidogrel sind in der Literatur zu finden.¹⁵⁷

Die Inhibition der CYP-Enzyme durch Omeprazol, dessen Racemat hier untersucht wurde, ist wesentlich schwächer gegenüber der des Clopidogrels (Abb. 34). Mit einem IC_{50} -Wert von $2.08 \pm 0.12 \mu\text{M}$ hemmte Omeprazol CYP2C19 am stärksten, was mit den Beobachtungen der Literatur übereinstimmt.^{158,159} Neben CYP2C19 wurden v. a. CYP3A4 und CYP1A2 gehemmt. Für alle anderen CYP-Enzyme ist für eine Beeinträchtigung ihrer Aktivität eine Omeprazolkonzentration von über $10 \mu\text{M}$ erforderlich.

1.8 In-vitro-Metabolismus von Omeprazol durch CYP-Enzyme

1.8.1 LC/MS/MS-Assay zur Detektion der Omeprazolmetaboliten

Omeprazol wird durch CYP-Enzyme hauptsächlich zu 5-Hydroxyomeprazol, 5-O-Desmethylomeprazol und Omeprazolsulfon metabolisiert (Abb. 35).¹⁶⁰ Für die Untersuchung des In-vitro-Metabolismus von Omeprazol wurde eine LC/MS/MS-Methode entwickelt. Hierfür wurde Omeprazol mit den rekombinanten Enzymen

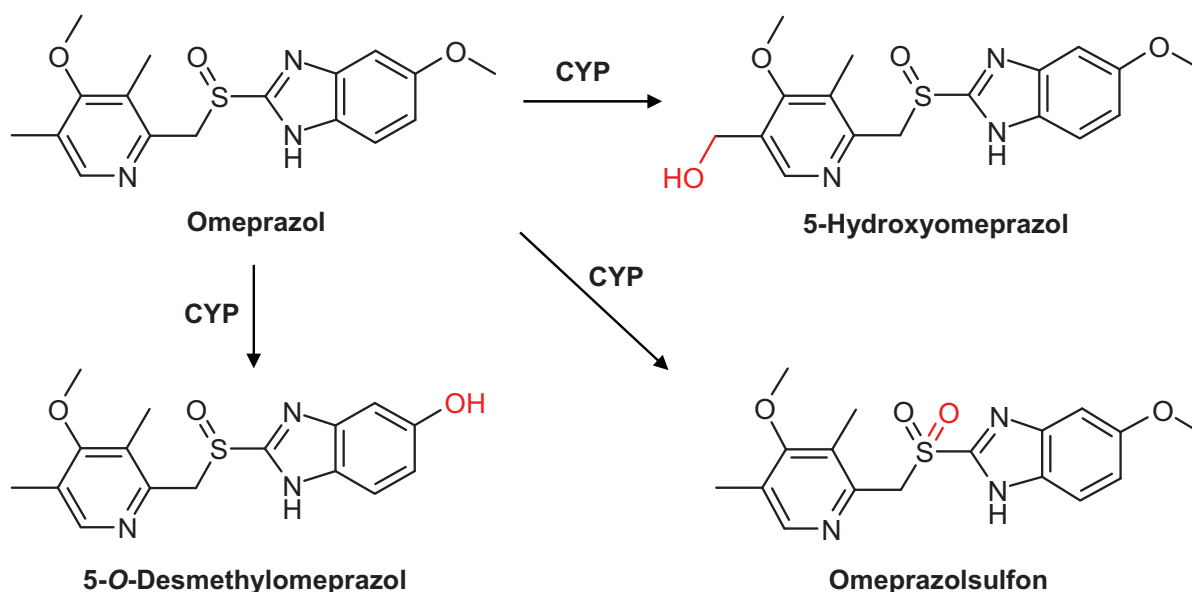


Abb. 35 Strukturformeln von Omeprazol und seine durch CYP-Enzyme entstehenden Hauptmetaboliten 5-Hydroxyomeprazol, 5-O-Desmethylomeprazol und Omeprazolsulfon.

CYP2C19 und CYP3A4 sowie mit humanen Lebermikrosomen inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte zunächst im positiven SIM-Modus. Durch Anpassung des Fließmittelgradienten konnte eine chromatographische Trennung der Metaboliten in 6 min erzielt werden. Damit die Detektion im MRM-Modus erfolgen konnte, wurden nun Produktionenscans durchgeführt und die Kollisionsenergien für ausgewählte Übergänge der Analyten optimiert. Durch die Bildung der Peak-Area-Ratios des jeweiligen Metaboliten mit dem als internen Standard zugesetzten Trimethoprim konnten die Aktivitäten einzelner CYP-Enzyme miteinander verglichen werden. Aus Abb. 36 ist ersichtlich, dass alle drei Metaboliten bei der Inkubation von Omeprazol sowohl mit humanen Lebermikrosomen als auch mit CYP3A4 entstehen, während in der mit CYP2C19 inkubierten Probe nur Hydroxyomeprazol und 5-O-Desmethylomeprazol detektiert werden konnten.

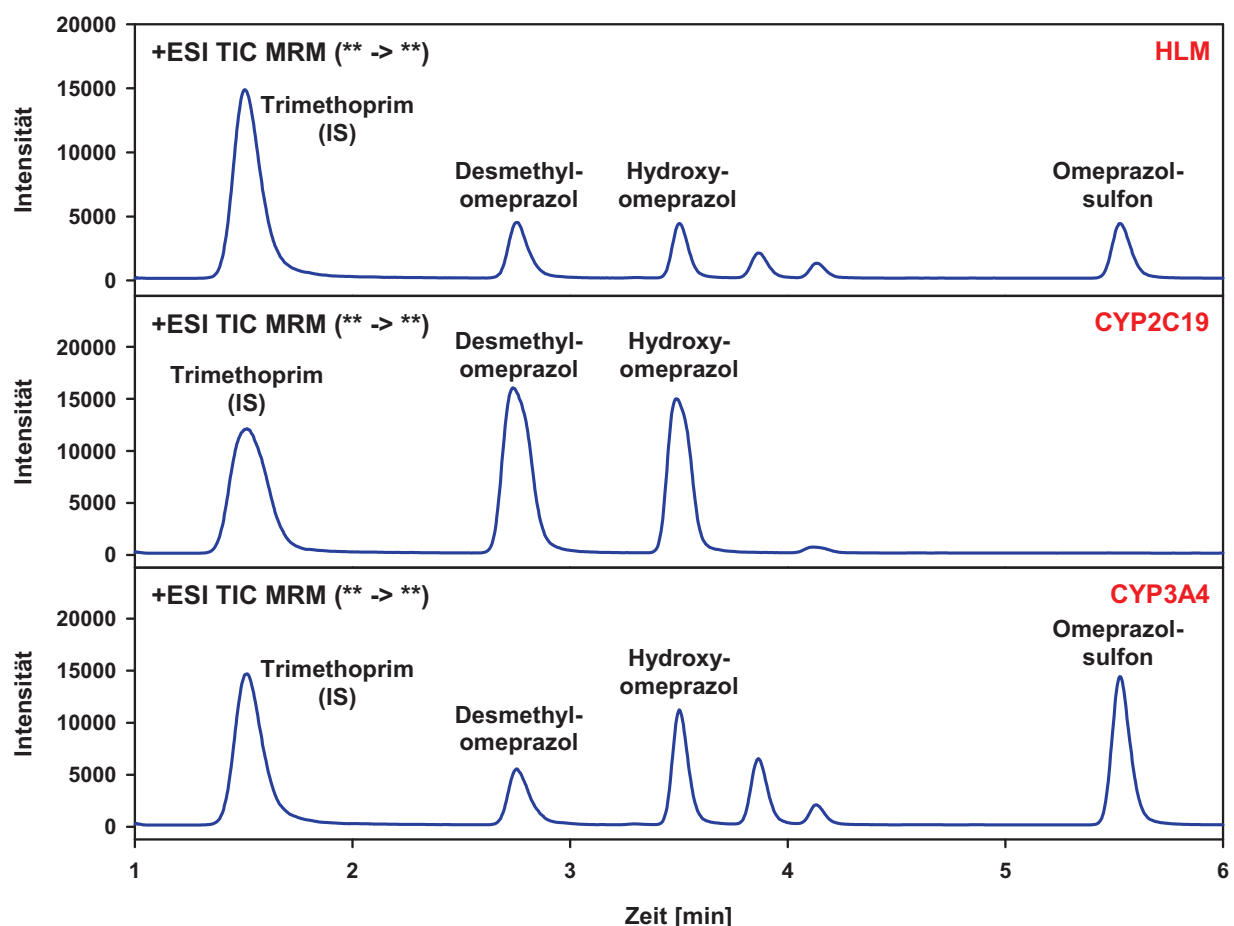


Abb. 36 LC/MS/MS-Analyse der inkubierten Proben von Omeprazol (25 μ M) mit humanen Lebermikrosomen (HLM) und den rekombinanten Enzymen CYP2C19 und CYP3A4.

1.8.2 CYP-Enzyme des Metabolismus von Omeprazol

Zur Ermittlung der am Metabolismus von Omeprazol beteiligten CYP-Enzyme wurden rekombinante CYP-Enzyme mit verschiedenen Omeprazolkonzentrationen inkubiert, da bisher vorhandene Daten v. a. durch die Inkubation von Standardinhibitoren mit humanen Lebermikrosomen erhalten wurden.¹⁶⁰ Für den direkten Vergleich wurde für jedes CYP-Enzym dieselbe Konzentration verwendet und nach der LC/MS/MS-Analyse der Proben die jeweiligen Peakflächenverhältnisse der Analyten und des internen Standards für die Metaboliten 5-Hydroxyomeprazol, 5-O-Desmethylomeprazol und Omeprazolsulfon gebildet (Abb. 37). Die Biotransformation zum 5-Hydroxyomeprazol erfolgt hauptsächlich durch CYP2C19 und CYP3A4 (Abb. 37), was mit den Literaturangaben übereinstimmt.^{161,162} Steigt die Omeprazolkonzentration an, sind weitere Isoenzyme, wie z. B. CYP1A2 und CYP2D6, beteiligt. Die Reaktion zum 5-O-Desmethylomeprazol erfolgt bei der Inkubation von 100 µM Omeprazol durch alle getesteten CYP-Enzyme, während bei niedrigeren Substratkonzentrationen die Umsetzung durch CYP2C19 überwiegt (Abb. 37). Die höchsten Aktivitäten besaßen CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4, weshalb Anderson und Mitarbeiter eine Hemmung der Umsetzung durch S-Mephenytoin, Chinidin und Troleandomycin beobachten konnten.¹⁶⁰ Die Bildung von Omeprazolsulfon wird im Gegensatz zu den anderen Metaboliten ausschließlich durch CYP3A4 katalysiert (Abb. 37), was die Literaturangaben bestätigen.^{162,163} Schließlich wurden für die CYP-Enzyme mit ausgeprägter Aktivität und für humane Lebermikrosomen Substratsättigungskurven im Bereich von 0.25 bis 100 µM aufgenommen (Abb. 37). Für die Biotransformation zum 5-Hydroxyomeprazol wurden K_m -Werte von 1.37 ± 0.07 µM für CYP2C19 und 14.8 ± 2.2 µM für CYP3A4 ermittelt, die etwas kleiner sind als die Literaturwerte.^{162,163} Ähnliche K_m -Werte wurden für die Umsetzung zum 5-O-Desmethylomeprazol mit 0.99 ± 0.05 µM für CYP2C19 und 19.1 ± 1.6 µM für CYP3A4 erhalten. Mit humanen Lebermikrosomen ergab sich für beide Metaboliten aufgrund der Beteiligung mehrerer CYP-Enzyme kein klassischer Kurvenverlauf nach Michaelis-Menten, wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde.^{160,161} Für die Oxidation zum Omeprazolsulfon lag der K_m -Wert mit 20.8 ± 1.6 µM für CYP3A4 niedriger als für humane Lebermikrosomen, für die sich ein K_m -Wert von 55.4 ± 4.0 µM ergab. Weiterhin gibt es Unterschiede in den kinetischen Daten für die Umsetzung der einzelnen Stereoisomere.^{164,165}

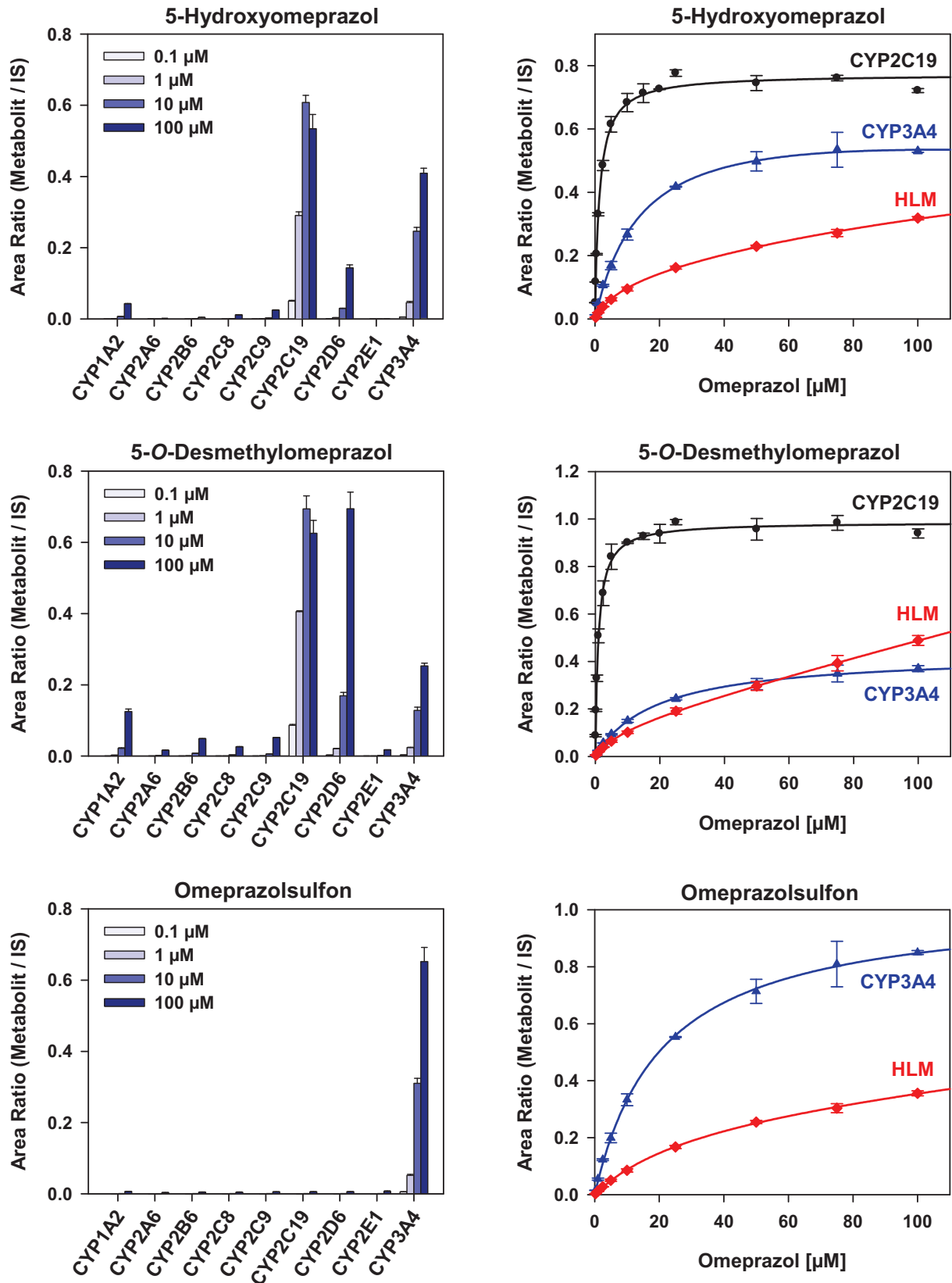


Abb. 37 Metabolismus von Omeprazol zu 5-Hydroxyomeprazol (oben), 5-O-Desmethylomeprazol (Mitte) und Omeprazolsulfon (unten). Untersuchung einzelner rekombinanter CYP-Enzyme (links). Substratsättigungskurven für ausgewählte rekombinante CYP-Enzyme und für humane Lebermikrosomen (HLM) (rechts).

Anhand der erhaltenen Ergebnisse zum Metabolismus des Omeprazol sind Interaktionen mit Arzneistoffen denkbar, die ebenfalls durch die Enzyme CYP2C19 und CYP3A4 metabolisiert und die gleichzeitig mit Omeprazol eingenommen werden.

1.9 Beurteilung der Interaktion von Clopidogrel und Omeprazol

Durch die In-vitro-Inkubationen von Clopidogrel und der Bestimmung seiner aktiven Metaboliten sollte herausgefunden werden, ob die Bioaktivierung durch Omeprazol gehemmt werden kann, was den beobachteten Anstieg kardiovaskulärer Ereignisse bei der gleichzeitigen Einnahme von Clopidogrel und Omeprazol erklären würde.⁹² Die in der Literatur angeführte Hemmung von CYP2C19 durch Omeprazol konnte anhand der durchgeführten In-vitro-Experimente bestätigt werden (s. II.1.6). Sie dürfte aber für die Arzneimittelinteraktion nicht der einzige Grund sein, da die Bioaktivierung von Clopidogrel nicht nur durch dieses CYP-Enzym erfolgt (s. II.1.4). Demnach erscheint der in der Literatur angeführte CYP2C19-Polymorphismus als Ursache für die unterschiedliche Ansprechrate bei der Clopidogreltherapie ebenfalls fragwürdig.¹⁶⁶ Zusätzlich konnte eine Hemmung von weiteren an der Bioaktivierung des Clopidogrels beteiligten CYP-Enzymen durch Omeprazol nachgewiesen werden (s. II.1.7). Bei einer Applikation von 20 mg Omeprazol wird eine maximale Plasmakonzentration von etwa 400 ng/ml erreicht (Fachinformation Omegamma[®]), was einer Konzentration von 1.2 µM entspricht. Im In-vitro-Versuch wurde die Aktivität für die Biotransformation von Clopidogrel zum 2-Oxo-Derivat durch Omeprazol in diesem Konzentrationsbereich nur um etwa 5 % herabgesetzt (Abb. 33). Allerdings wurde in der Literatur eine mechanismusbasierte CYP2C19-Inhibition von Omeprazol beschrieben, so dass sich im Vergleich zu den Experimenten ein stärkerer In-vivo-Effekt ergeben kann.¹⁶⁷ Aufgrund der starken Hydrolyse von Clopidogrel zum inaktiven Clopidogrelat werden nur sehr geringe Plasmakonzentrationen von < 1 ng/ml erreicht¹⁶⁸, die unterhalb der ermittelten K_m -Werte für die Bioaktivierungsreaktionen (s. II.1.4) liegen, was eine Beeinträchtigung der Bioaktivierung durch Inhibitoren erleichtert. Zwischenzeitlich durchgeführte klinische Studien zur Interaktion von Clopidogrel mit Protonenpumpeninhibitoren zeigten unterschiedliche Ergebnisse, so dass eine Interaktion von Clopidogrel mit Omeprazol nicht eindeutig bewiesen ist.¹⁵⁶ Zudem wurden weitere Enzyme identifiziert, die neben CYP-Enzymen an der Bioaktivierung von Clopidogrel beteiligt

sind. Ein Beispiel ist die Paraoxonase, die ebenfalls die Hydrolyse des Thiolactons katalysiert.^{169,170} Eine Alternative zum Clopidogrel stellt das als Weiterentwicklung auf dem Markt befindliche Prasugrel dar, dessen Metabolismus zum 2-Oxo-Derivat durch die wesentlich aktiveren Carboxylesterasen katalysiert wird und somit eine mögliche Interaktion mit Protonenpumpeninhibitoren vermieden werden kann.¹⁷¹ Eine weitere Maßnahme ist eine Substitution von Omeprazol, z. B. durch Pantoprazol, da Pantoprazol eine wesentlich schwächere Inhibition von CYP2C19 bewirkt.^{167,172}

2 Carboxylesterasen (CES)

2.1 HPLC/UV-Analyse der Hydrolyseprodukte

Zur Untersuchung der Esteraseaktivität werden v. a. Modellsubstrate eingesetzt, da diese mit einer hohen Geschwindigkeit umgesetzt werden und die Produkte oft leichter detektiert werden können. Häufig werden dabei Phenylacetat, Naphthylacetat, *p*-Nitrophenylacetat, 4-Methylumbelliferylacetat und Methyl-4-nitrobenzoat verwendet.⁷⁰ Die Detektion des aus Phenylacetat entstehenden Phenols erfolgt hauptsächlich spektralphotometrisch nach Umsetzung mit 4-Aminoantipyrin und Kaliumhexacyanoferrat(III).^{70,173} *p*-Nitrophenol (pK_S 7.2), das Reaktionsprodukt des am weitesten verbreiteten Substrates *p*-Nitrophenylacetat, liegt im Inkubationspuffer großteils deprotoniert vor und kann daher photometrisch selektiv bei 400 nm vermessen werden.¹⁷⁴ Die Hydrolyse von 4-Methylumbelliferylacetat kann fluorimetrisch nach Anregung bei 355 nm verfolgt werden.^{70,74} Werden Arzneistoffe als Substrate verwendet, ist in den überwiegenden Fällen eine chromatographische Trennung erforderlich. Für die folgenden Untersuchungen wurden Phenylacetat (PA), *p*-Nitrophenylacetat (PNPA), 4-Methylumbelliferylacetat (4-MUA), Methyl-4-nitrobenzoat (M4NB) als literaturbekannte Esterasesubstrate sowie Mycophenolatmofetil (MMF) und 3-*O*-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (AKBA) ausgewählt (Abb. 38). Zur Quantifizierung ihrer Hydrolyseprodukte wurden RP-HPLC/UV-Methoden entwickelt. Aufgrund der vorwiegend sauren Analyten wurde der Wasserphase des Fließmittels 0.05 % Trifluoressigsäure zugesetzt. Der Fließmittelgradient wurde so eingestellt, dass das Substrat und der Metabolit innerhalb einer Laufzeit von 6 min eluierten. In Abb. 39 sind die Chromatogramme der mit humanen Lebermikrosomen inkubierten Substrate dargestellt. Als Detektionswellenlänge wurde das Absorptionsmaximum des jeweiligen Metaboliten gewählt. Im verwendeten sauren Fließmittel liegen die Analyten ungeladen vor, wodurch sich im Vergleich zu den photometrischen Assays andere Absorptionsmaxima ergeben können. Beispielsweise musste die Detektion von *p*-Nitrophenol bei 320 nm erfolgen. Da die Substrate oft von den Hydrolyseprodukten abweichende Absorptionsmaxima besitzen, ergeben sich für diese z. T. kleinere Peaks (Abb. 39), obwohl diese in einer weitaus höheren Konzentration vorliegen. Aufgrund der höheren Lipophilie der Substrate eluierten diese später als die

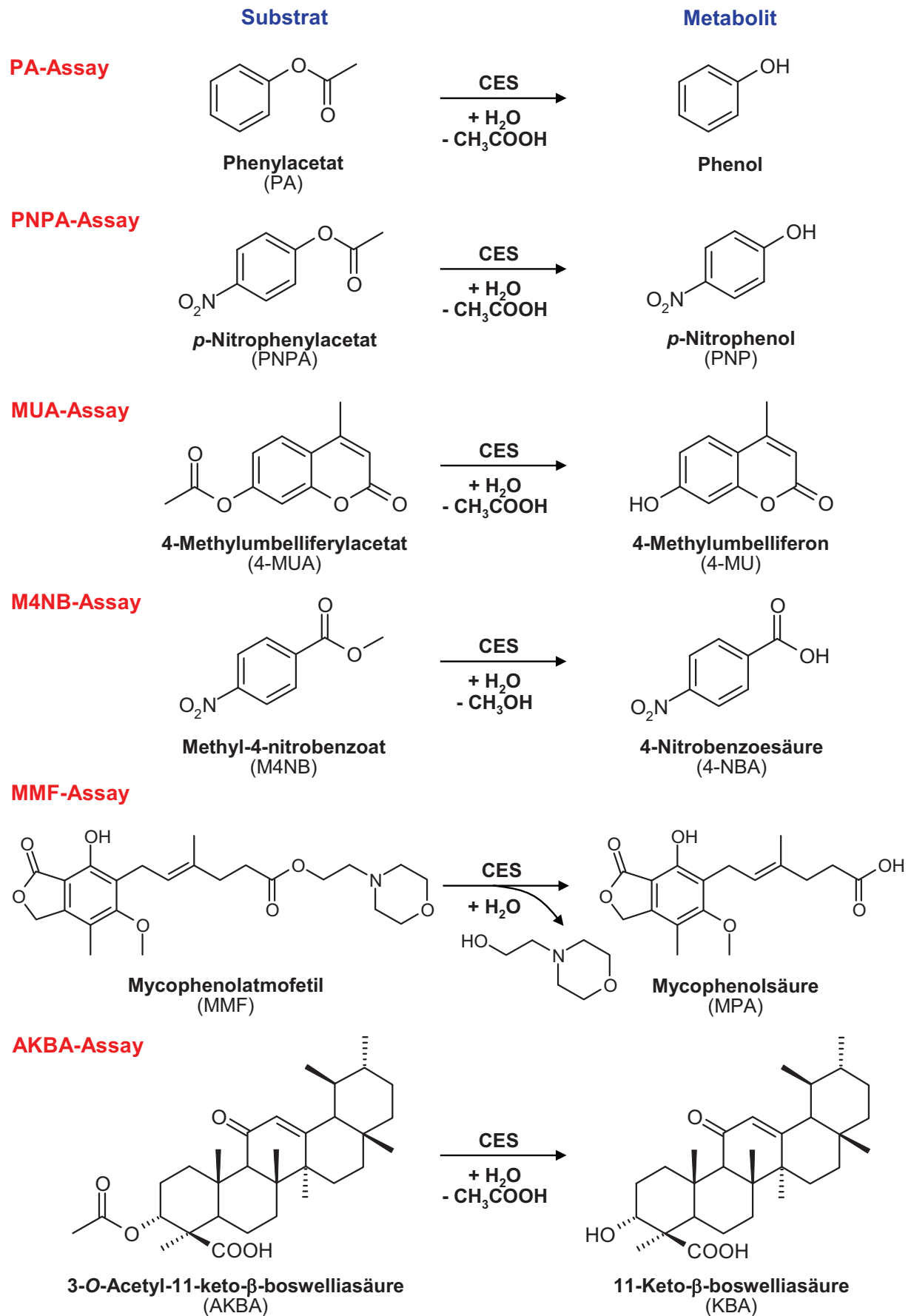


Abb. 38 Substratreaktionen der Carboxylesterase-Assays.

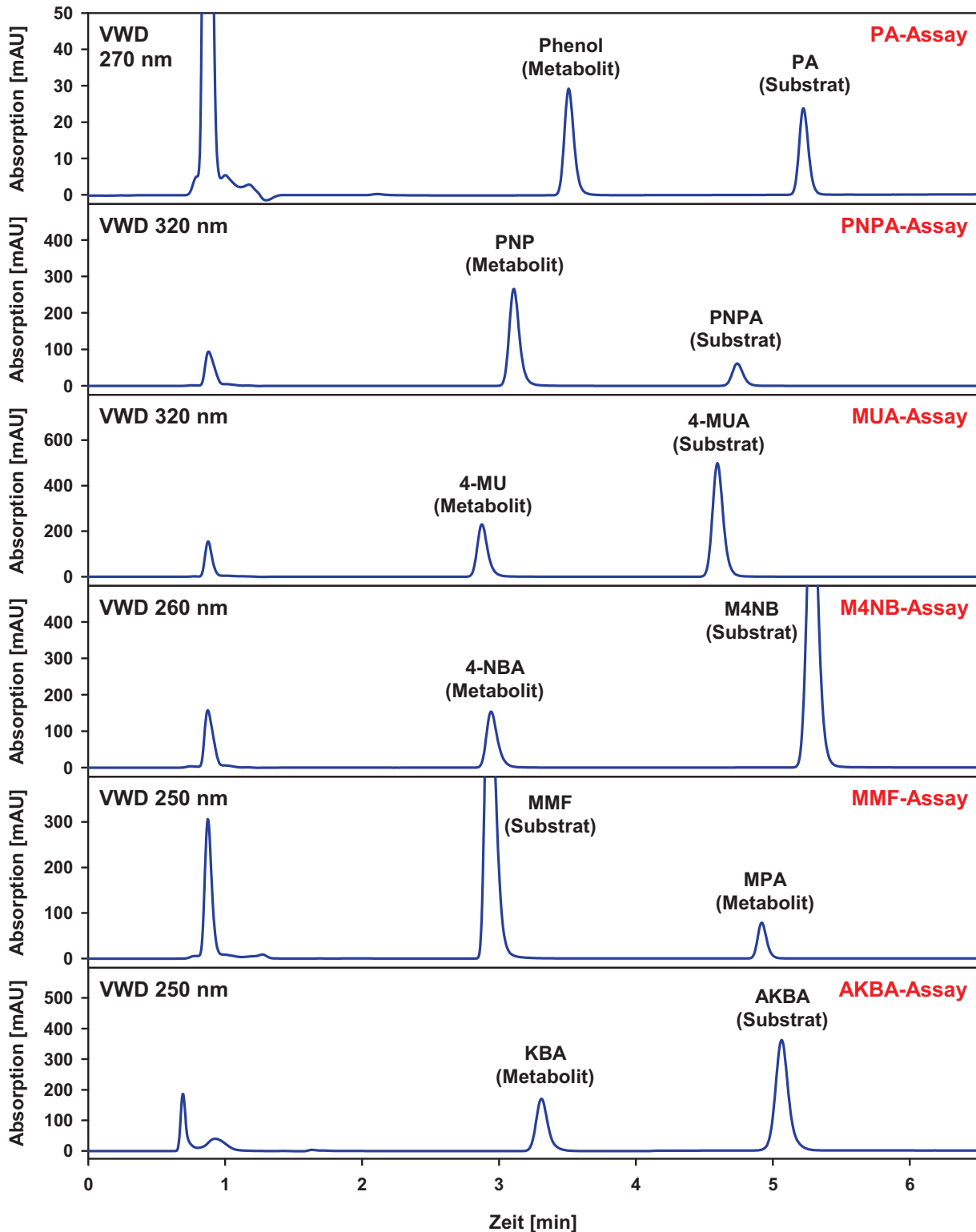


Abb. 39 HPLC/UV-Chromatogramme der Inkubationen von humanen Lebermikrosomen mit den Substraten Phenylacetat (PA), *p*-Nitrophenylacetat (PNPA), Methyl-4-nitrobenzoat (M4NB), 4-Methylumbelliferylacetat (4-MUA), Mycophenolatmofetil (MMF) und 3-*O*-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (AKBA) zur Quantifizierung der Enzymprodukte Phenol, *p*-Nitrophenol (PNP), 4-Nitrobenzoesäure (4-NBA), 4-Methylumbelliferon (4-MU), Mycophenolsäure (MPA) und 11-Keto- β -boswelliasäure (KBA).

dazugehörigen Metaboliten. Eine Ausnahme bildet Mycophenolatmofetil, das im Gegensatz zur Mycophenolsäure basische Eigenschaften besitzt. Durch den Zusatz von Trifluoressigsäure kann durch den dabei auftretenden Ionenpaareffekt auch für solche basischen Analyten eine ausreichende Retention auf dem RP-Material erhalten werden. Mit Hilfe von Standardsubstanzen der jeweiligen Hydrolyseprodukte wurde eine Kalibrierung der HPLC/UV-Methoden im Konzentrationsbereich von 0.25 bis 25 µg/ml durchgeführt und Regressionsgeraden mit hohem Bestimmtheitsmaß erhalten (Abb. 40).

Stabilität der Substrate

Ein Nachteil der meisten CES-Substrate ist ihre Instabilität, da sie im Inkubationspuffer hydrolysieren. Aus diesem Grund ist die Anfertigung von Blindproben ohne Enzym erforderlich und die Messwerte sind entsprechend zu korrigieren. Hohe Blindwerte können zu einer größeren Streuung der Messwerte führen und sind nicht erwünscht. Bei der HPLC-Analyse ist die Stabilität von noch größerer Bedeutung als bei den spektralphotometrischen Assays, da hierbei die Proben längere Zeit im Autosampler verbleiben und nur nacheinander vermessen werden können. Zur Untersuchung der Stabilität der Substrate wurden diese in verschiedenen Lösungsmitteln in einer Konzentration von 500 µM an drei aufeinanderfolgenden Tagen vermessen, während diese im Autosampler bei Raumtemperatur gelagert wurden. Als besonders instabil erwiesen sich PNPA und 4-MUA, die im Puffer bei pH 7.4 innerhalb von 3 Tagen nahezu vollständig hydrolysierten, während Methyl-4-nitrobenzoat wesentlich stabiler war. Eine Absenkung des pH-Wertes verbesserte die Stabilität der Substrate erheblich. Aus diesem Grund wurde der Stopplösung für die Enzyminkubation 5 % Essigsäure zugesetzt, wodurch die Hydrolyse stark verlangsamt war. Sie konnte aber nicht vollständig unterdrückt werden. Für AKBA konnte keine spontane Hydrolyse beobachtet werden, dennoch wurde auf den Zusatz von Essigsäure nicht verzichtet, da durch das Ansäuern der Proben die Chromatographie verbessert werden konnte. Durch kurze Inkubationszeiten und eine Temperierung des Autosamplers auf 5 °C konnten hohe Blindwerte verhindert werden. Weiterhin ist zur Minderung des Blindwertes die Senkung des pH-Wertes des Inkubationspuffers von 7.4 auf 6.5 eine Option, wie es beispielsweise bei den Glutathion-S-Transferasen praktiziert wird (s. II.7.2.5).

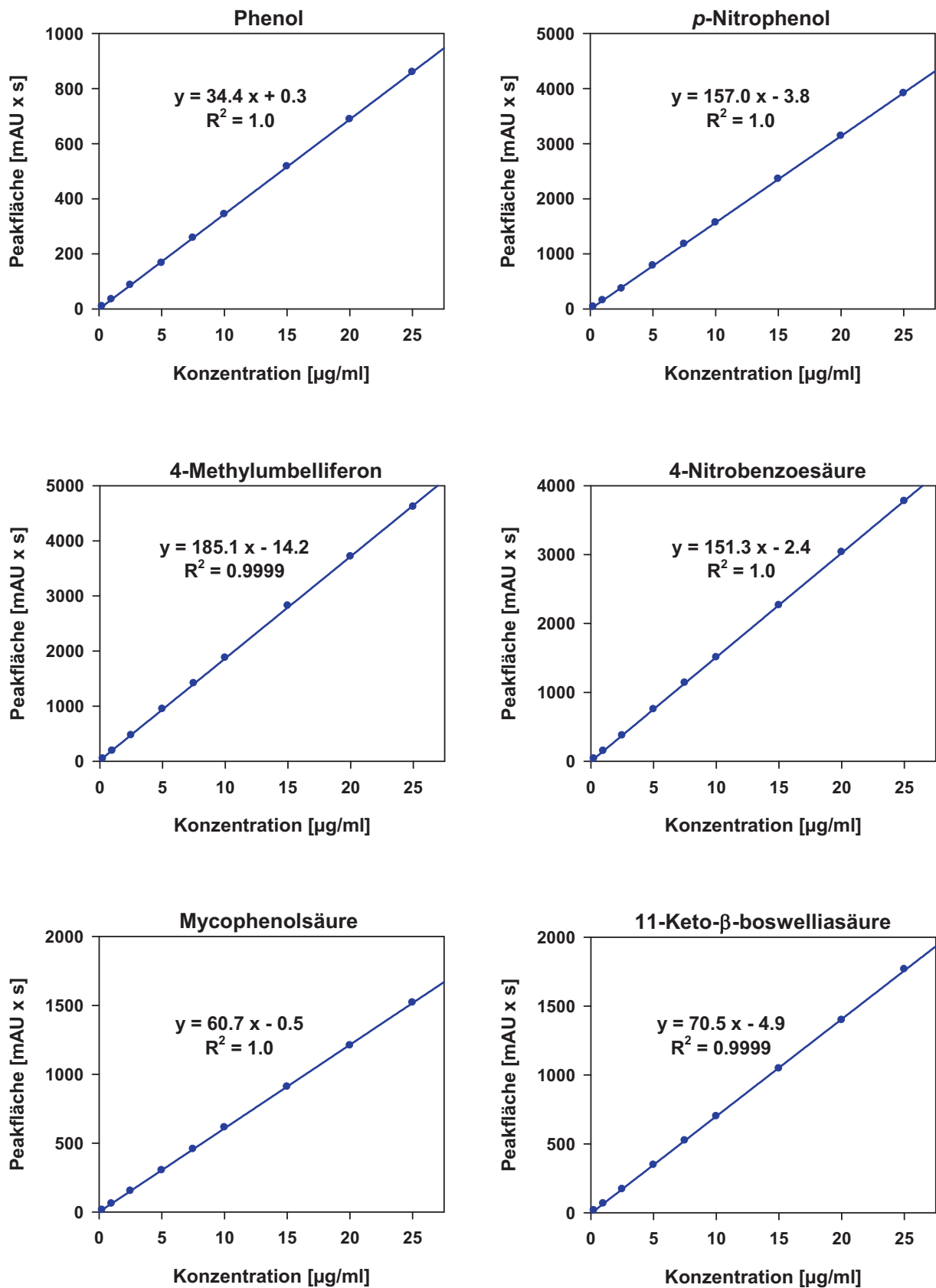


Abb. 40 Überprüfung der Linearität der HPLC/UV-Analysen zur Quantifizierung der Reaktionsprodukte der Carboxylesterase-Assays.

2.2 Umsetzung der Substrate durch humane Subzellfraktionen und Carboxylesterase-Enzyme

Zur Untersuchung der Esteraseaktivität wurden die Substrate Phenylacetat, *p*-Nitrophenylacetat, 4-Methylumbelliferylacetat, Methyl-4-nitrobenzoat, Mycophenolatmofetil und 3-*O*-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure mit verschiedenen humanen Subzellfraktionen aus Leber und Dünndarm bzw. mit kommerziell erhältlichen humanen Carboxylesterase-Enzymen umgesetzt. Von jedem Substrat wurden drei verschiedene Konzentrationen verwendet und aus den erhaltenen Produktkonzentrationen nach Korrektur mit Hilfe der jeweiligen Blindproben die Umsetzungsgeschwindigkeiten berechnet (Abb. 41). Bei allen Substraten besitzt von den Lebersubzellfraktionen die cytosolische Fraktion, bezogen auf die Proteinkonzentration, die geringste Umsetzungsgeschwindigkeit, die über die S9-Fraktion zu den Mikrosomen auf etwa das 10-fache ansteigt. Die mittels Lebermikrosomen ermittelten Umsetzungsgeschwindigkeiten sind für die meisten Substrate größer als 1 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ und liegen damit deutlich höher als beispielsweise die der CYP-Enzyme (s. II.3) oder der Glutathion-S-Transferasen (s. II.7). Die höchsten Umsetzungsgeschwindigkeiten wurden für die Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat gemessen (Abb. 41). Phenylacetat, *p*-Nitrophenylacetat und 4-Methylumbelliferylacetat sind unselektive Substrate, da diese von allen getesteten Subzellfraktionen und rekombinanten Carboxylesterase-Enzymen umgesetzt werden (Abb. 41). Methyl-4-nitrobenzoat und Mycophenolatmofetil zeigen eine Selektivität zur Familie CES1 und werden kaum durch CES2 metabolisiert (Abb. 41), was die bisherigen Literaturangaben bestätigt.^{73,175} Während alle Lebersubzellfraktionen diese Substrate hydrolysieren, ist die Aktivität der intestinalen Mikrosomen sehr gering, da im Dünndarm v. a. CES2 und kaum CES1 exprimiert wird.⁶⁴ Bei allen Substraten ist die Umsetzungsgeschwindigkeit bei 1000 μM deutlich höher als bei 250 μM , so dass die K_m -Werte im dreistelligen micromolaren Bereich liegen dürften. Für Phenylacetat gibt es die größten Unterschiede in der Substratsättigung bei den einzelnen Enzymen. Eine Ausnahme bildet die AKBA, für die aufgrund der schlechten Löslichkeit im Inkubationspuffer niedrigere Konzentrationen verwendet wurden. Im Gegensatz zu Krüger und Mitarbeitern wurde eine ausgeprägte enzymatische Hydrolyse von AKBA beobachtet, die allerdings langsamer ist als die

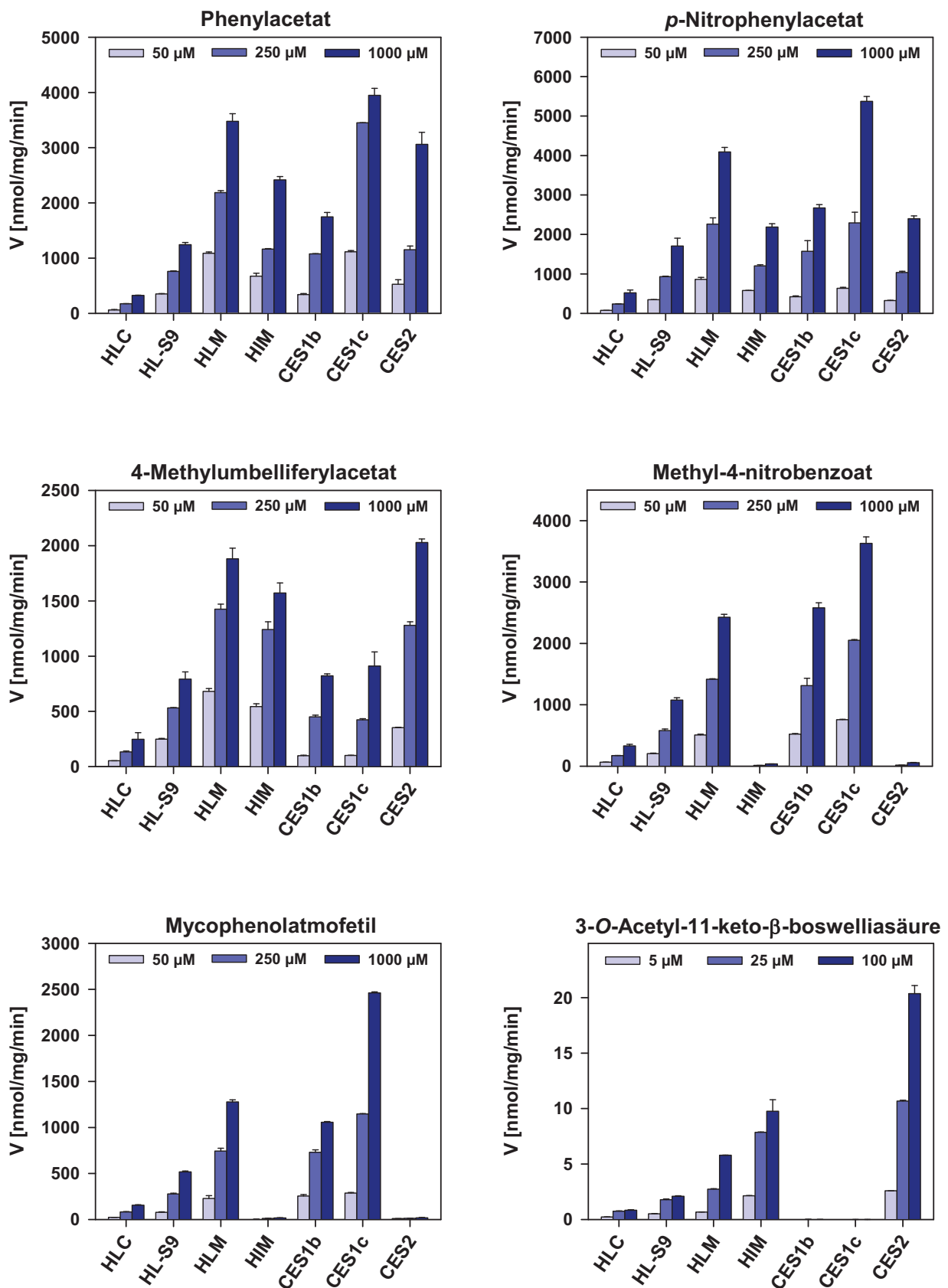


Abb. 41 Aktivitäten einzelner humaner Subzellfraktionen und rekombinanter Carboxylesterase-Enzyme für die Umsetzung der ausgewählten Substrate.

von den anderen Substraten.¹⁷⁶ Die höchste Aktivität besitzen die intestinalen Mikrosomen und die CES2, während CES1b und CES1c AKBA kaum umsetzen (Abb. 41). Es müssen daher neben den untersuchten Carboxylesterase-Enzymen weitere Isoenzyme existieren, die an der Deacetylierung der AKBA beteiligt sind, was die Aktivität der humanen Lebermikrosomen erklären würde.

2.3 Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat (PNPA-Assay)

2.3.1 Enzymkinetik

Im Folgenden wurden für die Umsetzung von PNPA durch die humanen Subzellfraktionen und die rekombinanten Carboxylesterase-Enzyme Substrat-sättigungskurven aufgenommen und daraus die in Tab. 6 angegebenen K_m - und V_{max} -Werte durch nichtlineare Regression nach der Michaelis-Menten-Gleichung erhalten. Zum Vergleich wurden Literaturwerte, die von einem photometrischen Assay stammen, angegeben (Tab. 6).⁷³ Alle K_m -Werte liegen über 100 μM . PNPA besitzt daher eine deutlich geringere Affinität zu den Carboxylesterasen als das zuvor untersuchte Clopidogrel (s. II.1.1). Die mit Hilfe der HPLC/UV-Methode ermittelten K_m -Werte sind in der Regel höher als die Literaturwerte. Der Unterschied in der Affinität des Substrates zu den einzelnen Enzymen ist nur gering ausgeprägt. Am schnellsten wurde PNPA durch die Lebermikrosomen und durch CES1c umgesetzt. Es wurden in allen Fällen deutlich höhere maximale Umsetzungs-

Tab. 6 K_m - und V_{max} -Werte für die Hydrolyse von PNPA durch humane Subzellfraktionen und rekombinante Carboxylesterase-Enzyme.

Enzym	HPLC/UV-Assay		Literatur ⁷³	
	K_m [μM]	V_{max} [nmol/mg/min]	K_m [μM]	V_{max} [nmol/mg/min]
HLC	449 \pm 49	769 \pm 37	-	-
HL-S9	280 \pm 27	2196 \pm 76	-	-
HLM	271 \pm 24	5595 \pm 174	198 \pm 17	3410 \pm 80
HIM	137 \pm 31	2055 \pm 131	182 \pm 25	1290 \pm 50
CES1b	332 \pm 54	3672 \pm 231	208 \pm 41	1620 \pm 90
CES1c	535 \pm 19	7941 \pm 134	441 \pm 67	1870 \pm 110
CES2	459 \pm 113	3479 \pm 376	173 \pm 22	718 \pm 24

geschwindigkeiten ermittelt, die für CES1c und CES2 etwa dem Fünffachen der Literaturwerte entsprechen. Eine Ursache hierfür könnte die in dieser Arbeit verwendete kurze Inkubationszeit von 5 min sein.

2.3.2 Inhibition durch Bis(*p*-nitrophenyl)phosphat

Als Positivkontrolle zur Evaluierung des HPLC/UV-basierten Inhibitionsassays wurde Bis(*p*-nitrophenyl)phosphat (BNPP) untersucht, das seit langem als Inhibitor der Carboxylesterasen bekannt ist.⁷² Bis auf CES1c, das in der Literatur ebenfalls am wenigsten durch BNPP gehemmt wurde, waren die IC₅₀-Werte unterhalb von 1 µM (Tab. 7). Für alle Enzyme waren die erhaltenen IC₅₀-Werte höher als die Literaturwerte.⁷³ CES2 wurde durch BNPP am stärksten gehemmt, was die Literaturangaben bestätigt. Anhand der ermittelten Hill-Koeffizienten (n_H) ist ersichtlich, dass mit den Subzellfraktionen, die mehrere Carboxylesterase-Enzyme enthalten, flache Inhibitionskurven erhalten wurden, was bei den intestinalen Mikrosomen am deutlichsten ausgeprägt war. Mit den rekombinanten Carboxylesterase-Enzymen waren die Steigungen der Inhibitionskurven wesentlich größer. Da mehrere Carboxylesterase-Enzyme durch BNPP gehemmt werden, kann BNPP als ein unselektiver Inhibitor von Carboxylesterasen angesehen werden.

Tab. 7 IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten (n_H) für die Hemmung der Hydrolyse von PNPA (500 µM) durch Bis(*p*-nitrophenyl)phosphat bei der Inkubation mit verschiedenen humanen Subzellfraktionen und rekombinanten Carboxylesterase-Enzymen.

Enzym	HPLC/UV-Assay		Literatur ⁷³
	IC ₅₀ -Wert [µM]	n_H	IC ₅₀ -Wert [µM]
HLC	0.246 ± 0.040	-0.77	-
HL-S9	0.706 ± 0.200	-0.70	-
HLM	0.578 ± 0.175	-0.57	0.099
HIM	0.195 ± 0.161	-0.49	0.032
CES1b	0.175 ± 0.023	-1.33	0.024
CES1c	3.289 ± 0.293	-1.42	0.788
CES2	0.054 ± 0.008	-1.17	0.010

2.4 Inhibition durch Pflanzenextrakte

Nach der Optimierung der Inhibitionsassays wurde die Beeinflussung der Aktivität der Carboxylesterasen durch Extrakte ausgewählter officinell verwendeter Arzneipflanzen untersucht (Abb. 42). Als Testsubstrat wurde zunächst *p*-Nitrophenylacetat verwendet, das durch mehrere Isoenzyme umgesetzt wird. Aufgrund der Instabilität des Substrates wurden schonende Inkubationsbedingungen von 25 °C und ein pH-Wert des Puffers von 6.5 sowie eine kurze Inkubationszeit von 5 min gewählt. Als Enzymquelle wurde die S9-Fraktion der humanen Leber verwendet, die sowohl die membrangebundenen als auch die cytosolischen Esterasen enthält.

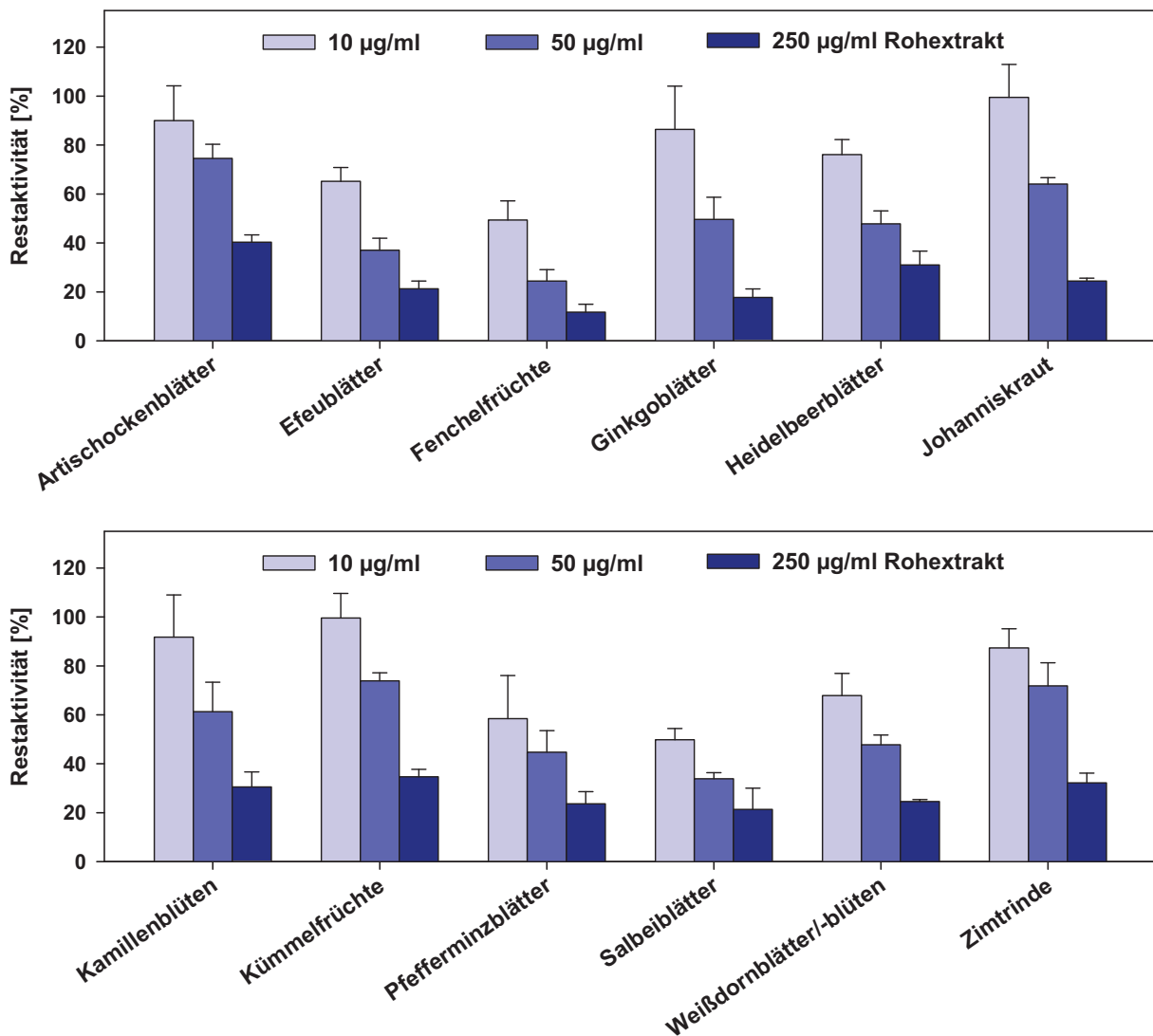


Abb. 42 Inhibition der Carboxylesterasen durch Pflanzenextrakte. Die Extraktkonzentrationen sind bezogen auf die Drogeneinwaage (Auszugsmittel: Methanol 80 %; Substrat: *p*-Nitrophenylacetat; Enzymquelle: Humane Leber S9-Fraktion).

Die Konzentration der untersuchten methanolischen Pflanzenextrakte betrug 10, 50 und 250 µg/ml, bezogen auf die Drogeneinwaage. Alle getesteten Pflanzenextrakte hemmten konzentrationsabhängig die Carboxylesterasen (Abb. 42). Bei einigen Arzneipflanzen, wie z. B. Fenchel Früchte, Pfefferminzblätter oder Salbeiblätter, sank die Restaktivität bei einer Extraktkonzentration von 10 µg/ml bereits unter 50 %, so dass von einer starken Inhibition gesprochen werden kann. Durch die höchste Konzentration wurde bei keinem Extrakt eine vollständige Hemmung erzielt. Die mit diesem Assay beobachtete starke Hemmung deutet darauf hin, dass die Pflanzenextrakte mehrere Carboxylesterase-Isoenzyme beeinflussen. Da die wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe der untersuchten Arzneipflanzen zu unterschiedlichen Naturstoffklassen gehören, kann man vermuten, dass die Inhibition der Carboxylesterasen von keiner speziellen Inhaltsstoffgruppe verursacht wird. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass mehrere Inhaltsstoffe für die gemessene Inhibition verantwortlich sind. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Reihe von Pflanzenextrakten die Carboxylesterasen hemmen und so Arzneimittelinteraktionen verursachen können. Bisher wurde nur von einer Esteraseinhibition durch Grapefruitsaft berichtet.⁷⁶ Um Aussagen über die Beeinflussung der Resorption von Esterprodrugs zu machen, sollten weitere Inhibitionsexperimente mit intestinalen Subzellfraktionen bzw. mit der hauptsächlich intestinal vorkommenden CES2 durchgeführt werden.

3 Cytochrom-P450-Enzyme (CYP)

In diesem Kapitel werden LC/MS/MS-basierte Assays beschrieben, mit denen die Hemmung einzelner CYP-Enzyme untersucht werden kann. Ebenso wurde eine Charakterisierung häufig eingesetzter CYP-Substrate durchgeführt. Bei den bisher im Arbeitskreis vorhandenen Assays zur Untersuchung der CYP-Inhibition von Pflanzenextrakten wurden die entstandenen Metaboliten durch eine LC/MS-Analyse mit einem Single-Quadrupol-Massenspektrometer und vorgeschalteter Online-Festphasenextraktion detektiert.^{118,143} Die Quantifizierung soll nun durch eine wesentlich selektivere LC/MS/MS-Analyse mit Hilfe eines Triple-Quadrupol-Detektors

Tab. 8 Von der Food and Drug Administration (FDA) vorgeschlagene Substratreaktionen für In-vitro-Untersuchungen der Inhibition von CYP-Enzymen.²

Enzym	Substratreaktion	
	bevorzugt	akzeptiert
CYP1A2	Phenacetin- <i>O</i> -deethylierung ^a	7-Ethoxyresorufin- <i>O</i> -deethylierung, Theophyllin- <i>N</i> -demethylierung, Coffein- <i>N</i> -demethylierung, Tacrin-1-hydroxylierung ^a
CYP2A6	Cumarin-7-hydroxylierung ^a , Nicotin-5'-oxidation	
CYP2B6	Efavirenzhydroxylierung, Bupropionhydroxylierung ^a	Propofolhydroxylierung, S-Mephenytoin- <i>N</i> -demethylierung
CYP2C8	Taxol-6 α -hydroxylierung	Amodiaquin- <i>N</i> -deethylierung ^a , Rosiglitazon- <i>p</i> -hydroxylierung
CYP2C9	Tolbutamidhydroxylierung ^a , S-Warfarin-7-hydroxylierung, Diclofenac-4'-hydroxylierung ^a	Flurbiprofen-4'-hydroxylierung, Phenytoin-4-hydroxylierung
CYP2C19	S-Mephenytoin-4'-hydroxylierung ^a	Omeprazol-5-hydroxylierung ^a , Fluoxetin- <i>O</i> -dealkylierung
CYP2D6	(\pm)-Bufuralol-1'-hydroxylierung, Dextromethorphan- <i>O</i> -demethylierung ^a	Debrisoquin-4-hydroxylierung
CYP2E1	Chlorzoxazon-6-hydroxylierung ^a	4-Nitrophenol-2-hydroxylierung ^a , Laurinsäure-11-hydroxylierung, Anilin-4-hydroxylierung
CYP3A4/5	Midazolam-1'-hydroxylierung ^a , Testosteron-6 β -hydroxylierung ^a	Erythromycin- <i>N</i> -demethylierung, Dextromethorphan- <i>N</i> -demethylierung, Triazolam-4-hydroxylierung, Terfenadin- <i>C</i> -hydroxylierung, Nifedipinoxidation

^a in dieser Arbeit untersuchte Substratreaktionen

erfolgen. Für jedes CYP-Enzym wurde mindestens eines der von der FDA vorgeschlagenen Substrate verwendet (Tab. 8). Damit stand für jedes der neun CYP-Enzyme, die hauptsächlich am Arzneistoffmetabolismus beteiligt sind, ein Inhibitionsassay zur Verfügung. Im Rahmen der Validierung der CYP-Assays wurden die Inkubationsbedingungen optimiert, während für vorangehende Arbeiten auf bisher vorhandene Literaturdaten zurückgegriffen werden musste. Im Rahmen der Charakterisierung der Substrate wurde die Isoenzymselektivität untersucht (s. II.3.4) und die K_m -Werte bestimmt (s. II.3.3). Anschließend wurde die Isoenzymselektivität von häufig eingesetzten CYP-Inhibitoren untersucht (s. II.3.9) und die CYP-Inhibition durch ausgewählte Pflanzenextrakte ermittelt (s. II.3.12).

3.1 Entwicklung von LC/MS/MS-basierten CYP-Assays

Substratreaktionen

Als Substrate für die Umsetzung durch CYP-Enzyme wurden Phenacetin (CYP1A2), Tacrin (CYP1A2), Cumarin (CYP2A6), Bupropion (CYP2B6), Amodiaquin (CYP2C8), Tolbutamid (CYP2C9), Diclofenac (CYP2C9), S-Mephenytoin (CYP2C19), Imipramin (CYP2C19), Dextromethorphan (CYP2D6), Chlorzoxazon (CYP2E1), 4-Nitrophenol (CYP2E1), Midazolam (CYP3A) und Testosteron (CYP3A) untersucht (Abb. 43). Für die Quantifizierung der daraus entstehenden Metaboliten (Abb. 43) wurde jeweils eine LC/MS/MS-Methode entwickelt.

Probenvorbereitung und interne Standards

Nach der Inkubation der Proben wurde die Reaktion durch Zugabe von Methanol abgestoppt und das gefällte Protein durch Zentrifugation abgetrennt, wodurch eine hohe Lebensdauer der HPLC-Säule gewährleistet wurde. Der erhaltene Überstand konnte direkt in das HPLC-System injiziert werden, was einen wesentlich höheren Probendurchsatz ermöglichte. Dadurch konnten andere, häufig bei HPLC-basierten Enzym-Assays eingesetzte kritische Probenaufbereitungsschritte, wie z. B. eine Filtration, eine Flüssig-Flüssig-Extraktion oder ein Abdampfen der Probe, vermieden werden. Aufgrund der Probenvorbereitung (Proteinfällung) und wegen der zeitlichen Schwankung des Messsignals des Massenspektrometers wurde den Proben ein interner Standard zugefügt (Abb. 43). Idealerweise sollten bei einer LC/MS-Analyse isotopenmarkierte Derivate der Metaboliten als interner Standard verwendet werden.

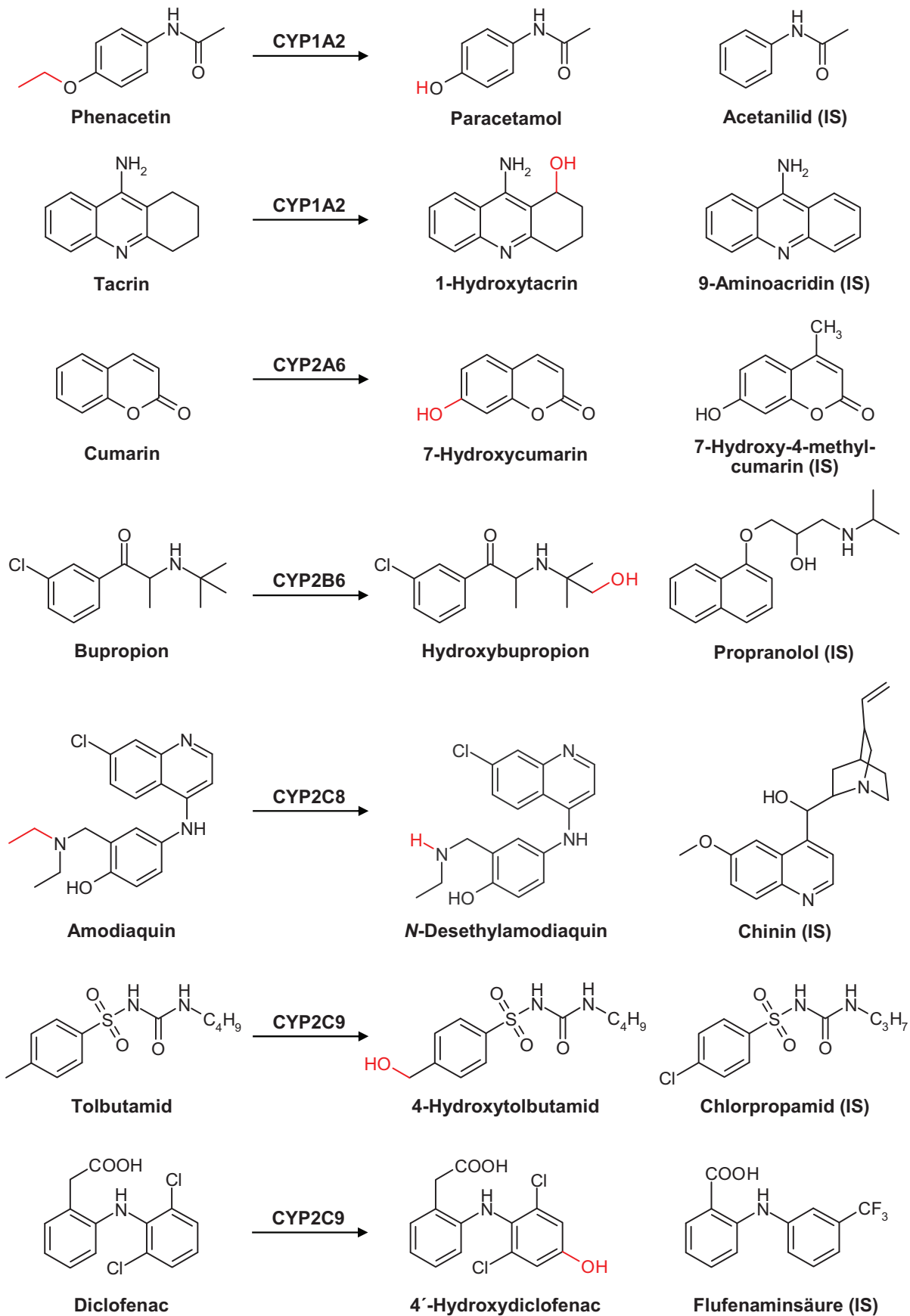


Abb. 43 Reaktionen für die Umsetzung der ausgewählten Substrate durch CYP-Enzyme und verwendete interne Standardsubstanzen (IS).

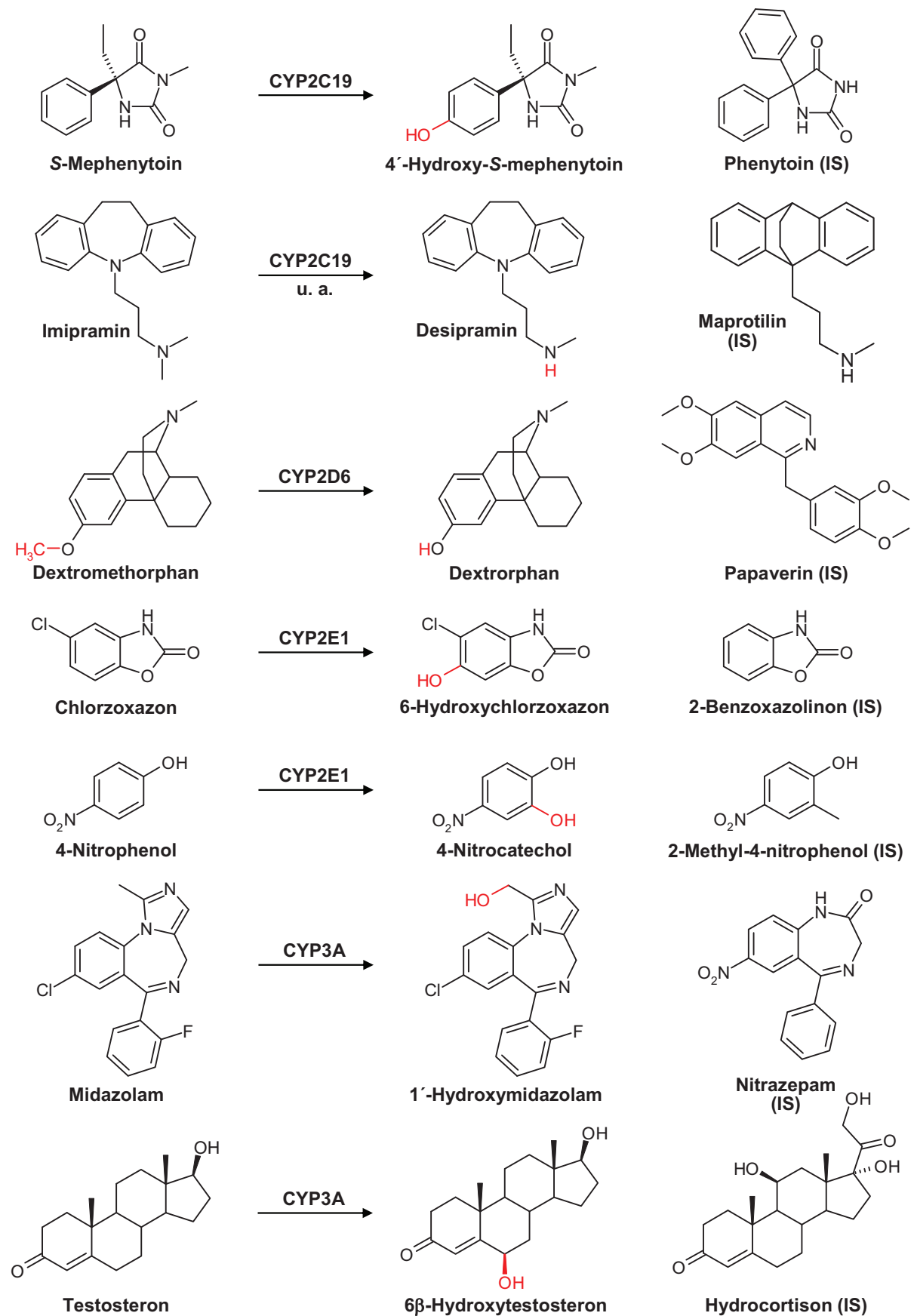


Abb. 43 (Fortsetzung) Reaktionen für die Umsetzung der ausgewählten Substrate durch CYP-Enzyme und verwendete interne Standardsubstanzen (IS).

Ein wesentlicher Vorteil solcher Substanzen besteht darin, dass diese dieselbe Retentionszeit besitzen und dadurch Einflüsse von coeluiierenden Substanzen aus der Probenmatrix auf die Signalintensität bei der Auswertung berücksichtigt werden können. Isotopenmarkierte interne Standards sind allerdings sehr teuer und von vielen Substanzen nicht kommerziell erhältlich. Aus diesem Grund wurden jeweils strukturverwandte Substanzen der Metaboliten als interne Standards ausgewählt (Abb. 43), die ähnliche chromatographische Eigenschaften besitzen. Beispielsweise eigneten sich für die Metaboliten Paracetamol, 7-Hydroxycumarin, 4'-Hydroxymephenytoin und 1'-Hydroxymidazolam die internen Standards Acetanilid, 7-Hydroxy-4-methylcumarin, Phenytoin und Nitrazepam (Abb. 43). Einige dieser internen Standards wurden bereits durch A. Frank verwendet.¹⁴³

Chromatographiesäule

Bei den meisten Assays wurde eine Synergi Max-RP-Säule (50 x 2.0 mm; 4 µm) zur Trennung verwendet. Diese kieselgelbasierte endcapped RP12-Säule ist über einen weiten pH-Bereich stabil und für Analyten geeignet, die mit einer RP18-Säule nicht ausreichend getrennt werden können. Durch die C12-Modifizierung kann das Endcapping im Vergleich zum RP18-Material effektiver durchgeführt werden. Weniger Silanolgruppen bleiben dabei unmodifiziert und man erhält daher eine niedrige Restsilanolaktivität. Für basische Analyten lassen sich schärfere Peaks mit einer höheren Peaksymmetrie erzielen als mit vergleichbaren RP18-Phasen. Weiterhin besitzt das Säulenmaterial eine hohe Lebensdauer und es kommt kaum zu einem Säulenbluten, weshalb diese Säule besonders für LC/MS-Anwendungen geeignet ist. Für den Phenacetin- und den Midazolam-Assay wurde eine Zorbax Bonus-RP-Säule (2.1 x 50 mm; 3.5 µm) eingesetzt, in deren Alkylkette sich eine Amidgruppe befindet. Durch diese spezielle Modifizierung wird ein verändertes Retentionsverhalten gegenüber anderen RP-Phasen erhalten, was sich u. a. in einer Änderung der Peakreihenfolge äußern kann. Diese Säule eignete sich besonders gut für die Analyse des sehr polaren Paracetamols, für das sich eine stärkere Retention im Vergleich zur Synergi Max-RP-Säule ergab.

Fließmittel und chromatographische Trennung

Als Fließmittelzusatz wurde 0.1 % Ameisensäure verwendet. Zudem wurde der Wasserphase 10 mM Ammoniumacetat zugegeben, wodurch sich der pH-Wert auf

etwa 3.5 erhöht. Dadurch ist sowohl eine Detektion im positiven als auch im negativen Modus möglich, so dass dieses Fließmittel für alle Assays eingesetzt werden konnte. Der Fließmittelgradient wurde so optimiert, dass der Metabolit und der interne Standard innerhalb von 4 min eluierten (Abb. 44). Das Eluat wurde allerdings erst 1.5 min nach der Injektion in das Massenspektrometer geleitet. Polare Matrixbestandteile, die nicht am Säulenmaterial retiniert werden und mit der Totzeit eluieren, wie z. B. Puffersalze oder NADPH, gelangen so nicht in das Massenspektrometer. Bei LC/MS/MS-Analysen wird häufig aufgrund der selektiven Detektion auf eine ausreichende Trennung der Analyten verzichtet, wobei diese sogar oft mit der Totzeit eluieren. Diese Verfahrensweise ist für eine quantitative Bestimmung nicht zu empfehlen, da das Messsignal durch polare Matrixbestandteile oder durch eine bei der Injektion der gepufferten Probe auftretende Änderung des pH-Wertes beeinflusst werden kann. Aus diesen Gründen wurde auf einen ausreichenden Abstand der Peaks zur Totzeit geachtet. Weiterhin können bei Metabolismusuntersuchungen Stellungsisomere auftreten, die Fragment-Ionen mit identischen m/z -Werten ergeben können. In diesen Fällen ist eine chromatographische Trennung erforderlich.

MS/MS-Detektion

Die vorrangig basischen Analyten liegen im sauren Fließmittel nahezu vollständig protoniert vor und können daher empfindlich im positiven Modus detektiert werden. Trotz Ladung wurde eine ausreichende Retention auf dem Säulenmaterial erhalten. Zur Detektion von Analyten mit aciden funktionellen Gruppen, wie z. B. 7-Hydroxycumarin, 4'-Hydroxydiclofenac oder 4'-Hydroxymephenytoin, diente der negative Modus. Die pK_S -Werte dieser Analyten liegen z. T. um einige Einheiten über dem pH-Wert des Fließmittels, daher lässt sich die Empfindlichkeit durch eine Erhöhung des pH-Wertes noch steigern. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte im MRM-Modus, wofür die erforderlichen Kollisionsenergien und Fragmentorspannungen der einzelnen Substanzen zuvor optimiert wurden. Für jeden Analyten wurden zwei Übergänge detektiert und der Übergang mit der jeweils höchsten Signalintensität zur Quantifizierung herangezogen (Quantifier, Q). In Abb. 44 sind exemplarisch die LC/MS/MS-Chromatogramme einiger Assays dargestellt. Durch die Aufzeichnung von zwei Übergängen kann das Peakflächen-

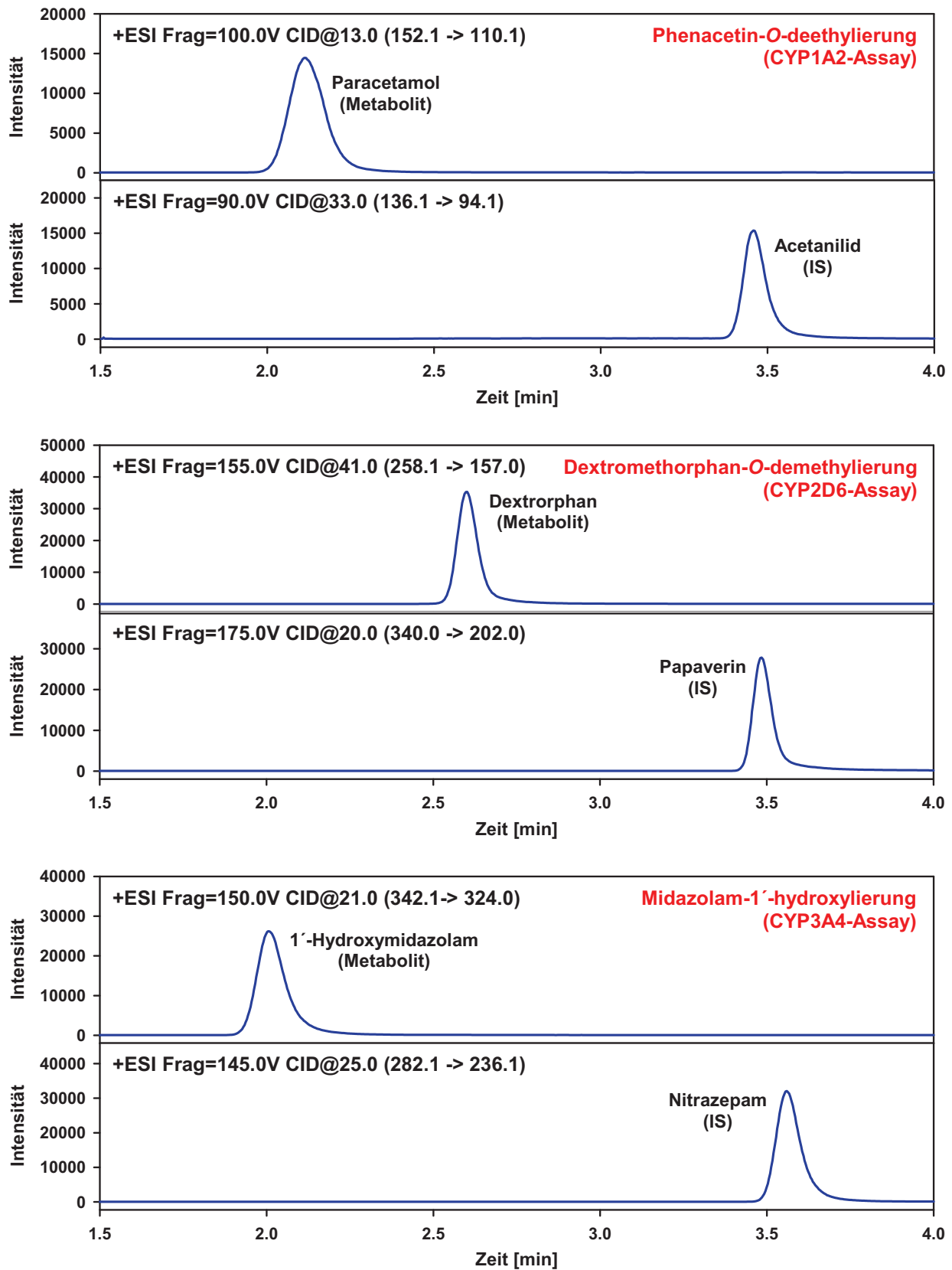


Abb. 44 LC/MS/MS-Chromatogramme spezifischer Markerreaktionen für ausgewählte CYP-Enzyme. Extrahierte Ionenspurten der Quantifizierübergänge des jeweiligen Metaboliten und des internen Standards (IS).

verhältnis dieser beiden Übergänge ermittelt werden (Qualifier-Quantifier-Ratio). Besitzt eine Standardlösung und die Probe unterschiedliche Ratios, bedeutet dies, dass eine coeluiierende Substanz die Detektion stört.

Die hier angewendete LC/MS/MS-Analyse mit Hilfe des Triple-Quadrupol-Detektors bietet im Vergleich zur LC/LC/MS-Analyse vorangegangener Arbeiten^{118,143} einige Vorteile. Die erhöhte Selektivität durch die Detektion von Übergängen im Gegensatz zu den im SIM-Modus erfassten Molekülonen ist insbesondere zur Untersuchung von Proben mit einer komplexen Matrix, wie z. B. Pflanzenextrakten, von Bedeutung. Es lassen sich niedrigere Bestimmungsgrenzen erzielen, so dass für die Inhibitionsassays eine geringere Proteinkonzentration und eine kürzere Inkubationszeit gewählt werden konnte, was die Assays kostengünstiger gestaltet. Aufgrund des niedrigen Substratverbrauches lassen sich selbst bei hochaffinen Substraten exakte kinetische Messungen durchführen.

Variation der Elektronenmultiplierspannung

Ein Geräteparameter bei der massenspektrometrischen Detektion ist die Elektronenmultiplierspannung (Delta EMV), die oft zur Verstärkung des Messsignals verändert wird. Zur Untersuchung des Einflusses der Elektronenmultiplierspannung auf die Bestimmungsgrenze (LOQ) wurden drei Metaboliten der CYP-Assays ausgewählt und das Signal-Rausch-Verhältnis bei der Injektion einer Standardlösung mit verschiedenen Einstellungen ermittelt (Tab. 9). Die Detektion der Analyten erfolgte hierbei im MRM-Modus. Die Standardgeräteeinstellung für die Elektronenmultiplierspannung ist null. Durch eine Änderung konnte zwar die Signalintensität erhöht werden, woraus eine größere Peakfläche resultierte. Bei Erhöhung des Delta EMV um 100 ergab sich eine Steigerung der Peakfläche um etwa den Faktor zwei. Gleichzeitig wird aber auch das Rauschen verstärkt, so dass das Signal-Rausch-Verhältnis bei allen Einstellungen annähernd gleich blieb und sich die Bestimmungsgrenze für die Analyten kaum veränderte (Tab. 9). Die Variation der Elektronenmultiplierspannung ist daher kein Mittel für eine nennenswerte Steigerung der Empfindlichkeit. Zusätzlich führt eine hohe Elektronenmultiplierspannung zu einem erhöhten Verschleiß des Detektorelementes.

Tab. 9 Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) bei verschiedenen Einstellungen für die Elektronenmultiplierspannung (Delta EMV) nach Injektion von 10 µl einer 1 ng/ml Standardlösung ausgewählter Metaboliten und daraus resultierende Bestimmungsgrenzen (LOQ).

Delta EMV	Dextrorphan <i>m/z</i> 258 → 157		7-Hydroxycumarin <i>m/z</i> 161 → 133		Paracetamol <i>m/z</i> 152 → 110	
	S/N	LOQ [pg/ml]	S/N	LOQ [pg/ml]	S/N	LOQ [pg/ml]
0	276	36	62	161	25	400
200	287	35	51	196	22	455
400	207	48	51	196	20	500
600	315	32	72	139	24	417
800	341	29	80	125	24	417
1000	367	27	92	109	26	385

3.2 Überprüfung der Linearität der LC/MS/MS-Analysen

Mit Hilfe der Enzymassays sollten die Umsetzungsgeschwindigkeiten für die Substrate durch die CYP-Enzyme und die inhibitorische Aktivität bestimmt werden. Um diese Größen berechnen zu können, muss eine Kalibrierung des Analysenverfahrens durchgeführt werden. D. h. es muss der funktionelle Zusammenhang des Messsignals, was in diesen Fällen der Peakfläche des Metaboliten entspricht, und seiner Konzentration bekannt sein. Idealerweise sollte es sich dabei um eine lineare Beziehung handeln. Bei LC/MS-Analysen treten aber auch andere funktionelle Zusammenhänge auf. Von den meisten Metaboliten standen Referenzsubstanzen zur Verfügung. Mit diesen Substanzen wurden mindestens sieben Kalibrierstandards, die gleichmäßig über den gesamten Konzentrationsbereich verteilt waren, im Inkubationspuffer hergestellt. Dabei wurden die Kalibrierstandards genauso behandelt, wie die Inkubationsproben, wodurch alle Proben dieselbe Matrix besaßen. Der jeweilige Kalibrierbereich richtete sich nach den Metabolitenkonzentrationen. Zur Analyse der Metaboliten, für die keine Referenzsubstanz zur Verfügung stand, wie z. B. 4'-Hydroxydiclofenac oder 6-Hydroxychlorzoxazon, wurde für die Kalibrierung eine Kontrollinkubation verwendet. Die Kontrollinkubation entspricht 100 % der Enzymaktivität und stellt damit

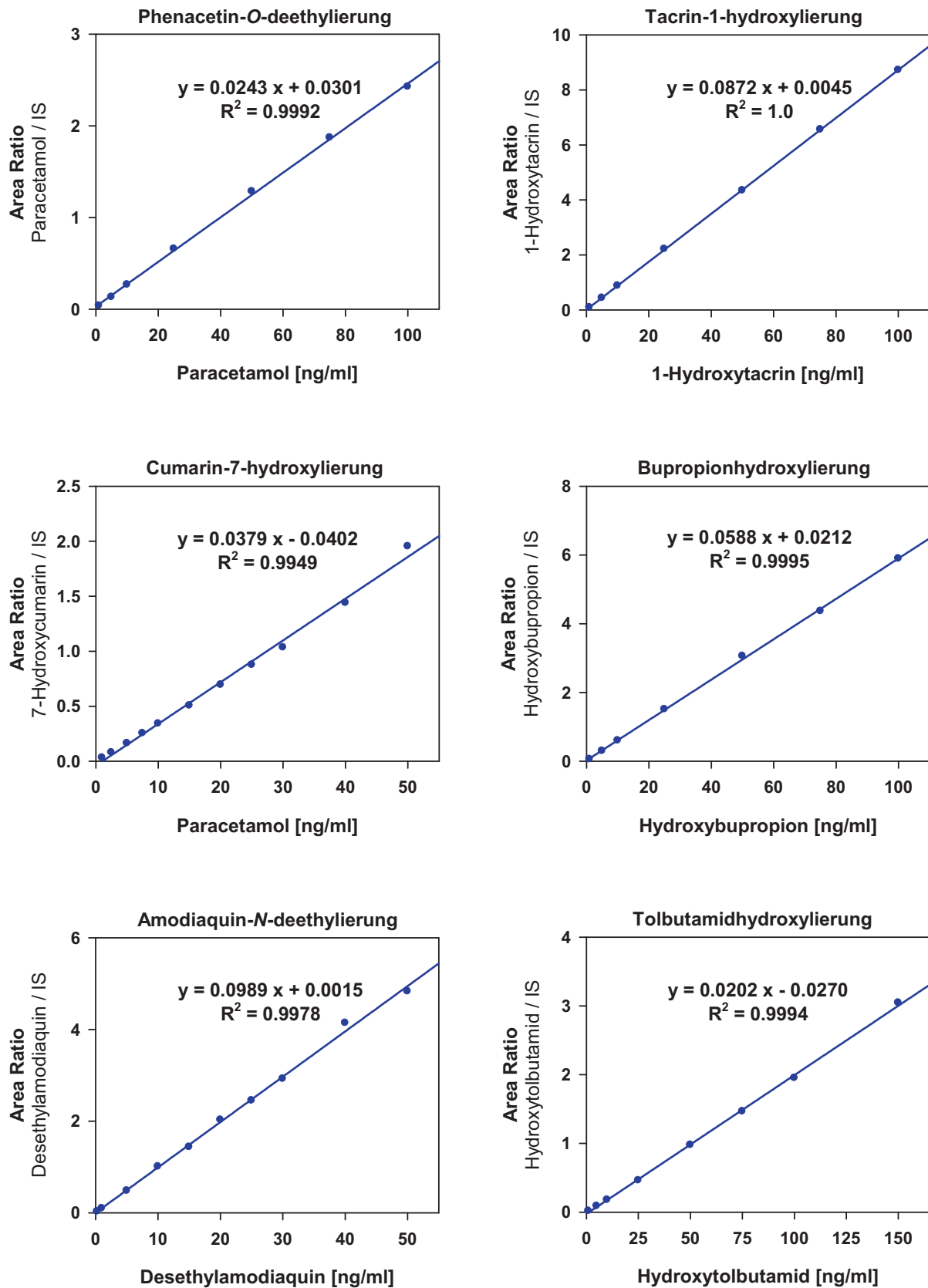


Abb. 45 Überprüfung der Linearität der LC/MS/MS-Analysen mit den Standardsubstanzen der CYP-Metaboliten.

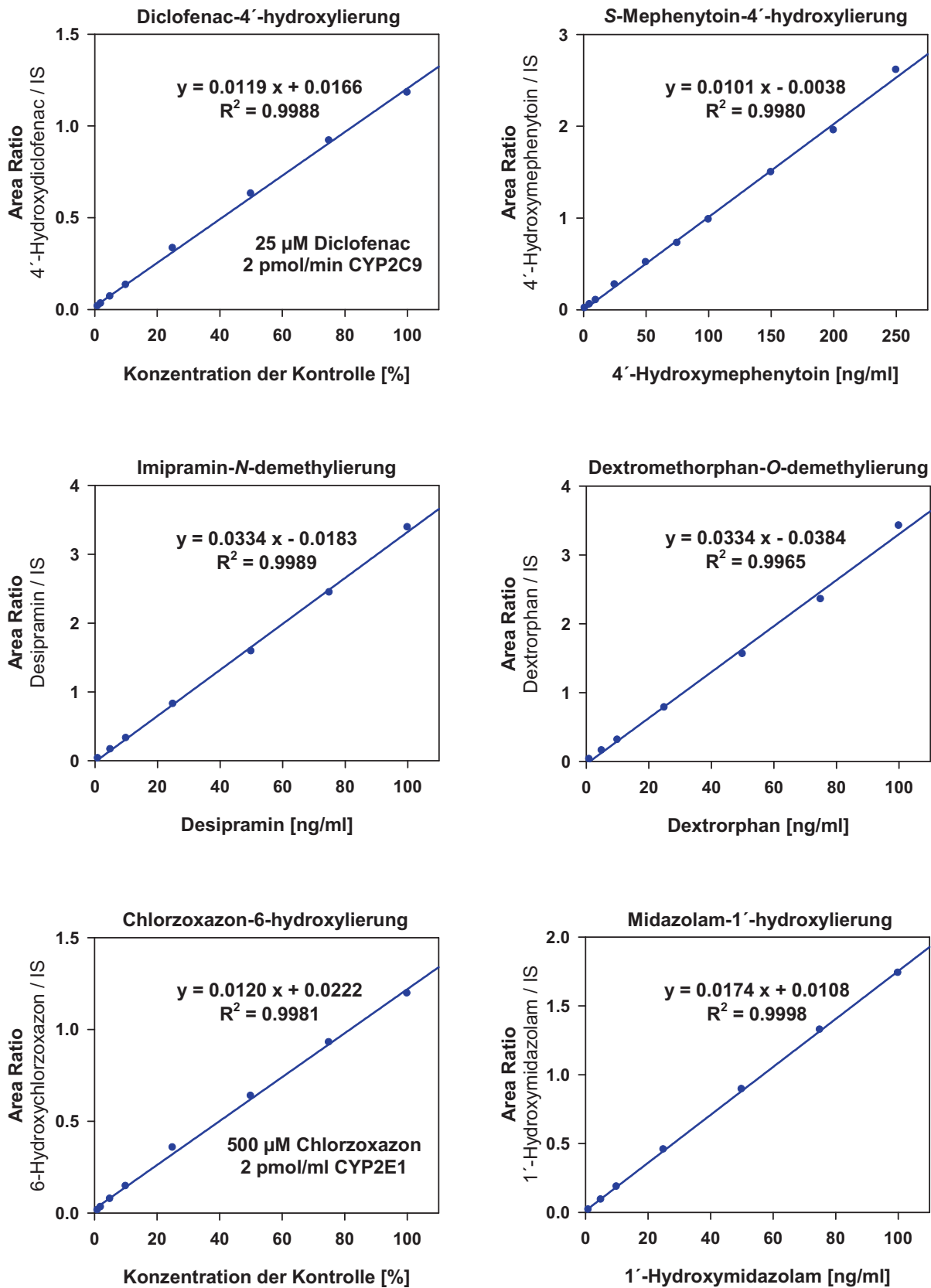


Abb. 45 (Fortsetzung) Überprüfung der Linearität der LC/MS/MS-Analysen mit den Standardsubstanzen der CYP-Metaboliten bzw. durch Verdünnung der Kontrollinkubation.

den Kalibrierstandard mit der höchsten Konzentration dar. Aus einem größeren Ansatz der Kontrollinkubation wurde mit Hilfe einer Blindprobe eine Verdünnungsreihe (75, 50, 25, 10, 5, 2 und 1 %) hergestellt, damit sich in jeder Probe dieselbe Matrix und dieselbe interne Standardkonzentration befinden. Durch diese Verfahrensweise kann die analytische Methode auf Linearität überprüft werden. Eine absolute Angabe des Probengehaltes kann dabei nicht gemacht werden. Dennoch ist die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität möglich, da hierbei anstatt der exakten Probenkonzentrationen bei vorliegender Linearität des Analysenverfahrens direkt die Peakflächen verwendet werden können. Bei den enzymkinetischen Untersuchungen kann ohne die entsprechende Referenzsubstanz nur die Michaelis-Menten-Konstante (K_m -Wert), nicht aber die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit (V_{max}) bestimmt werden. Aufgrund der Durchführung einer Proteinfällung vor der Probeninjektion und wegen der zeitlichen Schwankungen der Empfindlichkeit des Massenspektrometers wurde den Proben ein geeigneter interner Standard (IS) zugesetzt. Für die Auswertung wurden jeweils die Peakflächen des intensivsten Überganges (Quantifier) der Analyten verwendet. Es wurden die Peakflächenverhältnisse des Metaboliten und des internen Standards (Area Ratios) von jeder Probe gebildet. Für die graphischen Darstellungen wurden die erhaltenen Area Ratios gegenüber der jeweiligen Konzentration bzw. der Verdünnung der Kontrollinkubation aufgetragen (Abb. 45). Anschließend wurde eine lineare Regression durchgeführt und so die jeweilige Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß (R^2) erhalten (Abb. 45). Neben einem hohen Bestimmtheitsmaß sollten die Kalibriergeraden idealerweise durch den Koordinatenursprung gehen, d. h. der Achsenabschnitt der erhaltenen Geradengleichung sollte nahe bei null liegen. Bei der Untersuchung aller Metaboliten ergaben sich Bestimmtheitsmaße der Kalibriergeraden von nahezu 1, so dass von einem linearen Zusammenhang ausgegangen werden kann (Abb. 45). Die erhaltenen Kalibriergeraden, konnten somit zur Berechnung der Metabolitkonzentration der inkubierten Proben verwendet werden.

3.3 Bestimmung von K_m und V_{max} ausgewählter Substrate

Der K_m -Wert ist die Substratkonzentration, bei der eine halbmaximale Umsetzungsgeschwindigkeit erreicht wird und ist für jede Enzym-Substrat-Reaktion eine spezifische Größe. Dennoch werden in der Literatur z. T. stark unterschiedliche Werte angegeben. Walsky und Obach stellten eine Übersicht zusammen, in der einige bis zu diesem Zeitpunkt veröffentlichten K_m -Werte von ausgewählten Substratreaktionen für CYP-Enzyme dargestellt sind.¹⁷⁷ Beispielsweise erstreckten sich die ermittelten K_m -Werte für die Phenacetin-O-deethylierung durch humane Lebermikrosomen von 2.7 bis 116 μM . Mögliche Ursachen können in der Herkunft der Enzyme liegen. Häufig werden unterschiedliche Expressionssysteme für die Gewinnung von rekombinanten Enzymen verwendet. Bei humanen Lebermikrosomen handelt es sich um ein heterogenes Material, bei dem Polymorphismen eine Rolle spielen können. Aus diesem Grund sollten ausreichend gepoolte Präparationen, d. h. eine Mischung von mehreren Spendern unterschiedlicher ethnischer Herkunft und Lebensgewohnheiten, verwendet werden. Einen Einfluss auf die erhaltenen Werte können auch die Inkubationsbedingungen haben, wie z. B. der verwendete Puffer, die Inkubationstemperatur oder die Cosubstratkonzentration. Durch die Auftragung der ermittelten Umsetzungsgeschwindigkeit bei der jeweiligen Substratkonzentration wird theoretisch davon ausgegangen, dass die Substratkonzentration während der gesamten Inkubationszeit konstant bleibt, was im praktischen Versuch nicht der Fall ist. Ein wichtiger Aspekt ist deshalb die richtige Wahl der Proteinkonzentration, der Inkubationszeit und damit auch des Analysenverfahrens zur Quantifizierung des Metaboliten, so dass der prozentuale Substratverbrauch während der Inkubation so gering wie möglich gehalten wird. Weiterhin wurde von einem Einfluss organischer Lösungsmittel auf den K_m -Wert berichtet, das in den meisten Fällen durch die Zugabe der Substratstammlösung in den Inkubationsansatz enthalten ist.^{178,179} Aus diesen Gründen sollte eine Bestimmung des K_m -wertes vor der Durchführung von Inhibitionsuntersuchungen in jedem Labor mit den jeweiligen Versuchsbedingungen erfolgen. Die Kenntnis des K_m -wertes ist für die richtige Wahl der Substratkonzentration zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Bedeutung. Um auch kompetitive Inhibitoren erkennen zu können, ist es wichtig, dass die bei den Inhibitionsexperimenten verwendete Substratkonzentration nicht zu hoch gewählt wird. Zudem können Parameter zur

Beschreibung der Inhibition, wie z. B. der IC_{50} -Wert, von der eingesetzten Substratkonzentration abhängen (s. I.6.3.5).¹⁴⁰ Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit für Inhibitionsuntersuchungen eine Substratkonzentration in der Nähe des K_m -Wertes eingesetzt. In jedem Fall sollte bei der Veröffentlichung von Daten zur Enzyminhibition das verwendete Testsubstrat und die Substratkonzentration angegeben werden, da die in unterschiedlichen Laboren bestimmten Werte ansonsten nicht eingeordnet werden können. Wird generell der K_m -Wert als Substratkonzentration eingesetzt, erleichtert dies ebenfalls den Vergleich von Inhibitionsdaten, die mit unterschiedlichen Testsubstraten erhalten wurden.

In dieser Arbeit wurden eine Reihe der durch die FDA vorgeschlagenen Substrate für die In-vitro-Untersuchung der Inhibition von CYP-Enzymen verwendet.² Für die Bestimmung der K_m -Werte wurden verschiedene Substratkonzentrationen mit derselben Enzymmenge und Cosubstratkonzentration inkubiert und die jeweiligen Umsetzungsgeschwindigkeiten bestimmt. Zunächst wurde jeweils ein Probeversuch mit wenigen Substratkonzentrationen, die sich über einen weiten Konzentrationsbereich erstreckten, durchgeführt, um die Lage der K_m -Werte abzuschätzen. Es wurden das für das jeweilige Substrat beschriebene rekombinante CYP-Enzym und humane Lebermikrosomen untersucht. Aus den erhaltenen Ergebnissen wurden dann mindestens 10 verschiedene Substratkonzentrationen gleichmäßig verteilt über die gesamte Sättigungskurve für die exakte Bestimmung des K_m -Wertes ausgewählt. In einigen Fällen, wie z. B. der 4'-Hydroxylierung von Diclofenac oder der 6-Hydroxylierung von Chlorzoxazon, standen keine Referenzsubstanzen der entsprechenden Metaboliten für die Kalibrierung zur Verfügung. Hier wurden die Peakflächenverhältnisse des Metaboliten zum internen Standard (Area Ratios) gebildet und anstelle der Umsetzungsgeschwindigkeit im Diagramm aufgetragen, was zumindest die Bestimmung des K_m -Wertes ermöglichte. Anschließend erfolgte die Auswertung der Daten zur Bestimmung von K_m und V_{max} mit Hilfe des Softwareprogrammes SigmaPlot durch nichtlineare Regression nach den verschiedenen Rechenmodellen für die einzelnen möglichen Verlaufsformen der Substratsättigungskurven, wie z. B. hyperbol (Michaelis-Menten-Typ), sigmoidal (Hill-Typ), biphasisch (Isoenzym-Typ) oder Substratinhibition (s. I.6.1). Die in Tab. 10 angegebenen K_m - und V_{max} -Werte für die einzelnen Substratreaktionen mit dem jeweiligen rekombinanten CYP-Enzym bzw. humanen Lebermikrosomen stammen

Tab. 10 Ermittelte Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) und maximale Umsetzungsgeschwindigkeiten (V_{max}) für die einzelnen Substratreaktionen mit den CYP-Enzymen und humanen Lebermikrosomen (HLM).

Substrat katalys. Reaktion	Enzym	Kurventyp	K_m [μ M]	V_{max} [pmol/pmol/min]
Phenacetin O-Deethylierung	CYP1A2	hyperbol	11.2 ± 0.5	32.9 ± 0.3
	HLM	hyperbol	28.7 ± 1.0	1.41 ± 0.01
Tacrin 1-Hydroxylierung	CYP1A2	Hill ($n_H = 0.82$)	1.8 ± 0.1	4.31 ± 0.04
	HLM	Hill ($n_H = 0.79$)	14.0 ± 0.9	0.29 ± 0.01
Cumarin 7-Hydroxylierung	CYP2A6	hyperbol	1.21 ± 0.03	7.61 ± 0.04
	HLM	hyperbol	0.84 ± 0.02	2.06 ± 0.01
Bupropion Hydroxylierung	CYP2B6	Hill ($n_H = 0.92$)	103.1 ± 10.5	21.8 ± 0.7
	HLM	Substratinhibition	75.5 ± 5.0	1.40 ± 0.04
Amodiaquin N-Deethylierung	CYP2C8	hyperbol	0.48 ± 0.03	10.6 ± 0.1
	HLM	Substratinhibition	1.19 ± 0.07	7.5 ± 0.2
Tolbutamid Hydroxylierung	CYP2C9	Hill ($n_H = 0.91$)	93.1 ± 9.8	2.86 ± 0.10
	HLM	Hill ($n_H = 0.77$)	401.8 ± 104.9	0.72 ± 0.07
Diclofenac 4'-Hydroxylierung	CYP2C9	Hill ($n_H = 0.95$)	1.06 ± 0.07	n.d.
	HLM	hyperbol	3.32 ± 0.16	n.d.
S-Mephenytoin 4'-Hydroxylierung	CYP2C19	Substratinhibition	28.6 ± 3.8	9.67 ± 0.53
	HLM	Substratinhibition	59.4 ± 12.1	0.037 ± 0.004
Imipramin N-Demethylierung	CYP2C19	Hill ($n_H = 0.92$)	45.3 ± 4.3	48.6 ± 1.5
	HLM	Substratinhibition	985 ± 225	27.5 ± 5.6
Dextromethorphan O-Demethylierung	CYP2D6	Hill ($n_H = 0.72$)	0.71 ± 0.07	7.25 ± 0.16
	HLM	Hill ($n_H = 0.88$)	3.58 ± 0.20	0.48 ± 0.01
Chlorzoxazon 6-Hydroxylierung	CYP2E1	hyperbol	573 ± 31	n.d.
	HLM	biphasisch	$K_{m1} 7.2 \pm 4.2$ $K_{m2} 529 \pm 71$	n.d.
4-Nitrophenol 2-Hydroxylierung	CYP2E1	Substratinhibition	1395 ± 400	n.d.
	HLM	Hill ($n_H = 0.86$)	375 ± 30	n.d.
Midazolam 1'-Hydroxylierung	CYP3A4	Substratinhibition	1.06 ± 0.08	17.3 ± 0.5
	HLM	Substratinhibition	3.02 ± 0.15	2.39 ± 0.06
Testosteron 6 β -Hydroxylierung	CYP3A4	Hill ($n_H = 1.31$)	24.0 ± 2.1	95.9 ± 2.4
	HLM	Hill ($n_H = 1.02$)	59.7 ± 8.6	10.1 ± 0.5

von dem Rechenmodell mit dem höchsten Bestimmtheitsmaß. Die erhaltenen K_m -Werte wurden anschließend gerundet und so die für die Inhibitionsassays zu verwendenden Substratkonzentrationen erhalten (s. V.2.5.1). Daneben wurden die Daten durch Anwendung von verschiedenen Linearisierungsverfahren ausgewertet. Beschreiben die Datenpunkte in diesen Diagrammen eine Gerade, liegt eine klassische Michaelis-Menten-Kinetik vor, was nicht bei allen Substraten beobachtet wurde. Im Folgenden sollen die einzelnen untersuchten Substratreaktionen näher betrachtet werden.

Phenacetin-O-deethylierung

Für die O-Deethylierung von Phenacetin zum Paracetamol durch CYP1A2 wurden hyperbole Substratsättigungskurven erhalten (Abb. 46). Bei der Verwendung von rekombinantem CYP1A2 betrug die Michaelis-Menten-Konstante $11.2 \pm 0.5 \mu\text{M}$ und für gepoolte humane Lebermikrosomen $28.7 \pm 1.0 \mu\text{M}$. Damit wurde, wie bereits in der Literatur beschrieben, für humane Lebermikrosomen ein höherer K_m -Wert erhalten.¹⁷⁷ Die ermittelten K_m -Werte liegen zwischen dem niedrigsten von $1.7 \mu\text{M}$ und dem höchsten von $116 \mu\text{M}$ veröffentlichten Wert für diese Substratreaktion.^{180,181} Aufgrund der berechneten K_m -Werte wurde eine Substratkonzentration für die Inhibitionsassays von $10 \mu\text{M}$ für rekombinantes CYP1A2 und $25 \mu\text{M}$ für humane Lebermikrosomen verwendet.

Tacrin-1-hydroxylierung

Die 1-Hydroxylierung von Tacrin (Abb. 46) wird ebenfalls durch CYP1A2 katalysiert.^{21,182} Bei der Inkubation verschiedener Tacrinkonzentrationen mit rekombinantem CYP1A2 und humanen Lebermikrosomen beschrieben die Messpunkte nach Auftragung im Eadie-Hofstee-Diagramm keine Gerade. Es liegt somit keine klassische Michaelis-Menten-Kinetik vor. Bei der anschließend durchgeführten nichtlinearen Regression erwies sich das Rechenmodell nach Hill als wahrscheinlich. Der berechnete K_m -Wert für CYP1A2 betrug $1.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$ und für humane Lebermikrosomen $14.0 \pm 0.9 \mu\text{M}$. Es handelt sich um ein negativ kooperatives Substrat, da in beiden Fällen die Hill-Koeffizienten unter 1 lagen. Der für CYP1A2 ermittelte K_m -Wert ist kleiner als die in der Literatur zu findenden Werte von $2.8 \mu\text{M}$ und $14 \mu\text{M}$.^{21,183} Allerdings stammte das hierfür verwendete CYP1A2 aus

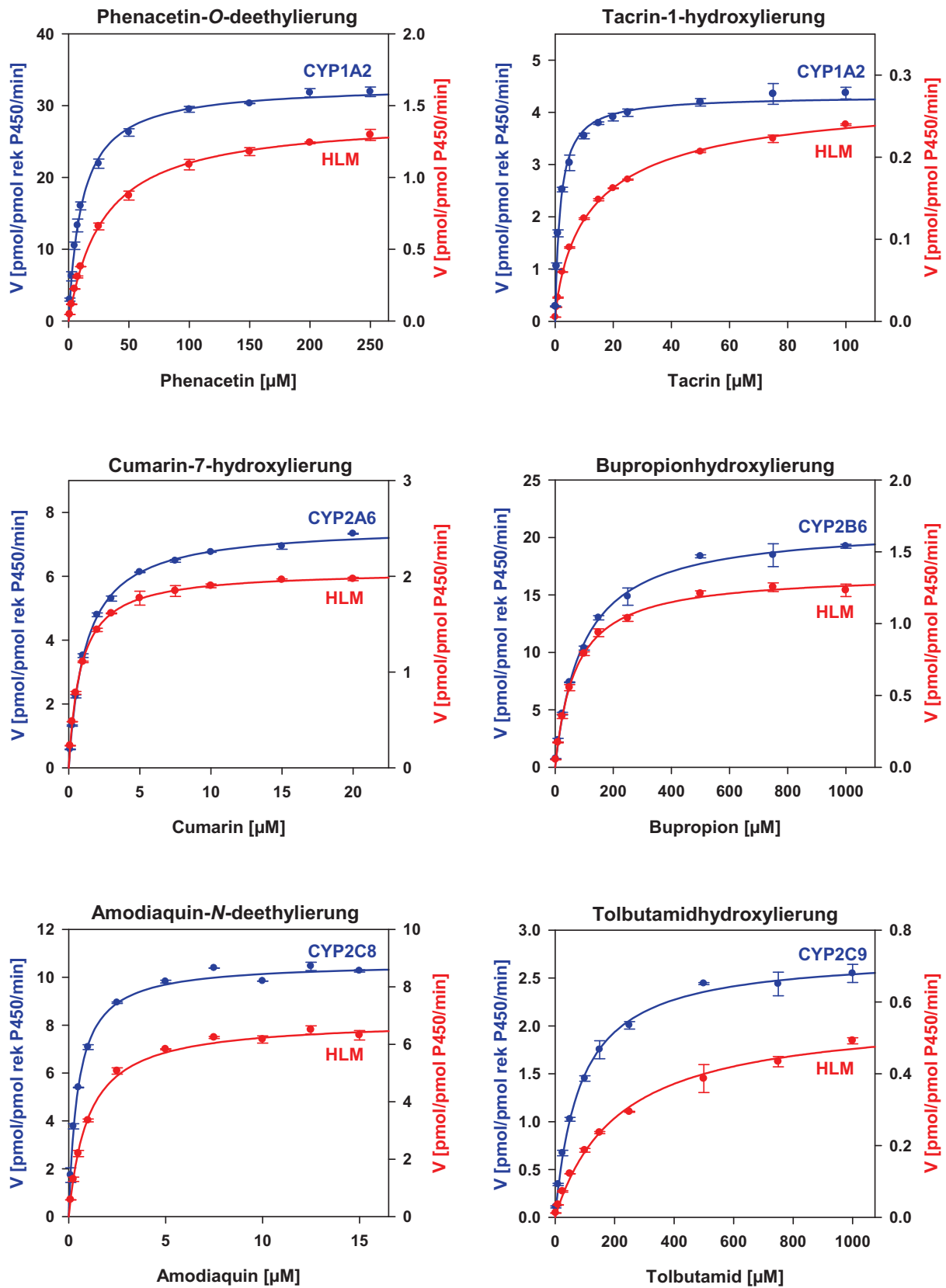


Abb. 46 Substratsättigungskurven für die Phenacetin-O-deethylierung, die Tacrin-1-hydroxylierung, die Cumarin-7-hydroxylierung, die Bupropionhydroxylierung, die Amodiaquin-N-deethylierung und die Tolbutamidhydroxylierung durch rekombinante CYP-Enzyme und humane Lebermikrosomen (HLM).

einem anderen Expressionssystem. Der Literaturwert für humane Lebermikrosomen von 16 μM kommt dem hier ermittelten Wert nahe.²¹ Der Vergleich der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeiten der Phenacetin-O-deethylierung und der Tacrin-1-hydroxylierung zeigt, dass die Phenacetin-O-deethylierung wesentlich schneller erfolgt als die Tacrin-1-hydroxylierung. Dennoch muss für Tacrin bei den Assays keine höhere Proteinkonzentration verwendet werden, da der Metabolit 1-Hydroxy-tacrin aufgrund seiner ausgeprägten basischen Eigenschaften mit Hilfe der LC/ESI/MS-Analyse wesentlich empfindlicher detektiert werden kann als Paracetamol. Aufgrund der erhaltenen K_m -Werte kann für Inhibitionsuntersuchungen eine Tacrinkonzentration von 2 μM für CYP1A2 und 15 μM für humane Lebermikrosomen verwendet werden.

Cumarin-7-hydroxylierung

Bei der Biotransformation von Cumarin zum 7-Hydroxycumarin durch CYP2A6 (Abb. 46) liegt eine klassische Michaelis-Menten-Kinetik vor, so dass K_m und V_{\max} mit Hilfe der Linearisierungsverfahren ermittelt werden können. Hierfür wurden die bei der Inkubation von Cumarin mit humanen Lebermikrosomen erhaltenen Messdaten nach Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee, Scatchard, Hanes-Woolf und Hill graphisch dargestellt und jeweils eine lineare Regression durchgeführt (Abb. 47). Es wurden die Mittelwerte einer Mehrfachbestimmung verwendet. Bei allen linearisierten Darstellungen wurden Geraden mit einem hohen Bestimmtheitsmaß erhalten. Folglich ergaben sich ähnliche Werte für K_m und V_{\max} . Die ermittelten K_m -Werte lagen zwischen 0.78 und 0.84 μM und die bestimmten maximalen Umsetzungsgeschwindigkeiten befanden sich zwischen 2.01 und 2.07 pmol/pmol P450/min. Aus dem Eadie-Hofstee- und dem Scatchard-Diagramm ergeben sich dieselben Werte, da bei diesen Darstellungen nur die Achsen vertauscht sind (Abb. 47). Für die Darstellung nach Hill wurde eine maximale Umsetzungsgeschwindigkeit von 2.05 pmol/pmol P450/min angenommen. Die in Tab. 10 angegebenen Werte wurden durch nichtlineare Regression erhalten, wobei sich für die Umsetzung mit CYP2A6 ein K_m -Wert von $1.21 \pm 0.03 \mu\text{M}$ und mit humanen Lebermikrosomen von $0.84 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ergab. Für die Untersuchung der Inhibition von CYP2A6 wurde daher eine Substratkonzentration von 1 μM verwendet. Der ermittelte K_m -Wert für rekombinantes CYP2A6 ist mit den veröffentlichten Werten von 0.83 μM und 1.48 μM

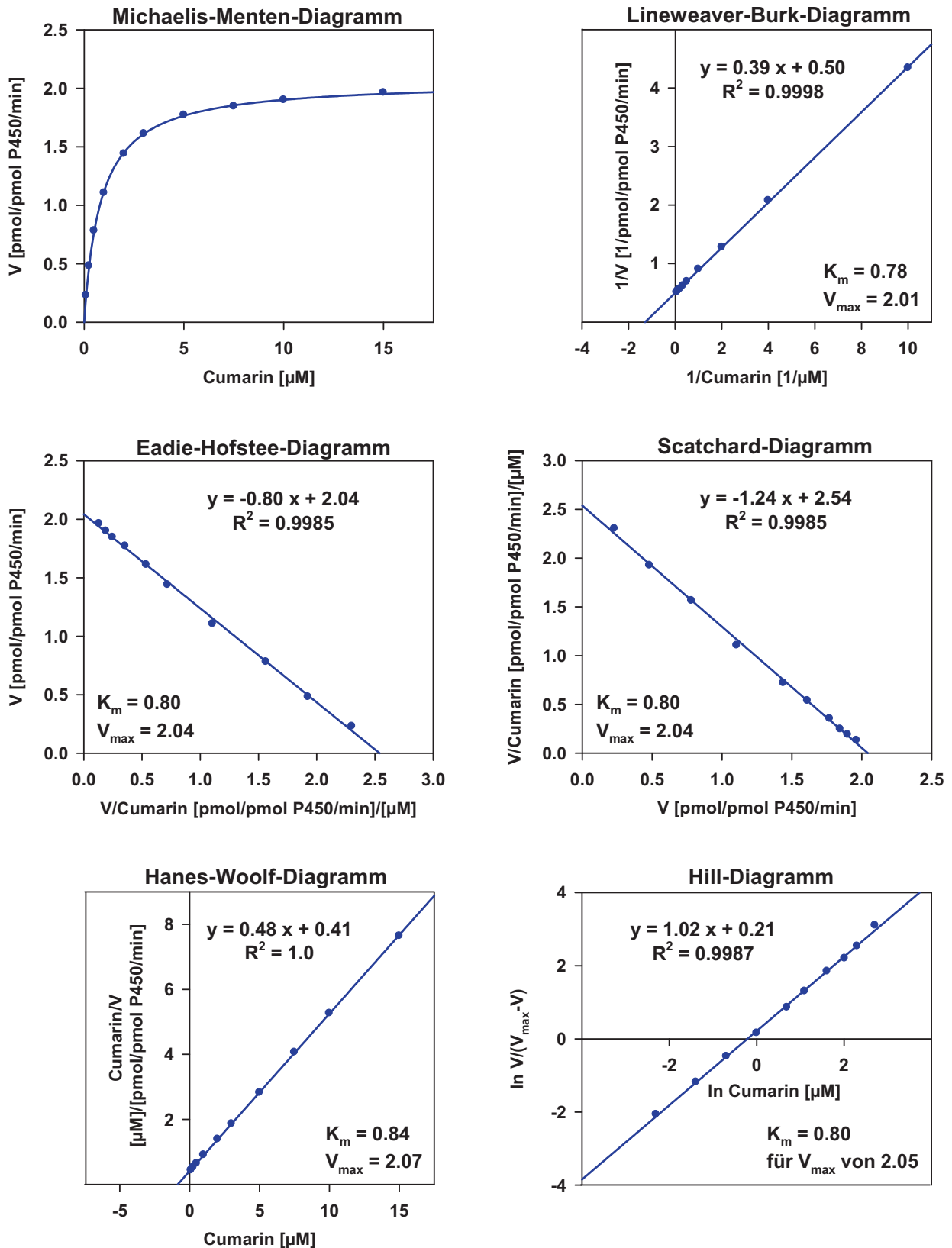


Abb. 47 Auswertung der Substratsättigungskurve der 7-Hydroxylierung von Cumarin durch humane Lebermikrosomen mit Hilfe von verschiedenen Linearisierungsverfahren zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten (K_m ; in μM) und der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit (V_{max} ; in pmol Metabolit/pmole P450/min).

vergleichbar.^{177,184} Bei der Verwendung von humanen Lebermikrosomen gibt es große interindividuelle Schwankungen der Aktivitäten für die Cumarin-7-hydroxylierung. Die angegebenen K_m -Werte liegen zwischen 0.2 und 3.3 μM .^{185,186}

Bupropionhydroxylierung

Für die gemessene Substratsättigungskurve der Bupropionhydroxylierung durch rekombinantes CYP2B6 (Abb. 46) eignete sich die Regression nach der Hill-Gleichung. Es liegt ein Hill-Koeffizient unter 1 vor. Als K_m -Wert wurden $103.1 \pm 10.5 \mu\text{M}$ erhalten. Bisher veröffentlichte Daten gehen von einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik aus.^{30,177} Es werden K_m -Werte von 67 μM ¹⁷⁷, 85 μM ¹⁸⁷ und 156 μM ³⁰ angegeben. Bei der Umsetzung mit humanen Lebermikrosomen wurde eine leichte Substratinhibitionskinetik festgestellt (Abb. 46), die auch durch eine mangelnde Löslichkeit bei hohen Konzentrationen bedingt sein kann. Es wurde ein K_m -Wert von $75.5 \pm 5.0 \mu\text{M}$ berechnet. Bisher wurden in der Literatur für humane Lebermikrosomen das klassische Michaelis-Menten-Modell und das Hill-Modell zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter verwendet.^{30,177} Es wurden unterschiedliche K_m -Werte von einzelnen Spendern beobachtet.^{30,187} Für gepoolte humane Lebermikrosomen wird ein K_m -Wert von 82 μM angegeben.¹⁷⁷ Bei den Inhibitionsassays wurde in dieser Arbeit eine Bupropionkonzentration von jeweils 75 μM für die Inkubation mit CYP2B6 und mit humanen Lebermikrosomen verwendet, was mit den bereits veröffentlichten Assays übereinstimmt.¹⁷⁷

Amodiaquin-N-deethylierung

Die Auswertung der gemessenen Substratsättigungskurve für die Amodiaquin-N-deethylierung (Abb. 46) durch rekombinantes CYP2C8 nach dem Michaelis-Menten-Modell ergab einen K_m -Wert von $0.48 \pm 0.03 \mu\text{M}$, der etwas niedriger ist als die bisher veröffentlichten Werte von 0.7 μM und 1.2 μM .^{177,188} Eine mögliche Ursache für die Abweichungen könnte in den verwendeten unterschiedlichen Expressionssystemen für die Gewinnung des rekombinanten CYP2C8 sein. Für die Substratsättigungskurve mit humanen Lebermikrosomen besitzt das Substratinhibitionsmodell das höchste Bestimmtheitsmaß. Der ermittelte K_m -Wert liegt bei $1.19 \pm 0.07 \mu\text{M}$ und ist gegenüber dem rekombinanten CYP2C8 deutlich höher. In der Literatur lassen sich K_m -Werte von 1.9 μM ¹⁷⁷, 2.4 μM ¹⁸⁸ oder gar 5.0 μM ¹⁸⁹ finden. Auffällig ist die hohe Umsetzungsgeschwindigkeit durch die HLM im Vergleich zu

dem rekombinanten Enzym (Tab. 10), obwohl der CYP2C8-Gehalt in den Lebermikrosomen im Vergleich zu den anderen CYP-Enzymen, wie z. B. CYP2C9 oder CYP3A4, gering ist (s. I.2.1). Für die Inhibitionsassays wurden Substratkonzentrationen von 0.5 μM für CYP2C8 und 1 μM für HLM verwendet.

Tolbutamidhydroxylierung

Die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter für die Hydroxylierung von Tolbutamid wurde durch nichtlineare Regression der Messdaten (Abb. 46) nach der Hill-Gleichung durchgeführt. Mit einem K_m -Wert von $93.1 \pm 9.8 \mu\text{M}$ für rekombinantes CYP2C9 und $401.8 \pm 104.9 \mu\text{M}$ für humane Lebermikrosomen ist die Affinität des Substrates geringer ausgeprägt als die der meisten CYP-Substrate. In beiden Fällen liegt eine negative Kooperativität vor. Aufgrund der niedrigen Affinität des Substrates ist die gemessene Umsetzungsgeschwindigkeit bei der höchsten getesteten Konzentration, insbesondere bei der Verwendung von humanen Lebermikrosomen, weit vom Maximalwert entfernt. Für eine vollständige Beschreibung der Substratsättigungskurve müssten weitere Datenpunkte bei höheren Konzentrationen vorhanden sein. Eine Erhöhung der Substratkonzentration über 1000 μM ist im praktischen Versuch aufgrund der begrenzten Löslichkeit der meisten Substrate im Inkubationspuffer nicht zu empfehlen. Der gemessene K_m -Wert für CYP2C9 liegt nahe bei dem veröffentlichten Wert von 82 μM , während der für humane Lebermikrosomen erhaltene K_m -Wert höher liegt als die in der Literatur zu findenden Werte, die sich zwischen 60 und 180 μM bewegen.^{177,190} Die Abweichungen können sich aufgrund der Wahl des Regressionsmodells oder des nicht ausreichend abgedeckten Konzentrationsbereiches ergeben. Wird die Auswertung nach dem klassischen Michaelis-Menten-Modell durchgeführt, erhält man einen mit der Literatur vergleichbaren Wert von $212 \pm 17 \mu\text{M}$. Für die Untersuchung der Inhibition wurde anhand der vorliegenden Daten eine Tolbutamidkonzentration von 100 μM für CYP2C9 und 200 μM für humane Lebermikrosomen, bei der allerdings mehrere CYP-Enzyme die Tolbutamidhydroxylierung katalysieren (s. II.3.4), verwendet.

Diclofenac-4'-hydroxylierung

Für die Biotransformation von Diclofenac zu seinem 4'-Hydroxy-Derivat wurde ein K_m -Wert von $1.06 \pm 0.07 \mu\text{M}$ für die Umsetzung mit CYP2C9 und $3.32 \pm 0.16 \mu\text{M}$ bei

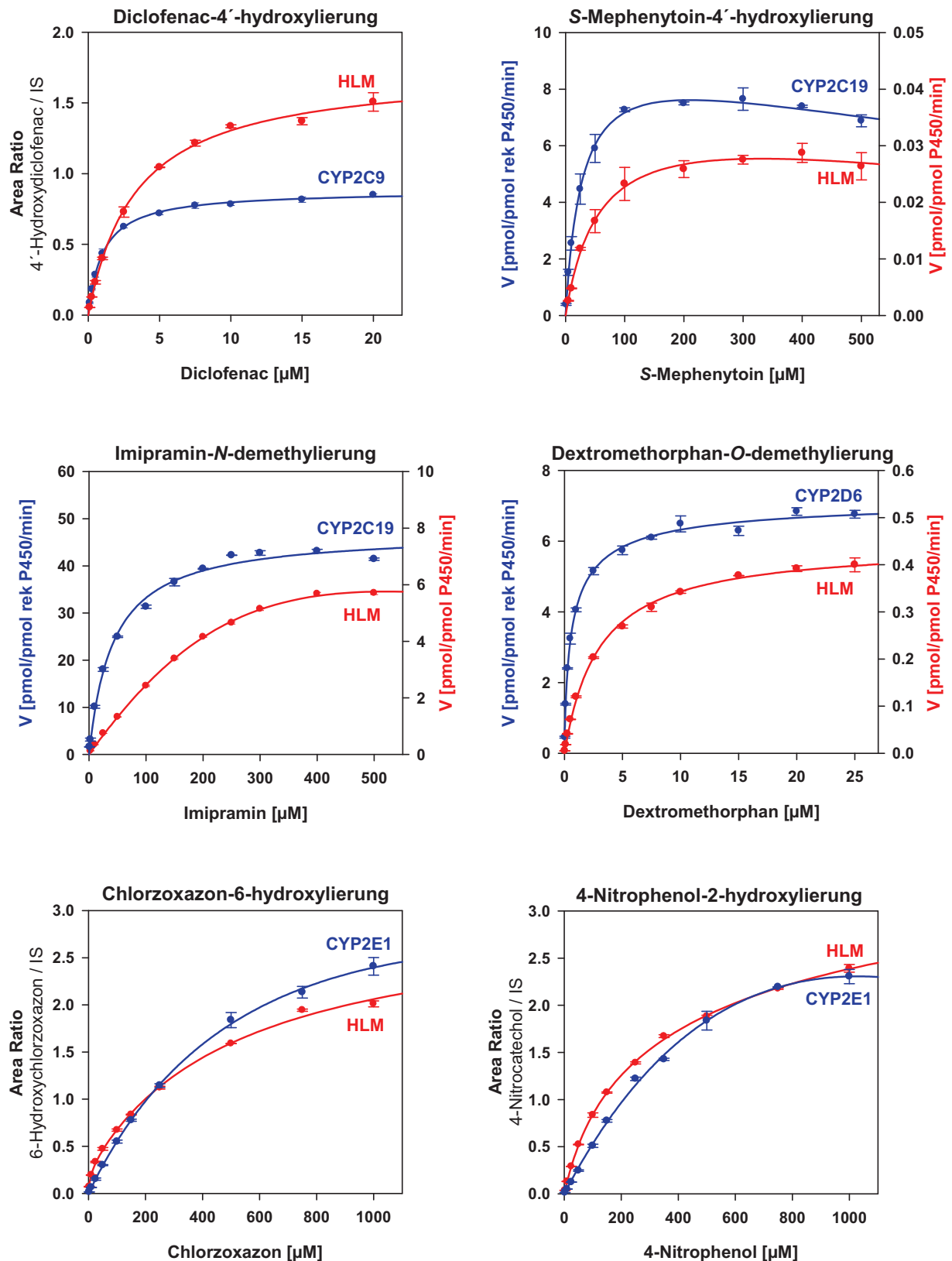


Abb. 48 Substratsättigungskurven für die Diclofenac-4'-hydroxylierung, die S-Mephenytoin-4'-hydroxylierung, die Imipramin-N-demethylierung, die Dextromethorphan-O-demethylierung, die Chlorzoxazon-6-hydroxylierung und die 4-Nitrophenol-2-hydroxylierung durch rekombinante CYP-Enzyme und humane Lebermikrosomen (HLM).

der Verwendung von humanen Lebermikrosomen ermittelt. Die Auswertung der Substratsättigungskurve (Abb. 48) für das rekombinante CYP-Enzym erfolgte nach dem Hill-Modell, während bei der Umsetzung durch humane Lebermikrosomen eine klassische Michaelis-Menten-Kinetik vorliegt. Da für die Quantifizierung des Metaboliten 4'-Hydroxydiclofenac keine Referenzsubstanz zur Verfügung stand, konnte keine maximale Umsetzungsgeschwindigkeit berechnet werden. Die erhaltenen K_m -Werte liegen im Bereich der bereits veröffentlichten Daten von 1.4 μM und 0.6 μM für CYP2C9 sowie 5.2 μM und 4.0 μM für humane Lebermikrosomen.^{177,178} Zur Untersuchung der Inhibition kann eine Substratkonzentration von 1 μM für CYP2C9 und 3 μM für humane Lebermikrosomen empfohlen werden.

S-Mephenytoin-4'-hydroxylierung

Bei der Untersuchung der 4'-Hydroxylierung von S-Mephenytoin durch CYP2C19 und humane Lebermikrosomen ergaben sich Sättigungskurven vom Substratinhibitionstyp (Abb. 48). Als K_m -Werte wurden $28.6 \pm 3.8 \mu\text{M}$ für CYP2C19 und $59.4 \pm 12.1 \mu\text{M}$ für humane Lebermikrosomen berechnet. Die Umsetzung durch humane Lebermikrosomen erfolgt aufgrund des geringen Gehaltes an CYP2C19 sehr langsam, weshalb eine hohe Proteinkonzentration eingesetzt werden muss. Da die Hydroxylierung von S-Mephenytoin seit langem als Markerreaktion zur Phänotypisierung von CYP2C19 eingesetzt wird, liegen eine Reihe kinetischer Daten für humane Lebermikrosomen vor.¹⁹¹ Aufgrund des genetischen Polymorphismus ist eine starke interindividuelle Variabilität von K_m und V_{max} bekannt.^{192,193} Für gepoolte humane Lebermikrosomen lässt sich ein K_m -Wert von 57 μM finden, der mit dem in dieser Arbeit ermittelten Wert gut übereinstimmt.¹⁷⁷ Für rekombinantes CYP2C19 wurden bisher K_m -Werte von 17.2 μM und 29 μM veröffentlicht.^{177,194} Demzufolge kann für die Untersuchung der Inhibition von CYP2C19 eine Substratkonzentration von 30 μM verwendet werden. Für humane Lebermikrosomen empfiehlt sich eine S-Mephenytoinkonzentration von 60 μM , wie sie bereits in den Literaturmethoden verwendet wird.^{177,195}

Imipramin-N-demethylierung

Für die N-Demethylierung von Imipramin wurden Substratsättigungskurven mit CYP2C19 und humanen Lebermikrosomen aufgenommen (Abb. 48). In beiden Fällen wird Desipramin mit einer hohen Umsetzungsgeschwindigkeit gebildet. Der

K_m -Wert von $45.3 \pm 4.3 \mu\text{M}$ für CYP2C19 wurde mit Hilfe des Hill-Modells errechnet, der etwa dem doppelten der Literaturwerte entspricht.^{47,183} Für die Umsetzung mit humanen Lebermikrosomen wurde ein hoher K_m -Wert von $985 \pm 225 \mu\text{M}$ durch Auswertung nach dem Substratinhibitions-Modell erhalten. Auffällig war, dass bei allen Regressionsmodellen die meisten Messwerte recht weit von der erhaltenen Kurve entfernt waren, was insbesondere in der Darstellung nach Eadie-Hofstee sichtbar wurde. In der Literatur wird v. a. eine biphasische Reaktionskinetik für die Imipramin-*N*-demethylierung durch humane Lebermikrosomen beschrieben.^{196,197} Es lassen sich auch unterschiedliche Kurvenverläufe in den Eadie-Hofstee-Darstellungen bei der Untersuchung von humanen Lebermikrosomen von verschiedenen Spendern finden.⁴⁷ Als Mittelwert aus den K_m -Werten von verschiedenen Spendern werden in der Literatur für K_{m1} $1.1 \mu\text{M}$ und für K_{m2} $214 \mu\text{M}$ angegeben.¹⁹⁶ Für In-vitro-Inhibitionsuntersuchungen mit rekombinantem CYP2C19 kann anhand der gemessenen Daten eine Substratkonzentration von $50 \mu\text{M}$ vorgeschlagen werden. Aufgrund der mangelnden Isoenzymselektivität (s. II.3.4) kann die Imipramin-*N*-demethylierung aber nicht als Markerreaktion bei der Inkubation mit humanen Lebermikrosomen verwendet werden.

Dextromethorphan-O-demethylierung

Die Dextromethorphan-*O*-demethylierung wird häufig als Substratreaktion für CYP2D6 eingesetzt. In Abb. 48 sind die erhaltenen Substratsättigungskurven für die Umsetzung von Dextromethorphan zum Dextrorphan durch rekombinantes CYP2D6 und humane Lebermikrosomen dargestellt. Trägt man die Messdaten in das Eadie-Hofstee-Diagramm ein, ergeben sich gekrümmte Kurvenverläufe. Durch nichtlineare Regression wurden daher die höchsten Bestimmtheitsmaße für das biphasische Regressionsmodell und das Rechenmodell nach Hill erhalten. Mit CYP2D6 ergab sich für K_{m1} $0.21 \pm 0.06 \mu\text{M}$ und für K_{m2} $3.0 \pm 1.3 \mu\text{M}$ bei Anwendung des Isoenzym-Modells und ein K_m -Wert von $0.71 \pm 0.07 \mu\text{M}$ bei der Auswertung nach Hill. Bei der Verwendung von humanen Lebermikrosomen liegt der ermittelte K_m -Wert vermutlich aufgrund der Beteiligung weiterer CYP-Enzyme deutlich höher, was mit den Literaturangaben übereinstimmt.¹⁷⁷ Es wurde für K_{m1} $0.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$ und K_{m2} $5.1 \pm 1.6 \mu\text{M}$ bei der Durchführung der Regression nach dem biphasischen Modell erhalten. Durch die Auswertung nach Hill ergab sich ein K_m -Wert von $3.58 \pm 0.20 \mu\text{M}$. In der Literatur liegen v. a. Daten für den Metabolismus durch humane

Lebermikrosomen vor. Es wurde ebenfalls häufig ein biphasischer Kurvenverlauf für die O-Demethylierung beobachtet.^{198,199} Walsky und Obach geben hingegen eine klassische Michaelis-Menten-Kinetik für CYP2D6 und humane Lebermikrosomen mit den K_m -Werten von 0.2 μM und 4.6 μM an.¹⁷⁷ Als Substratreaktion für die in dieser Arbeit durchgeführten CYP2D6-Inhibitionsassays wurden 0.7 μM für das rekombinante Enzym und 3.5 μM für humane Lebermikrosomen verwendet, die aus den Ergebnissen der Datenauswertung nach dem Hill-Modell abgeleitet wurden.

Chlorzoxazon-6-hydroxylierung

Für die 6-Hydroxylierung von Chlorzoxazon wurde durch rekombinantes CYP2E1 eine hyperbole Substratsättigungskurve mit einem K_m -Wert von $573 \pm 31 \mu\text{M}$ erhalten (Abb. 48). Bei der Verwendung von humanen Lebermikrosomen erwies sich das biphasische Regressionsmodell als wahrscheinlich. Es wurden die Michaelis-Menten-Konstanten K_{m1} $7.2 \pm 4.2 \mu\text{M}$ und K_{m2} $529 \pm 71 \mu\text{M}$ berechnet. Für den Metabolismus zum 6-Hydroxychlorzoxazon konnte keine maximale Umsetzungsgeschwindigkeit ermittelt werden, da keine Referenzsubstanz des Metaboliten für eine Kalibrierung zur Verfügung stand. Die ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten sind erheblich größer als die meisten veröffentlichten Werte.^{177,200} Nur wenige Autoren gaben K_m -Werte von über 500 μM an.^{201,202} Für die Untersuchung der CYP2E1-Inhibition wurde in dieser Arbeit eine Substratkonzentration von 500 μM verwendet. Aufgrund der mangelnden Isoenzymselektivität (s. II.3.4) konnte in dieser Arbeit keine Untersuchung der CYP2E1-Inhibition mit humanen Lebermikrosomen durchgeführt werden.

4-Nitrophenol-2-hydroxylierung

Ein weiteres Testsubstrat für CYP2E1 ist 4-Nitrophenol. Bei der Umsetzung von 4-Nitrophenol zum 4-Nitrocatechol durch CYP2E1 wurde eine Substratinhibition bei höheren Nitrophenolkonzentrationen festgestellt (Abb. 48). Daraus resultiert ein hoher K_m -Wert von $1395 \pm 400 \mu\text{M}$. Die Auswertung der durch Inkubation mit humanen Lebermikrosomen erhaltenen Messdaten erfolgte nach dem Hill-Modell, was einen K_m -Wert von $375 \pm 30 \mu\text{M}$ lieferte. Die meisten in der Literatur vorhandenen K_m -Werte für die 4-Nitrophenol-2-hydroxylierung sind allerdings niedriger. Für humane Lebermikrosomen wurden K_m -Werte von 30 μM und 422 μM angegeben.^{203,202} Ein K_m -Wert von 514 μM ließ sich für CYP2E1 finden.²⁰² Für die

Untersuchung der CYP2E1-Inhibition kann eine Substratkonzentration von 500 μM verwendet werden. Die Inkubation von HLM mit diesem Substrat ist allerdings aufgrund der gering ausgeprägten Isoenzymselektivität nicht zu empfehlen (s. II.3.4).

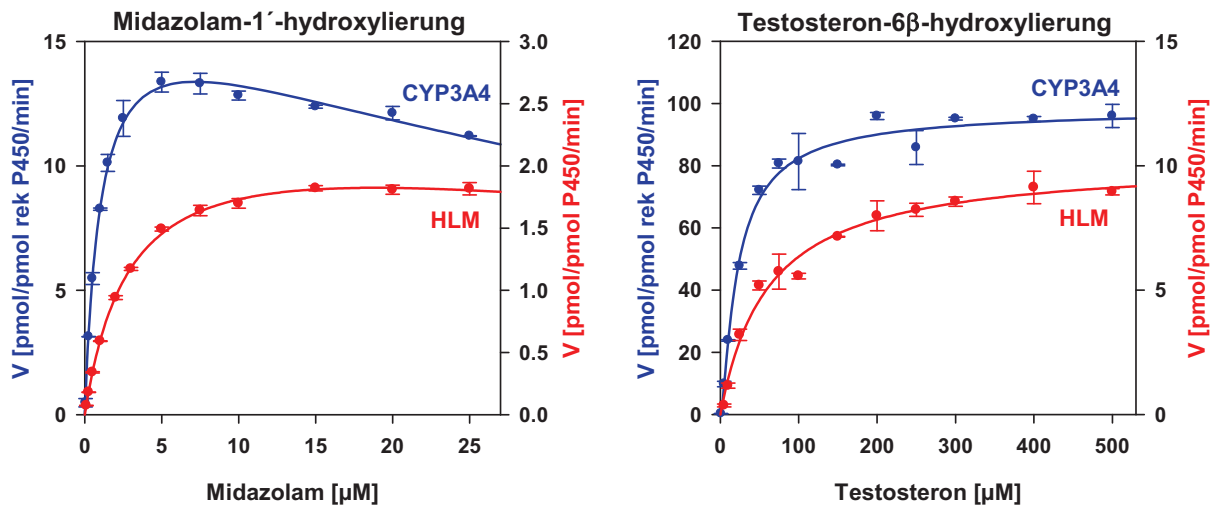


Abb. 49 Substratsättigungskurven für die Midazolam-1'-hydroxylierung und die Testosteron-6 β -hydroxylierung durch rekombinantes CYP3A4 und humane Lebermikrosomen (HLM).

Midazolam-1'-hydroxylierung

Im Michaelis-Menten-Diagramm für die 1'-Hydroxylierung von Midazolam lässt sich deutlich eine Substratinhibition erkennen, die bei CYP3A4 stärker ausgeprägt ist (Abb. 49). Als Michaelis-Menten-Konstante wurden $1.06 \pm 0.08 \mu\text{M}$ (CYP3A4) und $3.02 \pm 0.15 \mu\text{M}$ (HLM) erhalten. Demnach wurden für die Inhibitionsassays Substratkonzentrationen von 1 μM und 3 μM verwendet. Bei der Inkubation mit humanen Lebermikrosomen muss beachtet werden, dass die Biotransformation zum 1'-Hydroxymidazolam durch mehrere Isoenzyme der Subfamilie CYP3A erfolgt.²⁰⁴ Die erhaltenen Michaelis-Menten-Konstanten kommen den meisten veröffentlichten Werten sehr nahe.^{205,206} Beispielsweise gaben Walsky und Obach K_m -Werte von 0.6 μM (CYP3A4) und 2.3 μM (HLM) an.¹⁷⁷ Sie beobachteten ebenfalls eine Substratinhibition bei höheren Midazolamkonzentrationen.

Testosteron-6 β -hydroxylierung

Die Auswertung der Substratsättigungskurven für die Testosteron-6 β -hydroxylierung (Abb. 49) erfolgte nach dem Hill-Modell. Für CYP3A4 wurde ein K_m -Wert von $24.0 \pm 2.1 \mu\text{M}$ und für humane Lebermikrosomen von $59.7 \pm 8.6 \mu\text{M}$ erhalten. Testosteron

ist ein positiv kooperatives Substrat von CYP3A4 ($n_H > 1$). Für den Metabolismus von Testosteron zu 6 β -Hydroxytestosteron wurde die höchste Umsetzungsgeschwindigkeit von allen getesteten CYP-Substraten gemessen. Die ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten liegen im Bereich der meisten Literaturwerte, die für humane Lebermikrosomen ebenfalls höher sind im Vergleich zu dem rekombinanten Enzym.^{177,207} Zur Untersuchung der CYP3A4-Inhibition können Testosteronkonzentrationen von 25 μ M für CYP3A4 und 60 μ M für humane Lebermikrosomen verwendet werden.

3.4 Untersuchung der Isoenzymselektivität ausgewählter Substrate

Wird bei dem eingesetzten Testsubstrat nur von einem CYP-Enzym der entsprechende Metabolit gebildet, können subzelluläre Fraktionen anstatt von rekombinanten CYP-Enzymen für die Inhibitionsuntersuchungen verwendet werden, wodurch das Testsystem der In-vivo-Situation besser angepasst werden kann. Um die beteiligten CYP-Enzyme herauszufinden, gibt es mehrere Möglichkeiten. Einmal kann das Substrat mit humanen Lebermikrosomen umgesetzt werden und für jedes CYP-Enzym ein Inhibitor verwendet werden. Hierfür müssen die Inhibitoren eine ausreichende Selektivität aufweisen und in einer dafür geeigneten Konzentration eingesetzt werden. Wird die Umsetzung des Substrates durch den Inhibitor gehemmt, kann davon ausgegangen werden, dass das entsprechende Isoenzym für den Metabolismus des Substrates verantwortlich ist. Die andere hier verwendete Möglichkeit ist die direkte Umsetzung des Substrates mit einzelnen rekombinanten CYP-Enzymen, wobei nur eine Aktivität auftritt, wenn das Substrat durch das entsprechende CYP-Enzym umgesetzt wird. Daher wurden neun rekombinante CYP-Enzyme (CYP1A2 / 2A6 / 2B6 / 2C8 / 2C9 / 2C19 / 2D6 / 2E1 / 3A4), die zusammen über 90 % der in der Leber vorkommenden CYP-Enzyme darstellen, untersucht. Die ermittelten Umsetzungsgeschwindigkeiten für die einzelnen CYP-Enzyme wurden für jede Substratreaktion in einem Diagramm abgebildet (Abb. 50). Standen für einige Metaboliten keine Standardsubstanzen zur Verfügung, wie z. B. für 4'-Hydroxydiclofenac oder 6-Hydroxychlorzoxazon, konnte keine Umsetzungsgeschwindigkeit bestimmt werden. Hier wurden die Peakflächenverhältnisse (Area Ratios) des detektierten Metaboliten und des internen Standards gebildet. Da für jedes CYP-Enzym dieselbe Proteinkonzentration eingesetzt wurde, können diese direkt

miteinander verglichen werden. Zu beachten ist, dass durch die Gegenüberstellung der Umsetzungsgeschwindigkeit der einzelnen CYP-Enzyme in einem Diagramm eine Gleichsetzung erfolgt, da bei der Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit die CYP-Konzentration einbezogen wird. In den erhaltenen Diagrammen ist dadurch der tatsächliche Anteil, den die CYP-Enzyme in vivo am Metabolismus haben, nicht direkt ersichtlich, da die einzelnen CYP-Enzyme in der Leber in stark unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen.⁴ Somit kann beispielsweise bei einer hohen Aktivität von CYP2C19 und einer niedrigen Umsetzungsgeschwindigkeit durch CYP3A4 dennoch in vivo CYP3A4, aufgrund seiner starken Expression, das für den Metabolismus hauptsächlich verantwortliche Isoenzym sein. Es lassen sich nicht für alle häufig eingesetzten CYP-Substrate solche Selektivitätsdiagramme in der Literatur finden, da rekombinante CYP-Enzyme erst seit etwa 15 Jahren kommerziell erhältlich sind. In den meisten Fällen wurde auch nur eine Substratkonzentration getestet. Dabei kann je nach Wahl dieser Substratkonzentration ein anderes CYP-Enzym die höchste Aktivität besitzen, da die K_m -Werte für die Umsetzung des Substrates durch die einzelnen CYP-Enzyme stark unterschiedlich sein können. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit von jedem Substrat drei Konzentrationen untersucht. Dabei wurde sich an den ermittelten K_m -Werten orientiert (s. II.3.3). Für die niedrigste Substratkonzentration wurde etwa ein Zehntel des K_m -wertes eingesetzt. Die mittlere Konzentration entsprach etwa dem K_m -Wert und die höchste Konzentration etwa dem 10-fachen des K_m -wertes. Zeigt kein weiteres CYP-Enzym bei der mittleren untersuchten Substratkonzentration eine Umsetzung, handelt es sich um ein ausreichend selektives Substrat, da für die Inhibitionsuntersuchungen eine Substratkonzentration in der Nähe des K_m -wertes verwendet wurde. Anhand der drei getesteten Substratkonzentrationen kann die Michaelis-Menten-Konstante für die aktiven CYP-Enzyme abgeschätzt werden. Durch die Untersuchung der höheren Konzentration kann festgestellt werden, ob weitere CYP-Enzyme, zu denen das Substrat eine geringere Affinität aufweist, am Metabolismus beteiligt sind.

Phenacetin-O-deethylierung

Die O-Deethylierung von Phenacetin zum Paracetamol wird bei kleinen Substratkonzentrationen selektiv durch CYP1A2 katalysiert (Abb. 50). Bei einer

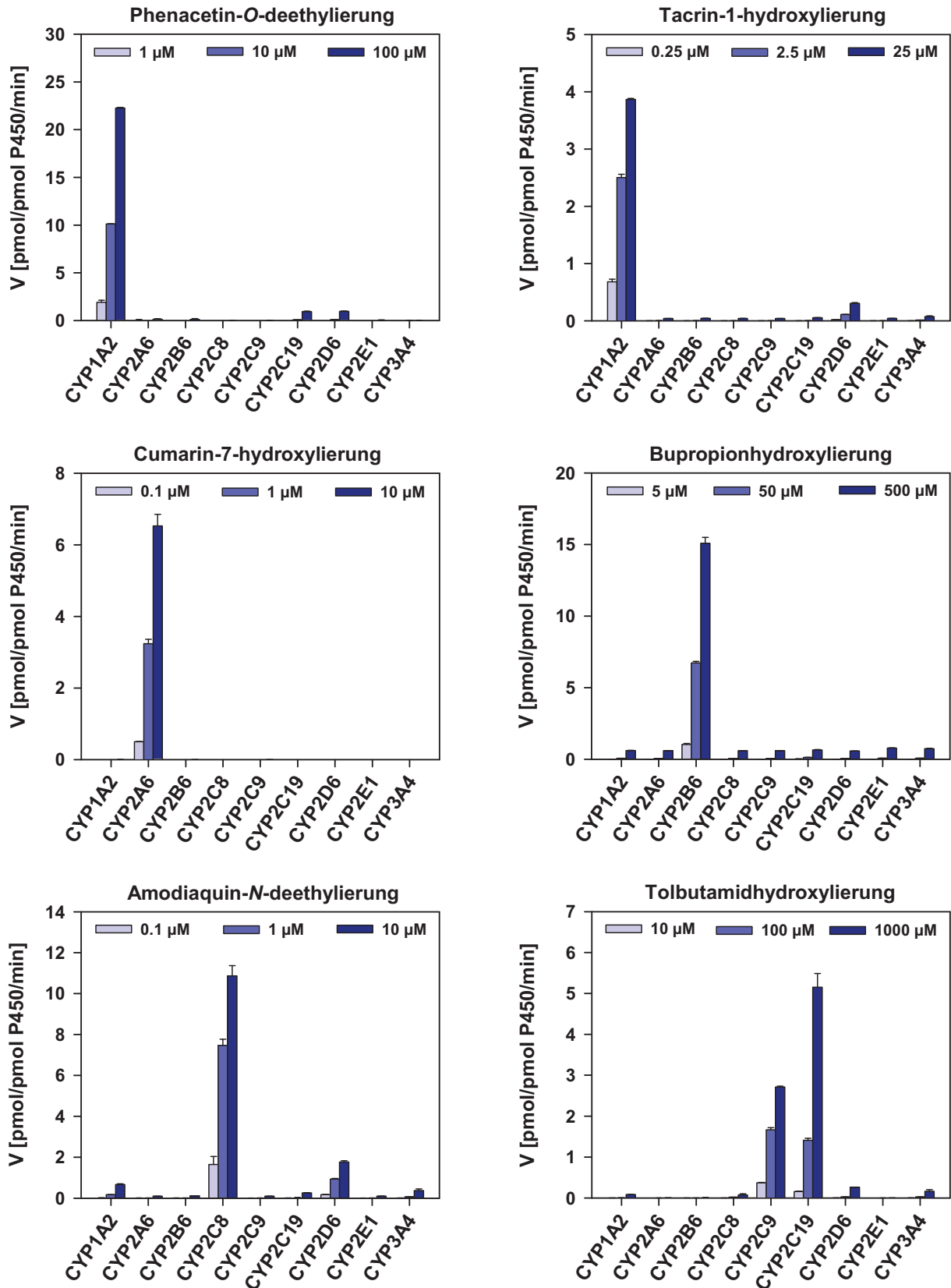


Abb. 50 Aktivitäten einzelner rekombinanter CYP-Enzyme für die O-Deethylierung von Phenacetin, die 1-Hydroxylierung von Tacrin, die 7-Hydroxylierung von Cumarin, die Hydroxylierung von Bupropion, die N-Deethylierung von Amodiaquin und die Hydroxylierung von Tolbutamid.

Substratkonzentration von 100 μM konnte zusätzlich eine geringe Umsetzung durch CYP2C19 und CYP2D6 festgestellt werden (Abb. 50), zu denen das Substrat jedoch eine wesentlich geringere Affinität besitzt. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in der Literatur gemacht.²⁰⁸ Zusätzlich ist eine Aktivität von CYP1A1 bekannt, das hier nicht untersucht wurde. Die erhaltene Umsetzungsgeschwindigkeit von 23 pmol/pmol P450/min bei der Inkubation von 100 μM Phenacetin entspricht etwa der Hälfte des Literaturwertes.²⁰⁸

Tacrin-1-hydroxylierung

1-Hydroxytacrin ist der Hauptmetabolit des Tacrins. Er entsteht vor allem durch CYP1A2.^{21,182} Tatsächlich ergab sich die höchste Umsetzungsgeschwindigkeit für die 1-Hydroxylierung von Tacrin durch CYP1A2 (Abb. 50). Deutlich niedriger fiel die Aktivität von CYP2D6 aus. Bei einer Substratkonzentration von 25 μM wurde mit allen CYP-Enzymen eine geringe Umsetzung festgestellt, was ebenfalls in der Literatur beschrieben wird.²¹ Die Affinität von Tacrin zu CYP1A2 ist höher als die des Phenacetins. Die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit beträgt aber nur etwa ein Fünftel. Die Selektivität bei einer Substratkonzentration im Bereich des K_m -Wertes ist geringer als die des Phenacetins, da Tacrin bei dieser Konzentration ebenfalls durch CYP2D6 hydroxyliert wird.

Cumarin-7-hydroxylierung

Cumarin ist ein sehr selektives CYP2A6-Substrat (Abb. 50). Mit keinem anderen CYP-Enzym konnte der Metabolit 7-Hydroxycumarin bei Inkubation einer Substratkonzentration von 0,1, 1 und 10 μM detektiert werden. Die hohe Selektivität konnte bereits in der Literatur nachgewiesen werden.²⁵

Bupropionhydroxylierung

Die Hydroxylierung von Bupropion erfolgt bei einer Substratkonzentration von 50 μM selektiv durch CYP2B6, während bei 500 μM zusätzlich mit allen anderen getesteten CYP-Enzymen eine vergleichbare aber geringe Umsetzung auftrat (Abb. 50). Das erhaltene Diagramm besitzt starke Ähnlichkeit mit den in der Literatur vorhandenen Daten.³⁰ Allerdings wurde eine geringere CYP2E1-Aktivität festgestellt. Die gemessene Umsetzungsgeschwindigkeit von CYP2B6 war etwa das Doppelte des Literaturwertes.³⁰

Amodiaquin-*N*-deethylierung

Amodiaquin besitzt eine hohe Affinität zu CYP2C8 und wird ebenfalls bei niedrigen Konzentrationen durch CYP2D6 deethyliert (Abb. 50), die etwa 20 % der Aktivität von CYP2C8 entspricht. Bei einer Substratkonzentration von 10 μM zeigten zusätzlich CYP1A2, CYP2C19 und CYP3A4 eine geringe Aktivität. Neben diesen Isoenzymen ist aus der Literatur eine Beteiligung von CYP1A1 und CYP1B1 bekannt, die beide hier nicht untersucht wurden.¹⁸⁸ Untersuchungen mit dem selektiven CYP2C8-Inhibitor Montelukast (s. II.3.10) zeigten, dass bei niedrigen Amodiaquin-konzentrationen von $< 1 \mu\text{M}$ die Selektivität ausreicht und die Umsetzung durch CYP2D6 vernachlässigbar ist.

Tolbutamidhydroxylierung

Tolbutamid wird an seiner Methylgruppe in Position 4 durch CYP2C9 und CYP2C19 hydroxyliert (Abb. 50). Die Umsetzung zum 4-Hydroxytolbutamid durch CYP2C9 ist dabei schon lange bekannt. Eine Beteiligung von CYP2C19 wurde anhand von Untersuchungen mit Antikörpern festgestellt.²⁰⁹ Aus Abb. 50 ist ersichtlich, dass der K_m -Wert und die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit (V_{max}) für CYP2C19 höher sind als für CYP2C9. Dennoch dürfte die Biotransformation von Tolbutamid in vivo hauptsächlich durch CYP2C9 erfolgen, da der Anteil von CYP2C9 in der Leber wesentlich höher ist als der von CYP2C19 (s. I.2.1). Die CYP2C19-Aktivität muss bei der Inkubation von humanen Lebermikrosomen beachtet werden. Andere CYP-Enzyme, wie z. B. CYP1A2, CYP2D6 und CYP3A4, setzen Tolbutamid sehr langsam und erst bei einer sehr hohen Konzentration um. Sie spielen bei den Inhibitionsassays keine Rolle.

Diclofenac-4'-hydroxylierung

Aus den gemessenen Daten geht hervor, dass Diclofenac im untersuchten Konzentrationsbereich nahezu ausschließlich durch CYP2C9 hydroxyliert wird (Abb. 51) und damit eine höhere Selektivität als Tolbutamid besitzt (Abb. 50). Darüber hinaus ist die Affinität zu diesem Enzym deutlich größer als die des Tolbutamids. Es findet kaum eine Umsetzung durch CYP2C19 statt. Damit ergab sich eine höhere Isoenzymselektivität als in der Literatur.³⁹ Bei der Verwendung von humanen Lebermikrosomen für die In-vitro-Inkubationen sollte deshalb besser Diclofenac anstatt von Tolbutamid als Substrat für CYP2C9 eingesetzt werden.

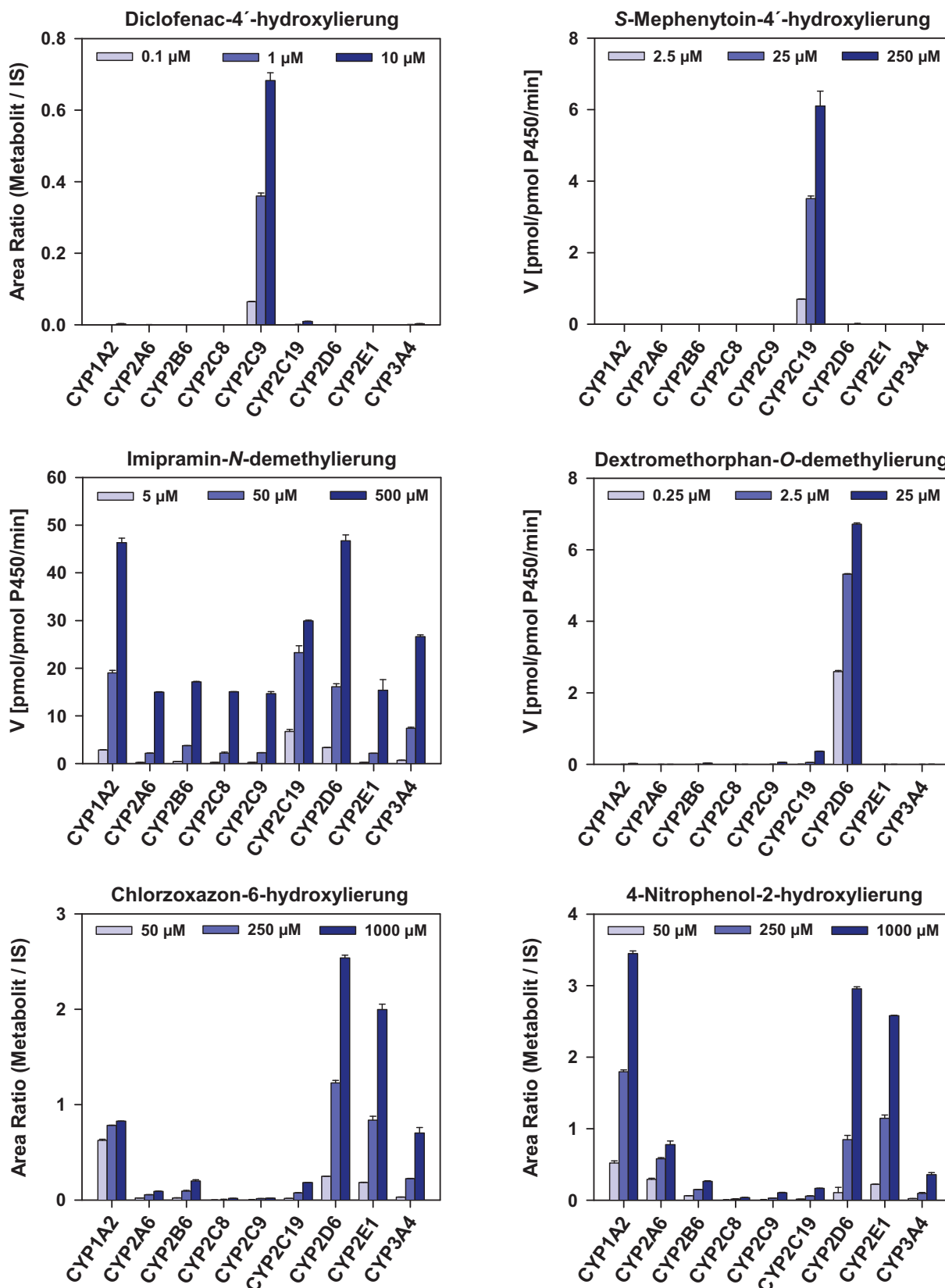


Abb. 51 Aktivitäten einzelner rekombinanter CYP-Enzyme für die 4'-Hydroxylierung von Diclofenac, die 4'-Hydroxylierung von S-Mephenytoin, die N-Demethylierung von Imipramin, die O-Demethylierung von Dextromethorphan, die 6-Hydroxylierung von Chlorzoxazon und die 2-Hydroxylierung von 4-Nitrophenol.

S-Mephenytoin-4'-hydroxylierung

Bei den Inkubationen mit rekombinanten CYP-Enzymen wurde S-Mephenytoin selektiv durch CYP2C19 zu 4'-Hydroxymephenytoin metabolisiert (Abb. 51). Für kein anderes CYP-Enzym konnte eine Umsetzung festgestellt werden. Durch die hohe CYP2C19-Selektivität kann die äußerst geringe maximale Umsetzungsgeschwindigkeit bei der Inkubation mit humanen Lebermikrosomen (Tab. 10) erklärt werden, da der CYP2C19-Gehalt in humanen Lebermikrosomen sehr gering ist. Nach Literaturangaben erfolgt die 4'-Hydroxylierung von S-Mephenytoin neben CYP2C19 ebenfalls durch CYP1A2.²¹⁰ Auf eine Beteiligung von CYP1A2 wurde dort aufgrund der Hemmung der Umsetzung durch den CYP1A2-Inhibitor Furafyllin geschlossen. Bei den hier durchgeführten Inkubationen konnte allerdings keine Aktivität von CYP1A2 festgestellt werden. Zusätzlich wurde bei den Untersuchungen zur Isoenzymselektivität der CYP-Inhibitoren (s. II.3.9) neben der CYP1A2-Inhibition eine Hemmung von CYP2C19 durch Furafyllin festgestellt, die bei einer zu hohen Furafyllinkonzentration fälschlicherweise zur Annahme der Beteiligung von CYP1A2 an der Umsetzung von S-Mephenytoin zum 4'-Hydroxymephenytoin in der Literatur geführt haben könnte.

Imipramin-N-demethylierung

Die N-Demethylierung von Imipramin erfolgt durch alle untersuchten CYP-Enzyme (Abb. 51). Die höchste Affinität besitzt dieses Substrat zu CYP2C19. Die aktivsten Enzyme für die N-Demethylierung sind CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 und CYP3A4. Eine Beteiligung dieser Isoenzyme konnte bereits in der Literatur nachgewiesen werden.^{47,197} Mit Umsetzungsgeschwindigkeiten bis zu 50 pmol/pmol P450/min erfolgt die Biotransformation von Imipramin zu Desipramin im Vergleich zu anderen Substraten der CYP-Enzyme sehr schnell. Die Umsetzung durch mehrere CYP-Enzyme erklärt, dass die mit humanen Lebermikrosomen erhaltene Substratsättigungskurve keinen klassischen hyperbolen Verlauf besitzt (s. II.3.3). Die Imipramin-N-demethylierung kann aufgrund der mangelnden Isoenzymselektivität nur als Substratreaktion für rekombinante CYP-Enzyme eingesetzt werden.

Dextromethorphan-O-demethylierung

Dextromethorphan ist der durch CYP2D6 entstehende Hauptmetabolit von Dextromethorphan, während 3-Methoxymorphinan erst bei hohen Substrat-

konzentrationen durch CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und vor allem CYP3A4 gebildet wird.^{45,211} Bei den Inkubationen der rekombinanten CYP-Enzyme erfolgte die O-Demethylierung von Dextromethorphan zum Dextrorphan nahezu ausschließlich durch CYP2D6 (Abb. 51). Erst bei einer höheren Substratkonzentration ist zusätzlich eine Umsetzung durch CYP2C19 zu beobachten. Dextromethorphan ist ein hochaffines Substrat von CYP2D6, da bereits bei einer Konzentration von 0.25 μM die halbmaximale Umsetzungsgeschwindigkeit nahezu erreicht wird. In der Literatur werden neben CYP2D6 die Enzyme CYP2C9, CYP2C19 und CYP3A4 für die Umsetzung zum Dextrorphan beschrieben.^{45,211} Diese spielen jedoch bei Inhibitionsassays keine Rolle, da Dextromethorphan eine erheblich geringere Affinität zu diesen Enzymen besitzt.

Chlorzoxazon-6-hydroxylierung

An der 6-Hydroxylierung von Chlorzoxazon sind mehrere CYP-Enzyme beteiligt, darunter v. a. CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 und CYP3A4 (Abb. 51). Im Vergleich zu den anderen CYP-Enzymen besitzt dieses Substrat eine deutlich höhere Affinität zu CYP1A2. Aus diesem Grund wurde bei der Umsetzung von Chlorzoxazon mit humanen Lebermikrosomen eine biphasische Substratsättigungskurve erhalten. Früher galt die Chlorzoxazon-6-hydroxylierung als Markerreaktion für CYP2E1.²⁰⁰ Neben der Umsetzung durch CYP2E1 wurde später eine Beteiligung weiterer CYP-Enzyme festgestellt, darunter CYP1A2 und CYP3A4.^{201,212} Die Literaturdaten und die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass Chlorzoxazon kein selektives CYP-Substrat ist und für die Untersuchung der CYP2E1-Inhibition bei der Inkubation mit humanen Lebermikrosomen nicht verwendet werden kann.

4-Nitrophenol-2-hydroxylierung

Die Biotransformation von 4-Nitrophenol zum 4-Nitrocatechol erfolgt durch alle untersuchten CYP-Enzyme, wobei CYP1A2, CYP2D6 und CYP2E1 die höchste Aktivität besitzen (Abb. 51). 4-Nitrophenol ist damit ebenso wie Chlorzoxazon kein selektives CYP2E1-Substrat. Von einer Beteiligung weiterer CYP-Enzyme, wie z. B. CYP3A4, wurde bereits in der Literatur berichtet.²¹³ Die durch viele Autoren beobachtete starke Hemmung der Umsetzung von 4-Nitrophenol durch Diethyldithiocarbamat bei der Inkubation von Lebermikrosomen hat zu der Annahme geführt, dass dieses Substrates hauptsächlich durch CYP2E1 umgesetzt wird, was

auf die mangelnde Selektivität dieses Inhibitors zurückgeführt werden kann (s. II.3.9).²⁰³

Midazolam-1'-hydroxylierung

Die 1'-Hydroxylierung von Midazolam erfolgt von den getesteten CYP-Enzymen nahezu ausschließlich durch CYP3A4 (Abb. 52). Erst bei höheren Midazolamkonzentrationen wurde eine Umsetzung durch CYP2B6 festgestellt, was die Literaturangaben bestätigt.²¹⁴ Bei Midazolam ist zu beachten, dass neben CYP3A4 weitere Isoenzyme der CYP3A-Subfamilie die 1'-Hydroxylierung katalysieren.^{204,214}

Testosteron-6 β -hydroxylierung

Testosteron wird bis zu einer Konzentration von mind. 25 μ M selektiv durch CYP3A4 zu 6 β -Hydroxytestosteron metabolisiert (Abb. 52). Bei einer Substratkonzentration von 250 μ M wurde neben CYP3A4 eine Umsetzung durch alle weiteren getesteten CYP-Enzyme festgestellt, die allerdings mit einer geringen Geschwindigkeit erfolgt, was mit den Beobachtungen aus der Literatur übereinstimmt.²¹⁵ Die gemessene Umsetzungsgeschwindigkeit für die 6 β -Hydroxylierung von Testosteron durch CYP3A4 ist die höchste aller hier untersuchten CYP-Substrate.

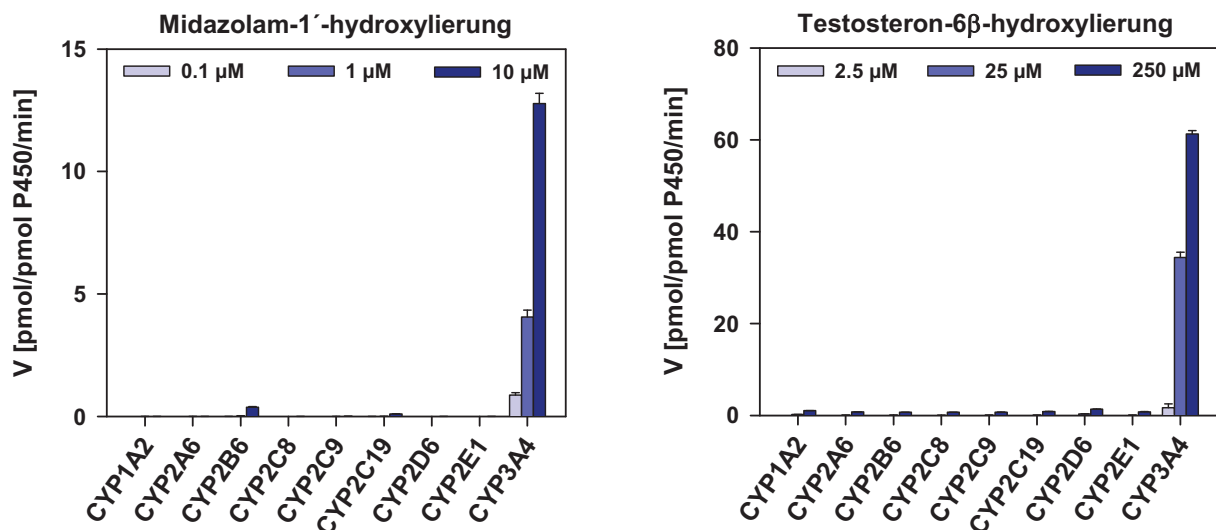


Abb. 52 Aktivitäten einzelner rekombinanter CYP-Enzyme für die 1'-Hydroxylierung von Midazolam und die 6 β -Hydroxylierung von Testosteron.

Durch die Umsetzung der ausgewählten Substrate mit rekombinanten CYP-Enzymen konnte für die meisten Enzyme ein selektives Substrat gefunden werden, wenn dieses in einer Konzentration des K_m -Wertes für das entsprechende Isoenzym eingesetzt wird. Die Phenacetin-O-deethylierung (CYP1A2), die Cumarin-7-hydroxylierung (CYP2A6), die Bupropionhydroxylierung (CYP2B6), die Diclofenac-4'-hydroxylierung (CYP2C9), die S-Mephenytoin-4'-hydroxylierung (CYP2C19), die Dextromethorphan-O-demethylierung (CYP2D6) und die Midazolam-1'-hydroxylierung (CYP3A4) können daher als Substratreaktionen für die Untersuchung der CYP-Inhibition bei der Inkubation mit humanen Lebermikrosomen empfohlen werden. Die Amodiaquin-N-deethylierung erfolgt neben CYP2C8 ebenfalls in einem geringen Ausmaß durch CYP2D6, daher sollten für dieses Enzym weitere Substrate, wie z. B. Paclitaxel, untersucht werden. Als ungeeignet aufgrund mangelnder Isoenzymselektivität erwiesen sich die Imipramin-N-demethylierung, die Chlorzoxazon-6-hydroxylierung und die 4-Nitrophenol-2-hydroxylierung. Von den getesteten Substraten wurde keines selektiv durch CYP2E1 umgesetzt.

3.5 Einfluss der NADPH-Konzentration auf die Enzymaktivität

Für die durch CYP-Enzyme katalysierten Reaktionen wird Nicotinamid-adenindinukleotidphosphat (NADPH) als Cosubstrat benötigt. Bei einer In-vitro-Inkubation kann hierzu direkt NADPH zugegeben werden oder das erforderliche Cosubstrat durch ein NADPH-generierendes System erzeugt werden.^{144,177} Die Erzeugung von NADPH erfolgt in den meisten Fällen durch die Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G6PDH), die Glucose-6-phosphat in D-Glucono-1,5-lacton-6-phosphat umwandelt, wobei NADP^+ zu NADPH reduziert wird. Ein großer Vorteil der Verwendung eines NADPH-generierenden Systems ist, dass ständig NADPH nachgeliefert wird und dadurch die NADPH-Konzentration im Sättigungsbereich gehalten werden kann. Bei Inhibitionsuntersuchungen besteht aber die Möglichkeit, dass die eingesetzte Glucose-6-phosphatdehydrogenase durch den getesteten Inhibitor gehemmt werden kann, wodurch fälschlicherweise eine CYP-Inhibition vorgetäuscht wird.²¹⁶ Somit müssten die zu testenden Inhibitoren zunächst auf eine Hemmung der Glucose-6-phosphatdehydrogenase untersucht werden. Eine Beeinträchtigung der Aktivität der Glucose-6-phosphatdehydrogenase ist für die meisten CYP-Inhibitoren und insbesondere bei der Untersuchung von

Pflanzenextrakten unbekannt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit bei allen CYP-Inhibitionsassays NADPH direkt zugegeben. Während für das Substrat eine Konzentration in der Nähe des K_m -Wertes verwendet wird (Tab. 10), sollte die Cosubstratkonzentration im Sättigungsbereich liegen. Um eine geeignete NADPH-Konzentration zu finden, wurden ausgewählte Substrate mit rekombinanten CYP-Enzymen bzw. humanen Lebermikrosomen mit unterschiedlichen NADPH-Konzentrationen inkubiert und jeweils die Umsetzungsgeschwindigkeit bestimmt (Abb. 53). In allen Fällen war die für eine maximale Umsetzungsgeschwindigkeit erforderliche NADPH-Konzentration bei der Verwendung von rekombinanten CYP-Enzymen kleiner als bei den humanen Lebermikrosomen. Für die rekombinanten

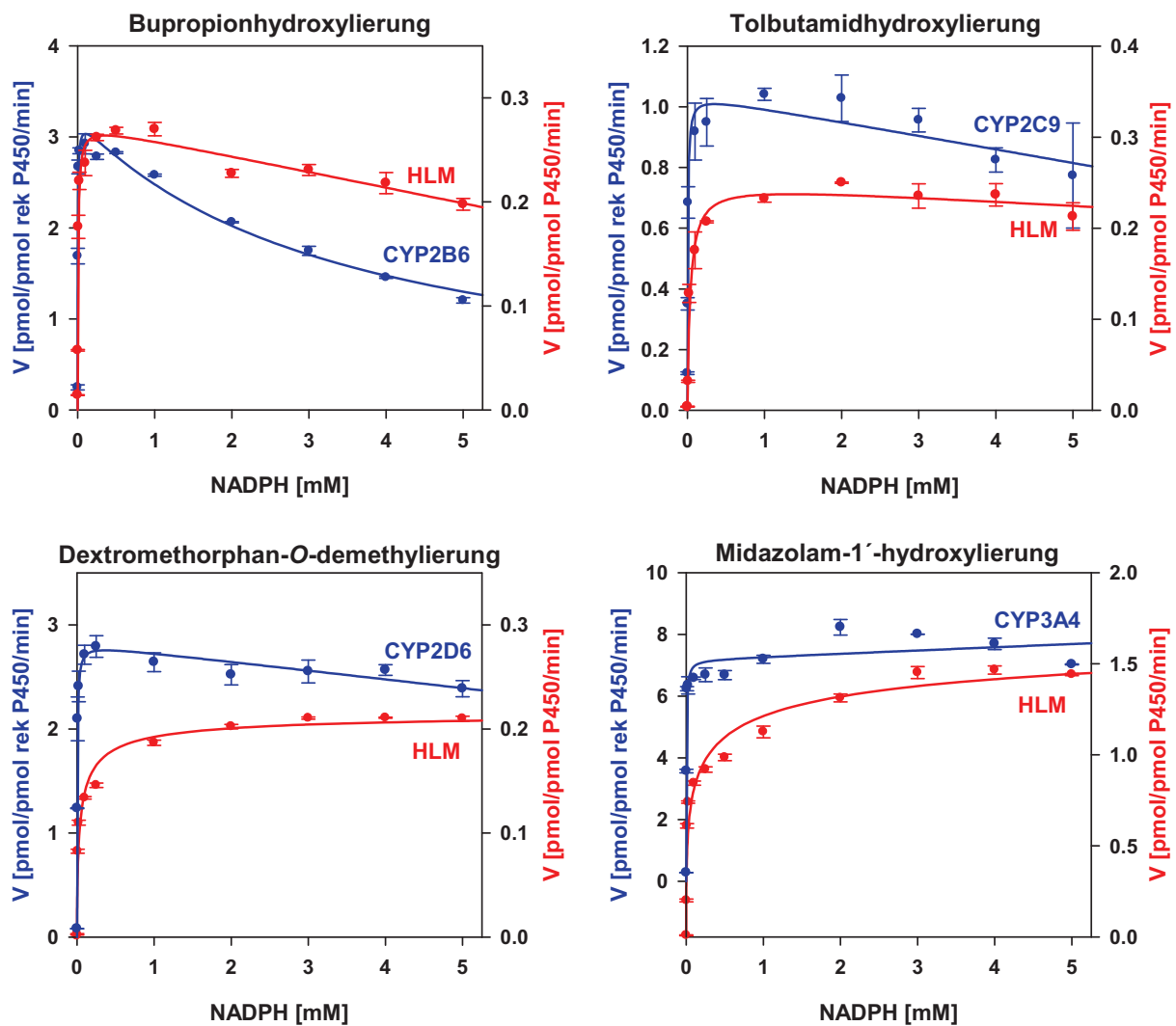


Abb. 53 Abhängigkeit der Umsetzungsgeschwindigkeit von der NADPH-Konzentration anhand von Markerreaktionen für ausgewählte CYP-Enzyme. Untersuchung von rekombinanten CYP-Enzymen und humanen Lebermikrosomen (HLM). Inkubationsbedingungen s. V.2.5.1.2.

CYP-Enzyme wurde bei der Inkubation von 100 μM NADPH bereits etwa 90 % der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit erreicht. Die Umsetzungsgeschwindigkeit stieg häufig bis zu einer NADPH-Konzentration von etwa 1 mM an. Wird die Cosubstratkonzentration weiter erhöht, nimmt die Umsetzungsgeschwindigkeit wieder ab, was bei den rekombinanten CYP-Enzymen stärker ausgeprägt ist (Abb. 53). Die erhaltenen Daten zeigen, dass die Verwendung von etwa 1 mM NADPH für die CYP-Assays sinnvoll ist. Eine geringere NADPH-Konzentration ist v. a. für die Inkubation mit humanen Lebermikrosomen nicht ausreichend. Die Ergebnisse bestätigen somit die in der Literatur häufig verwendete NADPH-Konzentration von 1.3 mM.¹⁷⁷ Bei den CYP-Assays entstehen nur geringe Metabolitenkonzentrationen, so dass für die Umsetzung des Substrates nur wenig NADPH benötigt wird. Im Vergleich zu dem Substratumsatz ist die eingesetzte NADPH-Konzentration von 1 mM sehr hoch (> 1000-facher Überschuss), so dass diese während der Inkubation kaum absinkt und demzufolge als konstant angesehen werden kann, sofern NADPH während der Inkubation stabil bleibt. Der Einsatz eines NADPH-generierenden Systems ist für die CYP-Assays demnach nicht erforderlich.

3.6 Abhängigkeit der Substratumsetzung von der Inkubationszeit

Bei den LC/MS-basierten CYP-Assays und bei den meisten Fluoreszenzassays in der Mikrotiterplatte muss die Enzymreaktion vor der Messung abgestoppt werden. Dies ist für eine LC/MS-Analyse erforderlich, da die Proben nur nacheinander vermessen werden können. Bei den Untersuchungen in der Mikrotiterplatte wird erst nach der Zugabe einer alkalischen Stopplösung die selektive Erfassung des Metaboliten ermöglicht. Wenn ein Abstoppen der Enzymreaktion erfolgt, wird aus einer Probe nur zu einem Inkubationszeitpunkt ein Messwert erhalten. Für die anschließende Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit wird die Metabolitkonzentration auf die Inkubationszeit bezogen, wodurch die mittlere Umsetzungsgeschwindigkeit erhalten wird. Für die Bestimmung enzymkinetischer Parameter ist allerdings die initiale Umsetzungsgeschwindigkeit zu verwenden.^{122,123} Ist die Umsetzungsgeschwindigkeit während der gesamten Inkubationszeit konstant, stimmt die erhaltene mittlere Umsetzungsgeschwindigkeit mit der initialen Umsetzungsgeschwindigkeit überein und es kann auf eine Korrektur verzichtet werden.

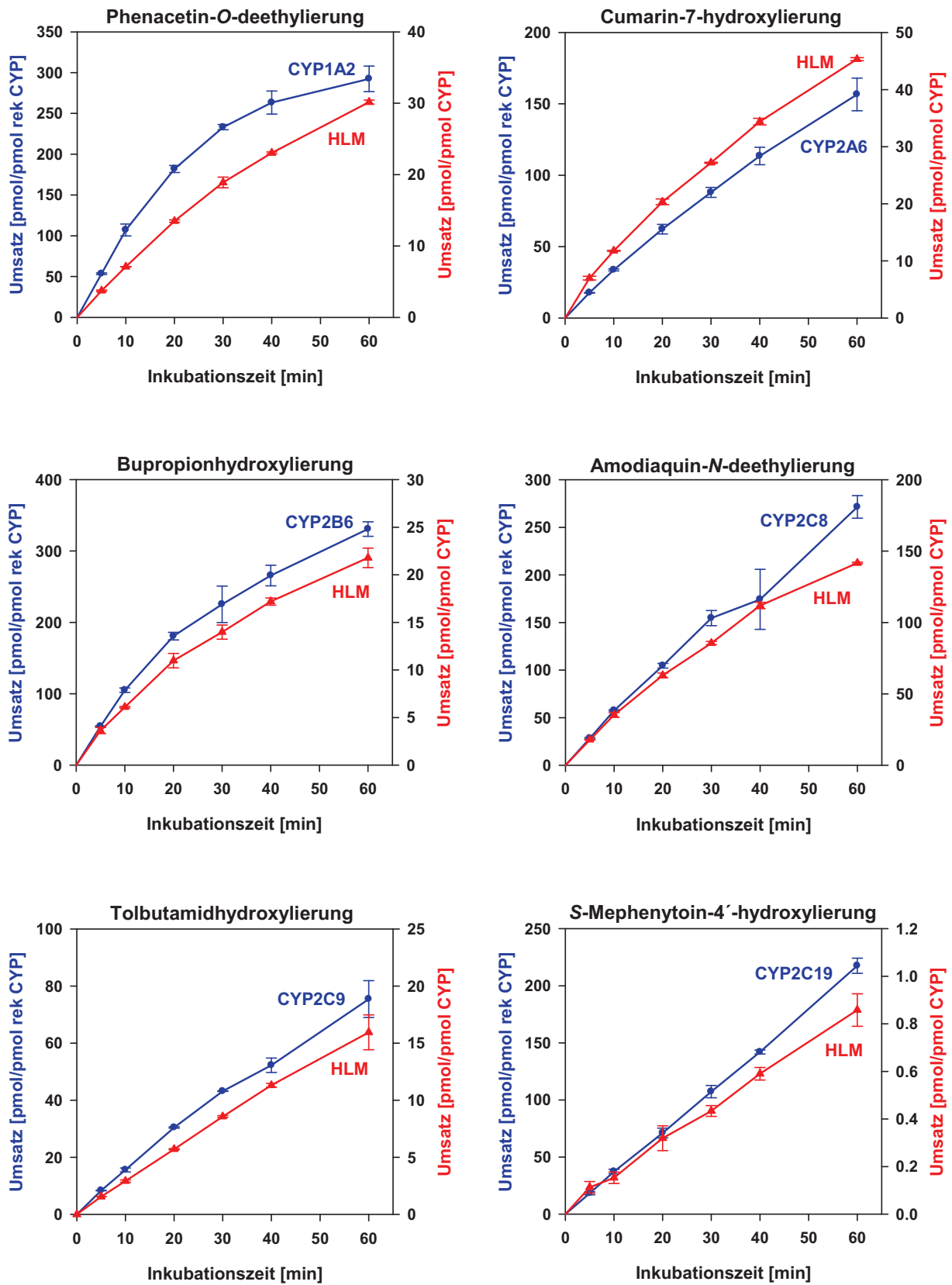


Abb. 54 Abhängigkeit der Umsetzung von der Inkubationszeit bei der Inkubation der Substrate mit rekombinanten CYP-Enzymen und humanen Lebermikrosomen. Weitere Inkubationsbedingungen s. V.2.5.1.2.

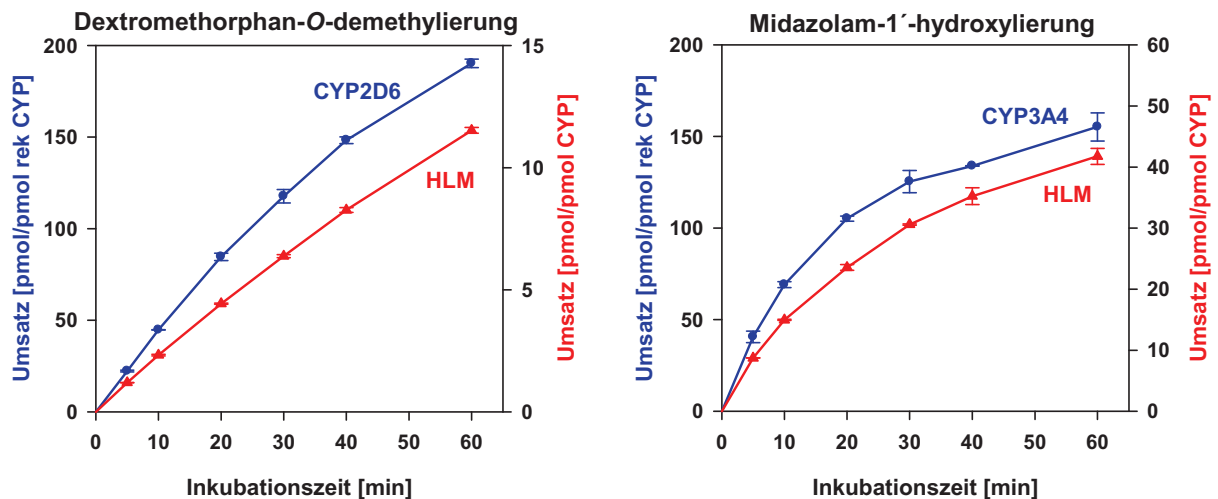


Abb. 54 (Fortsetzung) Abhängigkeit der Umsetzung von der Inkubationszeit bei der Inkubation der Substrate mit rekombinanten CYP-Enzymen und humanen Lebermikrosomen. Weitere Inkubationsbedingungen s. V.2.5.1.2.

Zur Überprüfung der zeitabhängigen Umsetzung der Substrate wurde jedes CYP-Enzym und die humanen Lebermikrosomen mit jeweils einem ausgewählten Substrat inkubiert und die Reaktion zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt. Nach der LC/MS/MS-Analyse der Metaboliten wurde der Substratumsatz in pmol Metabolit pro pmol CYP-Enzym bestimmt und dieser gegenüber der Inkubationszeit aufgetragen (Abb. 54). Ist die Umsetzungsgeschwindigkeit konstant, ergibt sich dabei eine Gerade. Ein annähernd linearer Verlauf wurde z. B. für die Cumarin-7-hydroxylierung durch CYP2A6, die Tolbutamidhydroxylierung durch CYP2C9 und HLM, die S-Mephenytoin-4'-hydroxylierung durch CYP2C19 und die Dextromethorphan-O-demethylierung durch HLM beobachtet (Abb. 54). In vielen anderen Fällen flacht die Kurve mit zunehmender Inkubationszeit ab, d. h. die Umsetzung des Substrates verlangsamt sich. Eine besonders ausgeprägte Sättigung tritt bei der Phenacetin-O-deethylierung durch CYP1A2 und bei der Midazolam-1'-hydroxylierung auf (Abb. 54). Für den Rückgang der Umsetzungsgeschwindigkeit mit steigender Inkubationszeit sind mehrere Gründe denkbar. Zunächst ist das Protein länger einer thermischen Belastung ausgesetzt, was zu einer Aktivitätsminderung führen kann. Während der Inkubation wird das Substrat umgesetzt, so dass die vorliegende Substratkonzentration sinkt. Da bei den Inhibitionsassays eine Substratkonzentration in der Nähe des K_m -Wertes und nicht eine Konzentration im Sättigungsbereich eingesetzt wird, führt der durch die Umsetzung erfolgte Rückgang der

Substratkonzentration zu einem Rückgang der Umsetzungsgeschwindigkeit. Ein hoher prozentualer Substratverbrauch liegt zum einen bei hochaffinen Substraten mit sehr kleinen K_m -Werten, wie z. B. Cumarin, Amodiaquin und Midazolam, und zum anderen bei Substraten, die einen hohen V_{max} -Wert besitzen, vor. Dies zeigt, dass für valide Enzymassays die Inkubationszeit und die Proteinkonzentration so gewählt werden müssen, dass der Substratverbrauch begrenzt wird und eine lineare Reaktionskinetik vorliegt. Bei niedrigen Substratkonzentrationen von z. B. $< 1 \mu\text{M}$ kann demzufolge nur eine sehr kleine Metabolitkonzentration entstehen, was die Wahl eines geeigneten Analysenverfahrens erforderlich macht. Aus diesem Grund werden für CYP-Assays häufig empfindliche Detektionsmethoden eingesetzt, wie z. B. die Massenspektrometrie¹⁷⁷ oder eine Fluoreszenzanalyse.^{144,217} In einigen Fällen werden auch HPLC/UV-Analysen zur Quantifizierung der CYP-Metaboliten durchgeführt.²¹⁸ Dabei werden oft eine hohe Proteinkonzentration und eine lange Inkubationszeit oder eine hohe Substratkonzentration verwendet, um eine detektierbare Metabolitkonzentration zu erhalten. Dies ist aus den oben genannten Gründen für enzymkinetische Messungen nicht sinnvoll. Somit sollte in jedem Fall ein dem analytischen Problem adäquates Messverfahren verwendet werden und nicht das analytische Problem dem gerade zur Verfügung stehenden Messgerät angepasst werden.

Zur Verdeutlichung der aus dem praktischen Versuch erhaltenen mittleren Umsetzungsgeschwindigkeit ist in Abb. 55 nochmals die Umsetzung von Midazolam durch CYP3A4 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt. Die Messpunkte beschreiben eine Sättigungskurve, was bereits aus der Literatur für die Midazolam-1'-hydroxylierung bekannt ist.²¹⁹ Zur Berechnung der Umsetzungsgeschwindigkeit wird die jeweilige Inkubationszeit verwendet. Graphisch wird dabei für jede Inkubationszeit eine Gerade durch den Messpunkt und den Koordinatenursprung gelegt. Die Steigungen dieser Geraden (Abb. 55A) entsprechen den jeweiligen mittleren Umsetzungsgeschwindigkeiten. Es ist ersichtlich, dass mit zunehmender Inkubationszeit die Ursprungsgeraden kleinere Steigungen besitzen. Somit ergeben sich für längere Inkubationszeiten kleinere mittlere Umsetzungsgeschwindigkeiten, die für die Midazolam-1'-hydroxylierung bei einer Inkubationszeit von 60 min nur noch ca. 30 % der von 5 min beträgt (Abb. 55B). Aus diesem Grund sollten für die Enzyminkubationen möglichst kurze Inkubationszeiten gewählt werden, bei denen

die Umsetzungsgeschwindigkeit gegenüber der Zeit noch nahezu konstant ist. Extrem kurze Inkubationszeiten von < 5 min sind aber praktisch nicht exakt durchführbar, da in einem Versuch bis zu 50 Proben jeweils in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gleichzeitig inkubiert werden. Dabei ist es notwendig zu allen Proben zum Start der Reaktion NADPH und nach Abschluss der Reaktion die Stopplösung zuzugeben. Zudem müssen die Proben jeweils gemischt werden, was einige Zeit in Anspruch nimmt. Eine Alternative hierzu ist die Durchführung der Inkubationen in einer Mikrotiterplatte, bei der diese Vorgänge schneller mit Hilfe einer Mehrkanalpipette durchgeführt werden können. Die am häufigsten verwendete Inkubationszeit bei den CYP-Inhibitionsassays betrug aus diesem Grund 15 min.

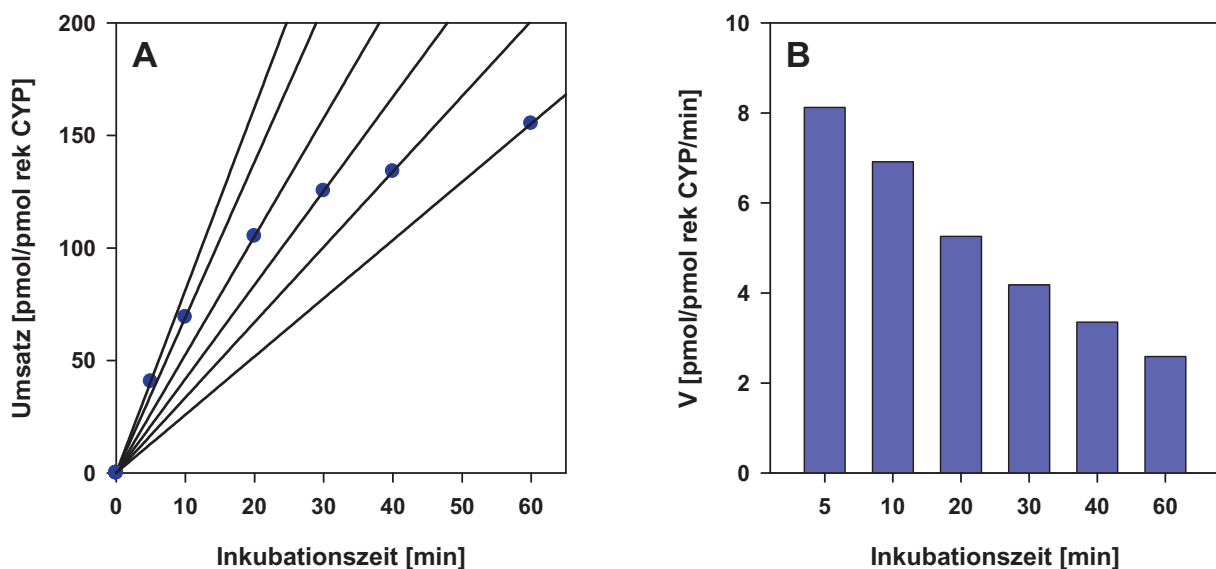


Abb. 55 Substratumsatz für die Midazolam-1'-hydroxylierung durch CYP3A4 bei verschiedenen Inkubationszeiten mit den Ursprungsgeraden zur Berechnung der mittleren Umsetzungsgeschwindigkeiten (A). Berechnete mittlere Umsetzungsgeschwindigkeiten für die Midazolam-1'-hydroxylierung durch CYP3A4 in Abhängigkeit der Inkubationszeit (B).

3.7 Stabilität der CYP-Enzyme unter den Inkubationsbedingungen

Um die Stabilität der CYP-Enzyme im Inkubationspuffer bei 37 °C zu untersuchen, wurden die Proben unterschiedliche Zeiten vorinkubiert und anschließend für jede Vorinkubationszeit die Umsetzungsgeschwindigkeit bestimmt (Abb. 56). Die NADPH-Lösung wurde im Eisbad aufbewahrt. Aliquote dieser Lösung wurden vor dem Start der Reaktion auf 37 °C für 5 min temperiert und anschließend den Proben für die

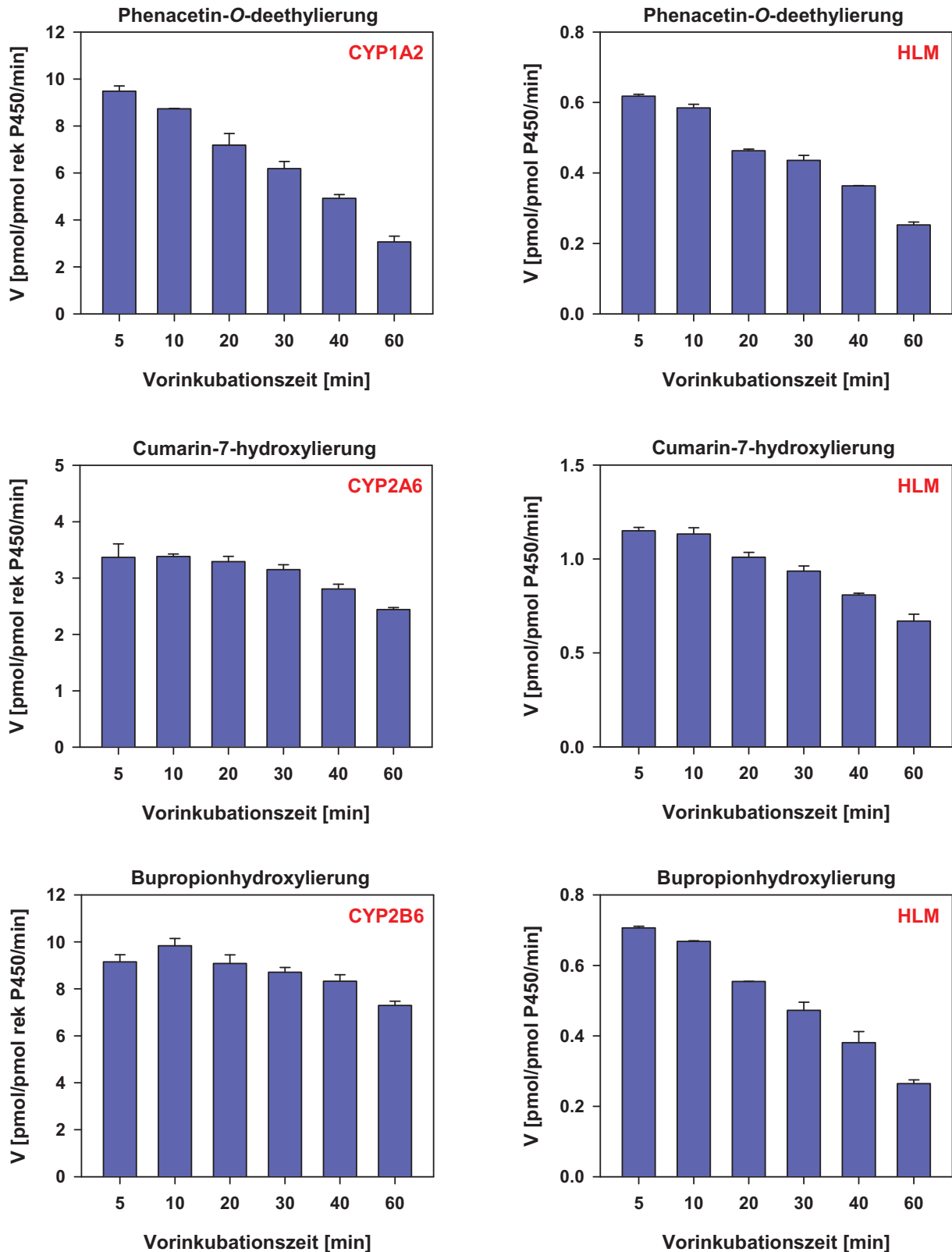


Abb. 56 Untersuchung der CYP-Enzym-Stabilität im Inkubationspuffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.4; 3 mM $MgCl_2$). Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit der einzelnen rekombinanten CYP-Enzyme (links) und der humanen Lebermikrosomen (HLM; rechts) nach verschiedenen Vorinkubationszeiten bei 37 °C mit Hilfe spezifischer Markerreaktionen.

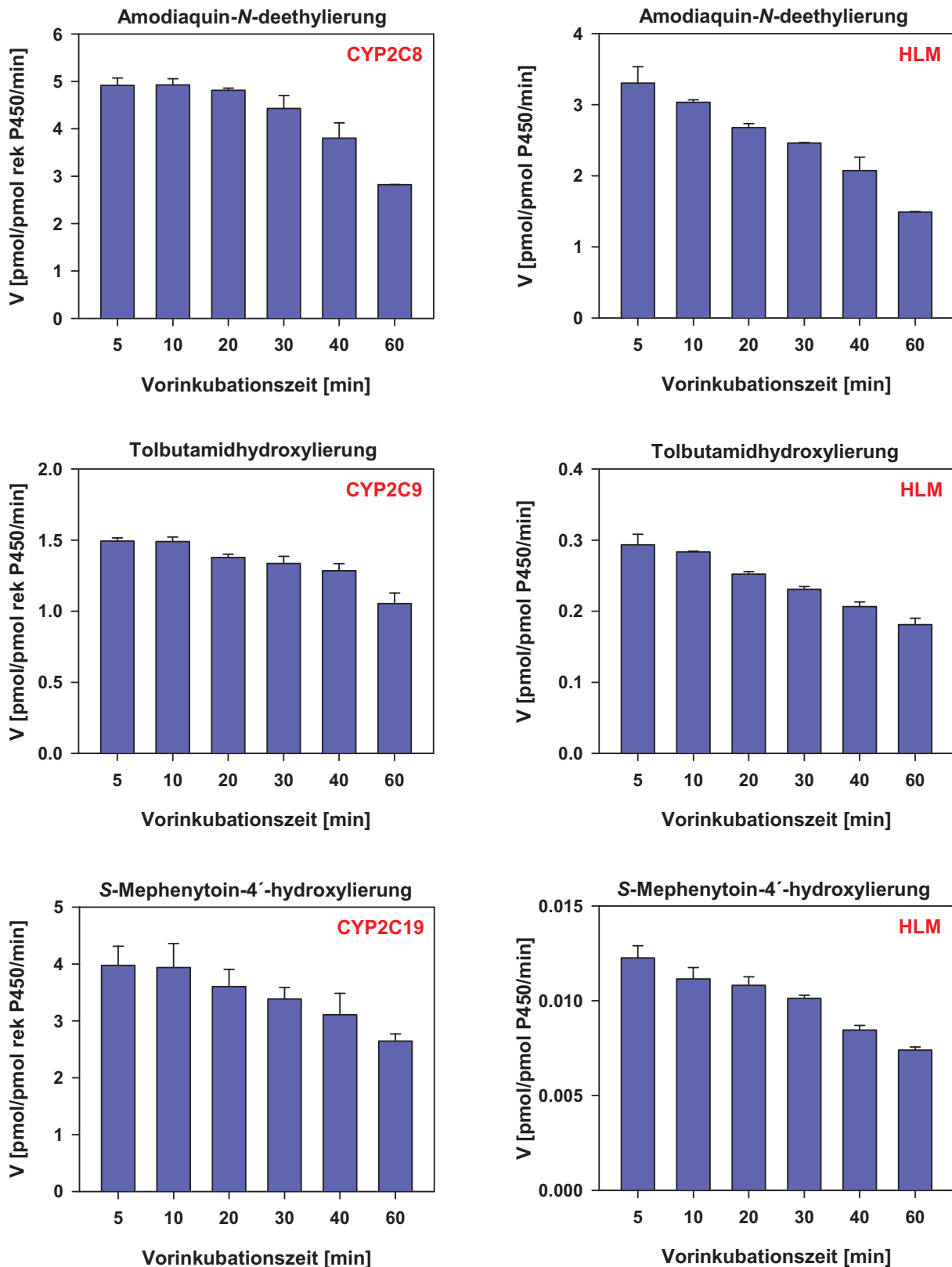


Abb. 56 (Fortsetzung) Untersuchung der CYP-Enzym-Stabilität im Inkubationspuffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.4; 3 mM $MgCl_2$). Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit der einzelnen rekombinanten CYP-Enzyme (links) und der humanen Lebermikrosomen (HLM; rechts) nach verschiedenen Vorinkubationszeiten bei 37 °C mit Hilfe spezifischer Markerreaktionen.

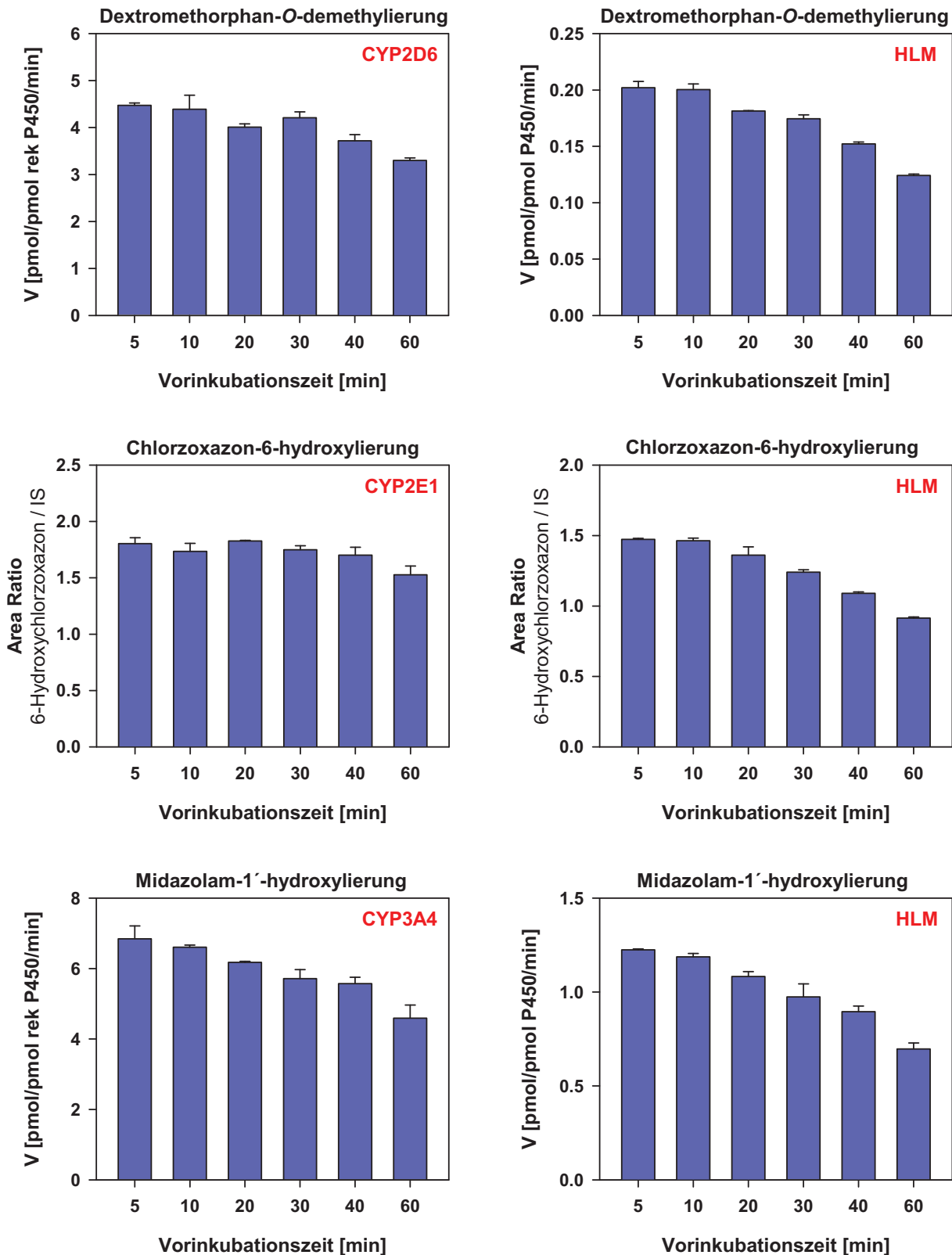


Abb. 56 (Fortsetzung) Untersuchung der CYP-Enzym-Stabilität im Inkubationspuffer (100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.4; 3 mM $MgCl_2$). Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit der einzelnen rekombinanten CYP-Enzyme (links) und der humanen Lebermikrosomen (HLM; rechts) nach verschiedenen Vorinkubationszeiten bei 37 °C mit Hilfe spezifischer Markerreaktionen.

einzelnen Vorinkubationszeiten zugegeben. Für jedes CYP-Enzym wurde ein spezifisches Substrat verwendet und das jeweilige rekombinante CYP-Enzym sowie humane Lebermikrosomen untersucht. Alle Substrate wurden dabei in einer Konzentration eingesetzt, die in der Nähe des jeweiligen K_m -Wertes lag. In allen Fällen nahmen die Umsetzungsgeschwindigkeiten mit steigender Vorinkubationszeit ab, was auf einen Stabilitätsverlust hindeutet (Abb. 56). Häufig sank die Aktivität bei Verwendung von HLM innerhalb von 60 min stärker ab als bei der Inkubation der rekombinanten CYP-Enzyme. Bei der Erhöhung der Vorinkubationszeit von 5 auf 10 min konnte nur in einzelnen Fällen ein Anstieg der Umsetzungsgeschwindigkeit beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass eine Vorinkubationszeit von 5 min bei den Inhibitionsassays für die Temperierung der Proben ausreichend ist. Ein sehr starker Rückgang der Enzymaktivität um bis zu 60 % bei einer Erhöhung der Vorinkubationszeit auf 60 min konnte bei CYP1A2 beobachtet werden. Daher ist das bereits beobachtete Absinken der Umsetzungsgeschwindigkeit bei einer steigenden Inkubationszeit (s. II.3.6) auf die mangelnde Stabilität von CYP1A2 unter den Inkubationsbedingungen zurückzuführen. Die geringsten Stabilitäten bei den rekombinanten CYP-Enzymen wiesen somit CYP1A2 und CYP3A4 auf. Bei der Verwendung von HLM sank die Umsetzungsgeschwindigkeit von CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8 und CYP3A am stärksten ab (Abb. 56). Aus den vorliegenden Daten kann geschlossen werden, dass CYP-Enzyme im Inkubationspuffer bei 37 °C an Aktivität verlieren. Das Ausmaß des Aktivitätsverlustes, der dabei > 50 % innerhalb von 1 h betragen kann, ist bei den einzelnen CYP-Enzymen unterschiedlich stark ausgeprägt. Daher müssen bei der Handhabung der CYP-Enzyme einige Dinge beachtet werden. Die Präparation von subzellulären Fraktionen muss im Eisbad bei etwa 1 °C durchgeführt werden. Vor dem Einfrieren der Proteinlösung empfiehlt sich der Zusatz eines Kryoprotektors, wie z. B. Sucrose. Grundsätzlich sollten die Enzyme im Tiefkühlschrank bei -80 °C gelagert werden. Empfehlenswert ist eine Temperaturlaufzeichnung, damit die Lagertemperatur zu jeder Zeit kontrolliert werden kann. Aus den kommerziell erworbenen Proteinlösungen wurden Aliquote angefertigt, die für jeweils einen Versuch ausreichten und nach dem Auftauen sofort aufgebraucht wurden. Somit konnte eine Belastung durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren der Proteinstammlösung vermieden werden. Schließlich sollte aufgrund des Aktivitätsverlustes bei den Assays eine kurze Inkubationszeit gewählt werden.

3.8 Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die Enzymaktivität

Für die Inhibitionsassays müssen das Substrat und der Inhibitor gelöst vorliegen. Da sich diese Substanzen oft nicht in reinem Puffer lösen, wird im Allgemeinen eine Stammlösung in einem geeigneten Lösungsmittel hergestellt, die dann in den Inkubationspuffer verdünnt wird, um die entsprechende Assay-Konzentration zu erhalten. Somit enthält die Inkubationsprobe eine bestimmte Konzentration an organischem Lösungsmittel. Da organische Lösungsmittel die Enzymaktivität beeinflussen können, sollte deren Konzentration im Assay möglichst gering gehalten werden und in jeder Inkubationsprobe muss sich dieselbe Lösungsmittelkonzentration befinden. In dieser Arbeit wurde v. a. Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel für die Substrat- und die Inhibitorstammlösungen verwendet. DMSO bietet gegenüber anderen Lösungsmitteln einige Vorteile. Es lässt sich ausgezeichnet pipettieren, so dass selbst bei kleinen Volumina eine hohe Pipettiergenauigkeit erzielt werden kann. Viele Substanzen und Pflanzenextrakte lösen sich in DMSO. Es ist schwer flüchtig, so dass bei mehrfacher Öffnung des Gefäßes keine Konzentrationsänderungen der Lösungen durch Verdunstung auftreten können. Im Kühlschrank erfolgt der Übergang von dem flüssigen in den festen Aggregatzustand. Um die Lösungsmittelkonzentration in den Assayproben gering zu halten, besteht prinzipiell zur Herstellung einer Konzentrationsreihe für eine Inhibitionskurve die Möglichkeit, das eingewogene Substrat oder den Inhibitor in einem organischen Lösungsmittel zu lösen und dann mit Puffer zu verdünnen. Dabei sinkt zwar die im Assay enthaltene Lösungsmittelkonzentration. Es befinden sich aber in jeder Assayprobe unterschiedliche Lösungsmittelgehalte und die gemessenen Restaktivitäten spiegeln nicht die durch den Inhibitor verursachte Hemmung wider. Aus diesem Grund wurde die Konzentrationsreihe ebenfalls mit dem organischen Lösungsmittel hergestellt und anschließend um den Faktor 100 in den Inkubationsansatz verdünnt. Damit enthielten die Proben für die enzymkinetischen Messungen 1 % organisches Lösungsmittel, verursacht durch die Zugabe des Substrates. In den Proben zur Bestimmung der inhibitorischen Aktivität befand sich ein Anteil von 2 % an organischem Lösungsmittel, der durch die Zugabe der Substrat- und der Inhibitorstammlösung zustande kam.

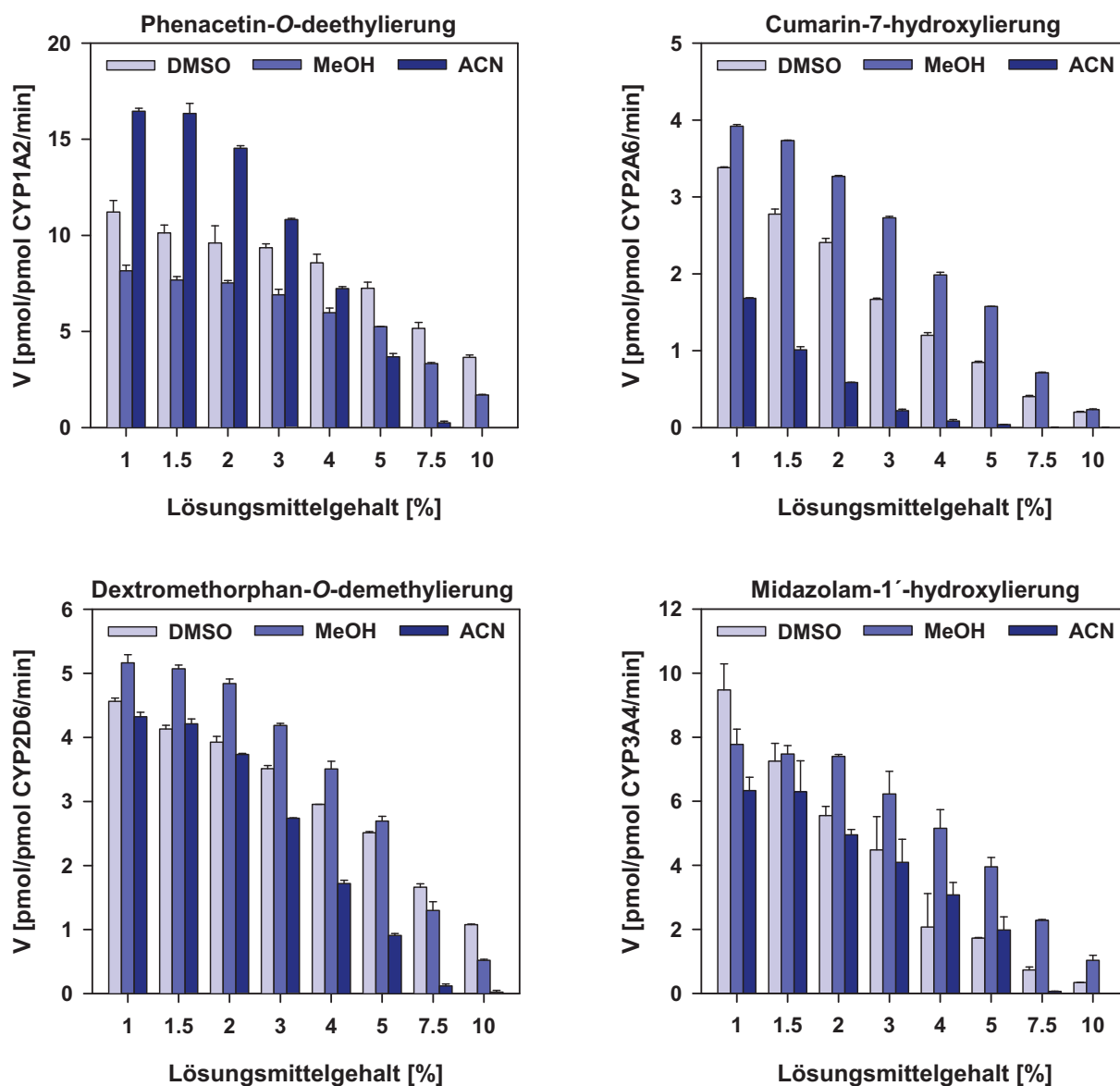


Abb. 57 Enzymaktivität ausgewählter CYP-Enzyme in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an organischem Lösungsmittel im Inkubationspuffer. Getestete Lösungsmittel: Dimethylsulfoxid (DMSO), Methanol (MeOH) und Acetonitril (ACN). Inkubation von Phenacetin (10 μ M, CYP1A2), Cumarin (1 μ M, CYP2A6), Dextromethorphan (0.7 μ M, CYP2D6) und Midazolam (1 μ M, CYP3A4).

Um den Einfluss von organischen Lösungsmitteln auf die Enzymaktivität zu untersuchen, wurden die Umsetzungsgeschwindigkeiten durch ausgewählte rekombinante CYP-Enzyme in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an DMSO, Methanol und Acetonitril anhand spezifischer Markerreaktionen bestimmt (Abb. 57). Dabei wurden die Substratstamlösungen im jeweiligen Lösungsmittel hergestellt, so dass sich mindestens ein Lösungsmittelgehalt von 1 % in der Inkubationsprobe befand. Als Substratkonzentration wurde dabei eine Konzentration

verwendet, die sich im Bereich des K_m -Wertes befand (s. II.3.3). Die ermittelten Umsetzungsgeschwindigkeiten unterschieden sich je nach Wahl des Lösungsmittels für die Substratstammlösung um bis zu 50 %. Bei einem Anstieg der Lösungsmittelkonzentration wurden die Enzyme stärker gehemmt. In Anwesenheit von 10 % Acetonitril sank die Aktivität aller getesteten CYP-Enzyme auf null (Abb. 57). Acetonitril ist daher als Lösungsmittel für die Stammlösungen ungeeignet. Bei einer Konzentration an organischem Lösungsmittel von 2 %, wie sie bei den Inhibitionsassays vorliegt, kann nicht gesagt werden, welches der getesteten Lösungsmittel generell verwendet werden sollte. Vergleicht man die Enzymaktivitäten in Anwesenheit von 1 % DMSO mit der von 2 % DMSO, konnte nur eine geringfügige Änderung der Aktivität der O-Deethylierung von Phenacetin durch CYP1A2 festgestellt werden, während die 7-Hydroxylierung von Cumarin durch CYP2A6 stärker durch das Lösungsmittel beeinflusst wurde. Die größte Differenz der Enzymaktivität bei einer Erhöhung der Lösungsmittelkonzentration um 1 % trat bei der Midazolam-1'-hydroxylierung durch CYP3A4 auf (Abb. 57). Die erhaltene Enzymaktivität bei einer Konzentration an organischem Lösungsmittel von 2 % ist mit allen getesteten Lösungsmitteln und CYP-Enzymen für einen Inhibitionsassay allerdings ausreichend. Es müssen keine höheren Proteinkonzentrationen als bei anderen veröffentlichten Assays verwendet werden.¹⁷⁷ Der Einfluss des organischen Lösungsmittels auf die Enzymaktivität bei der Untersuchung der inhibitorischen Aktivität wurde dadurch korrigiert, dass in die Kontrollprobe ohne Inhibitor (100 % Aktivität) dieselbe Lösungsmittelkonzentration gegeben wurde.

Zur Hemmung der CYP-Enzyme durch verschiedene Lösungsmittel liegen bereits in der Literatur Daten mit Hepatozyten²²⁰, humanen Lebermikrosomen²²¹ und rekombinanten CYP-Enzymen²²² vor, bei denen ebenfalls eine konzentrationsabhängige und für die einzelnen CYP-Enzyme unterschiedlich stark ausgeprägte Aktivitätsminderung festgestellt wurde. Darüber hinaus wurde eine Veränderung des K_m -Wertes in Anwesenheit von Lösungsmitteln beobachtet.¹⁷⁹ Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Assays ist im Vergleich zu den Angaben in der Literatur der negative Effekt der Lösungsmittel, insbesondere von DMSO, auf die Enzymaktivität geringer.

3.9 Isoenzymselektivität von ausgewählten CYP-Inhibitoren

In den letzten Jahren sind viele Inhibitoren von CYP-Enzymen entdeckt worden, worunter sich eine Reihe von Arznei- und Naturstoffen befindet.⁹ Durch die Food and Drug Administration (FDA), der Arzneimittelbehörde der USA, wurden für jedes CYP-Enzym spezielle Inhibitoren vorgeschlagen, die für In-vitro-Untersuchungen verwendet werden können (Tab. 11), von denen in dieser Arbeit eine Reihe untersucht wurden. Die FDA klassifiziert diese in bevorzugte und akzeptierte Inhibitoren. Kürzlich wurden die in der Literatur vorhandenen Daten zur Inhibition der CYP-Enzyme durch häufig eingesetzte Standardinhibitoren und deren Isoenzymselektivität zusammengefasst.²²³ Es ist zweckmäßig, die Hemmung durch einen Inhibitor in jedem Labor experimentell zu bestimmen, da in vielen Fällen das Ausmaß der Inhibition von den Versuchsbedingungen abhängt. Aus diesem Grund findet man in der Literatur oft unterschiedliche Daten für die inhibitorische Aktivität. Solche Parameter, die das Ergebnis beeinflussen können, sind u. a. das verwendete Testsubstrat, die Herkunft des Enzyms, die eingesetzte Substrat- sowie die

Tab. 11 Von der Food and Drug Administration (FDA) vorgeschlagene Inhibitoren der einzelnen CYP-Enzyme für In-vitro-Metabolismusuntersuchungen.²

Enzym	Inhibitor	
	bevorzugt	akzeptiert
CYP1A2	Furafyllin ^a	α -Naphthoflavon
CYP2A6	Tranlylcypromin ^a , Methoxsalen ^a	Pilocarpin ^a , Tryptamin ^a
CYP2B6		Sertralin ^a , Phenylcyclidin, Thiotepa, Clopidogrel ^a , Ticlopidin ^a
CYP2C8	Montelukast ^a , Quercetin ^a	Trimethoprim, Gemfibrozil, Rosiglitazon, Pioglitazon
CYP2C9	Sulfaphenazol ^a	Fluconazol, Fluvoxamin, Fluoxetin
CYP2C19		Ticlopidin ^a , Nootkaton ^a
CYP2D6	Chinidin ^a	
CYP2E1		Diethyldithiocarbamat ^a , Clomethiazol, Diallyldisulfid
CYP3A4/5	Ketoconazol ^a , Itraconazol	Azamulin, Troleandomycin, Verapamil

^a in dieser Arbeit untersuchte CYP-Inhibitoren

Proteinkonzentration und der vorliegende Inhibitionsmechanismus. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, sollte für die Inhibitionsassays am besten ein von der FDA vorgeschlagenes Substrat verwendet werden (Tab. 8) und die Substratkonzentration sollte sich im Bereich des K_m -Wertes befinden. Inhibitoren können bei der Validierung von laborspezifischen In-vitro-Assays als Positivkontrolle verwendet werden. Die erhaltenen Parameter der inhibitorischen Aktivität, wie z. B. der K_i - oder der IC_{50} -Wert, können mit vorhandenen Literaturdaten verglichen werden. Weiterhin können CYP-Inhibitoren helfen, die am Metabolismus eines Arzneistoffes beteiligten Isoenzyme herauszufinden. Hierfür muss der Inhibitor eine hohe Selektivität aufweisen, d. h. er sollte in einer bestimmten Konzentration nur ein CYP-Enzym hemmen, während andere Isoenzyme in ihrer Aktivität nur marginal beeinflusst werden dürfen.

Um die Isoenzymselektivität und die dafür erforderliche Konzentration der ausgewählten Inhibitoren zu ermitteln, wurde deren inhibitorische Aktivität auf neun rekombinante CYP-Enzyme mit Hilfe der optimierten LC/MS/MS-basierten Assays (s. II.3.1) untersucht. Als Substratreaktionen dienten dabei die Phenacetin-O-deethylierung (CYP1A2, 10 μ M Phenacetin), die Cumarin-7-hydroxylierung (CYP2A6, 1 μ M Cumarin), die Bupropionhydroxylierung (CYP2B6, 75 μ M Bupropion), die Amodiaquin-N-deethylierung (CYP2C8, 0.5 μ M Amodiaquin), die Tolbutamidhydroxylierung (CYP2C9, 100 μ M Tolbutamid), die Dextromethorphan-O-demethylierung (CYP2D6, 0.7 μ M Dextromethorphan) und die Midazolam-1'-hydroxylierung (CYP3A4, 1 μ M Midazolam). Die untersuchten Inhibitor-konzentrationen erstreckten sich über einen weiten Bereich von 250 pM bis 250 μ M. Für jedes CYP-Enzym wurde eine Inhibitionskurve erhalten (Abb. 58). Es wurden nur Messwerte für die Auswertung herangezogen, bei denen sich die ermittelte Restaktivität für das jeweilige CYP-Enzym von der Aktivität der Kontrolle ohne Inhibitor unterschied. Aus der Lage der Inhibitionskurven der einzelnen CYP-Enzyme zueinander, kann eine Aussage über die Isoenzymselektivität des Inhibitors getroffen werden. Befindet sich in dem erhaltenen Diagramm eine Inhibitionskurve im Vergleich zu den anderen deutlich weiter links, wird das dazugehörige CYP-Enzym durch diesen Inhibitor wesentlich stärker gehemmt und es ist eine selektive Hemmung eines Enzyms möglich. Anschließend wurden die IC_{50} -Werte der einzelnen Inhibitoren für jedes CYP-Enzym bestimmt (Tab. 12). Kein exakter IC_{50} -

Tab. 12 Ermittelte IC_{50} -Werte für die Inhibition der einzelnen humanen rekombinanten CYP-Enzyme durch ausgewählte Inhibitoren. Verwendet wurden folgende Isoenzyme und Standardsubstrate: CYP1A2 (10 μ M Phenacetin), CYP2A6 (1 μ M Cumarin), CYP2B6 (75 μ M Bupropion), CYP2C8 (0.5 μ M Amodiaquin), CYP2C9 (100 μ M Tolbutamid), CYP2C19 (30 μ M S-Mephenytoin), CYP2D6 (0.7 μ M Dextromethorphan), CYP2E1 (500 μ M Chlorzoxazon), CYP3A4 (1 μ M Midazolam).

Inhibitor	IC_{50} -Wert in μ M												
	CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4				
Furafyllin	0.71	> 100	> 100	> 100	> 100	32.4	87.1	> 100	> 100				
Tranylcypromin	27.3	0.12	8.07	17.0	10.4	8.41	69.4	93.5	> 250				
Clopidogrel	2.79	> 250	0.0061	9.60	13.5	0.38	12.5	> 250	8.54				
Sertraline	5.77	22.0	0.36	19.6	44.1	0.51	0.76	86.9	8.10				
Ticlopidin	2.20	> 250	0.090	157	77.8	0.67	1.79	> 250	> 250				
Montelukast	3.57	14.8	3.59	0.014	0.42	3.32	6.80	12.6	1.60				
Quercetin	3.30	31.7	29.6	1.92	6.97	19.5	27.8	14.7	27.0				
Sulfaphenazol	> 250	> 250	> 250	> 250	0.36	> 250	> 250	> 250	> 250				
Nootkaton	186	21.4	0.67	26.5	57.8	1.93	90.9	> 250	19.8				
Chinidin	> 250	> 250	7.39	44.0	> 250	49.3	0.0036	> 250	24.6				
Diethylthiocarbamat	149	51.0	> 250	63.7	64.6	32.5	> 250	30.8	195				
Ketoconazol	27.7	92.6	2.21	3.25	4.5	5.98	23.2	217	0.0125				

Wert konnte angegeben werden, wenn es sich um einen sehr schwachen Inhibitor handelte und die Restaktivität bei der größten getesteten Konzentration noch über 50 % lag.

Furafyllin

Furafyllin hemmte CYP1A2 mit einem IC_{50} -Wert von $0.71 \pm 0.07 \mu\text{M}$. Daneben wurde die Aktivität von CYP2C19 und CYP2D6 beeinflusst (Abb. 58). Für alle anderen CYP-Enzyme lagen die IC_{50} -Werte weit über $100 \mu\text{M}$. Die Ergebnisse zeigen, dass bei einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$, die für eine etwa 90%ige CYP1A2-Inhibition notwendig ist, ebenfalls die Aktivität von CYP2C19 um ca. 25 % vermindert ist. Furafyllin ist seit langem als Inhibitor von CYP1A2 bekannt. In der Literatur findet man mehrere IC_{50} -Werte für CYP1A2 von z. B. $1.54 \mu\text{M}$ oder $0.4 \mu\text{M}$, wovon die meisten mit humanen Lebermikrosomen bestimmt wurden.^{177,224} In bisherigen Untersuchungen wurde die Selektivität des Inhibitors durch Inkubation von humanen Lebermikrosomen anhand spezieller Markerreaktionen überprüft.^{24,221} Dabei erwies sich Furafyllin als sehr selektiver Inhibitor von CYP1A2. Die CYP1A2-Inhibition durch Furafyllin ist mechanismusbasiert und auf eine Aktivierung der Methylgruppe in Position 8 zurückzuführen.^{225,226} Es werden kleinere IC_{50} -Werte erhalten, wenn eine Vorinkubation des Enzyms mit dem Inhibitor und NADPH erfolgt. Aus diesem Grund hängen die erhaltenen Daten stark von den Versuchsbedingungen ab.

Tranlylcypromin

Tranlylcypromin ist ein potenter CYP2A6-Inhibitor. Der erhaltene IC_{50} -Wert betrug $0.12 \pm 0.01 \mu\text{M}$. Prinzipiell können aber alle CYP-Enzyme durch Tranlylcypromin gehemmt werden, wofür allerdings eine Konzentration erforderlich ist, die um etwa zwei Zehnerpotenzen größer ist. Durch $1 \mu\text{M}$ Tranlylcypromin wird selektiv CYP2A6 gehemmt, während die anderen CYP-Enzyme bei dieser Konzentration noch eine Restaktivität von über 90 % aufweisen (Abb. 58). Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen aus der Literatur, wo man einen IC_{50} -Wert von $0.42 \mu\text{M}$ für die CYP2A6-Inhibition findet.²²⁷ Von der Hemmung weiterer CYP-Enzyme wurde ebenfalls berichtet, bei denen IC_{50} -Werte von über $10 \mu\text{M}$ angegeben werden.^{227,228} Die Hemmung von CYP2A6 erfolgt nach einem kompetitiven Inhibitionsmechanismus.²⁷

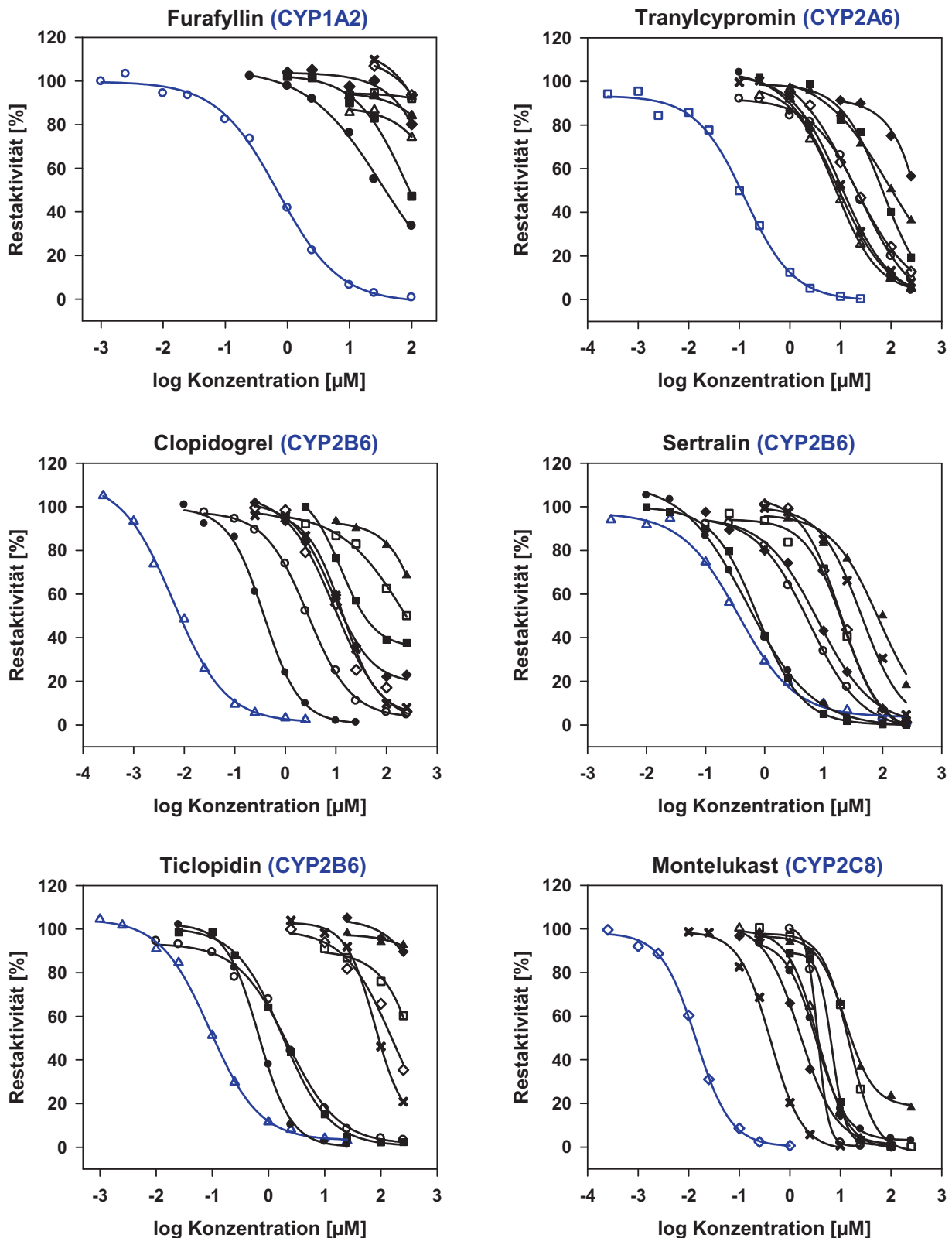


Abb. 58 Inhibitionskurven für die Hemmung einzelner rekombinanter CYP-Enzyme durch Furafyllin, Tranylcypromin, Clopidogrel, Sertralin, Ticlopidin und Montelukast. CYP1A2 (○, 10 µM Phenacetin), CYP2A6 (□, 1 µM Cumarin), CYP2B6 (△, 75 µM Bupropion), CYP2C8 (◇, 0,5 µM Amodiaquin), CYP2C9 (×, 100 µM Tolbutamid), CYP2C19 (●, 30 µM S-Mephenytoin), CYP2D6 (■, 0,7 µM Dextromethorphan), CYP2E1 (▲, 500 µM Chlorzoxazon), CYP3A4 (◆, 1 µM Midazolam).

Clopidogrel und Ticlopidin

Die Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel und Ticlopidin hemmen CYP2B6 am stärksten (Abb. 58). Die CYP2B6-Inhibition ist bei Clopidogrel ($IC_{50} = 0.0061 \pm 0.0007 \mu\text{M}$) stärker ausgeprägt als bei Ticlopidin ($IC_{50} = 0.090 \pm 0.004 \mu\text{M}$). Zusätzlich wurde durch beide Substanzen die Aktivität von CYP2C19, CYP2D6 und CYP1A2 beeinflusst. Aus den Inhibitionskurven für die einzelnen CYP-Enzyme geht hervor, dass CYP2B6 durch Clopidogrel im Gegensatz zu Ticlopidin sehr selektiv gehemmt werden kann. Bei einer Clopidogrelkonzentration von $0.1 \mu\text{M}$ wird CYP2B6 nahezu vollständig gehemmt, während die anderen CYP-Enzyme ihre Aktivität behalten. Die in dieser Arbeit erhaltenen Inhibitionskurven für die einzelnen CYP-Enzyme weisen Ähnlichkeiten mit den Literaturangaben auf. Es existieren einige Daten, die eine gewisse CYP2B6-Selektivität von Clopidogrel und Ticlopidin zeigen.^{33,229} Für die CYP2B6-Inhibition findet man IC_{50} -Werte von $0.046 \mu\text{M}$ (Clopidogrel) und $0.21 \mu\text{M}$ (Ticlopidin).³³ Eine mögliche Erklärung für die abweichenden IC_{50} -Werte kann in der vorliegenden mechanismusbasierten CYP2B6-Inhibition durch Clopidogrel und Ticlopidin liegen, wodurch die gemessene Hemmung stark von den Versuchsbedingungen abhängen kann.²²⁹ Ebenfalls wurde über eine Hemmung von CYP2C19 und CYP2D6 berichtet.^{229,230}

Sertralin

Durch den selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Sertralin wurde die Aktivität von zahlreichen CYP-Enzymen beeinträchtigt (Abb. 58). Für CYP2B6, das am stärksten gehemmt wurde, betrug der IC_{50} -Wert $0.36 \pm 0.04 \mu\text{M}$. Die IC_{50} -Werte für CYP2C19 und CYP2D6 waren nur geringfügig höher als für CYP2B6 (Tab. 12). Aufgrund der nicht ausreichenden Selektivität kann Sertralin nicht als CYP2B6-Inhibitor bei Inkubationen mit humanen Lebermikrosomen eingesetzt werden. In der Literatur wurde bereits der Einfluss von Sertralin auf mehrere CYP-Enzyme untersucht, darunter CYP2C9²³¹, CYP2C19²³²; CYP2D6²³³ und CYP3A.²³⁴ Für CYP2B6 findet man einen IC_{50} -Wert von $0.2 \mu\text{M}$ und für die Hemmung der Bupropionhydroxylierung in humanen Lebermikrosomen werden $2.3 \mu\text{M}$ angegeben.²³⁵ Sertralin wird durch eine Reihe von CYP-Enzymen metabolisiert, was die beobachtete Hemmung dieser Enzyme erklärt, die vermutlich kompetitiv ist.^{236,237}

Montelukast

Aus Abb. 58 ist ersichtlich, dass alle CYP-Enzyme durch Montelukast gehemmt werden. Die Inhibition von CYP2C8 tritt hingegen bei einer hundertfach geringeren Konzentration als bei den anderen CYP-Enzymen auf. Mit einem IC_{50} -Wert von $0.014 \pm 0.001 \mu\text{M}$ gehört Montelukast zu den starken CYP-Inhibitoren. Für alle CYP-Enzyme ergaben sich steile Inhibitionskurven, was sich in einem hohen Hill-Koeffizienten ($n_H < -1$) widerspiegelt. Bei einer Konzentration von $0.1 \mu\text{M}$ wird hauptsächlich CYP2C8 gehemmt und die Aktivität der anderen CYP-Enzyme kaum beeinflusst. Montelukast ist daher im Gegensatz zu dem häufig verwendeten Quercetin (s. u.) ein selektiver CYP2C8-Inhibitor. Zur Hemmung von CYP-Enzymen durch Montelukast liegen in der Literatur bereits einige Daten vor. Erste Untersuchungen wurden von Chiba und Mitarbeitern durchgeführt, die allerdings keine Daten für CYP2C8 lieferten.²³⁸ Sie stellten eine starke Hemmung der Tolbutamidhydroxylierung fest. Später wurde bei einem Screening einer Reihe von Arzneistoffen eine starke CYP2C8-Inhibition durch Montelukast beobachtet.²³⁹ Mit rekombinantem CYP2C8 findet man einen IC_{50} -Wert von $0.009 \mu\text{M}$, der dem in dieser Arbeit ermittelten Wert sehr nahe kommt. Dieselbe Arbeitsgruppe stellte ebenfalls eine hohe CYP2C8-Selektivität von Montelukast fest und ermittelte einen kompetitiven Inhibitionsmechanismus.²⁴⁰ Die angegebenen IC_{50} -Werte für die anderen CYP-Enzyme, die durch Inkubation mit humanen Lebermikrosomen erhalten wurden, sind nur geringfügig höher als die in dieser Arbeit ermittelten Werte (Tab. 12). Zu beachten ist, dass die inhibitorische Aktivität von Montelukast im In-vitro-Versuch von den Inkubationsbedingungen, wie z. B. der eingesetzten Proteinkonzentration, abhängt.²⁴⁰

Quercetin

Das Flavonoid Quercetin, das häufig als Inhibitor für CYP2C8 eingesetzt wird, hemmte alle CYP-Enzyme (Abb. 59). Die IC_{50} -Werte für die einzelnen CYP-Enzyme liegen alle im Bereich von etwa 2 bis $32 \mu\text{M}$ (Tab. 12). Mit $1.92 \pm 0.41 \mu\text{M}$ wurde für CYP2C8 der kleinste IC_{50} -Wert aller CYP-Enzyme gemessen. Eine selektive Inhibition von CYP2C8 ist mit Quercetin allerdings nicht möglich. Die Verwendung von Quercetin als CYP2C8-Inhibitor bei der Inkubation von humanen Lebermikrosomen ist daher nicht zu empfehlen. In der Literatur findet man einen IC_{50} -Wert von $3.3 \mu\text{M}$ für die Hemmung von CYP2C8, die nach einem kompetitiven

Mechanismus erfolgt.^{34,35,177} Eine Hemmung einer Reihe von CYP-Enzymen durch Quercetin ist bereits bekannt.^{240,241} Neben CYP2C8 wurden dabei die kleinsten IC₅₀-Werte für CYP1A2 angegeben, was mit den erhaltenen Daten aus Tab. 12 übereinstimmt. Bei der Durchführung von Mikrotiterplattenassays stört Quercetin aufgrund seiner Eigenfluoreszenz die Quantifizierung der Metaboliten.²⁴²

Sulfaphenazol

Für die Hemmung von CYP2C9 durch Sulfaphenazol wurde ein IC₅₀-Wert von $0.36 \pm 0.04 \mu\text{M}$ ermittelt. Die Aktivität anderer CYP-Enzyme wird durch Sulfaphenazol kaum beeinflusst (Abb. 59). Bei einer Konzentration von $250 \mu\text{M}$ besitzen sie eine Restaktivität von über 50 %, während CYP2C9 vollständig gehemmt wird. Sulfaphenazol ist damit ein selektiver CYP2C9-Inhibitor und kann zur Hemmung dieses Enzyms in humanen Lebermikrosomen eingesetzt werden. In der Literatur findet man einen IC₅₀-Wert von $0.2 \mu\text{M}$.¹⁷⁷ Die gute Selektivität bezüglich CYP2C9 ist bereits mehrfach beschrieben worden.^{243,244} Untersuchungen mit humanen Lebermikrosomen zeigten, dass die CYP2C9-Inhibition kompetitiv erfolgt.^{245,246}

Nootkaton

Das Sesquiterpen Nootkaton, das aus Grapefruitsaft isoliert werden kann, hemmt mehrere CYP-Enzyme (Abb. 59). Die stärkste Inhibition wurde für CYP2B6 (IC₅₀ = $0.67 \pm 0.07 \mu\text{M}$) und CYP2C19 (IC₅₀ = $1.93 \pm 0.05 \mu\text{M}$) festgestellt. In der Literatur wird eine annähernd gleichstarke Hemmung von CYP2C19 und CYP2A6 angegeben.²⁴⁷ Bei den durchgeführten Untersuchungen mit den rekombinanten CYP-Enzymen wurde CYP2C19 allerdings stärker gehemmt als CYP2A6. Die Ergebnisse zeigen, dass eine selektive CYP2C19-Inhibition durch Nootkaton nicht möglich ist.

Chinidin

Die Hemmung von CYP2D6 durch Chinidin erfolgt schon im nanomolaren Bereich, während die Aktivitäten von anderen CYP-Enzymen erst ab einer Konzentration über $1 \mu\text{M}$ beeinflusst werden (Abb. 59). Der ermittelte IC₅₀-Wert für CYP2D6 betrug $3.6 \pm 0.2 \text{ nM}$, was dem geringsten Wert aller getesteten CYP-Inhibitoren entspricht. Mit Hilfe von Chinidin kann daher CYP2D6 selektiv gehemmt werden. Die gute

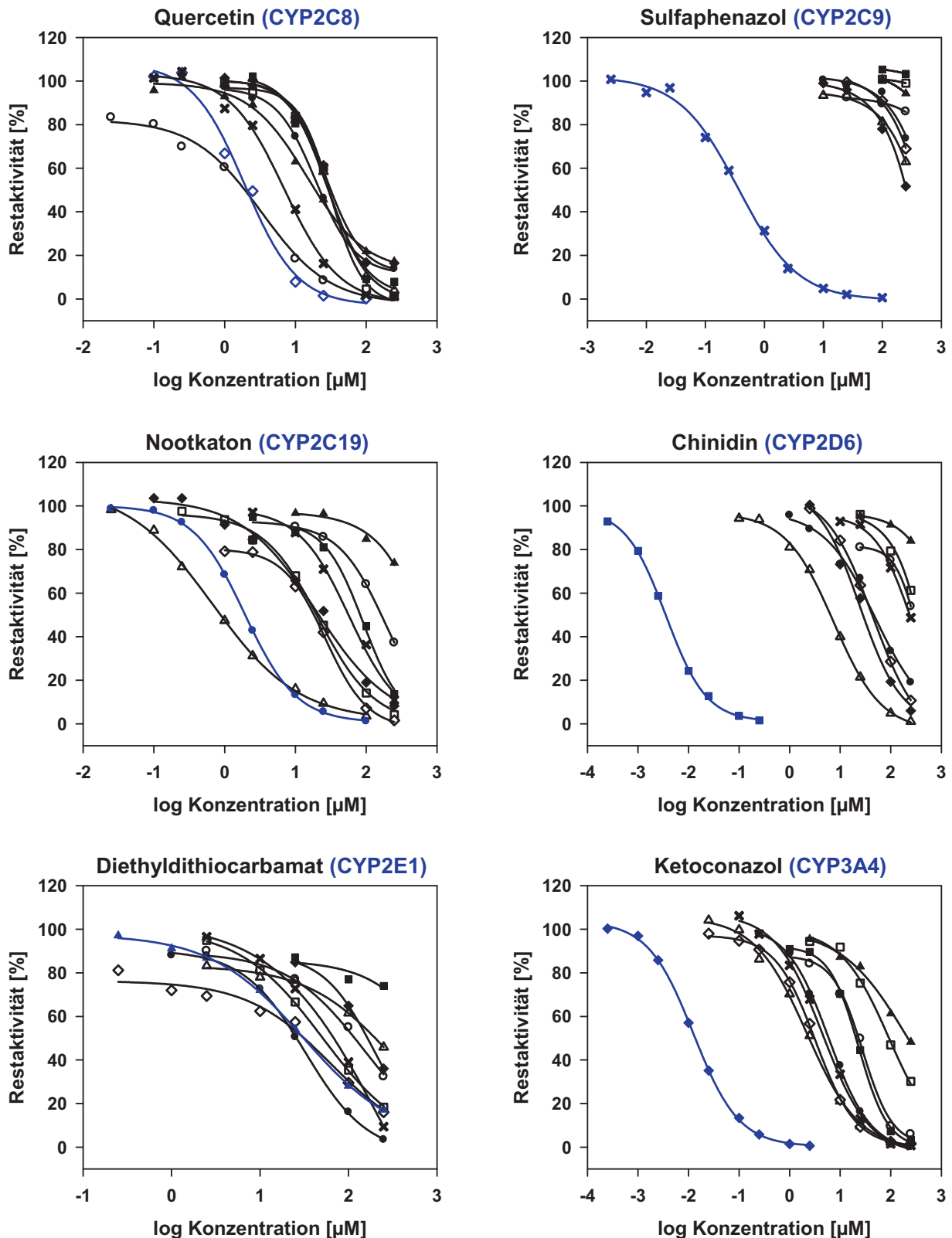


Abb. 59 Inhibitionskurven für die Hemmung einzelner rekombinanter CYP-Enzyme durch Quercetin, Sulfaphenazol, Nootkaton, Chinidin, Diethyldithiocarbamat und Ketoconazol. CYP1A2 (○, 10 µM Phenacetin), CYP2A6 (□, 1 µM Cumarin), CYP2B6 (△, 75 µM Bupropion), CYP2C8 (◇, 0,5 µM Amodiaquin), CYP2C9 (×, 100 µM Tolbutamid), CYP2C19 (●, 30 µM S-Mephenytoin), CYP2D6 (■, 0,7 µM Dextromethorphan), CYP2E1 (▲, 500 µM Chlorzoxazon), CYP3A4 (◆, 1 µM Midazolam).

Selektivität dieses Inhibitors wurde bereits durch mehrere Autoren festgestellt.^{221,244} In der Literatur findet man IC_{50} -Werte für CYP2D6, die um etwa eine Zehnerpotenz höher sind.^{177,248} Eine mögliche Ursache könnte die vorliegende kompetitive Inhibition sein, da in diesem Fall der IC_{50} -Wert stark von der eingesetzten Substratkonzentration abhängt (s. II.3.11).^{248,249} Zudem besteht ein starker Unterschied der inhibitorischen Aktivität gegenüber dem rekombinanten CYP2D6 und den humanen Lebermikrosomen.¹⁷⁷ Neben der CYP2D6-Inhibition wird v. a. von einer CYP3A4-Hemmung berichtet.²⁵⁰ Die beobachtete CYP2B6-Inhibition (Abb. 59) wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben.

Diethyldithiocarbamat

Durch Diethyldithiocarbamat (DEDTC) wurden viele CYP-Enzyme gehemmt, so dass man nicht von einem selektiven CYP2E1-Inhibitor sprechen kann (Abb. 59). Im Vergleich zu den anderen getesteten CYP-Inhibitoren besitzt DEDTC nur eine geringe inhibitorische Aktivität. Für CYP2E1 wurde ein IC_{50} -Wert von $30.8 \pm 4.5 \mu\text{M}$ erhalten, der mit den Angaben in der Literatur vergleichbar ist.^{251,252} Häufig wird die CYP2E1-Inhibition anhand der Chlorzoxazon-6-hydroxylierung durch Inkubation mit humanen Lebermikrosomen bestimmt. Da sowohl DEDTC (Abb. 59) als auch die Substratreaktion (s. II.3.4) eine geringe Isoenzymselektivität aufweisen, wurden abweichende Hemmdaten erhalten. Zusätzlich ist DEDTC nach den Literaturangaben ein mechanismusbasierter CYP2E1-Inhibitor, weshalb bei der hier fehlenden Vorinkubation des Inhibitors mit NADPH und den Enzymen ein höherer IC_{50} -Wert gemessen wurde.²⁵³ Bezüglich der Isoenzymselektivität gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Neben einer selektiven CYP2E1-Inhibition²⁴⁴ findet man Autoren, die zudem eine Hemmung von CYP1A2, CYP2A6, CYP2C19 und CYP3A4 beobachteten.^{221,251,252}

Ketoconazol

Durch Ketoconazol konnten alle untersuchten CYP-Enzyme gehemmt werden (Abb. 59). Für CYP3A4 wurde allerdings ein IC_{50} -Wert von $12.5 \pm 0.5 \text{ nM}$ ermittelt, der mindestens um zwei Zehnerpotenzen kleiner ist als für die anderen CYP-Enzyme (Tab. 12). Aus diesem Grund kann Ketoconazol zur selektiven Inhibition von CYP3A4 verwendet werden. Die Inhibition von CYP-Enzymen durch Ketoconazol ist seit langem bekannt.²⁵⁴ Ketoconazol besitzt von den Azolantimykotika eine hohe

inhibitorische Aktivität.²⁰⁶ Eine gewisse Selektivität bezüglich der Subfamilie CYP3A wurde bereits festgestellt.²⁴³ Neben dem hier untersuchten CYP3A4 wird ebenfalls CYP3A5 durch Ketoconazol gehemmt.²⁵⁵ In der Literatur wurde ebenfalls eine Beeinträchtigung von CYP1A2, CYP2C9 und CYP2D6 beobachtet.^{244,252} Die CYP3A-Inhibition erfolgt nach einem nicht-kompetitiven Mechanismus.^{255,256}

Durch die Untersuchungen zur Isoenzymselektivität der Inhibitoren wurde für die meisten CYP-Enzyme ein selektiver Inhibitor gefunden. Inhibitoren, die bei einer geeigneten Konzentration nur ein CYP-Enzym hemmen, sind Tranylcypromin (CYP2A6), Clopidogrel (CYP2B6), Montelukast (CYP2C8), Chinidin (CYP2D6) und Ketoconazol (CYP3A4). Bei dem CYP1A2-Inhibitor Furafyllin muss beachtet werden, dass zusätzlich die CYP2C19-Aktivität auf etwa 75 % sinkt. Eine völlig unzureichende Isoenzymselektivität wiesen Sertralin, Quercetin, Nootkaton und Diethyldithiocarbamat auf. Diese können bei der Inkubation mit humanen Lebermikrosomen nicht verwendet werden. Durch das häufig zur Inhibition von CYP2C19 eingesetzte Omeprazol wird ebenfalls die Aktivität von CYP3A4 deutlich herabgesetzt (s. II.1.7). Damit stehen für CYP2C19 und CYP2E1 keine selektiven Inhibitoren zur Verfügung.

3.10 Inhibition einzelner CYP-Enzyme in humanen Lebermikrosomen durch ausgewählte CYP-Inhibitoren

Nach der Aufnahme der Inhibitionskurven für die Hemmung der einzelnen CYP-Enzyme durch die Inhibitoren (s. II.3.9) wurde der Einfluss einiger Inhibitoren, die sich als selektiv erwiesen haben, auf die CYP-Enzyme in humanen Lebermikrosomen untersucht. Bei den ausgewählten Inhibitoren handelte es sich um Furafyllin, Tranylcypromin, Clopidogrel, Montelukast, Sulfaphenazol, Chinidin, Diethyldithiocarbamat und Ketoconazol. Von diesen Inhibitoren wurde jeweils eine Konzentration verwendet, bei der das entsprechende CYP-Enzym zu etwa 90 % gehemmt wird (Tab. 13) und die Restaktivität der einzelnen CYP-Enzyme in den humanen Lebermikrosomen in Anwesenheit dieser IC_{90} -Konzentration bestimmt (Abb. 60). Bei selektiven Inhibitoren sollten in Anwesenheit dieser Konzentration die anderen CYP-Enzyme kaum in ihrer Aktivität beeinflusst werden, wobei eine Hemmung von etwa 10 % akzeptiert werden kann. Für die Inkubationen mit den

humanen Lebermikrosomen wurden gegenüber den Untersuchungen mit den rekombinanten Enzymen die Substratkonzentrationen angepasst, da sich mit den humanen Lebermikrosomen z. T. andere K_m -Werte ergaben (s. II.3.3). Als Substratreaktionen für die Inhibitionsassays wurden die Phenacetin-O-deethylierung (CYP1A2, 25 μM Phenacetin), die Cumarin-7-hydroxylierung (CYP2A6, 1 μM Cumarin), die Bupropionhydroxylierung (CYP2B6, 75 μM Bupropion), die Amodiaquin-N-deethylierung (CYP2C8, 1 μM Amodiaquin), die Tolbutamidhydroxylierung (CYP2C9, 200 μM Tolbutamid), die Dextromethorphan-O-demethylierung (CYP2D6, 3.5 μM Dextromethorphan) und die Midazolam-1'-hydroxylierung (CYP3A, 3 μM Midazolam) verwendet. Um verwertbare Ergebnisse mit humanen Lebermikrosomen zu erhalten, ist es wichtig, dass der Metabolit nur durch ein CYP-Enzym gebildet wird. Aufgrund der mangelnden Selektivität der Chlorzoxazon-6-hydroxylierung, konnte CYP2E1 bei der Verwendung von humanen Lebermikrosomen nicht getestet werden, da die erhaltenen Restaktivitäten nicht allein durch dieses Enzym verursacht werden. Weiterhin war die Enzymaktivität für die 4'-Hydroxylierung des S-Mephenytoins bei der Verwendung von humanen Lebermikrosomen so gering, dass die Ergebnisse für CYP2C19 nicht ausgewertet werden konnten.

Tab. 13 IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten (n_H) für die Hemmung rekombinanter CYP-Enzyme durch selektive Inhibitoren und die daraus abgeleitete erforderliche Inhibitorkonzentration für eine etwa 90%ige Hemmung dieses Enzyms (IC_{-90}).

Enzym	Inhibitor	IC_{50} [μM]	n_H	IC_{-90} [μM]
CYP1A2	Furafyllin	0.71 ± 0.07	-0.88 ± 0.07	10
CYP2A6	Tranylcypromin	0.12 ± 0.01	-0.90 ± 0.10	1
CYP2B6	Clopidogrel	0.0061 ± 0.0007	-0.84 ± 0.07	0.1
CYP2C8	Montelukast	0.014 ± 0.001	-1.24 ± 0.11	0.1
CYP2C9	Sulfaphenazol	0.36 ± 0.04	-0.86 ± 0.08	10
CYP2D6	Chinidin	0.0036 ± 0.0002	-1.09 ± 0.05	0.1
CYP3A4	Ketoconazol	0.0125 ± 0.0005	-0.97 ± 0.04	0.25

Furafyllin hemmte in einer Konzentration von 10 μM nur die Phenacetin-O-deethylierung (Abb. 60). Die Restaktivität von CYP1A2 ging auf etwa 20 % zurück.

Dieser Wert ist etwa 10 % größer als bei der Verwendung des rekombinanten CYP1A2 (s. II.3.9). CYP2C19, das bei den Untersuchungen mit den rekombinanten CYP-Enzymen ebenfalls gehemmt wurde, wurde mit den humanen Lebermikrosomen nicht getestet. Durch Tranylcypromin (1 μM) wurde nur die durch CYP2A6 katalysierte 7-Hydroxylierung von Cumarin gehemmt (Abb. 60). Die Restaktivität ist geringfügig höher als bei der Verwendung von rekombinarem CYP2A6 (s. II.3.9). Die gemessene Hemmung von CYP2B6 durch Tranylcypromin ist nicht signifikant. Neben CYP2B6 wurde kein weiteres der getesteten CYP-Enzyme durch Clopidogrel in einer Konzentration von 0.1 μM gehemmt (Abb. 60). Die Restaktivität von CYP2B6 ist auch hier um etwa 10 % gegenüber den Untersuchungen mit dem rekombinanten Enzym erhöht (s. II.3.9). Durch Montelukast (0.1 μM) wurde CYP2C8 zu ca. 90 % gehemmt, während die Restaktivität der anderen CYP-Enzyme sich kaum gegenüber der Kontrolle veränderte (Abb. 60), was vorhandene Literaturdaten bestätigt.²⁴⁰ Durch Sulfaphenazol (10 μM) wurde, wie bereits mit den rekombinanten CYP-Enzymen, ausschließlich CYP2C9 gehemmt (Abb. 60). Die Hemmung durch Chinidin (0.1 μM) betrifft nur CYP2D6 (Abb. 60). Sie fällt bei dieser Konzentration aber wesentlich schwächer aus als die des rekombinanten CYP2D6 (s. II.3.9). Für Metabolismusuntersuchungen mit humanen Lebermikrosomen sollte daher eine höhere Chinidinkonzentration zur Hemmung von CYP2D6 eingesetzt werden. Diethyldithiocarbamat hemmte, wie bei den Untersuchungen mit den rekombinanten Enzymen (s. II.3.9), alle getesteten CYP-Enzyme (Abb. 60). CYP2E1, für das dieser Inhibitor in der Literatur²⁵³ häufig verwendet wird, konnte mit humanen Lebermikrosomen aufgrund der fehlenden Selektivität der Substratreaktionen (s. II.3.4) nicht getestet werden. Die Hemmung anderer CYP-Enzyme erstreckte sich bei einer Konzentration von 100 μM auf bis zu 75 %, so dass Diethyldithiocarbamat nicht als Inhibitor für die selektive Hemmung eines CYP-Enzyms eingesetzt werden kann. Durch Ketoconazol (0.25 μM) wurde die 1'-Hydroxylierung von Midazolam zu 90 % gehemmt (Abb. 60). Ebenfalls findet bei dieser Konzentration eine leichte Hemmung von CYP2B6 und CYP2C8 statt, was bereits aus den Inhibitionskurven mit den rekombinanten CYP-Enzymen ersichtlich war (s. II.3.9). Die beobachtete selektive Inhibition der in humanen Lebermikrosomen enthaltenen CYP-Enzyme, wie z. B. CYP1A2 durch Furafyllin, CYP2C9 durch Sulfaphenazol und CYP2D6 durch Chinidin, konnte bereits in der Literatur nachgewiesen werden.²⁴⁴

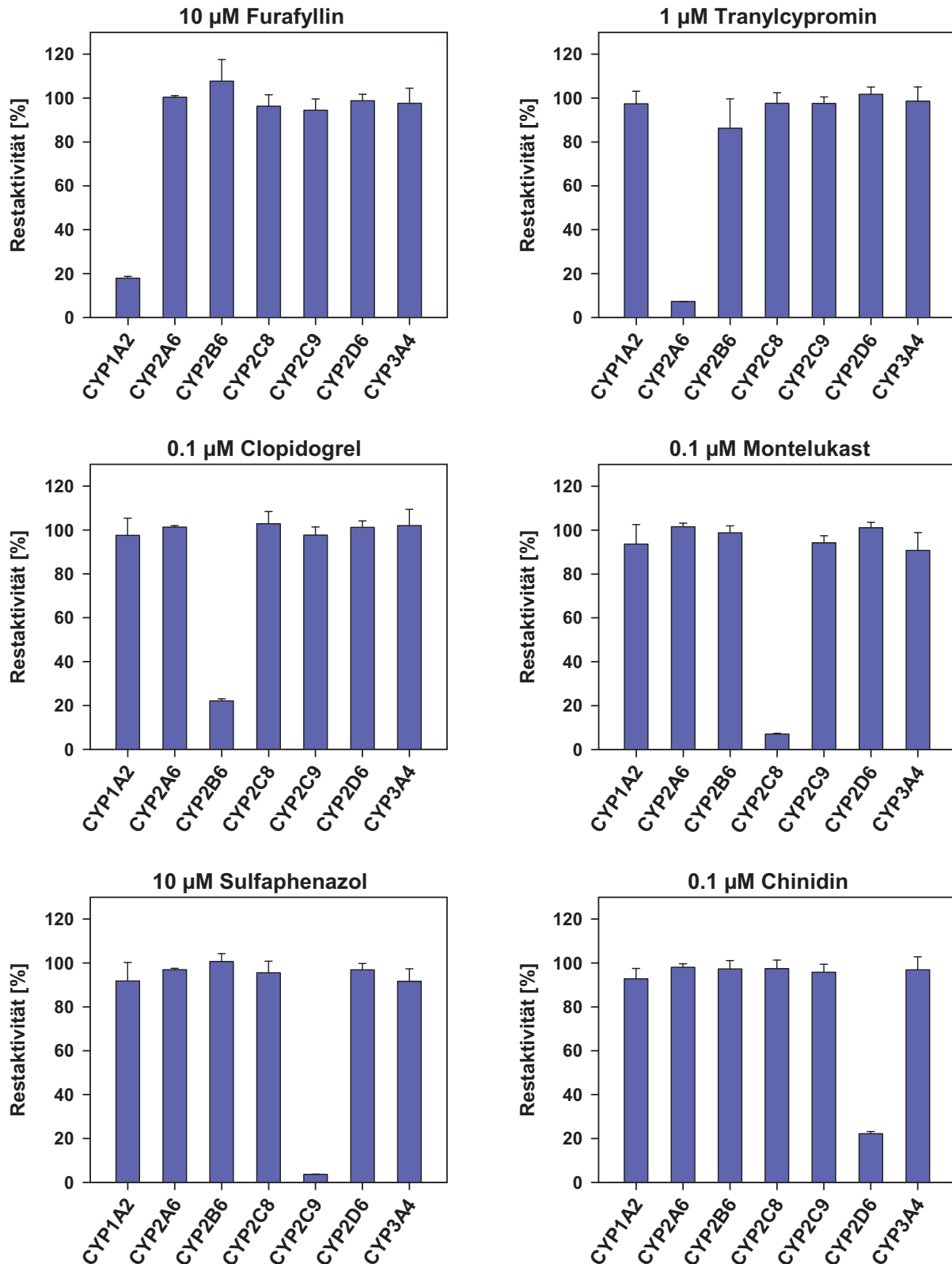


Abb. 60 Untersuchung der Aktivität einzelner CYP-Enzyme in humanen Lebermikrosomen in Anwesenheit der mit rekombinanten CYP-Enzymen ermittelten IC_{90} -Konzentration ausgewählter Inhibitoren. Verwendet wurden folgende Standardsubstrate: Phenacetin (25 µM, CYP1A2), Cumarin (1 µM, CYP2A6), Bupropion (75 µM, CYP2B6), Amodiaquin (1 µM, CYP2C8), Tolbutamid (200 µM, CYP2C9), Dextromethorphan (3.5 µM, CYP2D6) und Midazolam (3 µM, CYP3A4).

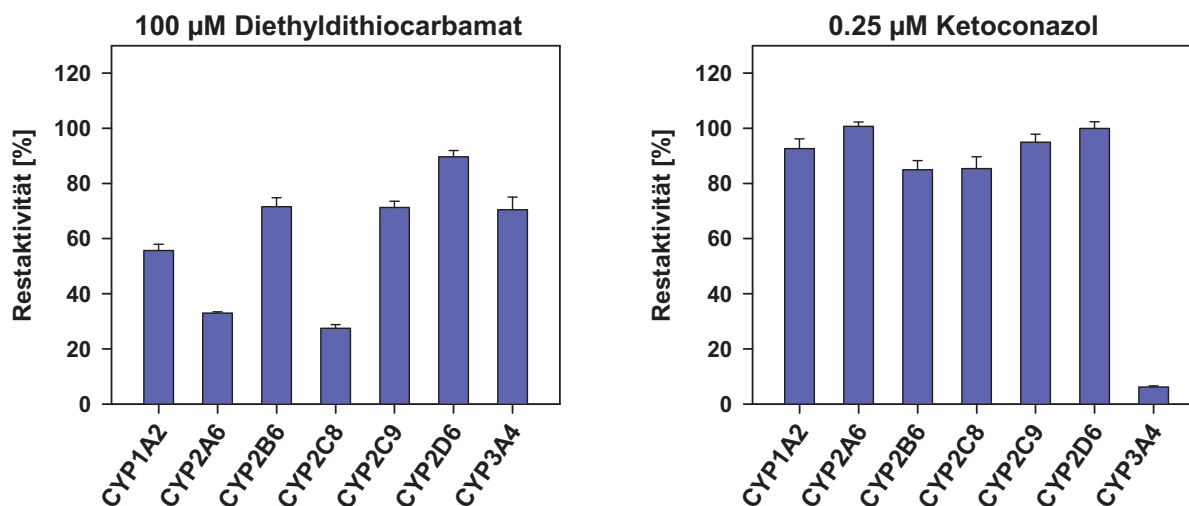


Abb. 60 (Fortsetzung) Untersuchung der Aktivität einzelner CYP-Enzyme in humanen Lebermikrosomen in Anwesenheit der mit rekombinanten CYP-Enzymen ermittelten IC_{-90} -Konzentration ausgewählter Inhibitoren. Verwendet wurden folgende Standardsubstrate: Phenacetin (25 µM, CYP1A2), Cumarin (1 µM, CYP2A6), Bupropion (75 µM, CYP2B6), Amodiaquin (1 µM, CYP2C8), Tolbutamid (200 µM, CYP2C9), Dextromethorphan (3.5 µM, CYP2D6) und Midazolam (3 µM, CYP3A4).

Insgesamt kann gesagt werden, dass Inhibitoren, die bei der Untersuchung von rekombinanten CYP-Enzymen nur ein Enzym hemmten, bei der Verwendung von humanen Lebermikrosomen ebenfalls selektiv waren. In den meisten Fällen ging die Restaktivität der humanen Lebermikrosomen in Anwesenheit der mit rekombinanten CYP-Enzymen bestimmten IC_{-90} -Konzentration aber nicht so weit zurück, so dass für eine ähnlich starke Hemmung höhere Inhibitorkonzentrationen eingesetzt werden müssen. Mögliche Erklärungen hierfür könnten in der angepassten Substratkonzentration bei den Assays oder einer mangelnden Selektivität der verwendeten Substrate zu finden sein.

3.11 Untersuchung des Einflusses der Substratkonzentration auf den IC_{50} -Wert

Als Maß für die inhibitorische Aktivität eines Hemmstoffes wird häufig dessen IC_{50} -Wert, die Inhibitorkonzentration für eine 50%ige Hemmung der Umsetzungsgeschwindigkeit des Testsubstrates, angegeben. Ein Aspekt hierfür ist, dass zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes nur die Inhibitorkonzentration variiert werden muss. Für die Bestimmung der Inhibitionskonstante (K_i) müssen zusätzlich unterschiedliche

Substratkonzentrationen untersucht werden, was aufwendiger ist. Allerdings hat die eingesetzte Substratkonzentration einen Einfluss auf den erhaltenen IC_{50} -Wert, was im Folgenden anhand einiger CYP-Inhibitoren untersucht wurde.

CYP2D6-Inhibition durch Chinidin

Als erstes Beispiel diente Chinidin, dessen CYP2D6-Inhibition mit Hilfe der Dextromethorphan-O-demethylierung bei verschiedenen Substratkonzentrationen untersucht wurde. Bei einer Erhöhung der Substratkonzentration verschieben sich die Inhibitionskurven deutlich nach rechts (Abb. 61) und die erhaltenen IC_{50} -Werte steigen dementsprechend von 2.3 bis auf 83.0 nM an (Tab. 14). Eine Verdopplung der Substratkonzentration führte in etwa zu einer Erhöhung des IC_{50} -Wertes um den Faktor 2. Die Steigungen (n_H) der Inhibitionskurven sind hingegen bei allen Substratkonzentrationen annähernd gleich (Tab. 14). Trägt man die erhaltenen IC_{50} -Werte gegenüber der Substratkonzentration auf (Cheng-Prusoff-Diagramm), ergibt sich eine Gerade (Abb. 61). Dies lässt auf eine kompetitive CYP2D6-Inhibition durch Chinidin schließen. Aus dem y-Achsenabschnitt dieser Gerade ergab sich eine Inhibitionskonstante (K_{ic}) von 0.82 nM. Zusätzlich konnte ein K_m -Wert von 0.3 μ M für die Dextromethorphan-O-demethylierung anhand der negativen Nullstelle abgelesen werden (Abb. 61).

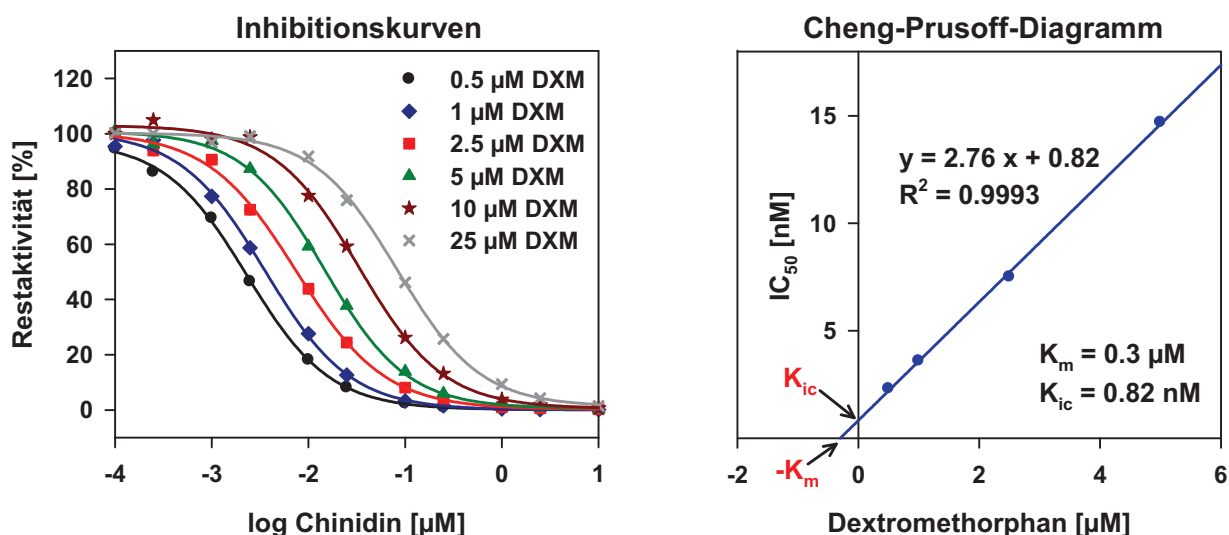


Abb. 61 Inhibition der Dextromethorphan-O-demethylierung von CYP2D6 durch Chinidin bei unterschiedlichen Dextromethorphankonzentrationen (DXM).

Tab. 14 IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten (n_H) der Inhibitionskurven für die Hemmung der Dextromethorphan-O-demethylierung von CYP2D6 durch Chinidin bei unterschiedlichen Dextromethorphankonzentrationen.

Dextromethorphan [μM]	IC ₅₀ [nM]	n _H	IC ₅₀ (berechnet) ^a [nM]
0.5	2.3 ± 0.1	-1.01	3.7
1	3.6 ± 0.3	-0.99	6.1
2.5	7.5 ± 0.5	-0.95	10.7
5	14.7 ± 0.9	-1.02	24.7
10	33.2 ± 2.4	-0.99	48.1
25	83.0 ± 4.6	-1.01	118.1

^a für K_m = 0.3 μM, K_i = 1.4 nM und kompetitive Inhibition

Die Ermittlung des Inhibitionsmechanismus erfolgt häufig aus der doppelt-reziproken Darstellung nach Lineweaver-Burk. Hierfür müssen die Substratsättigungskurven ohne und in Anwesenheit von mindestens einer Inhibitorkonzentration aufgenommen werden, um festzustellen ob sich die scheinbaren maximalen Umsetzungsgeschwindigkeiten bzw. die Michaelis-Menten-Konstanten ändern. Für die CYP2D6-Inhibition von Chinidin wurden daher 5 verschiedene Inhibitorkonzentrationen im Bereich vom einfachen bis zum 100-fachen des IC₅₀-Wertes ausgewählt und mit jeweils 6 verschiedenen Substratkonzentrationen inkubiert. Die erhaltenen Umsetzungsgeschwindigkeiten wurden im Michaelis-Menten-Diagramm aufgetragen, in dem eine Hemmung durch die verschiedenen Chinidinkonzentrationen deutlich sichtbar ist (Abb. 62). Im Lineweaver-Burk-Diagramm ist zu erkennen, dass alle Regressionsgeraden, die für jede Inhibitorkonzentration erhalten werden, denselben y-Achsenabschnitt aber unterschiedliche Nullstellen besitzen (Abb. 62). Durch die Anwesenheit von Chinidin ändert sich demnach nur der K_m-Wert der Substratreaktion aber nicht die maximale Umsetzungsgeschwindigkeit. Bei der CYP2D6-Inhibition durch Chinidin liegt daher ein kompetitiver Inhibitionsmechanismus vor, was mit den bisher bekannten Daten übereinstimmt.^{248,249} Um die Bindungskonstante des Inhibitors (K_i) zu erhalten, wurden die Daten nach Dixon (1/V-[I]-Diagramm)¹³⁸ und nach Cornish-Bowden ([S]/V-[I]-Diagramm)¹³⁹ graphisch aufgetragen. Aus dem Dixon-Diagramm wurde eine kompetitive Hemmkonstante (K_{ic}) von 1.4 nM anhand der negativen x-Koordinate des Schnittpunktes der Regressionsgeraden erhalten (Abb. 62). Dieser Wert ist deutlich

niedriger als die in der Literatur angegebenen und ebenfalls durch die Dextromethorphan-O-demethylierung erhaltenen Werte, die bei etwa 25 nM liegen.^{248,249} Man findet allerdings auch einen vergleichbaren K_i -Wert von 1.7 nM, der mit Hilfe des Substrates AMMC (s. II.4.1) ermittelt wurde.²⁵⁷ In der Darstellung nach Cornish-Bowden ergeben sich nahezu parallele Regressionsgeraden (Abb. 62), was für eine kompetitive Inhibition typisch ist, da die unkompetitive Hemmkonstante (K_{iu}) unendlich groß ist. Mit dem erhaltenen K_i -Wert für die CYP2D6-Inhibition von Chinidin und dem K_m -Wert für die Substratreaktion lassen sich mit Hilfe der für die kompetitive Inhibition geltenden Gesetzmäßigkeiten (s. I.6.3.5) die für unterschiedliche Substratkonzentrationen zu erwartenden IC_{50} -Werte vorhersagen

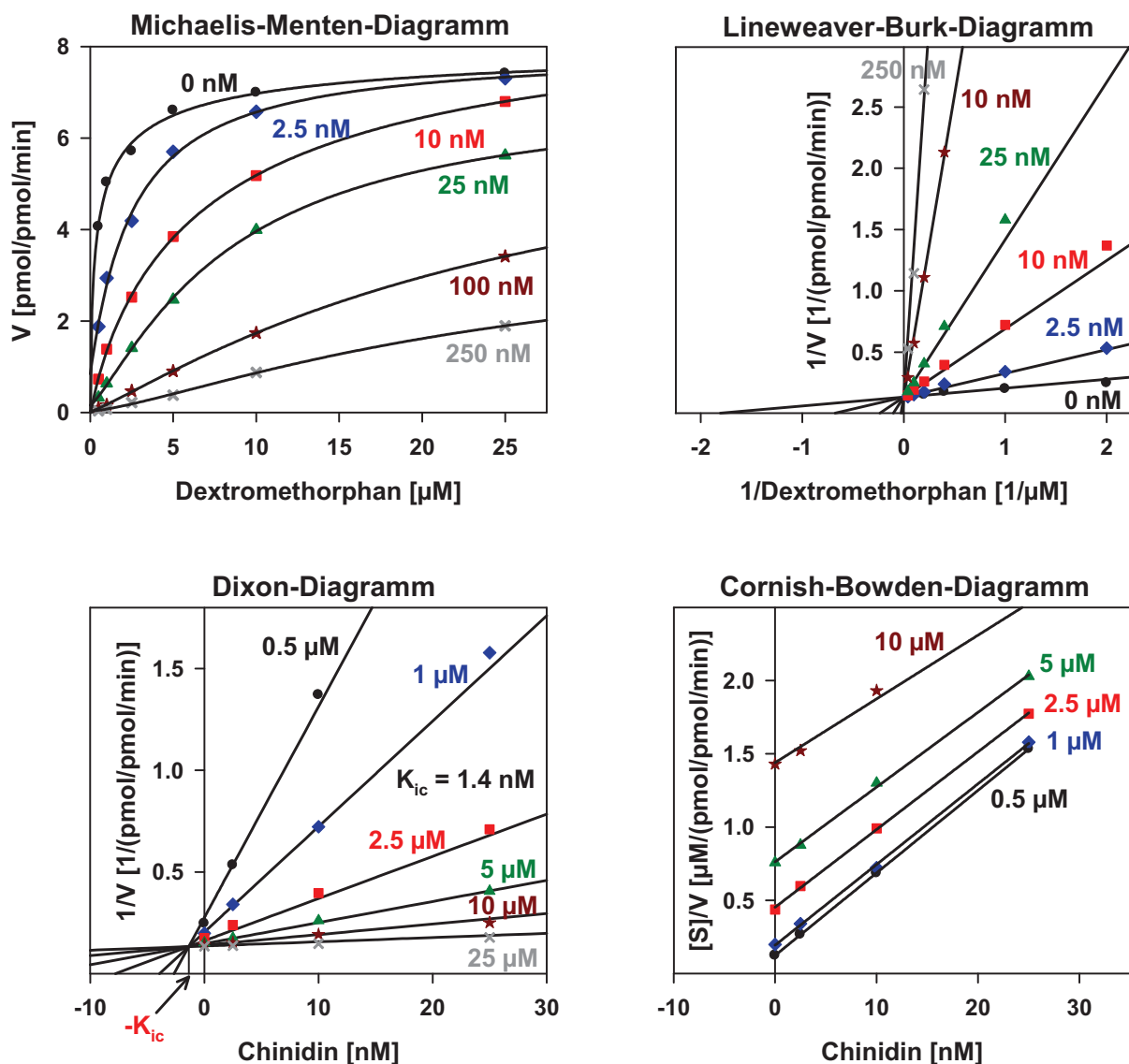


Abb. 62 Ermittlung des Inhibitionsmechanismus und Bestimmung der Inhibitionskonstanten (K_i) für die CYP2D6-Inhibition durch Chinidin.

(Tab. 14). Der berechnete IC_{50} -Wert steigt proportional mit der Substratkonzentration ebenso an, wie die IC_{50} -Werte der gemessenen Inhibitionskurven. Die experimentell bestimmten IC_{50} -Werte sind nur geringfügig kleiner als die berechneten Werte.

CYP2A6-Inhibitoren

Des Weiteren wurde der Einfluss der Substratkonzentration auf die inhibitorische Aktivität verschiedener in der Literatur beschriebener CYP2A6-Inhibitoren anhand der Cumarin-7-hydroxylierung durch humane Lebermikrosomen untersucht. Bei den ausgewählten Inhibitoren handelte es sich um Diethyldithiocarbamat (DEDTC), 8-Methoxypsoralen (8-MOP), Nicotin, Pilocarpin, Tranylcypromin und Tryptamin. Mit allen Substanzen wurden Inhibitionskurven unter Verwendung verschiedener Cumarin-Konzentrationen aufgenommen und die in Tab. 15 angegebenen IC_{50} -Werte erhalten. 8-MOP und Tranylcypromin besitzen IC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich und sind daher starke CYP2A6-Inhibitoren. Für eine CYP2A6-Inhibition durch DEDTC und Nicotin sind hingegen wesentlich höhere Konzentrationen erforderlich. Bei 8-MOP, Nicotin, Pilocarpin, Tranylcypromin und Tryptamin stieg der IC_{50} -Wert bei einer Erhöhung der Substratkonzentration von 0.5 μM auf 10 μM um das 3-fache (Tryptamin) bis 6.5-fache (Pilocarpin) an. Mit DEDTC wurde bei der kleinsten eingesetzten Cumarin-Konzentration der höchste IC_{50} -Wert erhalten, der bei einer Erhöhung der Substratkonzentration leicht abfiel. Dies ist ein Hinweis auf das Vorliegen eines unkompetitiven Inhibitionsmechanismus (s. I.6.3.5), wie es für DEDTC in der Literatur beschrieben wird.²⁷

Tab. 15 IC_{50} -Werte von ausgewählten CYP2A6-Inhibitoren für die Cumarin-7-hydroxylierung durch humane Lebermikrosomen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen.

Inhibitor	IC_{50} -Wert in μM bei einer Cumarinkonzentration von				
	0.5 μM	1 μM	2.5 μM	5 μM	10 μM
DEDTC	67.5	56.2	43.1	40.1	40.3
8-MOP	0.143	0.257	0.317	0.539	0.809
Nicotin	90.4	120.3	187.7	287.1	478.1
Pilocarpin	2.15	2.71	4.96	6.83	13.9
Tranylcypromin	0.072	0.106	0.161	0.261	0.401
Tryptamin	2.08	2.16	3.03	4.01	6.05

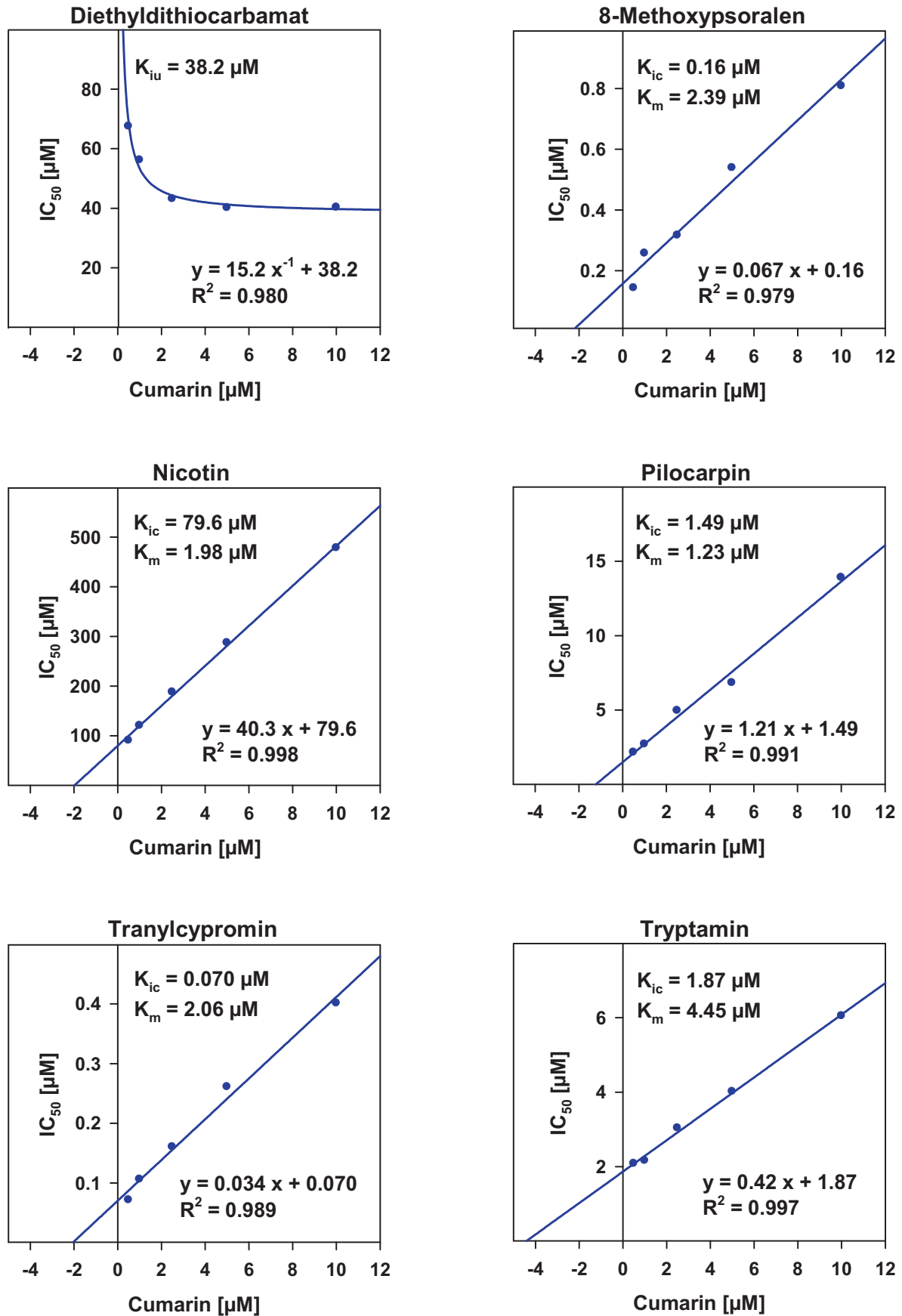


Abb. 63 Cheng-Prusoff-Diagramme zur Bewertung der Abhängigkeit der IC_{50} -Werte ausgewählter CYP2A6-Inhibitoren von der Substratkonzentration.

Trägt man die erhaltenen IC_{50} -Werte gegenüber der Cumarin-Konzentration auf (Cheng-Prusoff-Diagramm), ergeben sich mit Ausnahme von DEDTC Geraden (Abb. 63). Daher hemmen diese Inhibitoren CYP2A6 kompetitiv. An dieser Stelle sei erwähnt, dass 8-MOP neben der hier untersuchten reversiblen CYP2A6-Inhibition dieses Enzym ebenfalls mechanismusbasiert hemmt.^{27,258} Aus den y-Achsenabschnitten der Regressionsgeraden wurden die entsprechenden K_{ic} -Werte erhalten (Abb. 63). Zudem lässt sich aus den Cheng-Prusoff-Diagrammen der K_m -Wert der Substratreaktion ermitteln (s. I.6.3.5). Anhand der Abhängigkeit des IC_{50} -Wertes von der Substratkonzentration wurden mit den einzelnen CYP2A6-Inhibitoren K_m -Werte von 1.2 μ M (Pilocarpin) bis 4.5 μ M (Tryptamin) für die Cumarin-7-hydroxylierung erhalten (Abb. 63), die allerdings größer sind als der aus der Substratsättigungskurve ermittelte Wert von 0.84 μ M (s. II.3.3). Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass bei einigen Inhibitoren keine reine kompetitive Hemmung vorliegt. Eine Ermittlung des K_m -Wertes aus dem Cheng-Prusoff-Diagramm kann daher nicht empfohlen werden.

Fazit

Bei allen getesteten CYP-Inhibitoren konnte ein Einfluss der beim Inhibitionsassay verwendeten Substratkonzentration auf die Inhibitionskurven und den IC_{50} -Wert beobachtet werden, der von dem vorliegenden Inhibitionsmechanismus abhängt. Bei kompetitiven Inhibitoren wurden die größten Veränderungen des IC_{50} -Wertes festgestellt, der mit der Substratkonzentration stark anstieg. Die erhaltenen Ergebnisse ausgewählter Inhibitoren bestätigen somit die theoretischen Überlegungen von Cheng und Prusoff (s. I.6.3.5).¹⁴⁰ Die starke Abhängigkeit des IC_{50} -Wertes von der eingesetzten Substratkonzentration ist der Grund, dass von verschiedenen Autoren für viele Inhibitoren z. T. erheblich unterschiedliche IC_{50} -Werte angegeben werden.

3.12 CYP-Inhibition durch Extrakte lebertoxischer Arzneipflanzen

In der Vergangenheit wurden im Arbeitskreis von M. Unger bereits methanolisch-wässrige Pflanzenextrakte von einer Reihe hauptsächlich offizineller Arzneipflanzen auf eine Inhibition ausgewählter CYP-Enzyme mit Hilfe eines Cocktail-Assays untersucht.^{118,143} Nun wurden einige Pflanzen ausgewählt, von denen bekannt ist,

dass diese hepatotoxisch sind.^{97,98} Es wurden Trockenextrakte dieser Arzneipflanzen hergestellt, da von verschiedenen Pflanzen bzw. Pflanzenteilen unterschiedliche Mengen an Trockenextrakt gewonnen werden und sich so die erhaltenen Hemmdaten der einzelnen Drogen besser miteinander vergleichen lassen. Zusätzlich kann die aus dem Trockenextrakt hergestellte Stammlösung im Vergleich zu den methanolisch-wässrigen Rohextrakten einige Zeit im Kühlschrank aufbewahrt werden, da eine Testung von allen CYP-Enzymen durch Einzelassays an einem Tag nicht möglich ist. Hintergrund für die Untersuchung der inhibitorischen Aktivität dieser Extrakte ist die Bioaktivierung einiger Inhaltsstoffe zu reaktiven Metaboliten. Beispielsweise werden die u. a. im Huflattich, Pestwurz oder Greiskraut enthaltenen Pyrrolizidinalkaloide durch CYP-Enzyme in elektrophile Metaboliten umgewandelt. Diese Inhaltsstoffe werden daher für die toxischen Nebenwirkungen dieser Pflanzen verantwortlich gemacht.²⁵⁹ Aus den Furanoditerpenen Teucrin A und Teuchmaedryn A des Gamanders werden die entsprechende Epoxid-Derivate gebildet, die kovalent an Hepatozytenproteine binden können.²⁶⁰ Diese Metaboliten können im In-vitro-Experiment u. a. durch Glutathion abgefangen und dadurch nachgewiesen werden. Für solche Untersuchungen muss eine Extraktkonzentration gewählt werden, bei der die CYP-Enzyme nicht vollständig gehemmt werden. Während zur Bioaktivierung einzelner Inhaltsstoffe dieser Arzneidrogen in der Literatur einige Untersuchungen vorliegen, lassen sich nur wenige Daten zur Inhibition der CYP-Enzyme durch Extrakte dieser lebertoxischen Pflanzen finden. Bekannt ist, dass die im Schöllkraut enthaltenen Isochinolinalkaloide eine Reihe von CYP-Enzymen hemmen.²⁶¹ Weiterhin wurden die Kava-Lactone für die CYP-Inhibition von Kava-Kava-Extrakten verantwortlich gemacht.^{262,263} Von der Hemmung mehrerer CYP-Enzyme durch Extrakte aus der Traubensilberkerze wurde bereits berichtet.^{264,265}

Zur Ermittlung der inhibitorischen Aktivität der ausgewählten Extrakte wurde die Restaktivität von neun rekombinanten CYP-Enzymen in Anwesenheit von drei verschiedenen Extraktkonzentrationen mit Hilfe der etablierten Einzelassays untersucht (Abb. 64). Die schwächste inhibitorische Aktivität besaß der Extrakt aus der Beinwellwurzel mit IC_{50} -Werten von über 100 $\mu\text{g/ml}$. Am stärksten wurden die CYP-Enzyme durch Extrakte aus den Borretschsamen, dem Kreosotbusch und dem Schöllkraut gehemmt. Auffällig ist die starke Hemmung von CYP2D6 durch den Schöllkrautextrakt mit einem IC_{50} -Wert von unter 1 $\mu\text{g/ml}$. Durch alle anderen

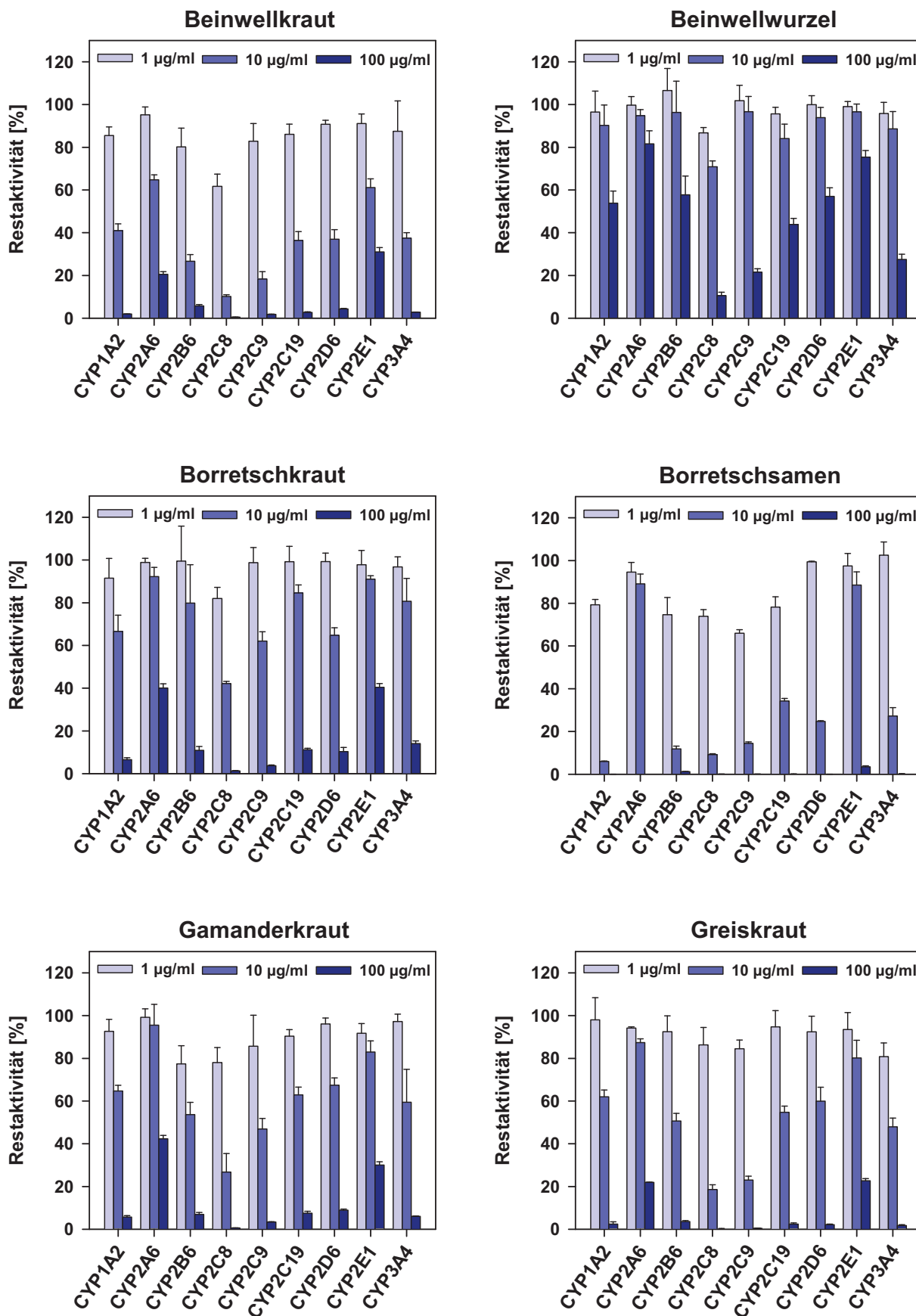


Abb. 64 Inhibition von rekombinanten CYP-Enzymen durch Trockenextrakte lebertoxischer Arzneipflanzen.

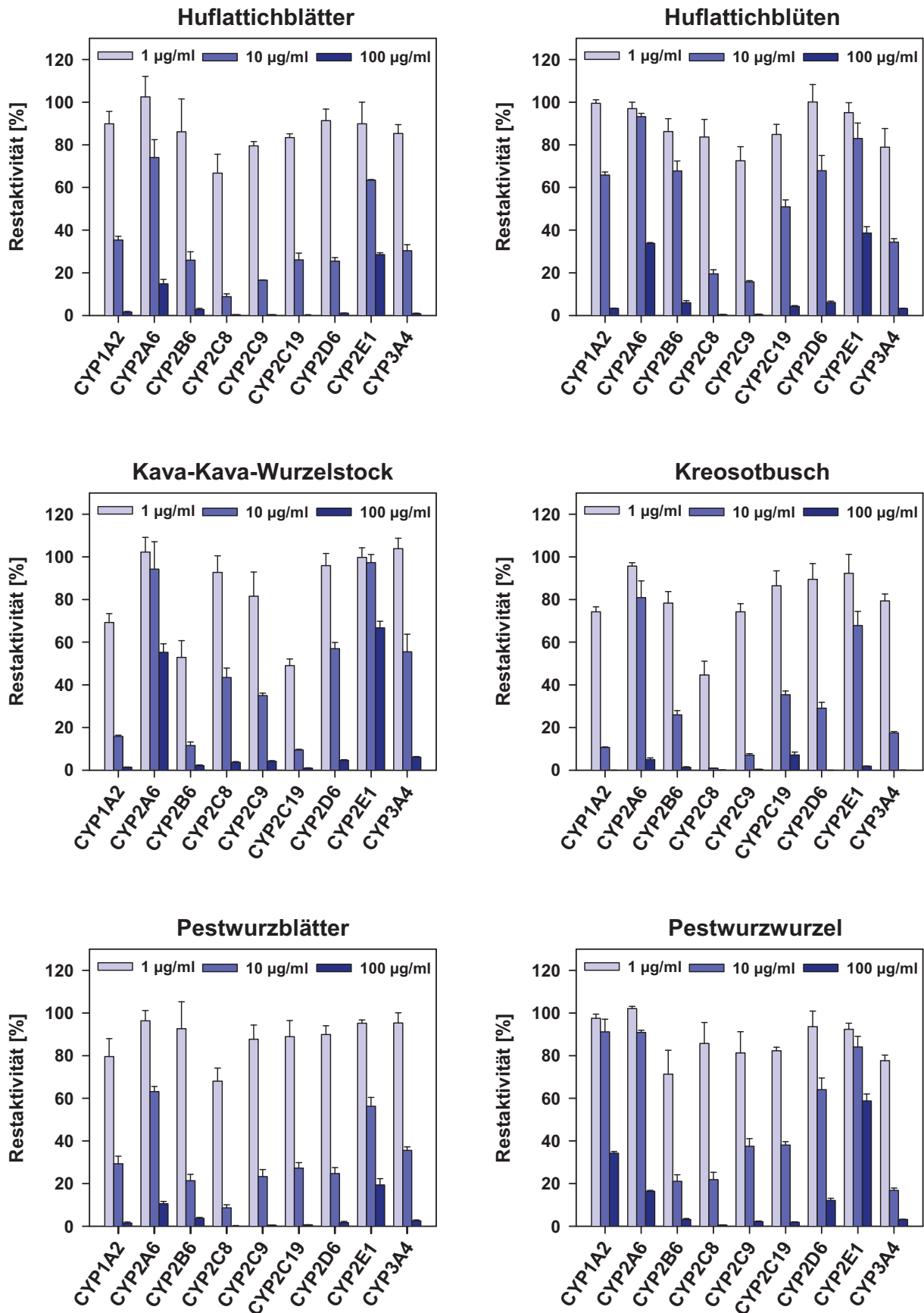


Abb. 64 (Fortsetzung) Inhibition von rekombinanten CYP-Enzymen durch Trockenextrakte lebertoxischer Arzneipflanzen.

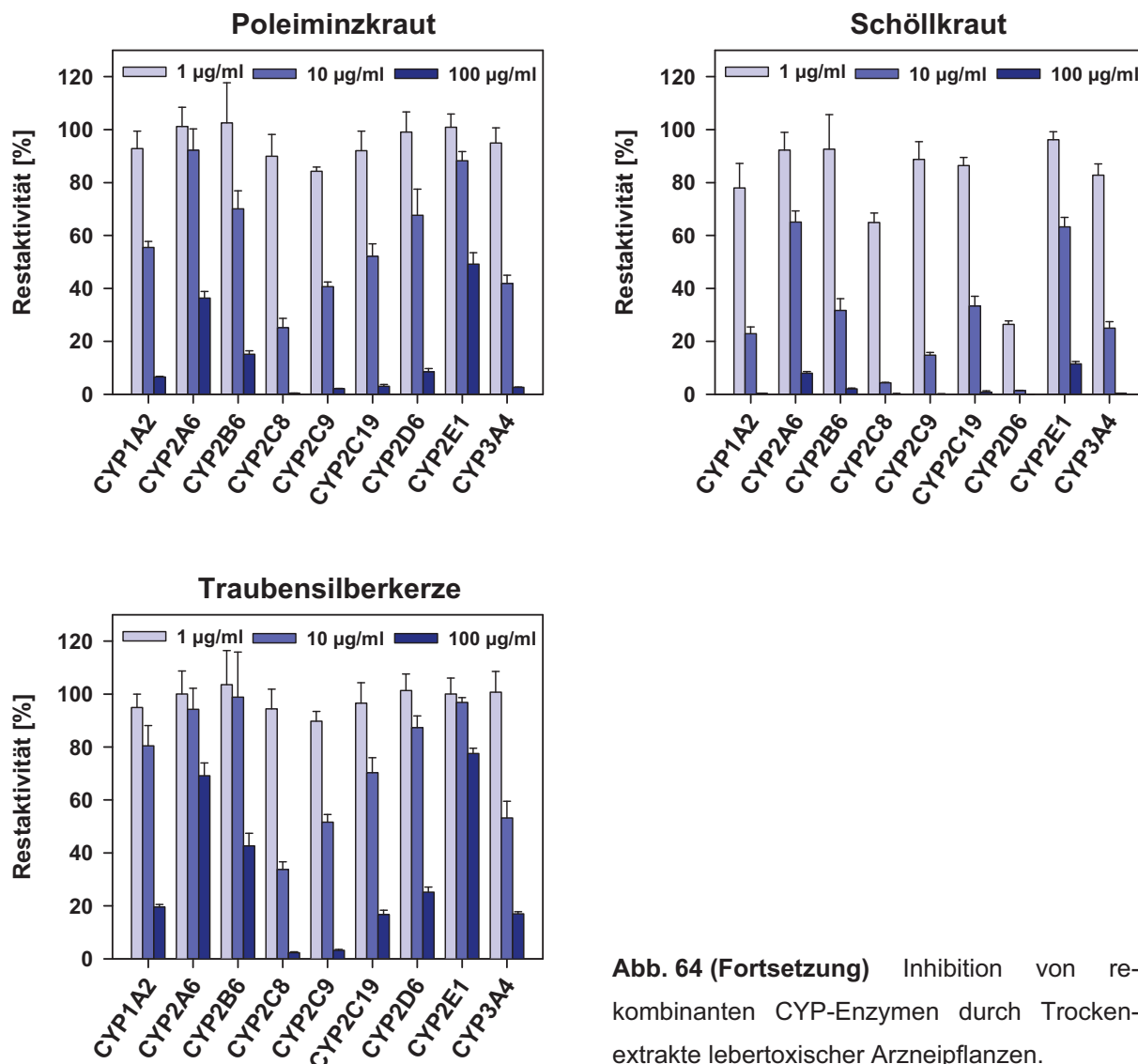


Abb. 64 (Fortsetzung) Inhibition von re-kombinanten CYP-Enzymen durch Trockenextrakte lebertoxischer Arzneipflanzen.

Extrakte wurden die CYP-Enzyme vergleichbar stark beeinflusst und die IC_{50} -Werte bewegen sich zwischen 10 und 100 $\mu\text{g/ml}$. Es konnten z. T. Unterschiede zwischen den Extrakten aus verschiedenen Pflanzenteilen festgestellt werden. Beispielsweise hemmte der Extrakt der Beinwellwurzel die CYP-Enzyme schwächer als der Extrakt aus der Krautdroge. Beim Borretsch war die CYP-Inhibition durch den Extrakt aus den Samen stärker als die des Extraktes aus der Krautdroge. Die Subfamilie CYP2C wurde durch die Extrakte am stärksten gehemmt. Häufig ging die Aktivität dieser Enzyme bei einer Extraktkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ auf null zurück (Abb. 64). Aus den erhaltenen Inhibitionsdaten sollte daher die Extraktkonzentration für eine Untersuchung der Bioaktivierung zwischen 10 und 100 $\mu\text{g/ml}$ liegen.

4 Cumarin-Derivate als In-vitro-Fluoreszenzsubstrate für CYP-Inhibitionsassays

4.1 Häufig eingesetzte Cumarin-Derivate

Cumarin (1,2-Benzopyron; Abb. 65) ist ein sekundärer Naturstoff und kommt in einer Reihe von Pflanzen, wie z. B. dem Steinklee (*Melilotus officinale*) oder dem Waldmeister (*Galium odoratum*), vor. Es leitet sich von den Phenylpropankörpern ab und ist das Lacton der *o*-Cumarsäure. Lösungen der kristallinen Substanz besitzen einen charakteristischen aromatischen Geruch. Bekannt ist, dass von den humanen CYP-Enzymen ausschließlich CYP2A6 Cumarin zum 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon; Abb. 65) hydroxyliert, was durch vorangegangene Untersuchungen bestätigt werden konnte (s. II.3.4).²⁵ Die Substanz wird als Substrat für In-vitro-Inhibitionsuntersuchungen dieses CYP-Enzyms als Alternative zu Nicotin eingesetzt.² Neben der Hydroxylierung von Cumarin können auch *O*-Desalkylierungsreaktionen von 7-Alkyloxycumarin-Derivaten als Substratreaktionen für CYP-Inhibitionsuntersuchungen eingesetzt werden. Ein einfaches 7-Alkyloxycumarin-Derivat ist der Naturstoff Herniarin (7-Methoxycumarin), dessen Namen vom Kahlen Bruchkraut (*Herniaria glabra*) stammt, aus dem es isoliert werden kann. Cumarin, Herniarin und ihr Metabolit 7-Hydroxycumarin besitzen in Lösung nach Anregung im UV-Licht eine ausgeprägte blaue Fluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität des Cumarin-Ringsystems ist durch die Hydroxylfunktion in Position 7 verstärkt. Da bei den Cumarin-Derivaten eine fluorimetrische Detektion selbst geringer Metabolitkonzentrationen erfolgen kann, sind diese als Substrate für In-vitro-Inhibitionsuntersuchungen besonders gut geeignet. Auf eine kostenintensive massenspektrometrische Analyse, die bei den häufig eingesetzten Arzneistoffen notwendig ist, kann in diesem Fall verzichtet werden. Die Enzyminkubationen mit den Cumarin-Derivaten und die anschließende fluorimetrische Detektion werden in den meisten Fällen in der Mikrotiterplatte durchgeführt.¹⁴⁴ Hierbei muss eine selektive Detektion des entstandenen Metaboliten erfolgen, da keine chromatographische Trennung des Metaboliten von dem Substrat vorgenommen wird. Durch die entstandene freie phenolische Hydroxylgruppe der Metaboliten, ergeben sich unterschiedliche fluorimetrische Eigenschaften, die für eine selektive Detektion ausgenutzt werden können. Nach der Deprotonierung der phenolischen Hydroxylgruppe des Metaboliten erfolgt eine bathochrome Verschiebung des

Anregungsmaximums, das bei dem Substrat nicht auftritt. Durch Einstrahlung von Licht dieser Wellenlänge wird ausschließlich die Fluoreszenz des Metaboliten angeregt. In den meisten Fällen steigt zusätzlich der Absorptionskoeffizient durch die Deprotonierung der phenolischen Hydroxylgruppe des Metaboliten an (hyperchromer Effekt), was ebenfalls zu einer Steigerung der Fluoreszenzintensität führt. Aufgrund des -M-Effektes des Lactons von 7-Hydroxycumarin ist der pK_S -Wert der phenolischen Hydroxylgruppe im Vergleich zum β -Naphthol um mindestens 2 Einheiten auf etwa 7-8 erniedrigt. D. h. eine Erhöhung des pH-Wertes des Inkubationspuffers von 7.4 auf 9-10 reicht aus, damit die phenolische Hydroxylgruppe des Metaboliten vollständig deprotoniert vorliegt. Bei den beschriebenen Mikrotiterplatten-Assays wird hierfür häufig Tris(hydroxymethyl)aminomethan in verdünntem Acetonitril verwendet, wodurch gleichzeitig die Enzymreaktion abgestoppt wird.²⁶⁶

Zur Verbesserung der fluorimetrischen Eigenschaften und v. a. zur Ausweitung des Metabolismus auf weitere CYP-Enzyme werden in der Literatur einige synthetische Cumarin-Derivate als In-vitro-Substrate beschrieben, die in Position 7 eine Alkyloxy- oder Benzyloxy-Gruppe tragen. Hierbei wurden Substitutionen mit elektronenziehenden Gruppen, wie z. B. eine Cyano- oder Trifluormethylgruppe, am Cumarin-Ringsystem durchgeführt.¹⁴⁴ Bei allen Cumarin-Derivaten, die für die In-vitro-Untersuchung der Inhibition von CYP-Enzymen eingesetzt werden, handelt es sich nicht um Arzneistoffe.

3-Cyan-7-ethoxycumarin (CEC) wird durch CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 und CYP2D6 durch O-Deethylierung in den Metaboliten 3-Cyan-7-hydroxycumarin (CHC) überführt (Abb. 65).^{266,267} Es wird von BD Gentest™ in erster Linie wegen der hohen Umsetzungsgeschwindigkeit als Substrat für CYP1A2 empfohlen. Durch den starken -M-Effekt der Cyanogruppe ist der pK_S -Wert gegenüber dem unsubstituierten 7-Hydroxycumarin so weit erniedrigt, dass die phenolische Hydroxylgruppe des Metaboliten CHC bereits im Inkubationspuffer mit pH 7.4 größtenteils deprotoniert vorliegt. Aus diesem Grund ist eine Alkalisierung durch die Zugabe einer Stopplösung nicht notwendig. Vielmehr besteht sogar die Möglichkeit einer kontinuierlichen Messung während der Inkubation.²⁶⁸

7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin (MFC), 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin (EFC) und 7-Benzyloxy-4-trifluormethylcumarin (BFC) sind Cumarin-Derivate, die mit einer

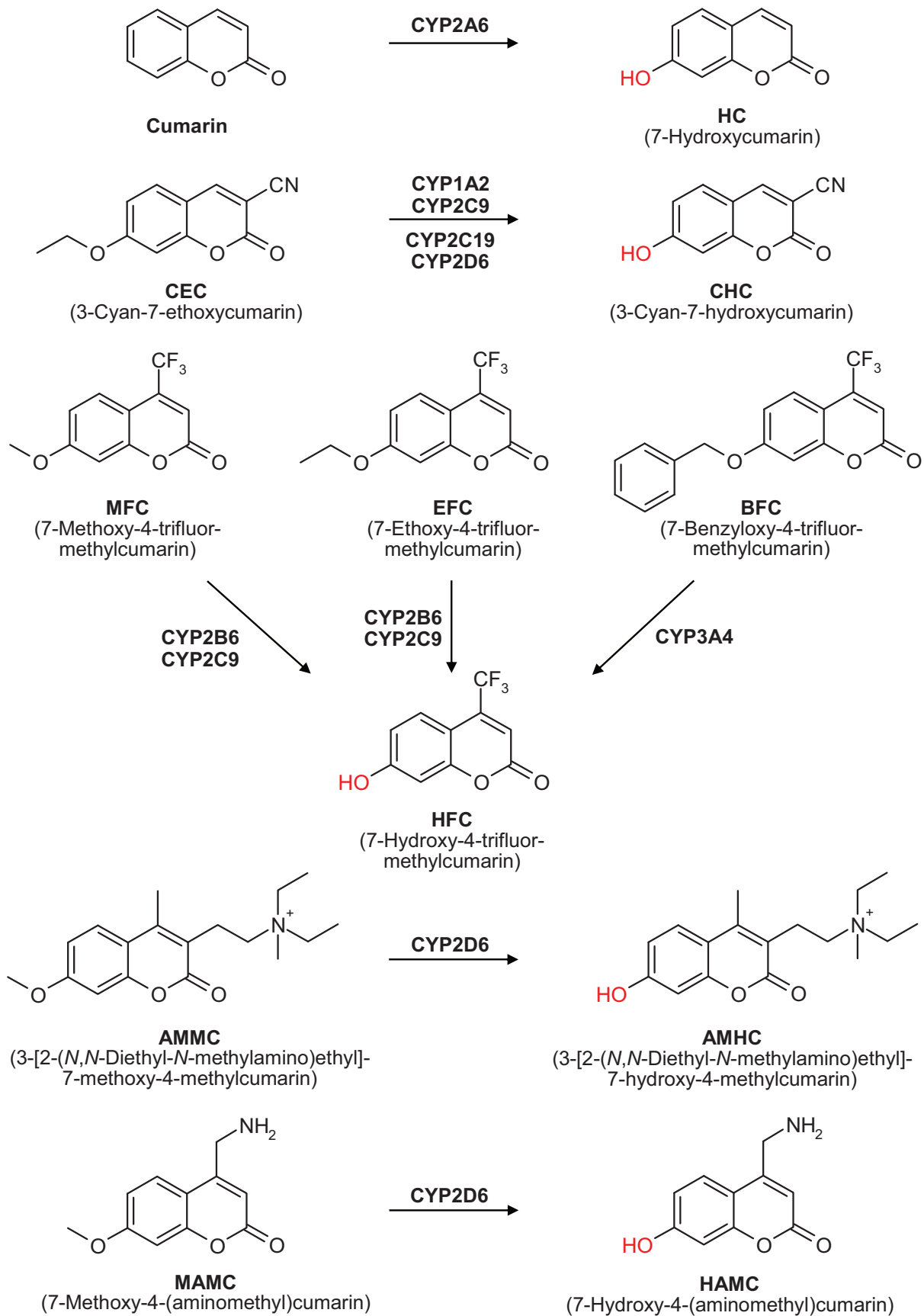


Abb. 65 Häufig eingesetzte Reaktionen von Cumarin-Derivaten für die Untersuchung der Inhibition von CYP-Enzymen.

Trifluormethylgruppe substituiert sind, und alle zu dem Metaboliten 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC) durch verschiedene CYP-Enzyme metabolisiert werden (Abb. 65). Für CYP2C9- und CYP2B6-Assays werden hauptsächlich MFC und EFC eingesetzt, während BFC als Substrat für CYP3A4 verwendet wird.^{144,266}

Das quarternäre Cumarin-Derivat 3-[2-*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin (AMMC) wird zu 3-[2-*N,N*-Diethyl-*N*-methylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin (AMHC) demethyliert (Abb. 65). Bei einer Substratkonzentration von 1.5 μM geschieht dies selektiv durch CYP2D6.²⁶⁹ Ein Nachteil bei diesem Substrat ist, dass nach der Zugabe der Stopplösung der bathochrome Shift der Anregungswellenlänge von AMHC im Vergleich zu den Metaboliten CHC und HFC nicht so stark ausgeprägt ist und das in der Probe vorhandene Cosubstrat NADPH (Ex 340 nm / Em 435 nm) unter diesen Bedingungen ebenfalls zur Fluoreszenz angeregt wird, wodurch die Detektion des Metaboliten gestört wird. Daher wird eine höhere Anregungswellenlänge von 390 nm verwendet, was zulasten der Empfindlichkeit geht, und die eingesetzte NADPH-Konzentration von 1.3 mM auf 8.1 μM erniedrigt.²⁶⁹ Für CYP2D6 wird neben AMMC noch 7-Methoxy-4-(aminomethyl)cumarin (MAMC), das zu 7-Hydroxy-4-(aminomethyl)cumarin (HAMC) metabolisiert wird, verwendet (Abb. 65).²⁷⁰

Die folgenden Kapitel beschäftigen sich mit der Synthese und Testung von Cumarin-Derivaten als Substrate für CYP-Enzyme. Durch Alkylierung und Benzylierung wurden eine Reihe von Cumarin-Derivaten synthetisiert und gereinigt (s. II.4.2). HPLC-Methoden mit Fluoreszenzdetektion wurden zur Quantifizierung der aus den synthetisierten Cumarin-Derivaten entstehenden *O*-Desalkylmetaboliten erarbeitet (s. II.4.4). Zuvor wurden für die optimale Detektion der *O*-Desalkylmetaboliten einige physikochemische Eigenschaften, wie z. B. Absorptions- und Fluoreszenzmaxima, Absorptionskoeffizienten und die pK_S -Werte dieser Substanzen bestimmt (s. II.4.3). Anschließend wurde der Metabolismus dieser Substrate mit humanen Lebermikrosomen und rekombinanten CYP-Enzymen untersucht (s. II.4.5).

4.2 Synthese und Reinigung der 7-Alkyloxycumarin-Derivate

Die Synthese der 7-Alkyloxycumarin-Derivate, die als Substrate für die CYP-Enzyme verwendet werden sollen, wurde aus den entsprechenden 7-Hydroxycumarin-Derivaten durch Umsetzung mit Alkylhalogeniden durchgeführt. Als Edukte für die

7-Hydroxycumarin-Teilstruktur wurden 7-Hydroxycumarin (HC), 7-Hydroxy-4-methylcumarin (HMC) und 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC) ausgewählt. Für die entsprechenden Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl-, Pentyl- und Benzyl-Derivate wurden Iodmethan, Ethyliodid, 1-Brompropan, 1-Brombutan, 1-Brompentan und Benzylbromid verwendet. Somit konnten 18 verschiedene Derivate synthetisiert werden (Abb. 66). Für den Syntheseansatz wurde das 7-Hydroxycumarin-Derivat in Aceton gelöst und Kaliumcarbonat, das vorher fein zermörsert wurde, als Hilfsbase hinzugegeben. Anschließend wurde das entsprechende Alkylhalogenid zugegeben und der Ansatz für mehrere Stunden erhitzt. Durch die Zugabe der Hilfsbase erfolgte eine Gelbfärbung der Lösung, die auf die freie phenolische Hydroxylgruppe des Eduktes zurückzuführen ist. Die Färbung der Lösung verschwand während der Reaktion, was auf eine vollständige Umsetzung hindeutet. Die Methylierungs-, Ethylierungs- und Benzylierungsreaktionen verliefen wesentlich schneller als die Umsetzung mit 1-Brombutan oder 1-Brompentan, für die eine höhere Temperatur und eine längere Reaktionszeit gewählt werden musste. Zur Beschleunigung der Reaktion wurde in allen Fällen ein Überschuss des Alkylhalogenids eingesetzt. Die Reaktionskontrolle wurde mit Hilfe der HPLC/UV-Analyse des verdünnten Reaktionsansatzes mit einer Detektionswellenlänge von 320 nm durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Umsetzung v. a. zu den methylierten und benzylierten Derivaten nahezu vollständig erfolgt. Nach der Reaktion wurde das überschüssige Alkylhalogenid mit Hilfe des Rotationsverdampfers entfernt.

Da es sich bei dem als Edukt eingesetzten jeweiligen 7-Hydroxycumarin-Derivat bereits um den aus den Substraten durch die CYP-Enzyme entstehenden O-Desalkylmetaboliten handelt, müssen die synthetisierten Substanzen frei von Edukt sein. Selbst kleinste Verunreinigungen mit dem Metaboliten ($\ll 1\%$) würden bei den Enzymassays einen hohen Blindwert verursachen und die Detektion des enzymatisch entstandenen Metaboliten erheblich erschweren. Dies zeigt das folgende Beispiel. Bei den In-vitro-Assays entstehen typischerweise Metabolitkonzentrationen im Bereich von 1 bis 100 ng/ml. Würde das Substrat eine Verunreinigung mit 1 % des Metaboliten aufweisen, wären bei einer Inkubation einer Substratkonzentration von 100 μM und einer Molmasse von 200 Da bereits etwa 200 ng/ml Metabolit vor der Inkubation in der Probe vorhanden. Das ist ein

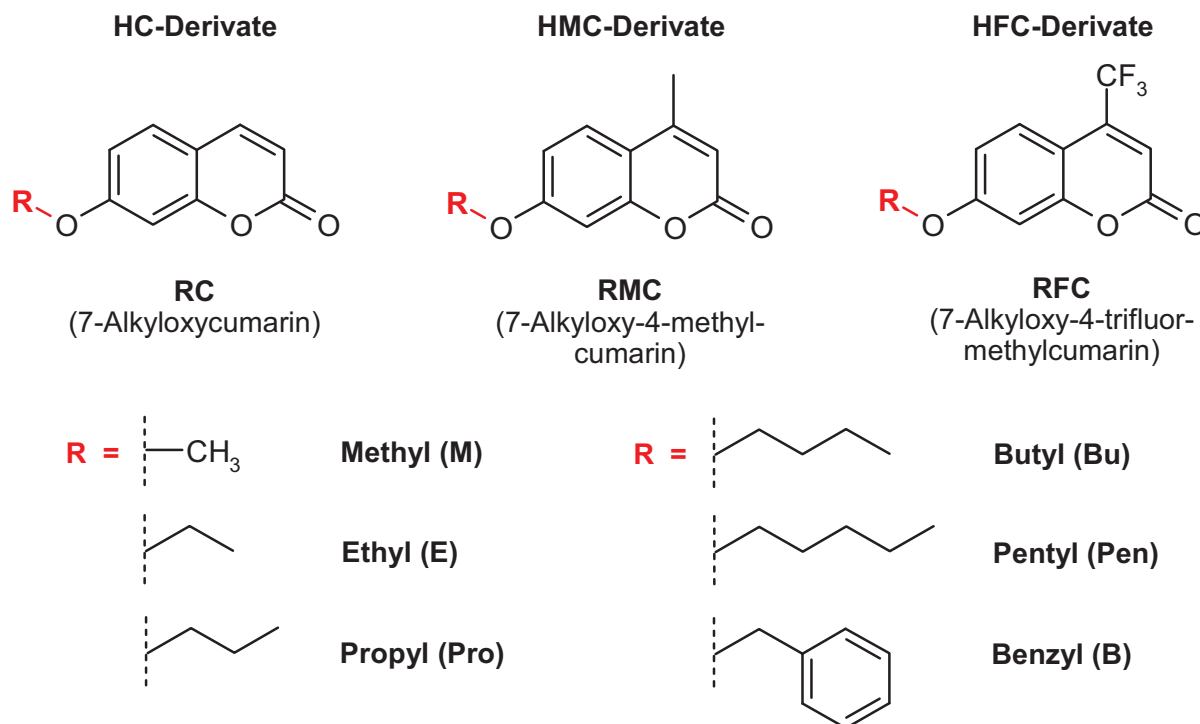


Abb. 66 Strukturen der synthetisierten Coumarin-Derivate für die Umsetzung mit CYP-Enzymen.

Vielfaches der durch die CYP-Enzyme entstehenden Metabolitkonzentration. Eine genaue Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit durch die CYP-Enzyme wäre in diesem Fall nicht möglich. Somit konnte z. B. das von Sigma-Aldrich erworbene 7-Methoxycoumarin, das bei den durchgeführten HPLC-Untersuchungen mit etwa 0.2 % 7-Hydroxycoumarin verunreinigt war, nicht als Substrat eingesetzt werden. Damit das durch die Verunreinigung mit dem Metaboliten entstehende Messsignal unter die Nachweisgrenze sinkt, die bei den beschriebenen LC/LC-Fluoreszenzmethoden bei etwa 0.2 ng/ml liegt, müssten die Substrate eine Reinheit von > 99.999 % aufweisen. Um hochreine Substanzen zu erhalten, erfolgte die Reinigung der Syntheseprodukte daher mit Hilfe der HPLC unter Verwendung einer analytischen Säule. Hierfür gab es mehrere Gründe. Der Reaktionsansatz ist mit 50 mg sehr klein und die analytische Säule besitzt eine höhere Trennleistung als eine präparative Säule. Zudem konnten die Aufreinigungen mit einer automatischen Sammlung von Fraktionen bei Verwendung einer analytischen Säule ohne Aufsicht über Nacht durchgeführt werden. Für einen Chromatographielauf wurden etwa 0.5 bis 1 mg der in Methanol oder Aceton gelösten Substanz injiziert. Mit dem verwendeten sauren Fließmittel (0.05 % Trifluoressigsäure / Methanol) ergaben sich

selbst bei den isokratischen Fließmittelzusammensetzungen sehr scharfe Peaks. Die Reinigung mittels HPLC besitzt allerdings einige Nachteile. Da häufig nicht der vollständige Peak gesammelt werden kann, muss mit einem Substanzverlust von bis zu 25 % gerechnet werden. Weiterhin enthält das gesammelte Eluat erhebliche Mengen Wasser, weshalb eine Gefriertrocknung durchgeführt wurde. Die Ausbeuten der einzelnen Substanzen beliefen sich zwischen 45 und 75 % (s. V.2.5.2.1). Dabei ist der Verlust hauptsächlich auf die Reinigung zurückzuführen, da die Reaktionen in der Regel vollständig abliefen. Zur Überprüfung der Identität und der Reinheit bezüglich des Eduktes wurden LC/MS- und HPLC/Fluoreszenzanalysen der Lösungen der Substanzen durchgeführt. In allen Fällen stimmten die detektierten *m/z*-Werte mit den aus der Molmasse berechneten Werten überein. Nach Injektion einer Lösung mit 100 µM Substrat konnten keine Signale des jeweiligen Metaboliten bei den unten beschriebenen LC/LC/Fluoreszenzanalysen detektiert werden.

4.3 Charakterisierung der 7-Hydroxycumarin-Metaboliten

UV-Absorption

Um die Absorptionsmaxima der 7-Hydroxycumarin-Derivate auch in Abhängigkeit des pH-Wertes zu bestimmen, wurden Absorptionsspektren in verschiedenen Pufferlösungen aufgenommen (Abb. 67). Im Puffer mit pH 2.0, der etwa dem verwendeten HPLC-Fließmittel entspricht, liegt die phenolische Hydroxylgruppe ungeladen vor. Bei einem pH-Wert von 9.5, der etwa nach Zugabe von Tris-Base zum Abstoppen der Inkubation in der Mikrotiterplatte vorliegt, ist die phenolische Hydroxylgruppe nahezu vollständig deprotoniert. Weiterhin wurde mit pH 7.5 ein Puffer untersucht, der mit den Bedingungen der Inkubation vergleichbar ist. In allen Fällen trat ein bathochromer Shift bei Verwendung des alkalischen Puffers mit pH 9.5 auf (Abb. 67). Der bathochrome Shift durch die Deprotonierung der phenolischen Hydroxylgruppe betrug dabei zwischen 40 und 55 nm. CHC besaß sowohl im alkalischen als auch im sauren Medium das längste Absorptionsmaximum. Die methylsubstituierten Derivate in Position 4 besaßen gegenüber den unsubstituierten Derivaten leicht hypsochrom verschobene Wellenlängen. Auffällig ist, dass für CHC bereits bei pH 7.5 der bathochrome Shift stark ausgeprägt ist (Abb. 67), d. h. ein großer Anteil der phenolischen Hydroxylgruppen im Inkubationspuffer bereits deprotoniert vorliegt.

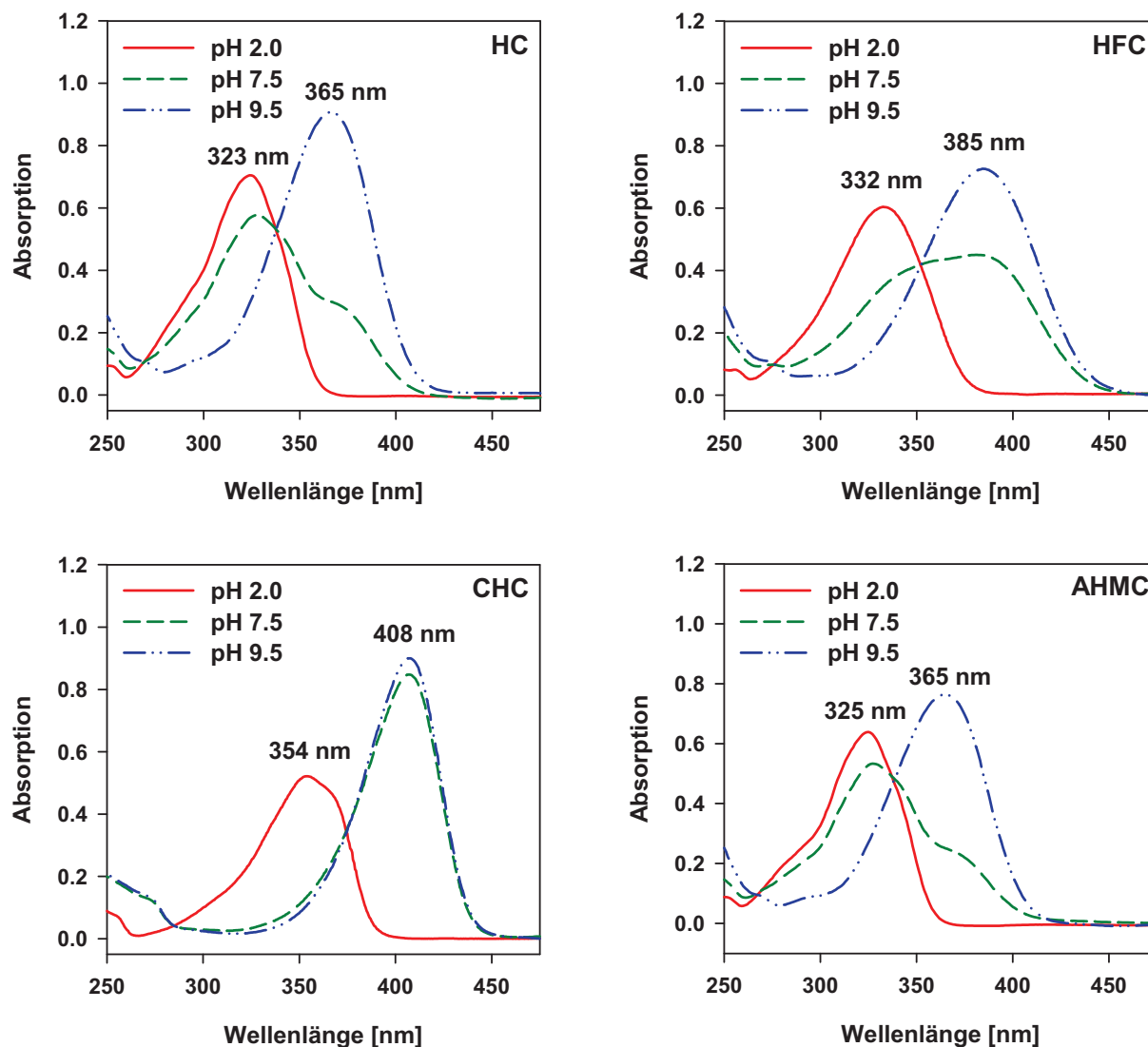


Abb. 67 UV/VIS-Spektren von 7-Hydroxycumarin (HC; 7.5 $\mu\text{g/ml}$), 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC; 10 $\mu\text{g/ml}$), 3-Cyan-7-hydroxycumarin (CHC; 4 $\mu\text{g/ml}$) und 3-[2-(N,N-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin-Hydrochlorid (AHMC; 12.5 $\mu\text{g/ml}$) in Pufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten.

Nach der Bestimmung der Absorptionsmaxima wurden die molaren Absorptionskoeffizienten berechnet (Tab. 16). Dabei besitzt HFC den kleinsten und die mit der Nitrilgruppe substituierten Derivate CHC und CHMC die höchsten Absorptionskoeffizienten. Es trat bei allen Substanzen durch die Deprotonierung der phenolischen Hydroxylgruppe ein hyperchromer Effekt auf. Die ermittelten Absorptionsmaxima und Absorptionskoeffizienten (Tab. 16) stimmen weitestgehend mit den bisher in der Literatur vorhandenen Angaben zu HC, HMC und HFC überein.^{271,272}

Tab. 16 Absorptionsmaxima (λ_{\max}) und molare Absorptionskoeffizienten (ε) der Metaboliten 7-Hydroxycumarin (HC), 7-Hydroxy-4-methylcumarin (HMC), 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC), 3-Cyan-7-hydroxycumarin (CHC), 3-Cyan-7-hydroxy-4-methylcumarin (CHMC) und des internen Standards 3-[2-(*N,N*-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin (AHMC).

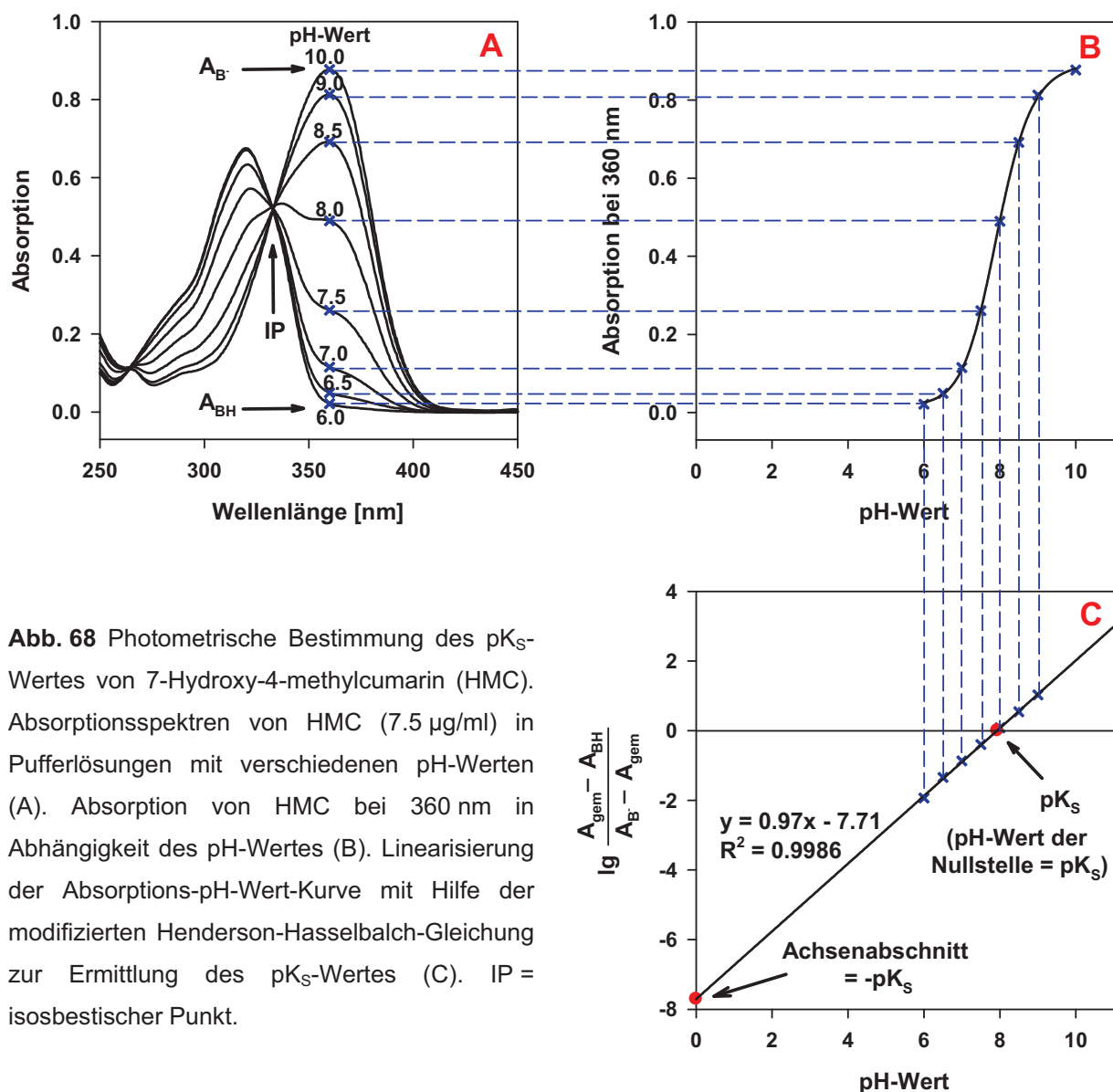
Substanz	pH 2.0		pH 9.5	
	λ_{\max} [nm]	ε [l x mol ⁻¹ x cm ⁻¹]	λ_{\max} [nm]	ε [l x mol ⁻¹ x cm ⁻¹]
HC	323	13700	365	19100
HMC	320	16500	360	20300
HFC	332	13900	385	16700
CHC	354	24400	408	42100
CHMC	347	24400	399	41500
AHMC	325	15900	365	19100

pK_S-Werte

Eine Säure reagiert in wässriger Lösung unter Abgabe eines Protons mit der Gleichgewichtskonstanten K_S für diese Protolysereaktion. Je größer die Gleichgewichtskonstante K_S , desto mehr Moleküle der Säure liegen protolysiert vor und desto stärker ist die Säure. Aus praktischen Gründen wird statt der Gleichgewichtskonstanten K_S der negative dekadische Logarithmus (pK_S) angegeben. Der pK_S-Wert steht für die Säure-Base-Eigenschaft einer Substanz und ist somit eine stoffspezifische Konstante. Das Vorliegen eines Arzneistoffes als ungeladene Säure oder als deprotonierte und geladene Base kann z. B. das Ausmaß der Resorption sowie den Resorptionsort beeinflussen. Weiterhin kann der im physiologischen Milieu vorliegende pH-Wert entscheidend sein, ob das Arzneistoffmolekül am Target binden kann oder nicht. Die Säure-Base-Eigenschaft kann auch analytisch zur Trennung von Substanzen aus einem Stoffgemisch genutzt werden (Stas-Otto-Trennungsgang).²⁷³

Bei den zu analysierenden 7-Hydroxycumarinen handelt es sich aufgrund der im Molekül vorkommenden phenolischen Hydroxylgruppe um Säuren. Bei der Deprotonierung dieser funktionellen Gruppe tritt eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums auf. Aus diesem Grund kann die Bestimmung des pK_S-Wertes mit Hilfe der UV/VIS-Absorptionsspektroskopie durchgeführt werden. Hierfür wurden UV/VIS-Spektren der Substanzen in verschiedenen Pufferlösungen im pH-Bereich von 2.0 bis 10.0 aufgenommen, die in Abb. 68A für HMC exemplarisch

dargestellt sind. Bei pH 6.0 liegt das Absorptionsmaximum bei 320 nm und im Puffer mit pH 10.0 bei 360 nm. Die Spektren in den Pufferlösungen mit den pH-Werten zwischen 6.0 und 10.0 setzen sich aus der Absorption der vorliegenden ungeladenen Form (BH) und der deprotonierten Form (B⁻) zusammen. Alle UV/VIS-Spektren schneiden sich im isosbestischen Punkt (IP), bei dessen Wellenlänge die ungeladene Form und die deprotonierte Form denselben Absorptionskoeffizienten besitzen. Für die Bestimmung des pK_S-Wertes wurden nun die Absorptionen in den verschiedenen Pufferlösungen bei der Wellenlänge des bathochrom verschobenen Absorptionsmaximums gegenüber dem pH-Wert der Pufferlösungen aufgetragen (Abb. 68B). Eine Voraussetzung für die Verwendung der direkt gemessenen Absorptionen ist, dass in jeder Probe dieselbe Analytkonzentration vorliegt. Hierbei



ergibt sich eine sigmoidale Kurve (Abb. 68B), deren Wendepunkt dem pK_S -Wert (x-Koordinate) entspricht. Um den exakten pK_S -Wert zu erhalten, kann die Auswertung dieser sigmoidalen Kurve durch eine nichtlineare Regression mit Hilfe der 4-Parametergleichung nach Hill erfolgen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Kurve zu linearisieren. Hierfür kann (Gl. 10) verwendet werden, die aus der Henderson-Hasselbalch-Gleichung und dem Lambert-Beerschen-Gesetz erhalten wird (s. V.2.9.3). Für die Linearisierung werden die Absorption der ungeladenen Form (BH) und der deprotonierten Form (B^-) sowie die gemeinsame Absorption (A_{gem}) bei Vorliegen beider Formen in den einzelnen Pufferlösungen benötigt. Die Absorptionen der reinen ungeladenen Form und der deprotonierten Form können in Lösungen mit extremen pH-Werten gewonnen werden, für die bekannt ist, dass ausschließlich eine Form vorliegt. Hierfür können z. B. 0.1 M Salzsäure oder 0.1 M Natriumhydroxidlösung verwendet werden, in denen die Analyten allerdings eine ausreichende Stabilität aufweisen müssen. Bei den 7-Hydroxycumarinen wurde deshalb eine Pufferlösung mit pH 10.5 anstatt der 0.1 M Natriumhydroxidlösung verwendet. Die Absorptionen werden in den logarithmischen Term von (Gl. 10) eingesetzt und die erhaltenen Werte gegenüber dem pH-Wert aufgetragen (Abb. 68C). Anschließend wird eine lineare Regression durchgeführt. Der y-Achsenabschnitt dieser Geradengleichung entspricht dem negativen pK_S -Wert. Die Steigung dieser Geraden beträgt theoretisch 1, weshalb die Nullstelle dieser Geraden ebenfalls dem pK_S -Wert entspricht. Da für den y-Achsenabschnitt eine Extrapolation dieser Regressionsgeraden vorgenommen werden muss, wurde für die Bestimmung der pK_S -Werte die Nullstelle verwendet. Prinzipiell kann die Detektion für die Bestimmung des pK_S -Wertes bei jeder Wellenlänge erfolgen z. B. auch bei der Wellenlänge des Maximums der ungeladenen Form. Hierbei wird eine fallende sigmoidale Kurve bzw. nach Linearisierung eine Gerade mit negativem Anstieg

$$\lg \frac{A_{\text{gem}} - A_{\text{BH}}}{A_{\text{B}^-} - A_{\text{gem}}} = \text{pH} - pK_S \quad (\text{Gl. 10})$$

A_{gem} = Absorption in der jeweiligen Pufferlösung

A_{BH} = Absorption bei Vorliegen der ungeladenen Form

A_{B^-} = Absorption bei Vorliegen der deprotonierten Form

pK_S = negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante

erhalten. Als Messwellenlänge ist die Wellenlänge des Absorptionsmaximums der deprotonierten Form zu empfehlen, da dort in der Regel die Differenz der Absorptionskoeffizienten der beiden Formen am größten ist und die Absorption der ungeladenen Form in den meisten Fällen bei einem großen bathochromen Shift sogar null beträgt. Aus den Messdaten für die einzelnen 7-Hydroxycumarine wurden mit Hilfe der Linearisierung durch (Gl. 10) die in Tab. 17 angegebenen pK_S -Werte erhalten. HMC ($pK_S = 7.9$) besitzt aufgrund des +I-Effektes der Methylgruppe einen höheren pK_S -Wert als HC ($pK_S = 7.7$). Für AHMC, für das bei dieser photometrischen Bestimmung nur der pK_S -Wert der phenolischen Hydroxylgruppe erfasst wird, ergibt sich ein mit HMC vergleichbarer Wert. Für HFC wurde aufgrund des -I-Effektes des Trifluormethylsubstituenten ein niedrigerer pK_S -Wert von 7.3 erhalten. Noch kleiner ist der pK_S -Wert von CHC ($pK_S = 6.3$), was auf den -M-Effekt der Nitrilgruppe zurückgeführt werden kann. Die Einführung der Methylgruppe in Position 4 beim CHMC wirkt dem Effekt entgegen, wodurch sich der pK_S -Wert auf 6.6 erhöht. Aufgrund des niedrigen pK_S -Wertes von CHC liegt die Substanz im Inkubationspuffer von pH 7.4 bereits zu 92 % deprotoniert vor, was eine direkte Messung in der Mikrotiterplatte während der Inkubation ermöglicht. Für alle anderen Derivate muss für eine selektive fluorimetrische Detektion der Metaboliten in der Mikrotiterplatte ein Abstoppen der Reaktion mit einer Alkalisierung erfolgen, um den bathochromen Shift der Anregungswellenlänge zu erhalten. Dabei sollte ein pH-Wert angestrebt werden, der sich um mindestens zwei Einheiten oberhalb des pK_S -Wertes befindet. Hierbei liegen mehr als 99 % des Analyten deprotoniert vor.

Tab. 17 pK_S -Werte der phenolischen Hydroxylgruppe ausgewählter 7-Hydroxycumarine. 7-Hydroxycumarin (HC), 7-Hydroxy-4-methylcumarin (HMC), 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC), 3-Cyan-7-hydroxycumarin (CHC), 3-Cyan-7-hydroxy-4-methylcumarin (CHMC), 3-[2-(*N,N*-Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin (AHMC).

Substanz	pK_S -Wert		Substanz	pK_S -Wert	
	bestimmt	Literatur		bestimmt	Literatur
HC	7.7	7.75 ^[271,274]	CHC	6.3	6.2 ^[274]
HMC	7.9	7.8 ^[271,272]	CHMC	6.6	-
HFC	7.3	7.3 ^[272]	AHMC	7.8	-

Fluoreszenz

Für die Bestimmung der Fluoreszenzeigenschaften wurden Anregungs- und Emissionsspektren in verschiedenen Puffersystemen und mit Hilfe des HPLC-Fluoreszenzdetektors gemessen. Die Emissionswellenlängen bleiben bei der Änderung des pH-Wertes der Lösung nahezu unverändert, während die Anregungsmaxima sich wie die Absorptionsmaxima verhalten und mit der Deprotonierung der phenolischen Hydroxylgruppe bathochrom verschoben sind, was die Literaturangaben bestätigt.²⁷¹ Für HFC wurde eine längere Emissionswellenlänge als bei den anderen Derivaten festgestellt, und es tritt bei dieser Substanz auch die größte Differenz zwischen dem Anregungs- und Emissionsmaximum (Stokes-Shift) auf (Abb. 69). Die intensivste Fluoreszenz zeigen die mit der Nitrilgruppe substituierten Derivate (CHC, CHMC) und die niedrigste Fluoreszenzintensität besaß HFC, was gut mit den ermittelten molaren Absorptionskoeffizienten (Tab. 16) korreliert. Demzufolge wurden die Photonenmultiplierspannungen des Fluoreszenzdetektors bei der HPLC-Analyse für jede Substanz angepasst (s. II.4.4). Bei der HPLC/Fluoreszenzanalyse im sauren Fließmittel erfolgt kein bathochromer Shift des Anregungsmaximums (Abb. 69). Dies ist für die Quantifizierung des Metaboliten hierbei nicht notwendig, da bei der HPLC-Analyse der Metabolit von dem Substrat chromatographisch abgetrennt wird. Eine Interferenz mit dem in der Probe enthaltenem NADPH kann ebenfalls nicht auftreten, da dieses auf der RP-Phase

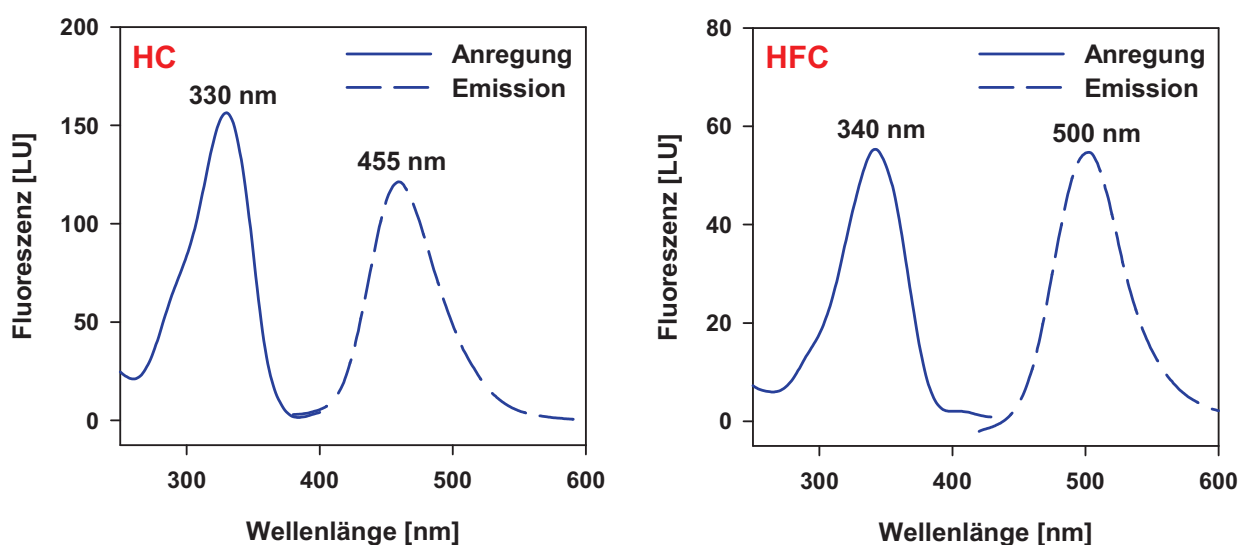


Abb. 69 Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren von 7-Hydroxycumarin (HC) und 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC), gemessen mit dem LC-Fluoreszenzdetektor im sauren Fließmittel (0.1 % Ameisensäure / Acetonitril).

keine Retention zeigt und bereits bei der Online-Festphasenextraktion entfernt wird. Hingegen können bei der Detektion in der Mikrotiterplatte Störungen durch die Eigenfluoreszenz von NADPH auftreten, wenn es zu Überlappungen der Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen kommt, was bei der Detektion der Metaboliten HC, HMC und AMHC möglich ist.

4.4 LC/LC/Fluoreszenzanalyse der 7-Hydroxycumarin-Metaboliten

Die Quantifizierung der aus den Cumarin-Derivaten durch die CYP-Enzyme entstandenen O-Desalkylmetaboliten wurde mit Hilfe der HPLC-Analyse mit automatischer Online-Festphasenextraktion und Fluoreszenzdetektion (LC/LC/Fluoreszenzanalyse) durchgeführt. Funktionsweise und Vorteile dieser Technik wurden bereits durch A. Frank beschrieben.¹⁴³ Die Assays wurden nach dem jeweiligen Metaboliten benannt (Abb. 70). Aus den 7-Alkyloxycumarin-Derivaten

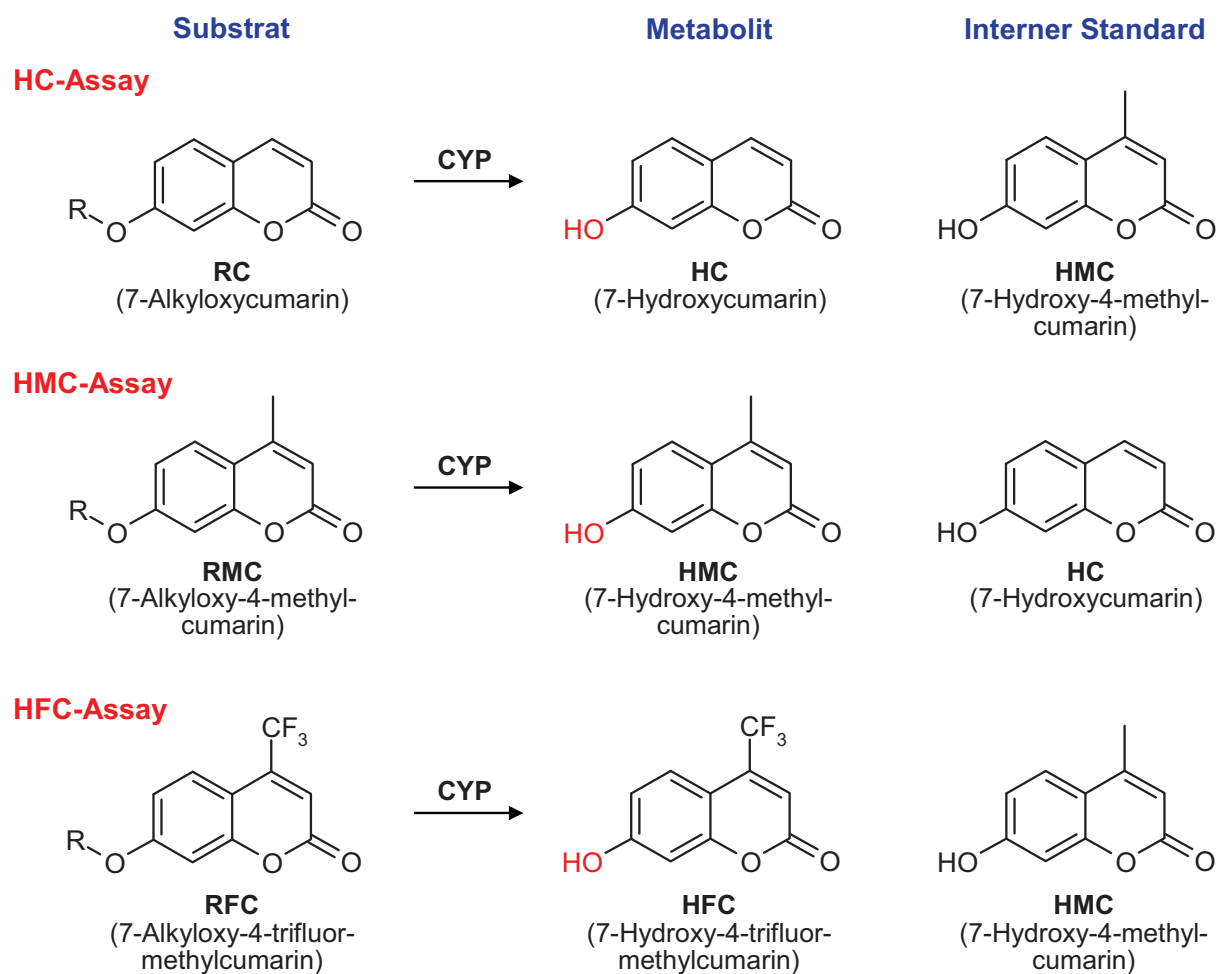


Abb. 70 LC/LC/Fluoreszenz-basierte Assays für CYP-Enzyme mit den Cumarin-Derivaten.

entsteht der O-Desalkylmetabolit HC, für dessen Quantifizierung HMC als interner Standard verwendet wurde (HC-Assay). Der aus den 7-Alkyloxy-4-methylcumarinen entstehende Metabolit HMC wurde mit Hilfe des internen Standards HC quantifiziert (HMC-Assay). Für beide Assays konnte dieselbe HPLC-Methode verwendet werden, da die jeweils andere der beiden Substanzen als interner Standard gewählt wurde. Den Inkubationen der 7-Alkyloxy-4-trifluormethylcumarine, aus denen der O-Desalkylmetabolit HFC entsteht, wurde HMC als interner Standard zugesetzt (HFC-Assay).

Optimierung der Online-Festphasenextraktion

Als Ladefließmittel für die Extraktion wurde ein saures Fließmittel mit 0.1 % Ameisensäurezusatz verwendet, in dem die phenolische Hydroxylgruppe der 7-Hydroxycumarine ungeladen vorliegt und somit eine maximale Retention der sauren Analyten auf der Extraktionssäule resultiert. Dennoch sollte die Elutionskraft des Ladefließmittels so hoch wie möglich sein, um viele Matrixbestandteile zu entfernen. Die Elutionskraft des Extraktionsmittels kann durch die Steigerung des Anteils der organischen Fließmittelkomponente erhöht werden. Aus diesem Grund wurden die Methanolanteile des Ladefließmittels variiert und die Wiederfindungsraten der Metaboliten gegenüber dem rein wässrigen Ladefließmittel bestimmt. Als Extraktionssäule wurde eine spezielle RP18-Säule verwendet (Zorbax SB-Aq; 12.5 x 4.6 mm; 5 µm), die auch mit rein wässrigem Fließmittel betrieben werden kann. In Abb. 71 sind die Wiederfindungsraten für die einzelnen Analyten bei Verwendung unterschiedlicher Methanolkonzentrationen und verschiedener Ladefließmittelzusätze dargestellt. Auf den ersten Blick ist ersichtlich, dass HC der polarste Analyt ist und HFC die stärkste Retention besitzt. Betrachtet man das Fließmittel mit 0.1 % Ameisensäure sinkt für HC die Wiederfindungsrate ab einer Konzentration von 5 % Methanol im Ladefließmittel und ab 10 % Methanol wird der Analyt gar nicht mehr auf der Extraktionssäule zurückgehalten. Bei HMC ist das Proton in Position 4 durch eine Methylgruppe substituiert, was sich bereits in einer erheblich stärkeren Retention auf der Extraktionssäule widerspiegelt. Hier sinkt die Wiederfindung erst bei einer Methanolkonzentration von > 15 %. Der lipophilste Analyt HFC wird sogar bis 20 % Methanol durch das Säulenmaterial aus der Probe extrahiert. Die untersuchten Fließmittelzusätze hatten kaum Auswirkungen auf die Retention der sauren Analyten.

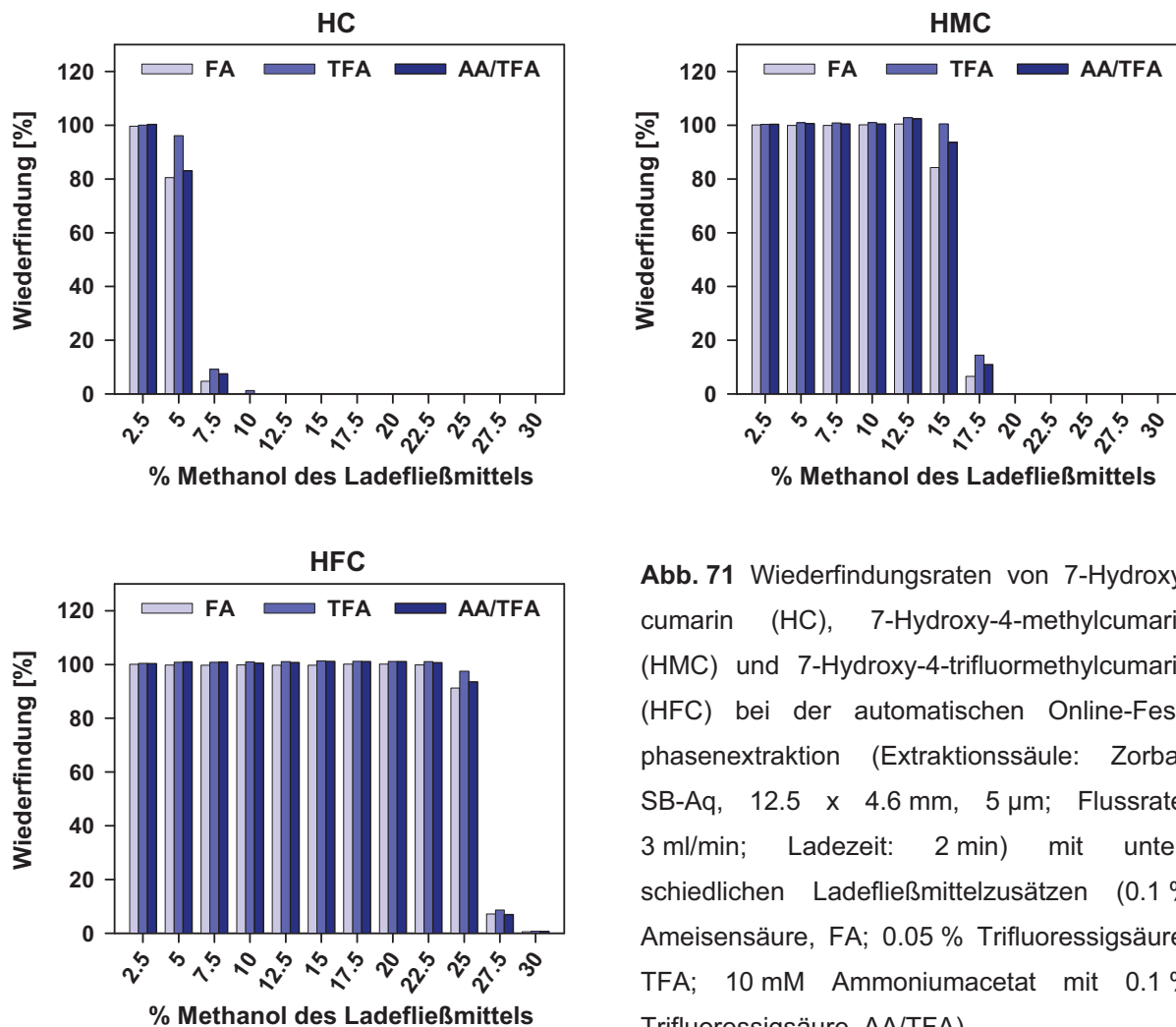


Abb. 71 Wiederfindungsraten von 7-Hydroxycumarin (HC), 7-Hydroxy-4-methylcumarin (HMC) und 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC) bei der automatischen Online-Festphasenextraktion (Extraktionssäule: Zorbax SB-Aq, 12.5 x 4.6 mm, 5 µm; Flussrate: 3 ml/min; Ladezeit: 2 min) mit unterschiedlichen Ladefließmittelzusätzen (0.1 % Ameisensäure, FA; 0.05 % Trifluoressigsäure, TFA; 10 mM Ammoniumacetat mit 0.1 % Trifluoressigsäure, AA/TFA).

Wenn der Methanolanteil des Ladefließmittels entsprechend gewählt wird, können alle drei untersuchten Fließmittelzusätze verwendet werden. Da die Wiederfindungsrate für eine quantitative Bestimmung möglichst hoch sein sollte, wurde für jede Methode anhand der vorliegenden Analyten ein Methanolanteil des Ladefließmittels gewählt, bei dem die Wiederfindung des jeweils polarsten Analyten in der Probe noch 100 % betrug. Demzufolge wurden bei dem Ladefließmittel mit 0.1 % Ameisensäurezusatz für den HC- und den HMC-Assay 2.5 % Methanolanteil, für den HFC-Assay 5 % Methanolanteil verwendet.

Chromatographie und Fluoreszenzdetektion

Nach der zweiminütigen automatischen Extraktion wurde durch Umschalten des 6-Wegeventils die Extraktionssäule mit der analytischen Säule verbunden und die Analyten auf die Chromatographiesäule im Backflush-Modus gespült. Die

chromatographische Trennung erfolgte nun mit Hilfe eines geeigneten Fließmittelgradienten. Hierfür wurde ein saures Fließmittel mit 0.1 % Ameisensäure in der Wasserphase und Acetonitril verwendet. Die Fließmittelgradienten wurden so gewählt, dass der zu quantifizierende Metabolit und der interne Standard innerhalb einer Analysenzeit von 6 min getrennt eluierten (Abb. 72). Es wurde darauf geachtet, dass die erste Substanz zur Vermeidung von Interferenzen eine um 2 min höhere Retentionszeit als die Totzeit besaß. Aufgrund der erheblich stärkeren Retention des HFC gegenüber dem internen Standard HMC wurde beim HFC-Assay ein steilerer Gradient als bei dem HC-Assay gewählt, um die Analysenzeit von 6 min einhalten zu können. Die stärkste Retention besaß HFC und die geringste HC. Bezüglich der Retention der Analyten auf dem Säulenmaterial ergab sich damit ein ähnliches Bild wie bei der Online-Festphasenextraktion (Abb. 71), da es sich in beiden Fällen um eine RP-Chromatographie handelt. Alle Substrate waren deutlich lipophiler als die Metaboliten und die verwendeten internen Standards. Sie wurden innerhalb der sechsminütigen Analysenzeit nicht von der Chromatographiesäule eluiert, weshalb in Anschluss an die chromatographische Trennung die Säule mit 100 % Acetonitril gespült wurde. Als interner Standard für eine quantitative Analyse sollte eine strukturverwandte Substanz verwendet werden, die vergleichbare physikalische und chemische Eigenschaften besitzt. Bei der durchgeführten Analyse wird davon ausgegangen, dass sich der Analyt und der interne Standard gleich verhalten, d. h. bei einer Probenaufbereitung dieselbe Wiederfindungsrate besitzt. Dies ist nur möglich, wenn es sich bei dem eingesetzten internen Standard um einen isotope markierten Analyten handelt. Isotopenmarkierte interne Standards, die hauptsächlich in der Massenspektrometrie eingesetzt werden, können aber bei einer HPLC-Analyse mit UV- oder Fluoreszenzdetektion nicht verwendet werden, da diese chromatographisch nicht von dem Analyten getrennt werden können. Somit muss auf strukturverwandte Substanzen zurückgegriffen werden. Solche Substanzen haben aber nur eingeschränkt vergleichbare Eigenschaften, was durch die Wiederfindungsexperimente bei der Online-Festphasenextraktion gezeigt werden konnte (s. o.). Die verwendeten internen Standards unterscheiden sich von den zu quantifizierenden Metaboliten in einer Methylgruppe. Durch die zusätzliche bzw. fehlende Methylgruppe ändern sich in den meisten Fällen die Fluoreszenz-

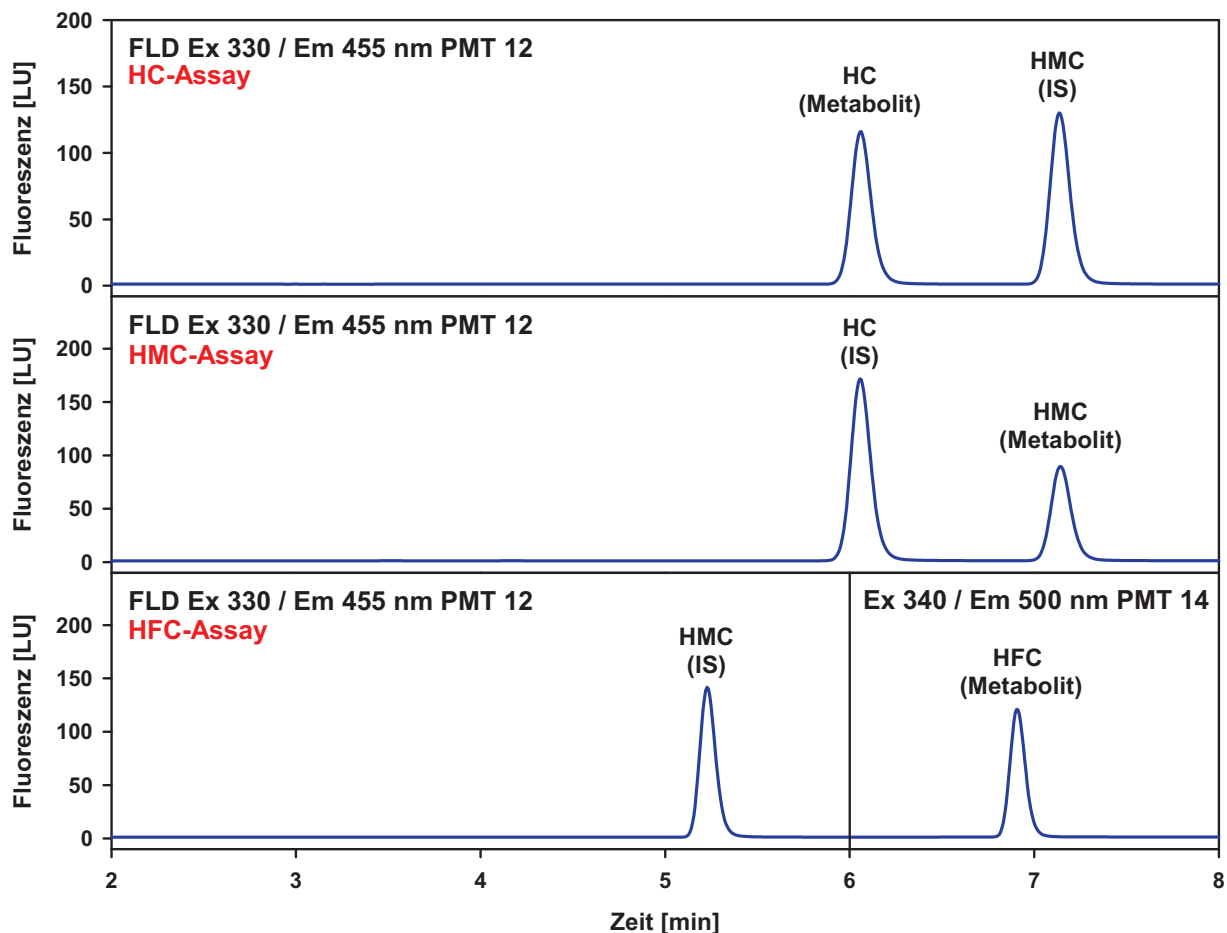


Abb. 72 LC/LC/Fluoreszenz-Chromatogramme zur Quantifizierung der aus den 7-Alkyloxycumarinen durch CYP-Enzyme entstehenden Metaboliten 7-Hydroxycumarin (HC), 7-Hydroxy-4-methylcumarin (HMC) und 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC).

eigenschaften kaum, so dass während des gesamten Laufes dieselben Einstellungen des Fluoreszenzdetektors gewählt werden konnten. Eine Ausnahme bildet der HFC-Assay, bei dem der Metabolit HFC eine längere Anregungs- und Fluoreszenzwellenlänge sowie eine schwächere Fluoreszenzintensität als der interne Standard HMC besitzt. Hierfür wurde der Chromatographielauf in zwei Zeitsegmente eingeteilt, in denen für jeden Analyten die optimalen Wellenlängen eingestellt werden konnten. Zur Steigerung des Messsignals von HFC wurde zusätzlich die Photonmultiplier-Tube-Spannung (PMT-Gain) in diesem Zeitsegment erhöht. Für HC und HMC wurden jeweils dieselben Anregungs- und Emissionswellenlängen verwendet. HFC besitzt durch die Trifluormethylsubstitution mit 500 nm die längste Emissionswellenlänge. Die schwächste Fluoreszenzintensität wurde für HFC erhalten, die u. a. auf den geringeren Absorptionskoeffizienten zurückgeführt werden kann (Tab. 16).

Zusätzlich fehlt der hyperchrome Effekt, da im sauren Fließmittel, in dem die phenolische Hydroxylgruppe ungeladen vorliegt, kein bathochromer Shift der Anregungswellenlänge erfolgt.

Überprüfung der Linearität

Zur Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit für die O-Dealkylierung der Cumarin-Derivate musste eine Kalibrierung der HPLC/Fluoreszenzanalysen mit den Referenzsubstanzen der Metaboliten durchgeführt (Abb. 73). Es wurden Kalibrierstandards im Inkubationspuffer durch Verdünnung der mit DMSO hergestellten Metabolitenstammlösung in einem Konzentrationsbereich von 0.25 ng/ml bis 100 ng/ml hergestellt. Die Quantifizierung wurde aufgrund der Proteinfällung und der Online-Festphasenextraktion mit Hilfe der internen Standardmethode durchgeführt. Hierzu wurde jeder Probe dieselbe interne Standardkonzentration von final 25 ng/ml mit der Stopplösung zugesetzt. Zur Erstellung der Kalibriergeraden (Abb. 73) wurden die Quotienten der Peakflächen des Metaboliten und des internen Standards von jeder Probe gebildet (Area Ratios).

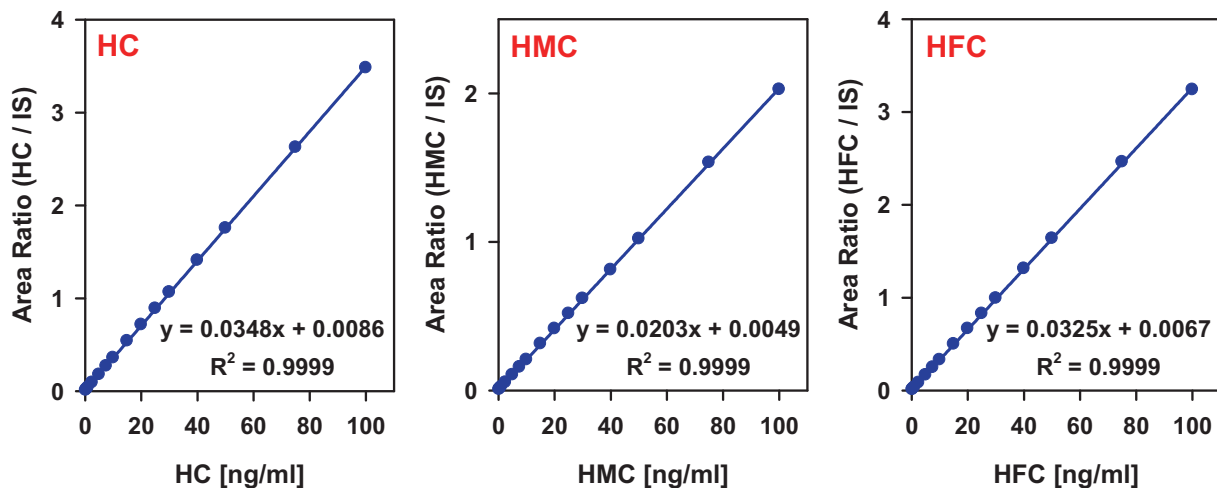


Abb. 73 Kalibrierung der LC/LC/Fluoreszenzanalyse (Inj. 50 μ l) mit den Standardsubstanzen der CYP-Metaboliten 7-Hydroxycumarin (HC), 7-Hydroxy-4-methylcumarin (HMC) und 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC). Bildung der Area Ratios aus den Peakflächen des Metaboliten und des jeweils zugesetzten internen Standards (IS; 25 ng/ml).

4.5 Metabolismus der 7-Alkyloxycumarin-Derivate durch CYP-Enzyme

4.5.1 Umsetzung mit Lebermikrosomen

4.5.1.1 LC/MS-Analysen

Von 7-Alkyloxycumarin-Derivaten ist bekannt, dass diese durch CYP-Enzyme zu mehreren Metaboliten umgesetzt werden.²⁷⁵ Um sämtliche aus den synthetisierten Cumarin-Derivaten durch CYP-Enzyme entstehenden Metaboliten detektieren zu können, wurden Inkubationen der Substrate (25 µM) mit humanen Lebermikrosomen mit Hilfe von LC/MS-Analysen im positiven Full-Scan Modus analysiert (s. V.1.1.3). Zusätzlich wurden die Peakflächen der Metaboliten mit Hilfe des UV-Signals bei 330 nm bestimmt, um die ungefähren Anteile der entstandenen Metaboliten abschätzen zu können. In Tab. 18 sind exemplarisch die Ergebnisse für die 7-Alkyloxy-4-methylcumarin-Derivate dargestellt. Neben den eingesetzten Substraten und dem jeweiligen O-Desalkylmetaboliten wurden v. a. Hydroxymetaboliten (Molekülspezies $[M+O+H]^+$) detektiert. Es ist ersichtlich, dass mit steigender Kettenlänge der Alkylreste die Anzahl der gebildeten Hydroxymetaboliten steigt.

Tab. 18 LC/MS-Analysen der Inkubationen von 7-Methoxy-4-methylcumarin (MMC), 7-Ethoxy-4-methylcumarin (EMC), 7-Propyloxy-4-methylcumarin (ProMC), 7-Butyloxy-4-methylcumarin (BuMC), 7-Pentyloxy-4-methylcumarin (PenMC) und 7-Benzoyloxy-4-methylcumarin (BMC) mit humanen Lebermikrosomen. (Säule: Synergi Max-RP (150 x 4.6 mm; 4 µm), Fließmittel: 0.1 % Ameisensäure (A) / Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure (B); Gradient: 25 – 100 % B in 15 min; Flussrate 0.8 ml/min; Detektion: Full Scan positiv, UV 330 nm).

Substrat	Anzahl detektierter Metaboliten	Retentionszeit (<i>m/z</i> -Wert)	Anteil O-Desalkylmetabolit [%]
MMC	3	5.8 (207) ^a , 6.1 (177) ^b , 8.7 (n. d.), 8.9 (191) ^c	22
EMC	4	5.8 (n. d.), 6.1 (177) ^b , 7.1 (221) ^a , 10.0 (221) ^a , 10.3 (205) ^c	6
ProMC	5	6.1 (177) ^b , 6.4 (n. d.), 6.5 (235) ^a , 8.6 (235) ^a , 11.4 (235) ^a , 11.7 (219) ^c	1.4
BuMC	> 5	6.1 (177) ^b , 7.3 (249) ^a , 7.5 (249) ^a , 7.8 (249) ^a , 9.9 (249) ^a , 13.0 (233) ^c	0.9
PenMC	> 5	6.1 (177) ^b , 8.2 (263) ^a , 8.8 (263) ^a , 14.2 (247) ^c	< 0.1
BMC	3	6.1 (177) ^b , 9.6 (283) ^a , 12.0 (n. d.), 12.3 (267) ^c	46

^a Hydroxymetabolit; ^b O-Desalkylmetabolit; ^c Substrat; n. d., kein *m/z*-Wert detektierbar

Zusätzlich nimmt der Anteil des O-Desalkylmetaboliten, bezogen auf alle detektierten Metaboliten, mit steigender Kettenlänge ab, so dass der O-Desalkylmetabolit nicht der Hauptmetabolit sein muss. Der größte Anteil des O-Desalkylmetaboliten konnte bei den Methoxy- und den Benzyloxy-Derivaten festgestellt werden.

4.5.1.2 O-Dealkylierung

Um die Umsetzung der synthetisierten 7-Alkyloxcumarin-Derivate zu den entsprechenden 7-Hydroxy-Derivaten zu untersuchen, wurden drei Konzentrationen (1, 10, 100 μM) der Substrate mit humanen bzw. Rattenlebermikrosomen inkubiert. Anschließend wurden mit den oben beschriebenen LC/LC/Fluoreszenzmethoden die Metabolitenkonzentrationen bestimmt und die Umsetzungsgeschwindigkeiten für die einzelnen Substrate ermittelt. Mit Rattenlebermikrosomen wurde zunächst ein Anstieg der Umsetzungsgeschwindigkeit mit der Kettenlänge beobachtet (Abb. 74). Bei einer Substratkonzentration von 100 μM wurde die größte Umsetzungsgeschwindigkeit bei einer Kettenlänge von C4 (HC-Derivate) bzw. C2 (HFC-Derivate) erhalten. Für die HC-Derivate wurde dies bereits in der Literatur beschrieben.^{275,276} Im Gegensatz dazu wurde mit humanen Lebermikrosomen für alle Grundstrukturen eine Abnahme der Aktivität mit steigender Länge der Alkylkette beobachtet (Abb. 74). Die höchsten Aktivitäten wurden daher für die Demethylierung, die Deethylierung und die Debenzylierung festgestellt (Abb. 74). Die Umsetzung der Propyloxy-, Butyloxy- und Pentyloxy-Derivate war so gering, dass auf eine weitere Untersuchung mit rekombinanten CYP-Enzymen verzichtet wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass durch Untersuchungen des Metabolismus an Labortieren, wie z. B. Ratten, nicht automatisch auf den Metabolismus beim Menschen geschlossen werden kann. Durch die Inkubation von drei Substratkonzentrationen können Hinweise auf den Konzentrationsbereich erhalten werden, in welchem die Michaelis-Menten-Konstante (K_m -Wert) liegt. Beispielsweise ist die Debenzylierung von 7-Benzyloxcumarin (BC) durch HLM bereits bei 10 μM gesättigt, während die Geschwindigkeit für die Debenzylierung von 7-Benzyloxy-4-methylcumarin (BMC) bei Erhöhung der Substratkonzentration von 10 auf 100 μM deutlich ansteigt. In diesem Fall kann zum einen ein hoher K_m -Wert vorliegen oder mehrere CYP-Enzyme an der Umsetzung beteiligt sein, wobei diese unterschiedliche K_m -Werte besitzen müssen, so dass mit steigender Konzentration immer mehr CYP-Enzyme die Substrate metabolisieren.

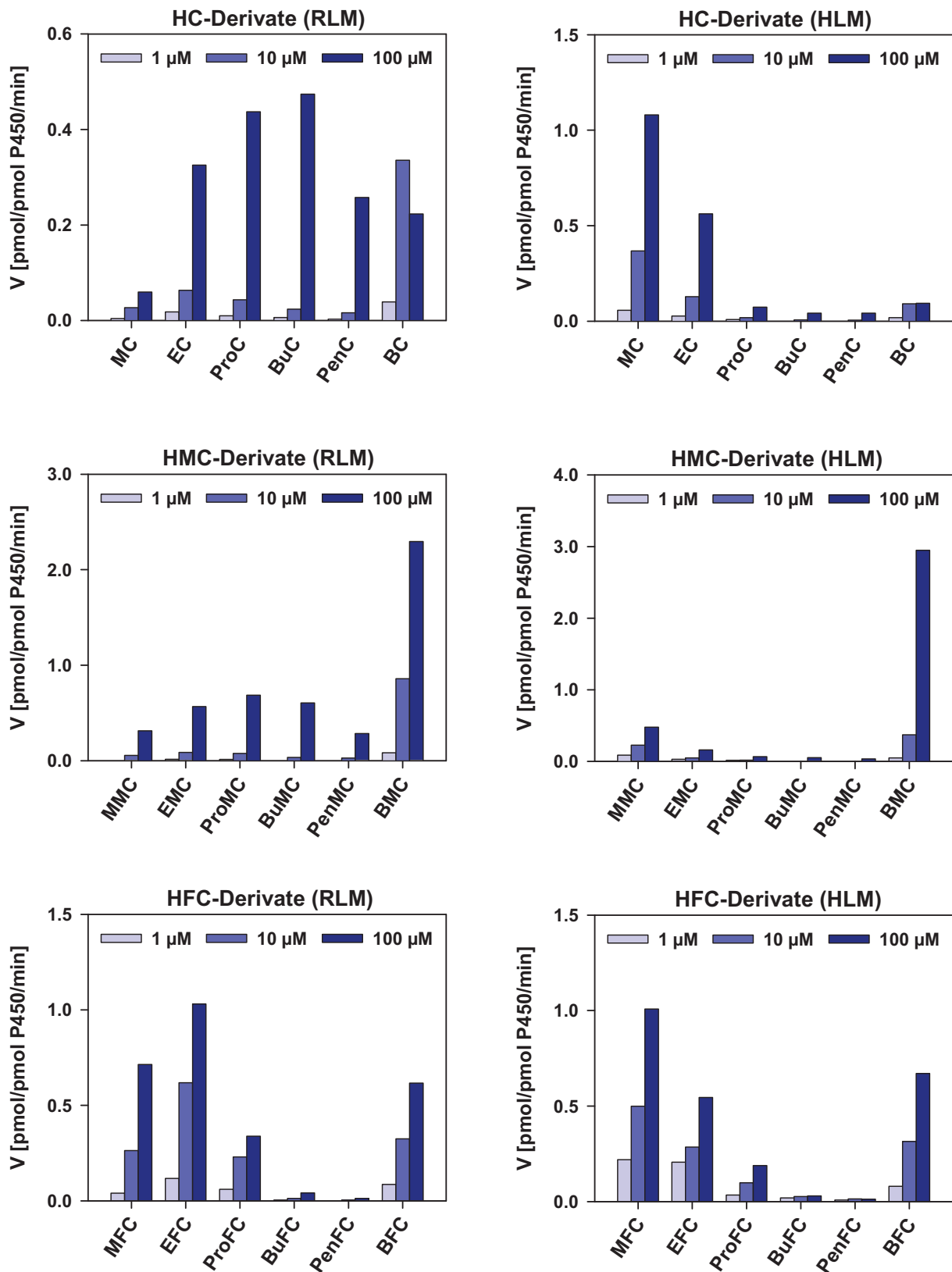


Abb. 74 Aktivitäten für die O-Dealkylierung der 7-Alkyloxycumarine (HC-Derivate, oben), 7-Alkyloxy-4-methylcumarine (HMC-Derivate, Mitte) und 7-Alkyloxy-4-trifluormethylcumarine (HFC-Derivate, unten) durch CYP-Enzyme aus Mikrosomen von männlichen Sprague Dawley Ratten (RLM, links) und gepoolten humanen Lebermikrosomen (HLM, rechts).

4.5.2 Identifizierung der CYP-Enzyme für die O-Dealkylierung

Für die 7-Methoxy-, 7-Ethoxy- und 7-Benzoyloxy-Cumarin-Derivate, die bei der Untersuchung mit den humanen Lebermikrosomen (s. II.4.5.1) die höchste Aktivität besaßen, sollen im Folgenden die CYP-Enzyme identifiziert werden, die für die O-Dealkylierung verantwortlich sind. Hierfür wurden drei verschiedene Konzentrationen (1, 10, 100 μM) der Substrate mit humanen rekombinanten CYP-Enzymen inkubiert und jeweils die Umsetzungsgeschwindigkeit ermittelt.

7-Alkyloxcumarine (HC-Derivate)

Bei der Umsetzung von 7-Methoxycumarin (MC) mit rekombinanten CYP-Enzymen zeigte CYP1A2 die stärkste Aktivität (Abb. 75). Die O-Demethylierung wird ebenfalls durch CYP2A6, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6 und CYP2E1 katalysiert, zu denen das Substrat allerdings eine geringere Affinität besitzt. Die O-Deethylierung von 7-Ethoxycumarin (EC) wird durch dieselben CYP-Enzyme, die auch MC metabolisieren, katalysiert (Abb. 75). Die Umsetzungsgeschwindigkeit für CYP1A2 ist aber wesentlich kleiner und der Anteil der anderen CYP-Enzyme daher höher. Bei geringen EC-Konzentrationen erfolgt die O-Deethylierung v. a. durch CYP1A2. Im Vergleich dazu ist die Affinität zu CYP2B6 und CYP2E1 geringer, was mit den Literaturangaben übereinstimmt.²⁷⁷ Die O-Debenzylierung von 7-Benzoyloxcumarin (BC) wird hauptsächlich durch CYP1A2, CYP2C19 und durch CYP3A4 katalysiert (Abb. 75). Für alle anderen CYP-Enzyme ist die Umsetzungsgeschwindigkeit wesentlich geringer. Bei den meisten Enzymen ist ein Rückgang der Umsetzungsgeschwindigkeit bei einer Erhöhung der Substratkonzentration von 10 μM auf 100 μM zu beobachten. Es liegt daher eine Substratinhibitionskinetik vor.

7-Alkyloxy-4-methylcumarine (HMC-Derivate)

7-Methoxy-4-methylcumarin (MMC) wird durch CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6 und CYP2E1 umgesetzt (Abb. 75). Der niedrigste K_m -Wert liegt bei CYP1A2 vor, während bei den anderen CYP-Enzymen ein starker Anstieg der Umsetzungsgeschwindigkeit bei einer Erhöhung der Substratkonzentration von 10 auf 100 μM auftritt. Bei einer Substratkonzentration von 100 μM besaßen alle oben genannten CYP-Enzyme eine vergleichbare Aktivität, die bei etwa 1.5 pmol/pmol P450/min lag (Abb. 75). Die Deethylierung von 7-Ethoxy-4-

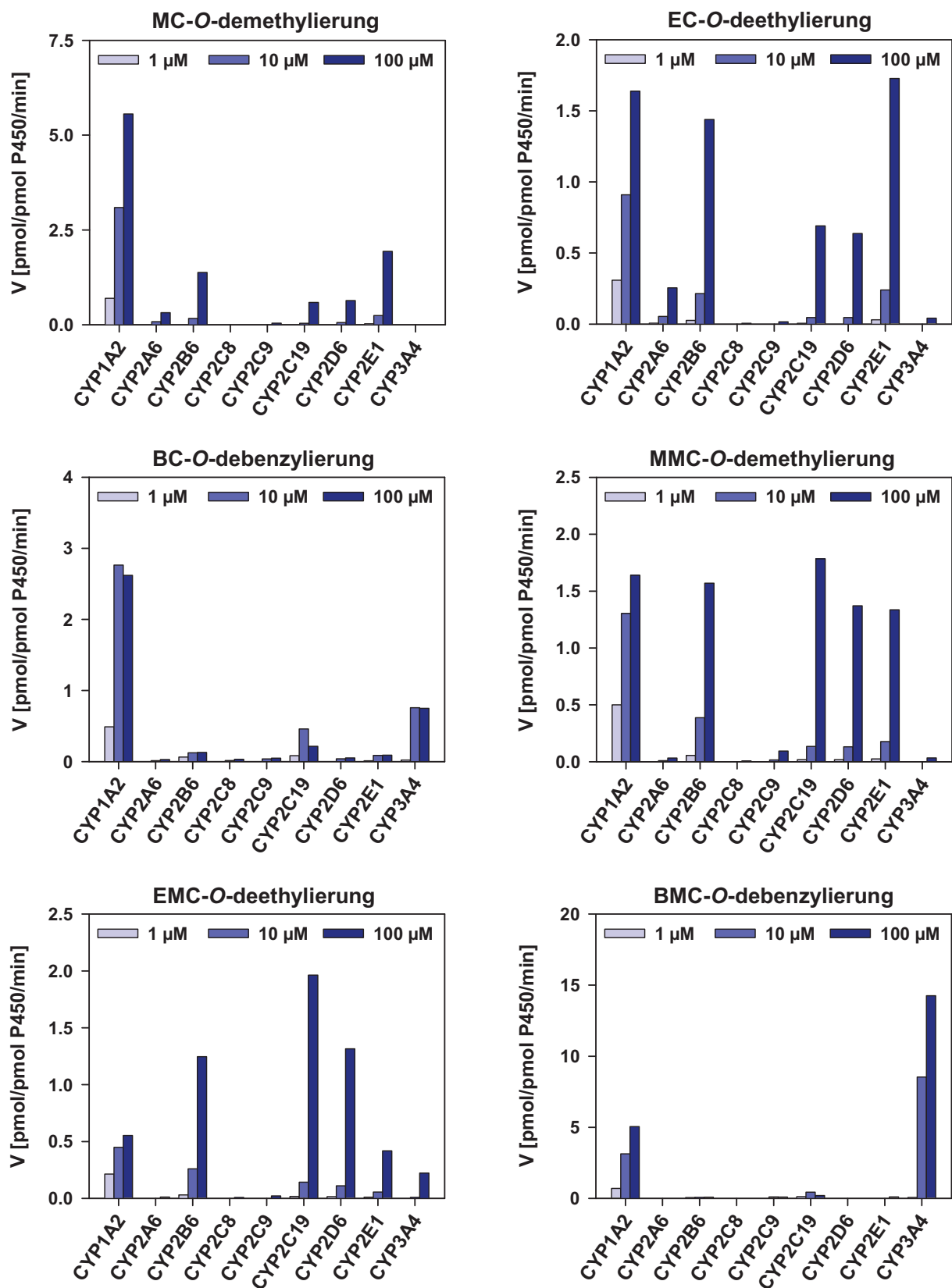


Abb. 75 Aktivitäten einzelner rekombinanter CYP-Enzyme für die O-Dealkylierung von 7-Methoxycumarin (MC), 7-Ethoxycumarin (EC), 7-Benzyloxycumarin (BC), 7-Methoxy-4-methylcumarin (MMC), 7-Ethoxy-4-methylcumarin (EMC) und 7-Benzyloxy-4-methylcumarin (BMC).

methylcumarin (EMC) katalysieren dieselben CYP-Enzyme, die für die Demethylierung von MMC verantwortlich sind (Abb. 75). Die Aktivitäten dieser CYP-Enzyme sind bei Verwendung beider Substrate prinzipiell vergleichbar. Nur für CYP1A2, für das die Affinität auch hier im Vergleich zu den anderen CYP-Enzymen am höchsten ist, wurde eine geringere Umsetzungsgeschwindigkeit festgestellt, die etwa 1/3 der Geschwindigkeit der Demethylierung von MMC beträgt. Die Debenzylierung von 7-Benzyloxy-4-methylcumarin (BMC) wird ebenso wie die Debenzylierung von BC nahezu ausschließlich durch CYP1A2 und CYP3A4 katalysiert (Abb. 75). Die Umsetzungsgeschwindigkeiten für BMC sind aber wesentlich höher und es trat im untersuchten Konzentrationsbereich für diese CYP-Enzyme im Gegensatz zur Debenzylierung von BC keine Substratsättigung auf. Im Vergleich zu BC ist CYP3A4 hier das CYP-Enzym mit der höchsten Aktivität. Weiterhin sind die Umsetzungsgeschwindigkeiten für die Debenzylierung von BMC im Vergleich zu den Dealkylierungen von MMC und EMC erheblich höher.

7-Alkyloxy-4-trifluormethylcumarine (HFC-Derivate)

Bei der Demethylierung von 7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin (MFC) wurden für CYP1A2 und CYP2B6 die höchsten Umsetzungsgeschwindigkeiten festgestellt (Abb. 76). Diese CYP-Enzyme besitzen selbst bei geringen MFC-Konzentrationen im Vergleich zu CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 und CYP2E1 eine hohe Aktivität. Die Aktivität von CYP2C9, wofür MFC hauptsächlich als Substrat zur Untersuchung der Inhibition bei mikrotiterplattenbasierten Assays eingesetzt wird, ist im Vergleich zu CYP1A2 und CYP2B6 gering. MFC kann somit ebenfalls für Inhibitionsuntersuchungen dieser CYP-Enzyme verwendet werden. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in letzter Zeit in der Literatur beschrieben.^{278,279}

Die Deethylierung von 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin (EFC) und 7-Propyloxy-4-trifluormethylcumarin (ProFC) wird ebenfalls in erster Linie durch CYP1A2 und CYP2B6 katalysiert (Abb. 76), was für EFC bereits aus der Literatur bekannt ist.²⁸⁰ Darüber hinaus werden diese Substanzen stärker durch CYP2C19 umgesetzt als MFC (Abb. 76). Die höchste Affinität besitzen diese Substrate zu CYP1A2, während mit CYP2B6 die höchsten Umsetzungsgeschwindigkeiten gemessen wurden.

7-Benzyloxy-4-trifluormethylcumarin (BFC) wird hauptsächlich für Inhibitionsuntersuchungen von CYP3A4 eingesetzt. Bei der Inkubation des Substrates mit rekombinanten CYP-Enzymen konnte zusätzlich eine hohe Aktivität von CYP1A2

festgestellt werden (Abb. 76). Für CYP3A4 steigt die Umsetzungsgeschwindigkeit bei der Erhöhung der Substratkonzentration von 10 auf 100 μM etwa um das Fünffache an, während mit CYP2C19 bereits bei 10 μM eine Sättigung eingetreten ist (Abb. 76). Somit besitzt BFC eine wesentlich höhere Affinität zu CYP1A2 und CYP2C19 als zu CYP3A4, mit dem allerdings eine höhere maximale Umsetzungsgeschwindigkeit vorliegt. Ähnliche Angaben zu BFC lassen sich in der Literatur finden.²⁸¹ BFC wird durch CYP3A4 langsamer debenzylisiert als BMC (Abb. 75). Weiterhin lässt sich erkennen, dass die Debenzylierung von BFC durch CYP1A2 wesentlich schneller erfolgt als die Dealkylierungen der Substrate MFC und EFC (Abb. 76).

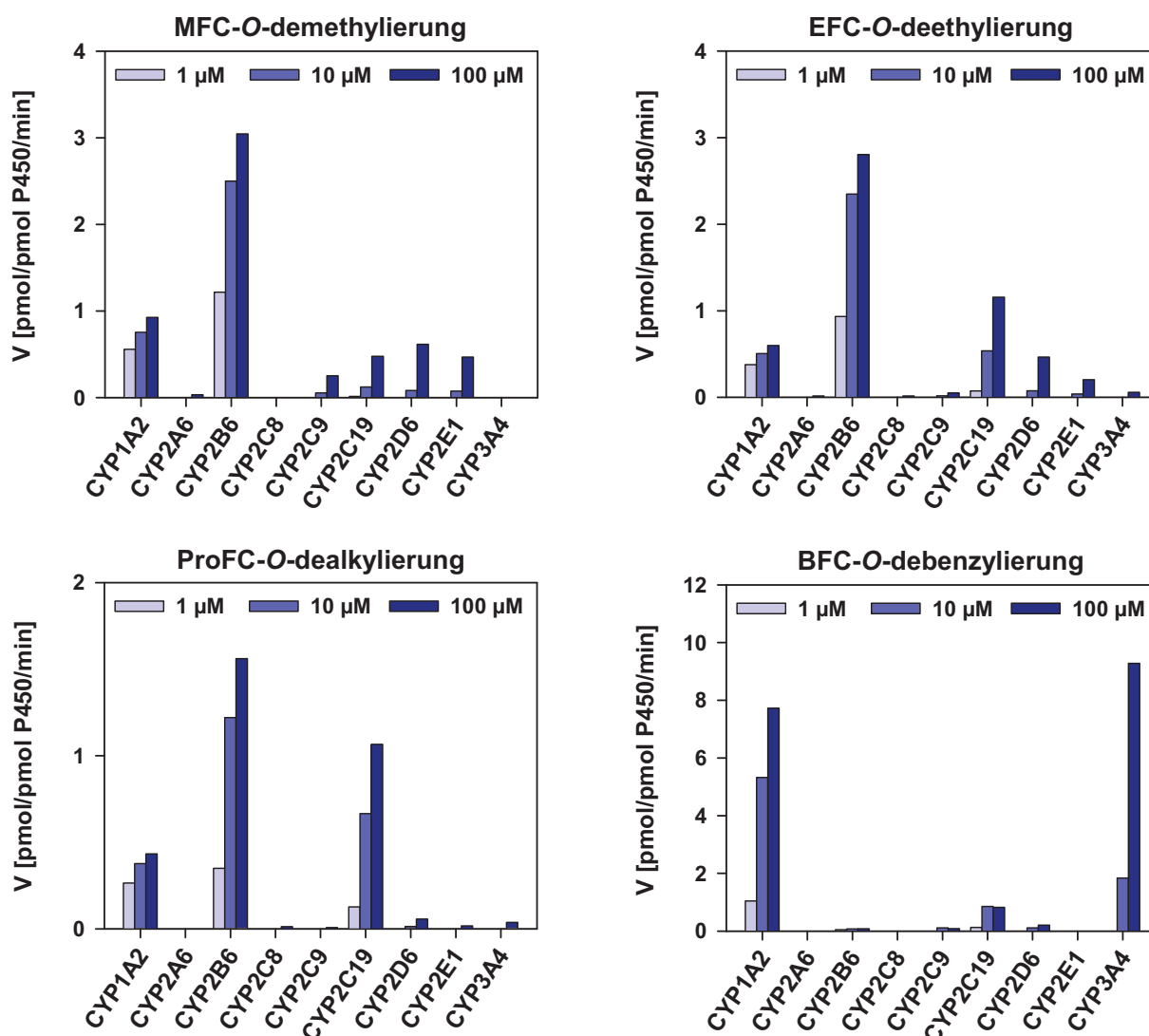


Abb. 76 Aktivitäten einzelner rekombinanter CYP-Enzyme für die O-Dealkylierung von 7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin (MFC), 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin (EFC), 7-Propoxy-4-trifluormethylcumarin (ProFC) und 7-Benzyloxy-4-trifluormethylcumarin (BFC).

5 Charakterisierung von Harman-Derivaten als neue In-vitro-Fluoreszenzsubstrate für CYP-Inhibitionsassays

5.1 Harman-Derivate

Harmane besitzen einen trizyklischen Heterozyklus, das 2-Methyl- β -carbolin, und gehören zu den Indolalkaloiden. Einige Derivate kommen als Sekundärstoffe in Pflanzen, wie z. B. der Steppenraute (*Peganum harmala*), die in der traditionellen chinesischen Medizin seit über 2000 Jahren Anwendung findet, vor. Biosynthetisch erfolgt der Ringschluss zum Harmalan in einer mannichartigen Reaktion des Tryptamins, was dabei als Amin- und Methylenkomponente fungiert, mit Pyruvat, das die erforderliche Carbonylfunktion besitzt (Abb. 77). Häufig tragen solche Substanzen in Position 7 eine Hydroxy- oder Methoxyfunktion, was zu den Alkaloiden Harmalol und Harmalin führt. Nach der Aromatisierung zum β -Carbolin-Ring werden die Harman-Derivate Harmol und Harmin erhalten (Abb. 77).

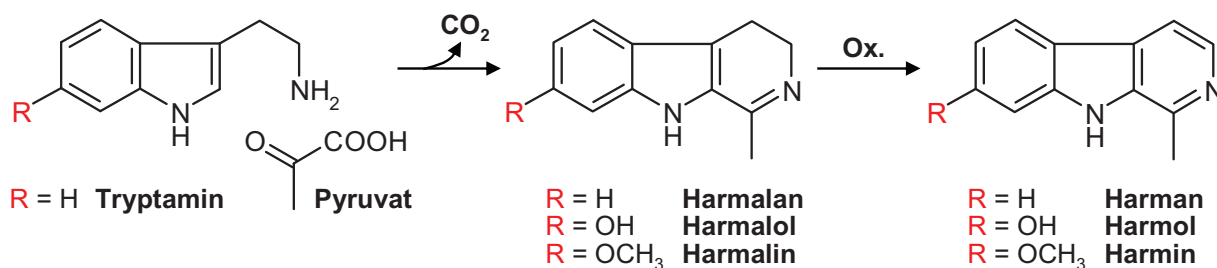


Abb. 77 Biosynthese von Harmalan- und Harmanalkaloiden.

Harman-Derivate zeigen bei Anregung mit UV-Licht eine intensive blaue bis gelbliche Fluoreszenz und können daher empfindlich mit Hilfe der Fluoreszenzdetektion analysiert werden. Derivate mit einer Alkyloxygruppe in Position 7 werden durch CYP-Enzyme dealkyliert, wodurch eine freie phenolische Hydroxylgruppe entsteht. Aufgrund der ausgeprägten Fluoreszenzeigenschaften bietet sich das Harman-Ringsystem als Leitstruktur für die Entwicklung von neuen In-vitro-Substraten zur Untersuchung der Inhibition von CYP-Enzymen an. Da die Demethylierung der natürlichen Derivate, Harmalin und Harmin, durch eine Reihe von CYP-Enzymen erfolgt, müssen Molekülveränderungen vorgenommen werden.²⁸² Ziel dabei ist es, selektive Substrate zu erhalten, die nur durch eines oder wenige CYP-Enzyme metabolisiert werden und eine hohe maximale Umsetzungsgeschwindigkeit

aufweisen, um Inhibitionsassays kostengünstig gestalten zu können. Zu diesem Zweck wurden im Arbeitskreis durch A. Frank, L. Schaefflein und M. Unger eine Reihe von Harman-Derivaten hergestellt. Als Molekülveränderungen wurden v. a. Methylierungen und Benzylierungen vorgenommen. Um eine hohe Reinheit der Substanzen zu erhalten und die häufig ebenfalls entstehenden Isomere abzutrennen, isolierten sie die Substanzen v. a. mit Hilfe der präparativen HPLC aus dem Syntheseansatz. Es wurden jeweils das Substrat und der dazugehörige O-Desalkylmetabolit synthetisiert, was eine exakte Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit ermöglicht. Zur Strukturaufklärung führten sie NMR-spektroskopische Untersuchungen durch.

Im Folgenden wurden einige dieser Harman-Derivate bezüglich der Biotransformation durch CYP-Enzyme untersucht (Abb. 78). Die Demethylierung des natürlichen Harmins führt zum Harmol (Harmin-Assay). 2-Benzyl-7-benzyloxyharman (BBH) wird zu 2-Benzyl-7-hydroxyharman (BHH) debenzyliert (BBH-Assay). Aus dem Substrat 2-Benzyl-7-methoxyharman (BMH) entsteht ebenfalls der Metabolit BHH (BMH-Assay). 7-Methoxy-9-(4-carboxybenzyl)harman (MCBH) wird zu 7-Hydroxy-9-(4-carboxybenzyl)harman (HCBH) demethyliert (MCBH-Assay). Das letzte untersuchte Substrat ist 2-Methyl-7-methoxyharman (MMH), das zu 2-Methyl-7-hydroxyharman (MHH) demethyliert wird (Abb. 78). Für die Detektion der dabei entstehenden O-Desalkylmetaboliten ist eine Reihe von analytischen Methoden denkbar. Aufgrund der ausgeprägten Fluoreszenzeigenschaften lassen sich diese Substanzen im für CYP-Assays typischen Konzentrationsbereich von 1 bis 100 ng/ml problemlos mit Hilfe der HPLC/Fluoreszenzanalyse quantifizieren. Aufgrund der Tatsache, dass die Metaboliten im Gegensatz zu den Substraten eine freie phenolische Hydroxylgruppe besitzen, ist ebenfalls eine selektive fluorimetrische Bestimmung in der Mikrotiterplatte nach dem Alkalisieren der Probe denkbar. Schließlich lassen sich die basischen bzw. quarternären Metaboliten mit Hilfe der LC/MS-Analyse im positiven Modus als $[M+H]^+$ - bzw. als $[M]^+$ -Ionen wesentlich empfindlicher detektieren als die häufig in CYP-Inhibitionsassays eingesetzten Cumarin-Derivate (s. II.4.1). Zur Quantifizierung der entsprechenden O-Desalkylmetaboliten wurden für jedes Substrat jeweils eine LC/LC/Fluoreszenz- (s. II.5.2) und eine LC/MS/MS-Methode (s. II.5.3) entwickelt. In den folgenden Untersuchungen wurden die CYP-Enzyme identifiziert, die für die O-Dealkylierung dieser Substrate

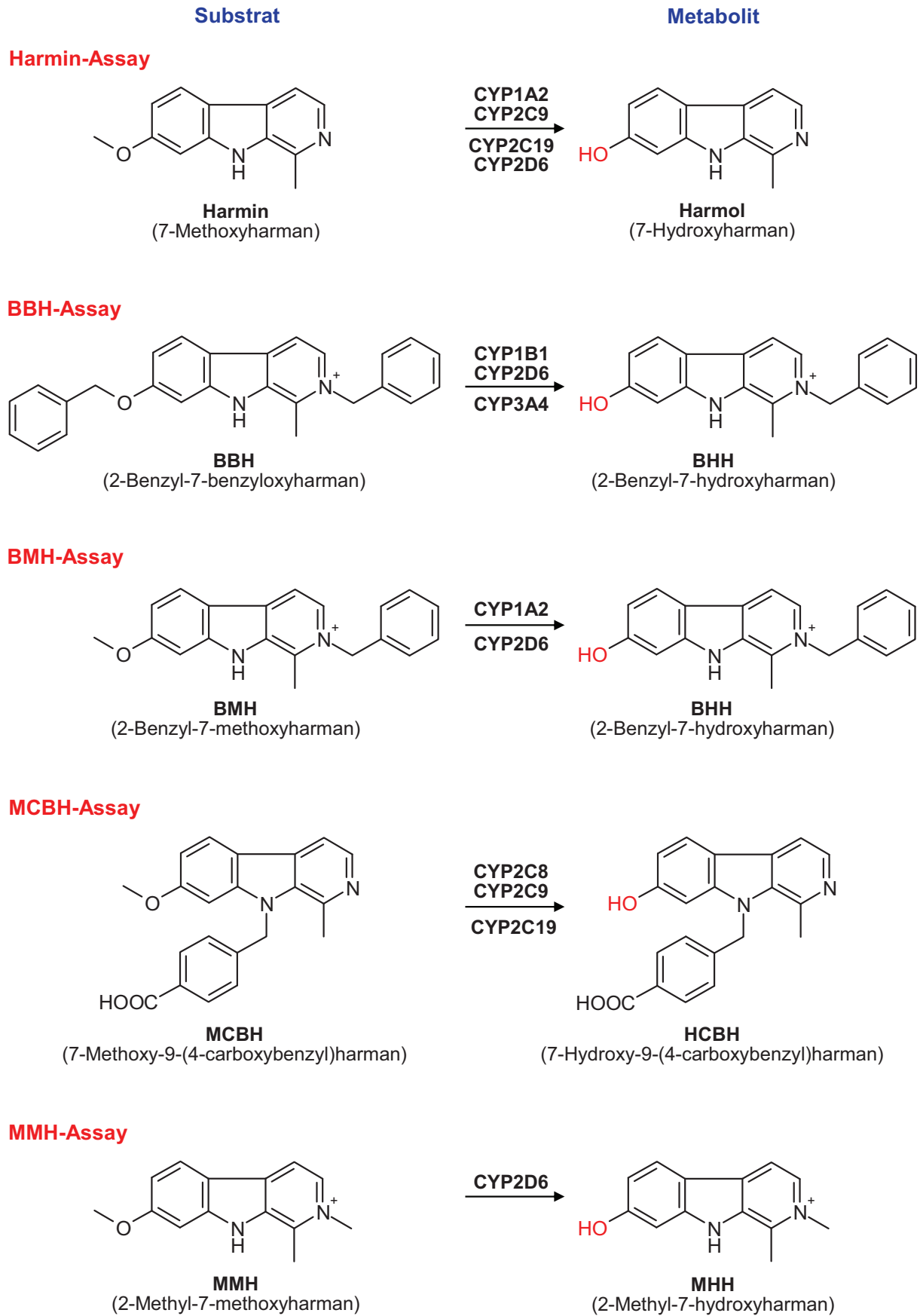


Abb. 78 Metabolismus der Harman-Derivate durch CYP-Enzyme.

verantwortlich sind (s. II.5.4) und die K_m - und V_{max} -Werte für ausgewählte CYP-Enzyme bestimmt (s. II.5.5). Anschließend wurden die IC_{50} -Werte von CYP-Standardinhibitoren ermittelt (s. II.5.6), um die Eignung der neuen Substrate für CYP-Inhibitionsassays zu überprüfen.

5.2 LC/LC/Fluoreszenzmethoden zur Quantifizierung der Metaboliten

Die HPLC/Fluoreszenzanalyse der Harman-Derivate wurde mit vorgeschalteter automatischer Online-Festphasenextraktion durchgeführt. Wichtig dabei ist, dass die Analyten auf der Extraktionssäule angereichert werden. Aus diesem Grund wurden die Ladefließmittelzusätze und die Methanolkonzentrationen für die Extraktion variiert. Als Ladefließmittelzusätze wurden 0.1 % Ameisensäure, 0.05 % Trifluoressigsäure und 10 mM Ammoniumacetat mit 0.1 % Trifluoressigsäure verwendet und die jeweiligen Wiederfindungsraten bestimmt (Abb. 79). Die Analyten Harmol, Harmin und HCBH besitzen einen basischen Pyridinstickstoff, der im sauren Fließmittel protoniert vorliegt, während dieser Stickstoff bei BBH, BMH und MHH durch die Alkylierung eine permanent positive Ladung trägt (Abb. 78). Im Ladefließmittel mit 0.1 % Ameisensäure besaßen die Analyten die schlechteste Retention, d. h. die Wiederfindungsrate sinkt bereits bei niedrigen Methanolkonzentrationen ab. Durch Trifluoressigsäure kann die Retention aufgrund der Ausbildung von Ionenpaaren mit den positiv geladenen Harman-Derivaten gesteigert werden. Die Erhöhung des pH-Wertes nach der Zugabe von Ammoniumacetat verstärkte diesen Effekt bei einigen Analyten (Abb. 79). Folglich wurde 10 mM Ammoniumacetat mit 0.1 % Trifluoressigsäure als Ladefließmittel für die Harman-Assays verwendet. Um eine Wiederfindungsrate der Analyten von nahezu 100 % zu erhalten, wurden für den BBH-Assay 15 % und für alle anderen Assays 5 % Methanol gewählt. Dennoch waren die Unterschiede in der Retention bei Verwendung der einzelnen Ladefließmittelzusätze kleiner als die Unterschiede zwischen den einzelnen Analyten (Abb. 79). Für die sich an die Extraktionsphase anschließende Trennung mittels RP-Chromatographie wurden 0.1 % Ameisensäure (A) und Methanol (B) als Fließmittel verwendet, wobei kein Ionenpaareffekt auftritt und sich die Retention gegenüber der Extraktion verschlechtert. Dabei verschieben sich die Peaks in ein früheres Retentionszeitfenster, in dem durch die Online-

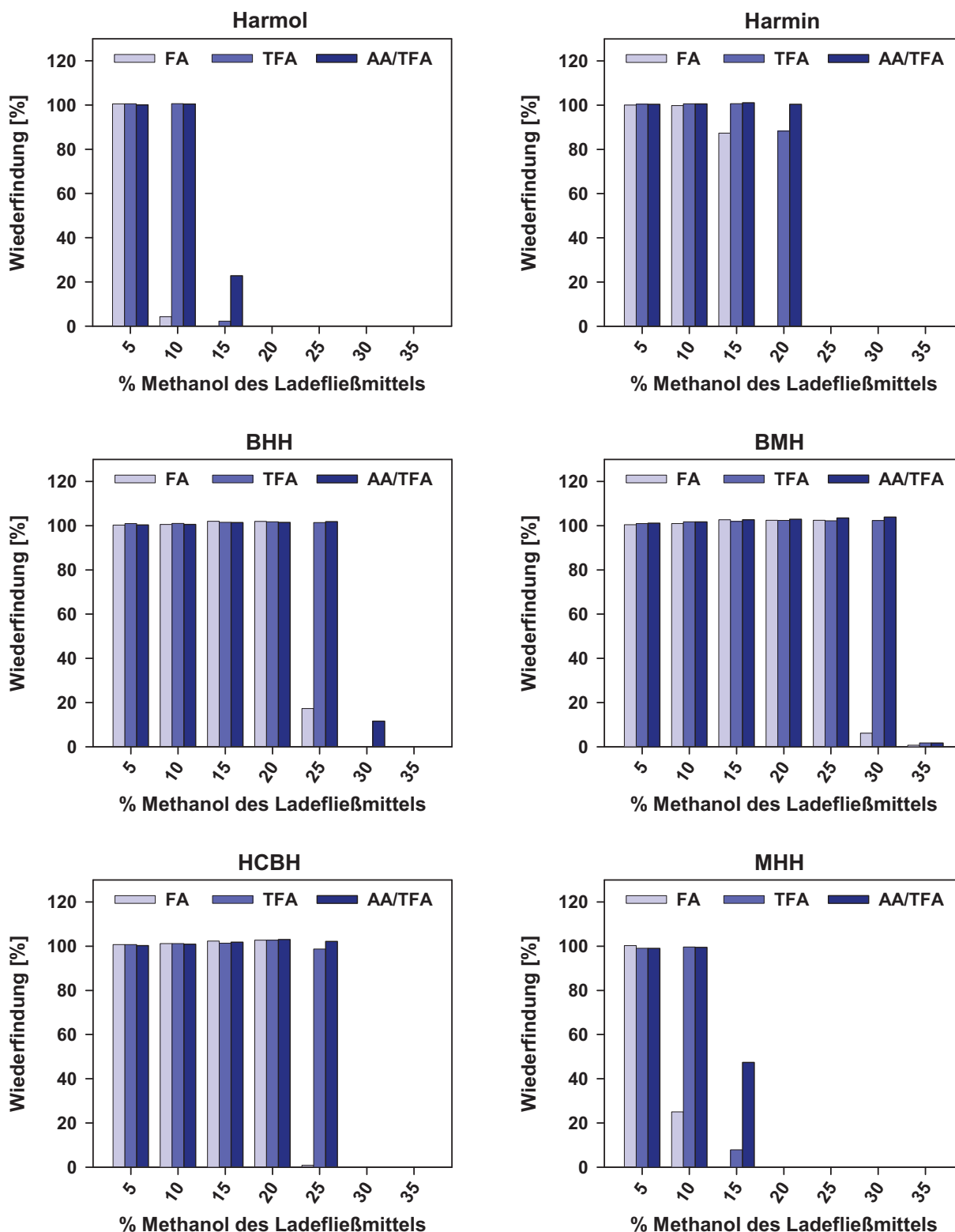


Abb. 79 Wiederfindungsraten der Harman-Analyten bei der automatischen Online-Festphasenextraktion (Extraktionssäule: Zorbax SB-Aq, 12.5 x 4.6 mm, 5 µm; Flussrate: 3 ml/min; Ladezeit: 2 min) mit unterschiedlichen Ladefließmittelzusätzen (0.1 % Ameisensäure, FA; 0.05 % Trifluoressigsäure, TFA; 10 mM Ammoniumacetat mit 0.1 % Trifluoressigsäure, AA/TFA). 2-Benzyl-7-hydroxyharman (BHH), 2-Benzyl-7-methoxyharman (BMH), 7-Hydroxy-9-(4-carboxybenzyl)harman (HCBH), 2-Methyl-7-hydroxyharman (MHH).

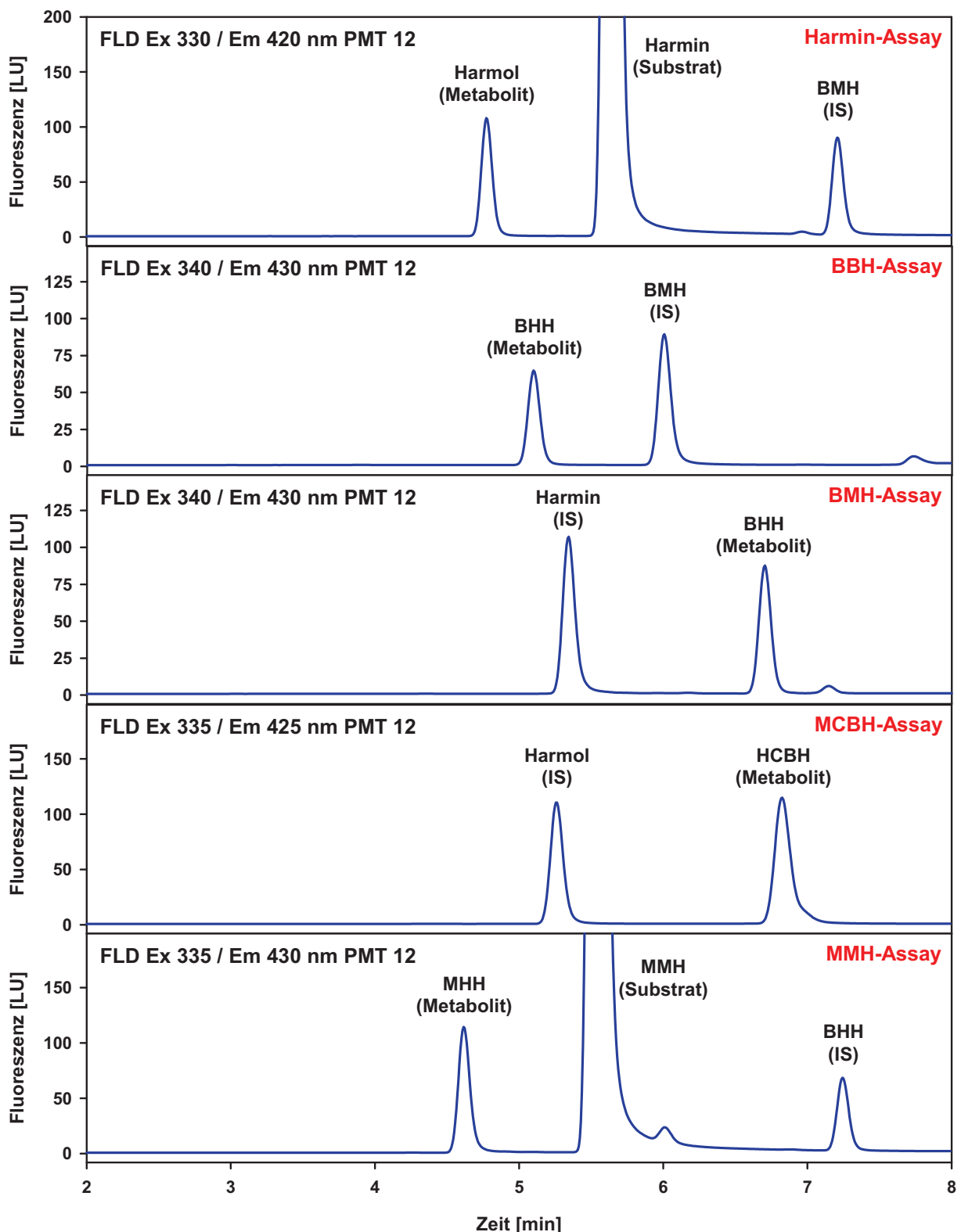


Abb. 80 LC/LC/Fluoreszenz-Chromatogramme der Kontrollinkubationen rekombinanter CYP-Enzyme mit den Substraten Harmin (CYP2D6), 2-Benzyl-7-benzoyloxyharman (BBH; CYP3A4), 2-Benzyl-7-methoxyharman (BMH; CYP1A2), 7-Methoxy-9-(4-carboxybenzyl)harman (MCBH; CYP2C9) und 2-Methyl-7-methoxyharman (MMH; CYP2D6). 2-Benzyl-7-hydroxyharman (BHH), 7-Hydroxy-9-(4-carboxybenzyl)harman (HCBH), 2-Methyl-7-hydroxyharman (MHH).

Festphasenextraktion neutrale und negativ geladene Matrixbestandteile entfernt wurden. Es können so saubere Chromatogramme erhalten werden und eine hohe Empfindlichkeit der Methode erzielt werden. Der Gradient für die chromatographische Trennung wurde so gewählt, dass der Metabolit und der interne Standard innerhalb einer Laufzeit von 6 min eluierten (Abb. 80). Beim Harmin- und beim MMH-Assay besaßen die Substrate eine Retentionszeit zwischen dem Metabolit und dem internen Standard, während bei allen anderen Assays die Substrate nicht innerhalb der Chromatographiezeit eluierten. Aus diesem Grund wurde bei jeder Injektion die Säule im Anschluss an die Chromatographie mit reinem Lösungsmittel gespült. Da die Probenkonzentration des Substrates wesentlich höher ist als die des zu quantifizierenden Metaboliten, wurde beim Substrat die Detektorgrenze überschritten und es trat ein Tailing des Substratpeaks auf, so dass die Basislinie erst nach etwa 1.5 min erreicht wurde. Somit musste ein ausreichend lipophiler interner Standard und ein steilerer Gradient für die Chromatographiezeit von 6 min gewählt werden. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen für die Fluoreszenzdetektion wurden bei jedem Assay für die entsprechenden Metaboliten optimiert. Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit der Harman-Derivate ergaben sich für die Detektionswellenlängen und die Empfindlichkeit kaum Unterschiede. Substanzen mit freier phenolischer Hydroxylgruppe wurden aufgrund des im sauren Fließmittel fehlenden bathochromen Shifts bei derselben Wellenlänge detektiert, wie die O-Alkyl-Derivate.

5.3 LC/MS/MS-Methoden zur Quantifizierung der Metaboliten

Neben der LC/LC/Fluoreszenzanalyse wurden Methoden für eine massenspektrometrische Quantifizierung der Metaboliten entwickelt, wofür sich an den Assays mit den Standardsubstraten orientiert wurde (s. II.3.1). Die Säule und das Fließmittel brauchten nicht verändert zu werden. Der Fließmittelgradient wurde so angepasst, dass der Metabolit und der interne Standard innerhalb einer Laufzeit von 4 min eluierten. Es konnten dieselben internen Standards wie bei den LC/LC/Fluoreszenzassays (s. II.5.2) verwendet werden. Für die basischen bzw. quarternären Analyten war die positive Polarität besonders geeignet. Die Bedingungen zur Detektion von jeweils einem Qualifier- und einem Quantifier-Ion im MRM-Modus wurden optimiert. Zur Überprüfung der Linearität wurde eine

Kalibrierung mit Hilfe der Metaboliten durchgeführt. Durch die Einteilung der Analyse in einzelne Zeitsegmente, in denen das Massenspektrometer auf die Detektion der Übergänge des Metaboliten und des internen Standards eingestellt wurde, ermöglichte eine Anpassung der Elektronenmultiplierspannungen, da die Analyten eine unterschiedliche Empfindlichkeit besaßen.

5.4 Aktivität einzelner CYP-Enzyme für die O-Dealkylierung

Für die einzelnen Harman-Derivate wurde die Umsetzungsgeschwindigkeit zu ihren O-Desalkylmetaboliten für einzelne CYP-Enzyme bei einer Substratkonzentration von 5 und 20 μM bestimmt (Abb. 81). Die Demethylierung von Harmin erfolgt durch CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 und CYP2D6, was mit den Literaturangaben übereinstimmt.²⁸² Zusätzlich ist in der Literatur eine Aktivität des hier nicht untersuchten CYP1A1 beschrieben, die mit der von CYP2D6 vergleichbar ist. Das neue synthetische Derivat BBH wird hauptsächlich durch CYP3A4 debenzyliert (Abb. 81). Es besitzt eine hohe Affinität zu diesem CYP-Enzym, da bereits bei niedrigen Konzentrationen eine Sättigung eintritt. Neben CYP3A4 spielt CYP2D6 eine untergeordnete Rolle bei der Dealkylierung von BBH. Extrem geringe Aktivitäten weisen CYP1A2, CYP2C9 und CYP2C19 auf, die noch einen hohen Anteil an der Demethylierung von Harmin hatten. Darüber hinaus ist BBH ein Substrat des extrahepatischen CYP1B1. BBH kann somit für Inhibitionsuntersuchungen für das bedeutende Enzym CYP3A4 verwendet werden, das den Naturstoff Harmin nicht demethyliert. Das Methylderivat BMH wird hingegen vorrangig durch CYP2D6 und CYP1A2 dealkyliert, während die Aktivität von CYP1B1, CYP2C19 und CYP3A4 gering ist (Abb. 81). Bis auf CYP2C9 und CYP2C19 besitzt die Demethylierung von BMH somit große Ähnlichkeit mit der des Harmins. Das acide MCBH wird selektiv durch die Subfamilie CYP2C demethyliert, wobei die höchste Umsetzungsgeschwindigkeit mit CYP2C19 erhalten wurde (Abb. 81). Das N-Methylderivat MMH erwies sich als selektives Substrat des polymorphen CYP2D6, wodurch neben dem rekombinanten CYP2D6 auch humane Lebermikrosomen für Inhibitionsuntersuchungen eingesetzt werden können (Abb. 81).

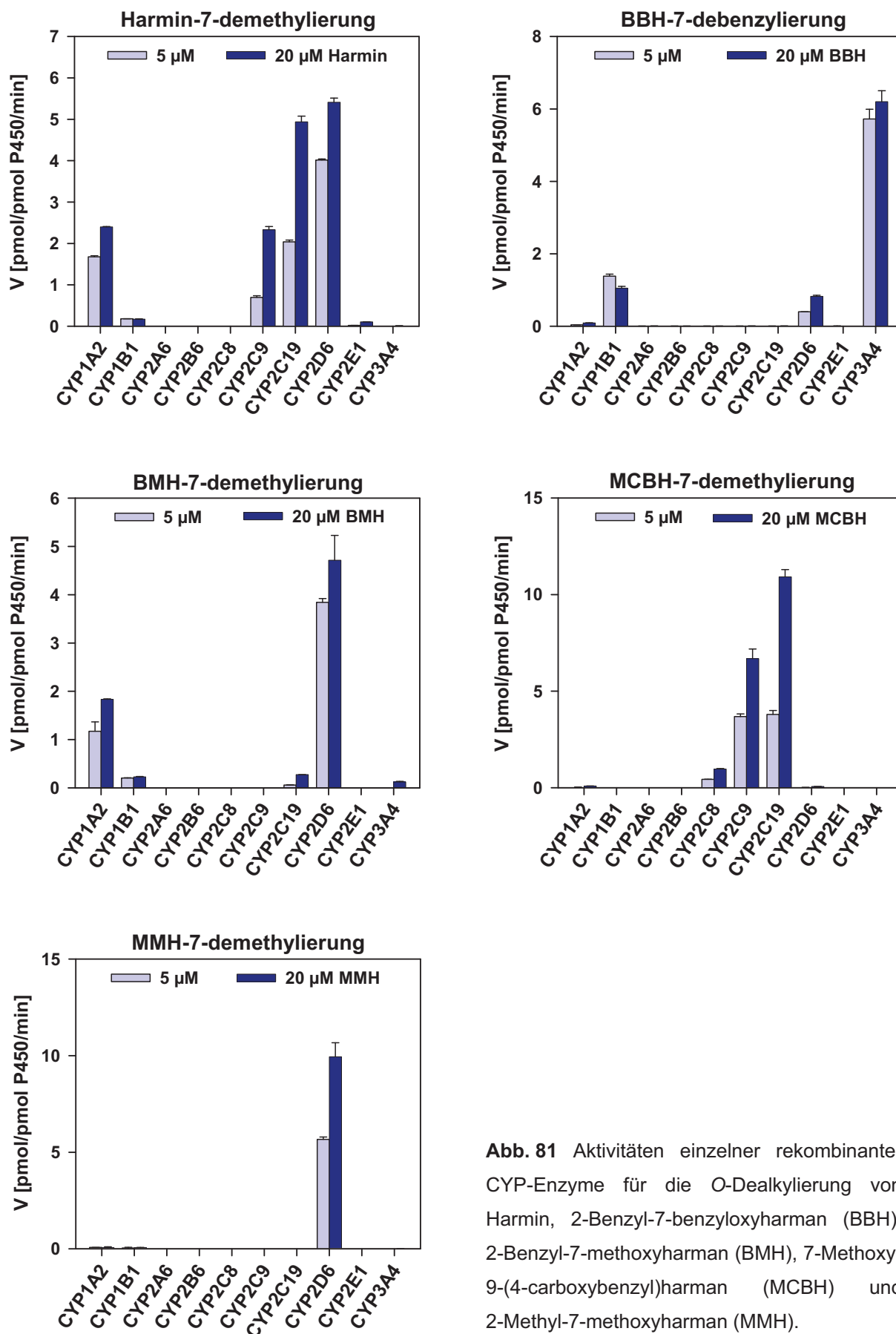


Abb. 81 Aktivitäten einzelner rekombinanter CYP-Enzyme für die O-Dealkylierung von Harmin, 2-Benzyl-7-benzyloxyharman (BBH), 2-Benzyl-7-methoxyharman (BMH), 7-Methoxy-9-(4-carboxybenzyl)harman (MCBH) und 2-Methyl-7-methoxyharman (MMH).

5.5 K_m -Wert-Bestimmung für die O-Dealkylierung

Wie bereits bei den Standardsubstraten (s. II.3.3) wurden zur Ermittlung der Konzentrationen, die für die In-vitro-Inhibitionsassays zu verwenden sind, Substratsättigungskurven aufgenommen (Abb. 82) und die Michaelis-Menten-Konstanten sowie die maximalen Umsetzungsgeschwindigkeiten ermittelt (Tab. 19). CYP1A2 und CYP2D6 besitzen die kleinsten K_m -Werte für die Harmin-7-demethylierung, während die Affinität dieses Substrates zu CYP2C9 und CYP2C19 geringer ist (Tab. 19). Durch die vorliegende Substratinhibitionskinetik (Abb. 82) bei diesen CYP-Enzymen wurden hohe theoretische V_{max} -Werte, die praktisch aber nicht erreicht werden, und große Standardabweichungen erhalten. Die ermittelten K_m -Werte sind vergleichbar mit den vorhandenen Literaturdaten, die erhaltenen maximalen Umsetzungsgeschwindigkeiten sind allerdings kleiner.²⁸² Für die Debenzylierung von BBH durch CYP3A4 ergab sich der niedrigste K_m -Wert von allen untersuchten Harman-Derivaten (Tab. 19). Wie bei dem Standardsubstrat Midazolam (Abb. 49) liegt auch hier eine Substratinhibitionskinetik vor (Abb. 82). Bei der Demethylierung von MCBH besitzt CYP2C19 die höchste und CYP2C8 die niedrigste maximale Umsetzungsgeschwindigkeit (Tab. 19). Mit CYP2C8 erfolgt bei höheren

Tab. 19 Ermittelte Michaelis-Menten-Konstanten (K_m) und maximale Umsetzungsgeschwindigkeiten (V_{max}) für die 7-Dealkylierung der Harman-Derivate durch CYP-Enzyme.

Substrat	Enzym	Kurventyp	K_m [μ M]	V_{max} [pmol/pmole/min]
Harmin	CYP1A2	hyperbol	2.03 \pm 0.13	3.15 \pm 0.04
	CYP2C9	Substratinhibition	78.0 \pm 33.3	9.32 \pm 2.77
	CYP2C19	Substratinhibition	63.3 \pm 19.5	16.27 \pm 3.30
	CYP2D6	Substratinhibition	5.15 \pm 0.38	9.14 \pm 0.23
BBH	CYP1B1	Substratinhibition	1.01 \pm 0.28	2.39 \pm 0.25
	CYP3A4	Substratinhibition	1.61 \pm 0.23	7.70 \pm 0.37
BMH	CYP1A2	hyperbol	3.71 \pm 0.25	3.08 \pm 0.04
MCBH	CYP2C8	Substratinhibition	21.1 \pm 2.2	2.28 \pm 0.14
	CYP2C9	hyperbol	8.11 \pm 0.44	9.35 \pm 0.13
	CYP2C19	hyperbol	23.2 \pm 0.8	22.4 \pm 0.2
MMH	CYP2D6	hyperbol	7.33 \pm 0.37	13.8 \pm 0.2
	HLM	hyperbol	39.4 \pm 4.8	1.70 \pm 0.04

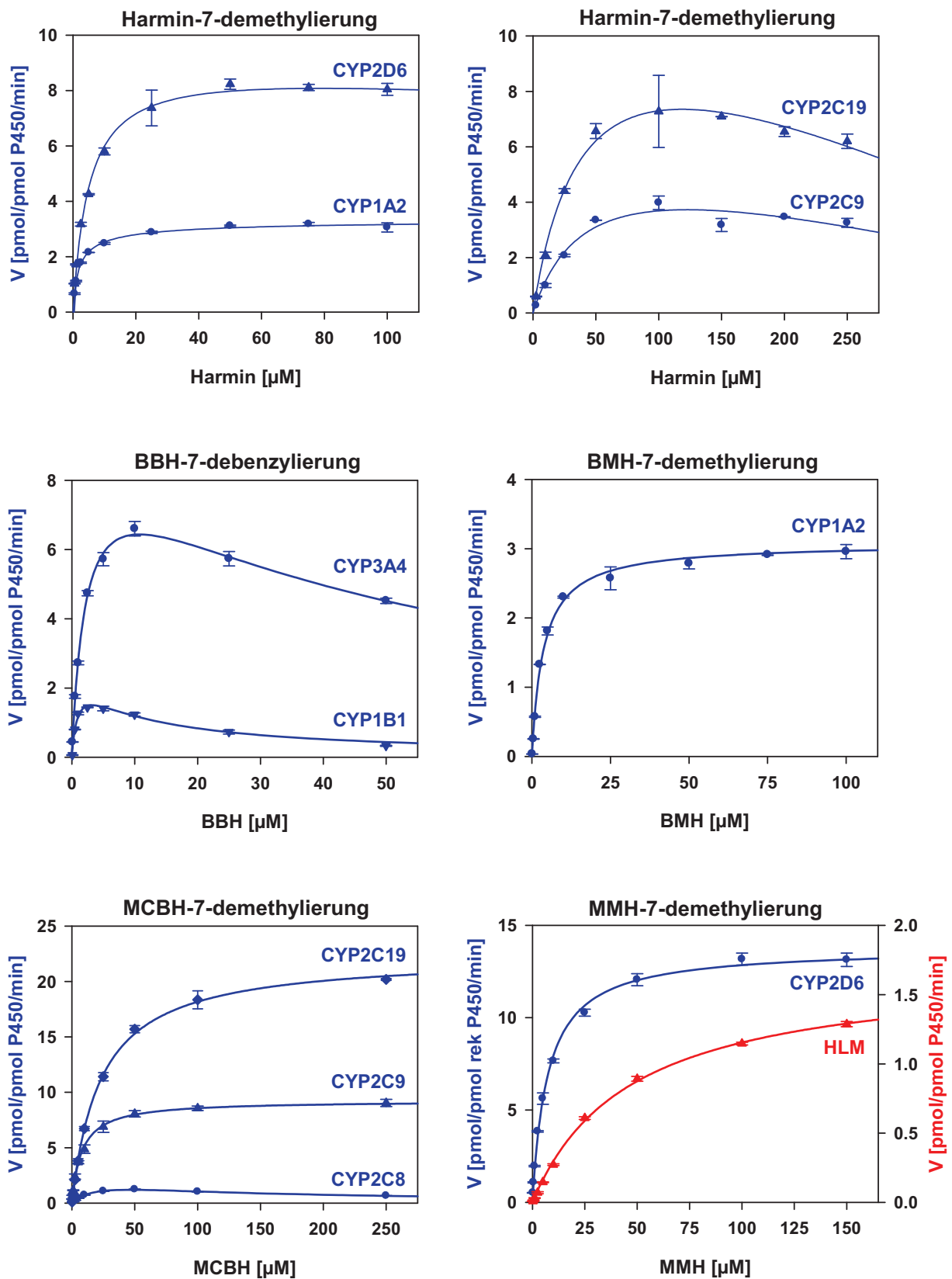


Abb. 82 Substratsättigungskurven für die O-Dealkylierung von Harmin, 2-Benzyl-7-benzyloxyharman (BBH), 2-Benzyl-7-methoxyharman (BMH), 7-Methoxy-9-(4-carboxybenzyl)harman (MCBH) und 2-Methyl-7-methoxyharman (MMH) durch rekombinante CYP-Enzyme und humane Lebermikrosomen (HLM).

Konzentrationen eine Inhibition durch das Substrat (Abb. 82). Vergleichbare K_m -Werte ergaben sich für CYP2C8 und CYP2C19, während die Affinität von MCBH zu CYP2C9 etwas höher ist (Tab. 19). Bei MMH, das selektiv durch CYP2D6 demethyliert wird, lag der K_m -Wert für rekombinantes CYP2D6 deutlich niedriger als bei der Verwendung von humanen Lebermikrosomen. Ähnliches wurde bereits bei dem Standardsubstrat Dextromethorphan beobachtet (Tab. 10). Die ermittelten K_m -Werte für die Umsetzung der Harman-Derivate wurden gerundet und als Substratkonzentration für die Inhibitionsassays verwendet (s. V.2.5.3.2).

5.6 Evaluierung mit Hilfe von CYP-Standardinhibitoren

Zum Nachweis der Eignung der Harman-Derivate als Substrate für CYP-Inhibitionsassays wurden die IC_{50} -Werte von CYP-Standardinhibitoren mit den entsprechenden rekombinanten CYP-Enzymen bestimmt. Da der IC_{50} -Wert von der Substratkonzentration abhängt und damit die Ergebnisse der verschiedenen Substrate miteinander vergleichbar sind, wurde für jedes Substrat eine Konzentration eingesetzt, die in der Nähe des K_m -Wertes lag. Als Inhibitoren für die einzelnen CYP-Enzyme wurden Furaflillin (CYP1A2), Quercetin (CYP2C8), Sulfaphenazol (CYP2C9), Tranylcypromin (CYP2C19), Chinidin (CYP2D6) und Ketoconazol (CYP3A4) untersucht (Abb. 83). Sind die mit den Harman-Derivaten erhaltenen Inhibitionskurven mit denen der Standardsubstrate deckungsgleich und ergeben sich dieselben IC_{50} -Werte, kann davon ausgegangen werden, dass mit den neuen Substraten äquivalente Ergebnisse erzielt werden können. Für die Standardsubstrate wurden die unter II.3.1 beschriebenen LC/MS/MS-basierten Inhibitionsassays verwendet. Die Quantifizierung der Harman-Metaboliten erfolgte durch die LC/LC/Fluoreszenz- (s. II.5.2) und die LC/MS/MS-Analyse (s. II.5.3). In allen Fällen ergaben sich kaum Unterschiede in den IC_{50} -Werten zwischen beiden Analysemethoden für die Harman-Metaboliten (Tab. 20). Der CYP1A2-Inhibitor Furaflillin hemmte die O-Deethylierung von Phenacetin stärker als die Demethylierung der Substrate Harmin und BMH (Abb. 83). Die erhaltenen IC_{50} -Werte unterscheiden sich um bis zu eine Zehnerpotenz (Tab. 20). Eine Erklärung kann darin liegen, dass Furaflillin ein mechanismusbasierter Inhibitor von CYP1A2 ist und daher die Ergebnisse stark von den Versuchsbedingungen abhängen können. Für

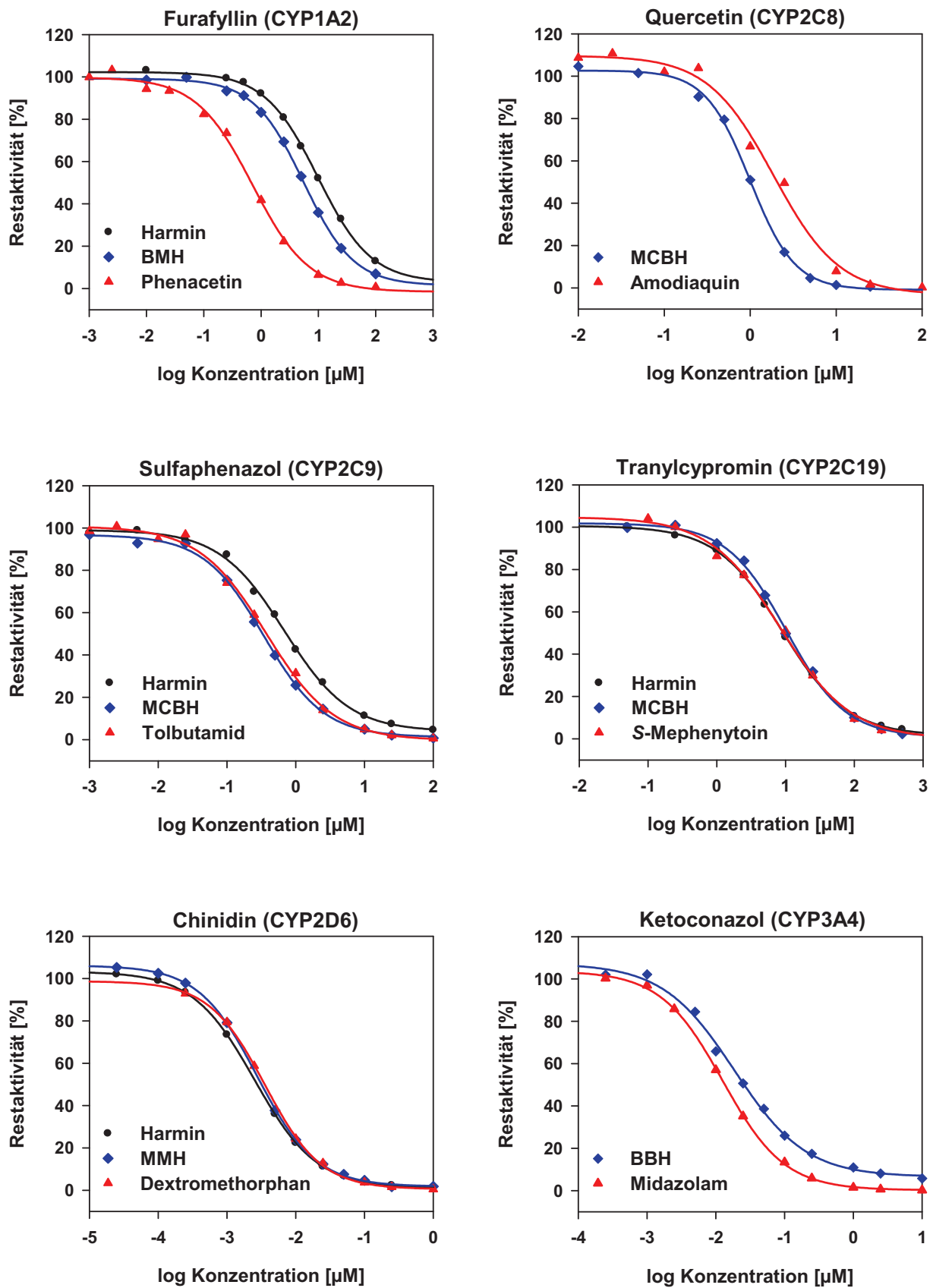


Abb. 83 Verwendung der Harman-Derivate und der Standardsubstrate zur Untersuchung der Inhibition von rekombinanten CYP-Enzymen durch CYP-Standardinhibitoren.

Tab. 20 IC₅₀-Werte der CYP-Inhibition durch Standardinhibitoren bei der Verwendung von verschiedenen Substraten.

Inhibitor	Enzym	Substrat	IC ₅₀ -Wert	
			LC/MS/MS	LC/LC/FLD
Furafyllin	CYP1A2	Harmin	8.86 ± 0.64 µM	9.82 ± 0.63 µM
		BMH	5.48 ± 0.25 µM	5.52 ± 0.26 µM
		Phenacetin	0.71 ± 0.07 µM	-
Quercetin	CYP2C8	MCBH	1.00 ± 0.04 µM	1.00 ± 0.04 µM
		Amodiaquin	1.92 ± 0.41 µM	-
Sulfaphenazol	CYP2C9	Harmin	0.64 ± 0.03 µM	0.68 ± 0.04 µM
		MCBH	0.33 ± 0.03 µM	0.34 ± 0.02 µM
		Tolbutamid	0.36 ± 0.04 µM	-
Tranlylcypromin	CYP2C19	Harmin	8.39 ± 0.22 µM	8.90 ± 0.27 µM
		MCBH	10.06 ± 0.84 µM	10.17 ± 0.63 µM
		S-Mephenytoin	8.41 ± 0.87 µM	-
Chinidin	CYP2D6	Harmin	2.4 ± 0.1 nM	2.5 ± 0.1 nM
		MMH	2.8 ± 0.1 nM	2.7 ± 0.1 nM
		Dextromethorphan	3.6 ± 0.2 nM	-
	HLM	MMH	34.5 ± 2.2 nM	34.5 ± 3.0 nM
		Dextromethorphan	25.2 ± 1.0 nM	-
Ketoconazol	CYP3A4	BBH	17.8 ± 1.9 nM	18.6 ± 0.2 nM
		Midazolam	12.5 ± 0.5 nM	-

die Hemmung von CYP2C8 durch Quercetin ergaben sich wesentlich geringere Unterschiede zwischen den Substraten MCBH und Amodiaquin (Abb. 83). Mit Amodiaquin wurden eine flachere Inhibitionskurve und ein geringfügig höherer IC₅₀-Wert erhalten (Tab. 20). Für die Hemmung von CYP2C9 durch Sulfaphenazol wurden Inhibitionskurven mit den Substraten Harmin, MCBH und Tolbutamid aufgenommen (Abb. 83). Der größte IC₅₀-Wert ergab sich mit Harmin, während Tolbutamid und MCBH identische Ergebnisse lieferten (Tab. 20). Nahezu deckungsgleiche Inhibitionskurven ergaben sich für die Hemmung von CYP2C19 durch Tranlylcypromin mit den Substraten Harmin, MCBH und S-Mephenytoin (Abb. 83). Für die Inhibition von CYP2D6 durch Chinidin wurden die Substrate Harmin, MMH und Dextromethorphan eingesetzt und ebenfalls nahezu identische Inhibitionskurven erhalten (Abb. 83). In späteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Substratkonzentration einen großen Einfluss auf den IC₅₀-Wert des kompetitiven CYP2D6-Inhibitors Chinidin hat (s. II.3.11). Bei den Substraten MMH

und Dextromethorphan konnten aufgrund der hohen Isoenzymselektivität neben dem rekombinanten CYP2D6 auch humane Lebermikrosomen untersucht werden. Mit beiden Substraten fällt die Hemmung mit humanen Lebermikrosomen schwächer aus als die des rekombinanten CYP2D6, für das die IC_{50} -Werte nur etwa ein Zehntel betragen (Tab. 20). Mit dem Substrat Dextromethorphan sind ähnliche Beobachtungen aus der Literatur bekannt.¹⁷⁷ Ketoconazol hemmt die Midazolam-1'-hydroxylierung durch CYP3A4 etwas schwächer als die Debenzylierung von BBH (Abb. 83). Der IC_{50} -Wert ist mit Midazolam aber nur geringfügig kleiner (Tab. 20). Auffällig ist, dass die Hemmung der BBH-7-debenzylierung nicht vollständig erfolgt, d. h. bei hohen Ketoconazolkonzentrationen nähert sich die Restaktivität einem Wert von etwa 5 % an (Abb. 83).

5.7 CYP2D6-Inhibition durch Arzneistoffe

Neben dem Standardinhibitor Chinidin wurde die CYP2D6-Inhibition durch weitere Arzneistoffe untersucht. Es wurde das neue Substrat 2-Methyl-7-methoxyharman (MMH) und das Standardsubstrat Dextromethorphan verwendet und die Restaktivitäten mit rekombinantem CYP2D6 und humanen Lebermikrosomen in Anwesenheit von drei Arzneistoffkonzentrationen bestimmt (Abb. 84). Bei den ausgewählten Arzneistoffen handelt es sich zum einen um bekannte Substrate von CYP2D6, wie Diphenhydramin⁴⁶, Imipramin⁴⁷, Metoprolol⁴⁹, Metoclopramid²⁸³, Promethazin²⁸⁴ oder um CYP-Inhibitoren, wie Fluoxetin.²³³ Tamoxifen ist ein Prodrug, dessen 4-Hydroxylierung hauptsächlich durch CYP2D6 katalysiert wird.²⁸⁵ Die stärkste CYP2D6-Inhibition der getesteten Arzneistoffe besitzt Fluoxetin und Promethazin, bei denen eine Konzentration von 1 μ M bereits eine Hemmung von mehr als 50 % bewirkte (Abb. 84). Schwächer fiel die Inhibition bei den CYP2D6-Substraten Diphenhydramin, Imipramin, Metoclopramid, Metoprolol und Tamoxifen aus. Dennoch wurde in den meisten Fällen das Enzym durch eine Arzneistoffkonzentration von 100 μ M nahezu vollständig gehemmt. Das im Hinblick auf die ausgeprägte Affinität der quarternären Substrate AMMC und MMH zu CYP2D6 aufgrund seiner Strukturähnlichkeit ausgewählte Neostigmin beeinflusst die Aktivität von CYP2D6 hingegen kaum. Wie bereits bei Chinidin beobachtet (s. II.5.6), fällt auf, dass auch für andere Arzneistoffe die Hemmung von rekombinantem CYP2D6 in der Regel um etwa 20 % stärker ist als die von humanen

Lebermikrosomen (Abb. 84). Damit ist die Übertragbarkeit der Ergebnisse, die mit einzelnen rekombinanten Enzymen erhalten werden, auf die In-vivo-Situation infrage gestellt. Die große Anzahl an Polymorphismen dieses Enzyms könnte eine mögliche Ursache für die Abweichungen sein. Mit dem Substrat MMH und dem Standardsubstrat Dextromethorphan wurde allerdings eine gute Übereinstimmung der Restaktivitäten erhalten (Abb. 84). Eine wichtige Voraussetzung hierfür war, dass bei beiden Substraten jeweils der K_m -Wert für das entsprechende Enzym als Substratkonzentration verwendet wurde. MMH ist daher ein geeignetes, neues Substrat für die In-vitro-Inhibitionsuntersuchungen von CYP2D6.

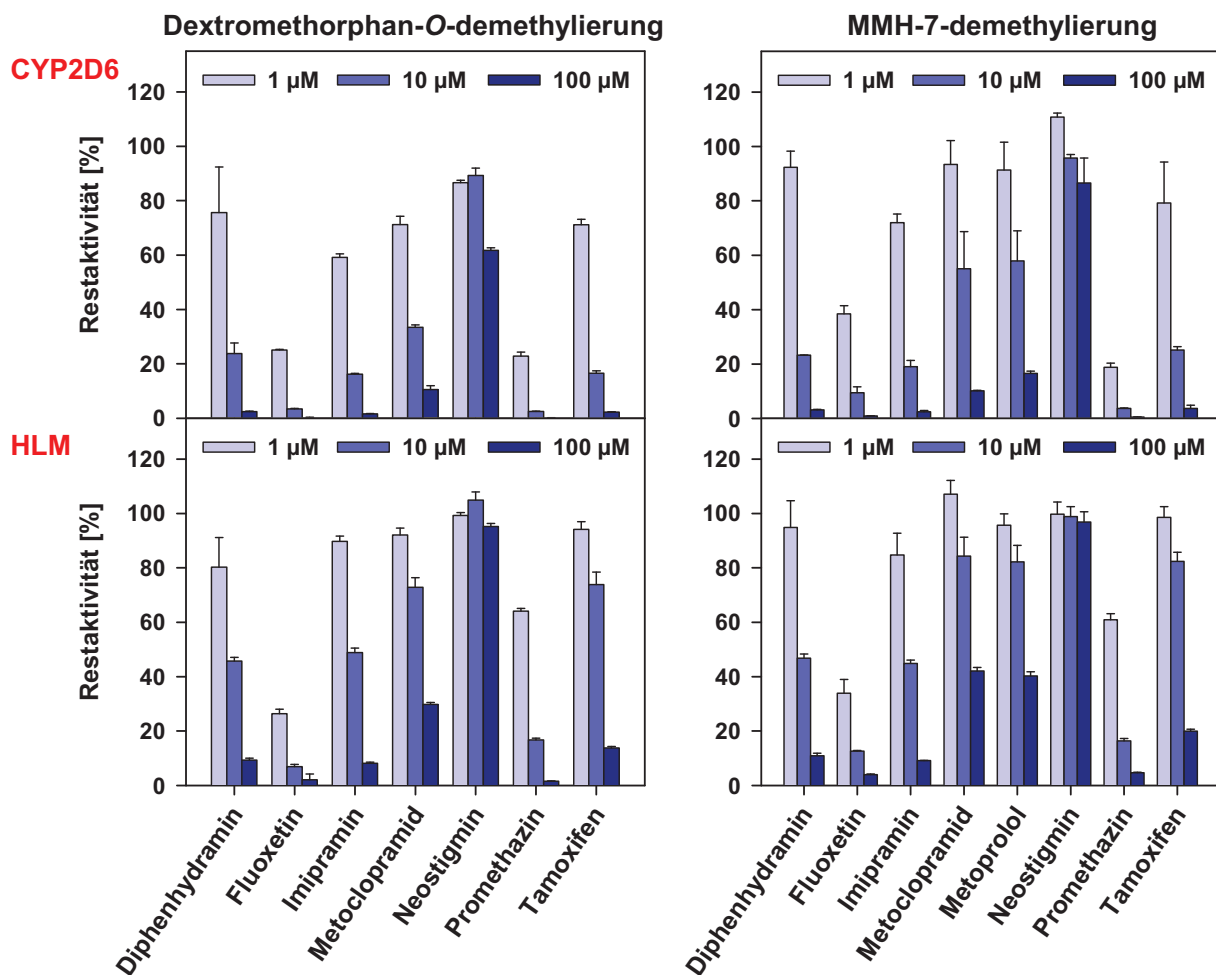


Abb. 84 CYP2D6-Inhibition durch ausgewählte Arzneistoffe. Untersuchung der Dextromethorphan-O-demethylierung und der MMH-7-demethylierung mit rekombinantem CYP2D6 und humanen Lebermikrosomen (HLM).

neuen Harman-Derivate für fluoreszenzbasierte Mikrotiterplattenassays eingesetzt werden können. Hierfür wurden von jedem Substrat und dem dazugehörigen Metaboliten UV-Absorptionsspektren in 0.1 M Salzsäure, 0.1 M Natronlauge und in Pufferlösungen im pH-Bereich von 2.0 bis 12.5 im Abstand von 0.5 Einheiten aufgenommen und die pK_S -Werte der Protolysestufen bestimmt. Zum einen kann der Pyridin-Stickstoff in saurer Lösung protoniert werden, sofern dieser nicht alkyliert ist. Die Metaboliten der Harman-Derivate besitzen, wie die Cumarin-Derivate, eine deprotonierbare freie phenolische Hydroxylgruppe. Der Indol-Stickstoff des β -Carbolins ist nicht basisch. Diese Funktion kann sogar mit starken Basen deprotoniert werden (Abb. 85). Von den einzelnen Protolysestufen der Harman-Derivate lassen sich mehrere mesomere Grenzstrukturen sowie Tautomere formulieren, so dass die natürlich vorherrschenden Formen noch unbekannt sind. Ohne eine NMR-spektroskopische Untersuchung ist es daher schwierig, den pK_S -Wert einer Funktion zuzuordnen. Das natürliche Alkaloid Harmin besitzt in saurer Lösung ein Absorptionsmaximum von 318 nm mit einer ausgeprägten Schulter bei etwa 360 nm (Abb. 86). Bei einem Anstieg des pH-Wertes verschiebt sich das Maximum auf 298 nm, was mit den Literaturangaben übereinstimmt und auf die Deprotonierung des in saurer Lösung geladenen Pyridin-Stickstoffs zurückgeführt werden kann.^{286,287} Die Auswertung ergab einen pK_S -Wert von 7.9, was recht nahe an den Literaturwerten von 7.5 und 8.0 liegt.^{286,287} Damit ist Harmin deutlich stärker basisch als Pyridin ($pK_S = 5.2$). Da sich das Spektrum bei einer weiteren Erhöhung des pH-Wertes nicht verändert, ist davon auszugehen, dass eine zweite Deprotonierung im untersuchten pH-Bereich nicht erfolgt. Hierfür sind konzentrierte Alkalihydroxid-Lösungen erforderlich.²⁸⁸ Der Metabolit Harmol besitzt in saurer Lösung ein dem Harmin vergleichbares Absorptionsspektrum (Abb. 86). Ab einem pH-Wert von etwa 7 entsteht durch einfache Deprotonierung des Moleküls ($pK_S = 8.1$) ein Maximum bei 367 nm, in dem bei pH 8.5 die maximale Absorption gemessen wurde. Steigt der pH-Wert weiter an, wird ein zweites Proton abgespalten ($pK_S = 9.7$) und das Absorptionsmaximum verschiebt sich auf 330 nm. Bei dem 2-Methylderivat des Harmins, dem MMH, bleibt das Spektrum in einem weiten pH-Bereich unverändert ($\lambda_{\max} = 323$ nm). Erst bei sehr hohen pH-Werten von größer als 10 erfolgt eine Deprotonierung des Moleküls ($pK_S = 11.6$), wodurch sich drei Absorptionsmaxima bei 276, 336 und 390 nm ergeben (Abb. 86). Vergleichbare

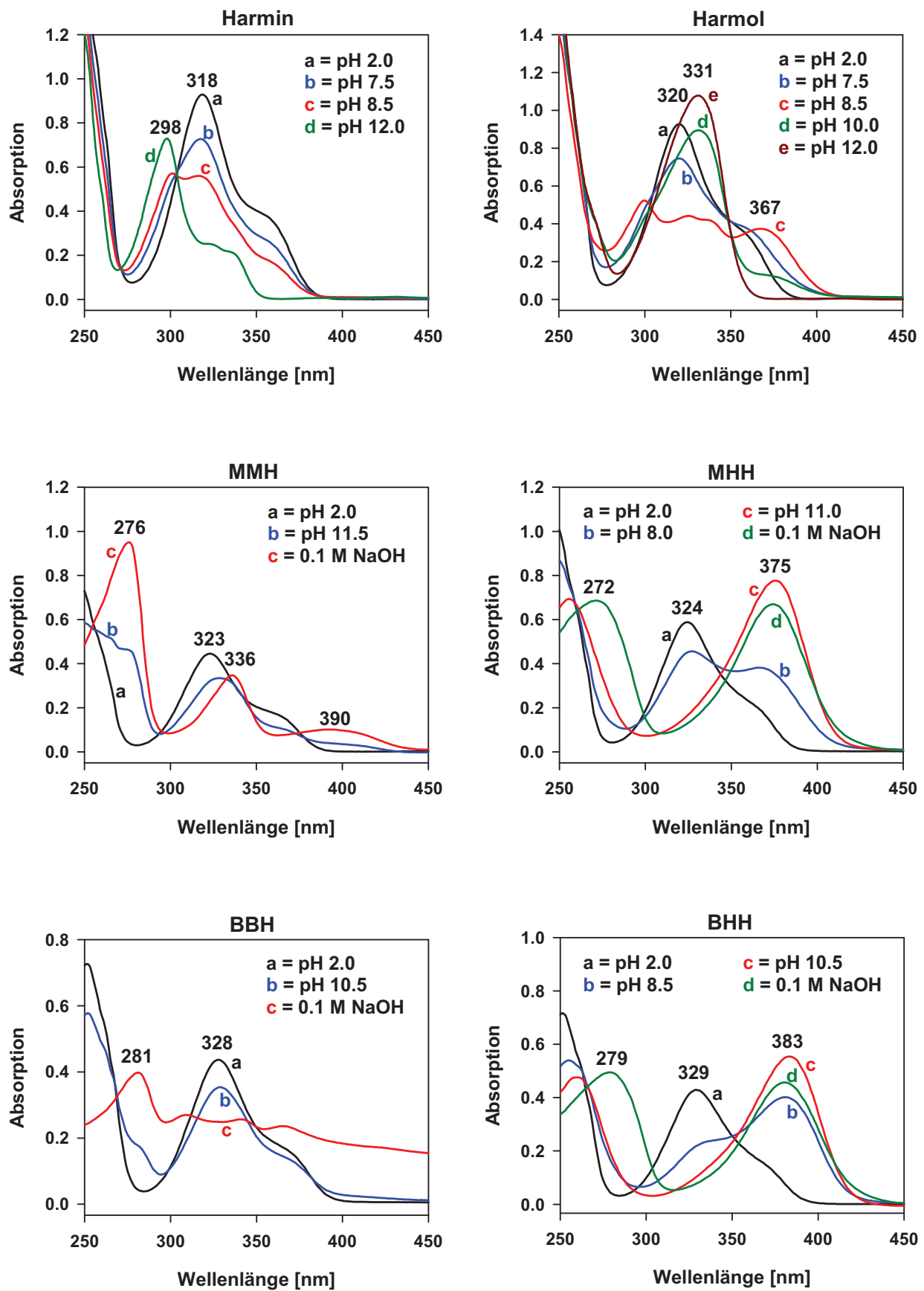


Abb. 86 UV/VIS-Absorptionsspektren ausgewählter Harman-Derivate bei unterschiedlichen pH-Werten. Substrate (links) und die dazugehörigen O-Desalkylmetaboliten (rechts).

Absorptionsspektren für MMH werden in der Literatur angegeben.²⁸⁷ Bei pH 2 sind die Absorptionsspektren von MMH und des Metaboliten MHH identisch (Abb. 86). Durch Deprotonierung der phenolischen Hydroxylgruppe von MHH ($pK_S = 8.2$) erfolgt eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 375 nm. Bei hohen pH-Werten nimmt die Absorption bei dieser Wellenlänge wieder ab, was auf die Abspaltung eines zweiten Protons zurückzuführen ist, dessen pK_S -Wert außerhalb des untersuchten pH-Bereiches liegt. Das Absorptionsmaximum von BBH in saurer Lösung gleicht dem des MMH (Abb. 86). Bei pH-Werten von über 10 verschwindet das Maximum bei 328 nm und es entsteht eine breite Bande. Durch die Auswertung bei 280 nm wurde für die Deprotonierung des Moleküls mit einem pK_S -Wert von 10.5 ein deutlich geringerer Wert als für MMH ermittelt, was auf den -I- und -M-Effekt der beiden Benzylsubstituenten zurückgeführt werden kann. Die Absorptionsspektren des Metaboliten BHH zeigen hohe Ähnlichkeit mit denen des MHH. Durch Deprotonierung der phenolischen Hydroxylgruppe ($pK_S = 8.1$) verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 329 auf 383 nm. Der pK_S -Wert für die zweite Stufe liegt mit > 12.5 , wie beim MHH, außerhalb des untersuchten pH-Bereiches.

In saurer Lösung ist keine selektive Detektion der Metaboliten möglich, da die Absorptionsspektren der Substrate und des dazugehörigen Metaboliten sich nicht unterscheiden. Die pK_S -Werte aller Harman-Metaboliten liegen oberhalb von 7.5, so dass der bathochrome Shift bei einer direkten Bestimmung im Inkubationspuffer nicht ausreichend ist. Die Harman-Derivate eignen sich somit nicht für eine kontinuierliche Messung. Erhöht man hingegen den pH-Wert auf 9.5, tritt eine ausgeprägte bathochrome Verschiebung auf. Da die Absorptionsspektren der Substrate im Maximum der entsprechenden O-Desalkylmetaboliten eine Schulter besitzen (Abb. 86), werden bei dieser Wellenlänge die Substrate ebenfalls zur Fluoreszenz angeregt. Es muss daher auf eine längere Wellenlänge außerhalb des Absorptionsmaximums ausgewichen werden, z. B. 400 nm für MHH und BHH, was zulasten der Empfindlichkeit geht. Steigt der pH-Wert weiter an, ist eine selektive Anregung der Metaboliten nicht mehr möglich. Das Absorptionsmaximum von Harmol verschiebt sich hypsochrom, so dass es wieder zu einer stärkeren Überlappung mit dem Substrat kommt. Bei den synthetischen Harman-Derivaten tritt hingegen eine breite Bande des Substrates auf, die sich bis in den VIS-Bereich erstreckt.

6 Biotoxifizierung

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Biotoxifizierung von Arznei- und Naturstoffen zu reaktiven Metaboliten, woran v. a. CYP-Enzyme beteiligt sind. Hierfür wurden In-vitro-Inkubationen der zu testenden Substanzen mit humanen Lebermikrosomen bzw. CYP-Enzymen durchgeführt und die dabei entstehenden reaktiven Metaboliten mit nukleophilen Reagenzien, wie z. B. Glutathion, abgefangen. Es wurden LC/MS/MS-basierte Methoden entwickelt, mit denen die gebildeten Addukte detektiert werden können. Für die Methodenoptimierung wurden Standardsubstanzen von Glutathionaddukten verwendet (s. II.6.1.1) und Arzneistoffe untersucht, von denen reaktive Metaboliten bekannt sind (s. II.6.1.2), damit die Methode anschließend für ein Screening verwendet werden kann. Darüber hinaus wurden markierte Glutathion-Derivate hergestellt, die ebenfalls zur Detektion reaktiver Metaboliten eingesetzt werden können (s. II.6.3).

6.1 In-vitro-Screening auf reaktive Metaboliten

6.1.1 Optimierung der LC/MS/MS-Analytik

Fragmentierung von GSH-Konjugaten

Wie alle Phase-II-Metaboliten besitzen Glutathionkonjugate einen konstanten Molekülteil, in diesem Fall den Glutathionrest. Bei einer LC/MS/MS-Analyse treten daher eine Reihe charakteristischer Fragmente auf, die sich aufgrund der Spaltung an diesem konstanten Molekülteil ergeben (Abb. 87).¹⁰⁵ Beispielsweise wird aus den Glutathionkonjugaten im positiven Modus Pyroglutaminsäure abgespalten, so dass ein um 129 Da leichteres Fragment entsteht (Abb. 87).¹⁰⁸ Zur massen-

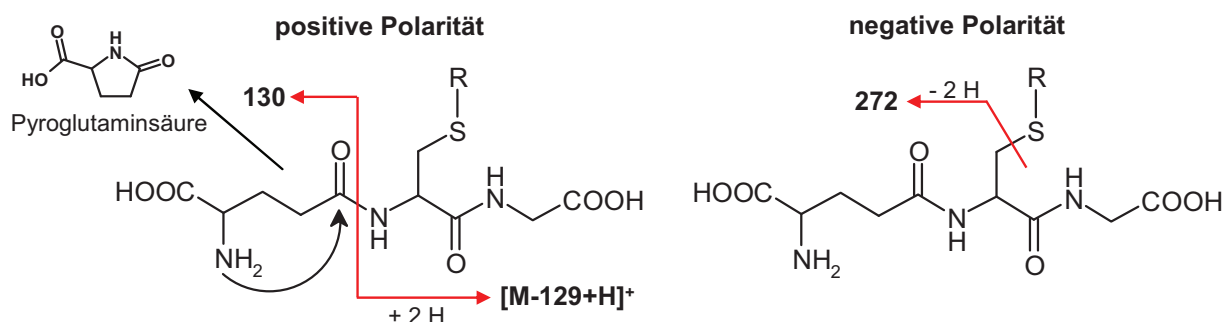


Abb. 87 Ausgewählte charakteristische Fragmente von GSH-Konjugaten bei der LC/MS/MS-Analyse mit positiver und negativer Polarität (modifiziert nach ¹⁰⁵).

spektrometrischen Analyse mit einem Triple-Quadrupol-Detektor kann daher der Neutral-Loss-Scan genutzt werden. Darüber hinaus tritt ein Fragment-Ion mit einem m/z -Wert von 130 auf, was einen Precursor-Ionen-Scan ermöglicht.^{99,105} Bei negativer Polarität kann bei GSH-Konjugaten ein Fragment mit einem m/z -Wert von 272 detektiert werden (Abb. 87).^{105,289}

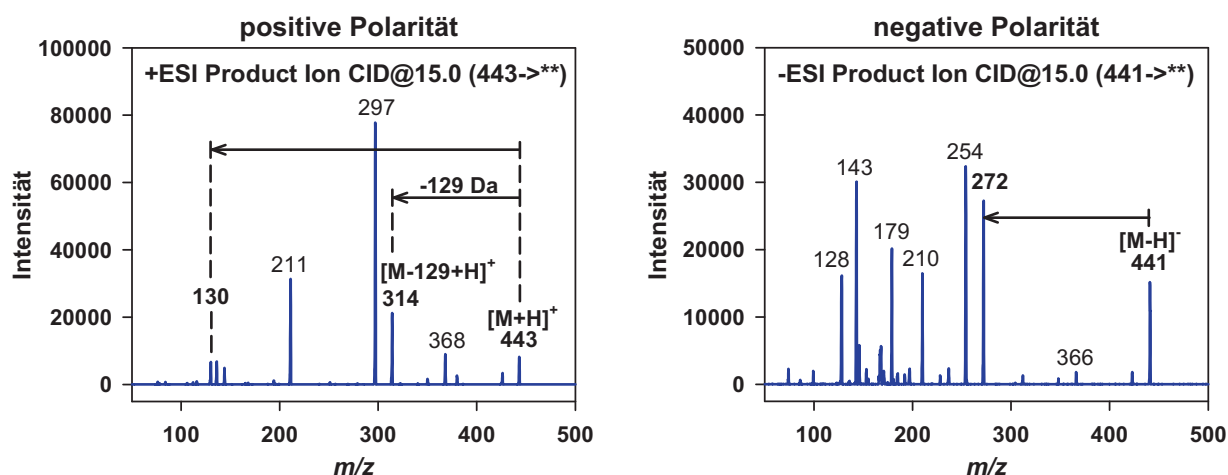


Abb. 88 Produktionenspektren der LC/MS/MS-Analyse von 4-Nitrobenzyl-S-glutathion (NB-SG) mit den ausgewählten für GSH-Konjugaten charakteristischen Fragmenten $[M-129+H]^+$ und m/z 130 bei positiver sowie m/z 272 bei negativer Polarität.

Zur Optimierung der LC/MS/MS-Analyse mit dem zur Verfügung stehenden Massenspektrometer wurden zunächst Produktionenspektren verschiedener Glutathionkonjugate mit positiver und negativer Polarität aufgenommen und diese von 4-Nitrobenzyl-S-glutathion (NB-SG) exemplarisch in Abb. 88 dargestellt. Im zweiten Schritt wurden die Fragmentorspannungen und die Kollisionsenergien für die ausgewählten charakteristischen Fragmente optimiert (Tab. 21). Die Fragmentorspannungen für eine maximale Signalintensität variierten aufgrund der unterschiedlichen Molekülgröße der einzelnen Substanzen zwischen 100 und 150 V. Daher wurde bei der Durchführung der Screening-Analysen die Standardeinstellung von 135 V beibehalten. Die Kollisionsenergie für die Detektion des Neutral-Loss von 129 lag zwischen 9 und 14 eV, weshalb für das Screening ein Mittelwert von 12 eV verwendet wurde (Tab. 21). Bei den Untersuchungen mit den Standardsubstanzen war zu beobachten, dass für die Fragmente 130 bei positiver und 272 bei negativer Polarität die Kollisionsenergien für eine maximale Signalintensität wesentlich stärker

variieren. Zudem war in einigen Fällen die Signalintensität für diese Ionen um ca. 100-fach niedriger. Für ein Screening auf GSH-Addukte eignet sich daher der Neutral-Loss von 129 Da am besten. Bei der Detektion anderer Fragmente besteht die Gefahr, dass aufgrund mangelnder Empfindlichkeit bzw. bei den gewählten festen Einstellungen einige in der Probe vorhandene Glutathionkonjugate nicht detektiert werden können.

Tab. 21 Kollisionsenergien (CE) für eine maximale Signalintensität der LC/MS/MS-Analyse verschiedener GSH-Konjugate für ausgewählte charakteristische Übergänge. 2,4-Dinitrophenyl-S-glutathion (DNP-SG), 4-Chinolinyl-*N*-oxid-S-glutathion (QNO-SG), 4-Nitrobenzyl-S-glutathion (NB-SG), Etacrynsäure-Glutathion-Konjugat (EA-SG).

Substanz	$[M+H]^+ \rightarrow [M-129+H]^+$		$[M+H]^+ \rightarrow 130$		$[M-H]^- \rightarrow 272$	
	<i>m/z</i>	CE [eV]	<i>m/z</i>	CE [eV]	<i>m/z</i>	CE [eV]
DNP-SG	474 → 345	12	474 → 130	25	472 → 272	8
QNO-SG	451 → 322	14	451 → 130	30	449 → 272	10
NB-SG	443 → 314	9	443 → 130	22	441 → 272	10
EA-SG	610 → 481	13	610 → 130	41	608 → 272	24
GSH-Addukte		12		25		15

Chromatographische Trennung

Vor der massenspektrometrischen Detektion ist eine chromatographische Trennung erforderlich. Hierfür wurde eine Standardsäule (150 x 4.6 mm) mit einer modifizierten RP12-Phase verwendet. Dem Fließmittel aus Wasser und Acetonitril wurde Ameisensäure zugesetzt, was die Chromatographie und die Detektion im positiven Modus verbessert. Bei den GSH-Addukten handelt es sich um polare Moleküle, weshalb sie bereits mit einem geringen organischen Fließmittelanteil eluieren. Daher wurde eine Fließmittelzusammensetzung verwendet, bei der in den ersten 2 min mit 5 % organischem Anteil eluiert wurde. Anschließend wurde ein flacher linearer Gradient angewendet, sodass nach 20 min ein Anteil von 50 % erhalten wurde. Schließlich wurde die Steigung des Gradienten auf 5 % pro Minute erhöht bis 100 % organische Phase erreicht wurden und eine Gesamtlaufzeit von 30 min resultierte.

6.1.2 Inkubation ausgewählter Arznei- und Naturstoffe

Zur Beurteilung der LC/MS/MS-basierten Screening-Methode (s. II.6.1.1) für eine Detektion von reaktiven Metaboliten wurden Clozapin, Diclofenac, Paracetamol und Pulegon, von denen reaktive Metaboliten in der Literatur^{290,291} beschrieben sind, mit humanen Lebermikrosomen und GSH inkubiert. In Abb. 89 sind die Neutral-Loss-Chromatogramme der Proben dargestellt. Alle erhaltenen Signale werden durch Moleküle verursacht, die ein Fragment von 129 Da abspalten, unabhängig davon ob diese GSH-Addukte sind. Dadurch entsteht eine Reihe von falsch positiven Signalen. Daneben wurden die Neutral-Loss-Spektren der gekennzeichneten Peaks abgebildet, in denen die m/z -Werte der Precursor-Ionen zu erkennen sind (Abb. 89). Alle m/z -Werte stimmten mit denen aus der Literatur überein, woraus geschlossen wurde, dass es sich bei diesen Signalen um GSH-Addukte der reaktiven Metaboliten handelt. Mit dieser Methode konnte jeweils nur ein GSH-Addukt der Substanzen detektiert werden. Das Paracetamol-GSH-Addukt ist am polarsten und die stärkste Retention wurde für das Pulegon-GSH-Addukt erhalten. Wurde bei der Analyse ein Precursor-Ionen-Scan durchgeführt, bei dem Fragment-Ionen mit einem m/z -Wert von 272 detektiert werden, wurden Peaks bei denselben Retentionszeiten erhalten. Dies gibt einen weiteren Hinweis darauf, dass es sich bei ihnen um GSH-Addukte handelt. Für die Precursor-Ionen ergaben sich m/z -Werte, die gegenüber dem Neutral-Loss-Scan aufgrund der negativen Polarität erwartungsgemäß um 2 Da niedriger waren. Weiterhin fiel eine geringe Massensensitivität der GSH-Konjugate auf. Im Gegensatz zu den Quantifizierungen im MRM-Modus (s. II.3.1) konnte bei den Neutral-Loss-Scans durch eine Erhöhung der Elektronenmultiplierspannung eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses im TIC erzielt werden, was die Erkennung von Signalen erleichterte. Anderenfalls müssen die einzelnen MS/MS-Spektren angesehen werden, die während des Chromatographielaufes alle 900 ms aufgezeichnet werden, was zeitaufwändig ist. In nahezu jedem Neutral-Loss-Chromatogramm treten mehrere Signale auf und es ist dabei unbekannt, ob es sich um GSH-Addukte handelt. Die MS/MS-Analyse mit dem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer ist daher zum Erkennen unbekannter reaktiver Metaboliten nur begrenzt geeignet. Es müssen deshalb Maßnahmen ergriffen werden, die eine eindeutige Identifizierung von GSH-Addukten ermöglichen.

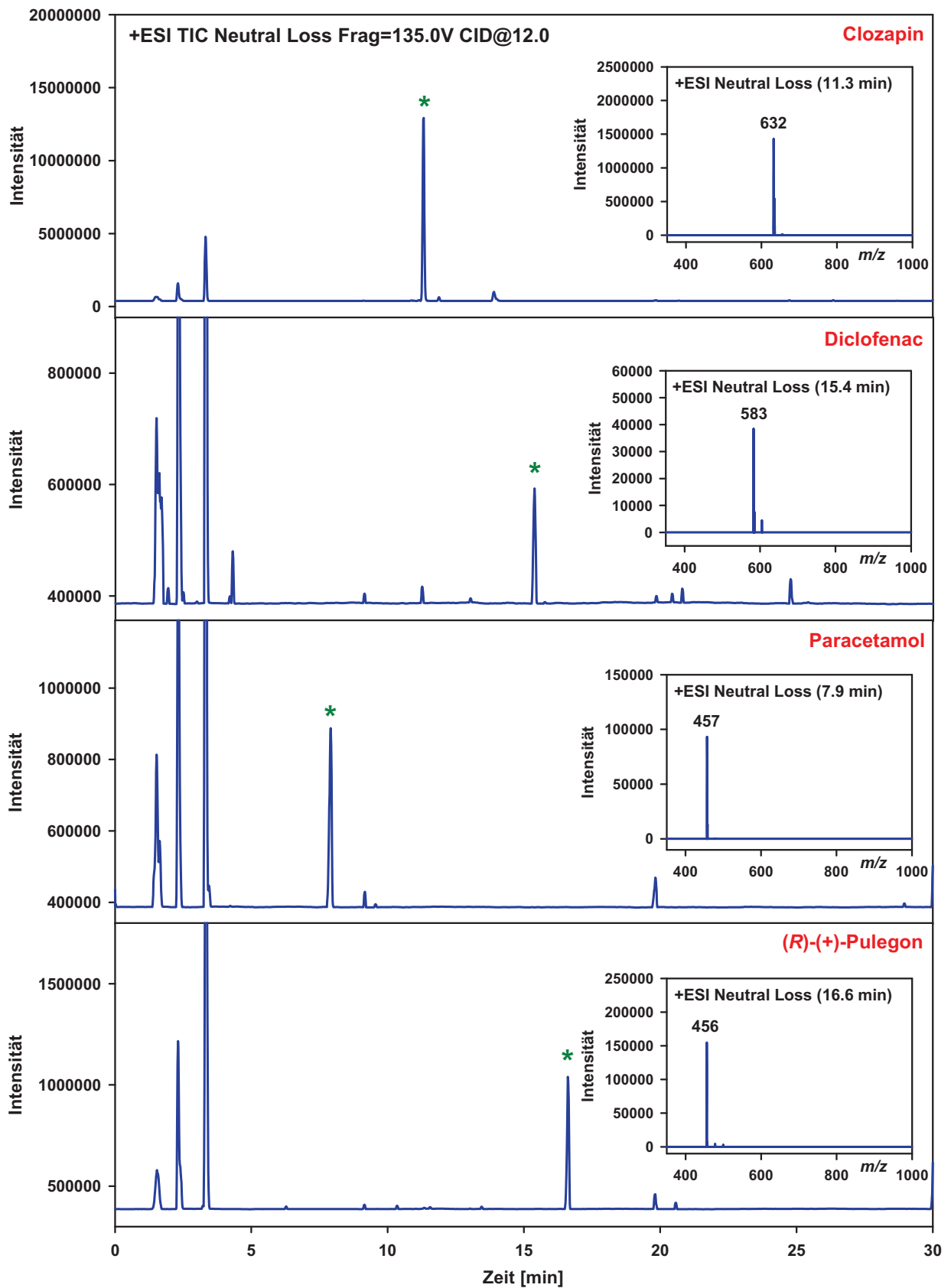


Abb. 89 LC/MS/MS-Analysen im Neutral-Loss-Scan-Modus (M-129) von inkubierten Proben ausgewählter Arznei- und Naturstoffe mit humanen Lebermikrosomen und Glutathion (GSH) zur Detektion von GSH-Addukten (*).

6.2 Metabolismus und Biotoxifizierung von Clozapin und Paracetamol

6.2.1 In-vitro-Metabolismus von Clozapin

Ein Arzneistoff, von dem reaktive Metaboliten bekannt sind, ist das Clozapin.^{292,293} Clozapin wird durch CYP-Enzyme v. a. zum Desmethylclozapin, dem *N*-Oxid- und einigen Hydroxyderivaten metabolisiert.²⁹³ Daneben wird aus Clozapin ein reaktives Intermediat gebildet, aus dem mehrere Glutathion-Addukte entstehen können.^{293,292} Zur Untersuchung des Metabolismus von Clozapin wurde der Arzneistoff mit humanen Lebermikrosomen inkubiert und die Probe mit einer LC/MS-Analyse im positiven Scan-Modus untersucht (Abb. 91). Durch Extraktion der entsprechenden Ionenspuren konnten die erhaltenen Peaks den einzelnen Substanzen zugeordnet werden. Dabei wurden das eingesetzte Clozapin (m/z 327, Retentionszeit 12.7 min), Desmethylclozapin (m/z 313, Retentionszeit 11.7 min) und mehrere Peaks mit einem m/z -Wert von 343 detektiert, was dem um ein Sauerstoffatom schwereren Clozapin entspricht. Bei dem Peak mit einer Retentionszeit von 13.8 min handelt es sich vermutlich um das Clozapin-*N*-oxid, da durch die Oxygenierung des tertiären

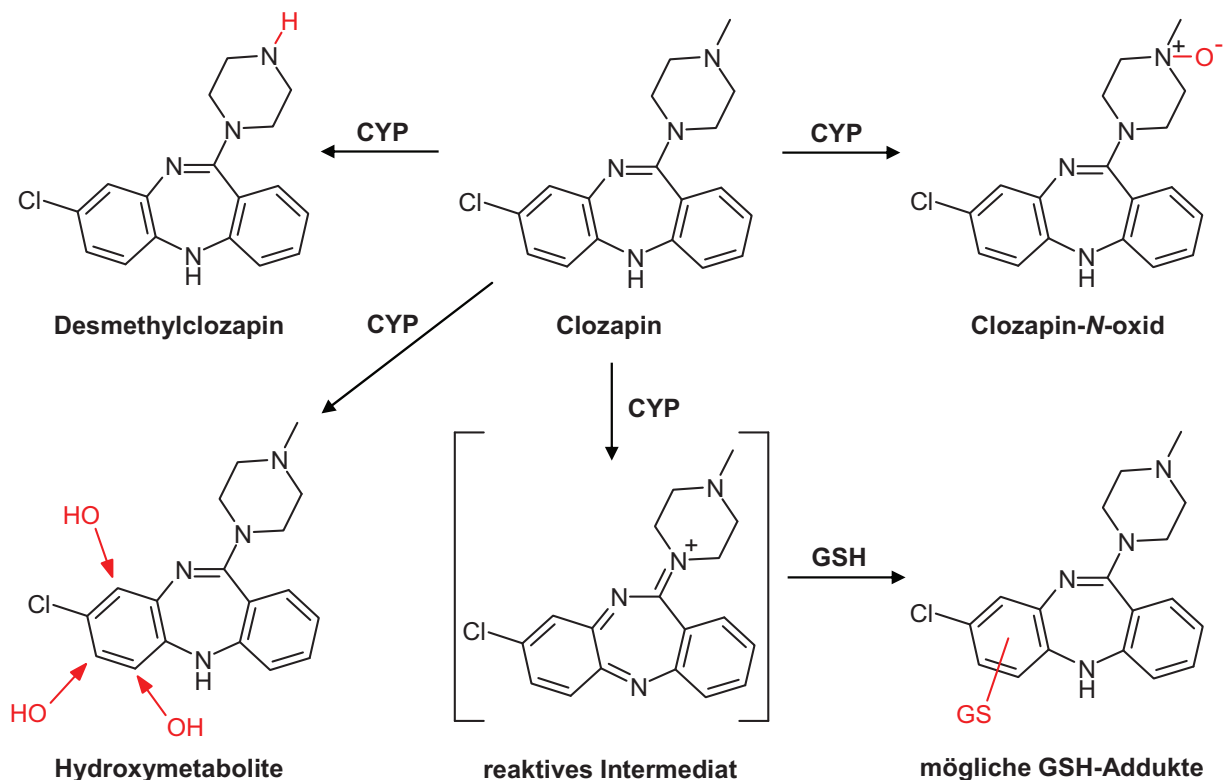


Abb. 90 Metabolismus von Clozapin beim Menschen und Derivatisierung des reaktiven Metaboliten mit Glutathion (GSH).

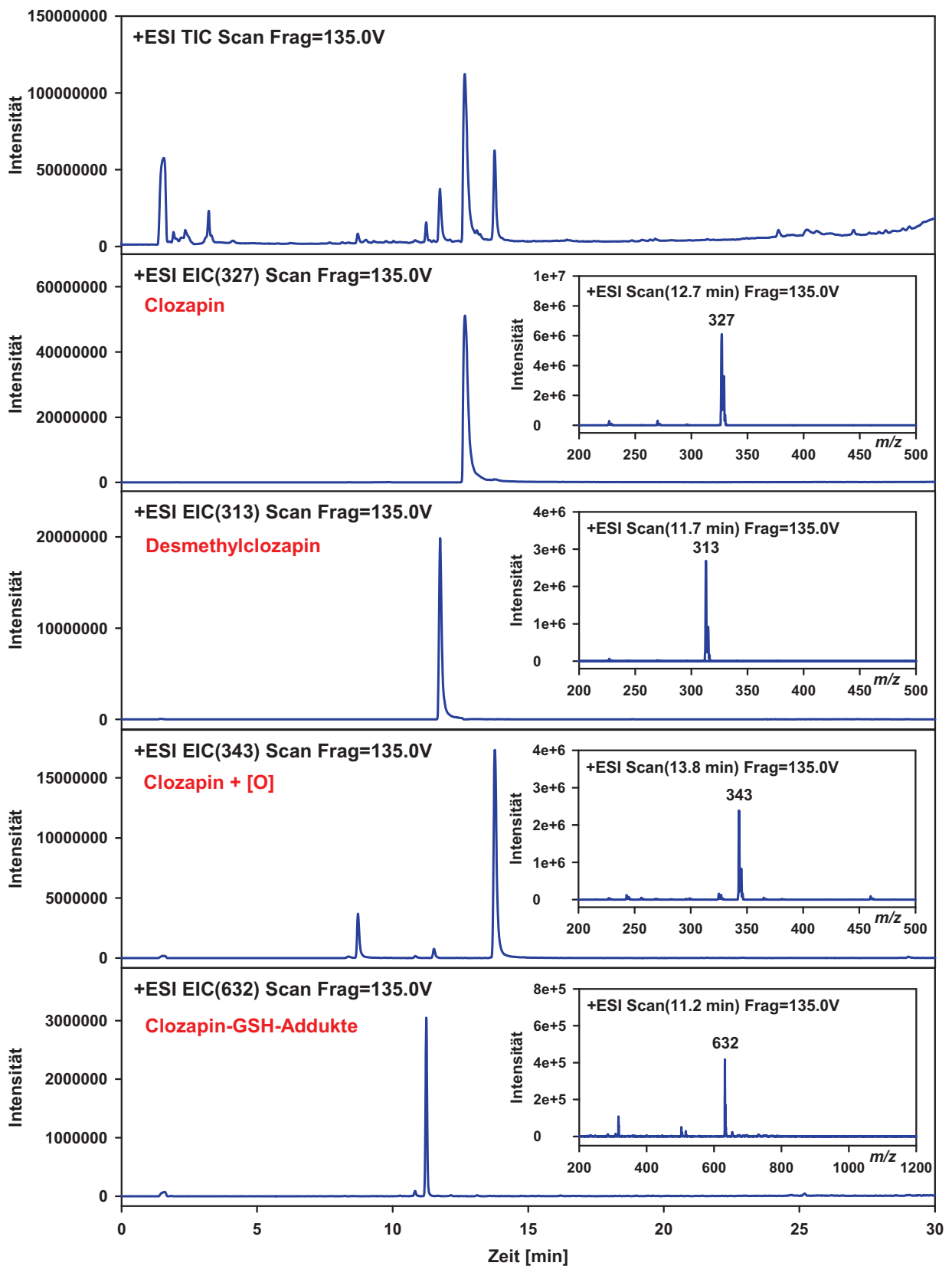


Abb. 91 LC/MS-Analyse einer inkubierten Probe von Clozapin (50 μ M) mit humanen Lebermikrosomen und GSH. Säule: Phenomenex Synergi Max-RP (150 x 4.6 mm; 4 μ m), Fließmittel: 0.1 % Ameisensäure (A) und Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure (B), Gradient: 5 % B von 0 – 2 min, 5 – 50 % B von 2 – 20 min, 50 – 100 % B von 20 – 30 min, Flussrate: 0.8 ml/min.

Stickstoffs die Basizität stark herabgesetzt wird und sich so gegenüber dem im sauren Fließmittel einfach positiv geladenen Clozapin eine stärkere Retention ergibt. Die Hydroxymetaboliten besitzen eine höhere Polarität als das Clozapin, woraus eine kürzere Retentionszeit resultiert. Im Ionenchromatogramm mit einem m/z -Wert von 632, was den Glutathion-Addukten des Clozapins entspricht, sind zwei Signale erkennbar (Abb. 91). Das intensivste Addukt mit einer Retentionszeit von 11.2 min wurde später noch näher untersucht (s. II.6.2.4). Die beobachtete Peakreihenfolge stimmt mit den Literaturangaben überein.^{293,294}

6.2.2 Urinuntersuchung nach Einnahme von Paracetamol

Ein zweiter prominenter Arzneistoff, bei dem die Oxidation durch CYP-Enzyme zu einer Giftung des Moleküls führt, ist das Paracetamol.⁹⁶ Deshalb steht dieser Arzneistoff zunehmend in der Kritik. Der überwiegende Teil des verabreichten Paracetamols wird direkt an der freien Hydroxyfunktion mit Glucuronsäure oder Schwefelsäure konjugiert (Abb. 92). Daneben wird Paracetamol zu dem hochreaktiven *N*-Acetyl-*p*-chinonimin metabolisiert, das mit dem in der Leber

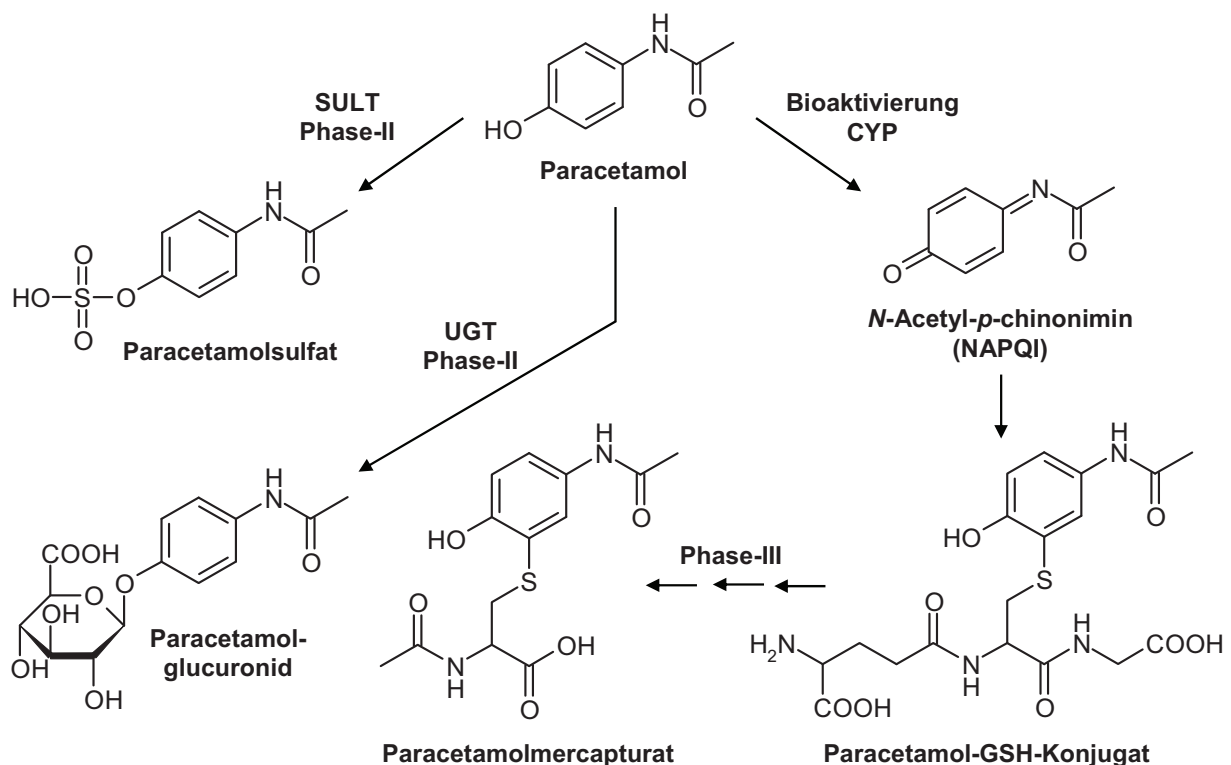


Abb. 92 Paracetamol und seine Hauptmetaboliten im menschlichen Organismus.

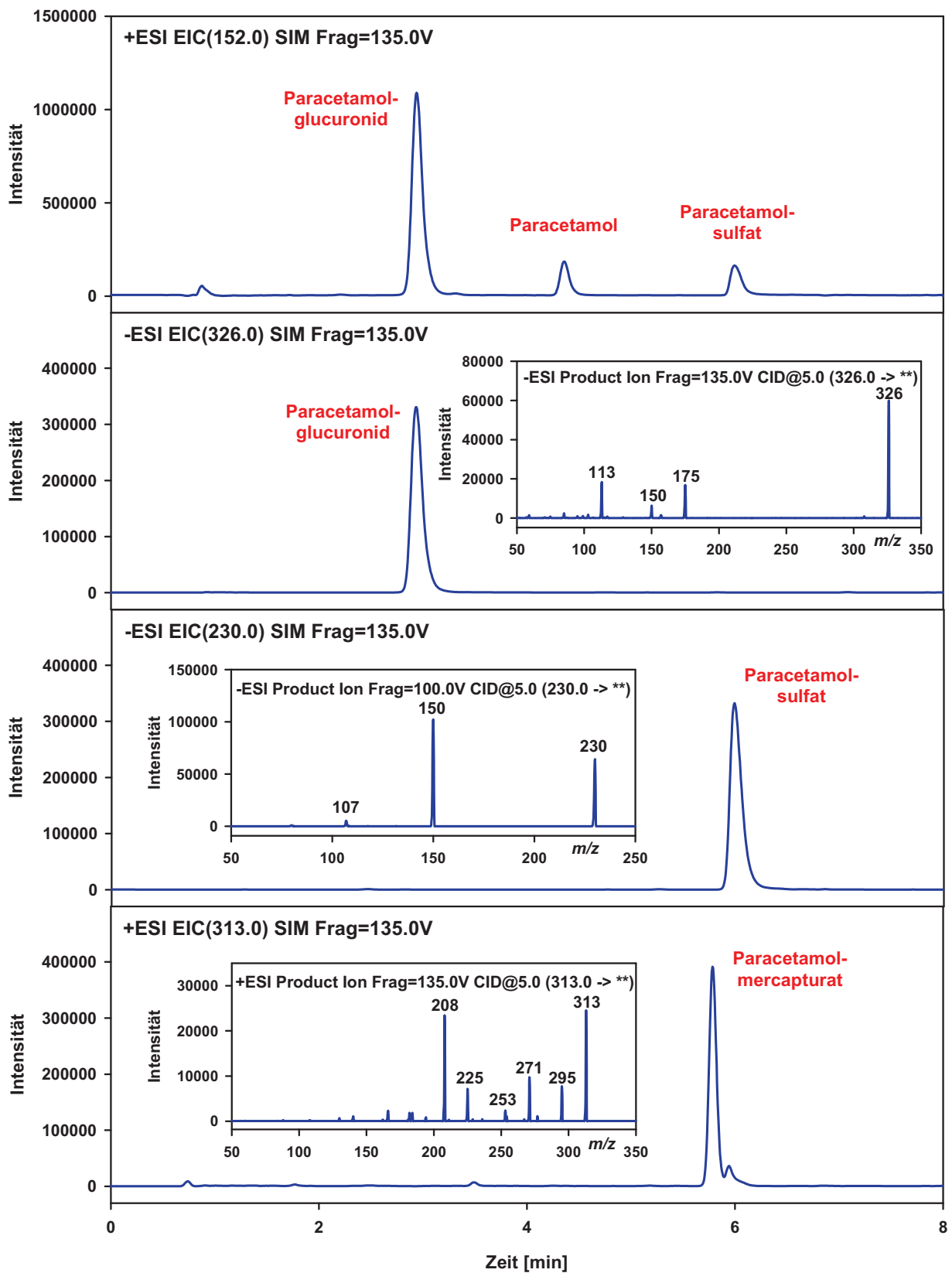


Abb. 93 LC/MS-Chromatogramme und Produktionspektren der detektierten Metaboliten einer Urinprobe 9 h nach Einnahme von 500 mg Paracetamol. Säule: Phenomenex Synergi Max-RP (75 x 4.6 mm; 4 μ m), Fließmittel: 0.1 % Ameisensäure (A) und Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure (B), Gradient: 5 – 25 % B in 8 min, Flussrate: 1 ml/min.

vorhandenen Glutathion reagiert. Anschließend wird aus dem entstandenen Glutathionkonjugat durch Abspaltung der Glutaminsäure und des Glycins sowie einer nachfolgenden Acetylierung das entsprechende Mercaptursäure-Derivat gebildet, das renal eliminiert wird (Abb. 92). Bei einer Paracetamolüberdosierung wird das gespeicherte Glutathion rasch aufgebraucht und es kommt zu einer akuten Leberschädigung, die zum Tode führen kann.⁹⁶ Zur Detektion der Metaboliten des Paracetamols wurde eine LC/MS-Analyse einer Urinprobe nach Einnahme von 500 mg Paracetamol durchgeführt (Abb. 93). Die Detektion erfolgte dabei im SIM-Modus mit positiver und negativer Polarität nach Einstellung der vorausberechneten m/z -Werte der Moleküle der Metaboliten. In allen Ionenchromatogrammen, außer dem mit dem m/z -Wert des Paracetamolglutathionkonjugates, konnten Peaks detektiert werden. Für Paracetamolglucuronid und Paracetamolsulfat, die beide im negativen Modus detektiert wurden, ergaben sich Retentionszeiten von 2.9 und 6.0 min. Das Mercaptursäure-Derivat eluierte nach 5.8 min. Im Ionenchromatogramm mit einem m/z -Wert von 152 sind neben dem unverändert ausgeschiedenen Paracetamol (Retentionszeit 4.3 min) zusätzlich zwei Peaks zu erkennen, deren Retentionszeiten mit dem Glucuronid- und dem Sulfatkonjugat übereinstimmen. Diese sind vermutlich durch Fragmentierung in der Ionenquelle aus den Konjugaten entstanden. Um zu überprüfen, ob es sich bei den erhaltenen Signalen tatsächlich um die entsprechenden Metaboliten handelt, wurden die Retentionszeiten mit Hilfe der Standardsubstanzen überprüft und Produktionsscans durchgeführt. Für das Paracetamolglucuronid wurden dabei charakteristische Fragmente mit einem m/z -Wert von 175 und 150, was um 176 Da leichter als das Precursor-Ion ist, detektiert. Dasselbe Fragment entstand aus dem Paracetamolsulfat, das dadurch den typischen Massenverlust von 80 Da erlitt (Abb. 93). Schließlich hat das erhaltene Produktionsspektrum des Mercaptursäure-Derivates, für das keine Referenzsubstanz zur Verfügung stand, große Ähnlichkeit mit den Angaben aus der Literatur.²⁹⁵

6.2.3 LC/MS/MS-Assays zur Biotoxifizierung von Clozapin und Paracetamol

Für eine Bestimmung der aus Paracetamol und Clozapin gefundenen reaktiven Metaboliten wurde eine LC/MS/MS-Analyse der GSH-Addukte durchgeführt (Abb. 94). Dabei erfolgte die Detektion im MRM-Modus mit positiver Polarität. Den

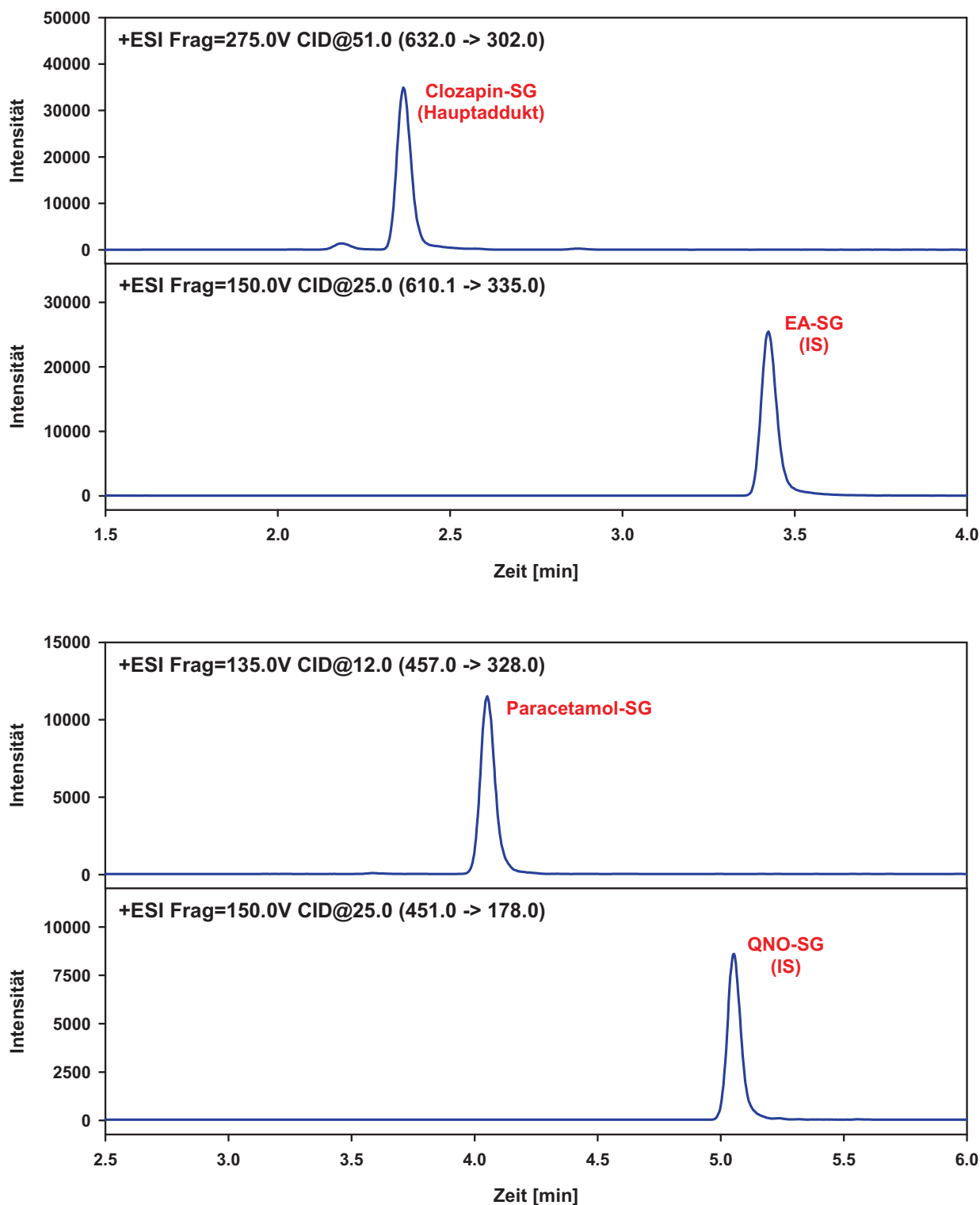


Abb. 94 LC/MS/MS-Chromatogramme der inkubierten Proben von Clozapin bzw. Paracetamol mit humanen Lebermikrosomen und Glutathion. Extrahierte Ionenspuren der Quantifizierübergänge des detektierten Clozapin-Glutathion-Adduktes (Clozapin-SG) und des Paracetamol-Glutathion-Adduktes (Paracetamol-SG) sowie des jeweils als interner Standard (IS) zugesetzten Etacrynsäure-Glutathion-Adduktes (EA-SG) bzw. 4-Chinolinyl-*N*-oxid-*S*-glutathions (QNO-SG). Inkubations- und Analysebedingungen s. V.2.6.3 und V.2.6.4.

inkubierten Proben wurde ein geeigneter interner Standard zugegeben, wofür jeweils eines der synthetisierten GSH-Konjugate ausgewählt wurde (s. II.7.1). Diese besitzen eine dem entsprechenden Addukt vergleichbare Polarität und eluieren bei einer ähnlichen Fließmittelzusammensetzung. Durch Anpassung des Fließmittelgradienten und einer Reduktion der Säulendimensionen konnte die Trennung gegenüber der Screening-Methode (s. II.6.1) in einer wesentlich kürzeren Laufzeit erzielt werden. Das Fließmittel und das verwendete Säulenmaterial blieben hierfür unverändert. Durch die LC/MS/MS-Analyse können niedrigere Konzentrationen der GSH-Addukte detektiert werden, weshalb bei den Inkubationen wesentlich weniger Protein als für das Screening eingesetzt werden muss. Die Methoden ermöglichen eine Ermittlung der Enzymaktivität und die Bestimmung von kinetischen Parametern für die Biotoxifizierung dieser Substanzen. Eine exakte Gehaltsangabe ist aufgrund fehlender Standardsubstanzen allerdings nicht möglich.

6.2.4 Enzymkinetik der Biotoxifizierung von Clozapin und Paracetamol

Um die CYP-Enzyme zu identifizieren, die die Toxifizierung von Clozapin und Paracetamol zu den entsprechenden reaktiven Metaboliten katalysieren, wurden die Arzneistoffe in 3 verschiedenen Konzentrationen mit rekombinanten CYP-Enzymen unter Zugabe von 1 mM Glutathion inkubiert (Abb. 95). Die Detektion der erhaltenen Glutathionaddukte erfolgte mit Hilfe der zuvor optimierten LC/MS/MS-Methoden (s. II.6.2.3). Damit die Aktivität der einzelnen CYP-Enzyme verglichen werden kann, wurden die Peakflächenverhältnisse des Glutathionadduktes und des zugesetzten internen Standards gebildet. Die Bioaktivierung des Clozapins erfolgt bei einer Konzentration von 5 μM durch CYP1A2, CYP2D6 und CYP3A4 (Abb. 95). Wird die Clozapinkonzentration gesteigert, sind mehrere CYP-Enzyme beteiligt. Die Aktivität von CYP2D6 und CYP3A4 geht bei der Erhöhung der Clozapinkonzentration von 50 auf 500 μM geringfügig zurück. Die Ergebnisse der Bioaktivierung von Clozapin sind damit mit den kürzlich veröffentlichten Daten vergleichbar.²⁹⁶ Den größten Anteil an der Giftung des Paracetamols besitzt CYP1A2, daneben sind hauptsächlich CYP2D6 und CYP3A4 beteiligt (Abb. 95). Es ist ein deutlicher Anstieg der Konzentration des reaktiven Metaboliten bei einer Erhöhung der Paracetamolkonzentration zu erkennen. Für das in der Literatur häufig beschriebene CYP2E1 konnte im Vergleich

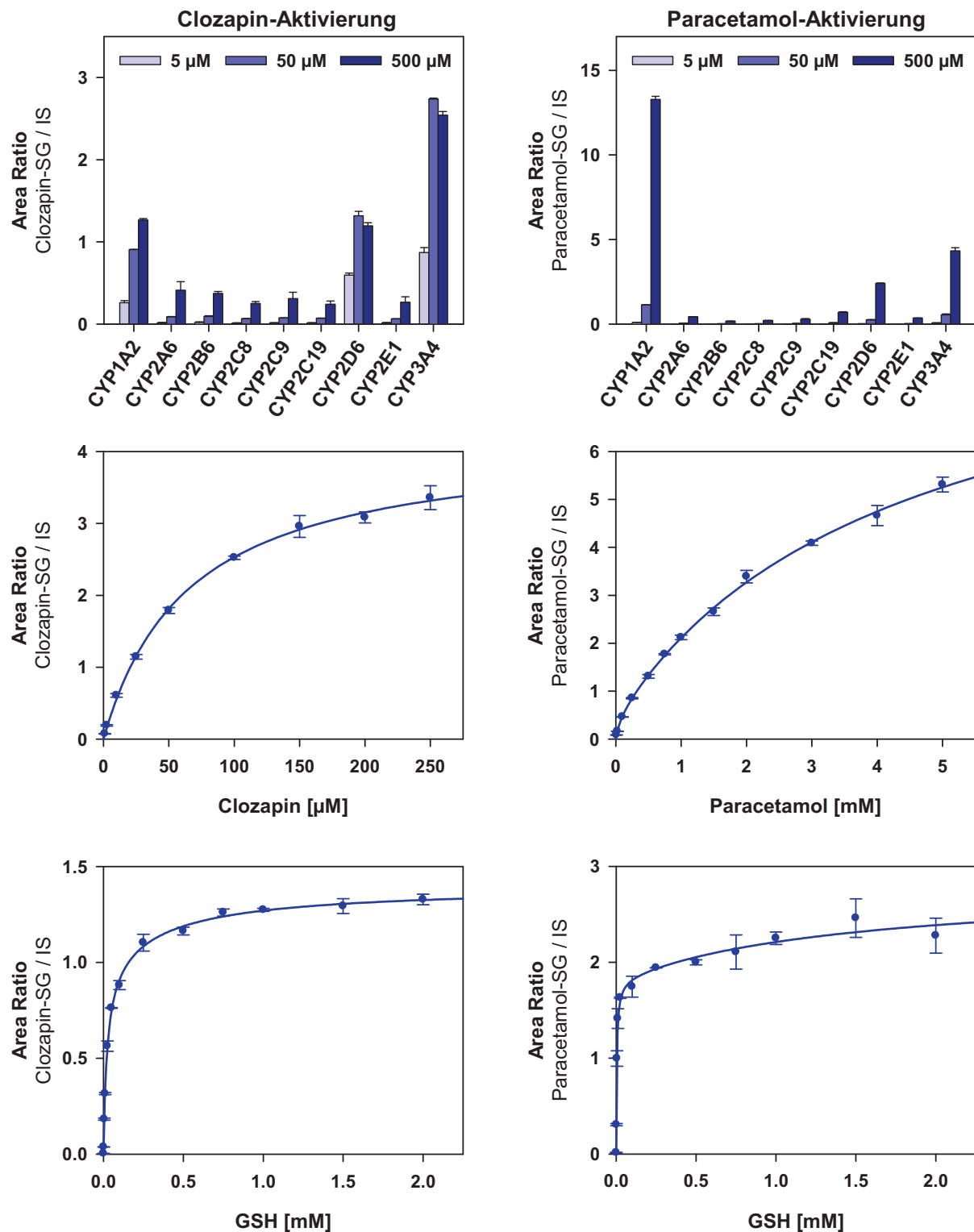


Abb. 95 Detektion der mit Glutathion abgefangenen reaktiven Metaboliten von Clozapin (links) und Paracetamol (rechts) nach Bioaktivierung durch humane Leberenzyme. Aktivitäten einzelner rekombinanter CYP-Enzyme (oben). Substratsättigungskurven für die Umsetzung durch humane Lebermikrosomen in Anwesenheit von 1 mM GSH (Mitte). Einfluss der eingesetzten Glutathionkonzentration bei der Inkubation von Clozapin (50 μM) und Paracetamol (250 μM) mit humanen Lebermikrosomen (unten).

zu den anderen Enzymen nur eine geringe Umsetzung festgestellt werden (Abb. 95).²⁹⁷ Eine mögliche Ursache liegt darin, dass in bisherigen Untersuchungen v. a. CYP-Inhibitoren, wie z. B. Diethyldithiocarbamat, eingesetzt wurden. Diese haben sich allerdings nicht als selektiv herausgestellt (s. II.3.9). Neuere Ergebnisse aus der Literatur zeigen ebenfalls eine Beteiligung weiterer CYP-Enzyme.²⁹⁸ Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Giftung von Clozapin und Paracetamol wurden verschiedene Arzneistoffkonzentrationen mit humanen Lebermikrosomen inkubiert (Abb. 95). Mit steigender Clozapinkonzentration tritt eine Sättigung ein. Für Paracetamol ergibt sich hingegen ein anderes Bild. Die detektierte Menge des Glutathionadduktes nimmt mit steigender Paracetamolkonzentration stetig zu, so dass selbst bei einer Konzentration von 5 mM noch keine Sättigung eingetreten ist (Abb. 95). Diese Beobachtungen könnten die bei einer Paracetamol-Überdosierung auftretende Lebertoxizität erklären, während die Toxizität anderer Arzneistoffe, für die ebenfalls reaktive Metaboliten nachgewiesen wurden, nicht so stark ausgeprägt ist. Die erhaltene Substratsättigungskurve besitzt eine biphasische Charakteristik, da der reaktive Metabolit mit steigender Paracetamolkonzentration durch immer mehr CYP-Enzyme gebildet wird. Wird die eingesetzte Glutathionkonzentration zum Abfangen der reaktiven Metaboliten des Clozapins und des Paracetamols variiert (Abb. 95), ergeben sich ebenfalls Sättigungskurven. Daher muss für eine erfolgreiche Detektion von reaktiven Metaboliten ein ausreichender Überschuss an Glutathion eingesetzt werden, damit die Metaboliten mit dem angebotenen Glutathion und nicht mit anderen Bestandteilen der Inkubationsprobe, wie z. B. den Leberproteinen, reagieren. Beim Paracetamol tritt die Sättigung im Vergleich zum Clozapin bereits bei einer niedrigeren Glutathionkonzentration ein (Abb. 95). Dies ist vermutlich auf die hohe Reaktivität des *N*-Acetyl-*p*-chinonimins zurückzuführen. Bei einer Glutathionkonzentration von 1 mM, die häufig für In-vitro-Inkubationen zur Detektion von reaktiven Metaboliten verwendet wird, werden in beiden Fällen Konzentrationen der Glutathionaddukte erreicht, die nahe am Maximalwert liegen.

6.3 Glutathion-Derivate zum Abfangen von reaktiven Metaboliten

Neben dem natürlichen Glutathion können modifizierte Glutathion-Derivate (Abb. 96) zum Abfangen der reaktiven Metaboliten eingesetzt werden, was verschiedene

Vorteile bietet. Beispielsweise ist ein Ethylester des Glutathions (GSH-EE) erhältlich, dessen Konjugate eine wesentlich höhere Massensensitivität besitzen.²⁹⁹ Eine Derivatisierung der freien Aminogruppe des Glutaminsäurerestes mit einem Fluoreszenzmarker bietet die Möglichkeit einer HPLC/Fluoreszenzanalyse zur Detektion der reaktiven Metaboliten. Eine Alternative hierfür ist das in der Literatur beschriebene dansylierte Glutathion (dGSH).²⁹⁰ Neben dGSH wurden in dieser Arbeit Glutathion-Derivate mit einem β -Carbolinrest (β C-GSH) und mit einem Fluorenylmethoxycarbonylrest (FMOC-GSH) hergestellt. Die Einführung eines Biotins (Bio-GSH) bietet die Möglichkeit der Immobilisierung des Glutathions z. B. auf einer streptavidinbeschichteten Mikrotiterplatte. Daher wurde an der Etablierung eines Mikrotiterplattenassays zur Detektion von reaktiven Metaboliten gearbeitet, der eine wesentlich kostengünstigere Methode darstellen würde. Bei einer Inkubation in der

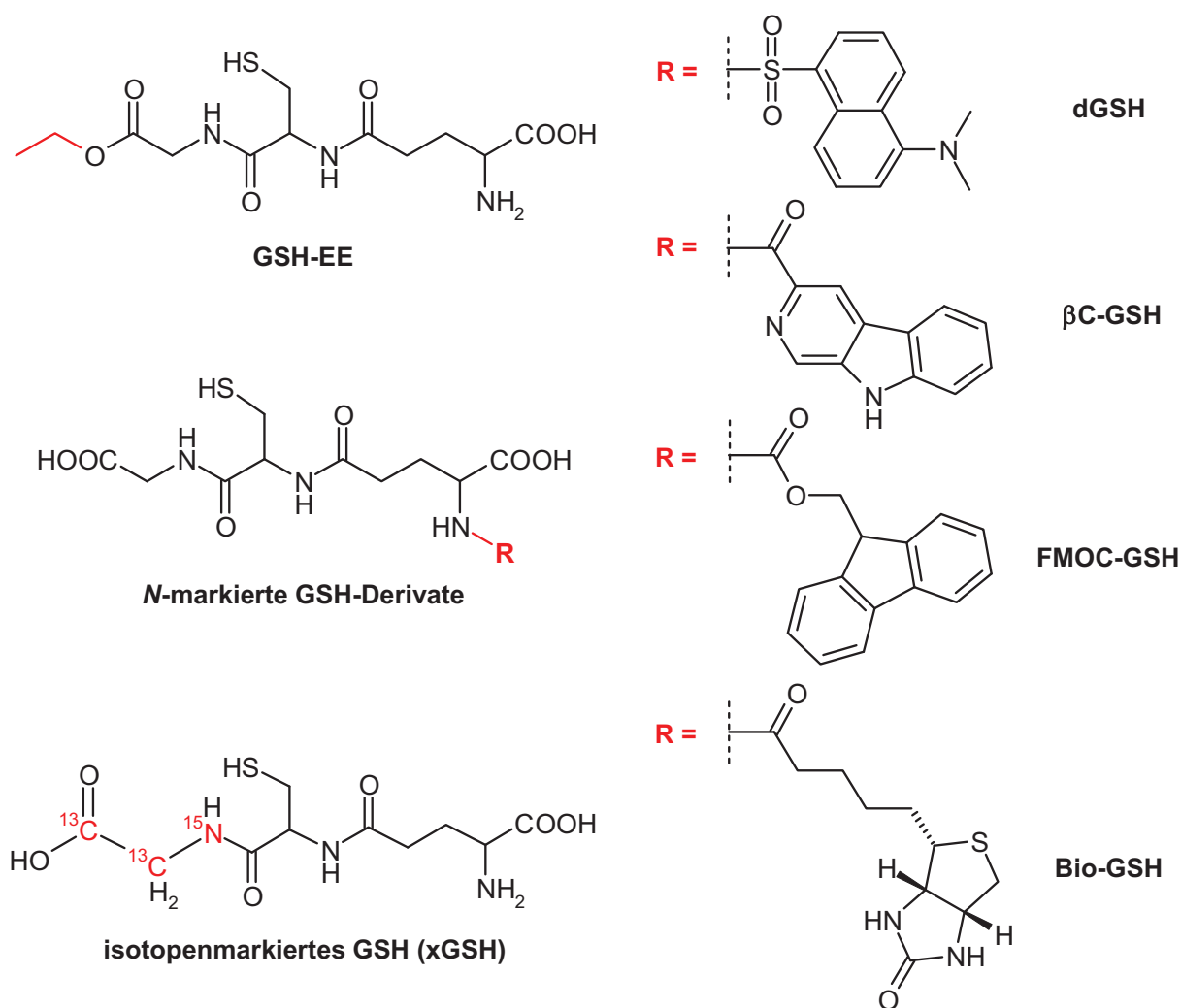


Abb. 96 Glutathion-Derivate zur Detektion von reaktiven Metaboliten.

Mikrotiterplatte können die entstandenen reaktiven Metaboliten an das auf der Oberfläche aufgebrauchte Bio-GSH binden. Nach dem Waschen müssen die nichtmodifizierten freien Thiolgruppen erfasst werden. Hierfür wurde eine Umsetzung mit maleinimidaktivierter Meerrettichperoxidase durchgeführt. Nach erneutem Waschen wurde Tetramethylbenzidin als Substrat zugegeben und nach Inkubation sowie dem Abstoppen der Reaktion die Absorption der Proben bestimmt. Ist die erhaltene Absorption kleiner im Vergleich zu einer Blindprobe, haben reaktive Metaboliten gebunden. Allerdings wurden bei diesen Versuchen, vermutlich aufgrund einer unspezifischen Bindung mikrosomaler Proteine, keine reproduzierbaren Ergebnisse erhalten. Somit musste dieser Ansatz leider verworfen werden.

Im Folgenden wird auf die Synthese der markierten Glutathion-Derivate eingegangen (s. II.6.3.1) und ihre Eignung zum Einsatz bei der Detektion von reaktiven Metaboliten anhand von ausgewählten Arzneistoffen untersucht (s. II.6.3.2). Darüber hinaus wurde ein kommerziell erhältliches isotopenmarkiertes Glutathion (xGSH) verwendet (s. II.6.3.3).¹⁰⁷

6.3.1 Synthese und Aufreinigung von *N*-markierten Glutathion-Derivaten

In dieser Arbeit wurde eine Reihe von *N*-markierten Glutathion-Derivaten (Abb. 96) synthetisiert, die zur Detektion von reaktiven Metaboliten dienen sollten. Da für alle Derivate ähnliche Routen gewählt wurden, ist in Abb. 97 nur die Synthese von Bio-GSH dargestellt. Aufgrund der größeren Nukleophilie der Thiolgruppe gegenüber der zu derivatisierenden Aminogruppe des GSH musste die Thiolgruppe geschützt werden. Aus diesem Grund wurde in allen Fällen oxidiertes Glutathion (GSSG) als Edukt eingesetzt. Für eine Derivatisierung der freien Aminogruppe konnten für dGSH und Fmoc-GSH die entsprechenden Säurechloride, Dansylchlorid und Fmoc-Chlorid, eingesetzt werden. Bei Bio-GSH und β C-GSH muss die Carboxylgruppe des Markers aktiviert werden, weshalb zunächst mit *N*-Hydroxysuccinimid (NHS-OH) ein Aktivester gebildet wurde. Als Kondensationsreagenz hierzu diente Dicyclohexylcarbodiimid (DCC). Die erforderliche β -Carbolin-3-carbonsäure wurde zuvor durch Hydrolyse aus dem kommerziell erhältlichen Ethylester hergestellt. GSSG ist nur in wässrigen Lösungen löslich, während die Kupplungsreagenzien sich überwiegend in organischem Lösungsmittel, wie z. B. DMF oder ACN, lösen. Aus diesem Grund wurde GSSG in einer Pufferlösung gelöst und diese zur Lösung des

Derivatisierungsreagenzes gegeben. Für eine Reaktion darf die Aminogruppe des GSSG nicht protoniert vorliegen. Hierfür war ein pH-Wert von etwa 7-8 ausreichend, so dass die Aminogruppe zumindest teilweise ungeladen vorliegt. Stark alkalische pH-Werte fördern die Hydrolyse des Aktivesters bzw. der Säurechloride und wurden daher vermieden. Die Reaktionskontrolle mit HPLC/UV- bzw. LC/MS-Analyse zeigte, dass mit allen Markierungsreagenzien neben den disubstituierten auch monosubstituierte GSSG-Derivate entstehen. Aufgrund der präparativen HPLC-Reinigung des Endproduktes wurden die Zwischenstufen in den meisten Fällen nicht isoliert, sondern jeweils mit dem einrotierten Ansatz der Zwischenstufen weitergearbeitet. Im letzten Schritt erfolgte die Reduktion des Disulfids mit Dithiothreitol (DTT), was die gewünschten GSH-Derivate lieferte. Die Reduktion wurde ebenfalls in wässriger Pufferlösung durchgeführt. Dabei ist auf einen ausreichend hohen pH-Wert von mindestens 9 zu achten. Wegen der Oxidationsempfindlichkeit der GSH-Derivate und da diese Peptide meist nicht kristallin anfallen, wurde das Eluat nach der präparativen HPLC-Reinigung gefriergetrocknet.

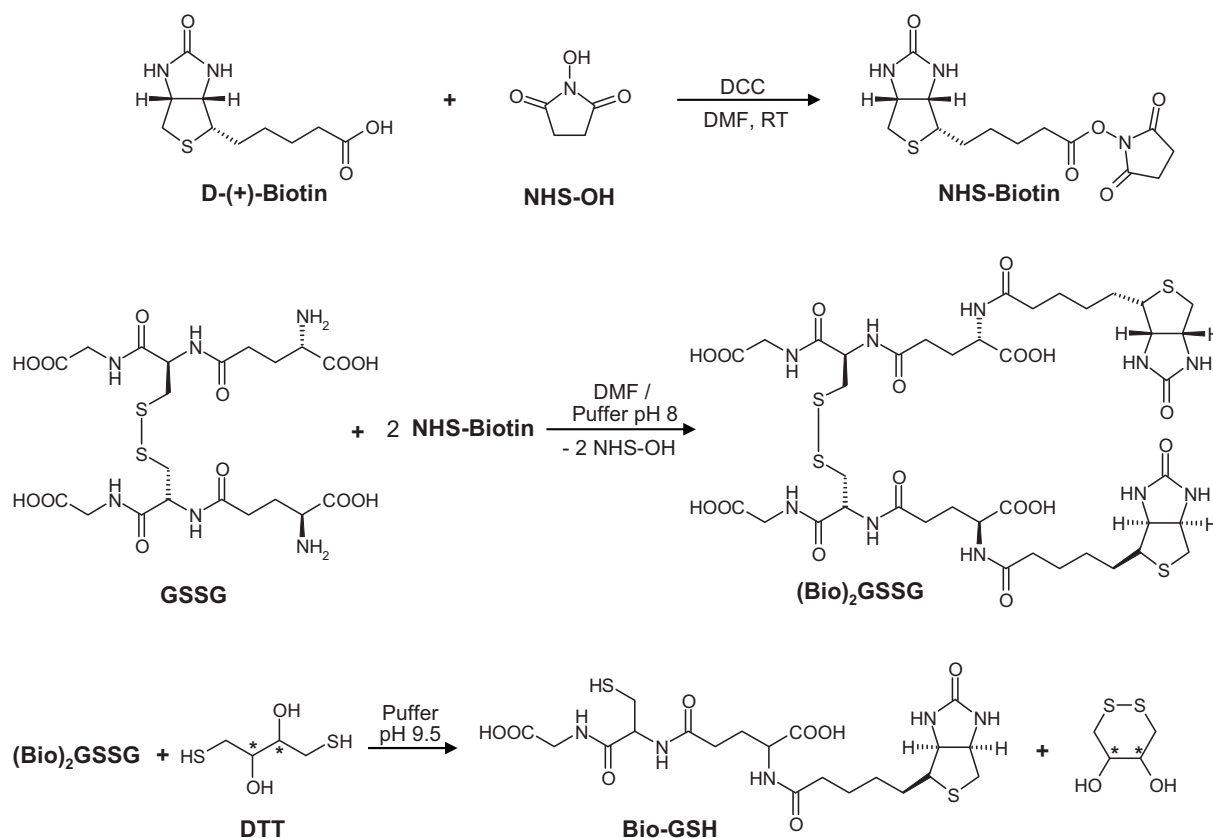


Abb. 97 Synthese von biotinyliertem Glutathion (Bio-GSH).

6.3.2 Inkubationen mit den markierten Glutathion-Derivaten

LC/MS-Analyse

Um zu überprüfen, ob mit den Glutathion-Derivaten reaktive Metaboliten abgefangen werden können, wurde Clozapin mit humanen Lebermikrosomen und jeweils GSH-EE, dGSH, β C-GSH, FMOC-GSH und Bio-GSH inkubiert. Die Proben wurden mit Hilfe der LC/MS-Analyse im positiven Full-Scan-Modus unter Anwendung desselben Fließmittelgradienten, wie bei der Screening-Methode mit dem natürlichen GSH, untersucht (s. II.6.1). In Abb. 98 sind jeweils der totale Ionenstrom (TIC) mit den m/z -Werten der Signale und die extrahierten Ionenchromatogramme (EIC) mit den vorausgerechneten m/z -Werten der Addukte zu sehen. Zusätzlich wurden in separaten Läufen Fragmentationenspektren der GSH-Addukte erhalten (Abb. 98). In allen Proben waren, wie bereits bei der Untersuchung mit GSH, neben Clozapin (m/z 327) die Metaboliten Desmethylclozapin (m/z 313) und Clozapin-*N*-oxid (m/z 343) enthalten. In allen Chromatogrammen können die Peaks der im Überschuss eingesetzten GSH-Derivate erkannt werden. Darüber hinaus konnte das Disulfid der GSH-Derivate detektiert werden, das ebenfalls bei der Inkubation durch Oxidation entsteht (Abb. 98). Aufgrund der chemischen Modifizierung besitzen die Addukte unterschiedliche Retentionszeiten und eluieren in den meisten Fällen kurz nach dem jeweiligen GSH-Derivat. Mit GSH-EE konnte ein Addukt mit einem m/z -Wert von 660 und einer Retentionszeit von 12.7 min, was mit Clozapin coeluierte, detektiert werden. Das Produktionenspektrum besitzt als einziges aller Addukte ein Fragment-Ion, das um 129 Da leichter ist. Grund hierfür ist, dass bei GSH-EE die Carboxylgruppe am Glycinrest verestert ist und es kann daher ebenfalls Pyroglutaminsäure abgespalten werden. Mit dGSH konnte ein Addukt mit einem m/z -Wert von 826 detektiert werden, für das sich eine deutlich längere Retentionszeit als mit GSH-EE ergab (Abb. 98). Das beim Einsatz von β C-GSH erhaltene Signal des Adduktes mit einem m/z -Wert von 826 besitzt eine äußerst geringe Intensität im Vergleich zu den anderen GSH-Derivaten (Abb. 98). Aus diesem Grund konnte kein brauchbares Produktionenspektrum erhalten werden. Parallel dazu konnte in der Probe ebenfalls nur eine geringe Menge des Disulfid-Derivates nachgewiesen werden. β C-GSH scheint daher zum Abfangen reaktiver Metaboliten nicht besonders geeignet zu sein.

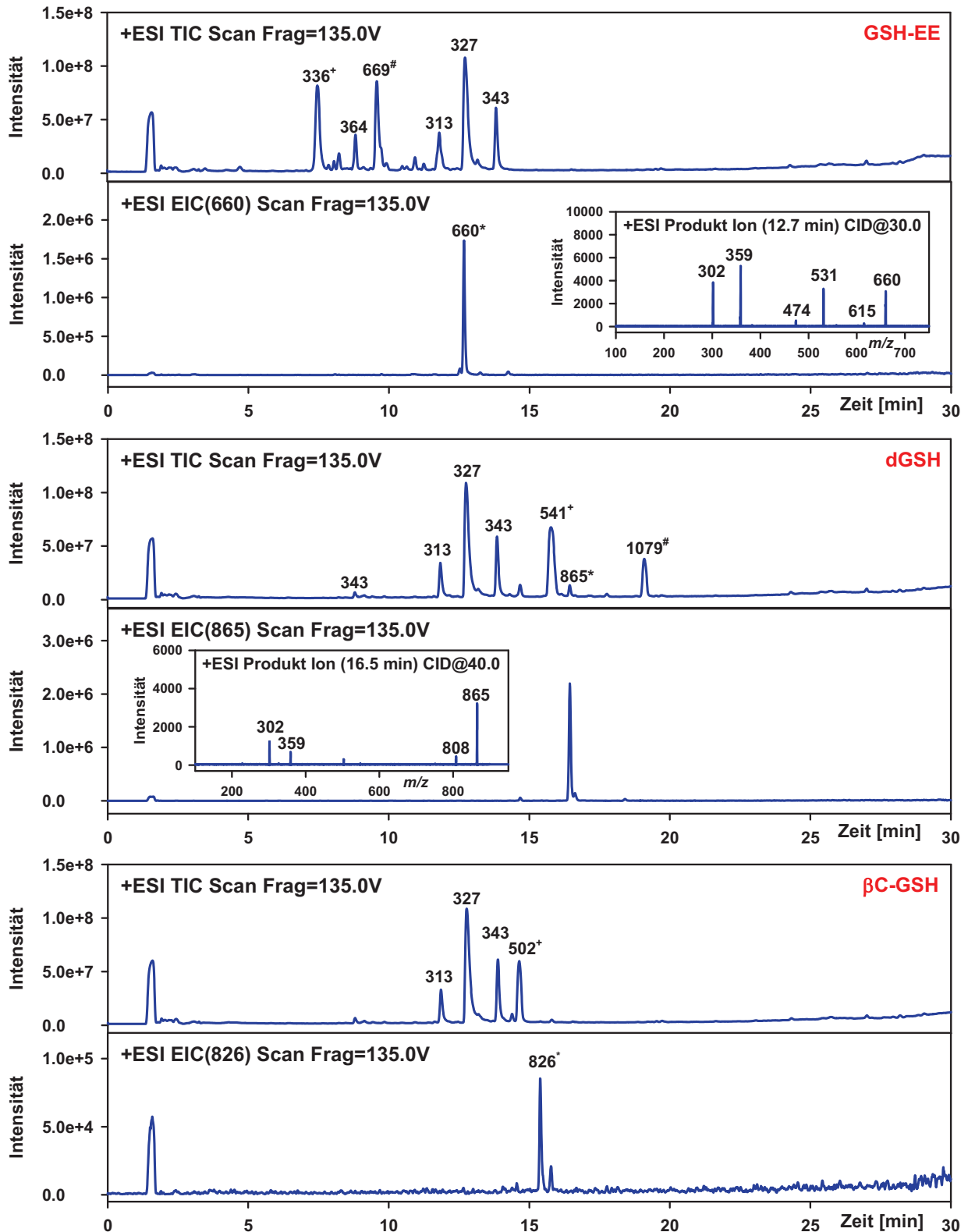


Abb. 98 LC/MS-Chromatogramme der inkubierten Proben von Clozapin (50 µM) mit humanen Lebermikrosomen und verschiedenen GSH-Derivaten. Detektion von Clozapin (m/z 327), Desmethylclozapin (m/z 313), Clozapin-*N*-oxid (m/z 343), eingesetzte GSH-Derivate (+), Disulfid des entsprechenden GSH-Derivates (#) und Addukte von Clozapin mit den GSH-Derivaten (*). Zusätzlich sind die extrahierten Ionenchromatogramme der vorausberechneten m/z -Werte der GSH-Addukte und die dazugehörigen Produktionenspektren dargestellt.

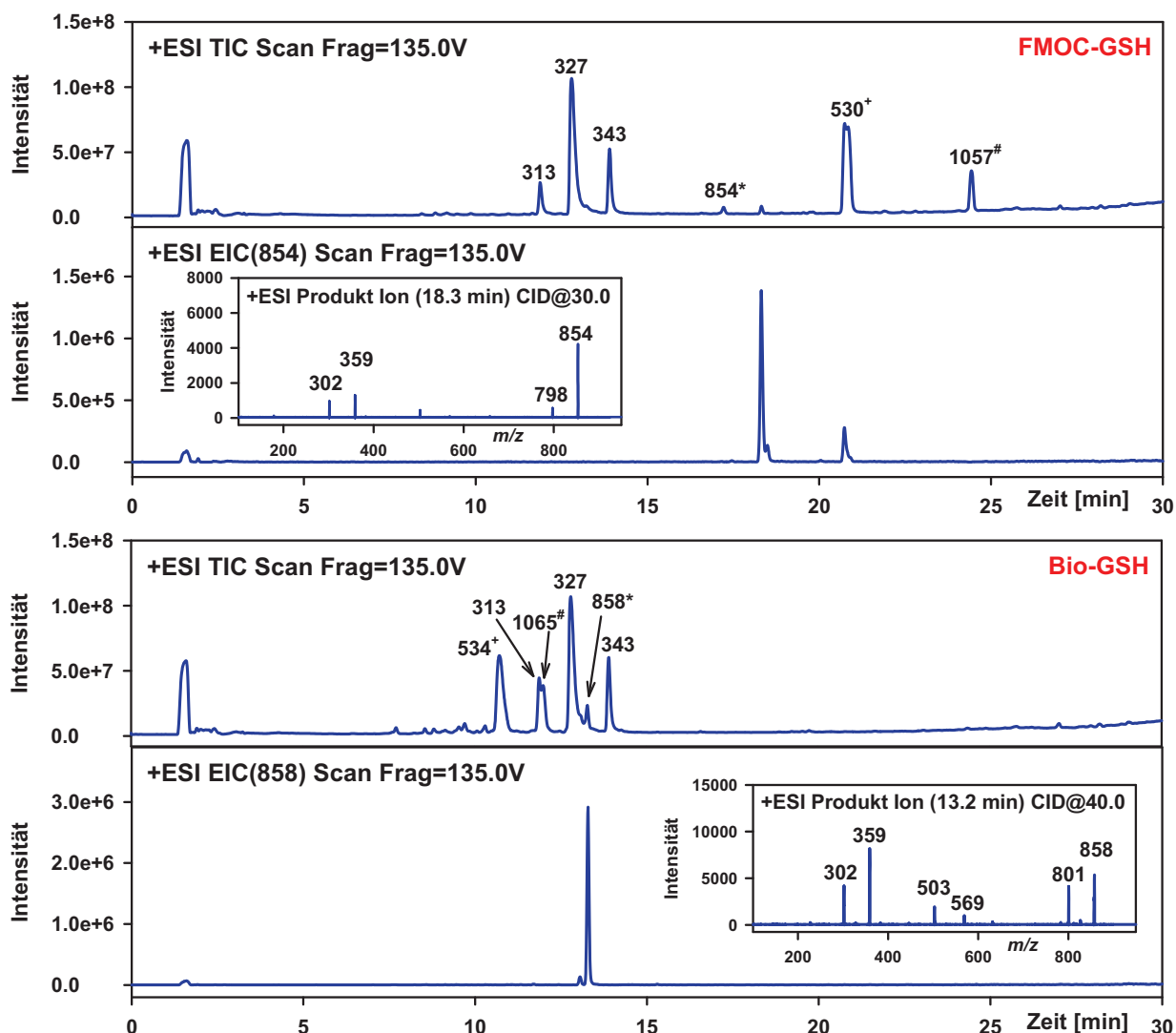


Abb. 98 (Fortsetzung) LC/MS-Chromatogramme der inkubierten Proben von Clozapin (50 μ M) mit humanen Lebermikrosomen und verschiedenen GSH-Derivaten. Detektion von Clozapin (m/z 327), Desmethylclozapin (m/z 313), Clozapin-*N*-oxid (m/z 343), eingesetzte GSH-Derivate (+), Disulfid des entsprechenden GSH-Derivates (#) und Addukte von Clozapin mit den GSH-Derivaten (*). Zusätzlich sind die extrahierten Ionenchromatogramme der vorausgerechneten m/z -Werte der GSH-Addukte und die dazugehörigen Produktionenspektren dargestellt.

Mit FMOc-GSH sind im EIC mit einem m/z -Wert von 854 zwei Signale zu erkennen (Abb. 98). FMOc-GSH ist deutlich lipophiler und eluiert später als die Addukte. Bei Bio-GSH wurde ein Addukt mit einem m/z -Wert von 858 detektiert und es ergab sich eine schlechtere Auftrennung der Analyten (Abb. 98). Betrachtet man die Produktionenspektren der Addukte mit den *N*-markierten GSH-Derivaten, fallen keine charakteristischen Fragmente auf. Daher ist die Anwendung eines Neutral-Loss- oder Precursor-Ionen-Scans zur Detektion reaktiver Metaboliten bei Verwendung dieser Trapping-Reagenzien nicht möglich. Das bei allen GSH-Derivaten detektierte

Fragment mit einem m/z -Wert von 302 tritt nur bei den Addukten mit Clozapin auf und ist daher kein charakteristisches Fragment für GSH-Addukte. Darüber hinaus ist zur Fragmentierung der Addukte mit den N -markierten GSH-Derivaten eine deutlich höhere Kollisionsenergie im Vergleich zum GSH (s. II.6.1) erforderlich.

HPLC/Fluoreszenzanalyse

Zur Optimierung der HPLC/Fluoreszenzanalyse für die Detektion reaktiver Metaboliten wurden zunächst Anregungs- und Emissionsspektren von dGSH aufgenommen (Abb. 99). Aufgrund der protonierbaren Dimethylaminofunktion besitzt dGSH ein pH-abhängiges Fluoreszenzspektrum. Im Fließmittel mit 0.1 % Ameisensäure besitzt das Anregungsspektrum ein Maximum bei 345 nm und eine Schulter bei 250 nm. Im Vergleich zu 345 nm kann durch eine Anregung bei 250 nm die Signalintensität der Fluoreszenz um etwa das Dreifache gesteigert werden (Abb. 99). Wird dem Fließmittel 0.05 % Trifluoressigsäure zugesetzt, verschiebt sich das Anregungsmaximum auf 285 nm (Abb. 99). In beiden Fließmitteln betrug das Emissionsmaximum 525 nm. Es fiel auf, dass die Fluoreszenzintensität von dGSH im Vergleich zu anderen untersuchten Substanzen, wie z. B. den Harman-Derivaten (s. II.5), deutlich geringer ausfällt. Um typische Metabolitenkonzentrationen detektieren zu können, wurde daher die Photomultiplier-Tube-Spannung (PMT-Gain) auf 14 erhöht.

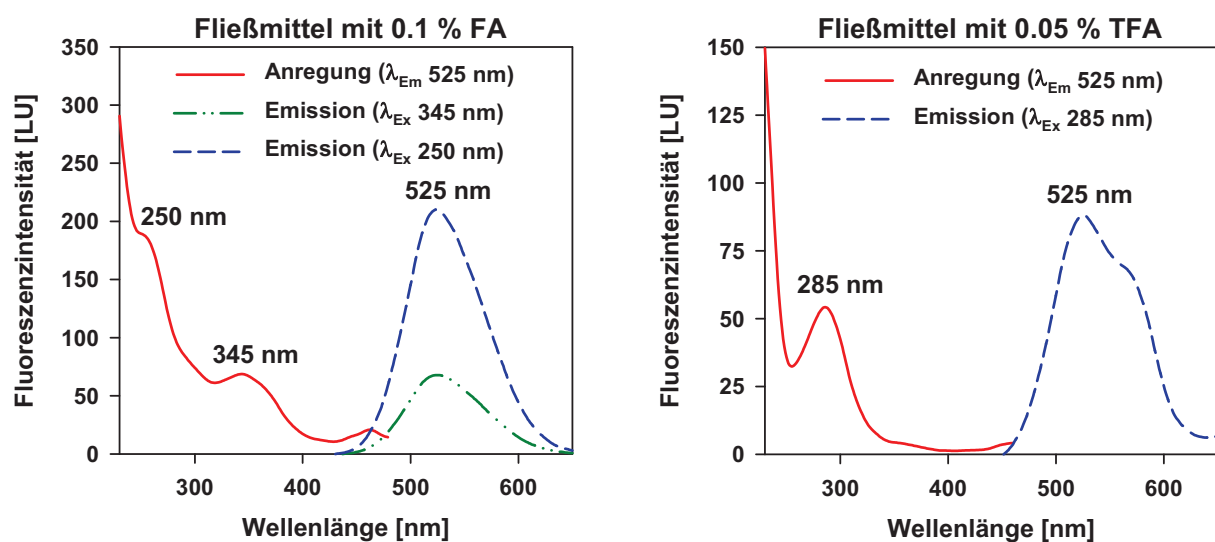


Abb. 99 Anregungs- und Emissionsspektren von dansyliertem Glutathion, gemessen mit dem HPLC/Fluoreszenzdetektor bei Verwendung von Ameisensäure (FA) und Trifluoressigsäure (TFA) als Fließmittelzusatz.

Hintergrund der Verwendung von fluoreszenzmarkierten GSH-Derivaten ist, dass die erhaltenen Addukte ebenfalls fluoreszieren und daher keine massenspektrometrische Detektion mehr erforderlich ist. Durch die HPLC/Fluoreszenzanalyse soll eine selektive und sensitive Detektion der reaktiven Metaboliten möglich sein.²⁹⁰ In Abb. 100 ist das HPLC/Fluoreszenzchromatogramm einer Probe abgebildet, bei der Clozapin mit dGSH und humanen Lebermikrosomen inkubiert wurde. Um einen besseren Methodenvergleich zu ermöglichen, wurden dieselben chromatographischen Parameter verwendet, wie bei der LC/MS/MS-Analyse (Abb. 98). Da das markierte GSH-Derivat in einer hohen Konzentration (1 mM) eingesetzt wird, ergibt sich ein breiter Peak, der bis über die Detektorgrenze hinausgeht. Aufgrund der unter den Inkubationsbedingungen auftretenden Oxidation kann ebenfalls das Disulfid des dansylierten Glutathions (ddGSSG) detektiert werden. Darüber hinaus sind weitere Peaks zu erkennen, bei denen es sich um Verunreinigungen oder Abbauprodukte des dGSH handelt. Eine Identifizierung der GSH-Addukte konnte nur durch den Vergleich mit einer Blindprobe bzw. anhand der bereits vorliegenden Ergebnisse der LC/MS/MS-Analyse (Abb. 98) vorgenommen

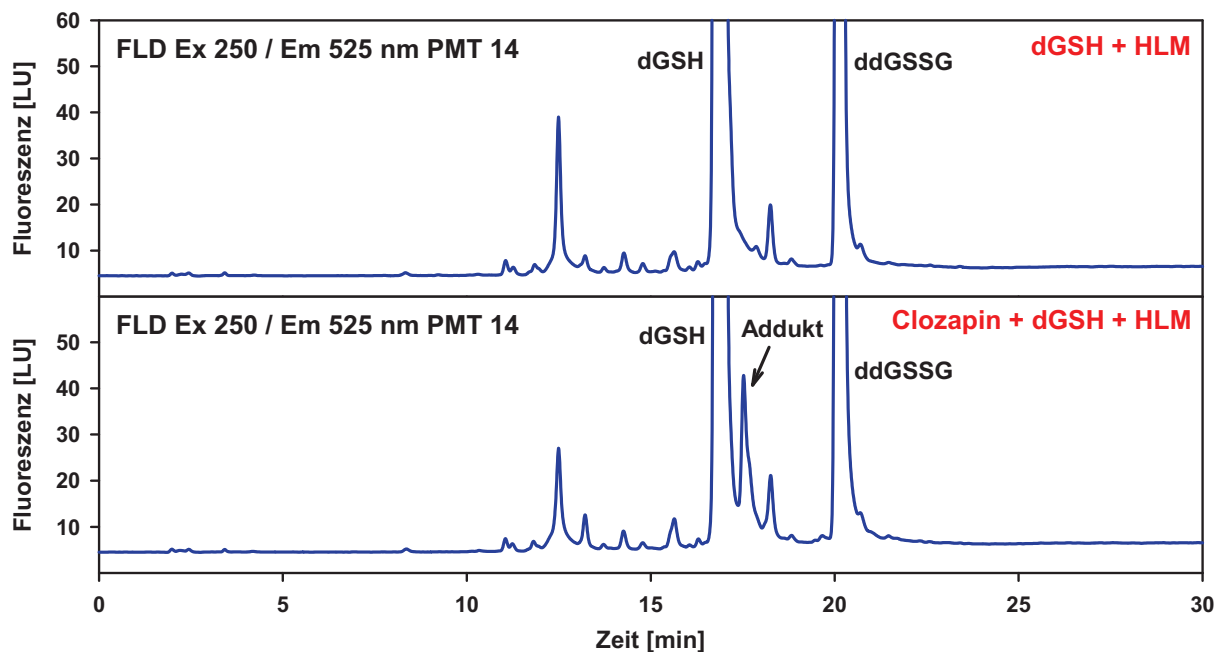


Abb. 100 HPLC/Fluoreszenzanalyse nach Inkubation von Clozapin mit dansyliertem Glutathion (dGSH) und humanen Lebermikrosomen (HLM) zur Detektion von Addukten reaktiver Metaboliten. Inkubations- und Chromatographiebedingungen wie in Abb. 98.

werden. Zudem können sich diese störenden Signale mit den Addukten der reaktiven Metaboliten überlagern, was in diesem Fall eine Detektion unmöglich macht. Aus diesem Grund muss das eingesetzte Fängerreagenz eine hohe Reinheit besitzen. Die in die HPLC/Fluoreszenzanalyse gesetzten Erwartungen haben sich daher in der Praxis nicht erfüllt, weshalb β C-GSH und FMOC-GSH nicht weiter untersucht wurden.

6.3.3 Einsatz von isotopenmarkiertem Glutathion

Eine weitere Möglichkeit der Eliminierung falsch positiver Signale ist die Verwendung von isotopenmarkiertem Glutathion.¹⁰⁷ Hierfür ist inzwischen ein Derivat kommerziell erhältlich, das zwei ^{13}C -Atome und ein ^{15}N -Atom enthält, und damit um 3 Da schwerer ist als das nicht isotopenmarkierte Glutathion (Abb. 101). Bei einer Inkubation mit humanen Lebermikrosomen werden der Probe beide Glutathion-Derivate zum Abfangen der gebildeten reaktiven Metaboliten in äquimolarer Menge zugegeben. Bei der anschließend durchgeführten LC/MS/MS-Analyse kann ein Masseverlust von 129 Da für beide Glutathionkonjugate detektiert werden.¹⁰⁷ Dies ist möglich, da sich die Isotopenmarkierung am Glycin befindet und die Massendifferenz durch die Abspaltung der Pyroglutaminsäure zustande kommt. Beide Konjugate besitzen aufgrund ihrer chemischen Äquivalenz im LC/MS/MS-Chromatogramm dieselbe Retentionszeit im Gegensatz zur Verwendung von chemisch modifizierten Glutathion-Derivaten. Im Neutral-Loss-Spektrum des erhaltenen Peaks sind allerdings zwei Signale für die Precursor-Massen der beiden Konjugate erkennbar, die sich aufgrund der Massendifferenz der eingesetzten Glutathion-Derivate um 3 Da unterscheiden (Abb. 101). Befindet sich eine Substanz in der Probe, die ebenfalls ein um 129 Da leichteres Fragment ergibt, aber kein Glutathion-Konjugat ist, tritt ein solches Signalpaar im Spektrum nicht auf. Somit können die bei der LC/MS/MS-Analyse erhaltenen Signale eindeutig als Glutathion-Konjugate identifiziert werden. Im Folgenden soll die Verwendung von isotopenmarkierten Glutathion am Beispiel der Bioaktivierung von Paracetamol und Clozapin untersucht werden.

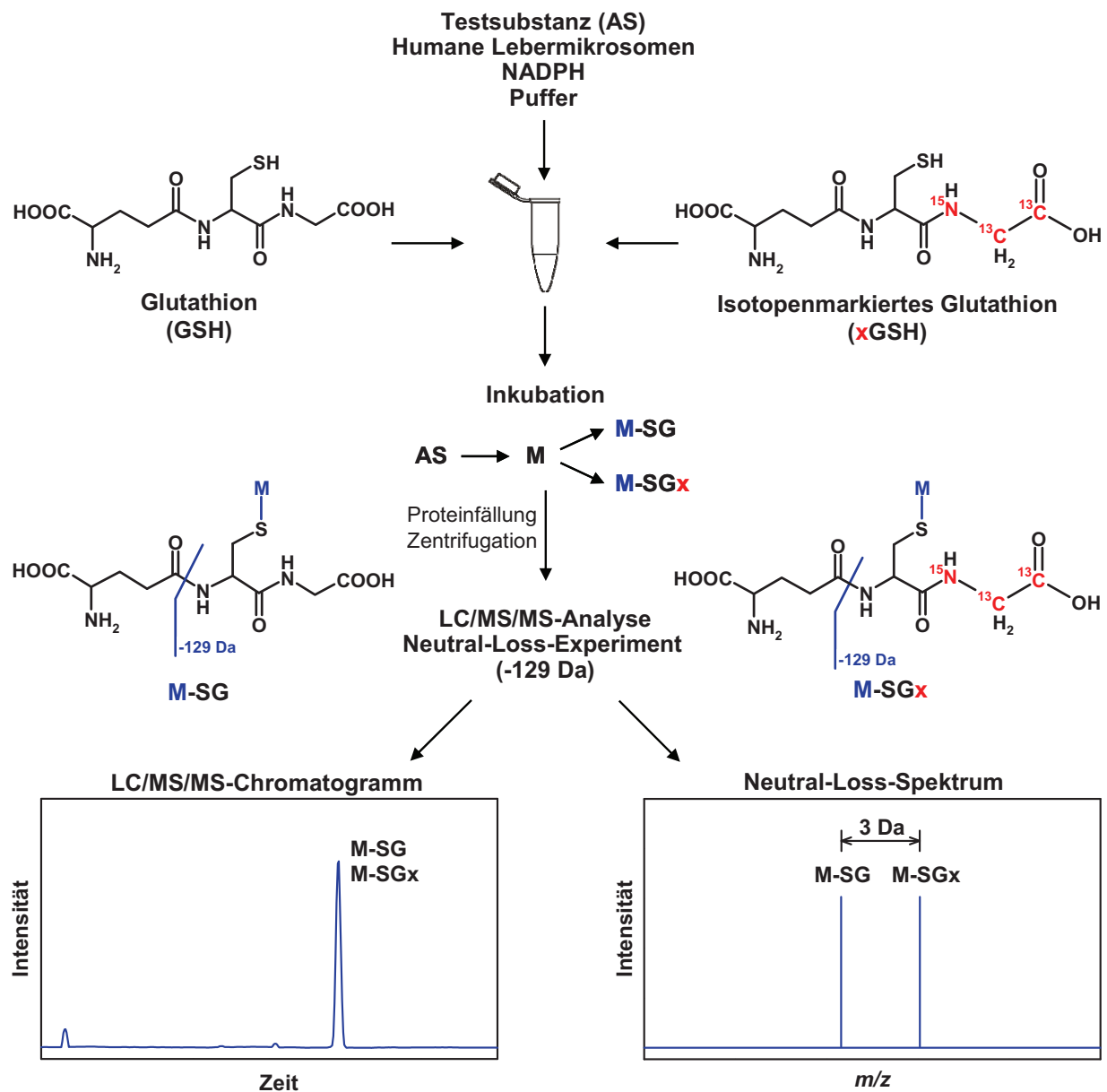


Abb. 101 Schema zur Durchführung der In-vitro-Inkubation und der LC/MS/MS-Analyse zur Detektion der aus einer Testsubstanz (AS) gebildeten reaktiven Metaboliten (M) unter Einsatz von isotopenmarkiertem Glutathion (xGSH) (modifiziert nach ¹⁰⁷).

In Abb. 102 sind die Produktionenspektren der mit Glutathion und dem isotopenmarkierten Derivat abgefangenen reaktiven Metaboliten des Clozapins und des Paracetamols dargestellt, die bei der LC/MS/MS-Analyse nach Inkubation der Arzneistoffe mit humanen Lebermikrosomen erhalten wurden. Vergleicht man die Spektren, fällt auf, dass bei den Konjugaten mit dem isotopenmarkierten Glutathion neben der um 3 Da größeren Masse des Precursor-Ions ebenfalls mehrere schwerere Fragment-Ionen auftreten. In allen Fällen konnte ein um 129 Da leichteres

Fragment detektiert werden, für das bei der angewendeten Kollisionsenergie das intensivste Signal aller Fragmente erhalten wurde. Beispielsweise wurden bei der Untersuchung der Clozapin-Konjugate Fragmente mit einem m/z -Wert von 503 und 506 gemessen (Abb. 102). Die erhaltenen Produktionenspektren der Paracetamol-konjugate sind nahezu identisch mit denen aus der Literatur.¹⁰⁷

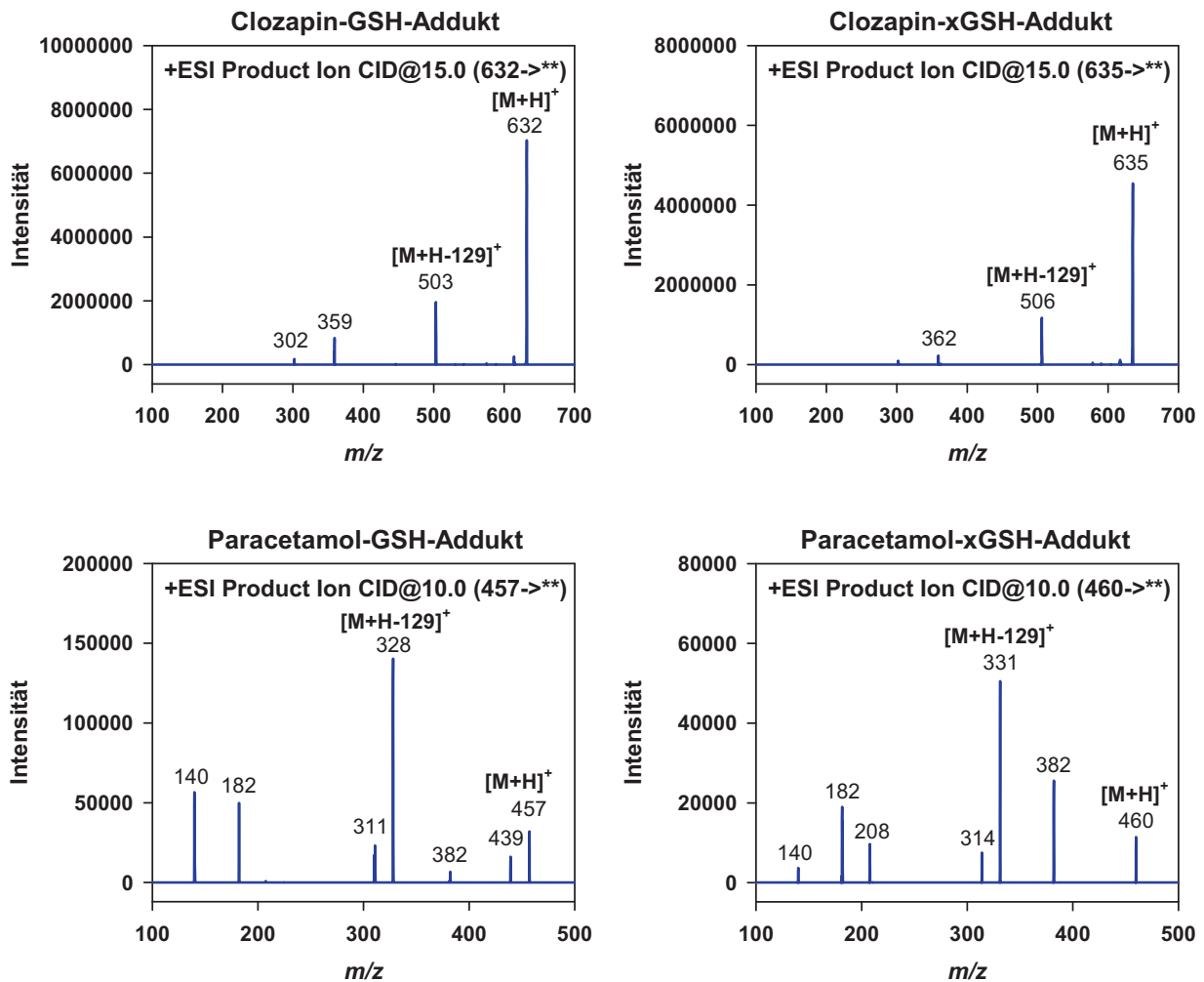


Abb. 102 Produktionenspektren der Addukte der reaktiven Metaboliten von Clozapin und Paracetamol mit Glutathion (GSH) und isotonenmarkiertem Glutathion (xGSH).

Zur Detektion der mit Glutathion und einer Mischung aus Glutathion und dem isotonenmarkierten Derivat abgefangenen reaktiven Metaboliten wurden LC/MS/MS-Analysen durchgeführt, bei denen die Detektion im Neutral-Loss-Scan (M-129) erfolgte. In den erhaltenen Neutral-Loss-Spektren werden die Precursor-Ionen angezeigt. Für die Peaks der Addukte des Clozapins und des Paracetamols findet man in den jeweiligen Neutral-Loss-Spektren mehrere Signale (Abb. 103). Das

detektierte Addukt des Clozapins mit dem natürlichen Glutathion besitzt einen m/z -Wert von 632. Daneben treten um bis zu 3 Da schwerere Isotope auf, die vor allem durch im Molekül enthaltene ^{37}Cl - und ^{13}C -Atome verursacht werden. Wird bei der Inkubation eine Mischung aus Glutathion und dem isotope markierten Glutathion verwendet, steigt die Anzahl der Signale weiter an. Da die Massendifferenz zwischen dem Glutathion und dem isotope markierten Glutathion nur 3 Da beträgt, kann es zur Überlagerung der Signale kommen. Zusätzlich wurden für die Konjugate des Paracetamols Natrium-Addukte (m/z 479 und 482) detektiert (Abb. 103).

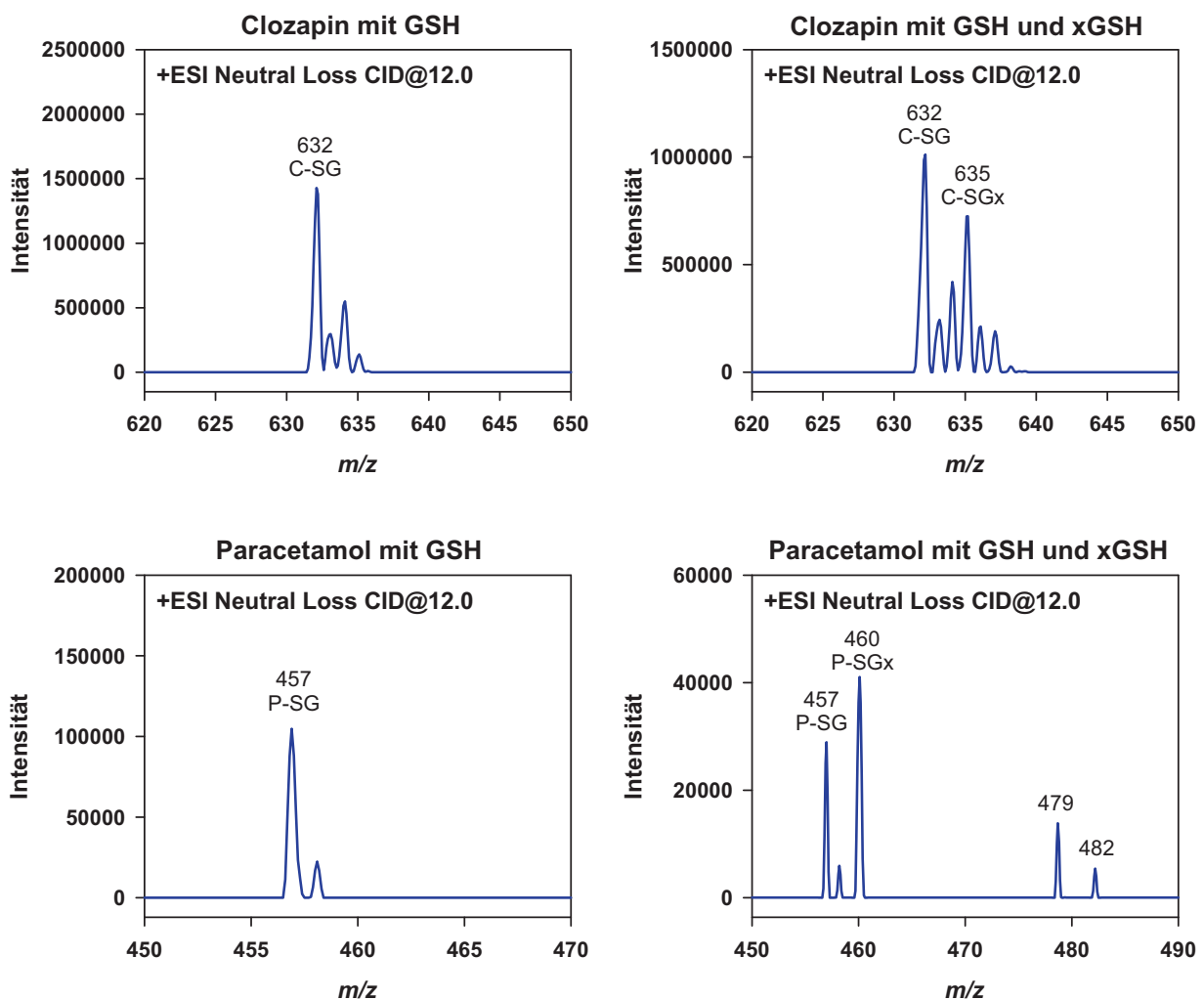


Abb. 103 Neutral-Loss-Spektren (M-129) der GSH-Addukte nach LC/MS/MS-Analyse der Inkubationen von Clozapin bzw. Paracetamol mit humanen Lebermikrosomen. Derivatisierung der reaktiven Metaboliten mit Glutathion (GSH) und mit einer Mischung von GSH und isotope markiertem Glutathion (xGSH). Detektion der m/z -Werte der $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ionen der entsprechenden Glutathion-Addukte von Clozapin (C-SG, C-SGx) und Paracetamol (P-SG, P-SGx).

6.3.4 Konjugation der Glutathion-Derivate durch GSTs

In einigen Fällen kann die Bildung der Glutathion-Addukte aus den reaktiven Metaboliten durch Glutathion-S-Transferasen (GSTs) katalysiert werden.^{294,300} Wenn markierte Glutathion-Derivate nicht durch die Glutathion-S-Transferasen akzeptiert werden, könnten im In-vitro-Experiment keine Addukte detektiert werden. Es würde fälschlicherweise davon ausgegangen, dass keine reaktiven Metaboliten des Arzneistoffes existieren. Mit den folgenden Versuchen sollte herausgefunden werden, ob die synthetisierten Glutathion-Derivate durch Glutathion-S-Transferasen umgesetzt werden. Hierfür wurde das Testsubstrat 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) mit den verschiedenen Glutathion-Derivaten und humanen Leberzellfraktionen inkubiert (Abb. 104). Gegenüber den GST-Inhibitionsassays (s. II.7.2) wurde eine höhere Proteinkonzentration und ein Inkubationspuffer mit pH 7.4, wie bei den Ansätzen zur Detektion der reaktiven Metaboliten, verwendet. Für eine Quantifizierung der entstehenden Konjugate wären allerdings jeweils eine eigene Methode und die Referenzsubstanzen der Konjugate erforderlich. Aus diesem Grund wurde in den Proben der CDNB-Restgehalt ermittelt (Abb. 104). In den Blindproben, die nur das Substrat und das jeweilige Glutathion-Derivat aber kein Protein enthielten, ging die CDNB-Konzentration durch die nichtenzymatische Reaktion mit den *N*-markierten Glutathion-Konjugaten um etwa 5 % zurück (Reaktionszeit 10 min).

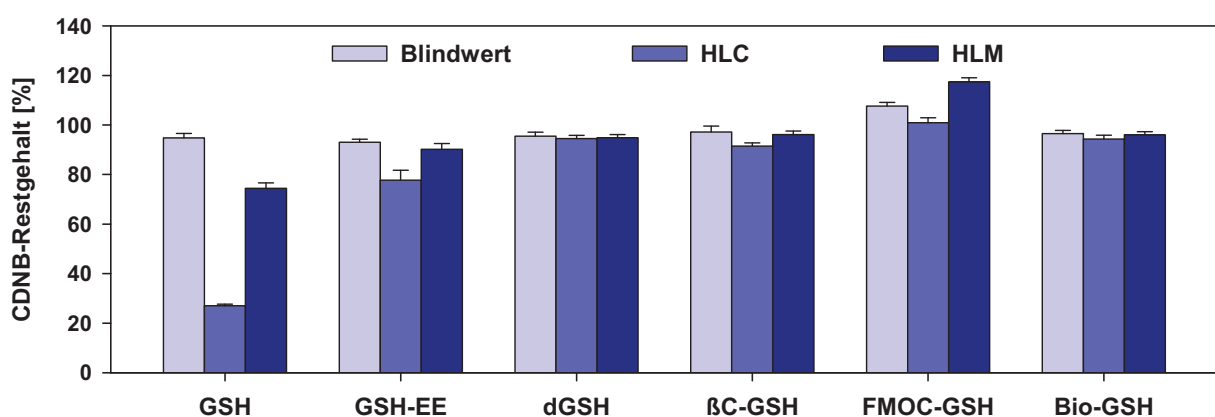


Abb. 104 Untersuchung der Konjugation von GSH-Derivaten mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) durch humanes Lebercytosol (HLC) und humane Lebermikrosomen (HLM) anhand der Detektion des Restgehaltes an CDNB (200 μ M CDNB, 1 mM GSH-Derivat, 0.1 mg/ml Protein, Inkubation im Phosphatpuffer pH 7.4 für 10 min bei 37 °C). Glutathion (GSH), Glutathionethylester (GSH-EE), *N*-Dansylglutathion (dGSH), β -Carbolin-3-carbonyliertes Glutathion (β C-GSH), *N*-Fluorenylmethoxy-carbonyliertes Glutathion (FMOC-GSH), biotinyliertes Glutathion (Bio-GSH).

Daraus kann geschlossen werden, dass die Glutathion-Derivate in der Lage sind, mit reaktiven Metaboliten zu reagieren. Bei der Inkubation mit humanem Lebercytosol wurden etwa 70 % des Substrates mit dem natürlichen Glutathion konjugiert, während dieselbe Proteinmenge an humanen Lebermikrosomen nur etwa 30 % des Substrates umsetzt. Bei allen Glutathion-Derivaten ist der detektierte CDNB-Restgehalt nach der Inkubation mit den Leberzellfraktionen gegenüber dem natürlichen Glutathion wesentlich höher (Abb. 104). Es kann daher gesagt werden, dass die am Glutathion vorgenommenen Molekülveränderungen sich negativ auf die Umsetzung durch die Glutathion-S-Transferasen auswirken. Da die markierten GSH-Derivate nicht durch die GSTs übertragen werden, erfolgt ein Abfangen von reaktiven Metaboliten durch spontane Reaktion.

6.4 Beurteilung der eingesetzten Methoden

Die LC/MS/MS-Analysen der inkubierten Proben, bei denen die reaktiven Metaboliten mit GSH abgefangen werden, lieferten eine Reihe von falsch positiven Signalen. Dadurch können GSH-Addukte nicht eindeutig identifiziert werden. Werden *N*-markierte GSH-Derivate verwendet, müssen die Analysen aufgrund fehlender charakteristischer Fragmente im Full-Scan-Modus durchgeführt werden. Darüber hinaus kann bei dieser Methode ebenfalls nicht unterschieden werden, ob es sich bei einem gefundenen Peak um ein Addukt handelt. Bei der Fluoreszenzanalyse treten mehrere Störsignale auf und es kann zu Peaküberlagerungen kommen. Vermutlich wird daher bei fluoreszenzmarkierten GSH-Derivaten in der Literatur zusätzlich die Massenspektrometrie angewendet.²⁹⁰ Zur Identifizierung von Addukten reaktiver Metaboliten muss bei Verwendung dieser Methoden daher der Arzneistoff mit verschiedenen GSH-Derivaten inkubiert und nach entsprechenden *m/z*-Werten gesucht werden oder ein Vergleich mit einer Blindprobe erfolgen. Beides ist recht aufwändig. Leichter lassen sich hingegen GSH-Addukte finden, deren Masse bekannt ist. Selbst bei dem Einsatz von isotoopenmarkiertem Glutathion müssen von allen Peaks des Chromatogrammes die Massenspektren angesehen werden. Die Praxis zeigt, dass neben dem schwereren Signal des isotoopenmarkierten Glutathion-Adduktes mehrere Signale auftreten können, die von Isotopen, Addukten mit z. B. Natrium $[M+Na]^+$ oder dimeren Clusterionen $[2M+H]^+$ herrühren. Die Massendifferenz des kommerziell erhältlichen markierten Glutathions ist mit 3 Da recht klein. Beim

Einsatz von äquimolaren Mengen von GSH und xGSH wurden in der Praxis keine identischen Signalhöhen der beiden Addukte erhalten. All dies erschwert die Identifizierung von Glutathion-Addukten in der Probe. Eine Softwareunterstützung wäre daher wünschenswert. Bei der Untersuchung von Arzneistoffen können durch die Verwendung von isotope markiertem Glutathion bereits gefundene Metaboliten eindeutig als Glutathion-Addukte nachgewiesen werden. Das eigentliche Ziel, reaktive Metaboliten hepatotoxischer Pflanzenextrakte zu detektieren, konnte mit diesen Methoden nicht erreicht werden. Aus diesem Grund ist der Einsatz der hochauflösenden Massenspektrometrie mit einem Flugzeitanalysator (TOF) oder einer Orbitrap für solche Fragestellungen unumgänglich. Hierdurch kann die bei der Fragmentierung der GSH-Addukte durch Abspaltung der Pyroglutaminsäure auftretende Massendifferenz auf einige Dezimalstellen exakt bestimmt werden.^{108,291} Falsch positive Ergebnisse, wie bei der hier durchgeführten LC/Triple-Quadrupol-Massenspektrometrie, treten somit nicht mehr auf.

7 Glutathion-S-Transferasen (GSTs)

7.1 In-vitro-Substrate für Glutathion-S-Transferasen

Glutathion-S-Transferasen (GSTs) katalysieren die Konjugation eines Substrates mit Glutathion, das über seine Thiolgruppe an das Substrat gekoppelt wird und so ein Glutathion-S-Konjugat entsteht. Zur Untersuchung der Enzymaktivität und der Inhibition der GSTs werden v. a. synthetische Substrate verwendet, die in den meisten Fällen aktivierende Substituenten, wie z. B. Nitrogruppen, tragen. Dadurch werden diese mit hohen Umsetzungsgeschwindigkeiten durch die GSTs metabolisiert.¹⁴⁵ Diese aktivierten Substrate besitzen oft eine derart hohe Reaktivität, dass sie mit Glutathion bereits ohne enzymatische Katalyse reagieren können, weshalb einige Substrate, wie z. B. die Etacrynsäure, hier nicht verwendet wurden.^{301,302} Von den literaturbekannten In-vitro-Substraten wurden 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB), 4-Nitrochinolin-*N*-oxid (NQO), 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol (DCNB) und 4-Nitrobenzylchlorid (NBCl) ausgewählt (Abb. 105). Die Quantifizierung der daraus entstehenden Glutathionkonjugate erfolgte mit Hilfe einer HPLC/UV-Analyse. Damit wird im Vergleich zur photometrischen Bestimmung eine spezifischere Detektion erzielt, da v. a. bei der Untersuchung der Enzyminhibition durch Pflanzenextrakte eine komplexere Probenmatrix vorliegt. Für bisherige Bestimmungen der Glutathionkonjugate wurde überwiegend die UV/VIS-Spektroskopie eingesetzt.¹⁴⁵ Durch die nukleophile Substitution der Thiolgruppe des Glutathions an einen nitrierten Aromaten erfolgt eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums, so dass das Produkt selektiv in Anwesenheit des Substrates bestimmt werden kann. Beispielsweise verschiebt sich das Absorptionsmaximum von CDNB durch die Konjugation mit Glutathion von 246 auf 332 nm, bei der das Substrat kaum absorbiert (Abb. 106). Ähnliches gilt für die Konjugation des bei 272 nm absorbierenden DCNB, dessen Konjugat ein Absorptionsmaximum bei 338 nm besitzt (Abb. 106). Ist die Verschiebung des Absorptionsmaximums nur gering ausgeprägt, wie z. B. bei NBCl, konnte bisher die Bestimmung des Reaktionsproduktes nur aufgrund der Änderung des Absorptionskoeffizienten bei derselben Wellenlänge erfolgen.¹⁴⁵ Für einige Substrate mit ungünstigen photometrischen Eigenschaften, wie z. B. NQO (Abb. 106), konnte das Reaktionsprodukt indirekt durch photometrische Analyse nach Derivatisierung des

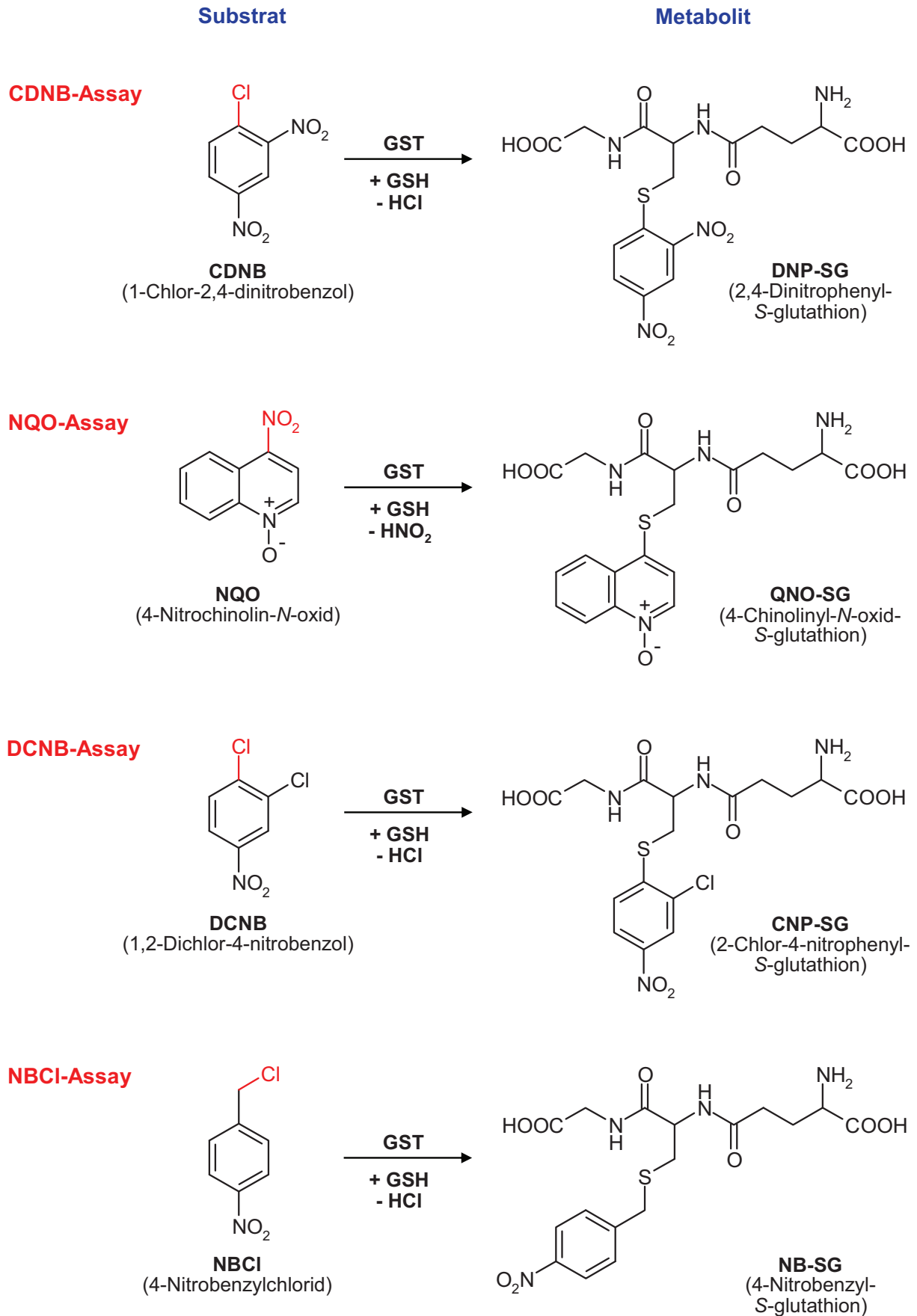


Abb. 105 Substratreaktionen zur Bestimmung der Inhibition der Glutathion-S-Transferasen.

aus dem Substrat entstehenden Nitrits bestimmt werden.³⁰³ Bei solchen Substraten liefert eine HPLC/UV-Analyse wesentlich reproduzierbarere Ergebnisse. In letzterer Zeit wurden Substrate entwickelt, bei denen auch eine fluorimetrische Analyse möglich ist. Ein Beispiel hierfür ist das 5-(Pentafluorbenzoylamino)fluorescein, bei dem ebenfalls eine chromatographische Trennung vorgenommen werden muss, da Substrat und das Glutathionkonjugat fluoreszenzaktiv sind.³⁰⁴ Dieser Nachteil konnte kürzlich durch eine Molekülveränderung überwunden werden.³⁰⁵

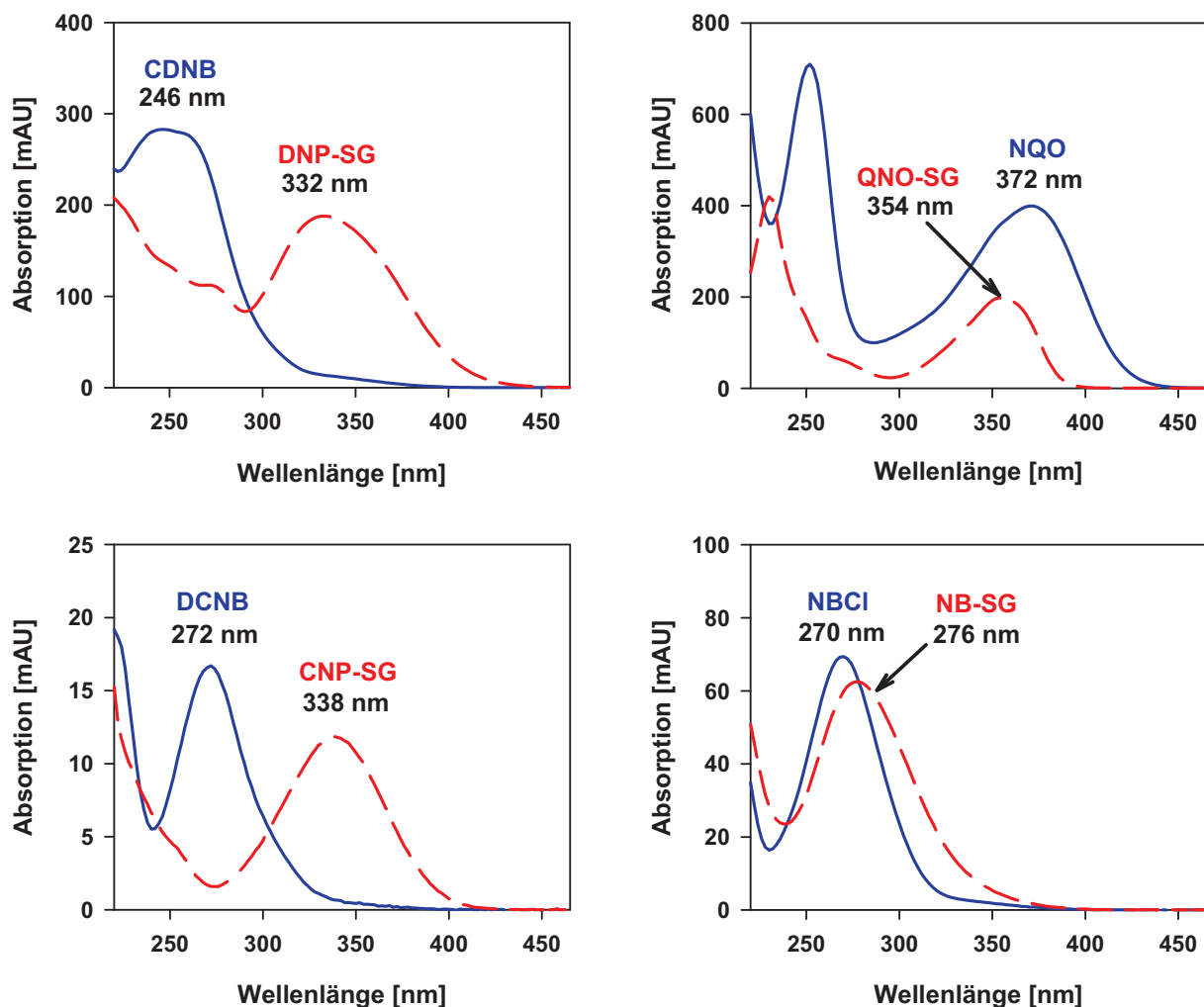


Abb. 106 UV-Spektren ausgewählter Substrate und Metaboliten der Glutathion-S-Transferase-Assays, gemessen mit einem Diodenarraydetektor. Substrate: 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB), 4-Nitrochinolin-*N*-oxid (NQO), 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol (DCNB) und 4-Nitrobenzylchlorid (NBCI), Metaboliten: 2,4-Dinitrophenyl-S-glutathion (DNP-SG), 4-Chinolinyl-*N*-oxid-S-glutathion (QNO-SG), 2-Chlor-4-nitrophenyl-S-glutathion (CNP-SG) und 4-Nitrobenzyl-S-glutathion (NB-SG).

7.2 GST-Inhibitionsassays

7.2.1 HPLC/UV-basierte Assays

Inkubation der Substrate mit humanem Lebercytosol

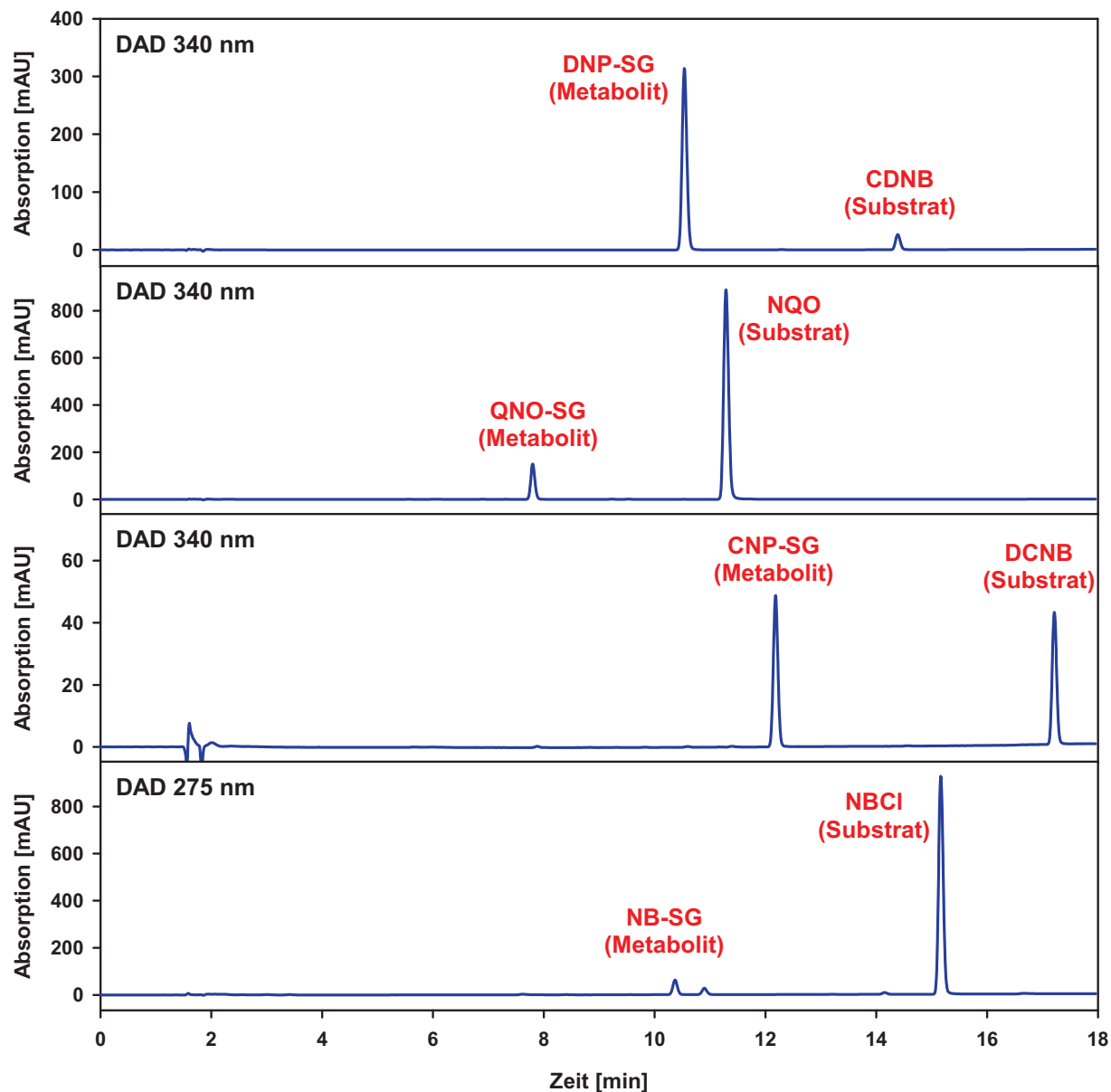


Abb. 107 HPLC/UV-Chromatogramme inkubierter Proben (10 min, 37 °C) der ausgewählten Substrate (1 mM) mit humanem Lebercytosol (0.1 mg/ml) und Glutathion (1 mM). Substrate: 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB), 4-Nitrochinolin-*N*-oxid (NQO), 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol (DCNB), 4-Nitrobenzylchlorid (NBCI), Metaboliten: 2,4-Dinitrophenyl-*S*-glutathion (DNP-SG), 4-Chinolinyl-*N*-oxid-*S*-glutathion (QNO-SG), 2-Chlor-4-nitrophenyl-*S*-glutathion (CNP-SG), 4-Nitrobenzyl-*S*-glutathion (NB-SG). Säule: Phenomenex Synergi Max-RP (150 x 4.6 mm; 4 µm), Fließmittel: 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Methanol mit 0.05 % Trifluoressigsäure (B), Gradient: 10 – 100 % B in 18 min, Flussrate: 1 ml/min, Injektionsvolumen: 25 µl.

Zur Untersuchung der Konjugation der Testsubstrate wurden diese mit humanem Lebercytosol und Glutathion in einem Phosphatpuffer pH 7.4 bei 37 °C inkubiert. Die abgestoppten Proben wurden anschließend mit Hilfe der RP-HPLC-Analyse unter Anwendung eines Fließmittelgradienten untersucht (Abb. 107). Während für die ungeladenen Substrate bereits ein neutrales Fließmittel ausreichen würde, wurde für die Analyse der Glutathionkonjugate dem Fließmittel Trifluoressigsäure zugegeben. Durch die Erniedrigung des pH-Wertes und den auftretenden Ionenpaareffekt wurden eine gute Retention und eine hohe Peaksymmetrie erhalten. Die UV-Detektion erfolgte im Absorptionsmaximum des jeweiligen Glutathionkonjugates, wodurch sich z. T. kleine Signale für die Substrate ergeben, da diese andere Absorptionsmaxima besitzen (Abb. 106). Die entstandenen Konjugate sind wesentlich hydrophiler als die eingesetzten Substrate, so dass in allen Fällen das Glutathionkonjugat eine niedrigere Retentionszeit im Vergleich zum dazugehörigen Substrat besitzt (Abb. 107). Das Substrat mit der größten Retentionszeit war DCNB, während NQO wesentlich polarer ist. Zur Quantifizierung der Reaktionsprodukte in den Assayproben wurden anschließend durch eine entsprechende Änderung des Gradienten Chromatographieläufe von 6 min durchgeführt, in denen nur das jeweilige Glutathionkonjugat detektiert wurde. Zur Elution der Substrate wurde im Anschluss die Säule mit reinem Lösungsmittel gespült.

Abstoppen der nichtenzymatischen Reaktion

Um eine quantitative HPLC-Analyse der Proben zu ermöglichen, muss die spontane Reaktion der Substrate mit Glutathion verhindert werden, damit die Produktkonzentration in den Proben vom Inkubationsende bis zur Analyse nicht weiter ansteigt. Zum Abstoppen der nichtenzymatischen Reaktion wurden daher verschiedene Oxidationsmittel untersucht, die der Stopplösung zugegeben wurden. Hierdurch wird das Cosubstrat Glutathion oxidiert und kann nicht mehr mit dem in der Probe im Überschuss vorhandenem Substrat reagieren.^{306,307} Ein geeignetes Oxidationsmittel für diesen Zweck ist Wasserstoffperoxid. Die dabei verwendete Konzentration hängt von der eingesetzten Glutathionkonzentration ab. Beispielsweise wurde für 1 mM Glutathion eine Konzentration von 0.1 % Wasserstoffperoxid verwendet, was in etwa einem dreißigfachen Überschuss entspricht. Handelte es sich bei dem Reaktionsprodukt um einen aliphatisch substituierten Thioether, wie z. B. NB-SG, trat bei der Verwendung von

Wasserstoffperoxid eine Oxidation des Glutathionkonjugates als Nebenreaktion auf, so dass sich die Produktkonzentration in den Proben veränderte. In diesem Fall wurde anstatt Wasserstoffperoxid Kaliumhexacyanoferrat(III) verwendet, wodurch eine höhere Probenstabilität erhalten wurde. Trotz dieser Maßnahmen zum Abstoppen der nichtenzymatischen Reaktion nach der Inkubation müssen Blindproben angefertigt und die erhaltenen Peakflächen korrigiert werden, da ein nicht unerheblicher Anteil des Reaktionsproduktes durch spontane Reaktion während der Inkubation entstehen kann (s. II.7.2.5).

Überprüfung der Linearität der HPLC/UV-Analyse

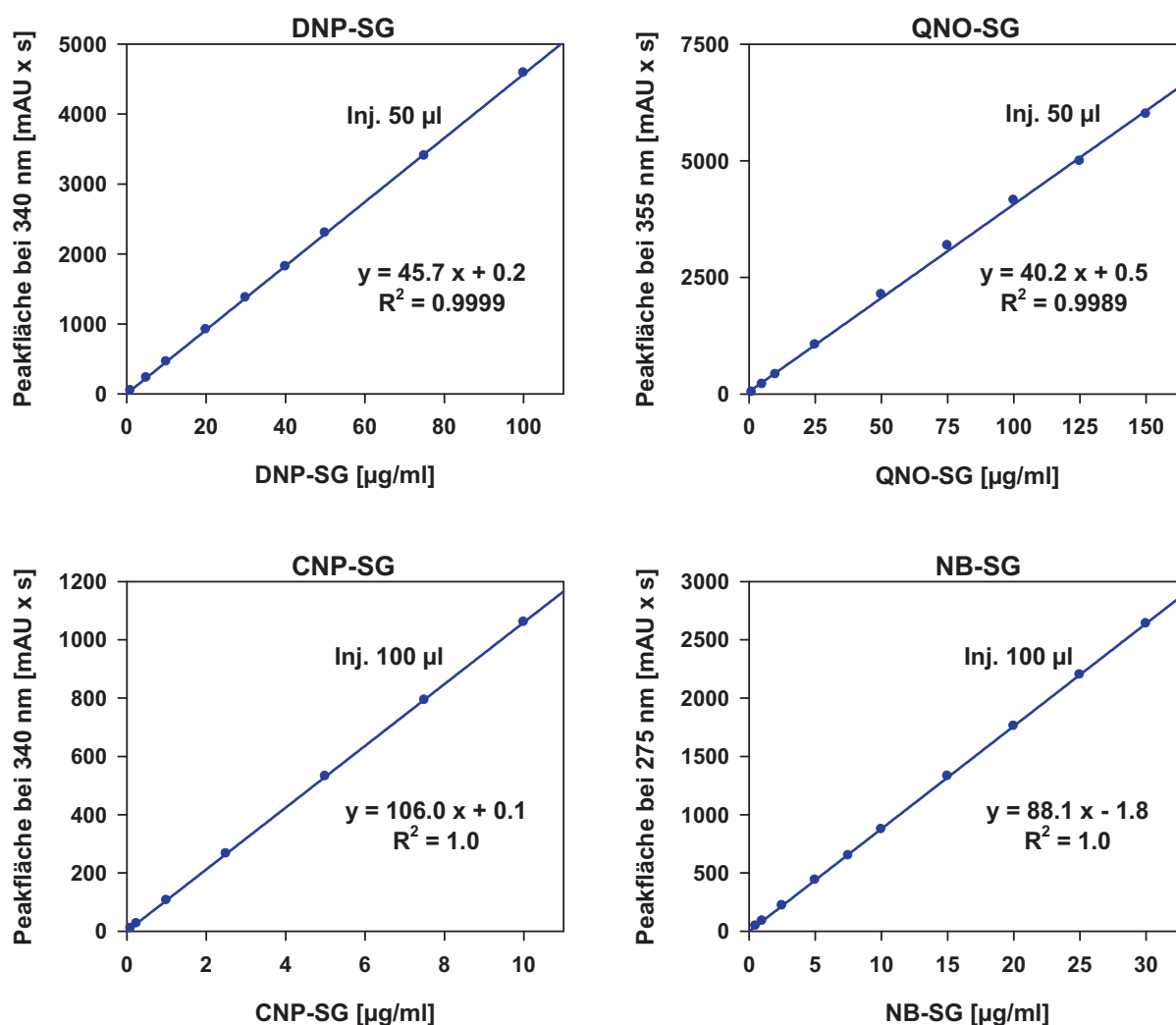


Abb. 108 Kalibrierung der HPLC/UV-Methoden zur Quantifizierung der Enzymprodukte bei den Glutathion-S-Transferase-Assays mit Hilfe der synthetisierten Glutathion-S-Konjugate als Kalibrierstandards: 2,4-Dinitrophenyl-S-glutathion (DNP-SG), 4-Chinolinyl-N-oxid-S-glutathion (QNO-SG), 2-Chlor-4-nitrophenyl-S-glutathion (CNP-SG) und 4-Nitrobenzyl-S-glutathion (NB-SG).

Aufgrund der spontanen Reaktion der Substrate mit Glutathion konnte die Synthese der entsprechenden Konjugate ebenfalls in wässrigen Pufferlösungen erfolgen. Zur Steigerung der Ausbeute wurden drastischere Reaktionsbedingungen als bei den Enzyminkubationen angewendet, wie z. B. ein höherer pH-Wert, eine höhere Temperatur und eine längere Reaktionszeit. Glutathion wurde dabei im Überschuss eingesetzt. Die Aufreinigung der Reaktionsprodukte erfolgte durch semipräparative HPLC, da eine Flüssig-Flüssig-Extraktion aufgrund der Polarität der Substanzen nicht möglich ist. Aufgrund der teilweise schlechten Kristallisation der Glutathionkonjugate wurde das erhaltene Eluat gefriergetrocknet, um ein gut einwiegbares Material zur Herstellung der Stammlösungen zu erhalten.

Zur Quantifizierung der aus den Substraten entstehenden Glutathionkonjugate wurde eine Kalibrierung der HPLC/UV-Analysen mit Hilfe dieser zuvor synthetisierten Standardsubstanzen im entsprechenden Konzentrationsbereich durchgeführt. Dabei wurden die Kalibrierstandards genauso wie die inkubierten Proben behandelt. Für alle Konjugate wurden Kalibriergeraden mit einem hohen Bestimmtheitsmaß erhalten (Abb. 108).

7.2.2 LC/MS/MS-basierter Assay

Neben der HPLC/UV-Analyse wurde für den CDNB-Assay eine LC/MS/MS-Methode zur Quantifizierung des Metaboliten entwickelt, die aufgrund ihrer hohen Selektivität besonders zur Untersuchung der GST-Inhibition durch Pflanzenextrakte geeignet ist. Zur Quantifizierung wurde den Proben 4-Chinolinyln-*N*-oxid-S-glutathion (QNO-SG) als interner Standard zugefügt. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte im MRM-Modus nach Optimierung der Übergänge mit Hilfe der synthetisierten Standards. Aufgrund einer möglichen Ionenpaarbildung wurde der Trifluoressigsäurezusatz des Fließmittels für die HPLC/UV-Analyse durch Ameisensäure ersetzt und die Säulendimension verkleinert, so dass eine Laufzeit von 4 min erzielt wurde (Abb. 109). Im Gegensatz zu anderen Verbindungen, wie z. B. den meisten Reaktionsprodukten der CYP-Assays, besitzen die Glutathionkonjugate eine unerwartet geringe Massenempfindlichkeit. Daher reichte eine Reduktion des Injektionsvolumens auf 1 bis 2 μl aus, um mit den CYP-Assays vergleichbare Peakflächen und eine Linearität des Messsignals bis etwa 25 $\mu\text{g/ml}$ zu erhalten, so dass keine Verdünnung der Proben vorgenommen werden musste.

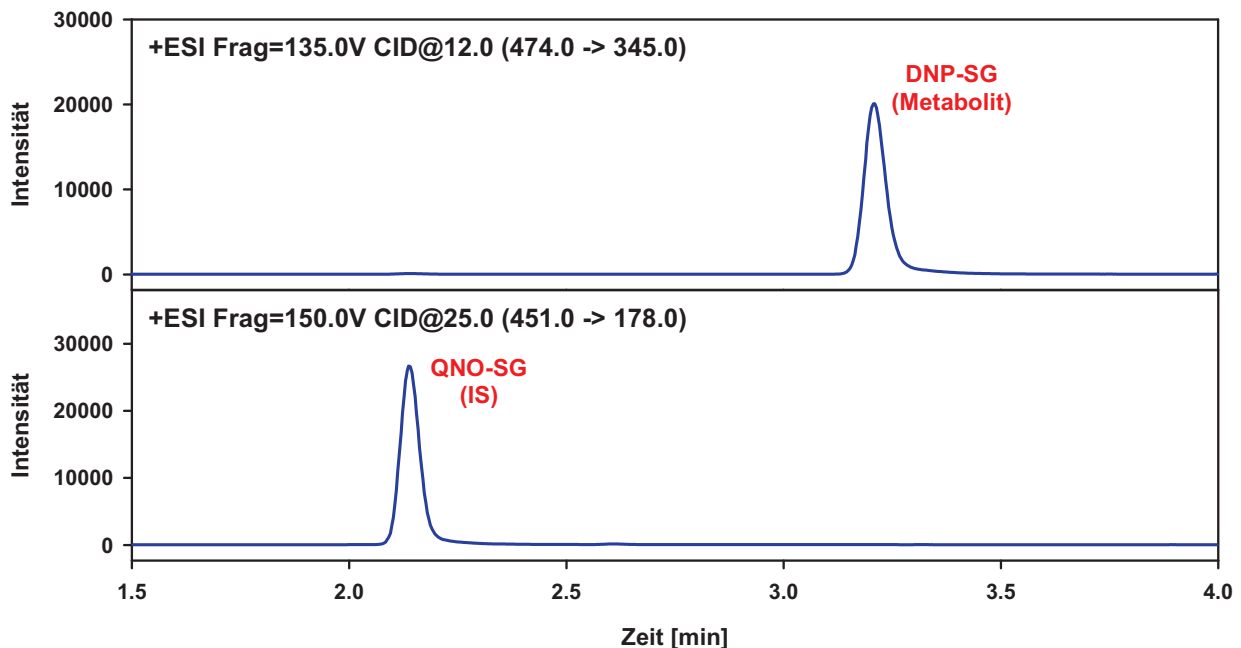


Abb. 109 LC/ESI/MS/MS-Chromatogramme des Glutathion-S-Transferase-Inhibitionsassays mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol als Substrat. Extrahierte Ionenspuren der Quantifizierübergänge des Metaboliten 2,4-Dinitrophenyl-S-glutathion (DNP-SG) und des internen Standards 4-Chinolinyl-*N*-oxid-S-glutathion (QNO-SG).

7.2.3 Aktivität verschiedener humaner subzellulärer Leberfraktionen

Zur Untersuchung der Aktivität der Glutathion-S-Transferasen wurden verschiedene humane Lebersubzellfraktionen mit den Substraten 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB), 4-Nitrochinolin-*N*-oxid (NQO), 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol (DCNB) und 4-Nitrobenzylchlorid (NBCl) zusammen mit GSH inkubiert. Die ermittelten Umsetzungsgeschwindigkeiten, bezogen auf die Proteinkonzentration und die Inkubationszeit, sind in Abb. 110 dargestellt. Die höchsten Umsetzungsgeschwindigkeiten wurden bei der Konjugation von CDNB erhalten. Im Vergleich dazu erfolgt der Metabolismus von DCNB etwa tausendmal langsamer. Mit der S9-Fraktion und dem Cytosol wurden nahezu vergleichbare Umsetzungsgeschwindigkeiten erhalten. Die Lebermikrosomen besitzen bei allen Substraten die geringste Aktivität, was bestätigt, dass der überwiegende Teil der Glutathion-S-Transferasen nicht membrangebunden vorliegt.⁸⁰ Für die Inhibitionsuntersuchungen wurde daher die cytosolische Fraktion verwendet.

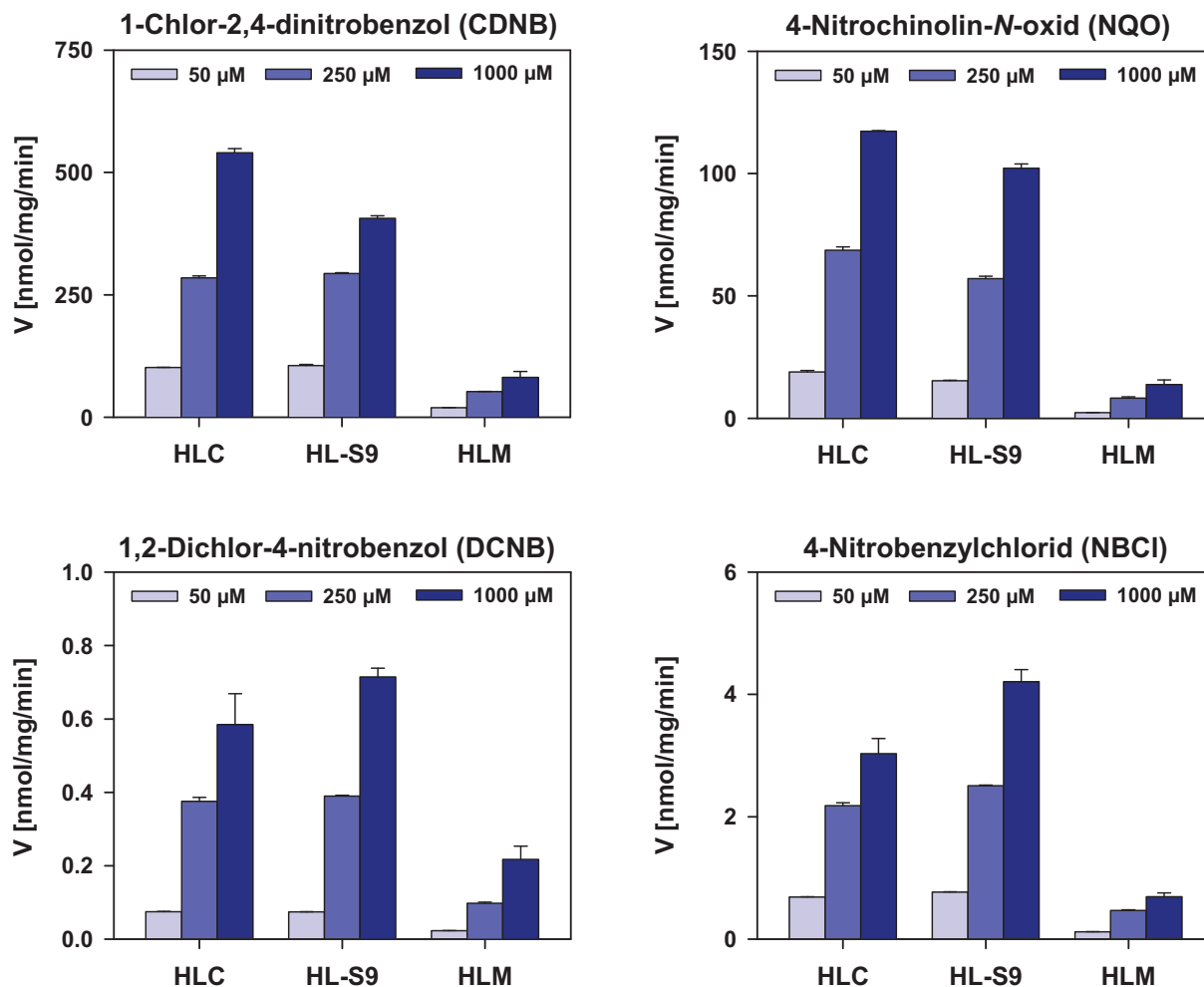


Abb. 110 Aktivitäten verschiedener humaner Leberzellfraktionen für die Konjugation von ausgewählten Substraten mit Glutathion (1 mM).

7.2.4 Enzymkinetische Untersuchungen

Substratsättigungskinetik

Die in der Literatur vorhandenen Daten zur Enzymkinetik der GSTs wurden v. a. mit GST-Isoenzymen oder Zellfraktionen von tierischen Organismen, wie z. B. Ratten und Mäusen, erhalten.^{301,308} Daher wurden zur Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstanten und der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeiten die Substrate im Konzentrationsbereich von 2,5 bis 1500 µM mit humanem Lebercytosol und 1 mM Glutathion inkubiert (Abb. 111). Für CDNB, NQO und NBCI wurde aufgrund der hohen nichtenzymatischen Reaktion der Substrate mit Glutathion ein pH-Wert von 6,5 und eine Inkubationstemperatur von 25 °C verwendet (s. II.7.2.5), während die Reaktion von DCNB bei pH 7,4 und 37 °C durchgeführt wurde. Für CDNB ergab sich eine hyperbole Sättigungskurve mit einem K_m -Wert von 258 ± 18 µM und die höchste

maximale Umsetzungsgeschwindigkeit aller Substrate von 712 ± 17 nmol/mg/min (Abb. 111). 4-Nitrochinolin-*N*-oxid, dessen Sättigungskurve nach dem Substratinhibitionsmodell ausgewertet wurde, besaß mit einem K_m -Wert von 550 ± 29 μ M eine niedrigere Affinität und eine geringere maximale Umsetzungsgeschwindigkeit von 204 ± 7 nmol/mg/min (Abb. 111). Für die Konjugation von DCNB ergab sich ein nahezu linearer Kurvenverlauf, d. h. im untersuchten Konzentrationsbereich tritt keine Sättigung ein (Abb. 111). Höhere Substratkonzentrationen führten aufgrund der begrenzten Löslichkeit des recht lipophilen Substrates im Inkubationspuffer zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen, so dass eine Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte im praktischen Versuch für dieses Substrat nicht möglich ist. Für NBCI wurde wiederum eine klassische Michaelis-Menten-Kurve mit einem K_m -Wert von 233 ± 26 μ M und

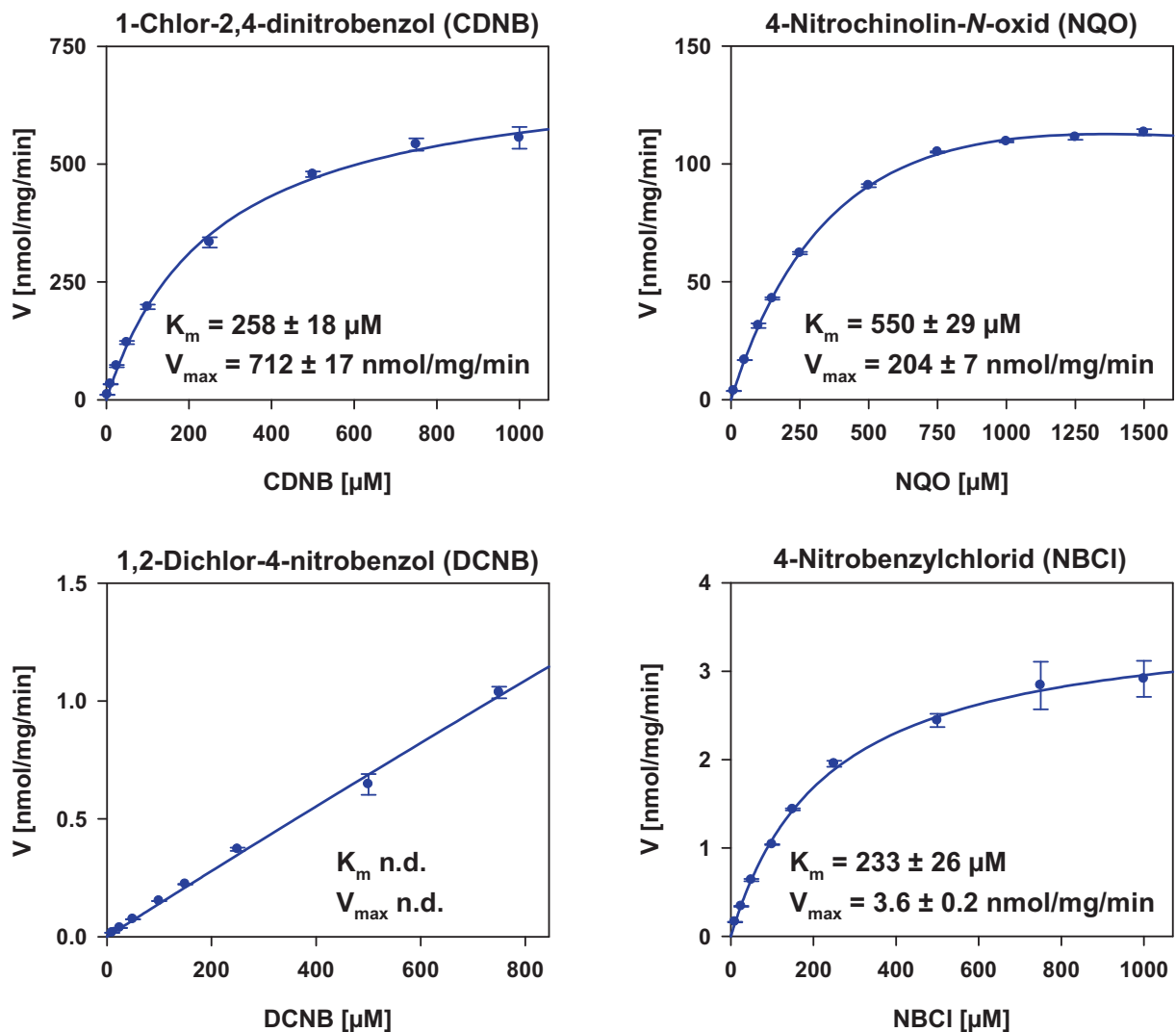


Abb. 111 Substratsättigungskurven für die Konjugation von ausgewählten Substraten mit Glutathion durch humanes Lebercytosol.

einer maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit von 3.6 ± 0.2 nmol/mg/min erhalten (Abb. 111). Durch Rundung der ermittelten K_m -Werte wurden 200 μ M CDNB, 500 μ M NQO und 250 μ M NBCl als Substratkonzentrationen für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität verwendet. Für DCNB wurde aufgrund der Löslichkeit 500 μ M gewählt. Da im verwendeten humanen Lebercytosol mehrere GST-Isoenzyme enthalten sind und die Spezifität dieser Substrate gegenüber den einzelnen GST-Isoenzymen, für die jeweils ein eigener K_m -Wert existiert, v. a. für CDNB^{80,302} gering ausgeprägt ist, setzen sich die ermittelten K_m -Werte aus den einzelnen an der Reaktion beteiligten Isoenzyme zusammen. Dies ist auch der Grund für Abweichungen der Kurvenverläufe von der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik.

Einfluss der Glutathionkonzentration auf die Enzymaktivität

Zur Untersuchung des Einflusses der Glutathionkonzentration auf die Aktivität der Glutathion-S-Transferasen in humanem Lebercytosol erfolgte die Umsetzung der Substrate mit verschiedenen Glutathionkonzentrationen (Abb. 112). Idealerweise sollte die für die Inhibitionsassays verwendete Glutathionkonzentration im Sättigungsbereich liegen. Für die Umsetzung von Glutathion mit den einzelnen Substraten wurden Michaelis-Menten-Konstanten zwischen 0.3 bis 0.6 mM erhalten. Bei Vorliegen von 1 mM GSH beträgt die Umsetzungsgeschwindigkeit demzufolge zwischen 60 und 80 % der Maximalgeschwindigkeit, während durch den Einsatz von 5 mM GSH über 90 % erreicht werden. Mit steigender Glutathionkonzentration wurde allerdings ein nahezu linearer Anstieg der spontanen Reaktion der Substrate mit Glutathion beobachtet, was sich negativ auf das Verhältnis zwischen enzymatischer und nichtenzymatischer Reaktion auswirkt. Daher wurde eine Glutathionkonzentration von 1 mM in den Inhibitionsassays eingesetzt, was ebenfalls bei den meisten Literaturmethoden verwendet wird.^{309,310}

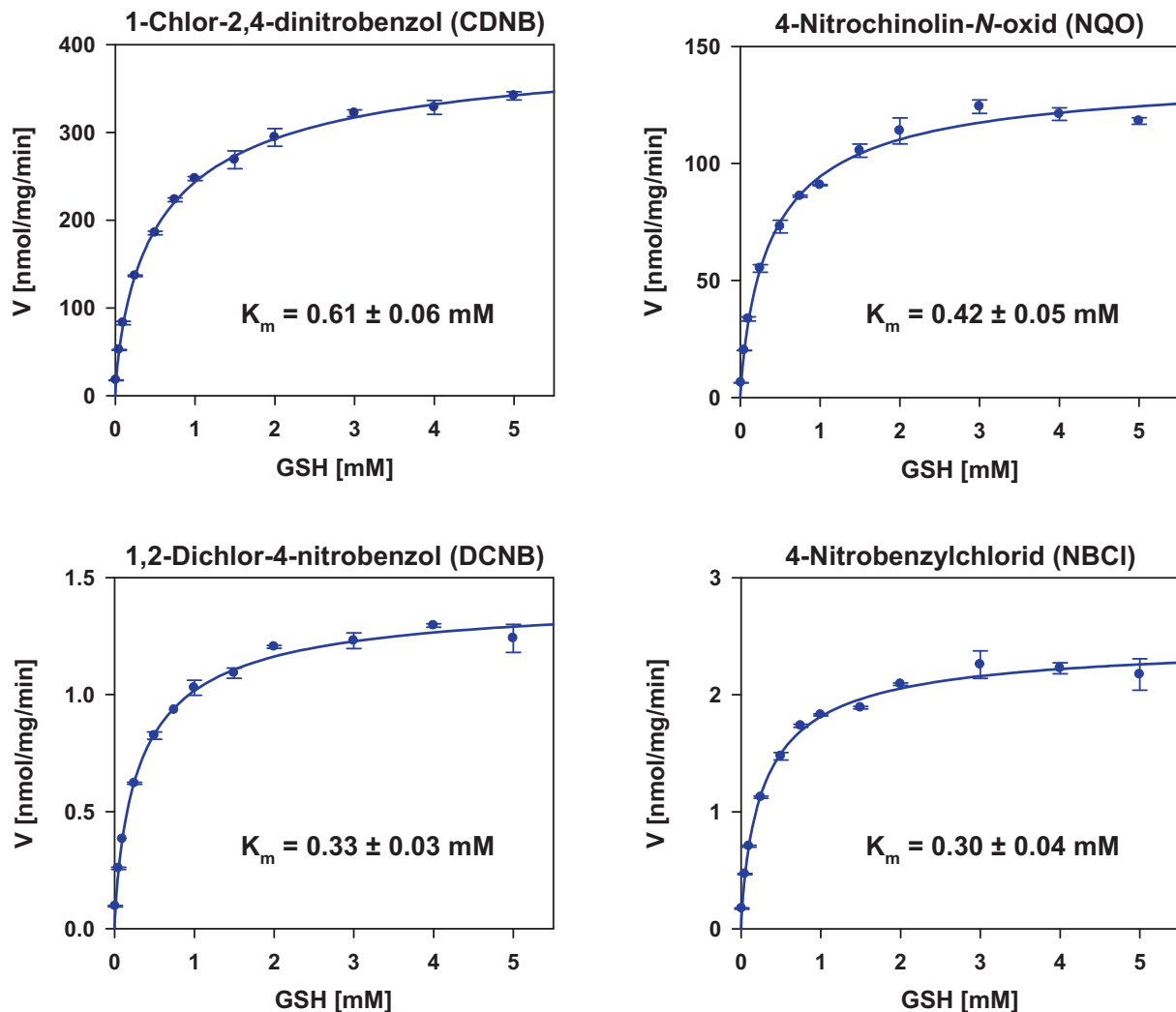


Abb. 112 Einfluss der Glutathionkonzentration auf die Enzymaktivität für die Konjugation von CDNB (200 μ M), NQO (500 μ M), DCNB (500 μ M) und NBCl (250 μ M) durch humanes Lebercytosol.

Einfluss von Lösungsmitteln auf die GST-Aktivität

In Abb. 113 ist dargestellt, wie sich die Anwesenheit von verschiedenen Lösungsmitteln im Inkubationspuffer auf die Konjugation von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol mit Glutathion durch die cytosolischen Glutathion-S-Transferasen auswirkt. Die GSTs sind dabei wesentlich unempfindlicher gegenüber den Lösungsmitteln als beispielsweise die CYP-Enzyme (s. II.3.8), deren Aktivität bei einem Lösungsmittelgehalt von 10 % bereits vollständig zum Erliegen kam. Am stärksten wurde die GST-Aktivität durch Acetonitril beeinträchtigt, die bei einer Acetonitrilkonzentration von mehr als 10 % stark absinkt (Abb. 113). Bis zu einer DMSO-Konzentration von 30 % steigt die Umsetzungsgeschwindigkeit sogar leicht an, wofür vermutlich Solubilisierungseffekte des lipophilen Substrates verantwortlich

gemacht werden können. Bei niedrigen Konzentrationen an DMSO (ca. 2 %), die aufgrund der zugegebenen Stammlösungen des Substrates und der zu testenden Pflanzenextrakte in den Inkubationsproben vorhanden war, wurde die Enzymaktivität kaum beeinflusst.

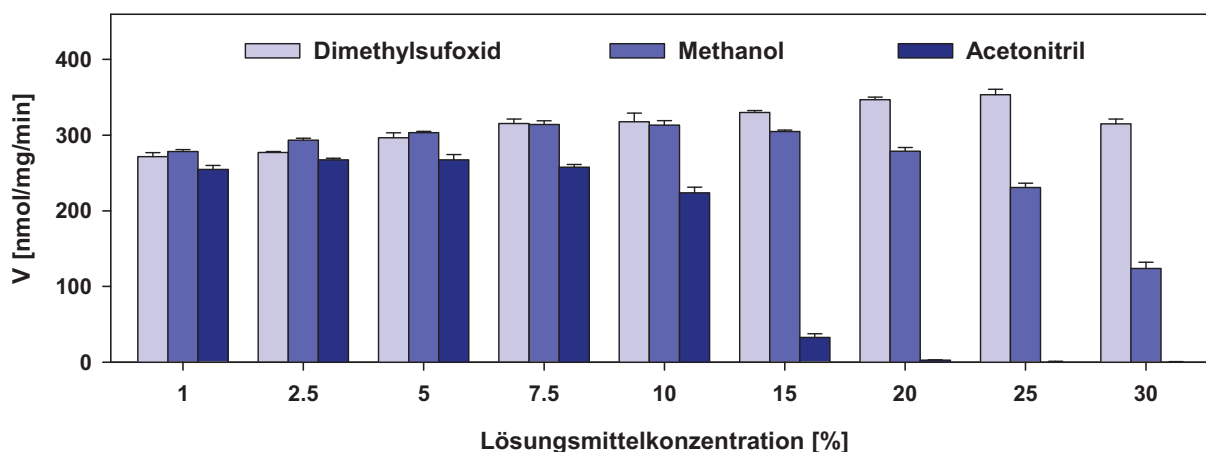


Abb. 113 Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Enzymaktivität der Konjugation von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) mit Glutathion durch humanes Lebercytosol (200 μ M CDNB, 0.025 mg/ml Protein, 5 min Inkubationszeit).

7.2.5 Einfluss des pH-Wertes und der Temperatur auf die enzymatische und nichtenzymatische Substrat-Konjugation mit Glutathion

Für viele Testsubstrate der Glutathion-S-Transferasen ist bekannt, dass diese bereits spontan ohne Anwesenheit des Enzyms mit Glutathion reagieren können.^{301,302} Für eine Bestimmung der Enzymaktivität bzw. der Enzyminhibition ist es sinnvoll, wenn der Anteil der nichtenzymatischen Reaktion des Substrates mit Glutathion unterdrückt wird, da sich neben der erforderlichen Blindwertkorrektur hohe zufällige Fehler ergeben können und der Substratverbrauch erhöht wird. Um diese spontane Reaktion bei den durchgeführten Assays zu beeinflussen und ein akzeptables Verhältnis zwischen enzymatischer und nichtenzymatischer Reaktion zu erhalten, wurden der pH-Wert des Inkubationspuffers und die Inkubationstemperatur variiert. Zur Einstellung des pH-Wertes wurden Natriumacetatpuffer für pH 4.5, Kaliumphosphatpuffer für die pH-Werte 6.5, 7.4 und 8.0, sowie Kaliumboratpuffer für pH 9.0 verwendet. Die Inkubationen wurden bei 25, 37 und 45 °C durchgeführt. Für jedes der vier Substrate, 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB), 4-Nitrochinolin-*N*-oxid (4-NQO),

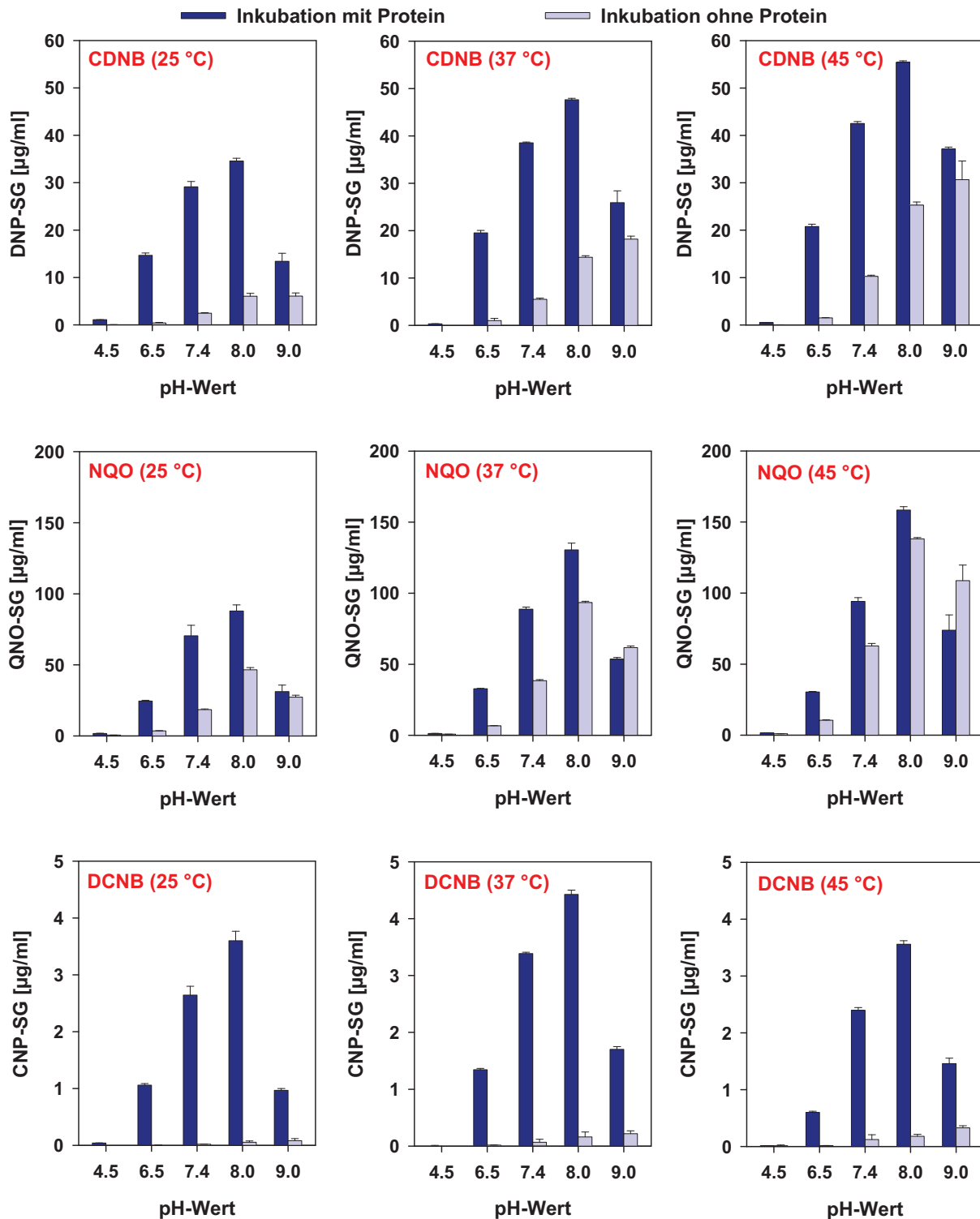


Abb. 114 Einfluss des pH-Wertes und der Temperatur auf die Konjugation von Glutathion mit ausgewählten Substraten durch humanes Lebercytosol. Vergleich der enzymatischen mit der nichtenzymatischen Reaktion. Inkubationsbedingungen: 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB, 200 µM, 0.025 mg/ml Protein, 5 min), 4-Nitrochinolin-*N*-oxid (NQO, 500 µM, 0.1 mg/ml Protein, 5 min) und 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol (DCNB, 500 µM, 0.25 mg/ml Protein, 30 min). Quantifizierte Reaktionsprodukte: 2,4-Dinitrophenyl-*S*-glutathion (DNP-SG), 4-Chinolinyl-*N*-oxid-*S*-glutathion (QNO-SG), 2-Chlor-4-nitrophenyl-*S*-glutathion (CNP-SG).

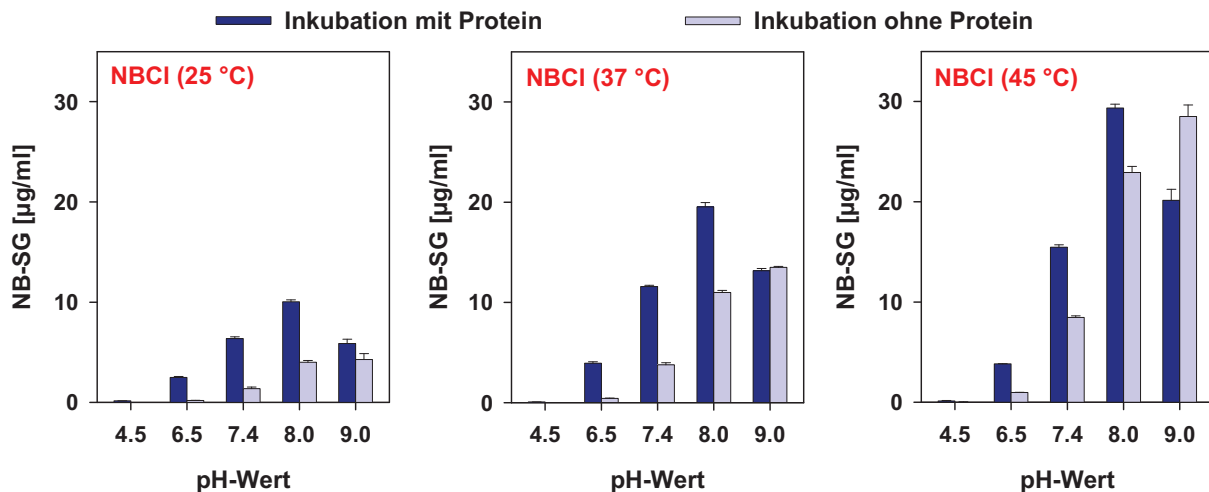


Abb. 114 (Fortsetzung) Einfluss des pH-Wertes und der Temperatur auf die Konjugation von Glutathion mit 4-Nitrobenzylchlorid (NBCI, 250 µM, 0.25 mg/ml Protein, 10 min Inkubationszeit) durch humanes Lebercytosol. Vergleich der enzymatischen mit der nichtenzymatischen Reaktion und Quantifizierung des Reaktionsproduktes 4-Nitrobenzyl-S-glutathion (NB-SG).

1,2-Dichlor-4-nitrobenzol (DCNB) und 4-Nitrobenzylchlorid (4-NBCI), wurden bezüglich der Inkubationszeit sowie der Substrat- und der Proteinkonzentration die bereits optimierten Bedingungen verwendet (s. II.7.2.4). In Abb. 114 sind die Produktkonzentrationen, die bei der Inkubation der Substrate mit und ohne Protein unter den jeweiligen Bedingungen erhalten wurden, graphisch aufgetragen. Die aus der Inkubation mit Protein erhaltene Produktkonzentration setzt sich aus der nichtenzymatischen und der enzymatischen Reaktion zusammen. Im Puffer mit pH 4.5 konnte bei allen Substraten und allen drei Temperaturen ohne Enzym kein Reaktionsprodukt detektiert werden. In Anwesenheit des humanen Lebercytosol ergaben sich bei diesem pH-Wert die niedrigsten Umsetzungsgeschwindigkeiten. Die spontane Reaktion der Substrate steigt bei Erhöhung des pH-Wertes aufgrund der gesteigerten Nukleophilie des Glutathions, die durch die zunehmende Deprotonierung der Thiol-Gruppe auftritt, stark an. Dem gegenüber treten die höchsten Reaktionsgeschwindigkeiten für die enzymatisch katalysierte Reaktion bei pH-Werten von 7.4 bzw. 8.0 auf, in dessen Bereich sich das pH-Optimum der Glutathion-S-Transferasen befinden dürfte. Eine Temperaturerhöhung beschleunigt v. a. die nichtenzymatische Reaktion. Die Enzymreaktion ging bei Erhöhung der Temperatur von 37 °C auf 45 °C in einigen Fällen vermutlich aufgrund der Instabilität der Enzyme zurück (Abb. 114). Somit kann die allgemeine RGT-Regel, wonach sich

bei einer Temperaturerhöhung um 10 K die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt bis vervierfacht, nicht auf die enzymatisch katalysierte Reaktion angewendet werden. Weiterhin wurde beobachtet, dass die spontane Konjugation bei einer Erhöhung der Substrat- bzw. Glutathionkonzentration ansteigt. Daher wurden die Untersuchungen in Anlehnung an die Inhibitionsassays mit einer Substratkonzentration in der Nähe der jeweiligen K_m -Werte und mit 1 mM GSH durchgeführt. Für die meisten Substrate müssen für die Inhibitionsuntersuchungen schonende Inkubationsbedingungen, d. h. eine Inkubationstemperatur von 25 °C und eine Erniedrigung des pH-Wertes auf 6.5 verwendet werden, um das beste Verhältnis zwischen enzymatischer und nichtenzymatischer Reaktion zu erhalten. Eine Ausnahme stellt DCNB dar, das nur sehr langsam spontan mit Glutathion reagiert, gleichzeitig aber auch die niedrigste enzymatische Umsetzungsgeschwindigkeit aller getesteten Substrate besitzt (Abb. 114).

7.3 Hemmung von Glutathion-S-Transferasen

7.3.1 Arznei- und Naturstoffe

Mit dem CDNB-Assay (s. V.2.7.3) wurden eine Reihe von Arznei- und Naturstoffen auf eine Inhibition der Glutathion-S-Transferasen untersucht. Einige inhibitorisch aktive Substanzen sind in Abb. 115 dargestellt. Die Mehrzahl der getesteten Arzneistoffe sind schwache Inhibitoren der GSTs in humanem Lebercytosol, so dass eine Arzneistoffkonzentration von über 250 μM erforderlich ist, um eine 50%ige Hemmung der Enzymaktivität zu erreichen. Das Potential von pharmakokinetischen Arzneimittelinteraktionen aufgrund einer Inhibition von GSTs durch Arzneistoffe kann daher als gering eingeschätzt werden. Eine Ausnahme bildete Hexachlorophen, für das ein IC_{50} -Wert von 0.57 μM ermittelt wurde.

Zur Evaluierung der HPLC-basierten Inhibitionsassays wurden einige literaturbekannte GST-Inhibitoren, wie die Etacrynsäure und das Konjugat der Etacrynsäure, das ebenso wie die Produkte der Enzymassays zuvor synthetisiert wurde, untersucht.³⁰⁹ Für beide Substanzen wurde eine starke Hemmung der cytosolischen GSTs festgestellt (Abb. 116). Mit einem IC_{50} -Wert von $0.176 \pm 0.007 \mu\text{M}$ ist die Hemmung durch das Glutathionkonjugat der Etacrynsäure stärker als die Hemmung durch die Etacrynsäure, was bisherige Literaturangaben bestätigt.³¹¹ Aus den Lineweaver-Burk-Diagrammen lässt sich für beide Substanzen

ein kompetitiver Inhibitionsmechanismus erkennen (Abb. 116). Die ermittelten K_i -Werte betragen $0.49 \pm 0.04 \mu\text{M}$ für die Etacrynsäure und $0.18 \pm 0.01 \mu\text{M}$ für das Glutathionkonjugat der Etacrynsäure. Neben diesen beiden Substanzen wurden Versuche mit der Ellagsäure durchgeführt, für die eine inhibitorische Aktivität gegenüber GSTs beschrieben wurde.³¹² Die GST-Inhibition durch die Ellagsäure fällt mit einem IC_{50} -Wert von $25.8 \pm 2.3 \mu\text{M}$ deutlich schwächer aus als bei der Etacrynsäure und erfolgt nach einem nichtkompetitiven Mechanismus (Abb. 116). An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass aufgrund der Verwendung von humanem Lebercytosol, das mehrere GST-Isoenzyme enthält (s. I.2.3.1), die durch die Substanzen unterschiedlich gehemmt werden können, nur ein Gesamteffekt beobachtet werden kann. Die in der Literatur vorhandenen Werte wurden allerdings vorwiegend anhand von isolierten GST-Isoenzymen erhalten, wodurch sich Abweichungen ergeben können.

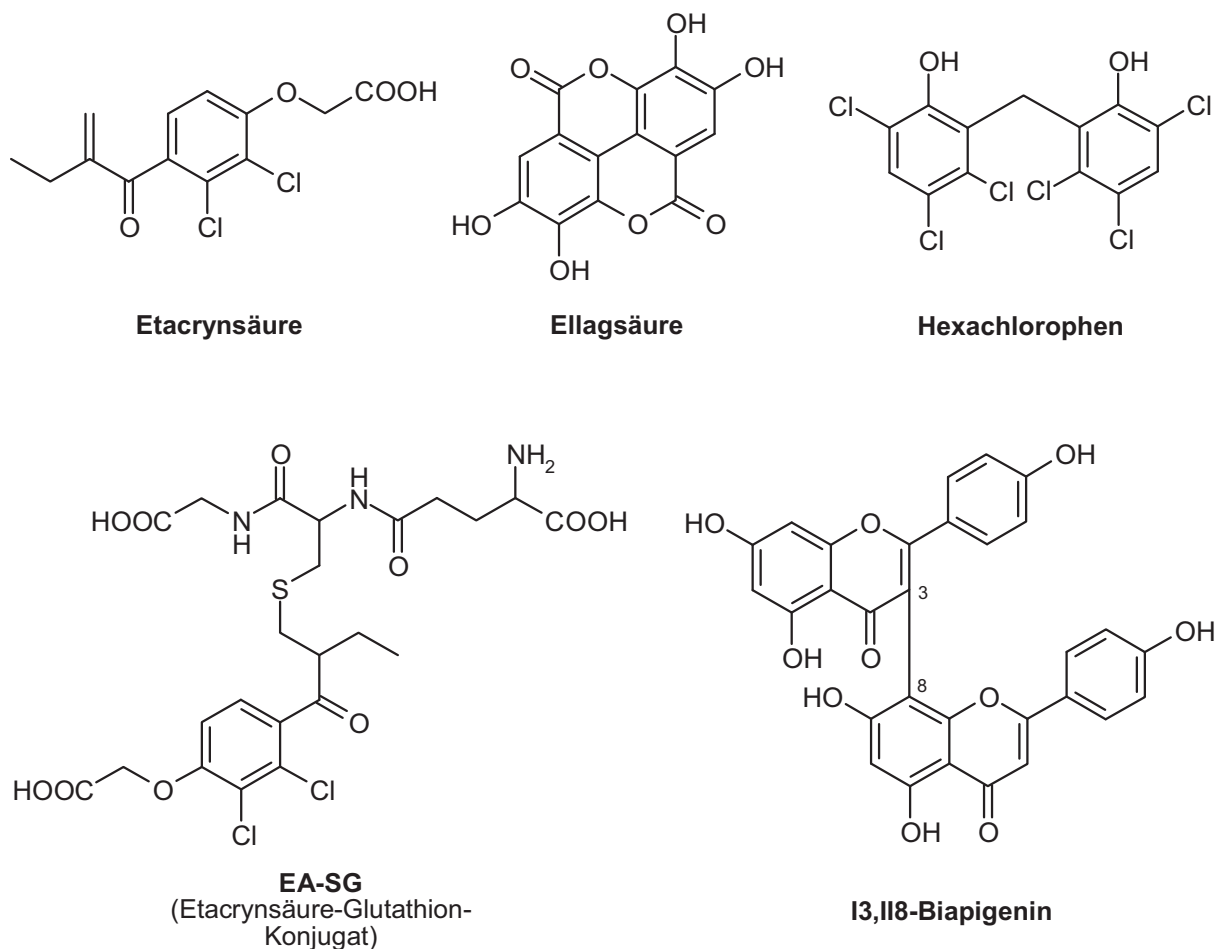


Abb. 115 Strukturformeln einer Auswahl der auf die Glutathion-S-Transferasen inhibitorisch wirkenden Substanzen.

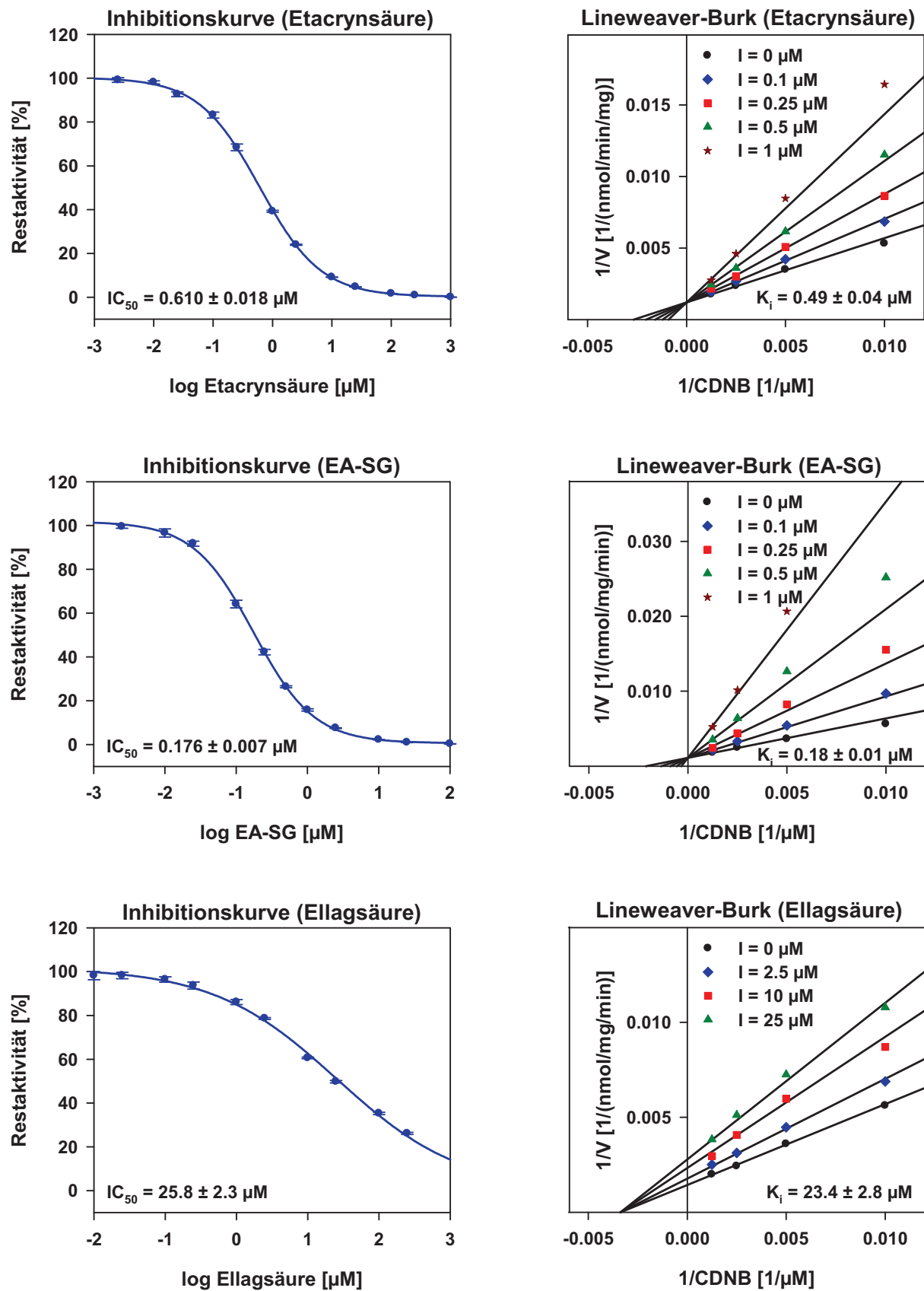


Abb. 116 Inhibition der Glutathion-S-Transferasen in humanem Lebercytosol durch die Etacrynsäure, das Glutathionkonjugat der Etacrynsäure (EA-SG) und die Ellagsäure.

In Tab. 22 sind die IC_{50} -Werte für die Hemmung der cytosolischen GSTs durch das Glutathionkonjugat der Etacrynsäure angegeben, die bei der Verwendung von verschiedenen Testsubstraten erhalten wurden. Für CDNB wurde zusätzlich die Substratkonzentration variiert. Wird die Substratkonzentration erhöht, steigen die IC_{50} -Werte aufgrund des vorliegenden kompetitiven Inhibitionsmechanismus nahezu linear mit der Substratkonzentration an (Tab. 22). Durch die Umsetzung von NBCI wurde mit $182 \pm 7 \mu\text{M}$ ein vergleichbarer IC_{50} -Wert wie mit dem Standardsubstrat CDNB bei einer Substratkonzentration von $200 \mu\text{M}$ erhalten. Mit NQO und DCNB ergaben sich ähnliche IC_{50} -Werte, die allerdings dreimal höher sind als bei den anderen beiden Substraten. Zudem besaßen die Inhibitionskurven mit diesen Substraten eine geringere Steigung, was sich in den ermittelten Hill-Koeffizienten (n_H) widerspiegelt (Tab. 22). Unterschiede in der inhibitorischen Aktivität bei Verwendung der einzelnen Substrate lassen sich durch eine unterschiedliche Isoenzymselektivität der Substrate begründen.

Tab. 22 IC_{50} -Werte und Hill-Koeffizienten (n_H) der Inhibitionskurven für die Hemmung der Glutathion-S-Transferasen in humanem Lebercytosol durch das Glutathionkonjugat der Etacrynsäure bei Verwendung unterschiedlicher Substrate.

Substrat		IC_{50} -Wert [nM]	n_H
Name	Konzentration [μM]		
CDNB	50	101 ± 4	-1.06
	100	133 ± 5	-1.04
	200	176 ± 7	-1.02
	400	288 ± 7	-0.99
	800	510 ± 4	-0.97
NQO	500	486 ± 24	-0.81
DCNB	500	481 ± 41	-0.89
NBCI	250	182 ± 7	-1.14

Weiterhin konnte ein Einfluss der Inkubationsbedingungen auf die inhibitorische Aktivität des Glutathionkonjugates der Etacrynsäure (EA-SG) beobachtet werden (Tab. 23). Im Inkubationspuffer mit pH 6.5, der aufgrund der Unterdrückung der nichtenzymatischen Reaktion häufig gewählt wird, wurde ein wesentlich niedrigerer IC_{50} -Wert gegenüber dem Inkubationspuffer mit pH 7.4 ermittelt. Bei Verwendung von humanen Lebermikrosomen fiel die Hemmung schwächer aus als mit humanem Lebercytosol, wofür die unterschiedliche Isoenzymzusammensetzung verantwortlich

gemacht werden kann (s. I.2.3.1). Zudem erfolgte die Hemmung der mikrosomalen GSTs nicht vollständig, während die GST-Aktivität der cytosolischen GSTs bei hohen Konzentrationen des Inhibitors bis auf null zurückging. Die Ergebnisse zeigen, dass die erhaltenen Hemmdaten stark von den gewählten Versuchsbedingungen, wie z. B. dem Substrat, der Substratkonzentration, dem pH-Wert oder der Inkubationstemperatur, abhängen können und diese bei der Beurteilung der inhibitorischen Aktivität berücksichtigt werden müssen.

Tab. 23 IC₅₀-Werte und Hill-Koeffizienten (n_H) der Inhibitionskurven für die Hemmung der Konjugation von CDNB mit Glutathion durch das Glutathionkonjugat der Etacrynsäure bei Verwendung von unterschiedlichen Inkubationsbedingungen und unterschiedlichen humanen Lebersubzellfraktionen.

Enzym	pH 6.5 / 25 °C		pH 7.4 / 37 °C	
	IC ₅₀ [nM]	n_H	IC ₅₀ [nM]	n_H
HLC	176 ± 7	-0.98	1270 ± 37	-1.01
HLM	328 ± 23	-0.88	2016 ± 212	-1.15

Im Folgenden wurden verschiedene Naturstoffe, wie z. B. Phenolcarbonsäuren und Flavonoide, auf die Inhibition der cytosolischen GSTs untersucht (Abb. 117). Die Inhibition der Gallussäure ist wesentlich schwächer ausgeprägt als die der Ellagsäure, die als Dimer der Gallussäure aufgefasst werden kann. Flavonoidglycoside, wie z. B. Isoquercitrin oder Hyperosid, hemmen im Gegensatz zu den CYP-Enzymen³¹³ die GSTs ähnlich stark, wie die Aglyca. Biflavonoide, wie

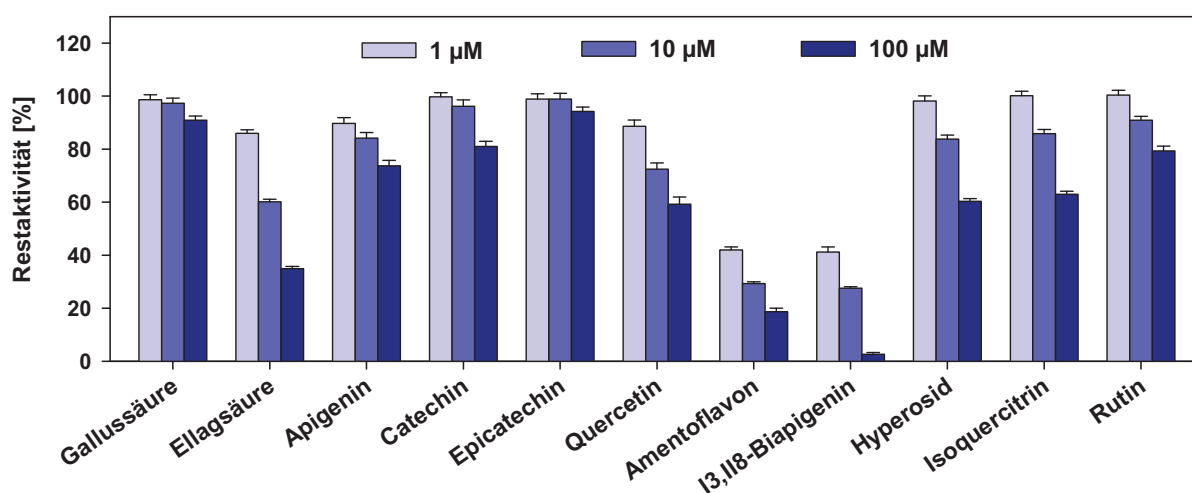


Abb. 117 Untersuchung der Hemmung der Glutathion-S-Transferasen in humanem Lebercytosol durch Phenolcarbonsäuren und Flavonoide mit dem CDNB-Assay.

Amentoflavon oder 13,118-Biapigenin, erwiesen sich im Vergleich zu den Monomeren als starke GST-Inhibitoren deren IC_{50} -Werte unterhalb von $1 \mu\text{M}$ liegen. Die Bioverfügbarkeit der Flavonoide ist allerdings gering, so dass eine In-vivo-Beeinträchtigung der Enzyme in der Leber kaum zu befürchten ist. Aus den erhaltenen Daten lässt sich erkennen, dass größere Moleküle, wie z. B. Dimere, die GSTs stärker hemmen. Aus diesem Grund zeigten vermutlich v. a. die Extrakte der gerbstoffhaltigen Pflanzen eine ausgeprägte GST-Inhibition (s. II.7.3.2.2), da diese oligomere Verbindungen der Gallussäure bzw. des Catechins enthalten.

7.3.2 Pflanzenextrakte

7.3.2.1 Screening von Rohextrakten pflanzlicher Arzneidrogen

Bisher liegen nur wenige Daten zur Beeinflussung der Aktivität von Glutathion-S-Transferasen durch Pflanzenextrakte vor, die überwiegend von nichtoffizinellen Pflanzen stammen.³¹⁰ Aus diesem Grund wurde ein Screening mit einer Reihe von Arzneipflanzen durchgeführt. Hierfür wurden methanolische Extrakte hergestellt und die GST-Restaktivität in Anwesenheit von 10, 50 und 250 $\mu\text{g/ml}$ Extrakt bestimmt, wobei die Extraktkonzentration auf die Drogeneinwaage bezogen wurde (Abb. 118). Als Substrat wurde 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB) verwendet und die Quantifizierung des Metaboliten erfolgte mit Hilfe der massenspektrometrischen Detektion. Da CDNB durch mehrere GST-Isoenzyme umgesetzt wird, müssen mehrere Isoenzyme aus dem humanen Lebercytosol gehemmt werden, damit ein Effekt messbar wird. Die Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten Pflanzenextrakte die cytosolischen GSTs konzentrationsabhängig hemmen (Abb. 118). Sie können dabei in drei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen gibt es Extrakte mit einer schwach ausgeprägten inhibitorischen Aktivität, wie z. B. die aus Korianderfrüchten oder Bittersüßstengeln, bei denen die Enzymaktivität bei der höchsten getesteten Konzentration nur geringfügig beeinflusst wurde. Bei der zweiten Gruppe, der die meisten Pflanzenextrakte angehören, ging die Restaktivität bei einer Extraktkonzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ auf bis zu 50 % zurück. Daneben gibt es einige Extrakte mit starker inhibitorischen Aktivität, wie z. B. der Extrakt aus der Zimtrinde, der in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ bereits eine 50%ige Hemmung verursacht. Bei der höchsten Extraktkonzentration wurde die Aktivität der GSTs fast vollständig gehemmt.

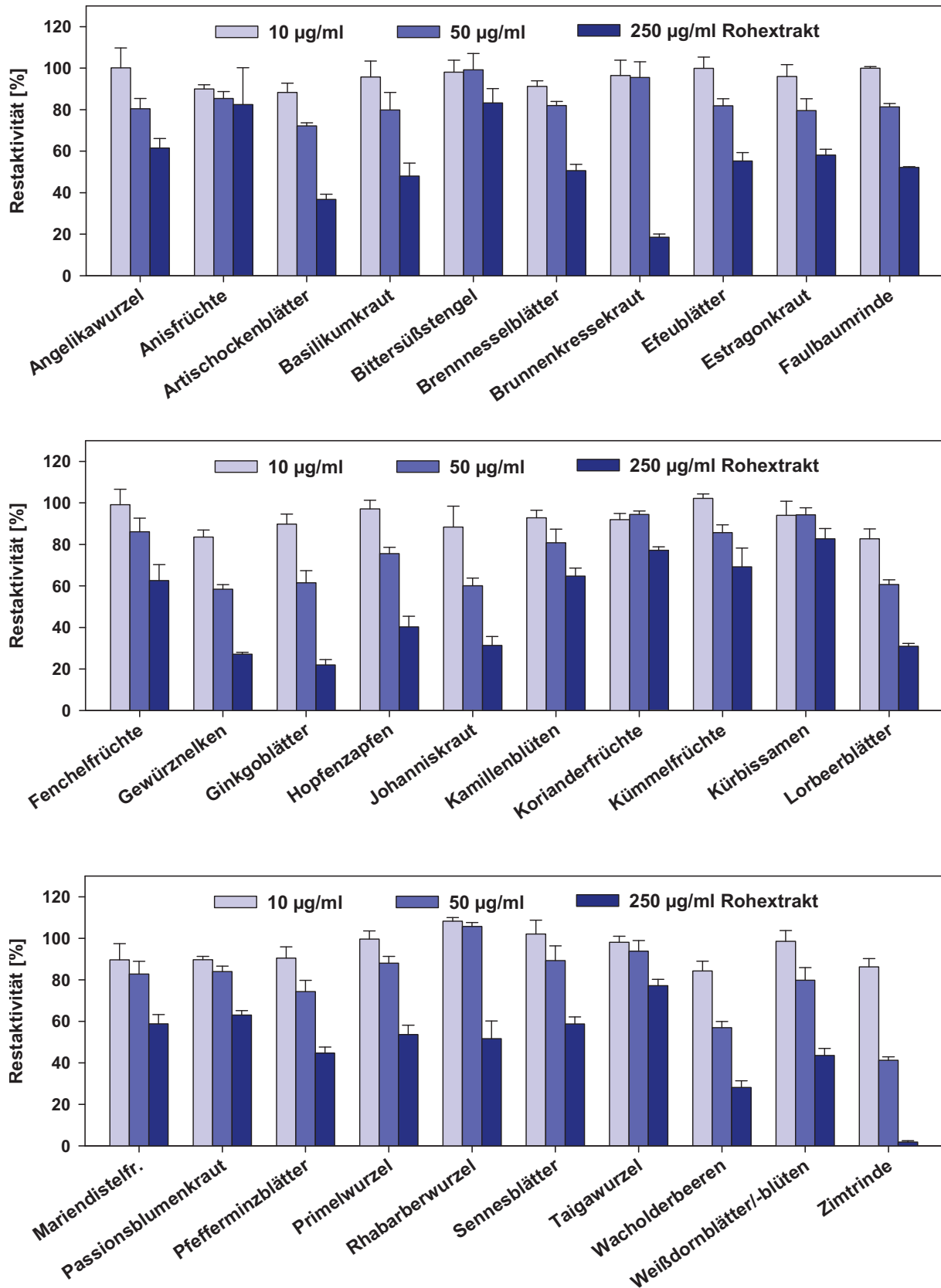


Abb. 118 Screening von Pflanzenextrakten auf Inhibition der Glutathion-S-Transferasen in humanem Lebercytosol mit dem CDNB-Assay (Auszugsmittel Methanol 80 %, Extraktkonzentrationen bezogen auf die Drogeneinwaage).

7.3.2.2 Extrakte gerbstoffhaltiger Arzneidrogen

Aufgrund der Tatsache, dass phenolische Verbindungen die Glutathion-S-Transferasen hemmen^{312,314}, wurden zusätzlich einige Extrakte gerbstoffhaltiger Arzneipflanzen getestet. Für alle methanolischen Extrakte dieser Pflanzen konnte eine ausgeprägte GST-Inhibition festgestellt werden (Abb. 119). Die stärkste Inhibition wurde durch den Extrakt aus Hamamelisblättern erhalten, während die Hemmung durch die Extrakte aus Heidelbeerfrüchten und -blättern deutlich schwächer ist. Sowohl Extrakte von Arzneidrogen mit überwiegend hydrolysierbaren Gerbstoffen, wie z. B. Hamamelis- und Walnussblätter, als auch Arzneidrogen mit Catechingerbstoffen, wie z. B. Ratanhiawurzel, zeigten eine starke GST-Inhibition (Abb. 119).

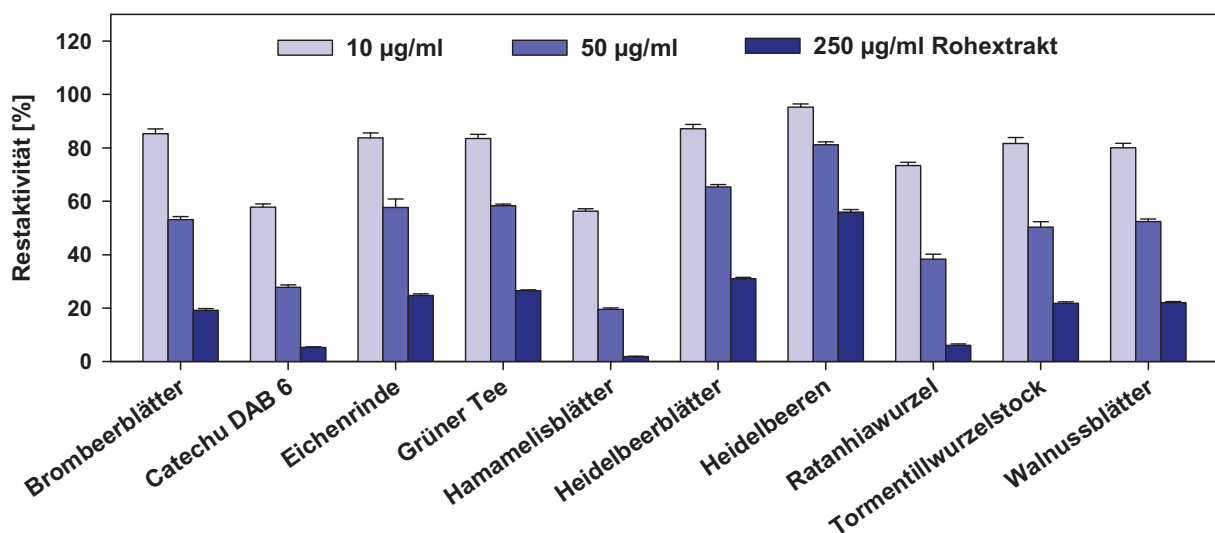


Abb. 119 Untersuchung der Inhibition der Glutathion-S-Transferasen in humanem Lebercytosol durch Rohextrakte gerbstoffhaltiger Drogen mit dem CDNB-Assay (Auszugsmittel Methanol 80 %, Extraktkonzentrationen bezogen auf die Drogeneinwaage).

7.3.2.3 Extrakte lebertoxischer Arzneidrogen

Neben offizinellen Arzneipflanzen wurden auch Trockenextrakte lebertoxischer Pflanzen auf die Inhibition von Glutathion-S-Transferasen untersucht. Mit denselben Extrakten wurde bereits die inhibitorische Aktivität gegenüber den CYP-Enzymen (s. II.3.12) und der Glutathionreduktase (s. II.8.3) bestimmt. Alle Extrakte hemmten die cytosolischen Glutathion-S-Transferasen, wobei die inhibitorische Aktivität annähernd gleichstark ausgeprägt war (Abb. 120). Bei einer Extraktkonzentration von

100 µg/ml wurde ein Rückgang der Enzymaktivität auf etwa 50 % beobachtet, womit die Hemmung schwächer ist als die der meisten Extrakte aus den gerbstoffhaltigen Pflanzen. Der Extrakt aus dem Kraut des Kreosotbusches (*Larrea tridentata*), für den ein IC_{50} -Wert von 21.5 ± 1.2 µg/ml ermittelt wurde, hemmt die Glutathion-S-Transferasen stärker als die anderen Extrakte aus den lebertoxischen Pflanzen. Vergleicht man die inhibitorische Aktivität der Extrakte gegenüber den verschiedenen untersuchten Enzymen, kann gesagt werden, dass die Extrakte die Glutathion-S-Transferasen stärker hemmen als die Glutathionreduktase (s. II.8.3). Die GST-Inhibition fällt aber wesentlich schwächer aus als die der meisten CYP-Enzyme (s. II.3.12).

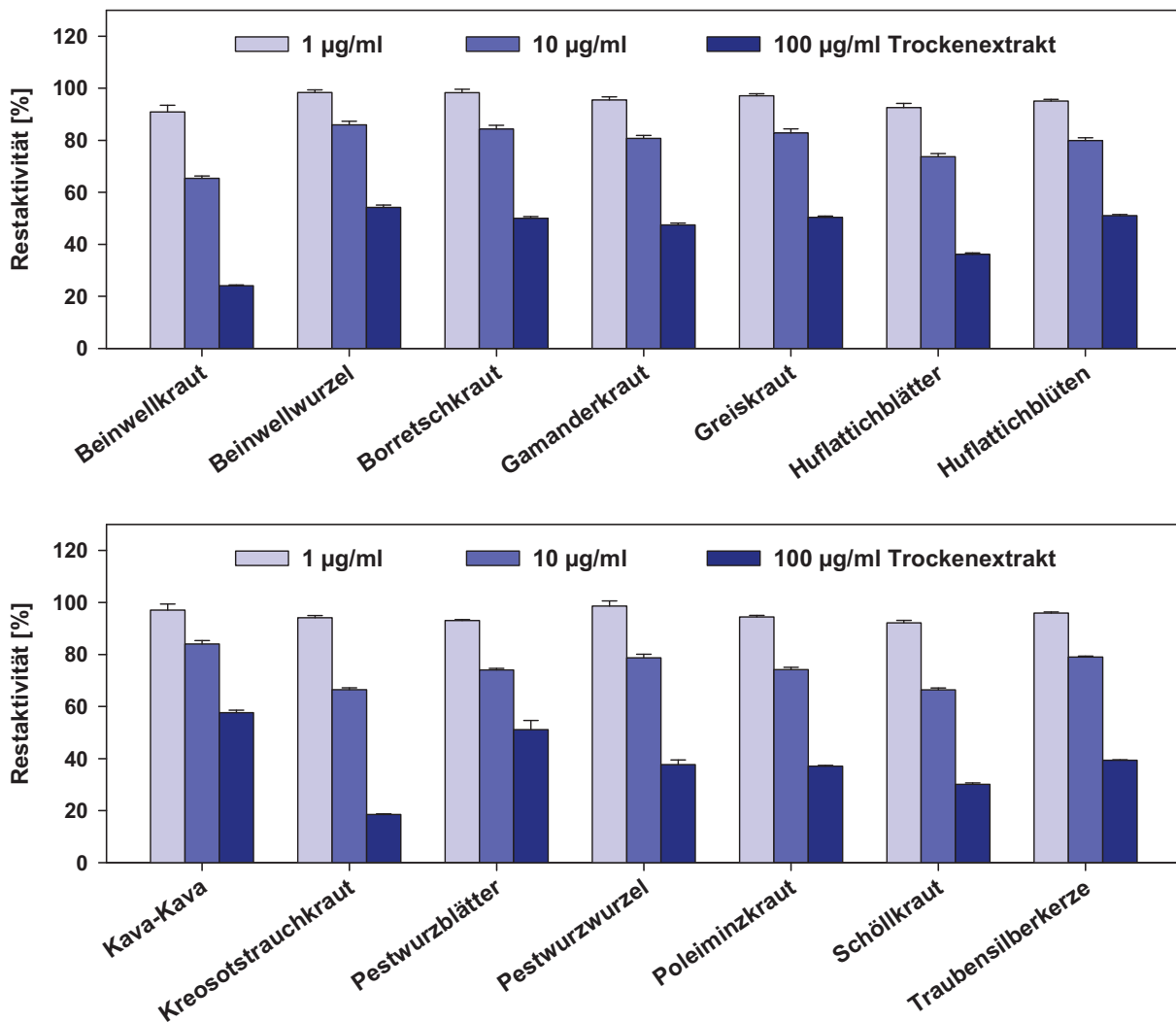


Abb. 120 Untersuchung der Inhibition der Glutathion-S-Transferasen in humanem Lebercytosol durch Trockenextrakte lebertoxischer Pflanzen mit dem CDNB-Assay (Auszugsmittel Methanol 80 %).

7.3.2.4 Extrakte der Zimtrinde

Einfluss des Extraktionsmittels

Bereits beim Screening der Pflanzenextrakte auf Inhibition der Glutathion-S-Transferasen fiel eine starke Inhibition des Extraktes aus der Chinesischen Zimtrinde (*Cinnamomum cassia*) auf. Im Folgenden wurden verschiedene Extraktionsmittel verwendet und die Auswirkung auf die inhibitorische Aktivität der Extrakte untersucht (Abb. 121). Die stärkste Hemmung besaß der Extrakt mit 50%igem Methanol. Erhöht man den Wasseranteil oder verwendet man unpolare Lösungsmittel, wie z. B. Aceton, sinkt die inhibitorische Aktivität der Extrakte (Abb. 121). Methanol-Wassermischungen sind daher ideal, um die inhibitorisch wirkenden Inhaltsstoffe aus dem Drogenmaterial herauszulösen. Bei einer Rohextraktkonzentration von 250 µg/ml betrug die GST-Hemmung des Aceton-Extraktes allerdings noch 80 %. Neben der Chinesischen Zimtrinde, die v. a. als Gewürz eingesetzt wird, wurden ebenfalls Extrakte aus der Echten Zimtrinde (*Cinnamomum zeylanicum*) untersucht. Die inhibitorische Aktivität dieser Extrakte ist deutlich schwächer, so dass bei einer Rohextraktkonzentration von 250 µg/ml maximal eine 50%ige Hemmung erzielt werden konnte. Bezüglich der Effektivität der Extraktionsmittel ergibt sich ein ähnliches Bild, wie bei der Chinesischen Zimtrinde (Abb. 121).

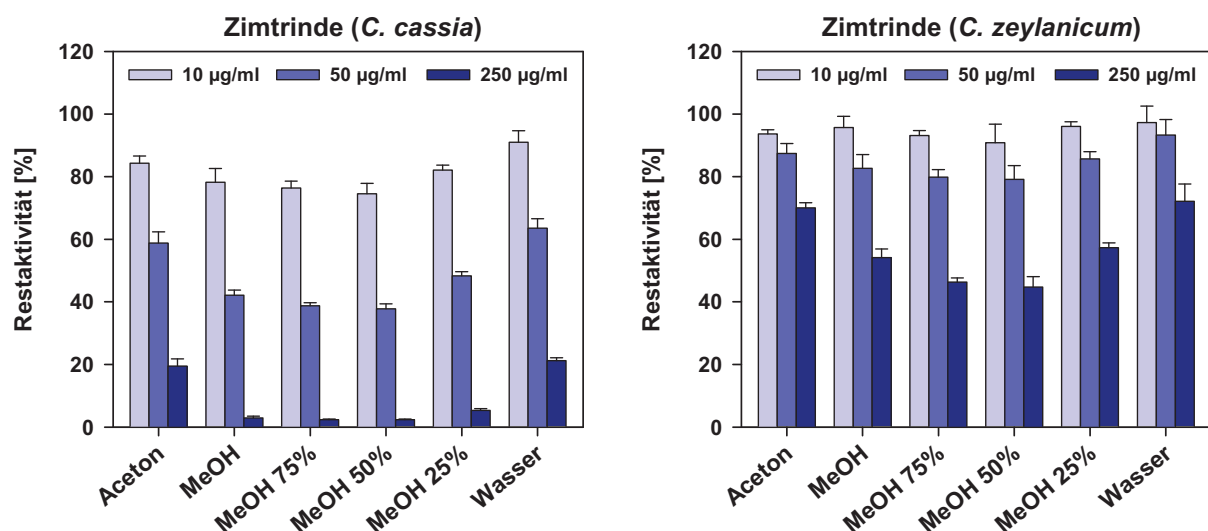


Abb. 121 Inhibition der Glutathion-S-Transferasen in humanem Lebercytosol (CDNB-Assay) durch mit verschiedenen Extraktionsmitteln gewonnene Rohextrakte aus Zimtrinde (Extraktkonzentrationen bezogen auf die Drogeneinwaage).

GST-Inhibition durch Trockenextrakte

Mit $9.7 \pm 0.9 \mu\text{g/ml}$ für den Extrakt aus der Chinesischen Zimtrinde und $12.7 \pm 1.2 \mu\text{g/ml}$ für den Extrakt aus der Echten Zimtrinde liegen die IC_{50} -Werte der hergestellten Trockenextrakte (Abb. 122) beider Arten nahe beieinander, während sich die inhibitorische Aktivität der Rohextrakte deutlich unterschied (Abb. 121). Die Ursache hierfür scheint zu sein, dass bei der Echten Zimtrinde ein wesentlich geringerer Trockenextraktanteil gegenüber der Chinesischen Zimtrinde erzielt wurde (s. V.2.1.2). Aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm für die Inhibition mit Chinesischer Zimtrinde ist ein nicht-kompetitiver Inhibitionsmechanismus erkennbar (Abb. 122). Es wurde ein K_i -Wert von $7.7 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ ermittelt, der nahe am IC_{50} -Wert liegt.

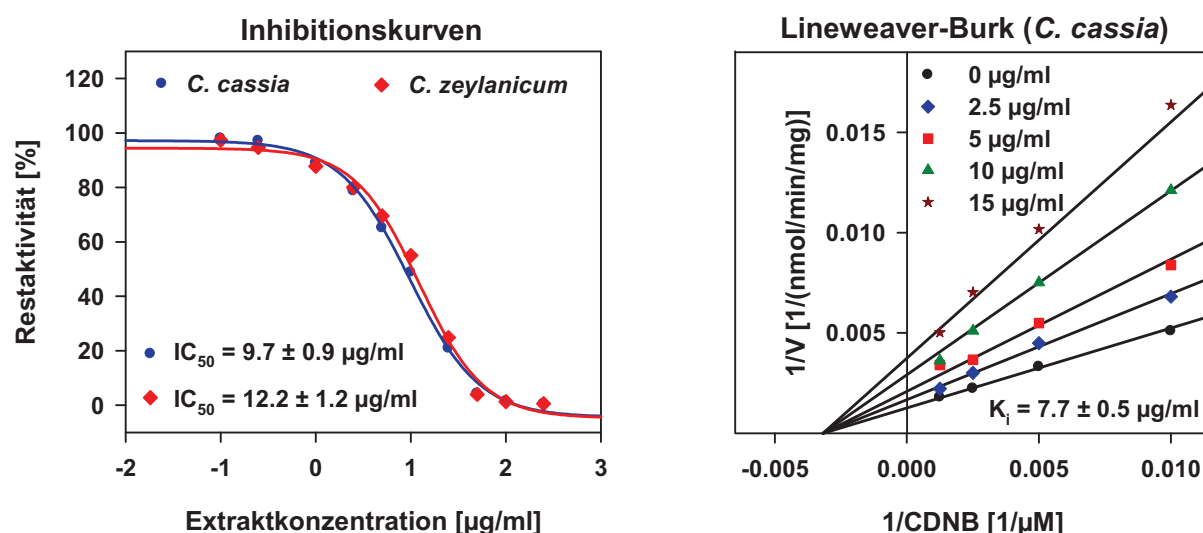


Abb. 122 Inhibition der Glutathion-S-Transferasen in humanem Lebercytosol (CDNB-Assay) durch Trockenextrakte aus der Chinesischen Zimtrinde (*C. cassia*) und der Echten Zimtrinde (*C. zeylanicum*).

GST-Inhibition durch Zimtinhaltsstoffe

Schließlich wurde die inhibitorische Aktivität einiger Inhaltsstoffe der Zimtrinde, darunter Zimtaldehyd und Eugenol, untersucht (Abb. 123). Diese Stoffe hemmten die Glutathion-S-Transferasen kaum. Selbst in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ betrug die Restaktivität noch 80 %. Sie können aufgrund ihrer schwachen inhibitorischen Aktivität und wegen ihrer Flüchtigkeit, wodurch viele dieser Substanzen bei der Herstellung der Trockenextrakte verloren gehen, nicht für die ausgeprägte GST-Hemmung durch die Extrakte verantwortlich sein.

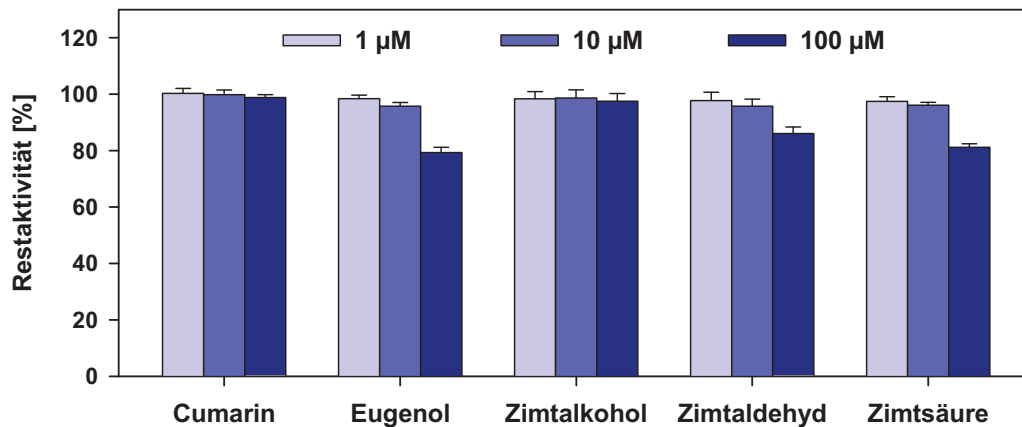


Abb. 123 Inhibition der Glutathion-S-Transferasen in humanem Lebercytosol (CDNB-Assay) durch Inhaltsstoffe aus Zimtrinde.

7.3.2.5 IC₅₀-Werte inhibitorisch aktiver Pflanzenextrakte

Von Arzneipflanzen, die beim Screening eine ausgeprägte GST-Inhibition zeigten, wurden aus den methanolischen Rohextrakten Trockenextrakte hergestellt (s. V.2.1.2). Dabei wurde für die Blatt- bzw. Krautdrogen ein Trockenextraktanteil von etwa 20 bis 35 % bezogen auf die Drogeneinwaage erhalten, was einem Droge-Extrakt-Verhältnis von etwa 5:1 bis 3:1 entspricht. Aus den Wurzel- bzw. Rindendrogen ergab sich ein geringerer Trockenextraktanteil, wodurch das Droge-Extrakt-Verhältnis bei etwa 10:1 bis 5:1 lag. Die GST-Inhibition der Trockenextrakte ist daher gegenüber den Rohextrakten entsprechend erhöht. Durch die Untersuchung der Trockenextrakte liegen definierte Extraktgehalte vor und die

Tab. 24 IC₅₀-Werte für die GST-Inhibition (CDNB-Assay) von Trockenextrakten (s. V.2.1.2) ausgewählter Arzneidrogen (Auszugsmittel Methanol 80 %).

Droge	IC ₅₀ [µg/ml]	Droge	IC ₅₀ [µg/ml]
Brombeerblätter	14.2 ± 0.5	Johanniskraut	16.5 ± 1.9
Catechu	8.6 ± 0.7	Ratanhiawurzel	6.9 ± 0.7
Eichenrinde	12.2 ± 0.4	Tormentillwurzelstock	24.3 ± 1.5
Ginkgoblätter	13.1 ± 1.0	Walnussblätter	18.8 ± 1.3
Grüner Tee	25.0 ± 0.4	Walnussschalen	30.7 ± 1.0
Hamamelisblätter	4.3 ± 0.2	Zimtrinde (<i>C. cassia</i>)	9.7 ± 0.9
Heidelbeerblätter	29.0 ± 1.7	Zimtrinde (<i>C. zeylanicum</i>)	12.2 ± 1.2

inhibitorische Aktivität der einzelnen Drogen kann besser miteinander verglichen werden. Anschließend wurde die GST-Inhibition dieser Extrakte im Konzentrationsbereich von 0.025 bis 250 µg/ml untersucht. Aus den erhaltenen Inhibitionskurven (Abb. 124) wurden die jeweiligen IC_{50} -Werte berechnet (Tab. 24), die recht nahe beieinander lagen und sich alle zwischen 4 und 31 µg/ml bewegten. Wie bereits bei der Untersuchung der Rohextrakte besaß der Extrakt aus den Hamamelisblättern die stärkste GST-Inhibition. In den meisten Fällen wurde bei einer Extraktkonzentration von 250 µg/ml eine vollständige Hemmung der GST erhalten.

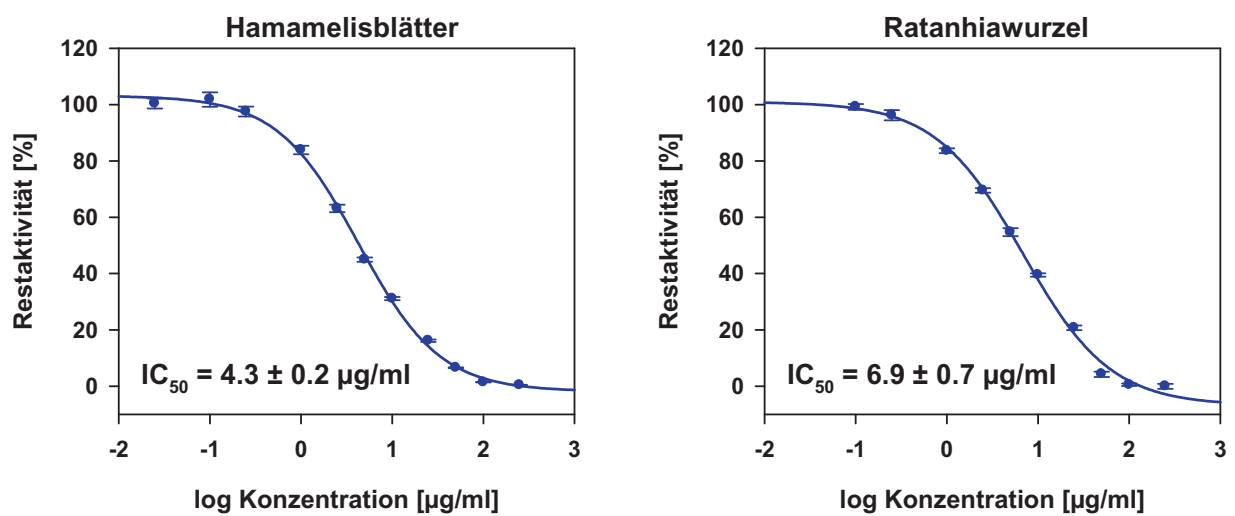


Abb. 124 Inhibitionskurven für die Hemmung der Glutathion-S-Transferasen in humanem Lebercytosol (CDNB-Assay) durch die inhibitorisch aktivsten Pflanzenextrakte.

7.3.2.6 Vergleich verschiedener Quantifizierungsmethoden der Metaboliten

Zur Beurteilung der Selektivität verschiedener Methoden zur Quantifizierung der Metaboliten in Anwesenheit einer komplexen Probenmatrix wurde humanes Lebercytosol zusammen mit CDNB und Glutathion in Anwesenheit von einigen Pflanzenextrakten, für die eine GST-Hemmung bereits nachgewiesen wurde, inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurde das entstandene Glutathionkonjugat mit Hilfe verschiedener Methoden quantifiziert (s. V.2.7.3) und die Restaktivitäten bezogen auf die Kontrolle ohne Pflanzenextrakt ermittelt (Abb. 125). Bei der direkten photometrischen Messung zeigte sich, dass die meisten Pflanzenextrakte ebenfalls eine Absorption bei dieser Wellenlänge besitzen und daher trotz sinkender Produktkonzentration eine hohe Absorption gemessen wird

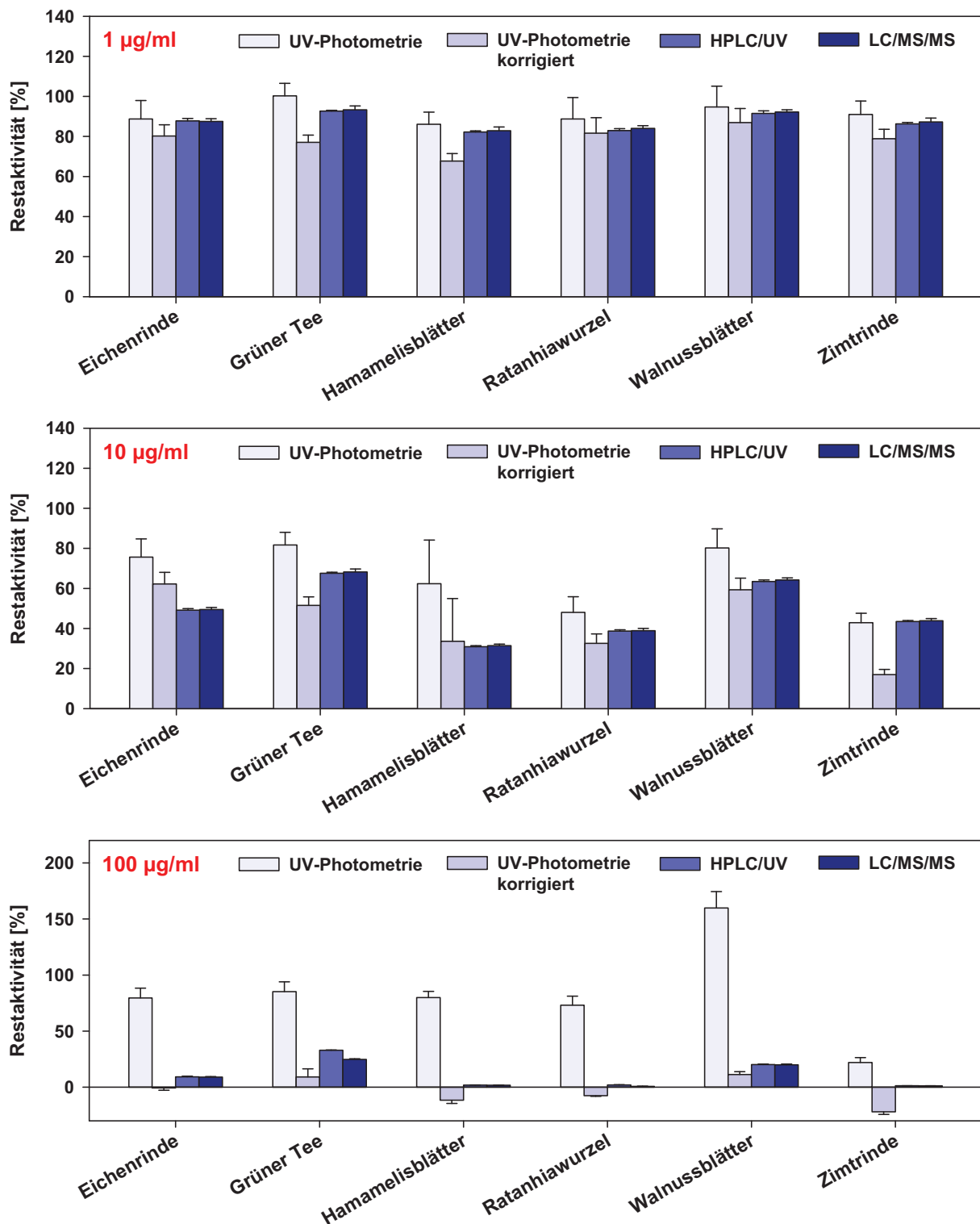


Abb. 125 Bestimmung der Inhibition von Glutathion-S-Transferasen in humanem Lebercytosol durch Pflanzenextrakte (1, 10 und 100 µg/ml Trockenextrakt), wobei die Quantifizierung des Enzymproduktes (2,4-Dinitrophenyl-S-glutathion) mit unterschiedlichen Methoden erfolgte (UV-Photometrie, HPLC/UV- und LC/MS/MS-Analyse). Zur Korrektur der Matrixeffekte bei der UV-Photometrie wurde von der Absorption der Probe (mit Pflanzenextrakt, mit Protein) die Absorption einer Blindprobe (mit Pflanzenextrakt, ohne Protein) subtrahiert.

und so zu große Restaktivitäten erhalten werden. Eine Maßnahme ist die Korrektur der gemessenen Absorptionen mit Hilfe von Blindproben, die den Pflanzenextrakt aber kein Enzym enthalten. Diese Vorgehensweise lieferte aber v. a. bei hohen Extraktkonzentrationen keine plausiblen Ergebnisse (Abb. 125). Die direkte UV-photometrische Detektion der Metaboliten kann daher nicht zur Bestimmung der Inhibition von Pflanzenextrakten empfohlen werden. Durch die chromatographische Trennung bei der HPLC/UV-Analyse wird die Selektivität erheblich gesteigert und es konnten wesentlich reproduzierbarere Ergebnisse erhalten werden (Abb. 125). Nur in seltenen Fällen kam es zu einer Peaküberlagerung des Metaboliten mit Bestandteilen aus dem Pflanzenextrakt. Um die Bestimmung des Metaboliten in solchen Fällen zu ermöglichen, kann eine LC/MS/MS-Analyse angewendet werden. Allerdings waren, bis auf wenige Ausnahmen, die erhaltenen Restaktivitäten mit denen der HPLC/UV-Methode identisch (Abb. 125), so dass eine chromatographische Trennung mit UV-Detektion für die Untersuchung der Inhibition von Glutathion-S-Transferasen durch Pflanzenextrakte ausreichend ist. Bei der Untersuchung der Inhibition von CYP-Enzymen ist allerdings aufgrund der erheblich geringeren Produktkonzentration die massenspektrometrische Detektion vorzuziehen.

8 Glutathionreduktase (GR)

8.1 HPLC/UV-Analyse von Glutathion

Die Glutathionreduktase (GR) reduziert Glutathiondisulfid (GSSG) zu Glutathion, gleichzeitig wird dabei das Cosubstrat Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) in seine oxidierte Form NADP^+ umgewandelt (Abb. 126). In bisher beschriebenen Enzymassays bzw. fertigen Assaykits für die Aktivitätsbestimmung der GR wird häufig das Cosubstrat NADPH erfasst, wobei es zu einer Abnahme der Absorption bei 340 nm kommt.^{315,316} Diese Methode hat einige Nachteile. Zum einen ist die maximal einsetzbare NADPH-Konzentration aufgrund des Lambert-Beerschen Gesetzes limitiert und zum anderen wird bei Verwendung des notwendigen Cosubstratüberschusses nur eine geringfügige Änderung der Absorption gemessen, woraus ein hoher Messwertfehler resultiert. Bei der Verwendung von Zell-

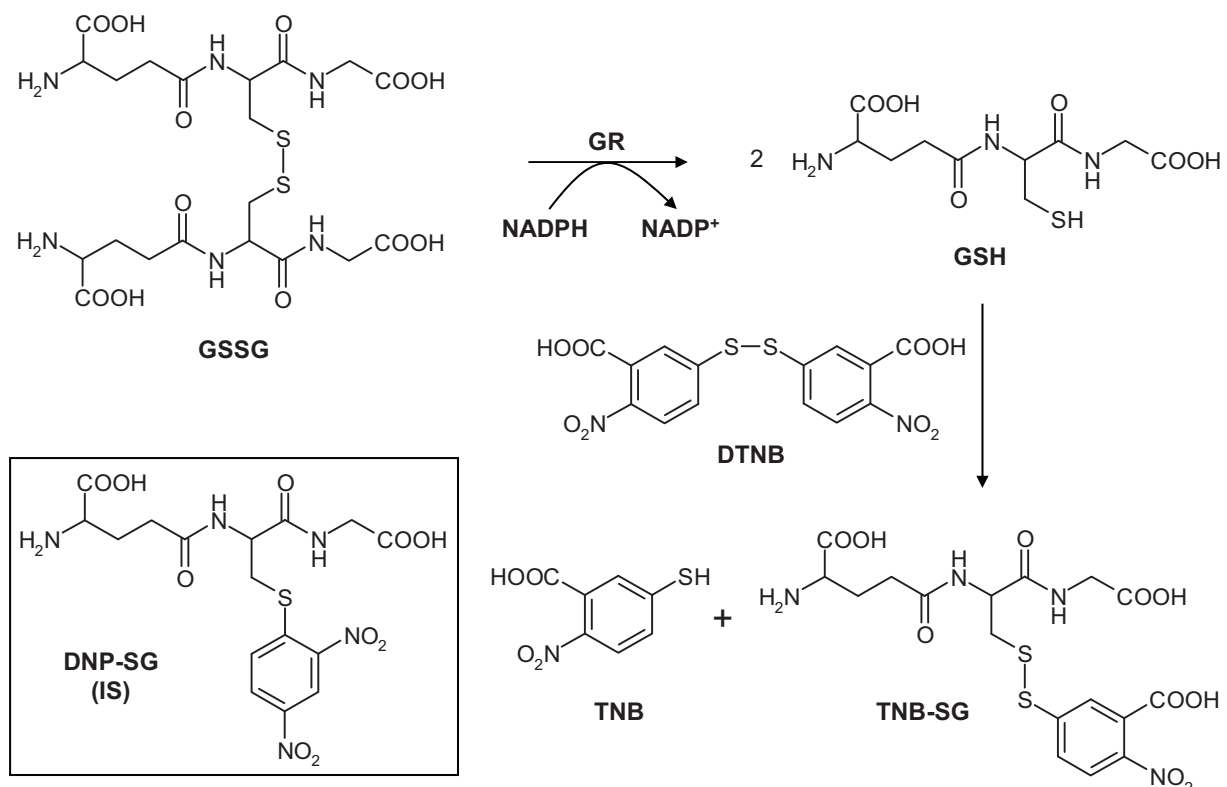


Abb. 126 Reduktion von oxidiertem Glutathion (GSSG) durch die Glutathionreduktase (GR) und Derivatisierung des entstandenen Glutathions (GSH) mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) zu 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB) und dem gemischten Disulfid des Glutathions mit TNB (TNB-SG). Zusätzlich ist die Struktur des internen Standards (IS) 2,4-Dinitrophenyl-S-glutathion (DNP-SG) abgebildet.

homogenaten kann NADPH auch durch andere Enzyme umgesetzt werden, was eine zu hohe GR-Aktivität vortäuscht. Darüber hinaus hat sich bei der Untersuchung von Proben mit komplexer Matrix die direkte Absorptionsspektrometrie als nicht selektiv genug herausgestellt (s. II.7.3.2.6). Eine selektive Erfassung des Enzymproduktes nach vorheriger chromatographischer Trennung von den Matrixbestandteilen lieferte die reproduzierbarsten Ergebnisse. Das durch die GR entstehende Glutathion besitzt durch seinen polaren Charakter allerdings eine schlechte Retention auf dem RP-Material. Es hat kein geeignetes Chromophor für eine UV-Detektion und ist instabil, da es antioxidative Eigenschaften besitzt. Zur Umgehung dieser Nachteile kann eine Derivatisierung durchgeführt werden, wofür sich die durch die Reduktion frei gewordene Thiolgruppe anbietet, um GSH neben GSSG zu quantifizieren. Die am häufigsten für Aminosäuren und Thiole eingesetzten Derivatisierungsreagenzien sind *o*-Phthaldialdehyd³¹⁷, 2,3-Naphthalendialdehyd³¹⁸, Monobrombiman-Derivate³¹⁹, 4-Chlor-7-nitrobenzofurazan³²⁰ und 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB).¹⁴⁶ Mit allen Derivatisierungsreagenzien, außer mit DTNB, entstehen sogar fluoreszierende Reaktionsprodukte. Einige dieser Reagenzien können neben Thiolgruppen auch mit Aminogruppen reagieren und sind somit für eine selektive Bestimmung von GSH ungeeignet. Weiterhin sollte eine Derivatisierung direkt im Inkubationspuffer mit einem pH-Wert von 7.4 möglich

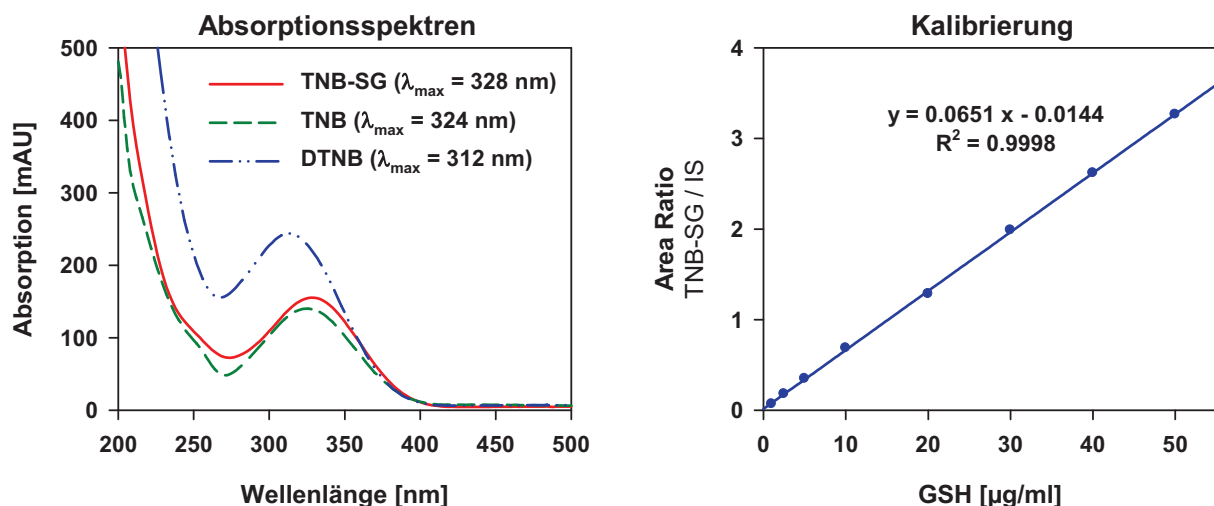


Abb. 127 UV/VIS-Absorptionsspektren von DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)), TNB (5-Thio-2-nitrobenzoesäure) und TNB-SG (TNB-Glutathion-Addukt) gemessen mit einem Diodenarraydetektor bei pH 2 (links). Kalibrierung der HPLC/UV-Analyse von GSH (Glutathion) nach Derivatisierung mit DTNB (1 mM) und Auswertung der Peakfläche von TNB-SG (rechts).

sein und das Reaktionsprodukt für die anschließende HPLC-Analyse eine längere Zeit stabil sein, weshalb DTNB als Derivatisierungsreagenz ausgewählt wurde. Bei der Reaktion von DTNB mit einem Thiol-Analyten, wie z. B. Glutathion (Abb. 126), entsteht das Monomer 4-Thio-2-nitrobenzoesäure (TNB) und ein gemischtes Disulfid des Thiol-Analyten mit TNB.¹⁴⁶ Zunächst wurde jeweils Glutathion, Acetylcystein, Captopril und Penicillamin mit DTNB umgesetzt und mit Hilfe einer HPLC/UV-Analyse untersucht (Abb. 128). Durch Injektion einer Blindprobe konnte der Peak mit einer Retentionszeit von 10.9 min dem Derivatisierungsreagenz zugeordnet werden. Das gemischte Disulfid aus TNB und dem jeweiligen Reaktionspartner besitzt in den einzelnen Proben unterschiedliche Retentionszeiten, während es sich bei dem Peak mit einer Retentionszeit von 7.4 min um TNB handelt. Die Ergebnisse bestätigen bisherige HPLC-Untersuchungen der Derivatisierung von Thiolen.^{321,322} Kolorimetrische Assays zur Bestimmung von Glutathion, in denen eine Derivatisierung mit DTNB erfolgt, beruhen darauf, dass TNB selektiv neben dem Derivatisierungsreagenz erfasst wird, da durch die im Inkubationspuffer vorliegende deprotonierte Thiolgruppe ein bathochromer Shift erfolgt und die entstandene gelb gefärbte Lösung bei 412 nm vermessen werden kann.³²³ Bei der hier angewendeten HPLC/UV-Analyse unterscheiden sich die Absorptionsmaxima von DTNB, TNB und des gemischten Disulfides TNB-SG aufgrund des sauren Fließmittels kaum (Abb. 127), so dass als Detektionswellenlänge 325 nm gewählt wurde (Abb. 128). Auffällig war, dass die Reaktion mit DTNB sehr schnell erfolgte und bereits ein geringer Überschuss des Reagenzes für eine vollständige Umsetzung ausreichend war. Für den Assay wurde demnach eine Konzentration von 1 mM DTNB verwendet. Bei der RP-HPLC-Analyse verbesserte der Zusatz von Trifluoressigsäure durch die Zurückdrängung der Protolyse der Carboxylgruppen die Retention der Analyten. Durch die Injektion der inkubierten Probe (ca. 50 µl) wurde aufgrund der darin enthaltenen Pufferlösung der pH-Wert des Fließmittels in der Säule allerdings gestört, wodurch sich aufgrund der starken Acidität der Analyten, die durch die Substitution der Nitrogruppen resultiert, keine reproduzierbaren Retentionszeiten und eine schlechte Peaksymmetrie ergaben. Dies konnte durch Ansäuern der Probe mit Ameisensäure verhindert werden.

Zur quantitativen Bestimmung des Glutathions wurde der Peak des Disulfids TNB-SG herangezogen, was wesentlich spezifischer ist als die meist angewendete Detektion von TNB, da TNB auch durch andere in der Probe enthaltenen

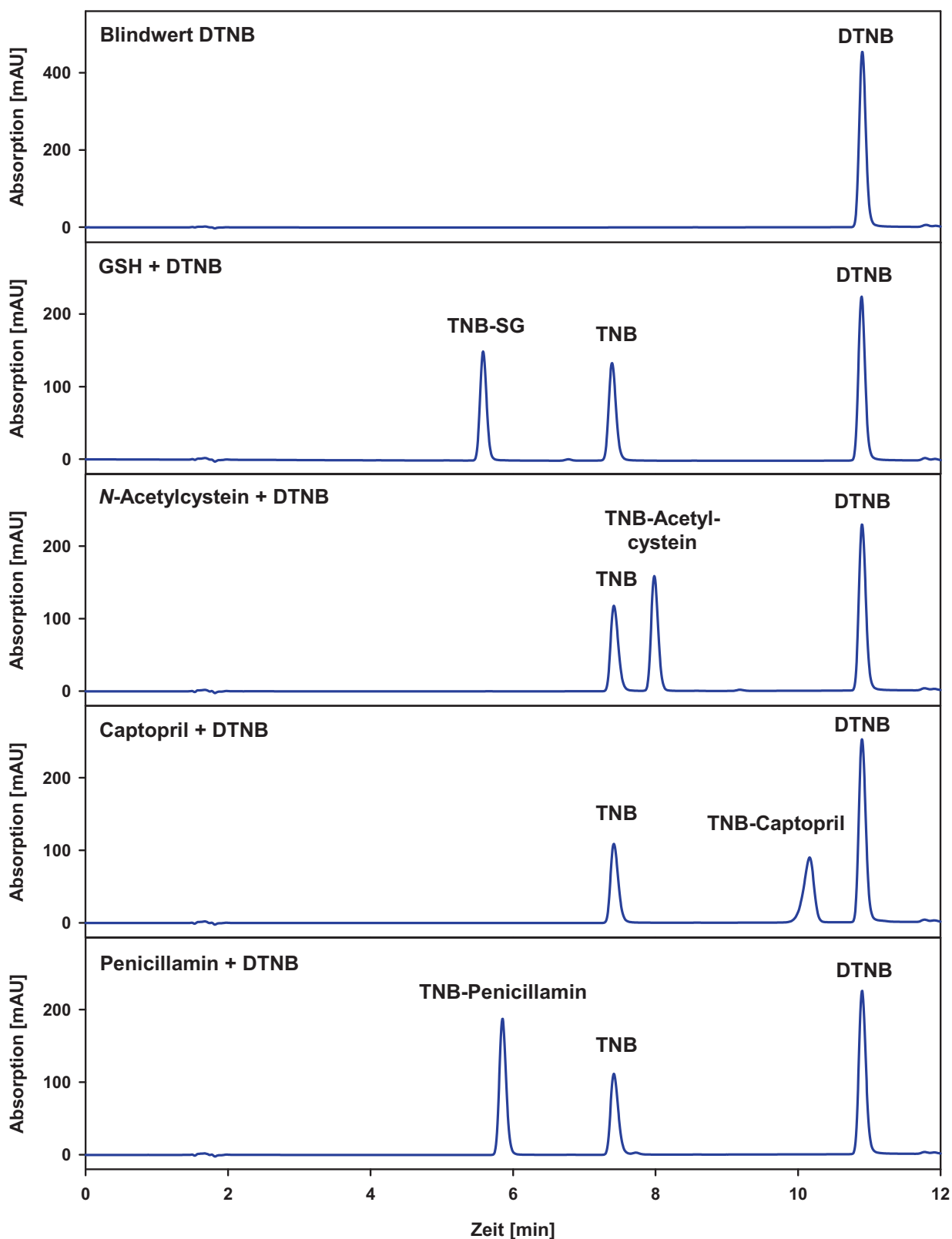


Abb. 128 HPLC/UV-Analyse verschiedener Thiol-Analyten nach Derivatisierung mit DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)). Säule: Phenomenex Synergi Max-RP (150 x 4.6 mm; 4 μ m), Fließmittel: 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Methanol mit 0.05 % Trifluoressigsäure (B), Gradient: 30 – 90 % B in 12 min, Flussrate: 1 ml/min, Detektion: 325 nm, Injektionsvolumen: 25 μ l.

Reduktionsmittel oder durch Hydrolyse von DTNB entstehen kann.³²⁴ Darüber hinaus wurde ein sinkender TNB-Gehalt in den Proben während der Verweildauer im HPLC-Autosampler beobachtet, was durch eine Reoxidation zu DTNB erklärt werden kann. Zur Quantifizierung wurde den Proben das strukturverwandte und zuvor synthetisierte 2,4-Dinitrophenyl-S-glutathion (DNP-SG) als interner Standard zugesetzt (Abb. 126). Aufgrund der für den Assay verkürzten Chromatographiezeit, innerhalb der das Derivatisierungsreagenz nicht von der Säule eluierte, wurde ein Spülschritt mit reiner organischer Phase angefügt. Für die Durchführung des Assays ergab sich die folgende optimierte Vorgehensweise. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Cosubstrates NADPH gestartet. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe der Stopplösung, die neben Methanol das Derivatisierungsreagenz und den internen Standard enthielt. Das ausgefällte Protein wurde abzentrifugiert und eine definierte Menge des Überstandes wurde mit verdünnter Ameisensäure versetzt. Nach erneuter Zentrifugation konnten die Proben in das HPLC-System injiziert werden. Weiterhin war die Untersuchung von Blindproben erforderlich, da die eingesetzten subzellulären Fraktionen geringe Mengen an Glutathion enthielten. Die TNB-SG-Peakfläche der Blindprobe, die kein NADPH enthielt, wurde dann von der TNB-SG-Peakfläche der anderen Proben subtrahiert. Zur Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit wurde eine Kalibrierung mit Glutathion im Konzentrationsbereich von 1 bis 50 µg/ml durchgeführt. Es konnte eine ausgezeichnete Linearität für die Derivatisierung von Glutathion mit DTNB anhand der HPLC/UV-Detektion von TNB-SG festgestellt werden (Abb. 127).

8.2 Optimierung des Glutathionreduktase-Assays

Zur Optimierung der Inkubationsbedingungen des Glutathionreduktase-Assays wurden zunächst verschiedene subzelluläre Fraktionen der Humanleber mit oxidiertem Glutathion umgesetzt. Die geringste Aktivität, bezogen auf die eingesetzte Proteinkonzentration, besaßen die Mikrosomen und die höchste fand sich im Cytosol (Abb. 129), d. h. die GR kommt überwiegend frei im Cytosol vor und ist nicht membrangebunden. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher das humane Lebercytosol verwendet. Zur Bestimmung der kinetischen Daten wurde die Umsetzungsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen ermittelt. Die Auswertung nach dem Michaelis-Menten-Modell ergab einen K_m -Wert von

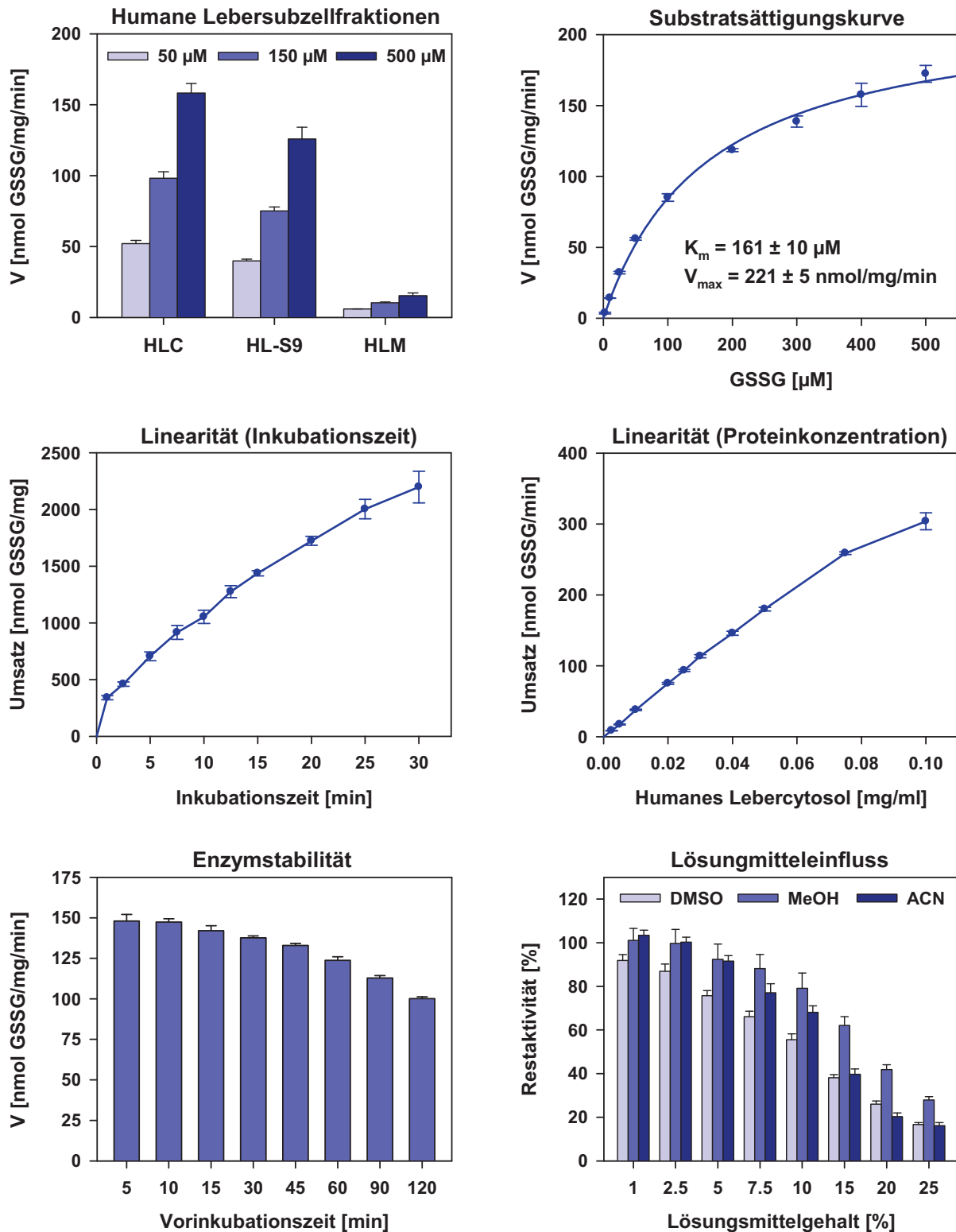


Abb. 129 Optimierung der Inkubationsbedingungen für den Glutathionreduktase-Assay. Untersuchung der Aktivität verschiedener humaner Lebersubzellfraktionen und Aufnahme der Substratsättigungskurve mit humanem Lebercytosol (oben). Bestimmung des Substratumsatzes (150 μM GSSG) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und von der Proteinkonzentration (Mitte). Vorinkubation bei 37 °C zur Untersuchung der Enzymstabilität und Einfluss von Lösungsmitteln auf die Enzymaktivität (unten).

161 ± 10 µM und eine maximale Umsetzungsgeschwindigkeit von 221 ± 5 nmol GSSG/mg/min (Abb. 129). Die bisher in der Literatur angegebenen K_m -Werte wurden v. a. von anderen Organismen oder Geweben erhalten und bewegen sich im Bereich von 50 bis 200 µM.^{315,316,325} Für die folgenden Untersuchungen wurde eine Substratkonzentration von 150 µM verwendet. Das Cosubstrat NADPH wurde in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt, was im Sättigungsbereich liegt.^{315,316,325} Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Inkubationszeit wurde die Reaktion zu unterschiedlichen Zeiten abgestoppt und der Substratumsatz, bezogen auf die Proteinkonzentration, gegenüber der Inkubationszeit aufgetragen (Abb. 129). Nach einer höheren initialen Reaktionsgeschwindigkeit steigt die Kurve von 5 bis etwa 15 min linear an, d. h. die Umsetzungsgeschwindigkeit ist in diesem Bereich konstant, so dass eine Inkubationszeit von 10 min für den Inhibitionsassay verwendet wurde. Neben der Inkubationszeit wurde auch die Proteinkonzentration variiert. Bis zu einer Konzentration von 0.05 mg/ml ist der Substratumsatz proportional zur Proteinkonzentration (Abb. 129), weshalb für die folgenden Untersuchungen 0.025 mg/ml humanes Lebercytosol verwendet wurde. Um die Stabilität des Enzyms zu überprüfen, wurden die Proben vor dem Start der Reaktion verschiedene Zeiten vorgewärmt. Dabei sank die Enzymaktivität auf etwa zwei Drittel innerhalb von zwei Stunden (Abb. 129). Kurze Verweilzeiten von bis zu 10 min, wie sie bei der Durchführung des Assays vorkommen, wirkten sich allerdings kaum auf die Enzymaktivität aus. Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener Lösungsmittel auf die Enzymaktivität untersucht, da bei den Inhibitionsuntersuchungen durch die Zugabe des Inhibitors Lösungsmittel in den Inkubationsansatz gelangt. Mit steigender Lösungsmittelkonzentration nimmt die Enzymaktivität ab, wobei der schwächste Effekt durch Methanol hervorgerufen wird (Abb. 129). Bei niedrigen Lösungsmittelkonzentrationen senkte DMSO die Aktivität am stärksten ab, während bei höheren Lösungsmittelkonzentrationen der Effekt von DMSO und Acetonitril vergleichbar ist. Konzentrationen von 1 oder 2 %, wie sie im Inhibitionsassay vorkommen, verursachten eine Hemmung von maximal 10 %. Dieser Hemmeffekt wurde durch Zugabe derselben Lösungsmittelkonzentration zu der Kontrollprobe ausgeglichen.

8.3 Inhibition der Glutathionreduktase durch Pflanzenextrakte

Mit dem unter II.8.2 beschriebenen GR-Assay wurden Pflanzenextrakte auf eine Inhibition der Glutathionreduktase untersucht (Abb. 130). Hierfür wurden Trockenextrakte lebertoxischer Pflanzen verwendet. Zusätzlich wurden Extrakte aus Walnussblättern und Walnusschalen (*Juglans regia*) hergestellt, da diese Naphthochinon-Derivate, wie z. B. Juglon, enthalten. Von solchen Strukturen ist bekannt, dass diese die Glutathionreduktase hemmen können.⁸⁸ Beispielsweise wurde in dieser Arbeit ein Rückgang der GR-Aktivität auf 36 % in Anwesenheit von 100 µM Menadion gemessen. Im Gegensatz zu den CYP-Enzymen (s. II.3.12) und den Glutathion-S-Transferasen (s. II.7.3.2.3) wird die Aktivität der Glutathionreduktase kaum durch die Pflanzenextrakte beeinflusst. Die Restaktivität bei einer

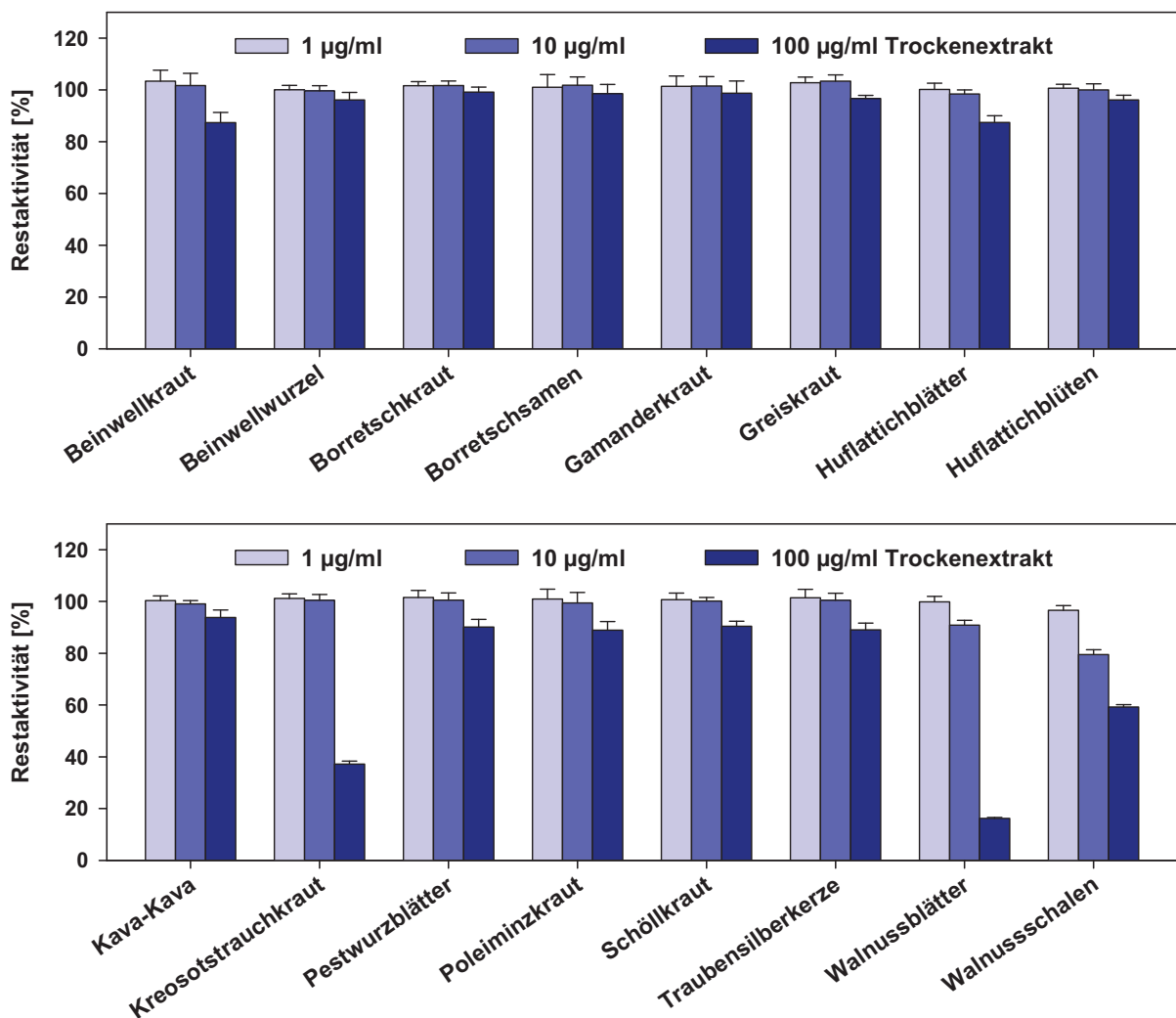


Abb. 130 Untersuchung von Pflanzenextrakten (Auszugsmittel Methanol 80 %) auf Inhibition der Glutathionreduktase aus humanem Lebercytosol.

Extraktkonzentration von 100 µg/ml lag meist über 90 %. Eine stärkere GR-Hemmung wurde bei den Extrakten aus dem Kraut des Kreosotstrauches (*Larrea tridentata*) und den Extrakten aus der Walnuss beobachtet. Die GR-Hemmung der Extrakte aus den Walnussblättern war stärker als die des Extraktes aus den Nussschalen. Da die Naphthochinone v. a. in den Schalen der Früchte vorkommen, können diese nicht allein für die Hemmung der Glutathionreduktase verantwortlich sein. Zudem ist unklar, inwieweit diese bei der Herstellung der Trockenextrakte verändert werden.

III ZUSAMMENFASSUNG

Arzneistoffe werden nach ihrer Applikation durch verschiedene fremdstoffmetabolisierende Enzyme des Organismus biochemisch verändert. Durch eine Hemmung dieser Enzyme, z. B. durch Grapefruitsaft oder einen gleichzeitig eingenommenen Arzneistoff, kann es insbesondere bei Arzneistoffen mit geringer therapeutischer Breite, wie z. B. Theophyllin oder Phenprocoumon, zu gefährlichen Nebenwirkungen kommen. Besonders gefährdet sind multimorbide Patienten, die eine Therapie mit einer Vielzahl von Arzneimitteln erhalten. Um den Metabolismus von neuen Wirkstoffen und deren Interaktionspotential zu untersuchen, werden u. a. In-vitro-Experimente mit Zellfraktionen oder einzelnen Enzymen durchgeführt. Bei Inhibitionsassays wird der Einfluss von Arzneistoffen auf die Umsetzung eines Testsubstrates untersucht. Ein Großteil dieser Arbeit beschäftigt sich daher mit der Entwicklung von Methoden, mit denen die Inhibition wichtiger fremdstoffmetabolisierender Enzyme, wie Cytochrom-P450-Enzyme (CYP-Enzyme), Glutathion-S-Transferasen (GSTs) und Carboxylesterasen (CES), untersucht werden kann. Dabei wurde auch eine Charakterisierung der Testsubstrate vorgenommen. Darüber hinaus wurden die Bioaktivierung von Clopidogrel und die Bildung von reaktiven Metaboliten untersucht.

Aufgrund aktueller Diskussionen über die Interaktion zwischen Clopidogrel und Omeprazol wurde in dieser Arbeit die **Bioaktivierung von Clopidogrel** mit Hilfe von LC/MS/MS-Analysen und rekombinanten CYP-Enzymen sowie humanen Lebermikrosomen untersucht. Aufgrund der Instabilität des aktiven Metaboliten wurde in den inkubierten Proben eine Derivatisierung mit Dimedon durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten, dass die Umwandlung zum 2-Oxo-Clopidogrel durch mehrere CYP-Enzyme erfolgt. Neben CYP2C19 sind CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9 und CYP3A4 beteiligt. Anhand von selektiven Inhibitoren konnte CYP3A4 für die Bildung des aktiven Metaboliten aus 2-Oxo-Clopidogrel identifiziert werden. Neben der Biotransformation durch CYP-Enzyme wird hauptsächlich der Carbonsäureester des Clopidogrels hydrolysiert. Untersuchungen mit humanen Subzellfraktionen und rekombinanten Carboxylesterasen zeigen, dass die Esterhydrolyse durch CES1 katalysiert wird. Des Weiteren wurde der Metabolismus von Omeprazol untersucht. Es stellte sich heraus, dass die 5-Hydroxylierung und die 5-O-Demethylierung

hauptsächlich durch CYP2C19 und CYP2D6 erfolgen. Dabei besitzt Omeprazol die höchste Affinität zu CYP2C19. Die Bildung von Omeprazolsulfon wird hingegen nur durch CYP3A4 katalysiert. Mit Hilfe etablierter CYP-Inhibitionsassays wurde der Einfluss von Clopidogrel und Omeprazol auf neun verschiedene CYP-Enzyme untersucht. Durch Clopidogrel wurden CYP2B6 ($IC_{50} = 6 \text{ nM}$), CYP2C19 ($IC_{50} = 0.4 \text{ }\mu\text{M}$) und CYP1A2 ($IC_{50} = 2.8 \text{ }\mu\text{M}$) gehemmt. Omeprazol inhibiert v. a. CYP2C19 ($IC_{50} = 2 \text{ }\mu\text{M}$) und CYP3A4 ($IC_{50} = 17 \text{ }\mu\text{M}$). Im Folgenden wurde auch der Einfluss von Omeprazol auf die Bildung von 2-Oxo-Clopidogrel untersucht. Die Bioaktivierung wurde allerdings erst bei einer Omeprazol-Konzentration von mehr als $10 \text{ }\mu\text{M}$ beeinflusst. Am stärksten wurde dabei CYP2C19 (IC_{50} ca. $100 \text{ }\mu\text{M}$) gehemmt. Aufgrund der recht schwachen Inhibition von CYP2C19 durch Omeprazol und der Tatsache, dass mehrere CYP-Enzyme die Bildung von 2-Oxo-Clopidogrel katalysieren, lässt sich der Wirkungsverlust von Clopidogrel bei einer gleichzeitigen Einnahme von Omeprazol anhand der Ergebnisse der In-vitro-Versuche nicht durch eine Hemmung von CYP2C19 erklären.

Eine bisher nur wenig bei In-vitro-Interaktionsstudien untersuchte Klasse fremdstoffmetabolisierender Enzyme sind die **Carboxylesterasen** (CES), die v. a. bei der Bioaktivierung von Esterprodrugs eine wichtige Rolle spielen. Für die Entwicklung von Inhibitionsassays wurden zunächst verschiedene Modellsubstrate ausgewählt. Nach Inkubation dieser Substrate mit humanen Subzellfraktionen und rekombinanten Carboxylesterase-Enzymen wurden die Metaboliten mit Hilfe einer HPLC/UV-Analyse quantifiziert. Es zeigte sich, dass Methyl-4-nitrobenzoat und Mycophenolatmofetil selektiv durch CES1 hydrolysiert werden. Die Hydrolyse von Phenylacetat, *p*-Nitrophenylacetat und 4-Methylumbelliferylacetat wurde durch alle verwendeten Enzyme katalysiert. Darüber hinaus konnte eine Hydrolyse der aus *Boswellia*-Arten (Weihrauch) stammenden 3-O-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure durch CES2 beobachtet werden. Aufgrund der bei den meisten Modellsubstraten auftretenden Instabilität im Inkubationspuffer war eine Korrektur mit Hilfe von Blindproben erforderlich. Die Hydrolyse konnte durch Erniedrigung des pH-Wertes des Inkubationspuffers von 7.4 auf 6.5 und durch die Zugabe von Essigsäure zur Stopplösung verlangsamt werden. Anschließend wurde die Beeinflussung der Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat durch Pflanzenextrakte untersucht. Es zeigte sich, dass zahlreiche Extrakte die Esterasen aus der humanen Leber hemmten und die

Aktivität bei einer Extraktkonzentration von 25-50 µg/ml weit unterhalb von 50 % lag. Die Inhibition von CES durch Pflanzenextrakte stellt daher ein bisher unbekanntes Risiko für Arzneimittelinteraktionen dar.

Cytochrom-P450-Enzyme (CYP-Enzyme) sind die wichtigste Gruppe fremdstoff-metabolisierender Enzyme. Zur Untersuchung der Beeinflussung dieser Enzyme durch neue Wirkstoffe werden daher standardmäßig In-vitro-Interaktionsstudien durchgeführt. Von der Food and Drug Administration (FDA) wurden daher für jedes CYP-Enzym verschiedene Arzneistoffe als Testsubstrate vorgeschlagen. Zusätzlich kommen bei solchen Untersuchungen Modellssubstrate zum Einsatz, deren Metaboliten fluoreszieren und die somit für ein Hochdurchsatz-Screening mit Hilfe von Mikrotiterplatten verwendet werden können. In dieser Arbeit wurde eine Reihe von Modellsstoffen (Cumarin- und Harman-Derivate) auf ihre Eignung als Substrate für CYP-Inhibitionsassays untersucht. Nach der Entwicklung von Methoden zur Detektion der Metaboliten, die durch LC/MS/MS-Analysen oder durch HPLC/Fluoreszenzanalysen erfolgte, wurden die CYP-Enzyme identifiziert, die an der Umsetzung der Substrate beteiligt sind und mit Hilfe von CYP-Enzymen und humanen Lebermikrosomen wurden die K_m -Werte der Substrate bestimmt. Die Untersuchungen zur Stabilität der CYP-Enzyme über 60 min zeigten, dass diese bei 37 °C stark an Aktivität verlieren, insbesondere CYP1A2. Für eine maximale Umsetzungsgeschwindigkeit war eine NADPH-Konzentration von 1 mM ausreichend. Die Untersuchung von 14 Standardsubstraten ergab, dass die Mehrheit selektiv durch das entsprechende CYP-Enzym umgesetzt wird. Die Amodiaquin-*N*-deethylierung, die Tolbutamidhydroxylierung, die Chlorzoxazon-6-hydroxylierung und die 4-Nitrophenol-2-hydroxylierung wurden durch mehrere CYP-Enzyme katalysiert. Als Positivkontrollen für die Inhibitionsassays und zur Identifizierung der am Metabolismus beteiligten CYP-Enzyme werden von der FDA verschiedene Inhibitoren vorgeschlagen. Da nicht zu allen Inhibitoren Daten über deren Isoenzymselektivität vorliegen, wurde mit Hilfe der Assays die inhibitorische Aktivität von zwölf Inhibitoren auf neun verschiedene CYP-Enzyme untersucht. Alle Inhibitoren hemmten das jeweilige angegebene CYP-Enzym. Bei Furafyllin (CYP1A2), Tranylcypromin (CYP2A6), Clopidogrel (CYP2B6), Montelukast (CYP2C8), Sulfaphenazol (CYP2C9), Chinidin (CYP2D6) und Ketoconazol (CYP3A4) konnte eine Konzentration ermittelt werden, bei der nur ein CYP-Enzym

gehemmt wird. Für Quercetin, Nootkaton, Diethyldithiocarbamat, Sertralin und Ticlopidin wurde eine Inhibition mehrerer CYP-Enzyme festgestellt. Mit Hilfe der CYP-Inhibitionsassays wurden Extrakte lebertoxischer Arzneipflanzen, wie z. B. *Tussilago farfara* (Huflattich) oder *Chelidonium majus* (Schöllkraut), untersucht. Alle Extrakte hemmten konzentrationsabhängig die CYP-Enzyme, am stärksten die Enzyme der Subfamilie CYP2C.

Als In-vitro-Substrate für CYP-Inhibitionsassays werden aufgrund ihrer starken Fluoreszenz häufig **Cumarin-Derivate** eingesetzt. In dieser Arbeit wurden daher 18 O-alkylierte bzw. O-benzylierte Derivate von 7-Hydroxycumarin, 7-Hydroxy-4-methylcumarin und 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin synthetisiert und die Umsetzung durch verschiedene CYP-Enzyme mit Hilfe der zuvor optimierten LC/LC/Fluoreszenz-basierten Assays untersucht. An der O-Desalkylierung der Cumarin-Derivate waren hauptsächlich CYP1A2, CYP2B6 und im geringeren Ausmaß CYP2C19, CYP2D6 und CYP2E1 beteiligt. Die höchste Affinität besaßen die Substrate zu CYP1A2. Debenzylierungen wurden neben CYP1A2 hauptsächlich durch CYP3A4 katalysiert. Die höchsten Umsetzungsgeschwindigkeiten wurden für die Debenzylierung von 7-Benzoyloxy-4-methylcumarin (BMC, 14 pmol/pmol P450/min) und 7-Benzoyloxy-4-trifluormethylcumarin (BFC, 9 pmol/pmol P450/min) beobachtet. Für 7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin (MFC) war die Umsetzungsgeschwindigkeit für die O-Demethylierung mit CYP1A2 und CYP2B6 im Vergleich zu CYP2C9 deutlich höher. MFC und 7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin (EFC) eignen sich daher v. a. für Inhibitionsuntersuchungen von CYP2B6. Bei den untersuchten 7-Alkyloxy-cumarinen handelt es sich in allen Fällen nicht um selektive CYP-Substrate. Sie können demnach nicht für Inhibitionsuntersuchungen mit humanen Lebermikrosomen verwendet werden. Ein Einsatz für Simultanbestimmungen der Hemmung mehrerer CYP-Enzyme in einem Versuch (Cocktail-Assay) ist aus diesem Grund ebenfalls nicht möglich. Durch LC/MS-Analysen nach Inkubation der Cumarin-Derivate mit humanen Lebermikrosomen zeigte sich, dass neben den entsprechenden O-Desalkylmetaboliten mehrere Hydroxymetaboliten entstehen und der O-Desalkylmetabolit insbesondere bei Derivaten mit längeren Alkylsubstituenten nicht der Hauptmetabolit ist.

Ein Ziel der Arbeitsgruppe ist es zudem, **neue In-vitro-Substrate** zur Untersuchung der Inhibition von CYP-Enzymen mit besseren enzymkinetischen und analytischen Eigenschaften zu entwickeln. Grundstruktur hierfür ist das β -Carbolin, da β -Carbolin-Derivate eine starke Fluoreszenz aufweisen. Von dem Naturstoff Harmin ist bekannt, dass dieser durch CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 und CYP2D6 O-demethyliert wird. Durch Modifizierung der Harman-Struktur sollte die CYP-Isoenzymselektivität für die O-Dealkylierung gesteigert werden und Substrate für weitere CYP-Enzyme erhalten werden. Hierfür wurden in der Arbeitsgruppe u. a. 2-Benzyl-7-benzyloxyharman (BBH), 2-Benzyl-7-methoxyharman (BMH), 7-Methoxy-9-(4-carboxybenzyl)harman (MCBH) und 2-Methyl-7-methoxyharman (MMH) hergestellt. In dieser Arbeit wurden LC/LC/Fluoreszenz- und LC/MS/MS-Methoden zur Quantifizierung der aus diesen Derivaten entstehenden O-Desalkylmetaboliten entwickelt und die Substrate charakterisiert. Die Einführung von Benzylsubstituenten an der phenolischen Hydroxylgruppe von Harmol (BBH) führte zum Metabolismus durch CYP3A4 und die Substitution mit einem Carboxybenzylrest am Indolstickstoff (MCBH) verstärkte die Selektivität zu den Enzymen der Subfamilie 2C. Durch die Methylierung des Pyridin-Stickstoffs des Harmins (MMH) wurde ein selektives Substrat für CYP2D6 erhalten, weshalb bei dieser Substanz auch humane Lebermikrosomen verwendet werden können. Durch die im Vergleich zu anderen CYP2D6-Substraten erhaltene hohe Umsetzungsgeschwindigkeit lässt sich die Proteinkonzentration minimieren. Für die überwiegend an der O-Dealkylierung der Substrate beteiligten CYP-Enzyme wurden die K_m -Werte ermittelt. Bei der Untersuchung von verschiedenen CYP-Inhibitoren zeigte sich, dass mit diesen Substraten vergleichbare IC_{50} -Werte, wie mit den Standardsubstraten, erhalten werden. Die Harman-Derivate können daher zur Untersuchung der Inhibition wichtiger CYP-Enzyme eingesetzt werden und bieten eine Alternative zu den bisher vorhandenen Fluoreszenz-Substraten. Durch die Einstellung des pH-Wertes im Anschluss an die Inkubation lassen sich die Metaboliten ebenfalls fluorimetrisch in der Mikrotiterplatte detektieren und können für ein Hochdurchsatz-Screening eingesetzt werden. Allerdings müssen die Fluoreszenzeigenschaften weiter verbessert werden, um eine kontinuierliche Bestimmung während der Inkubation zu ermöglichen.

In der pharmazeutischen Industrie besteht ein großes Interesse an der Detektion von **reaktiven Metaboliten**, um eine potentielle Lebertoxizität von neuen Wirkstoffen

vorhersagen zu können. Hierfür werden die Testsubstanzen mit humanen Lebermikrosomen inkubiert und die reaktiven Metaboliten mit Glutathion abgefangen. Zur Optimierung der LC/MS/MS-Analysen wurde in dieser Arbeit die Fragmentierung solcher Addukte anhand von Standardsubstanzen untersucht. Bei allen untersuchten Glutathion-Addukten trat eine Abspaltung der Pyroglutaminsäure bei positiver Polarität mit einer vergleichbaren Signalintensität auf, weshalb eine Detektion dieses Fragmentes durch einen Neutral-Loss-Scan am besten geeignet erschien. Mit Hilfe der Screening-Methode wurden zuerst Arzneistoffe untersucht, von denen reaktive Metaboliten bekannt sind. Für die Bioaktivierung von Clozapin konnten CYP1A2, CYP2D6 und CYP3A4 identifiziert werden, während die Toxifizierung von Paracetamol hauptsächlich durch CYP1A2 und CYP3A4 erfolgte. Auffällig war, dass mit steigender Paracetamolkonzentration keine Sättigung der Umsetzung auftrat. Durchgeführte Molekülveränderungen am Glutathion, wie die Einführung eines Dansylrestes oder eines Biotins, führten zu keiner deutlichen Verbesserung der Detektion der reaktiven Metaboliten. Darüber hinaus zeigte sich, dass bei den markierten GSH-Derivaten die Umsetzung durch GSTs erheblich reduziert ist. Mit der Screening-Methode wurden allerdings viele falsch positive Signale erhalten, so dass diese nicht für eine Untersuchung von Extrakten lebertoxischer Pflanzen eingesetzt werden konnte. Für eine eindeutige und schnelle Identifizierung der Signale als Glutathion-Addukte ist daher die hochauflösende Massenspektrometrie erforderlich.

Eine weitere Klasse fremdstoffmetabolisierender Enzyme sind die **Glutathion-S-Transferasen** (GSTs), über deren Inhibition durch Arzneistoffe und Pflanzenextrakte in der Literatur nur wenige Daten vorliegen. Zur Entwicklung von Inhibitionsassays wurden die in der Literatur beschriebenen Substrate 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol, 4-Nitrochinolin-*N*-oxid, 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol und 4-Nitrobenzylchlorid verwendet. Die Detektion der Metaboliten erfolgte im Gegensatz zu der häufig eingesetzten Photometrie mit Hilfe der HPLC/UV- bzw. einer LC/MS/MS-Analyse. Für die Kalibrierung wurden zunächst die entsprechenden Glutathionkonjugate aus den Substraten synthetisiert. Bei den durchgeführten diskontinuierlichen Assays stellte die häufig auftretende nichtenzymatische Reaktion der Substrate mit Glutathion ein Problem dar. Durch die Erniedrigung des pH-Wertes des Inkubationspuffers von 7.4 auf 6.5 und der Senkung der Inkubationstemperatur von 37 °C auf 25 °C konnte die nichtenzymatische Reaktion während der Inkubation erheblich verlangsamt werden.

Die nichtenzymatische Reaktion nach der Inkubation konnte durch Zugabe von Oxidationsmitteln gestoppt werden. Von den getesteten humanen Lebersubzellfraktionen besaß die cytosolische Fraktion bei allen Substraten die höchste Aktivität. Im Rahmen der Assayentwicklung wurde die Glutathion-, die Proteinkonzentration und die Inkubationszeit optimiert. Es wurden die K_m - und V_{max} -Werte für die Umsetzung der Substrate ermittelt. Als Positivkontrolle diente das ebenfalls synthetisierte Glutathionkonjugat der Etacrynsäure, für das die IC_{50} -Werte mit jedem Substrat bestimmt wurden. Dabei konnte ein Einfluss des pH-Wertes des Inkubationspuffers und der Inkubationstemperatur auf die gemessene inhibitorische Aktivität beobachtet werden. Anschließend wurde ein Screening von Arzneistoffen, ausgewählten Naturstoffen und etwa 50 Pflanzenextrakten auf eine Inhibition der GSTs in humanem Lebercytosol mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol, das am schnellsten von allen Substraten umgesetzt wurde, durchgeführt. Von den getesteten Naturstoffen fiel eine ausgeprägte Hemmung durch Biflavonoide auf. Nahezu alle untersuchten Pflanzenextrakte hemmten die GSTs. Eine starke Inhibition der GSTs zeigten Extrakte aus *Cinnamomum cassia* (Zimt), die sich als nicht-kompetitiv herausstellte. Weiterhin wurde eine starke Hemmung der Extrakte gerbstoffhaltiger Pflanzen, wie z. B. *Hamamelis virginiana* (virginische Zaubernuss) oder *Krameria triandra* (Ratanhia), beobachtet. Hier resultierten IC_{50} -Werte zwischen 5 und 30 $\mu\text{g/ml}$. Ein Vergleich verschiedener Methoden zur Detektion des Metaboliten 2,4-Dinitrophenyl-S-glutathion zeigte, dass die Photometrie für die Untersuchung der Inhibition von Pflanzenextrakten aufgrund der Störung durch die Pflanzenmatrix ungeeignet ist. Mit Hilfe der verwendeten HPLC/UV- sowie der LC/MS/MS-Analyse konnte der Metabolit selektiv erfasst werden und reproduzierbare Ergebnisse für die Inhibition der GSTs durch Pflanzenextrakte erzielt werden.

Neben den GSTs wurde auch die Beeinflussung der **Glutathionreduktase** (GR) in dieser Arbeit untersucht. Hierfür wurde ein HPLC-basierter Assay entwickelt, bei dem das reduzierte Glutathion mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) derivatisiert und das entstandene gemischte Disulfid aus Glutathion und 5-Thio-2-nitrobenzoesäure quantifiziert wurde. Zur Untersuchung der Inhibition durch Pflanzenextrakte wurde humanes Lebercytosol verwendet, das von allen humanen Lebersubzellfraktionen die höchste Aktivität besaß. Im Vergleich zu den GSTs wurde die GR durch die überwiegende Zahl der ausgewählten Pflanzenextrakte kaum gehemmt. Eine

nennenswerte Inhibition der GR konnte nur bei Extrakten von *Juglans regia* (Walnuss) beobachtet werden.

Fazit

In dieser Arbeit wurden eine Reihe von In-vitro-Methoden zur Untersuchung der Inhibition von CYP-Enzymen und weiteren fremdstoffmetabolisierenden Enzymen, wie CES oder GSTs, entwickelt. Aufgrund der dabei angewendeten selektiven HPLC-basierten Quantifizierung der Metaboliten durch UV-, Fluoreszenz- oder MS-Detektion können mit diesen Methoden auch Proben mit komplexer Matrix untersucht werden. Für alle Assays wurden die Inkubationsbedingungen optimiert und die enzymkinetischen Parameter vieler Substrate ermittelt. Darüber hinaus wurden wichtige Erkenntnisse über die Isoenzymselektivität dieser Substrate gewonnen. Die Eignung der Assays wurde anhand von Standardinhibitoren bewiesen. Schließlich wurde die inhibitorische Aktivität von zahlreichen Pflanzenextrakten bestimmt, deren Auswirkung auf fremdstoffmetabolisierende Enzyme bisher unbekannt war. Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden können für die Untersuchung des Metabolismus von Arzneistoffen und der Inhibition fremdstoffmetabolisierender Enzyme, die für eine Zulassung neuer Wirkstoffe erforderlich ist, routinemäßig eingesetzt werden.

IV SUMMARY

Drugs are biochemically transformed by different xenobiotic metabolising enzymes after their application to humans. The inhibition of these enzymes, e. g. by grapefruit juice or a coadministered drug, especially drugs with a small therapeutic range, for example theophylline or phenprocoumon, can result in serious side effects. Especially endangered are multimorbid patients, who get a therapy with multiple drugs. To examine the metabolism of new therapeutic agents and their potential for interactions, in-vitro-experiments will be done with tissue fractions or individual enzymes. In inhibition assays the influence of the drug on the transformation of the test substrate will be investigated. A major part of this work deals with the development of methods to test the inhibition of xenobiotic metabolising enzymes, like cytochrome P450 enzymes (CYP enzymes), glutathione S-transferases (GSTs) and carboxylesterases (CES). Thereby, a characterisation of the test substrates was performed. In addition the bioactivation of clopidogrel and the formation of reactive metabolites were investigated.

Due to current discussions about the interaction between clopidogrel and omeprazole, the **bioactivation of clopidogrel** was investigated by LC/MS/MS analysis and recombinant CYP enzymes or human liver microsomes. Because of the instability of the active metabolite a derivatisation of the incubated samples with dimedone were carried out. The investigation shows, that the transformation to 2-oxo-clopidogrel is catalysed by several CYP enzymes. Beside CYP2C19, the enzymes CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 are involved. With selective inhibitors CYP3A4 could be identified for the formation of the active metabolite from 2-oxo-clopidogrel. In addition to the biotransformation by CYP enzymes the carboxylic acid ester of clopidogrel is mainly hydrolysed. Incubations with human tissue fractions and recombinant carboxylesterases shows, that the hydrolysis of the ester is catalysed by CES1. Furthermore the metabolism of omeprazole was investigated. The results show, that the 5-hydroxylation and the 5-O-demethylation mainly is carried out by CYP2C19 and CYP2D6. Thereby omeprazole has the highest affinity to CYP2C19. In contrast, the formation of omeprazole sulfone is catalysed especially by CYP3A4. With the aid of established inhibition assays for CYP enzymes the influence of clopidogrel and omeprazole on nine different CYP

enzymes was investigated. Clopidogrel inhibits CYP2B6 ($IC_{50} = 6 \text{ nM}$), CYP2C19 ($IC_{50} = 0.4 \text{ }\mu\text{M}$) and CYP3A4 ($IC_{50} = 2.8 \text{ }\mu\text{M}$). Omeprazole inhibits especially CYP2C19 ($IC_{50} = 2 \text{ }\mu\text{M}$) and CYP3A4 ($IC_{50} = 17 \text{ }\mu\text{M}$). Subsequent, the influence of omeprazole on the formation of 2-oxo-clopidogrel was also investigated. However, the bioactivation of clopidogrel was decreased by concentrations of omeprazole higher than $10 \text{ }\mu\text{M}$. Here mostly CYP2C19 was inhibited with an IC_{50} value of about $100 \text{ }\mu\text{M}$. Due to the poor inhibition of CYP2C19 caused by omeprazole and the fact, that several CYP enzymes catalyse the formation of 2-oxo-clopidogrel, the loss of the pharmacological effect of clopidogrel during the simultaneous intake of omeprazole can not be explained with the inhibition of CYP2C19.

A previously insufficient investigated class of xenobiotic metabolising enzymes are **carboxylesterases** (CES) which especially play an important role in the bioactivation of ester prodrugs. For the development of inhibition assays different artificial substrates were selected. After the incubation with human tissue fractions and recombinant carboxylesterases the metabolites were quantified via HPLC/UV-analysis. It was demonstrated that methyl 4-nitrobenzoate and mycophenolate mofetil are selectively hydrolysed by CES1. The hydrolysis of phenyl acetate, *p*-nitrophenyl acetate and 4-methylumbelliferyl acetate was catalysed by all enzymes used. Furthermore the hydrolysis of 3-*O*-acetyl-11-keto- β -boswellic acid, which can be isolated from various *Boswellia species*, by CES2 was obtained. Because of the instability of the most artificial substrates in the incubation buffer, a correction with a blank value was necessary. A decrease of the pH value of the incubation buffer from 7.4 to 6.5 and the addition of acetic acid to the termination solvent retards the hydrolysis. Afterwards the influence of the inhibitory activities of plant extracts on the hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate was investigated. The results shows, that numerous plant extracts inhibits esterases of the human liver and the activity with an extract concentration of 25-50 $\mu\text{g/ml}$ is widely below 50 percent. Thus the inhibition of CES caused by plant extracts is until now an unknown risk of drug interactions.

Cytochrome P450 enzymes (CYP enzymes) are the most important class of xenobiotic metabolising enzymes. To investigate the influence of these enzymes due to new active substances standardised in vitro interaction studies will be performed. Thus the Food and Drug Administration (FDA) has suggested several drugs as test

substrates for each CYP isoform. Additional artificial substrates are used in such studies. The metabolites of these substrates are fluorescent and therefore they are suitable for high-throughput screening analysis in multiwell plates. In this work, a series of artificial substrate (derivatives of coumarin and harmaline) were investigated to their applicability as substrates for CYP inhibition assays. After the development of methods to detect the metabolites, which was done by LC/MS/MS- or HPLC/fluorescence analysis, the CYP isoforms for the transformation of the substrates were identified. With the aid of CYP enzymes and human liver microsomes the K_m values were determined. The stability testing of the CYP enzymes during 60 min shows, that they strongly lose their activity at 37 °C, especially CYP1A2. For the maximum reaction velocity, a NADPH concentration of 1 mM was sufficient. The investigation of 14 standard substrates shows, that the majority was metabolised by a single CYP enzyme. The amodiaquine *N*-deethylation, the tolbutamide hydroxylation, the chlorzoxazone 6-hydroxylation and the 4-nitrophenol 2-hydroxylation were catalysed by several CYP isoforms. As positive control of the inhibition assays and for the identification of the CYP enzymes, which are involved in the metabolism, the FDA has also proposed several inhibitors. For many inhibitors there are no data of the selectivity to the CYP isoforms published. Therefore the inhibitory activity of 12 inhibitors with 9 different CYP enzymes by the established assays was investigated. All inhibitors inhibited the previously described CYP enzymes. For furafylline (CYP1A2), tranilcypromine (CYP2A6), clopidogrel (CYP2B6), montelukast (CYP2C8), sulfaphenazole (CYP2C9), quinidine (CYP2D6) and ketoconazole (CYP3A4) a concentration was found, which inhibited only one CYP enzyme. For quercetin, nootkatone, diethyldithiocarbamic acid, sertraline and ticlopidine an inhibition of several CYP enzymes was discovered. With the CYP inhibition assays liver toxic plant extracts of e. g. *Tussilago farfara* (coughwort) or *Chelidonium majus* (celandine) were investigated. All extracts inhibited the CYP enzymes concentration dependent, most intensive the enzymes of subfamily CYP2C.

Coumarin derivatives are often used as in vitro substrates for CYP inhibition assays because of their high fluorescence. In this work 18 *O*-alkylated and *O*-benzylated derivatives of 7-hydroxycoumarin, 7-hydroxy-4-methylcoumarin and 7-hydroxy-4-trifluoromethylcoumarin were synthesised and the transformation due to several CYP enzymes was investigated with primarily optimised LC/LC/fluorescence-based

assays. On the *O*-dealkylation of coumarin derivatives CYP1A2, CYP2B6 were mainly participated and to a lower extent CYP2C19, CYP2D6 and CYP2E1. The highest affinity had the substrates to CYP1A2. Debenzylations were catalysed mainly by CYP1A2 and CYP3A4. The highest reaction velocities were observed for the debenzylation of 7-benzyloxy-4-methylcoumarin (BMC, 14 pmol/pmol P450/min) and 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin (BFC, 9 pmol/pmol P450/min). For 7-methoxy-4-trifluoromethylcoumarin (MFC) the conversion rate for the *O*-demethylation with CYP1A2 and CYP2B6 in comparison with CYP2C9 was explicitly higher. So MFC and 7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin (EFC) are suitable substrates especially for CYP2B6. All analysed 7-alkyloxy coumarin derivatives are no selective substrates. Thus they cannot be used for inhibition studies with human liver microsomes. Also their application for the simultaneous determination of the inhibition of several CYP enzymes in one sample (cocktail assay) is not possible. The LC/MS-based analysis after the incubation of the coumarin derivatives showed, that beside the *O*-dealkylated metabolites several hydroxylated metabolites are formed. In many cases the *O*-dealkylated metabolite is not the main metabolite, especially by derivatives with longer alkyl chains.

An aim of our group is the development of **new in vitro substrates** for the investigation of the inhibition of CYP enzymes with improved kinetic and analytical properties. The basic structure is β -carboline, because β -carboline derivatives show a strong fluorescence. It is known about the natural product harmine, that it will be *O*-demethylated by CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6. Due to modifications of the harmine structure, the CYP isoform selectivity for the *O*-dealkylation should increase and substrates should receive for further CYP enzymes. For this, our working group synthesised e. g. 2-benzyl-7-benzyloxyharmine (BBH), 2-benzyl-7-methoxyharmine (BMH), 7-methoxy-9-(4-carboxybenzyl)harmine (MCBH) and 2-methyl-7-methoxyharmine (MMH). In this work LC/LC/fluorescence- and LC/MS/MS methods were developed for quantification of the generated *O*-dealkylated metabolites. The introduction of a benzyl residue at the phenolic hydroxyl group of harmol (BBH) caused a metabolism due to CYP3A4. The substitution with a carboxybenzyl residue on the indole nitrogen (MCBH) increased the selectivity to the subfamily CYP2C. With the methylation of the pyridine nitrogen a selective substrate for CYP2D6 was obtained. So this substrate is usable with

human liver microsomes. Due to the high reaction velocity of MMH in comparison with other substrates of CYP2D6, the concentration of the protein can be minimized. The K_m values of the CYP enzymes, which predominantly catalysed the O-dealkylation of the harmane derivatives, were determined. The investigation of several CYP inhibitors showed, that with the new substrates comparable IC_{50} values to the standardised substrates were received. The harmane derivatives are suitable for the detection of the inhibition of important CYP enzymes. They are alternative substrates to the previously existing fluorescent substrates. With an adjustment of the pH value after incubation, the metabolites can be fluorimetrically detected in multiwell plates. So they are usable for high throughput screening. However, the fluorescence properties have to be improved for a continuous determination of the metabolite during the incubation.

The pharmaceutical industry is interested in the detection of **reactive metabolites** to predict a potential liver toxicity of new drug candidates. For this purpose the test compounds will be incubated with human liver microsomes and the reactive metabolites will be trapped with glutathione. To optimise the LC/MS/MS analysis, the fragmentation of such adducts was investigated with standard substances. At positive polarity, all glutathione adducts showed a loss of pyroglutamic acid with comparable peak intensity. Therefore the detection of this fragment with a neutral loss scan is most practicable. With the aid of the screening method first drugs were investigated from which reactive metabolites are known. CYP1A2, CYP2D6 and CYP3A4 were identified for the bioactivation of clozapine. The toxification of acetaminophen is mainly catalysed by CYP1A2 and CYP3A4. Conspicuous was the fact, that there was no saturation of the reaction velocity with increasing concentration of acetaminophen. Changes of the glutathione molecule like the introduction of a dansyl or a biotin residue do not seriously improve the detection of the reactive metabolites. Also it was shown, that the reaction of the labelled glutathione derivatives by GSTs is significantly reduced. With the developed screening methods many false positive signals were observed. So this method was not applicable for the investigation of extracts from liver toxic plants. For a definite and fast identification of signals as glutathione adducts the high resolution mass spectrometry is required.

Another class of xenobiotic metabolising enzymes are **glutathione S-transferases** (GSTs). About their inhibition caused by drugs and plant extracts only a few information can be found in the literature. For the development of inhibition assays well known substrates like 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 4-nitroquinoline *N*-oxide, 1,2-dichloro-4-nitrobenzene and 4-nitrobenzyl chloride were used. The metabolites were quantified by HPLC/UV- and LC/MS/MS analysis in contrast to the often used photometry. For the calibration of the methods first the appropriate glutathione conjugates were synthesised from the substrates. A problem of the discontinuous assays was the often arising non enzymatic reaction of the substrates with glutathione. With a decrease of the pH value of the incubation buffer from 7.4 to 6.5 and the reduction of incubation temperature from 37 °C to 25 °C the velocity of the non enzymatic reaction extensively slows down. The non enzymatic reaction in the samples after incubation could be stopped by the addition of oxidants. For all substrates the cytosolic fraction showed the highest activity of all tested human liver tissue fractions. During the development of the assays the glutathione concentration, the protein concentration and the incubation time were optimised. The K_m and V_{max} values for the conversion of the substrates were determined. The also synthesised glutathione conjugate of ethacrynic acid was used as positive control, for that the IC_{50} values were determined with every substrate. Thereby the pH value of the incubation buffer and the incubation temperature influence the measured inhibitory activity. Following drugs, selected natural products and about 50 plant extracts were screened for the inhibition of GSTs with human liver cytosol and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, that was conjugated with the highest conversion rate of all substrates. Of the natural products the distinctive inhibition of biflavonoids was noticeable. Nearly all tested plant extracts inhibit GSTs. A strong inhibition of the GSTs showed extracts from *Cinnamomum cassia* (cinnamomum), which is non-competitive. Furthermore an important inhibition caused by extracts from e.g. *Hamamelis virginiana* (witch hazel) or *Krameria triandra* (ratanhia) were observed. Here IC_{50} values between 5 and 30 µg/ml were obtained. A comparison of different methods for the detection of the metabolite 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione demonstrated, that photometry is not suitable for the investigation of the inhibition by plant extracts because of the interference caused by the plant matrix. With HPLC/UV- and the LC/MS/MS methods the metabolite could selectively be

determined and reproducible results for the inhibition of GSTs by plant extracts were obtained.

Besides GSTs the influence of **glutathione reductase** (GR) was also investigated in this work. An HPLC-based assay was developed, where the reduced glutathione has been derivatised with 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) and the resulted mixed disulfide of glutathione and 5-thio-2-nitrobenzoic acid has been quantified. For the examination of the inhibition by plant extracts, human liver cytosol was applied, which has the highest activity of all human liver tissue fractions. In comparison with GSTs, the GR was hardly inhibited by most of the selected plant extracts. A notable inhibition could only be obtained by extracts of *Juglans regia* (walnut).

Conclusion

In this work, many in vitro methods for the investigation of the inhibition of CYP enzymes and further xenobiotic metabolising enzymes like CES or GSTs were developed. On the basis of the selective HPLC-based quantification with UV-, fluorescence- or MS detection, samples with a complex matrix can be measured. For all assays the conditions for incubation were optimised and the kinetic parameters of many substrates were determined. In addition important information about the selectivity of isoenzymes was received. The suitability of the developed assays was demonstrated with standard inhibitors. Finally, the inhibitory activity of numerous plant extracts were determined, which effect on xenobiotic metabolising enzymes was previously unknown. The developed methods in this work are routinely applicable for the investigation of drug metabolism and the inhibition of xenobiotic metabolising enzymes, which are required for the marketing authorization.

V MATERIAL UND METHODEN

1 Material und Geräte

1.1 Geräte

1.1.1 HPLC/UV

Zur UV-Detektion wurde ein HPLC-System der Firma Agilent (Waldbronn, Deutschland) verwendet, das mit den folgenden Komponenten ausgestattet war: einem Vakuumentgaser (G1322A), einer binären Pumpe (G1312A), einem automatischen Probengeber (G1313A), einem Säulenthermostat (G1316A) und einem Diodenarraydetektor (G1315B). Die Steuerung der Anlage und die Auswertung der Daten erfolgte mit der Agilent ChemStation-Software (Revision B.03.02). Dieses System wurde v. a. für die Bestimmung der Metaboliten der Glutathion-S-Transferase- und des Glutathionreduktase-Assays sowie zur Reaktionskontrolle der Syntheseansätze eingesetzt.

1.1.2 LC/LC/UV/Fluoreszenz

Das LC-System mit Online-Festphasenextraktion zur UV- und Fluoreszenzdetektion bestand aus zwei über ein 6-Wegeventil verbundenen HPLC-Anlagen der Firma Agilent (Waldbronn, Deutschland). Die HPLC 1 zur Online-Festphasenextraktion bestand aus einem Vakuumentgaser (G1379B), einer quarternären Pumpe (G1311A), einem automatischen Probengeber (G1329A) und einem Thermostat für den automatischen Probengeber (G1330B). Die HPLC 2 zur chromatographischen Trennung war mit einem Vakuumentgaser (G1379A), einer binären Pumpe (G1312A), einem Säulenthermostat (G1316A), einem variablen Wellenlängendetektor (G1314A), einem Fluoreszenzdetektor (G1321A) und einem Fraktionssammler (G1364A) ausgestattet. Das LC-System mit Online-Festphasenextraktion wurde v. a. zur Detektion der fluoreszierenden Metaboliten der CYP-Enzyme eingesetzt. Die einzelnen Komponenten der Anlage konnten auch so miteinander kombiniert werden, dass ein gewöhnliches HPLC/UV-System ohne Online-Festphasenextraktion wie unter V.1.1.1 erhalten werden konnte. Der kühlbare Autosampler wurde für die Carboxylesterase-Assays genutzt. Mit Hilfe des Fraktionskollektors konnten Syntheseansätze im semipräparativen Maßstab gereinigt

und Pflanzenextrakte fraktioniert werden. Zur Steuerung dieses Systems und zur Datenauswertung wurde die ChemStation-Software (Revision B.02.01) verwendet.

1.1.3 LC/Triple-Quadrupol-Massenspektrometer

Bei dem verwendeten LC/MS-System der Firma Agilent (Waldbronn, Deutschland) handelte es sich um eine Kopplung einer HPLC-Anlage mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer der Serie 6460 (G6460A). Die HPLC-Anlage war bis 600 bar ausgelegt (SL-Serie) und bestand aus den folgenden Modulen: einem Vakuumentgaser (G1379B), einer binären Pumpe (G1312B), einem automatischen Wellplate-Probengeber (G1367D), einem Säulenthermostat (G1316B) und einem Diodenarraydetektor (G1315C). Die Steuerung des LC/MS-Systems erfolgte mit Hilfe der MassHunter Workstation Acquisition Software (Version B.02.01). Die Datenauswertung wurde mit dem Qualitative Analysis Modul (Version B.02.00) und dem Quantitative Analysis Modul (Version B.04.00) der MassHunter Workstation Software durchgeführt.

1.1.4 UV/VIS- und Fluoreszenzspektrometer

Zur Aufzeichnung von UV/VIS-Absorptionsspektren wurde das Cary 50 Bio Absorptionsspektrometer (Varian, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur Steuerung des Gerätes diente die Cary WinUV Scan Application Software (Version 3.00). Die UV-Absorptionsmessungen in der Mikrotiterplatte wurden mit dem Mithras LB 940 der Firma Berthold (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland) durchgeführt, das mit der Mikro WIN 2000 Software (Version 4.41) ausgestattet war. Zur Ermittlung von Fluoreszenzspektren wurde das Cary Eclipse Fluoreszenz Spektrophotometer (Varian, Darmstadt, Deutschland) mit der Cary Eclipse Scan Application Software (Version 1.1) verwendet.

1.1.5 Präparative HPLC

Das präparative HPLC-System der Firma Agilent (Waldbronn, Deutschland) zur Reinigung von synthetisierten Substanzen bestand aus zwei präparativen Pumpen (G1361A), einem automatischen Probengeber (G2260A), einem multiplen Wellenlängendetektor (G1365B) und einem Fraktionssammler (G1364B). Gesteuert wurde das System durch die Agilent ChemStation-Software (Revision A.10.02).

1.1.6 Weitere technische Geräte

Technisches Gerät	Typ (Hersteller)
Waagen	
Präzisionswaage	EW600-2M (Kern & Sohn, Balingen, Deutschland)
Analysenwaagen	AB204-S (Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz) Kern 770 (Kern & Sohn, Balingen, Deutschland)
Zentrifugen	
für Reaktionsgefäße	5415R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
für Reagenzgläser	EBA12 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland)
pH-Meter	744 (Metrohm, Filderstadt, Deutschland)
Blockthermostat	QBD4 (Grant Instruments, Cambridgeshire, England)
Vortex	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)
Wasserbad	Isotemp 205 (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)
Rotationsverdampfer	Rotavapor RE111 (Büchi, Flawil, Schweiz)
Probenkonzentrator	EC1 (VLM, Leopoldshöhe, Deutschland)
Gefriertrocknungsanlage	ALPHA 1-4 LD plus (Martin Christ, Osterode, Deutschland)
Kühl- und Gefrierschrank	KGN34V00/01 (Bosch, München, Deutschland)
Tiefkühlschrank (-80 °C)	ULT790-3-V33 (Thermo, Asheville, USA)
Rührplatte	TMA2071 (Karl Hecht, Sondheim, Deutschland)
Standmixer	La Moulinette Typ D56 (Moulinex, Ecully Cedex, Frankreich)
Ultraschallbad	Sonorex RK100 (Brandelin, Berlin, Deutschland)
Wasseraufbereitung	Milli-Q® Synthesis (Millipore, Schwalbach, Deutschland)
Pipetten	Reference (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Multidispenser	Multipette plus (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Art.-Nr.	Hersteller bzw. Lieferant
Pipettenspitzen		
10 µl	70.1115	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
200 µl	70.760.002	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
1000 µl	70.762	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
2500 µl	0030 000.951	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Combitips plus		
0.1 ml	0030 069.200	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
2.5 ml	0030 069.242	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße mit Deckel aus Polypropylen		
1.5 ml	RK1G	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
2 ml	0030 120.094	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
HPLC-Vials 9 mm		
Gläser (2 ml, Braunglas)	AR0-3911-13	Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
Deckel (PTFE/Silikon)	AR0-8957-13	Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
96-Well-Mikrotiterplatten		
transparent (F-Boden)	260844	Nunc (Langenselbold, Deutschland)
weiß (F-Boden)	236108	Nunc (Langenselbold, Deutschland)
Flaschenfilter für HPLC- Fließmittel (0.2 µm, Nylon)	430049	Corning (Corning, NY, USA)
Kryoboxen aus Pappe		
50 mm	10408381	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
75 mm	10671432	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Inneneinteilung 10 x 10	10095441	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Inneneinteilung 8 x 8	10209151	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Spritzenfilter PVDF 0.22 µm	P811.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

1.3 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in der untenstehenden Tabelle aufgelistet. Die Produkte von Aldrich, Fluka, Riedel-de Haen und Sigma wurden von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) geliefert. Weitere Bezugsquellen waren ABCR (ABCR GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), AppliChem (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland), Fisher (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland), Grüssing (Grüssing GmbH Analytika, Filsum, Deutschland), Kraft (Bernd Kraft GmbH, Duisburg, Deutschland), PhytoLab (PhytoLab GmbH & Co. KG, Vestenbergsgreuth, Deutschland) und Roth (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Substanzen von BD GentestTM stammten von der Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland). Die Produkte von CAYMAN, dem

Council of Europe (EDQM), Merck und VWR wurden über die VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Chemikalien von Acros Organics wurden von der Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland) geliefert.

Bezeichnung	Art.-Nr.	Lieferant
Acetanilid	150812500	Acros
Aceton p. a.	07021.4700	Kraft
Acetonitril (HPLC grade)	A/0626/17	Fisher
Acetonitril (HPLC gradient grade)	A/0627/17	Fisher
N-Acetyl-L-cystein	01039	Fluka
Ameisensäurelösung 50 % puriss. p. a. für HPLC	09676	Fluka
Amentoflavon	80351	PhytoLab
9-Aminoacridin	A1135	Sigma
Ammoniumacetat puriss. p. a. für HPLC	17836	Fluka
Amodiaquindihydrochlorid Dihydrat	A2799	Sigma
Apigenin	10798	Fluka
2-Benzoxazolinon	157058	Aldrich
Benzylbromid	8.01815.0250	Merck
13,118-Biapigenin	89166	PhytoLab
D(+)-Biotin	3822.1	Roth
Bis(p-nitrophenyl)phosphat-Natrium	N3002	Sigma
Borsäure	1.59095.8025	Merck
1-Brombutan	106772500	Acros
1-Brompentan	8.01604.0250	Merck
1-Brompropan	8.01667.0250	Merck
Bupropionhydrochlorid	B102	Sigma
β-Carbolin-3-carbonsäureethylester	24,430-9	Aldrich
(+)-Catechinhydrat	22110	Fluka
Chininhydrochlorid Dihydrat	1.5117.0001	Merck
1-Chlor-2,4-dinitrobenzol	23,732-9	Aldrich
Chlorpropamid	C1290	Sigma
Chlorzoxazon	C187	Sigma
Cumarin	110530050	Acros
3-Cyan-7-hydroxycumarin	C183	Molecular Probes
3-Cyan-7-hydroxy-4-methylcumarin	438596	Aldrich
Dansylchlorid	39220	Fluka
Desethylamodiaquin	451782	BD Gentest
Dextromethorphanhydrobromid	D2531	Sigma
Dextrophantrarat	D127	Sigma

Bezeichnung	Art.-Nr.	Lieferant
3-[2-(<i>N,N</i> -Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarinhydrochlorid (AHMC)	451701	BD Gentest
1,2-Dichlor-4-nitrobenzol Pestanal [®]	35831	Riedel-de Haen
<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	D8,000-2	Aldrich
Diethyldithiocarbamat-Natrium	1.59716.0001	Merck
Dimedon	38490	Sigma
<i>N,N</i> -Dimethylformamid p. a.	23466.323	VWR
Dimethylsulfoxid ≥ 99.5 % Zellkultur getestet	D4540	Sigma
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)	D21,820-0	Aldrich
DL-Dithiothreitol	43819	Fluka
Ellagsäure	E2250	Sigma
(-)-Epicatechin	E1753	Sigma
Essigsäure 100 % extra pure	27225	Riedel-de Haen
Etacrynsäure	E4754	Sigma
Eugenol	6941.1	Roth
Flufenaminsäure	F9005	Sigma
Fluoxetinhydrochlorid	F132	Sigma
Fmoc-chlorid	23186	Fluka
Furafyllin	F124	Sigma
Gallussäure Monohydrat	1.59630.0001	Merck
L-Glutathion oxidiert	A2243,0001	AppliChem
L-Glutathion reduziert	G4251	Sigma-Aldrich
Glutathionethylester reduziert	G1401	Sigma
Glutathion-(<i>glycin</i> - ¹³ C ₂ , ¹⁵ N)	683620	Aldrich
Harmin	51400	Fluka
Harmol	AB148955	ABCR
Hydrocortison	H4001	Sigma
7-Hydroxycumarin	U7626	Sigma
7-Hydroxy-4-methylcumarin	156380250	Acros
7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin Referenzstandard	T659	Molecular Probes
7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin 98 %	368512	Aldrich
Hydroxybupropion	451711	BD Gentest
4'-Hydroxymephenytoin	H146	Sigma
1'-Hydroxymidazolam	UC430	Sigma
<i>N</i> -Hydroxysuccinimid	130672	Aldrich
6β-Hydroxytestosteron	H2898	Sigma
4-Hydroxytolbutamid	T145	Sigma
Hyperosid	1.59637.7100	Merck
Iodethan	8.00896.0100	Merck
Iodmethan	8.06064.0050	Merck

Bezeichnung	Art.-Nr.	Lieferant
Isoquercitrin	5573.1	Roth
Kaliumcarbonat p. a.	12005	Grüssing
Kaliumchlorid 3 mol/l Elektrolytlösung	6.2308.050	Metrohm
Kaliumhexacyanoferrat(III)	1.52913.8050	Merck
Kaliumhydroxid Plätzchen p. a.	06215.5600	Kraft
Kaliumphosphat dibasisch wasserfrei	60353	Sigma
Kaliumphosphat monobasisch Ultra $\geq 99.5\%$	60219	Fluka
Ketoconazol	K1003	Sigma
Lithiumhydroxid * H ₂ O	L4533	Sigma
Magnesiumchlorid Hexahydrat	63072	Fluka
S-(+)-Mephenytoin	UC175	Sigma
Methanol Chromasolv [®] für HPLC	34860	Sigma-Aldrich
Methyl-4-nitrobenzoat	72962	Aldrich
2-Methyl-4-nitrophenol	422908	Aldrich
4-Methylumbelliferylacetat	46002	Sigma
7-Methoxycumarin	220337	Sigma
Montelukast Natriumsalz	10008318	CAYMAN
Mycophenolatmofetil	Y0000489	EDQM
Mycophenolsäure	70018	Fluka
NADPH Tetranatriumsalz	A1395,0001	AppliChem
Natriumacetat Trihydrat	1.59289.0050	Merck
Natriumsulfat wasserfrei	12623.4600	Kraft
Natronlauge 0.1 mol/l	01031.3000	Kraft
(-)-Nicotin	N3876	Sigma
4-Nitrobenzoesäure	8.00646.0100	Merck
4-Nitrobenzylchlorid	73185	Fluka
4-Nitrochinolin-1-oxid	N8141	Sigma
4-Nitrophenol	73560	Fluka
4-Nitrophenylacetat	N8130	Sigma
Nootkaton	8012.1	Roth
Omeprazol	O104	Sigma
Paracetamolsulfat Kaliumsalz	UC448	Sigma
Paracetamol- β -D-glucuronid Natriumsalz	A2799	Sigma
Phenol	33517	Riedel-de Haen
Phenylacetat	8.22053.0250	Merck
Fisherbrand Pufferlösung pH 4.00	3119824	Fisher
Fisherbrand Pufferlösung pH 7.00	3119826	Fisher
Fisherbrand Pufferlösung pH 9.00	1004-7941	Fisher
R-(+)-Pulegon	376388	Aldrich
Quercetin Dihydrat	Q0125	Sigma

Bezeichnung	Art.-Nr.	Lieferant
Rutin * 3 H ₂ O	1.59664.0001	Merck
Salzsäure 0.1 mol/l	31955.293	VWR
Tacrin	A79922	Aldrich
Tamoxifencitrat	T9262	Sigma
Testosteron	T1500	Sigma
Ticlopidinhydrochlorid	T6654	Sigma
Trifluoressigsäure p. a. für HPLC	91707	Fluka
Tryptamin 98 %	193747	Aldrich
Wasserstoffperoxid 30 %	1.07209.0250	Merck
Xanthotoxin (8-Methoxypsoralen)	5497.1	Roth
Zinksulfat Heptahydrat	96500	Fluka
<i>trans</i> -Zimtaldehyd	219780500	Acros
<i>trans</i> -Zimtalkohol	4905.1	Roth
<i>trans</i> -Zimtsäure	C6004	Sigma

Die Iscover[®]-Filmtabletten zur Isolierung von Clopidogrel wurden von der Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg erhalten. 11-Keto- β -boswelliasäure (KBA) und 3-O-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (AKBA) stammten von A. Frank.³²⁶ 2-Benzyl-7-benzyloxyharman (BBH), 2-Benzyl-7-hydroxyharman (BHH), 2-Benzyl-7-methoxyharman (BMH), 7-Hydroxy-9-(4-carboxybenzyl)harman (HCBH), 7-Methoxy-9-(4-carboxybenzyl)harman (MCBH), 2-Methyl-7-hydroxyharman (MHH) und 2-Methyl-7-methoxyharman (MMH) wurden synthetisiert und gereinigt durch A. Frank und L. Schaefflein. 1-Hydroxytacrin wurde von E. Heller aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Holzgrabe synthetisiert. Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit die in der untenstehenden Tabelle aufgelisteten Arzneistoffe verwendet, die von den angegebenen Firmen zur Verfügung gestellt wurden.

Arzneistoff	Bezugsquelle
Captopril	Apogepha Arzneimittel GmbH, Dresden
Chinidinsulfat * 2 H ₂ O	Buchler GmbH, Braunschweig
Clozapin	Salutas Pharma GmbH, Barleben
Desipraminhydrochlorid	Alfred E. Tiefenbacher GmbH & Co. KG, Hamburg
Diclofenac-Natrium	Dr. Kade Pharmazeutische Fabrik GmbH, Berlin
Diphenhydraminhydrochlorid	Kettelhack Riker Pharma GmbH, Borken
Hexachlorophen	Dr. August Wolff Arzneimittel GmbH & Co. KG, Bielefeld
Imipraminhydrochlorid	Alfred E. Tiefenbacher GmbH & Co. KG, Hamburg

Arzneistoff	Bezugsquelle
Maprotilinhydrochlorid	Dolorgiet GmbH & Co. KG, St. Augustin
Menadion	Merck KGaA, Darmstadt
Metoclopramidhydrochlorid	Heumann Pharma GmbH & Co. Generika KG, Nürnberg
Metoprololtartrat	1 A Pharma GmbH, Oberhaching
Midazolam	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim
Nitrazepam	Dr. R. Pfleger Chemische Fabrik GmbH, Bamberg
Papaverin	Knoll AG, Ludwigshafen
Paracetamol	1 A Pharma GmbH, Oberhaching
Penicillamin	Heyl Chem.-pharm. Fabrik GmbH & Co. KG, Berlin
Phenacetin	Merck KGaA, Darmstadt
Phenytain	Nordmark Arzneimittel GmbH & Co. KG, Uetersen
Pilocarpinhydrochlorid	Dr. Gerhard Mann Chem.-pharm. Fabrik GmbH, Berlin
Promethazinhydrochlorid	Rodleben Pharma GmbH, Rodleben
Propranolol	STADA GmbH, Bad Vilbel
Sertralin	Pfizer Pharma GmbH, Berlin
Sulfaphenazol	Ciba-Geigy AG, Basel
Tolbutamid	Sanorania Pharma GmbH, Bensheim
Tranlycyprominsulfat * H ₂ O	Röhm Pharma GmbH, Weiterstadt
Trimethoprim	Dr. R. Pfleger Chemische Fabrik GmbH, Bamberg

1.4 Pflanzliche Arzneidrogen

Die untersuchten pflanzlichen Arzneidrogen wurden von Caelo (Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland), Klenk (Heinrich Klenk GmbH & Co. KG, Schwebheim, Deutschland) und Galke (Alfred Galke GmbH, Gittelde, Deutschland) bezogen. Die von Caelo und Klenk gelieferten Arzneidrogen entsprachen laut Hersteller den Anforderungen des deutschen bzw. europäischen Arzneibuchs, sofern diese monographiert sind.

Droge	Droge (lat.) (Stammpflanze, Familie)	Charge
Angelikawurzel	<i>Angelicae dahuricae radix</i> (<i>Angelica dahurica</i> , Apiaceae)	50172179
Anisfrüchte	<i>Anisi fructus</i> (<i>Pimpinella anisum</i> , Apiaceae)	32367124
Artischockenblätter	<i>Cynarae folium</i> (<i>Cynara scolymus</i> , Asteraceae)	1981 B 05101801
Basilikumkraut	<i>Basilici herba</i> (<i>Ocimum basilicum</i> , Lamiaceae)	23983203

Droge	Droge (lat.) (Stammpflanze, Familie)	Charge
Beinwellkraut	Symphyti herba (<i>Symphytum officinale</i> , Boraginaceae)	12870
Beinwellwurzel	Symphyti radix (<i>Symphytum officinale</i> , Boraginaceae)	14734
Bittersüßstengel	Dulcamarae stipes (<i>Solanum dulcamara</i> , Solanaceae)	30036233
Borretschkraut	Boraginis herba (<i>Borago officinalis</i> , Boraginaceae)	7452
Borretschsamen	Boraginis semen (<i>Borago officinalis</i> , Boraginaceae)	1768
Brennnesselblätter	Urticae folium (<i>Urtica dioica</i> , Urticaceae)	31558503
Brombeerblätter	Rubi fruticosi folium (<i>Rubus fruticosus</i> , Rosaceae)	11631
Brunnenkressekraut	Nasturtii herba (<i>Nasturtium officinale</i> , Brassicaceae)	25635163
Catechu DAB 6	Extractum catechu (<i>Acacia catechu</i> , Fabaceae)	13314
Efeublätter	Hedera helici folium (<i>Hedera helix</i> , Araliaceae)	30306123
Eichenrinde	Quercus cortex (<i>Quercus robur</i> , Fagaceae)	11567
Estragonkraut	Dracunculi herba (<i>Artemisia dracuncululus</i> , Asteraceae)	30513163
Faulbaumrinde	Frangulae cortex (<i>Rhamnus frangula</i> , Rhamnaceae)	25230233
Fenchelfrüchte	Foeniculi fructus (<i>Foeniculum vulgare</i> , Apiaceae)	30730084
Edles Gamanderkraut	Teucree chamaedrys herba (<i>Teucrium chamaedrys</i> , Lamiaceae)	1
Ginkgoblätter	Ginkgo bilobae folium (<i>Ginkgo biloba</i> , Ginkgoaceae)	81481518
Greiskraut	Senecio vulgaris herba (<i>Senecio vulgaris</i> , Asteraceae)	3099
Grüner Tee	Theae folium (<i>Camellia sinensis</i> , Theaceae)	5100 A 081028
Hamamelisblätter	Hamamelidis folium (<i>Hamamelis virginiana</i> , Hamamelidaceae)	2051 B 090303
Heidelbeerblätter	Myrtilli folium (<i>Vaccinium myrtillus</i> , Ericaceae)	32413024
Heidelbeeren	Myrtilli fructus (<i>Vaccinium myrtillus</i> , Ericaceae)	30806503
Hopfenzapfen	Lupuli strobuli (<i>Humulus lupulus</i> , Cannabaceae)	25607183

Droge	Droge (lat.) (Stammpflanze, Familie)	Charge
Huflattichblätter	Farfarae folium (<i>Tussilago farfara</i> , Asteraceae)	1
Huflattichblüten	Farfarae flos (<i>Tussilago farfara</i> , Asteraceae)	13745
Johanniskraut	Hyperici herba (<i>Hypericum perforatum</i> , Hypericaceae)	4021 A 100819
Kava-Kava-Wurzelstock	Kava-Kava rhizoma (<i>Piper methysticum</i> , Piperaceae)	05106491
Korianderfrüchte	Coriandri fructus (<i>Coriandrum sativum</i> , Apiaceae)	2790 A 05091501
Kreosotstrauchkraut	Larreae mex. herba (<i>Larrea tridentata</i> , Zygophyllaceae)	11919
Kümmelfrüchte	Carvi fructus (<i>Carum carvi</i> , Apiaceae)	24659503
Kürbissamen	Cucurbitae semen (<i>Cucurbita pepo</i> , Cucurbitaceae)	31720438
Lorbeerblätter	Lauri folium (<i>Laurus nobilis</i> , Lauraceae)	11223603
Mariendistel Früchte	Cardui mariae fructus (<i>Silybum marianum</i> , Asteraceae)	32461134
Passionsblumenkraut	Passiflorae herba (<i>Passiflora incarnata</i> , Passifloraceae)	31077034
Pestwurzblätter	Petasitides folium (<i>Petasites hybridus</i> , Asteraceae)	6691
Pestwurz Wurzel	Petasitides radix (<i>Petasites hybridus</i> , Asteraceae)	7449
Pfefferminzblätter	Menthae piperitae folium (<i>Mentha x piperita</i> , Lamiaceae)	32616074
Poleiminzkraut	Pulegii herba (<i>Mentha pulegium</i> , Lamiaceae)	7053
Primelwurzel	Primulae radix (<i>Primula veris</i> , Primulaceae)	30565074
Ratanhiawurzel	Ratanhiae radix (<i>Krameria triandra</i> , Krameriaceae)	13777
Salbeiblätter	Salviae herba (<i>Salvia officinalis</i> , Lamiaceae)	32057024
Schöllkraut	Chelidonii herba (<i>Chelidonium majus</i> , Papaveraceae)	3436
Sennesblätter	Sennae fructus angustifoliae (<i>Cassia angustifolia</i> , Fabaceae)	32145124
Taigawurzel	Eleutherococci radix (<i>Eleutherococcus senticosus</i> , Araliaceae)	30645064
Tormentillwurzelstock	Tormentillae rhizoma (<i>Potentilla erecta</i> , Rosaceae)	14003

Droge	Droge (lat.) (Stammpflanze, Familie)	Charge
Traubensilberkerze	Cimicifugae racemosae rhizoma (<i>Cimicifuga racemosa</i> , Ranunculaceae)	14152
Wacholderbeeren	Juniperi pseudo-fructus (<i>Juniperus communis</i> , Cupressaceae)	30807114
Walnussblätter	Juglandis folium (<i>Juglans regia</i> , Juglandaceae)	8773
Walnussschalen	Juglandis nuc. cortex (<i>Juglans regia</i> , Juglandaceae)	13271
Weißdornblätter/-blüten	Crataegi folium cum flore (<i>Crataegus laevigata/monogyna</i> , Rosaceae)	32849024
Chinesische Zimtrinde	Cinnamomi cassiae cortex (<i>Cinnamomum cassia</i> , Lauraceae)	0594 B 081118
Echte Zimtrinde	Cinnamomi cortex (<i>Cinnamomum zeylanicum</i> , Lauraceae)	064 B 080304

1.5 Enzyme

1.5.1 Subzelluläre Fraktionen

Die verwendeten subzellulären Fraktionen wurden von BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) bezogen. Bei diesen Präparationen handelte es sich um gepooltes Probenmaterial, d. h. für die Herstellung einer Charge wurden frisch eingefrorene Gewebeproben von ca. 10 bis 50 verschiedenen verstorbenen Spendern verwendet. Die Gewichtsanteile der Lebergewebeproben der einzelnen Spender für die Gewinnung einer Charge waren dabei unterschiedlich. Bei den Spendern handelte es sich um Personen beider Geschlechter (männlich und weiblich), verschiedenen Lebensalters (von 16 bis 84 Jahre) und unterschiedlicher ethnischer Gruppen (v. a. Kaukasier, Afroamerikaner, Hispanoamerikaner, Asiaten). Das Spenderkollektiv setzte sich aus Rauchern und Nichtrauchern zusammen. Bei einigen von ihnen war Alkoholkonsum bekannt. Der Proteingehalt der Leberfraktionen war bei allen Chargen auf 20 mg/ml eingestellt. Für die Mikrosomen wurde zusätzlich der CYP-Gehalt der einzelnen Chargen in pmol Enzym pro mg Protein angegeben, was zur Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeiten bei den In-vitro-Assays verwendet wurde. Für fast alle Spender waren die Genotypen für CYP2C9 und CYP2C19 angegeben. Dabei gehörte die Mehrheit der Spender dem Wildtyp (*1) an. Kein Spender war homozygoter Träger der veränderten Allele (*2

und *3). Zum CYP2D6-Genotyp war nichts bekannt. Die verwendeten gepoolten Rattenlebermikrosomen stammten von männlichen Sprague Dawley Ratten.

Enzym	Cat.-No.	Proteingehalt [mg/ml]
HLC	452861	20
HL-S9	452961	20
HLM	452161	20
HIM	452210	10
RLM	452501	20

1.5.2 Carboxylesterasen

Die humanen rekombinanten Carboxylesterase-Enzyme wurden ebenfalls von BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) erworben. Sie stammten aus mit Baculoviren transfizierten Insektenzellen (Supersomes™, BTI-TN-5B1-4). Die gelieferte Proteinlösung der Mikrosomenfraktion besaß einen Proteingehalt von 5 mg/ml.

Enzym	Cat.-No.	Proteingehalt [mg/ml]
CES1b	453320	5
CES1c	453321	5
CES2	453322	5

1.5.3 Cytochrom-P450-Enzyme (CYP-Enzyme)

Die eingesetzten humanen rekombinanten CYP-Enzyme stammten von BD Biosciences (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland). Sie wurden mit Hilfe der humanen cDNA des entsprechenden CYP-Enzyms in mit Baculovirus-infizierten Insektenzellen (Supersomes™, BTI-TN-5B1-4) exprimiert. Die gelieferten Proteinlösungen stammten aus den Mikrosomenfraktionen dieser Insektenzellen. Die CYP-Enzyme wurden mit NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase und mehrheitlich mit Cytochrom b₅ co-exprimiert. Die einzelnen CYP-Enzyme besaßen chargenabhängig Proteingehalte von etwa 4 bis 17 mg/ml. Der CYP-Gehalt war hingegen auf 1000 bzw. 2000 pmol/ml eingestellt.

Enzym	Cat.-No.	CYP-Gehalt [pmol/ml]	Co-Expression	
			NADPH-P450- Reduktase	Cytochrom b ₅
CYP1A2	456203	1000	+	-
CYP1B1	456220	1000	+	-
CYP2A6	456254	1000	+	+
CYP2B6	456255	1000	+	+
CYP2C8	456252	1000	+	+
CYP2C9*1 (Arg ₁₄₄)	456258	1000	+	+
CYP2C19	456259	1000	+	+
CYP2D6*1 (Val ₃₇₄)	456217	1000	+	-
CYP2E1	456206	2000	+	+
CYP3A4	456202	1000	+	+

2 Methoden

2.1 Herstellung der Pflanzenextrakte

2.1.1 Herstellung von Rohextrakten durch Mazeration

Sofern keine pulverisierten Arzneidrogen bezogen werden konnten bzw. es sich um Arzneidrogen mit flüchtigen Inhaltsstoffen handelte, wurde das erworbene geschnittene Drogenmaterial zunächst mittels einer Küchenmaschine (La Moulinette Typ D56) fein gemahlen. Das Gerät wurde dabei nur in kurzen Zeitintervallen betrieben, um die thermische Belastung des Mahlgutes möglichst gering zu halten. Jeweils 250 mg des gepulverten Drogenmaterials wurden in 10 ml Methanol 80 % (V/V) oder 10 ml eines anderen jeweils angegebenen Extraktionsmittels im Ultraschallbad (Brandelin Sonorex RK 100) für 30 min bei 40 °C extrahiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und 8 ml der erhaltenen Extraktionslösung bei 2500 x g für 10 min zentrifugiert (Hettich Zentrifuge EBA 12). Der abgenommene Überstand stellt den als Rohextrakt bezeichneten Extrakt mit einer Konzentration von 25 mg Arzneidroge pro ml Extraktionsmittel (25 mg/ml) dar. Um weitere Konzentrationen der Extrakte zu erhalten, wurden diese mit dem Extraktionsmittel entsprechend verdünnt.

2.1.2 Herstellung von Trockenextrakten

Für die Herstellung der Trockenextrakte wurden 5 ml des unter V.2.1.1 erhaltenen Mazerates (25 mg/ml) im Probenkonzentrator (Evaporator EC1, VLM GmbH, Leopoldshöhe, Deutschland) bei 40 °C mit Stickstoffgas bis zur Massekonstanz getrocknet und die in der untenstehenden Tabelle angegebenen Trockenextraktanteile bezogen auf die Drogeneinwaage ermittelt. Der erhaltene Rückstand wurde in DMSO in einer Konzentration von 25 mg/ml gelöst. Um die entsprechenden Assay-Konzentrationen für die Untersuchung der Inhibition der Enzyme zu erhalten, wurden Verdünnungen dieser Stammlösung in den Inkubationsansatz gegeben.

Droge	Trockenextrakt [%]	Droge	Trockenextrakt [%]
Beinwellkraut	18.2	Huflattichblüten	32.9
Beinwellwurzel	36.8	Johanniskraut	32.1
Borretschkraut	28.4	Kava-Kava-Wurzelstock	11.3
Borretschsamen	12.6	Kreosotstrauchkraut	39.4
Brombeerblätter	23.7	Pestwurzblätter	18.4
Catechu DAB 6	54.8	Pestwurzwurzel	22.7
Eichenrinde	13.1	Poleiminzkraut	21.8
Gamanderkraut	23.6	Ratanhiawurzel	18.8
Ginkgoblätter	33.0	Schöllkraut	26.0
Greiskraut	22.1	Tormentillwurzelstock	41.5
Grüner Tee	35.7	Traubensilberkerze	21.0
Hamamelisblätter	33.1	Walnussblätter	30.6
Heidelbeerblätter	31.0	Walnussschalen	29.0
Heidelbeeren	59.5	Zimtrinde (<i>C. cassia</i>)	30.8
Huflattichblätter	18.7	Zimtrinde (<i>C. zeylanicum</i>)	5.9

2.2 Herstellung der Puffer- und Stopplösungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Pufferlösungen wurden mit gereinigtem Wasser hergestellt. Das verwendete gereinigte Wasser hatte Arzneibuchqualität (Ph. Eur. 6.00) und wurde mit dem Milli-Q[®] Synthesis-System (Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) aus dem hauseigenen demineralisierten Wasser (Umkehrosiose)

gewonnen und anschließend durch einen 0.22 µm Filter (Millipak[®], Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) filtriert. Die hergestellten Lösungen wurden im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt und innerhalb von 4 Wochen verwendet.

2.2.1 Inkubationspuffer

Inkubationspuffer für die CYP-Enzyme

Für die Untersuchung der Bioaktivierung, der Biotoxifizierung und der CYP-Inhibition wurde ein 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.4) mit 3 mM Magnesiumchlorid verwendet. Für die Herstellung dieses Puffers dienten eine 100 mM Kaliumhydrogenphosphatlösung (13.61 g/l) und eine 100 mM Dikaliumhydrogenphosphatlösung (17.42 g/l). Es wurden ca. 800 ml der Dikaliumhydrogenphosphatlösung vorgelegt und durch Zugabe von ca. 200 ml der Kaliumhydrogenphosphatlösung ein pH-Wert von 7.4 eingestellt. Anschließend wurden in dieser Pufferlösung 3 mM Magnesiumchlorid-Hexahydrat (610 mg/l) gelöst.

Inkubationspuffer für die Glutathion-S-Transferasen

Acetatpuffer pH 4.5

Für die Herstellung des 100 mM Acetatpuffers (pH 4.5) wurden 100 ml einer 100 mM Essigsäurelösung (5.72 ml/l) mit ca. 70 ml einer 100 mM Natriumacetat-Lösung (8.20 g/l) auf einen pH-Wert von 4.5 eingestellt.

Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 / 7.4 / 8.0

Für die Inkubationspuffer mit den pH-Werten 6.5, 7.4 und 8.0 wurde das Hydrogenphosphat/Dihydrogenphosphat-Puffersystem verwendet. Zur Herstellung dieser Puffer wurde eine 100 mM Kaliumhydrogenphosphat-Lösung (13.61 g/l) und eine 100 mM Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung (17.42 g/l) hergestellt. Um 100 mM Pufferlösungen zu erhalten, wurde eine der beiden Lösungen vorgelegt und durch Zugabe der jeweils anderen Komponente der pH-Wert entsprechend eingestellt.

Boratpuffer pH 9.0

Für den 100 mM Boratpuffer pH 9.0 wurden 100 ml einer 100 mM Borsäurelösung (6.18 g/l) hergestellt. Anschließend wurde der pH-Wert durch Zutropfen einer 5 M Kaliumhydroxidlösung (280.6 g/l) auf 9.0 eingestellt.

Inkubationspuffer für die Glutathionreduktase

Zur Herstellung des Inkubationspuffers für den Glutathionreduktase-Assay wurden eine 100 mM Kaliumhydrogenphosphat-Lösung (13.61 g/l) und eine 100 mM Dikaliumhydrogenphosphatlösung (17.42 g/l) angefertigt. Es wurden ca. 800 ml der Dikaliumhydrogenphosphatlösung vorgelegt und durch Zugabe von ca. 200 ml der Kaliumhydrogenphosphatlösung ein pH-Wert von 7.4 eingestellt.

Inkubationspuffer für die Carboxylesterasen

Für die Umsetzung der Substrate durch die Carboxylesterasen wurde ein 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.4 verwendet. Für die Untersuchung der Inhibition der Hydrolyse von *p*-Nitrophenylacetat durch Pflanzenextrakte betrug der pH-Wert des Puffers 6.5. Die Herstellung der Pufferlösungen erfolgte genauso, wie bei den Glutathion-S-Transferasen (s. o.).

2.2.2 Pufferlösungen zur Bestimmung der pK_S-Werte

Zur Herstellung der Pufferlösungen für die photometrische Bestimmung der pK_S-Werte wurden zunächst die folgenden Lösungen angefertigt: 500 ml 100 mM Phosphorsäure (6.74 ml Phosphorsäure 85 % / l), 1000 ml 100 mM Kaliumhydrogenphosphat-Lösung (13.61 g/l), 500 ml 100 mM Essigsäure (5.72 ml/l), 500 ml Natriumacetat-Lösung (8.20 g/l), 500 ml 100 mM Dikaliumhydrogenphosphat (17.42 g/l), 500 ml 100 mM Borsäure (6.18 g/l) und 25 ml 5 M Kaliumhydroxidlösung (280.6 g/l). Je 100 ml der 100 mM Borsäurelösung wurden durch Zutropfen der 5 M Kaliumhydroxidlösung auf die pH-Werte 8.5, 9.0, 9.5 und 10.0 eingestellt. Die Herstellung der anderen Pufferlösungen erfolgte nach der untenstehenden Tabelle. Zur Ermittlung des erforderlichen Volumens an Säure und Base für die Herstellung der Puffer mit den entsprechenden pH-Werten wurden die pK_S-Werte der Puffersysteme bestimmt. Hierfür wurden 20 ml der Base (100 mM) mit 20 ml der Säure (100 mM) gemischt und der resultierende pH-Wert gemessen. Um Pufferlösungen mit den gewünschten pH-Werten zu erhalten, wurden mit Hilfe der bestimmten pK_S-Werte der Puffersysteme die jeweiligen erforderlichen Volumina an Säure bzw. Base mittels der Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechnet und zusammengegeben. Der erhaltene pH-Wert wurde kontrolliert und ggf. durch Zugabe der Säure bzw. Base exakt eingestellt.

Puffersystem	pK _S -Wert	pH-Wert	Volumen [ml]	
			Säure (A)	Base (B)
Phosphorsäure (A) Dihydrogenphosphat (B)	2.15	2.0	59	41
		2.5	31	69
		3.0	12	88
Essigsäure (A) Acetat (B)	4.67	3.5	94	6
		4.0	82	18
		4.5	60	40
		5.0	32	68
		5.5	13	87
Dihydrogenphosphat (A) Hydrogenphosphat (B)	6.87	6.0	88	12
		6.5	70	30
		7.0	43	57
		7.5	13	81
		8.0	7	93

2.2.3 Stopplösung für die Enzyminkubationen

Zur Herstellung der Stopplösung für die Enzyminkubationen wurden 150 ml einer 200 mM Zinksulfatlösung (57.51 g ZnSO₄*7 H₂O / l) mit 350 ml Methanol gemischt. Die erhaltene Lösung wurde im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Zu Versuchsbeginn wurde der benötigte Anteil dieser Lösung in den Gefrierschrank gestellt, um eine eiskalte Stopplösung (MeOH/ZnSO₄-Lösung) zu erhalten.

2.3 Bioaktivierung

2.3.1 Isolierung von Clopidogrel

Clopidogrel wurde mit Hilfe der Flüssig-Flüssig-Extraktion aus Iscover[®]-Filmtabletten extrahiert und anschließend als Hydrochlorid ausgefällt. Hierfür wurde eine Tablette mit 75 mg Clopidogrel in 5 ml Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7.4) suspendiert und mit 1 M Kaliumhydroxidlösung der pH-Wert auf etwa 7 eingestellt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 6 ml Diethylether extrahiert und die vereinigte Etherphase mit wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wurde eine Fällung des Clopidogrelhydrochlorids mit Chlorwasserstoffgas durchgeführt. Die ausgefallene Substanz wurde mit 5 ml Diethylether gewaschen und anschließend am

Rotationsverdampfer getrocknet. Aus einer Tablette wurden 47 mg Clopidogrelhydrochlorid erhalten (Ausbeute 56 %).

2.3.2 Darstellung von Clopidogrelat

Zunächst erfolgte die Extraktion von Clopidogrel aus einer Iscover[®]-Filmtablette nach V.2.3.1. Der Rückstand der abgedampften Etherphase wurde in ca. 10 ml Tetrahydrofuran gelöst und 5 ml Wasser sowie 500 µl einer 2 M Lithiumhydroxidlösung (5 Äquivalente) hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur für 2 Tage gerührt. Durch die HPLC/UV-Analyse (s. V.2.3.3) wurde eine vollständige Umsetzung des Clopidogrels nachgewiesen. Anschließend wurde das organische Lösungsmittel mit Hilfe des Rotationsverdampfers entfernt und der Rückstand mit verdünnter Salzsäure neutralisiert. Die Fällung des Hydrochlorids nach Extraktion mit Diethylether wurde nach V.2.3.1 durchgeführt. Es wurden 38 mg Clopidogrelhydrochlorid erhalten (Ausbeute 47 %).

2.3.3 Assay zur Untersuchung der Hydrolyse von Clopidogrel

In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7.4) vorgelegt und die entsprechende humane Subzellfraktion bzw. das rekombinante Carboxylesterase-Enzym (0.05 mg/ml) zugegeben. Zur Temperierung wurden die Proben 5 min bei 37 °C vorinkubiert. Durch Zugabe von Clopidogrel, das in DMSO gelöst war, wurde die Reaktion gestartet und ein Gesamtvolumen des Inkubationsansatzes von 300 µl erhalten. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden die Proben durch Zugabe von 150 µl eiskalter MeOH/ZnSO₄-Lösung, die 5 % Essigsäure enthielt, abgestoppt. Es wurden Blindproben ohne Protein zur Korrektur der nichtenzymatischen Hydrolyse angefertigt. Das gefällte Protein wurde durch Zentrifugation bei 12000 x g für 6 min abgetrennt und etwa 400 µl des klaren Überstandes in ein HPLC-Vial überführt. Die Quantifizierung des entstandenen Clopidogrelats erfolgte mit Hilfe der HPLC/UV-Analyse (s. V.1.1.1) bei 220 nm. Hierfür wurden 100 µl der Probe auf eine Synergi Max-RP-Säule (75 x 4.6 mm; 4 µm) injiziert. Als Fließmittel wurde 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Acetonitril (B) verwendet. Durch Anwendung eines Fließmittelgradienten von 20 bis 65 % B in 6 min und einer Flussrate von 1.0 ml/min wurden Clopidogrelat (Retentionszeit 3.2 min) und Clopidogrel (Retentionszeit 5.4 min) getrennt.

2.3.4 Assay zur Untersuchung der Bioaktivierung von Clopidogrel

Für die kinetischen Messungen und die Untersuchung der Inhibition der Bioaktivierung von Clopidogrel wurde der Arzneistoff in der jeweils angegebenen Konzentration und ggf. der Inhibitor, gelöst in DMSO, mit humanen Lebermikrosomen (0.2 mg/ml) oder dem jeweiligen rekombinanten CYP-Enzym (10 pmol/ml) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM Magnesiumchlorid; pH 7.4) zusammengegeben. Zur Derivatisierung des aktiven Metaboliten von Clopidogrel wurde Dimedon (1 mM), gelöst in DMSO, hinzugefügt und die Proben bei 37 °C für 5 min vorgewärmt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von NADPH (1 mM) gestartet. Bei der Inkubation von humanen Lebermikrosomen wurde die Reaktion anstatt mit NADPH durch die Zugabe des Clopidogrels gestartet. Das Gesamtvolumen des Inkubationsansatzes betrug 200 µl. Nach 30 min Inkubation wurde die Reaktion mit 200 µl eiskalter MeOH/ZnSO₄-Lösung, die 25 ng/ml Ticlopidin als internen Standard enthielt, abgestoppt. Zur Abtrennung des gefällten Proteins wurden die Proben bei 12000 x g für 6 min zentrifugiert und jeweils ca. 350 µl des klaren Überstandes in ein Vial überführt. 25 µl des Inkubationsansatzes wurden zur LC/MS/MS-Analyse (s. V.1.1.3) auf eine Synergi Max-RP-Säule (75 x 4.6 mm; 4 µm) injiziert. Die mobile Phase bestand aus 0.1 % Ameisensäure in Wasser (A) und Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure (B). Es wurde ein Fließmittelgradient von 20 – 75 % B in 11 min mit einer Flussrate von 0.8 ml/min angewendet. Die LC/MS/MS-Analyse wurde im MRM-Modus mit positiver Polarität durchgeführt. Die Analyse wurde in einzelne Zeitsegmente eingeteilt, in denen separate Einstellungen vorgenommen wurden (Tab. 25). 2 min nach der Injektion wurde das Eluat in das Massenspektrometer geleitet und von dem internen Standard (Ticlopidin; Retentionszeit 2.7 min), den Dimedon-Addukten des aktiven Metaboliten von Clopidogrel (Retentionszeiten 5.8 und 6.1 min) und dem Diastereomerenpaar des 2-Oxo-Clopidogrels (Retentionszeiten 10.2 und 10.4 min) je ein Qualifier- (q) und ein Quantifizierübergang (Q) detektiert. Stickstoff wurde zur Verneblung des Eluates (Druck 45 psi), als Trocknungsgas (Flussrate 8 l/min, Temperatur 300 °C), als Sheathgas (Flussrate 10 l/min, Temperatur 250 °C) und als Kollisionsgas (Flussrate 1 ml/min) verwendet. Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V und die Nozzle-Voltage 500 V. Nach der chromatographischen Trennung wurde die Säule mit 100 % B für 2 min gespült und anschließend mit 20 % B für 3 min reäquilibriert.

Tab. 25 Parameter des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers zur Untersuchung der Bioaktivierung von Clopidogrel. Zeitsegment (TS), Ventilstellung (Valve), Elektronenmultiplierspannung (Delta EMV), Precursor-Ion (Prec Ion), Produkt-Ion (Prod Ion), Fragmentorspannung (Frag), Kollisionsenergie (CE), Ionenanalysenzeit (Dwell time), Qualifierübergang (q), Quantifierübergang (Q).

TS	Zeit [min]	Valve	Delta EMV [V]	Compound	Prec Ion (m/z)	Prod Ion (m/z)	Frag [V]	CE [eV]	Dwell time [ms]
1	0.0	to waste	-	-	-	-	-	-	-
2	2.0	to MS	0	Ticlopidin (IS)	264	154 (Q)	100	15	100
					264	125 (q)	100	30	100
3	4.5	to MS	400	Dimedon-Addukte	494	323 (Q)	150	20	100
					494	354 (q)	150	20	100
4	7.0	to MS	0	2-Oxo-Clopidogrel	338	155 (Q)	125	30	100
					338	183 (q)	125	15	100
5	11.0	to waste	-	-	-	-	-	-	-

2.3.5 Assay zur Detektion der Omeprazolmetaboliten

Zur Untersuchung des In-vitro-Metabolismus von Omeprazol zu seinen Metaboliten 5-Hydroxyomeprazol, 5-O-Desmethylomeprazol und Omeprazolsulfon wurde Omeprazol, in der jeweils angegebenen Konzentration, mit humanen Lebermikrosomen (0.1 mg/ml) oder dem jeweiligen rekombinanten CYP-Enzym (5 pmol/ml) in einen 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM Magnesiumchlorid; pH 7.4) und NADPH (1 mM) in einem Gesamtvolumen von 300 µl inkubiert. Nach 15 min Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch die Zugabe von 150 µl eiskalter MeOH/ZnSO₄-Lösung, die 75 ng/ml Trimethoprim als internen Standard enthielt, abgestoppt. Nach der Zentrifugation mit 12000 x g für 6 min zur Abtrennung des gefällten Proteins wurden jeweils etwa 400 µl des klaren Überstandes in ein Vial überführt. 20 µl des Inkubationsansatzes wurden zur LC/MS/MS-Analyse der Omeprazolmetaboliten auf eine Synergi Max-RP-Säule (50 x 2.1 mm; 4 µm), die auf 30 °C temperiert war, injiziert. Die Zusammensetzung des Fließmittels war 10 mM Ammoniumacetat mit 0.1 % Ameisensäure in Wasser (A) und Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure (B). Es wurde ein Fließmittelgradient von 10 – 40 % B in 6 min mit einer Flussrate von 0.6 ml/min angewendet. 1 min nach der Injektion wurde das Eluat in das Massenspektrometer geleitet und 5-Hydroxyomeprazol (Retentionszeit 3.5 min), 5-O-Desmethylomeprazol (Retentionszeit 2.7 min), Omeprazolsulfon

(Retentionszeit 5.5 min) und der interne Standard (Retentionszeit 1.5 min) im MRM-Modus mit positiver Polarität detektiert. Es wurden für jeden Analyten ein Qualifizier-(q) und ein Quantifizierübergang (Q) gemessen (Tab. 26). Stickstoff wurde zur Verneblung des Eluates (Druck 45 psi), als Trocknungsgas (Flussrate 8 l/min, Temperatur 300 °C), als Sheathgas (Flussrate 10 l/min, Temperatur 300 °C) und als Kollisionsgas (Flussrate 1 ml/min) verwendet. Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V und die Nozzle-Voltage 500 V. Nach der chromatographischen Trennung wurde die Säule mit 100 % B für 2 min gespült und mit der ursprünglichen Fließmittelzusammensetzung von 10 % B für 4 min reäquilibriert.

Tab. 26 Parameter des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers zur Detektion der Omeprazolmetaboliten. Zeitsegment (TS), Ventilstellung (Valve), Elektronenmultiplierspannung (Delta EMV), Precursor-Ion (Prec Ion), Produkt-Ion (Prod Ion), Fragmentorspannung (Frag), Kollisionsenergie (CE), Ionenanalysenzeit (Dwell time), Qualifizierübergang (q), Quantifizierübergang (Q).

TS	Zeit [min]	Valve	Delta EMV [V]	Compound	Prec Ion (m/z)	Prod Ion (m/z)	Frag [V]	CE [eV]	Dwell time [ms]
1	0.0	to waste	-	-	-	-	-	-	-
2	2.0	to MS	0	Trimethoprim (IS)	291	230 (Q)	150	20	25
					291	123 (q)	150	20	25
				Desmethylomeprazol	332	198 (Q)	75	5	25
					332	136 (q)	75	35	25
				Hydroxyomeprazol	362	214 (Q)	75	10	25
					362	152 (q)	75	35	25
				Omeprazolsulfon	362	150 (Q)	100	25	25
					362	120 (q)	100	35	25
3	6.0	to waste	-	-	-	-	-	-	-

2.4 Carboxylesterasen

2.4.1 Stammlösungen

Substrate

Zur Bestimmung der Aktivität der Carboxylesterasen wurden Stammlösungen von Phenylacetat (PA; 100 mM), *p*-Nitrophenylacetat (PNPA; 100 mM), 4-Methylumbelliferylacetat (4-MUA; 100 mM), Methyl-4-nitrobenzoat (M4NB; 100 mM), Mycophenolatmofetil (MMF; 100 mM) und 3-*O*-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure (AKBA; 10 mM) in DMSO hergestellt. Die verwendeten Assay-Konzentrationen, die durch Verdünnung der Stammlösungen im Inkubationspuffer erhalten wurden, waren 5, 25 und 100 μ M für AKBA sowie 50, 250 und 1000 μ M für alle anderen Substrate. Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für die Hydrolyse von PNPA wurden die Assay-Konzentrationen 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 und 1000 μ M inkubiert. Für die Untersuchung der Inhibition wurde eine Assay-Konzentration von 500 μ M PNPA eingesetzt.

Metaboliten

Für die Quantifizierung der entstandenen Metaboliten wurden Stammlösungen von Phenol, *p*-Nitrophenol (PNP), 4-Methylumbelliferon (4-MU), 4-Nitrobenzoesäure (4-NBA), Mycophenolsäure (MPA) und 11-Keto- β -boswelliasäure (KBA) jeweils in einer Konzentration von 10 mg/ml mit DMSO als Lösungsmittel hergestellt. Die Linearität der HPLC/UV-Analysen wurde mit den Assay-Konzentrationen 0.25, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 und 25 μ g/ml überprüft.

Inhibitoren und Pflanzenextrakte

Die Bestimmung der IC₅₀-Werte von Bis(*p*-nitrophenyl)phosphat-Natrium (BNPP) wurde mit den Assay-Konzentrationen 0.01, 0.025, 0.1, 0.25, 1, 2.5, 10, 25, 100 und 250 μ M durchgeführt, die aus einer 100 mM Stammlösung von BNPP in DMSO erhalten wurden. Zum Screening von pflanzlichen Arzneidrogen auf Inhibition der Carboxylesterasen wurden die unter V.2.1.1 hergestellten methanolischen Rohextrakte jeweils in einer Assay-Konzentration von 10, 50 und 250 μ g/ml (bezogen auf die Drogeneinwaage) untersucht.

2.4.2 In-vitro-Assays für Carboxylesterasen

Zur Untersuchung der Hydrolyse der ausgewählten Substrate (Tab. 27) durch die Carboxylesterasen wurde die entsprechende humane Subzellfraktion bzw. das rekombinante Carboxylesterase-Enzym in einen 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.4; 3 mM $MgCl_2$) gegeben, um die jeweils in Tab. 27 angegebene Proteinkonzentration zu erhalten. Für die Untersuchung der Inhibition der Carboxylesterasen durch die Pflanzenextrakte wurden die Rohextrakte in Methanol 80 % (V/V) zusammen mit dem Substrat *p*-Nitrophenylacetat (500 μ M) und humaner Leber (S9-Fraktion; 0.025 mg/ml) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer mit pH 6.5 inkubiert. Es wurden Blindproben ohne Protein zur Korrektur der nichtenzymatisch ablaufenden Hydrolyse der Substrate und Kontrollproben ohne Inhibitor (100%ige Enzymaktivität) angefertigt. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 300 μ l. Zunächst wurden die Proben für 5 min auf 37 °C temperiert. Bei Untersuchung der Pflanzenextrakte betrug die Inkubationstemperatur 25 °C. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe der SubstratstammLösung gestartet. Nach der in Tab. 27 angegebenen Inkubationszeit wurde den Proben jeweils 150 μ l eiskalte MeOH/ $ZnSO_4$ -Lösung, die 5 % Essigsäure enthielt, hinzugegeben. Als Stopplösung für den AKBA-Assay wurden 300 μ l Acetonitril, der 2.5 % Essigsäure enthielt, verwendet. Das gefällte Protein wurde durch Zentrifugation bei 12000 x g für 6 min abgetrennt und jeweils etwa 400 μ l des klaren Überstandes in ein HPLC-Vial überführt. Die Quantifizierung der Metaboliten erfolgte mit Hilfe einer HPLC/UV-Analyse. Hierfür wurde das in Tab. 27 angegebene Volumen auf eine Synergi Max-RP-Säule (75 x 4.6 mm; 4 μ m) injiziert. Die Temperatur der Chromatographiesäule betrug 30 °C. Zur Reduktion der nichtenzymatisch ablaufenden Hydrolyse der Substrate, wurden die Proben im Autosampler auf 5 °C gekühlt. Das Fließmittel bestand aus 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Acetonitril (B). Unter Anwendung eines Fließmittelgradienten (Tab. 27) mit einer Flussrate von 1 ml/min wurde das Substrat und der Metabolit innerhalb einer Laufzeit von 6 min getrennt. Die entsprechenden Detektionswellenlängen und Retentionszeiten sind in Tab. 27 angegeben. Anschließend wurde die Säule mit reinem Acetonitril für 2 min mit einer Flussrate von 1 ml/min gespült und mit der jeweils zu Beginn des Gradienten vorliegenden Fließmittelzusammensetzung für 2 min mit 1 ml/min reäquilibriert.

Tab. 27 Inkubationsbedingungen der Carboxylesterase-Assays und Parameter der HPLC/UV-Analysen zur Quantifizierung der entstandenen Metaboliten.

	PA-Assay	PNPA-Assay	MUA-Assay	M4NB-Assay	MMF-Assay	AKBA-Assay
Inkubation						
Substrat	Phenylacetat	<i>p</i> -Nitrophenyl-acetat	4-Methylumbelliferylacetat	Methyl-4-nitrobenzoat	Mycophenolat-mofetil	3-O-Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure
Metabolit	Phenol	<i>p</i> -Nitrophenol	4-Methylumbelliferon	4-Nitrobenzoesäure	Mycophenolsäure	11-Keto- β -boswelliasäure
Proteinkonzentration						
HLC	0.005 mg/ml	0.01 mg/ml	0.01 mg/ml	0.01 mg/ml	0.01 mg/ml	0.25 mg/ml
HL-S9	0.005 mg/ml	0.01 mg/ml	0.01 mg/ml	0.01 mg/ml	0.01 mg/ml	0.1 mg/ml
HLM	0.0025 mg/ml	0.005 mg/ml	0.005 mg/ml	0.005 mg/ml	0.005 mg/ml	0.1 mg/ml
HIM	0.005 mg/ml	0.005 mg/ml	0.005 mg/ml	0.01 mg/ml	0.01 mg/ml	0.05 mg/ml
CES1b	0.005 mg/ml	0.005 mg/ml	0.01 mg/ml	0.005 mg/ml	0.005 mg/ml	0.1 mg/ml
CES1c	0.005 mg/ml	0.005 mg/ml	0.01 mg/ml	0.005 mg/ml	0.005 mg/ml	0.1 mg/ml
CES2	0.005 mg/ml	0.005 mg/ml	0.005 mg/ml	0.01 mg/ml	0.01 mg/ml	0.05 mg/ml
Reaktion	5 min, 37 °C	5 min, 37 °C	5 min, 37 °C	5 min, 37 °C	5 min, 37 °C	30 min, 37 °C
HPLC/UV-Analyse						
Säule	Phenomenex Synergi Max-RP (75 x 4.6 mm; 4 μ m)					
Fließmittel	0.05 % Trifluoressigsäure (A) / Acetonitril (B)					
Flussrate	1.0 ml/min	1.0 ml/min	1.0 ml/min	1.0 ml/min	1.0 ml/min	1.0 ml/min
Injektionsvolumen	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	100 μ l
Gradient, % B (min)	25(0)→75(6)	35(0)→65(6)	30(0)→60(6)	35(0)→65(6)	30(0)→75(6)	80(0)→100(6)
R _t Metabolit/Substrat	3.5/5.2 min	3.1/4.7 min	2.9/4.6 min	2.9/5.3 min	4.9/2.9 min	3.3/5.1 min
UV-Detektion	270 nm	320 nm	320 nm	260 nm	250 nm	250 nm

2.5 In-vitro-Assays für Cytochrom-P450-Enzyme

2.5.1 Standardsubstrate

2.5.1.1 Stammlösungen

Substrate

Die Stammlösungen der Substrate und ihre Verdünnungen für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten, die CYP-Isoenzymselektivität und für die Inhibitionsassays wurden in DMSO hergestellt. Durch 100-fache Verdünnung der Substratstammlösungen in den Inkubationsansatz wurden die in der untenstehenden Tabelle angegebenen Assay-Konzentrationen erreicht.

Substrat	Enzym	Assay-Konzentration in μM	
		Substratsättigungskinetik	Inhibition
Phenacetin	CYP1A2	1/2.5/5/7.5/10/25/50/100/150/200/250	10
	HLM	1/2.5/5/7.5/10/25/50/100/150/200/250	25
Tacrin	CYP1A2	0.1/0.5/1/2.5/5/10/15/20/25/50/75/100	2
	HLM	0.1/0.5/1/2.5/5/10/15/20/25/50/75/100	15
Cumarin	CYP2A6	0.1/0.25/0.5/1/2/3/5/7.5/10/15/20	1
	HLM	0.1/0.25/0.5/1/2/3/5/7.5/10/15/20	1
Bupropion	CYP2B6	2.5/10/25/50/100/150/250/500/750/1000	75
	HLM	2.5/10/25/50/100/150/250/500/750/1000	75
Amodiaquin	CYP2C8	0.1/0.25/0.5/1/2.5/5/7.5/10/12.5/15	0.5
	HLM	0.1/0.25/0.5/1/2.5/5/7.5/10/12.5/15	1
Tolbutamid	CYP2C9	2.5/10/25/50/100/150/250/500/750/1000	100
	HLM	2.5/10/25/50/100/150/250/500/750/1000	200
Diclofenac	CYP2C9	0.1/0.25/0.5/1/2.5/5/7.5/10/15/20/25	1
	HLM	0.1/0.25/0.5/1/2.5/5/7.5/10/15/20/25	3
S-Mephenytoin	CYP2C19	1/5/10/25/50/100/200/300/400/500	30
	HLM	1/5/10/25/50/100/200/300/400/500	60
Imipramin	CYP2C19	2.5/10/25/50/100/150/200/250/300/400/500	50
	HLM	2.5/10/25/50/100/150/200/250/300/400/500	-
Dextromethorphan	CYP2D6	0.025/0.1/0.25/0.5/1/2.5/5/7.5/10/15/20/25	0.7
	HLM	0.025/0.1/0.25/0.5/1/2.5/5/7.5/10/15/20/25	3.5
Chlorzoxazon	CYP2E1	2.5/10/25/50/100/150/250/500/750/1000	500
	HLM	2.5/10/25/50/100/150/250/500/750/1000	-
4-Nitrophenol	CYP2E1	2.5/10/25/50/100/150/250/350/500/750/1000	500
	HLM	2.5/10/25/50/100/150/250/350/500/750/1000	-

Substrat	Enzym	Assay-Konzentration in μM	
		Substratsättigungskinetik	Inhibition
Midazolam	CYP3A4	0.05/0.25/0.5/1/1.5/2.5/5/7.5/10/15/20/25	1
	HLM	0.1/0.25/0.5/1/2/3/5/7.5/10/15/20/25	3
Testosteron	CYP3A4	1/5/10/25/50/75/100/150/200/250/300/400/500	25
	HLM	1/5/10/25/50/75/100/150/200/250/300/400/500	60

Metaboliten

Zur Überprüfung der Linearität der LC/MS/MS-Analysen wurden Stammlösungen der einzelnen Metaboliten in DMSO hergestellt. Aus jeder Metabolitenstammlösung wurde eine Verdünnungsreihe in DMSO angefertigt. Durch die 100-fache Verdünnung dieser Stammlösungen in den Inkubationsansatz resultierten die unten angegebenen Assay-Konzentrationen für die Erstellung der Kalibriergeraden.

Metabolit	Stammlösung	Assay-Konzentration
Paracetamol	10 mg/ml	1/5/10/25/50/75/100 ng/ml
1-Hydroxytacin	10 mg/ml	1/5/10/25/50/75/100 ng/ml
7-Hydroxycumarin	10 mg/ml	1/2.5/5/7.5/10/15/20/25/30/40/50 ng/ml
Hydroxybupropion	1 mg/ml	1/5/10/25/50/75/100 ng/ml
Desethylamodiaquin	1 mg/ml	0.25/1/5/10/15/20/25/30/40/50 ng/ml
Hydroxytolbutamid	1 mg/ml	1/5/10/25/50/75/100/150 ng/ml
4'-Hydroxymephenytoin	1 mg/ml	1/5/10/25/50/75/100/150/200/250 ng/ml
Desipramin	10 mg/ml	1/5/10/25/50/75/100 ng/ml
Dextrophan	10 mg/ml	1/5/10/25/50/75/100 ng/ml
1'-Hydroxymidazolam	1 mg/ml	1/5/10/25/50/75/100 ng/ml
6 β -Hydroxytestosteron	1 mg/ml	5/10/25/50/100/150/250/500/750/1000 ng/ml

Interne Standards

Die Quantifizierung der Metaboliten in den Proben wurde nach der internen Standardmethode durchgeführt. Hierfür wurden Stammlösungen der einzelnen internen Standardsubstanzen und geeignete Verdünnungen in DMSO hergestellt. Der interne Standard wurde der Stopplösung für die Enzymreaktion zugesetzt. Die finalen Konzentrationen des jeweiligen internen Standards in der inkubierten Probe nach der Zugabe der Stopplösung sind unten angegeben.

Interner Standard	Assay	Stamm- lösung	Assay- Konz.
Acetanilid	Phenacetin-O-deethylierung	10 mg/ml	100 ng/ml
9-Aminoacridin	Tacrin-1-hydroxylierung	10 mg/ml	100 ng/ml
7-Hydroxy- 4-methylcumarin	Cumarin-7-hydroxylierung	10 mg/ml	25 ng/ml
Propranolol	Bupropionhydroxylierung	10 mg/ml	100 ng/ml
Chinin	Amodiaquin-N-deethylierung	10 mg/ml	100 ng/ml
Chlorpropamid	Tolbutamidhydroxylierung	10 mg/ml	100 ng/ml
Flufenaminsäure	Diclofenac-4'-hydroxylierung	10 mg/ml	10 ng/ml
Phenytoin	S-Mephenytoin-4'-hydroxylierung	10 mg/ml	150 ng/ml
Maprotilin	Imipramin-N-demethylierung	10 mg/ml	75 ng/ml
Papaverin	Dextromethorphan-O-demethylierung	10 mg/ml	10 ng/ml
2-Benzoxazolinon	Chlorzoxazon-6-hydroxylierung	10 mg/ml	2000 ng/ml
2-Methyl-4- nitrophenol	4-Nitrophenol-2-hydroxylierung	10 mg/ml	10 ng/ml
Nitrazepam	Midazolam-1'-hydroxylierung	10 mg/ml	25 ng/ml
Hydrocortison	Testosteron-6 β -hydroxylierung	10 mg/ml	100 ng/ml

CYP-Inhibitoren

Für die Bestimmung der inhibitorischen Aktivität von Chinidin, Clopidogrel, Diethyldithiocarbamat, Furaflin, Ketoconazol, 8-Methoxy-psoralen, Montelukast, Nicotin, Nootkaton, Omeprazol, Pilocarpin, Quercetin, Sertralin, Sulfaphenazol, Ticlopidin und Tryptamin wurden jeweils 25 mM oder 100 mM Stammlösungen in DMSO hergestellt. Für Tranylcypromin wurde Methanol 50 % (V/V) als Lösungsmittel verwendet. Aus jeder Inhibitorstammlösung wurde eine Verdünnungsreihe mit den folgenden Konzentrationen erstellt: 10 mM / 2.5 mM / 1 mM / 250 μ M / 100 μ M / 25 μ M / 10 μ M / 2.5 μ M / 1 μ M / 250 nM / 100 nM und 25 nM. Durch die 100-fache Verdünnung dieser Stammlösungen in den Inkubationspuffer resultierten die Assay-Konzentrationen: 250 μ M / 100 μ M / 25 μ M / 10 μ M / 2.5 μ M / 1 μ M / 250 nM / 100 nM / 25 nM / 10 nM / 2.5 nM / 1 nM und 0.25 nM zur Ermittlung der Inhibitionskurven für die einzelnen CYP-Enzyme.

2.5.1.2 LC/MS/MS-basierte Assays

Für die Inhibitionsuntersuchungen der einzelnen CYP-Enzyme wurden verschiedene Standardsubstrate ausgewählt (Tab. 28). Das jeweilige Substrat wurde mit dem entsprechenden CYP-Enzym bzw. humanen Lebermikrosomen und ggf. dem zu testenden Inhibitor bzw. Pflanzenextrakt in einen 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM Magnesiumchlorid; pH 7.4) pipettiert. Die resultierenden Konzentrationen für das Substrat und die Enzyme für die einzelnen Assays sind in Tab. 28 angegeben. Nach einer Vorwärmzeit von 5 min bei 37 °C zur Temperierung der Proben wurde die Reaktion durch Zugabe von NADPH (1 mM) gestartet. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 300 µl. Im Anschluss an die Inkubation bei 37 °C für die in Tab. 28 angegebene Zeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl eiskalter MeOH/ZnSO₄-Lösung, die den jeweiligen internen Standard (Tab. 28) enthielt, abgestoppt. Das gefällte Protein wurde durch Zentrifugation bei 12000 x g für 6 min abgetrennt und ca. 400 µl des Überstandes in ein HPLC-Vial pipettiert. Die Quantifizierung der entstandenen Metaboliten (Tab. 28) erfolgte durch eine LC/MS/MS-Analyse mit angeschlossenen Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (s. V.1.1.3). Hierfür wurde das entsprechende Volumen der Probe auf eine Bonus-RP-Säule (50 x 2.1 mm; 3.5 µm) bzw. eine Synergi Max-RP-Säule (50 x 2.0 mm; 4 µm) injiziert (Tab. 28). Als Fließmittel wurden 10 mM Ammoniumacetat und 0.1 % Ameisensäure in Wasser (A) und Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure (B) verwendet. Die chromatographische Trennung erfolgt mit Hilfe eines Fließmittelgradienten (Tab. 28) innerhalb von 4 min und einer Flussrate von 0.6 ml/min. 1.5 min nach der Probeninjektion wurde das Eluat in das Massenspektrometer geleitet (valve to MS) und der Metabolit sowie der interne Standard im MRM-Modus detektiert. Die gemessenen Quantifizierungsübergänge (Q) für die einzelnen Analyten sind in Tab. 28 angegeben. Die Ionenanalysenzeit (Dwell time) für einen Übergang betrug 50 ms. Stickstoff wurde zur Verneblung des Eluates (Druck 45 psi), als Trocknungsgas (Flussrate 8 l/min, Temperatur 300 °C), als Sheathgas (Flussrate 10 l/min, Temperatur 300 °C) und als Kollisionsgas (Flussrate 1 ml/min) verwendet. Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V bei positiver Polarität und 3500 V bei negativer Polarität. Als Nozzle-Voltage wurden 500 V gewählt. Nach der chromatographischen Trennung wurde das Schaltventil wieder umgeschaltet (valve to waste). Dann wurde die Säule für 2 min mit 100 % B gespült und für 4 min reäquilibriert.

Tab. 28 Inkubationsbedingungen für die CYP-Inhibitionsassays mit den Standardsubstraten und Parameter der LC/MS/MS-Analysen zur Quantifizierung der Metaboliten. (Säule 1: Zorbax Bonus RP, 50 x 2.1 mm, 3.5 µm; Säule 2: Synergi Max-RP, 50 x 2.0 mm, 4 µm).

	CYP1A2		CYP2A6		CYP2B6		CYP2C8	
	Phenacetin-O-deethylierung	Tacin-1-hydroxylierung	Cumarin-7-hydroxylierung	Bupropion-hydroxylierung	Amodiaquin-N-deethylierung			
Substratkonzentration rek. CYP / HLM (µM)	10 / 25	2 / 15	1 / 1	75 / 75	0.5 / 1			
Metabolit	Paracetamol	1-Hydroxytacin	7-Hydroxycumarin	Hydroxybupropion	Desethylamodiaquin			
Interner Standard (IS)	Acetanilid	9-Aminoacridin	7-Hydroxy-4-methylcumarin	Propranolol	Chinin			
rek. CYP (pmol/ml)	1.5	2.0	2.0	1.0	1.0			
HLM (mg/ml)	0.05	0.05	0.025	0.025	0.01			
Inkubationszeit (min)	15	15	15	15	15			
LC/ESI/MS/MS-Analyse								
Säule	1	2	2	2	2			
Fließmittel	10 mM Ammoniumacetat + 0.1 % Ameisensäure (A) / Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure (B)							
Flussrate (ml/min)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6			
Injektionsvolumen (µl)	25	10	25	10	10			
Gradient, % B (min)	5(0)→50(4)	5(0)→35(4)	15(0)→30(4)	10(0)→50(4)	5(0)→40(4)			
R _t Metabolit/IS (min)	2.1/3.4	2.2/3.1	2.1/3.2	2.5/3.5	2.4/3.4			
IS finale Konz. (ng/ml)	100	100	25	100	100			
Modus	positiv	positiv	negativ	positiv	positiv			
Q (m/z) Metabolit (CE)	152→110 (13)	215→197 (13)	161→133 (17)	256→238 (7)	328→283 (14)			
Q (m/z) IS (CE)	136→94 (13)	195→93 (41)	175→133 (17)	260→116 (17)	325→81 (33)			

Tab. 28 (Fortsetzung) Inkubationsbedingungen für die CYP-Inhibitionsassays mit den Standardsubstraten und Parameter der LC/MS/MS-Analysen zur Quantifizierung der Metaboliten. (Säule 1: Zorbax Bonus RP, 50 x 2.1 mm, 3.5 µm; Säule 2: Synergi Max-RP, 50 x 2.0 mm, 4 µm).

	CYP2C9			CYP2C19			CYP2D6	
	Tolbutamid- hydroxylierung	Diclofenac- 4'-hydroxylierung	S-Mephenytoin- 4'-hydroxylierung	Imipramin- N-demethylierung	Dextromethorphan- O-demethylierung			
Inkubation								
Substratkonzentration rek. CYP / HLM (µM)	100 / 200	1 / 3	30 / 60	50 / -	0.7 / 3.5			
Metabolit	Hydroxytolbutamid	4'-Hydroxydiclofenac	4'-Hydroxy- S-mephenytoin	Desipramin	Dextrorphan			
Interner Standard (IS)	Chlorpropamid	Flufenaminsäure	Phenytoin	Maprotilin	Papaverin			
rek. CYP (pmol/ml)	5.0	2.0	5.0	0.5	1.0			
HLM (mg/ml)	0.1	0.05	0.2	0.01	0.05			
Inkubationszeit (min)	30	15	30 (2C19), 60 (HLM)	15	15			
LC/ESI/MS/MS-Analyse								
Säule	2	2	2	2	2			
Fließmittel	10 mM Ammoniumacetat + 0.1 % Ameisensäure (A) / Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure (B)							
Flussrate (ml/min)	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6			
Injektionsvolumen (µl)	25	25	25	5	20			
Gradient, % B (min)	20(0)→70(4)	35(0)→90(4)	10(0)→70(4)	25(0)→40(4)	10(0)→40(4)			
R _t Metabolit/IS (min)	2.0/3.2	2.1/3.5	2.5/3.5	2.8/3.3	2.6/3.5			
IS finale Konz. (ng/ml)	100	10	150	50	10			
Modus	positiv	negativ	negativ	positiv	positiv			
Q (m/z) Metabolit (CE)	287→89 (45)	310→266 (7)	233→190 (9)	267→72 (17)	258→157 (41)			
Q (m/z) IS (CE)	277→111 (37)	280→236 (13)	251→102 (17)	278→250 (17)	340→202 (25)			

Tab. 28 (Fortsetzung) Inkubationsbedingungen für die CYP-Inhibitionsassays mit den Standardsubstraten und Parameter der LC/MS/MS-Analysen zur Quantifizierung der Metaboliten. (Säule 1: Zorbax Bonus RP, 50 x 2.1 mm, 3.5 µm; Säule 2: Synergi Max-RP, 50 x 2.0 mm, 4 µm).

	CYP2E1		CYP3A4	
	Chlorzoxazon-6-hydroxylierung	4-Nitrophenol-2-hydroxylierung	Midazolam-1'-hydroxylierung	Testosteron-6β-hydroxylierung
Inkubation				
Substratkonzentration rek. CYP / HLM (µM)	500 / -	500 / -	1 / 3	25 / 60
Metabolit	6-Hydroxychlorzoxazon	4-Nitrocatechol	1'-Hydroxymidazolam	6β-Hydroxytestosteron
Interner Standard (IS)	2-Benzoxazolinon	2-Methyl-4-nitrophenol	Nitrazepam	Hydrocortison
rek. CYP (pmol/ml)	2.0	2.0	1.5	2.0
HLM (mg/ml)	0.025	0.025	0.025	0.05
Inkubationszeit (min)	30	15	15	15
LC/ESI/MS/MS-Analyse				
Säule	2	2	1	2
Fließmittel	10 mM Ammoniumacetat + 0.1 % Ameisensäure (A) / Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure (B)			
Flussrate (ml/min)	0.6	0.6	0.6	0.6
Injektionsvolumen (µl)	10	20	20	25
Gradient, % B (min)	5(0)→45(4)	15(0)→65(4)	25(0)→55(4)	20(0)→35(4)
R _t Metabolit/IS (min)	2.8/3.3	2.2/3.5	2.0/3.5	2.5/3.1
IS finale Konz. (ng/ml)	2000	10	25	100
Modus	negativ	negativ	positiv	positiv
Q (m/z) Metabolit (CE)	184→120 (11)	154→124 (13)	342→324 (21)	305→269 (9)
Q (m/z) IS (CE)	134→42 (25)	152→122 (13)	282→236 (25)	363→121 (25)

2.5.2 Cumarin-Derivate

2.5.2.1 Synthese und Reinigung der Cumarin-Derivate

Reaktionsansätze

Zur Darstellung der alkylierten Cumarin-Derivate wurden 7-Hydroxycumarin (HC), 7-Hydroxy-4-methylcumarin (HMC) und 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC) jeweils mit Iodmethan, Ethyliodid, 1-Brompropan, 1-Brombutan, 1-Brompentan und Benzylbromid umgesetzt. Hierzu wurden jeweils 25 mg Edukt in zwei 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und in jeweils 1.5 ml Aceton gelöst. In jedes Reaktionsgefäß wurden etwa 50 mg Kaliumcarbonat hinzugefügt und 2 Äquivalente des Alkylierungsreagenzes pipettiert. Der Reaktionsansatz wurde für 4 h bei 60 °C inkubiert und dabei mehrmals mit Hilfe eines Vortex-Mischers geschüttelt. Danach erfolgte eine Reaktionskontrolle mittels HPLC/UV-Analyse (s. u.). Bei unzureichender Umsetzung wurde ein weiteres Äquivalent des Alkylhalogenids zugegeben und der Ansatz für weitere 4 h bei 60 °C zur Reaktion gebracht. Nach der Zentrifugation des Reaktionsansatzes wurde der Überstand zur Entfernung des überschüssigen Alkylhalogenids im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde zweimal in ca. 5 ml Aceton gelöst und jeweils wieder bis zur Trockene eingeeengt. Für die anschließende Aufreinigung mittels HPLC wurde die erhaltene Substanz in etwa 2 ml Methanol oder Aceton gelöst.

Reaktionskontrolle

Zur Reaktionskontrolle wurden 10 µl des Reaktionsansatzes auf 1000 µl mit Methanol verdünnt. 10 µl dieser Lösung wurden in das HPLC/UV-System (s. V.1.1.1) auf eine RP18-Säule (Agilent Zorbax SB-C18; 150 x 4.6 mm; 5 µm) injiziert. Das Fließmittel bestand aus 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Methanol (B). Es wurde ein Fließmittelgradient von 40 bis 100 % B in 12 min angewendet und anschließend die erreichten 100 % B für 4 min gehalten. Dann wurde die Säule mit 40 % B für 4 min reäquilibriert. Die Flussrate betrug 1.0 ml/min und als Wellenlänge für die UV-Detektion wurde 320 nm gewählt.

Reinigung mittels HPLC

Die alkylierten Cumarin-Derivate wurden aus der Lösung des abgedampften Reaktionsansatzes mit Hilfe des HPLC-Systems mit angeschlossenem

Fraktionskollektor (s. V.1.1.2) isoliert. Hierfür wurden jeweils 25 µl des Reaktionsansatzes auf eine RP18-Säule (Agilent Zorbax SB-C18; 150 x 4.6 mm; 5 µm) injiziert. Anschließend erfolgte die chromatographische Trennung mit 1.0 ml/min bei isokratischer Fließmittelzusammensetzung. Als Fließmittel wurden 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Methanol (B) verwendet. Die Detektionswellenlänge betrug 320 nm. Die Fraktion, die das jeweilige Reaktionsprodukt enthielt, wurde mit Hilfe des automatischen Fraktionskollektors aufgefangen. Die Fließmittelzusammensetzungen für die Isolierung der einzelnen Cumarin-Derivate sowie die dazugehörigen Retentionszeiten der gesammelten Fraktionen sind in der untenstehenden Tabelle aufgelistet. Der Chromatographielauf wurde ca. 1 min nach der Elution des Reaktionsproduktes abgebrochen und die Säule mit 100 % B für 3.5 min gespült. Vor der nächsten Injektion wurde die Säule mit der ursprünglichen Fließmittelzusammensetzung für 3 min reäquilibriert. Der methanolische Anteil des gesammelten Eluats wurde mit Hilfe des Rotations-

Substanz	Fließmittel % B	Fraktion [min]	Ausbeute [%]
HC-Derivate			
7-Methoxycumarin (MC)	50	6.5-8.5	66
7-Ethoxycumarin (EC)	55	7.9-8.9	72
7-Propyloxy-cumarin (ProC)	65	6.7-7.7	72
7-Butyloxy-cumarin (BuC)	70	7.3-8.3	59
7-Pentyloxy-cumarin (PenC)	75	7.2-8.2	46
7-Benzyloxy-cumarin (BC)	67.5	6.9-8.1	59
HMC-Derivate			
7-Methoxy-4-methylcumarin (MMC)	55	7.0-8.0	54
7-Ethoxy-4-methylcumarin (EMC)	62.5	7.0-8.1	78
7-Propyloxy-4-methylcumarin (ProMC)	70	6.6-7.6	37
7-Butyloxy-4-methylcumarin (BuMC)	75	6.7-7.7	50
7-Pentyloxy-4-methylcumarin (PenMC)	80	6.3-7.3	46
7-Benzyloxy-4-methylcumarin (BMC)	72.5	6.5-7.7	74
HFC-Derivate			
7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin (MFC)	67.5	7.4-8.5	40
7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin (EFC)	72.5	7.0-8.0	50
7-Propyloxy-4-trifluormethylcumarin (ProFC)	77.5	6.9-7.9	52
7-Butyloxy-4-trifluormethylcumarin (BuFC)	80	7.7-8.7	56
7-Pentyloxy-4-trifluormethylcumarin (PenFC)	82.5	8.4-9.5	58
7-Benzyloxy-4-trifluormethylcumarin (BFC)	80	6.1-7.2	74

verdampfers entfernt. Die erhaltene Lösung wurde bei -80 °C über Nacht eingefroren und anschließend mit der Gefriertrocknungsanlage ALPHA 1-4 LD plus in ca. 2 Tagen getrocknet.

Charakterisierung

Als Nachweis für die Identität der synthetisierten Cumarine wurden Stammlösungen der jeweiligen Substanz in DMSO (10 mg/ml) hergestellt und diese mit 50%igem Methanol auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. Diese Lösungen wurden mit Hilfe einer LC/ESI/MS-Analyse im positiven Scan-Modus untersucht. Die erhaltenen *m/z*-Werte der detektierten $[M+H]^+$ -Ionen stimmten in allen Fällen mit den aus der Molmasse berechneten Werten überein. Es konnte kein Edukt detektiert werden.

2.5.2.2 Stammlösungen

Substrate

Zur Bestimmung der Aktivität für die *O*-Dealkylierung der 7-Alkyloxcumarin-Derivate durch CYP-Enzyme und humane Lebermikrosomen wurden Assay-Konzentrationen von 1, 10 und 100 µM verwendet. Hierfür wurden von jedem synthetisierten Cumarin-Derivat (s. V.2.5.2.1) Stammlösungen der Konzentrationen 100 µM, 1 mM und 10 mM in DMSO hergestellt.

Metaboliten

Zur Kalibrierung der LC/LC/Fluoreszenzanalyse für die Quantifizierung der entstandenen Metaboliten wurden Stammlösungen (10 mg/ml) und Verdünnungsreihen von 7-Hydroxycumarin (HC), 7-Hydroxy-4-methylcumarin (HMC) und 7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin (HFC) in DMSO angefertigt. Kalibriergeraden wurden mit den Assay-Konzentrationen von 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75 und 100 ng/ml erstellt.

Interne Standards

Zur Quantifizierung der entstandenen Metaboliten mittels LC/LC/Fluoreszenzanalyse wurden den inkubierten Proben die unten angegebenen internen Standardsubstanzen, gelöst in DMSO, mit der Stopplösung zugesetzt.

Interner Standard	Assay zur O-Dealkylierung der	Stamm-lösung	Assay-Konz.
HC	7-Alkyloxy-4-methylcumarine	10 mg/ml	25 ng/ml
HMC	7-Alkyloxycumarine	10 mg/ml	25 ng/ml
	7-Alkyloxy-4-trifluormethylcumarine	10 mg/ml	25 ng/ml

2.5.2.3 LC/LC/Fluoreszenz-Assays zur Bestimmung der O-Dealkylierung

Die Untersuchung der O-Dealkylierung der Cumarin-Derivate erfolgte durch LC/LC/Fluoreszenz-basierte Assays. Die 7-Alkyloxycumarine (HC-Assay), die 7-Alkyloxy-4-methylcumarine (HMC-Assay) und die 7-Alkyloxy-4-trifluormethylcumarine (HFC-Assay) wurden in einer Konzentration von 1, 10 und 100 μM mit humanen Lebermikrosomen (0.05 mg/ml) bzw. mit rekombinanten CYP-Enzymen (5 pmol/ml) in einen 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM Magnesiumchlorid; pH 7.4) inkubiert. Die Proben wurden für 5 min auf 37 °C temperiert und die Reaktion durch Zugabe von NADPH (1 mM) gestartet. Das resultierende Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 300 μl . Zum Abstoppen der Reaktion nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde das Protein mit 150 μl eiskalter MeOH/ZnSO₄-Lösung, die den entsprechenden internen Standard enthielt, gefällt. Die Proben wurden bei 12000 x g für 6 min zentrifugiert und jeweils etwa 400 μl des Überstandes in ein Vial überführt. Zur Quantifizierung der Metaboliten wurde eine HPLC/Fluoreszenzanalyse mit automatischer Online Festphasenextraktion durchgeführt. Hierfür wurden 50 μl der Probe auf die Extraktionssäule (Zorbax SB-Aq; 12.5 x 4.6 mm; 5 μm) injiziert. Als Extraktionsfließmittel diente 0.1 % Ameisensäure in Wasser (A1) und Methanol (B1). Die Festphasenextraktion wurde mit einer isokratischen Fließmittelzusammensetzung und einer Flussrate von 3 ml/min für 2 min durchgeführt. Nach der Extraktionsphase wurde das Schaltventil umgeschaltet und die Analyten im Backflush-Modus auf die Chromatographiesäule (Synergi Max-RP; 75 x 4.6 mm; 4 μm) gespült. Die Extraktions- und die Chromatographiesäule wurden auf 30 °C temperiert. Das Chromatographiefließmittel bestand aus 0.1 % Ameisensäure in Wasser (A2) und Acetonitril (B2). Die Trennung erfolgte mit Hilfe eines Fließmittelgradienten und einer Flussrate von 1.0 ml/min. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen für die fluorimetrische Detektion der Metaboliten und der internen Standards sowie die dazugehörigen Photomultiplier-

Tube-Spannungen (PMT-Gain) und die Retentionszeiten können der untenstehenden Tabelle entnommen werden.

	HC-Assay	HMC-Assay	HFC-Assay
Inkubation			
Substrat	7-Alkyloxcumarine	7-Alkyloxy-4-methylcumarine	7-Alkyloxy-4-trifluormethylcumarine
Substratkonzentration	1 / 10 / 100 µM	1 / 10 / 100 µM	1 / 10 / 100 µM
Metabolit	7-Hydroxycumarin	7-Hydroxy-4-methylcumarin	7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin
Interner Standard (IS)	7-Hydroxy-4-methylcumarin	7-Hydroxycumarin	7-Hydroxy-4-methylcumarin
IS-Konzentration final	25 ng/ml	25 ng/ml	25 ng/ml
rek. CYP	5 pmol/ml	5 pmol/ml	5 pmol/ml
HLM	0.05 mg/ml	0.05 mg/ml	0.05 mg/ml
Inkubationszeit	20 min	20 min	20 min
LC/LC/Fluoreszenzanalyse			
Injektionsvolumen	50 µl	50 µl	50 µl
Extraktionssäule	Zorbax SB-Aq (12.5 x 4.6 mm; 5 µm)		
Extraktionsfließmittel	0.1 % Ameisensäure (A1) / Methanol (B1)		
Extraktion	2.5 % B1 (3 ml/min; 2 min)	2.5 % B1 (3 ml/min; 2 min)	5 % B1 (3 ml/min; 2 min)
Säule	Synergi Max-RP (75 x 4.6 mm; 4 µm)		
Fließmittel	0.1 % Ameisensäure (A2) / Acetonitril (B2)		
Flussrate	1.0 ml/min	1.0 ml/min	1.0 ml/min
Gradient, % B2 (min)	20(2)→35(8)	20(2)→35(8)	25(2)→80(8)
Ex/Em (PMT-Gain)			
Metabolit	330 / 455 nm (12)	330 / 455 nm (12)	340 / 500 nm (14)
IS	330 / 455 nm (12)	330 / 455 nm (12)	330 / 455 nm (12)
R _t Metabolit / IS (min)	6.1 / 7.2	7.2 / 6.1	6.9 / 5.2

2.5.3 Harman-Derivate

2.5.3.1 Stammlösungen

Substrate

Die Stammlösungen von Harmin und den Harman-Derivaten 2-Benzyl-7-benzyloxyharman (BBH), 2-Benzyl-7-methoxyharman (BMH), 7-Methoxy-9-(4-carboxybenzyl)harman (MCBH) und 2-Methyl-7-methoxyharman (MMH) für die enzymkinetischen Untersuchungen und die Inhibitionsassays wurden in DMSO hergestellt. Die inkubierten Assay-Konzentrationen in der untenstehenden Tabelle wurden durch 100-fache Verdünnung dieser Stammlösungen in den Inkubationspuffer erhalten.

Substrat	Enzym	Assay-Konzentration	
		Substratsättigungskinetik	Inhibition
Harmin	CYP1A2	0.5/1/2.5/5/10/25/50/75/100 µM	2.5 µM
	CYP2C9	2.5/10/25/50/100/150/200/250 µM	75 µM
	CYP2C19	2.5/10/25/50/100/150/200/250 µM	50 µM
	CYP2D6	0.5/1/2.5/5/10/25/50/75/100 µM	5 µM
BBH	CYP1B1	0.1/0.5/1/2.5/5/10/25/50 µM	1 µM
	CYP3A4	0.1/0.5/1/2.5/5/10/25/50 µM	1.5 µM
BMH	CYP1A2	0.1/0.5/1/2.5/5/10/25/50/75/100 µM	3.5 µM
MCBH	CYP2C8	1/2.5/5/10/25/50/100/250 µM	20 µM
	CYP2C9	0.25/0.5/1/2.5/5/10/25/50/100/250 µM	7.5 µM
	CYP2C19	0.25/0.5/1/2.5/5/10/25/50/100/250 µM	25 µM
MMH	CYP2D6	0.25/0.5/1/2.5/5/10/25/50/100/150 µM	7.5 µM
	HLM	0.25/0.5/1/2.5/5/10/25/50/100/150 µM	40 µM

Metaboliten

Zur Quantifizierung der aus den Harman-Derivaten gebildeten Metaboliten wurden Stammlösungen von Harmol, 2-Benzyl-7-hydroxyharman (BHH), 7-Hydroxy-9-(4-carboxybenzyl)harman (HCBH) und 2-Methyl-7-hydroxyharman (MHH) in DMSO hergestellt. Aus diesen Stammlösungen wurden Verdünnungsreihen für die Kalibriergeraden der einzelnen Metaboliten erstellt. Die verwendeten Assay-Konzentrationen der Kalibrierstandards können der untenstehenden Tabelle entnommen werden.

Metabolit	Stammlösung	Assay-Konzentration
Harmol	1 mg/ml	0.5/1/5/10/25/50/75/100/150/200/250 ng/ml
BHH	1 mg/ml	0.5/1/2.5/5/10/25/100/250 ng/ml
HCBH	1 mg/ml	0.25/0.5/1/2.5/5/10/25/50/100/250 ng/ml
MHH	1 mg/ml	0.5/1/2.5/5/10/25/50/100/250 ng/ml

Interne Standards

Zur Quantifizierung der Metaboliten wurde den Proben ein interner Standard mit der Stopplösung im Anschluss an die Inkubation zugesetzt. Die hierfür erforderlichen Stammlösungen der einzelnen internen Standardsubstanzen und ihre geeigneten Verdünnungen wurden in DMSO hergestellt. Die resultierenden Konzentrationen des jeweiligen internen Standards in der inkubierten Probe nach der Zugabe der Stopplösung sind in der untenstehenden Tabelle angegeben.

Interner Standard	Assay	Stamm- lösung	Assay-Konz.
Harmin	BMH-7-debenzylierung	1 mg/ml	25 ng/ml
Harmol	MCBH-7-demethylierung	1 mg/ml	25 ng/ml
BHH	MMH-7-demethylierung	1 mg/ml	25 ng/ml
BMH	Harmin-7-demethylierung BBH-7-debenzylierung	1 mg/ml 1 mg/ml	25 ng/ml 25 ng/ml

CYP-Inhibitoren

Inhibitor	Enzym	Stamm- lösung	Assay-Konzentration
Furafyllin	CYP1A2	10 mM	0.01/0.05/0.25/0.5/1/2.5/5/10/25/100 µM
Quercetin	CYP2C8	25 mM	0.01/0.05/0.25/0.5/1/2.5/5/10/25 µM
Sulfaphenazol	CYP2C9	25 mM	0.001/0.005/0.025/0.1/0.25/0.5/1/2.5/10/25/100 µM
Tranylcypromin	CYP2C19	50 mM	0.05/0.25/1/2.5/5/10/25/100/250/500 µM
Chinidin	CYP2D6	25 mM	0.025/0.1/0.25/1/5/10/25/50/100/250/1000 nM
Ketoconazol	CYP3A4	10 mM	0.25/1/5/10/25/50/100/250/1000/2500/10000 nM

Zur Evaluierung der Harman-Derivate als CYP-Substrate wurden die IC_{50} -Werte von Standardinhibitoren für die einzelnen CYP-Enzyme bestimmt. Hierzu wurden Stammlösungen von Furafyllin, Quercetin, Sulfaphenazol, Chinidin und Ketoconazol in DMSO sowie von Tranylcypromin in Methanol 50 % (V/V) hergestellt. Die verwendeten Assay-Konzentrationen sind in der obenstehenden Tabelle angegeben.

2.5.3.2 Assays zur O-Dealkylierung der Harman-Derivate

Für die CYP-Assays mit den Harman-Derivaten wurden Harmin, 2-Benzyl-7-methoxyharman (CYP1A2-Assay), 7-Methoxy-9-(4-carboxybenzyl)harman (CYP2C-Assay), 2-Methyl-7-methoxyharman (CYP2D6-Assay) und 2-Benzyl-7-benzyloxyharman (CYP3A4-Assay) mit den Enzymen inkubiert und die entstandenen O-Desalkylmetaboliten durch die unten angegebenen LC/LC/Fluoreszenz- bzw. LC/MS/MS-Methoden quantifiziert.

Inkubation

Das Harman-Derivat (Tab. 29) wurde mit dem jeweiligen rekombinanten CYP-Enzym bzw. humanen Lebermikrosomen (Tab. 29), NADPH (1 mM) und ggf. dem in DMSO gelösten Inhibitor in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7.4; 3 mM Magnesiumchlorid) bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden zunächst für 5 min auf 37 °C vorgewärmt und anschließend die Reaktion durch Zugabe von NADPH gestartet und ein Gesamtvolumen von 300 μ l erhalten. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde das Protein mit 150 μ l eiskalter MeOH/ZnSO₄-Lösung, die den internen Standard (Tab. 29) enthielt, gefällt. Die Proben wurden mit 12000 x g für 6 min zentrifugiert und jeweils etwa 400 μ l des Überstandes in ein HPLC-Vial überführt. Die Inkubationsbedingungen für die einzelnen Substrate sind in Tab. 29 angegeben.

LC/LC/Fluoreszenzanalyse

75 μ l des Inkubationsansatzes wurden in das HPLC-System mit automatischer Online-Festphasenextraktion (s. V.1.1.2) auf die Extraktionssäule (Zorbax SB-C18; 12.5 x 4.6 mm; 5 μ m) injiziert. Das Ladefließmittel bestand aus 0.1 % Trifluoressigsäure mit 10 mM Ammoniumacetat in Wasser (A1) und Methanol (B1). Die automatische Festphasenextraktion wurde mit einer gleichbleibenden

Fließmittelzusammensetzung (Tab. 30) und einer Flussrate von 3 ml/min durchgeführt. Nach 2 min wurde das Schaltventil umgeschaltet, wodurch die Extraktionssäule mit der Chromatographiesäule (Phenomenex Gemini C18; 100 x 4.6 mm; 5 µm) verbunden wurde und die Analyten von der Extraktionssäule auf die analytische Säule im Backflush-Modus gelangten. Als Chromatographiefließmittel wurde 0.1 % Ameisensäure in Wasser (A2) und Methanol (B2) verwendet. Die chromatographische Trennung erfolgte mit Hilfe eines Fließmittelgradienten (Tab. 30) und einer Flussrate von 1.5 ml/min in 6 min. Die Extraktionssäule und die Chromatographiesäule wurden auf 30 °C temperiert. Die verwendeten Anregungs-, Emissionswellenlängen und die Einstellungen der Photomultiplier-Tube-Spannung (PMT-Gain) der einzelnen Assays sowie die Retentionszeiten der Analyten sind in Tab. 30 aufgelistet.

LC/MS/MS-Analyse

Zur LC/MS/MS-Detektion (Tab. 30) der entstandenen Metaboliten wurden 10 µl des Inkubationsansatzes in das LC/MS/MS-System mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer und einer Elektrospray-Ionenquelle (ESI) auf eine Synergi Max-RP Säule (50 x 2.0 mm; 4 µm) injiziert. Als Fließmittel wurde 10 mM Ammoniumacetat mit 0.1 % Ameisensäure in Wasser (A) und Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure (B) verwendet. Es wurde eine Gradientenelution (Tab. 30) innerhalb von 4 min mit einer Flussrate von 0.6 ml/min durchgeführt. 1.5 min nach der Probeninjektion wurde das Eluat in das Massenspektrometer geleitet (valve to MS). Die Analyse erfolgte im positiven MRM-Modus. Die detektierten Quantifizier-Übergänge der Metaboliten und der internen Standards sind in Tab. 30 angegeben. Stickstoff wurde zur Verneblung des Eluates (Druck 45 psi), als Trocknungsgas (Flussrate 8 l/min, Temperatur 300 °C), als Sheathgas (Flussrate 10 l/min, Temperatur 250 °C) und als Kollisionsgas (Flussrate 1 ml/min) verwendet. Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V und die Nozzle-Voltage 500 V. Nach dem Chromatographie-Lauf wurde das Schaltventil am Massenspektrometer umgeschaltet, wodurch das Eluat unter Umgehung der Ionenquelle direkt in den Fließmittelabfall geleitet wurde (valve to waste). Nun wurde die Säule mit 100 % B gereinigt (Flussrate: 0.6 ml/min; Zeit: 2 min) und für die Analyse der nächsten Probe mit der ursprünglichen Fließmittelzusammensetzung zu Beginn des Gradienten (Tab. 30) reäquilibriert (Flussrate: 0.6 ml/min; Zeit: 3 min).

Tab. 29 Inkubationsbedingungen der CYP-Inhibitionsassays mit den Harman-Derivaten als Substrate für die einzelnen CYP-Enzyme. 2-Benzyl-7-benzylxyharman (BBH), 2-Benzyl-7-hydroxyharman (BHH), 2-Benzyl-7-methoxyharman (BMH), 7-Hydroxy-9-(4-carboxybenzyl)harman (HCBH), 7-Methoxy-9-(4-carboxybenzyl)harman (MCBH), 2-Methyl-7-hydroxyharman (MHH), 2-Methyl-7-methoxyharman (MMH).

	CYP1A2-Assay		CYP2C-Assay		CYP2D6-Assay		CYP3A4-Assay	
	Harmin-7-demethylierung	BMH-7-demethylierung	MCBH-7-demethylierung	MMH-7-demethylierung	BBH-7-demethylierung			
Inkubationsansatz	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
Substratkonzentration	2.5 µM (CYP1A2) 75 µM (CYP2C9) 50 µM (CYP2C19) 5 µM (CYP2D6)	3.5 µM (CYP1A2)	20 µM (CYP2C8) 7.5 µM (CYP2C9) 25 µM (CYP2C19)	7.5 µM (CYP2D6) 40 µM (HLM)	1.5 µM (CYP3A4)			
Proteinkonzentration	3 pmol/ml CYP1A2 2 pmol/ml CYP2C9 1 pmol/ml CYP2C19 1.5 pmol/ml CYP2D6	5 pmol/ml CYP1A2	15 pmol/ml CYP2C8 6 pmol/ml CYP2C9 2.5 pmol/ml CYP2C19	1 pmol/ml CYP2D6 0.05 mg/ml HLM	1.5 pmol/ml CYP3A4			
NADPH-Konzentration	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM			
Metabolit	Harmol	BHH	HCBH	MHH	BHH			
Interner Standard (IS)	BMH	Harmin	Harmol	BMH	BMH			
IS-Konzentration final	25 ng/ml	25 ng/ml	25 ng/ml	25 ng/ml	25 ng/ml			25 ng/ml
Vorwärmen	5 min, 37 °C	5 min, 37 °C	5 min, 37 °C	5 min, 37 °C	5 min, 37 °C			5 min, 37 °C
Inkubation	30 min, 37 °C	30 min, 37 °C	30 min, 37 °C	30 min, 37 °C	30 min, 37 °C			30 min, 37 °C
Quenching	150 µl MeOH/ZnSO ₄	150 µl MeOH/ZnSO ₄	150 µl MeOH/ZnSO ₄	150 µl MeOH/ZnSO ₄	150 µl MeOH/ZnSO ₄			150 µl MeOH/ZnSO ₄

2.6 Biotoxifizierung

2.6.1 Synthese von markierten Glutathion-Derivaten

2.6.1.1 N-dansyliertes Glutathion (dGSH)

Zur Fluoreszenzmarkierung der freien Aminogruppe der Glutaminsäure des Glutathions mit einer 5-(Dimethylamino)naphthalin-1-sulfonylgruppe (Dansyl-Gruppe) wurden 254 mg Dansylchlorid (0.94 mmol) in 20 ml DMF und 288 mg oxidiertes Glutathion (GSSG; 0.47 mmol; 1 Äquivalent) in 10 ml 1 M Triethylaminlösung gelöst. Die GSSG-Lösung wurde nun langsam in die Dansylchloridlösung getropft. Das Gemisch wurde 30 min im Wasserbad bei 30 °C zur Reaktion gebracht und alle 5 min geschüttelt. Anschließend wurden jeweils 2.5 ml des Reaktionsgemisches in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal mit 7.5 ml Diethylether ausgeschüttelt. Nach dem Zentrifugieren wurde die Etherphase verworfen und in jedes Zentrifugenröhrchen 2.5 ml 50%iger Methanol gegeben. Es wurde eine Probe für die massenspektrometrische Reaktionskontrolle entnommen (s. V.1.1.3). Zur Reduktion des Disulfids wurden 145 mg (0.94 mmol; 2 Äquivalente) Dithiothreitol in den Reaktionsansatz gegeben und die Lösung 30 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichen Umschütteln stehengelassen. Auch hier wurde eine massenspektrometrische Kontrolluntersuchung vorgenommen. Das Reaktionsgemisch wurde mit 25%iger Essigsäure auf pH 4 eingestellt und nach dem Zentrifugieren durch semipräparative HPLC aufgereinigt (s. V.1.1.5). Hierfür wurden 900 µl des Reaktionsansatzes auf eine Zorbax SB-C18-Säule (150 x 9.4 mm; 5 µm) injiziert. Die mobile Phase bestand aus 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Acetonitril mit 0.05 % Trifluoressigsäure (B). Es wurde eine isokratische Fließmittelzusammensetzung von 20 % B mit einer Flussrate von 5 ml/min verwendet. Die Wellenlänge für die UV-Detektion betrug 290 nm. Von 5.8 bis 7.0 min wurde das Eluat mit dem reduzierten dansylierten Glutathion (dGSH) aufgefangen. Die Entfernung des Wassers aus dem gesammelten Eluat (ca. 400 ml) erfolgte mit Hilfe einer RP-Festphasenextraktion (Isolute C18, 5 g). Zunächst wurde das Eluat mit demineralisiertem Wasser auf 2.5 l verdünnt, um die Acetonitrilkonzentration herabzusetzen. Für die Konditionierung der Extraktionssäule wurden 30 ml Acetonitril und 30 ml 5%iger Acetonitril, der 0.05 % Trifluoressigsäure enthielt, verwendet. Anschließend wurde die Extraktionssäule mit 0.5 - 1 l des verdünnten Eluats geladen

(Flussrate ca. 5 ml/min) und es wurde mit 10 ml 5%igen Acetonitril nachgewaschen. Auf das Trocknen des Säulenmaterials wurde aufgrund der Oxidationsempfindlichkeit des Syntheseproduktes verzichtet. Mit 30 ml Acetonitril wurde die Substanz vom Säulenmaterial eluiert und das Lösungsmittel im Probenkonzentrator mit Stickstoff bei 40 °C entfernt. Da kein kristallines Produkt entstand, wurde zusätzlich eine Gefriertrocknung durchgeführt. Auf die Substanz wurden ca. 10 ml entmineralisiertes Wasser gegeben und die Probe in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Trocknung erfolgte mit Hilfe der Gefriertrocknungsanlage ALPHA 1-4 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland) für ca. 2 Tage. Schließlich konnten 244 mg hellgelbes dGSH gewonnen werden (Ausbeute 48 %).

2.6.1.2 β -Carbolin-markiertes Glutathion (β C-GSH)

β -Carbolin-3-carbonsäure (β CC)

Zunächst wurde die β -Carbolin-3-carbonsäure (β CC) aus dem kommerziell erworbenen β -Carbolin-3-carbonsäureethylester (β CCE) durch Hydrolyse gewonnen. Hierfür wurden 150 mg β CCE (0.62 mmol) in 12 ml THF gelöst und 4 ml einer 1 M Lithiumhydroxidlösung in Wasser (2.5 mmol; 4 Äquivalente) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 3 Tage bei Raumtemperatur gerührt und danach das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde in 5 ml Methanol gelöst und 10 ml Wasser hinzugegeben. Die entstandene β CC wurde durch Ansäuern mit 50%iger Trifluoressigsäure als gelber Niederschlag ausgefällt und abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde zweimal mit je 2 ml 0.05%iger Trifluoressigsäure in Wasser gewaschen und anschließend 3 ml Aceton hinzugegeben. Im Probenkonzentrator wurde das Lösungsmittel mit Druckluft entfernt und 89 mg β CC als gelbes Pulver erhalten (Ausbeute 67 %).

β -Carbolin-3-carbonsäure-*N*-hydroxysuccinimidester (β CC-NHS)

75 mg β CC (0.35 mmol) und 45 mg *N*-Hydroxysuccinimid (0.39 mmol; 1.1 Äquivalente) wurden in etwa 5-10 ml trockenem DMF gelöst. Es wurden 95 mg *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC; 0.46 mmol; 1.3 Äquivalente) zugegeben und der Reaktionsansatz unter Argongas bei Raumtemperatur für 2 Tage gerührt. Der entstandene Dicyclohexylharnstoff wurde abzentrifugiert und die erhaltene Lösung direkt mit oxidiertem Glutathion umgesetzt (s. u.).

β -Carbolin-3-carbonyliertes oxidiertes Glutathion ((β C)₂-GSSG)

95 mg oxidiertes Glutathion wurden in 8 ml eines Kaliumphosphatpuffers (100 mM; pH 7.4) gelöst und in den Reaktionsansatz mit dem erhaltenen Aktivester der β -Carbolin-3-carbonsäure (β CC-NHS; s. o.) gegeben. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht im Eisbad gerührt und anschließend mit Hilfe des Rotationsverdampfers bis zur Trockene eingengt. Der erhaltene Rückstand wurde in etwa 6 ml Methanol gelöst und ca. 8 ml Wasser hinzugegeben. Mit 10%iger Trifluoressigsäure wurde ein pH-Wert von etwa 5-6 eingestellt. Zur Isolierung des β -carbolin-3-carbonylierten oxidierten Glutathion ((β C)₂-GSSG) mit Hilfe der semipräparativen HPLC wurden jeweils 500 μ l der Lösung auf eine Zorbax SB-C18-Säule (150 x 9.4 mm; 5 μ m) injiziert. Das Fließmittel bestand aus 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Methanol (B). Es wurde eine gleichbleibende Fließmittelzusammensetzung von 45 % B und eine Flussrate von 4 ml/min verwendet. Die UV-Detektion erfolgte bei 220 und 280 nm. Das Eluat mit dem (β C)₂-GSSG wurde von 10.6 bis 12.1 min aufgefangen. Das Lösungsmittel der bei den einzelnen Läufen gesammelten Fraktionen wurde mit Hilfe des Probenkonzentrators mit Druckluft bis zur Trockene eingengt und 90 mg (β C)₂-GSSG erhalten (Ausbeute 51 %).

 β -Carbolin-3-carbonyliertes reduziertes Glutathion (β C-GSH)

75 mg des synthetisierten und gereinigten (β C)₂-GSSG (0.075 mmol) wurden in 5 ml Methanol und 5 ml Kaliumboratpuffer (100 mM; pH 9.0) gelöst. Zur Reduktion wurden etwa 20 mg Dithiothreitol (ca. 2 Äquivalente), gelöst in 1 ml Wasser, hinzugegeben. Nach 10 min wurde der Reaktionsansatz mit 10%iger Trifluoressigsäure auf einen pH-Wert von etwa 2 eingestellt und die Lösung durch einen 0.22 μ m Spritzenfilter filtriert. 750 μ l des Reaktionsansatzes wurden auf eine Zorbax SB-C18-Säule (150 x 9.4 mm; 5 μ m) injiziert. Das Fließmittel bestand aus 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Acetonitril mit 0.05 % Trifluoressigsäure (B). Für die chromatographische Trennung wurde eine isokratische Fließmittelzusammensetzung von 15 % B mit einer Flussrate von 4 ml/min verwendet. Die UV-Detektion erfolgte bei 220 und 280 nm. Von 14.9 bis 16.8 min wurde das Eluat mit dem β C-GSH aufgefangen. Anschließend wurde die Säule mit 100 % B für 3 min gespült und vor der nächsten Injektion mit 15 % B für 3 min reäquilibriert. Zur Entfernung des Acetonitrils aus dem Eluat wurden die vereinigten Fraktionen der

einzelnen Läufe am Rotationsverdampfer eingengt. Anschließend wurde die Lösung im Tiefkühlschrank bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und anschließend für 2 Tage gefriergetrocknet. Es wurden 37 mg $\beta\text{C-GSH}$ als hellgelbes Pulver erhalten (Ausbeute 25 %, berechnet auf die eingesetzte βCC).

2.6.1.3 N-Fluorenylmethoxycarbonyliertes Glutathion (FMOC-GSH)

Für die Markierung der freien Aminofunktion der Glutaminsäure des Glutathions mit einer Fluorenylmethoxycarbonyl-Gruppe (FMOC) wurden 42 mg 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (FMOC-Cl; 0.16 mmol) in 7 ml Acetonitril gelöst. In diese Lösung wurden 50 mg oxidiertes Glutathion (0.08 mmol), das zuvor in 7 ml eines Kaliumboratpuffers (100 mM; pH 9.0) gelöst wurde, hinzugegeben und der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur für 15 min stehengelassen. Dann wurde der pH-Wert der Lösung mit 1 M Kaliumhydroxidlösung auf 10 eingestellt und zur Reduktion des Disulfids 25 mg Dithiothreitol, gelöst in 1 ml Wasser, hinzugefügt. Nach 5 min Reaktionszeit wurde die Lösung mit 50%iger Trifluoressigsäure auf einen pH-Wert von 5-6 eingestellt. Der Acetonitril-Gehalt des Reaktionsansatzes wurde durch Zugabe von Wasser auf ca. 35 % erniedrigt und die Lösung durch einen $0.22\text{ }\mu\text{m}$ Spritzenfilter filtriert. Zur Isolierung des reduzierten markierten Glutathions (FMOC-GSH) mittels semipräparativer HPLC mit UV-Detektion bei 220 und 265 nm wurden $900\text{ }\mu\text{l}$ des Reaktionsansatzes auf eine Zorbax SB-C18-Säule (150 x 9.4 mm; $5\text{ }\mu\text{m}$) injiziert. Die mobile Phase bestand aus 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Methanol (B). Es wurde eine gleichbleibende Fließmittelzusammensetzung von 60 % B mit einer Flussrate von 4 ml/min verwendet. Das Eluat im Retentionszeitenbereich von 8.5 bis 9.4 min, das das Reaktionsprodukt enthielt, wurde von jedem Lauf aufgefangen. Bei der Loop-MS-Analyse des gesammelten Eluates im positiven Modus wurde ein m/z -Wert von 530 des reduzierten fluorenylmethoxycarbonylmarkierten Glutathions detektiert. Anschließend wurde der in der gesammelten Lösung vorhandene Acetonitril mit Hilfe eines Rotationsverdampfers entfernt. Die übriggebliebene wässrige Lösung wurde im Gefrierschrank bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und etwa 2 Tage gefriergetrocknet. Es wurden etwa 18 mg FMOC-GSH als weißes Pulver erhalten (Ausbeute 21 %).

2.6.1.4 N-biotinyliertes Glutathion (Bio-GSH)

Biotin-N-hydroxysuccinimidester (NHS-Biotin)

500 mg Biotin (2.05 mmol) und 236 mg *N*-Hydroxysuccinimid (NHS; 2.05 mmol; 1 Äquivalent) wurden in etwa 40 ml trockenem DMF gelöst. In diese Lösung wurden 549 mg *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC; 2.66 mmol; 1.3 Äquivalente) gegeben und der Reaktionsansatz unter Argonatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionskontrolle wurde mit Hilfe der HPLC/UV-Analyse bei 220 nm durchgeführt. Hierzu wurden 20 µl des Reaktionsansatzes in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und im Probenkonzentrator bis zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde in 500 µl Methanol gelöst und 500 µl Wasser hinzugefügt. 25 µl dieser Lösung wurden auf eine Synergi Hydro-RP-Säule (150 x 4.6 mm; 4 µm) injiziert. Das Fließmittel bestand aus 0.1 % Ameisensäure in Wasser (A) und Acetonitril mit 0.1% Ameisensäure (B). Es wurde ein Fließmittelgradient von 10 - 60 % B in 10 min mit einer Flussrate von 1 ml/min angewendet. Mit fortschreitender Reaktion verschwand der Biotinpeak (Retentionszeit 5.6 min) und es konnte ein neuer Peak mit einer Retentionszeit von 7.2 min detektiert werden (NHS-Biotin). Nach 2 Tagen Reaktionszeit wurde der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und die Lösung am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt.

Biotinylierung und Reduktion

Zur Biotinylierung von Glutathion wurden 269 mg oxidiertes Glutathion (GSSG; 0.44 mmol) in 15 ml Kaliumphosphatpuffer (250 mM; pH 8.0) gelöst und 15 ml DMF hinzugefügt. In diese Lösung wurden 280 mg des hergestellten NHS-Biotins (0.82 mmol; 2 Äquivalente), gelöst in 15 ml DMF, gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht im Eisbad gerührt. Die Reaktionskontrolle erfolgte wie bei der Synthese des NHS-Biotins (s. o). Hierfür wurde der Reaktionsansatz 1:50 mit 50%igem Methanol verdünnt. Es konnten zwei neue Peaks, bei denen es sich wahrscheinlich um das monobiotinylierte oxidierte Glutathion (Bio-GSSG; Retentionszeit 4.1 min) und das dibiotinylierte oxidierte Glutathion ((Bio)₂-GSSG; Retentionszeit 5.5 min) handelte, detektiert werden. Im Reaktionsansatz war kein NHS-Biotin (Retentionszeit 7.2 min) mehr vorhanden. Die ausgefallenen Puffersalze wurden abzentrifugiert und der Überstand im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt. 400 mg der erhaltenen Substanz mit dem biotinylierten oxidierten

Glutathion wurden in 30 ml eines Kaliumboratpuffers (100 mM; pH 9.5) und 10 ml Methanol gelöst. Es wurden 120 mg Dithiothreitol (DTT), das zuvor in 2 ml Wasser gelöst wurde, hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur für 15 min stengelassen. Die Retentionszeit des entstandenen biotinylierten Glutathions (Bio-GSH) bei der HPLC/UV-Analyse betrug 4.8 min. Anschließend wurde die Lösung mit 10%iger Trifluoressigsäure auf einen pH-Wert von etwa 2 angesäuert und durch einen 0.22 µm Spritzenfilter filtriert. Zur Isolierung des Bio-GSH mittels semipräparativer HPLC (s. V.1.1.5) mit UV-Detektion bei 220 nm wurden 1800 µl des Reaktionsansatzes auf eine Zorbax SB-C18 Säule (150 x 9.4 mm; 5 µm) injiziert. Als Fließmittel wurde 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Acetonitril mit 0.05 % Trifluoressigsäure (B) verwendet. Es wurde eine isokratische Fließmittelzusammensetzung von 12.5 % B mit einer Flussrate von 4 ml/min gewählt und das Eluat mit dem Bio-GSH von 8.1 bis 9.6 min aufgefangen. Mit der aufgefangenen Fraktion wurde eine Loop-MS-Analyse im positiven Modus durchgeführt und ein *m/z*-Wert von 534 erhalten, der mit dem für das biotinylierte Glutathion berechneten Wert übereinstimmt. Der Acetonitrilanteil des Eluats wurde mit Hilfe des Rotationsverdampfers entfernt. Die übriggebliebene wässrige Lösung wurde über Nacht im Gefrierschrank bei -80 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Nach 2 Tagen Gefriertrocknung wurden 171 mg Bio-GSH als feines weißes Pulver erhalten.

2.6.2 LC/MS/MS-basierte Screening-Methode auf reaktive Metaboliten

Inkubation

Der zu testende Arzneistoff (50 µM), gelöst in DMSO, wurde mit humanen Lebermikrosomen (1 mg/ml), NADPH (1 mM) und Glutathion (1 mM) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM Magnesiumchlorid; pH 7.4) bei 37 °C in einem Gesamtvolumen von 200 µl inkubiert. Nach 60 min Inkubation wurden 200 µl eiskalte MeOH/ZnSO₄-Lösung hinzugegeben und das gefällte Protein durch Zentrifugation bei 12000 x g für 6 min abgetrennt. Etwa 350 µl des klaren Überstandes wurden in ein Vial überführt und mit Hilfe einer LC/MS/MS-Analyse untersucht.

LC/Triple-Quadrupol-Analyse (Neutral-Loss-Experiment)

25 µl des Inkubationsansatzes wurden in das LC/MS-System mit angeschlossenen Triple-Quadrupol-Detektor (s. V.1.1.3) auf eine Synergi Max-RP-Säule (150 x 4.6 mm; 4 µm) injiziert. Das Fließmittel bestand aus 0.1 % Ameisensäure in Wasser (A) und Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure (B). Es wurde der in der untenstehenden Tabelle angegebene Fließmittelgradient angewendet. Die massenspektrometrische Detektion erfolgte im Neutral-Loss-Modus mit positiver Polarität, wobei ein Neutralverlust von 129 Da im Scanbereich von 320 bis 1200 Da detektiert wurde. Die Fragmentorspannung betrug 135 V und als Kollisionsenergie wurden 12 eV eingestellt. Stickstoff wurde zur Verneblung des Eluates (Druck 45 psi), als Trocknungsgas (Flussrate 10 l/min, Temperatur 300 °C), als Sheathgas (Flussrate 11 l/min, Temperatur 300 °C) und als Kollisionsgas (Flussrate 1 ml/min) verwendet. Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V und als Nozzle-Voltage wurden 500 V eingestellt.

Zeit [min]	Fließmittel (% B)	Flussrate [ml/min]
0.00	5.0	0.8
2.00	5.0	0.8
20.00	50.0	0.8
30.00	100.0	0.8
33.00	100.0	0.8
33.01	5.0	1.0
38.00	5.0	1.0

2.6.3 Assay zur Biotoxifizierung von Paracetamol

Für die kinetischen Untersuchungen zur Giftung von Paracetamol wurde der Arzneistoff in der jeweils angegebenen Konzentration mit Glutathion (1 mM), NADPH (1 mM) und humanen Lebermikrosomen (0.025 mg/ml) bzw. rekombinanten CYP-Enzymen (5 pmol/ml) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM Magnesiumchlorid, pH 7.4) bei 37 °C für 30 min in einem Volumen von 300 µl inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 µl eiskalter MeOH/ZnSO₄-Lösung, die 150 ng/ml 4-Chinolinyl-*N*-oxid-*S*-glutathion (QNO-SG) als internen Standard enthielt, abgestoppt. Nach der Zentrifugation bei 12000 x g für

6 min wurden etwa 400 µl des Überstandes zur LC/MS/MS-Analyse (s. V.1.1.3) in ein Vial überführt. 10 µl des Inkubationsansatzes wurden auf eine Synergi Max-RP-Säule (75 x 4.6 mm; 4 µm) injiziert, die auf 30 °C temperiert war. Als Fließmittel wurden 0.1 % Ameisensäure in Wasser (A) und Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure (B) verwendet. Der Fließmittelgradient bestand aus 5 - 20 % B in 6 min mit einer Flussrate von 0.8 ml/min. Die LC/MS/MS-Analyse wurde im positiven MRM-Modus durchgeführt. Hierfür wurde 2.5 min nach der Injektion das Eluat in das Massenspektrometer geleitet (valve to MS) und für das entstandene Glutathion-Addukt des Paracetamols (Retentionszeit 4.0 min) und dem internen Standard (Retentionszeit 5.0 min) je ein Qualifier- (q) und ein Quantifierübergang (Q) detektiert (Tab. 31). Nach 6 min wurde das Ventil wieder umgeschaltet (valve to waste). Anschließend wurde die Säule mit 100 % B für 3 min gespült und dann mit 5 % B für 5 min reäquilibriert. Stickstoff wurde zur Verneblung des Eluates (Druck 45 psi), als Trocknungsgas (Flussrate 8 l/min, Temperatur 300 °C), als Sheathgas (Flussrate 10 l/min, Temperatur 350 °C) und als Kollisionsgas (Flussrate 1 ml/min) verwendet. Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V und die Nozzle-Voltage 500 V.

Tab. 31 Parameter des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers zur Detektion des Glutathion-Adduktes von Paracetamol und des internen Standards (QNO-SG). Zeitsegment (TS), Ventilstellung (Valve), Elektronenmultiplierspannung (Delta EMV), Precursor-Ion (Prec Ion), Produkt-Ion (Prod Ion), Fragmentorspannung (Frag), Kollisionsenergie (CE), Ionenanalysenzeit (Dwell time), Qualifierübergang (q), Quantifierübergang (Q).

TS	Zeit [min]	Valve	Delta EMV [V]	Compound	Prec Ion (m/z)	Prod Ion (m/z)	Frag [V]	CE [eV]	Dwell time [ms]
1	0.0	to waste	-	-	-	-	-	-	-
2	2.5	to MS	500	Paracetamol-SG	457	328 (Q)	135	12	50
					457	130 (q)	135	25	50
					451	178 (Q)	150	25	50
					451	145 (q)	150	21	50
3	6.0	to waste	-	-	-	-	-	-	

2.6.4 Assay zur Biotoxifizierung von Clozapin

Zur Untersuchung der Biotoxifizierung von Clozapin wurde der Arzneistoff in der jeweils angegebenen Konzentration mit humanen Lebermikrosomen (0.025 mg/ml) bzw. rekombinanten CYP-Enzymen (5 pmol/ml) und Glutathion (1 mM) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer (3 mM Magnesiumchlorid; pH 7.4) zusammengegeben. Nach dem Vorwärmen der Proben bei 37 °C für 5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von NADPH (1 mM) gestartet. Das Gesamtvolumen des Inkubationsansatzes betrug 300 µl. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit 150 µl eiskalter MeOH/ZnSO₄-Lösung, die 300 ng/ml des Etacrynsäure-Glutathion-Konjugates (EA-SG) als internen Standard enthielt, abgestoppt. Das gefällte Protein wurde durch Zentrifugation bei 12000 x g für 6 min abgetrennt und jeweils etwa 400 µl des Überstandes in ein HPLC-Vial überführt. Zur LC/MS/MS-Detektion (s. V.1.1.3) wurden 10 µl des Inkubationsansatzes auf eine Synergi Max-RP-Säule (50 x 2.0 mm; 4 µm) injiziert, die auf 30 °C temperiert war. Das Fließmittel bestand aus 0.1 % Ameisensäure in Wasser (A) und Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure. Es wurde ein Gradient von 10 - 50 % B in 4 min mit einer Flussrate von 0.6 ml/min angewendet. 1.5 min nach der Injektion wurde das Eluat in das Massenspektrometer geleitet (valve to MS) und das entstandene Glutathion-Addukt von Clozapin mit der höchsten Intensität bei einer Retentionszeit von 2.3 min und der interne Standard bei einer Retentionszeit von 3.5 min im MRM-Modus mit positiver Polarität detektiert. Für jeden Analyten wurden ein Qualifier- (q) und ein Quantifizierübergang (Q) aufgezeichnet (Tab. 32). Stickstoff wurde zur Verneblung des Eluates (Druck 45 psi), als Trocknungsgas (Flussrate 8 l/min, Temperatur 300 °C), als Sheathgas (Flussrate 10 l/min, Temperatur 350 °C) und als Kollisionsgas (Flussrate 1 ml/min) verwendet. Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V und die Nozzle-Voltage 500 V. Nach der Analysenzeit von 4 min wurde das Ventil wieder umgeschaltet (valve to waste). Nun wurde die Säule mit 100 % B für 2 min gespült und anschließend mit der Fließmittelzusammensetzung, die zu Beginn des Chromatographielaufes vorlag, für 4 min reäquilibriert.

Tab. 32 Parameter des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers zur Detektion des Glutathion-Adduktes von Clozapin mit der höchsten Intensität und des internen Standards (EA-SG). Zeitsegment (TS), Ventilstellung (Valve), Elektronenmultiplierspannung (Delta EMV), Precursor-Ion (Prec Ion), Produkt-Ion (Prod Ion), Fragmentorspannung (Frag), Kollisionsenergie (CE), Ionenanalysenzeit (Dwell time), Qualifizierübergang (q), Quantifizierübergang (Q).

TS	Zeit [min]	Valve	Delta EMV [V]	Compound	Prec Ion (m/z)	Prod Ion (m/z)	Frag [V]	CE [eV]	Dwell time [ms]
1	0.0	to waste	-	-	-	-	-	-	-
2	1.5	to MS	400	Clozapin-SG	632	302 (Q)	275	51	50
					632	503 (q)	275	25	50
					610	335 (Q)	150	25	50
					610	481 (q)	150	13	50
EA-SG (IS)	610	335 (Q)	150	25	50				
3	6.0	to waste	-	-	-	-	-	-	

2.7 Glutathion-S-Transferasen

2.7.1 Synthese und Reinigung von Glutathion-Konjugaten

2,4-Dinitrophenyl-S-glutathion (DNP-SG)

Zur Synthese des Metaboliten 2,4-Dinitrophenyl-S-glutathion (DNP-SG) wurden 107 mg 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (0.53 mmol), gelöst in 2.5 ml DMSO, und 325 mg Glutathion (GSH; 1.06 mmol; 2 Äquivalente) in 200 ml eines Kaliumphosphatpuffers (20 mM; pH 7.4) zusammengegeben. Die Reaktion erfolgte im Wasserbad bei 40 °C für 4 h und anschließend wurde eine Reaktionskontrolle durch HPLC/UV-Analyse durchgeführt (s. u.). Zur Extraktion des restlichen Eduktes wurde der Reaktionsansatz dreimal mit je 50 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die erhaltene wässrige Phase wurde am Rotationsverdampfer bei 200 mbar für 10 min behandelt, wobei der verbliebene Diethylether entfernt wurde. Vor der Isolierung von DNP-SG durch eine Festphasenextraktion wurde die Lösung durch Zugabe von Trifluoressigsäure auf einen pH-Wert von etwa 2 angesäuert. Die Konditionierung der Extraktionssäule (Isolute C18; 5 g) erfolgte mit 20 ml Methanol und 50 ml 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser. Anschließend wurde die Säule mit etwa 50 ml des angesäuerten Reaktionsansatzes geladen und es wurde mit 5%igem Methanol (50 ml), der 0.05 % Trifluoressigsäure enthielt, nachgespült. Dann wurde das Säulenmaterial mit Hilfe der angeschlossenen Wasserstrahlpumpe 10 min lang getrocknet. Die Elution von DNP-SG wurde mit 60%igem Methanol (50 ml)

durchgeführt. Für die Beladung mit dem nächsten Teil des Reaktionsansatzes wurde die Extraktionssäule mit ausreichend Methanol gereinigt. Die vereinigten Eluate wurden mit Hilfe eines Rotationsverdampfers bis zur Trockene eingeeengt und die erhaltenen Kristalle im Exsikkator über Phosphorpentoxid bis zur Massekonstanz getrocknet. Es wurden 150 mg DNP-SG als gelblicher Feststoff erhalten (Ausbeute 60 %).

4-Chinolinyl-*N*-oxid-*S*-glutathion (QNO-SG)

Zur Synthese von 4-Chinolinyl-*N*-oxid-*S*-glutathion (QNO-SG) wurden 50 mg 4-Nitrochinolin-*N*-oxid (NQO; 0.26 mmol) in 4 ml Methanol und 81 mg Glutathion (0.26 mmol; 1 Äquivalent) in einen Kaliumphosphatpuffer (250 mM; pH 7.4) gelöst. Das gelöste GSH wurde in die methanolische Lösung des NQO gegeben und im Wasserbad bei 40 °C für 2 h inkubiert. Es wurde eine Reaktionskontrolle mit Hilfe einer HPLC/UV-Analyse durchgeführt (s. u.). Anschließend wurde die Lösung mit 10%iger Trifluoressigsäure auf einen pH-Wert von etwa 2 angesäuert. Der Methanolgehalt der Lösung wurde durch Zugabe von 3.5 ml Wasser auf etwa 30 % eingestellt. Zur Reinigung des Reaktionsproduktes mit Hilfe der semipräparativen HPLC (s. V.1.1.5) wurden 900 µl des filtrierten (Rotilabo[®]-Spritzenfilter PVDF; 0.22 µm; Carl Roth GmbH; Karlsruhe) Reaktionsansatzes auf eine Zorbax SB-C18-Säule (150 x 9.4 mm; 5 µm) injiziert. Als Fließmittel wurden 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Methanol (B) mit einer isokratischen Fließmittelzusammensetzung von 20 % B verwendet. Die Flussrate betrug 4 ml/min und die UV-Detektion erfolgte bei den Wellenlängen 220 und 355 nm. Von 9.4 bis 12 min wurde das Eluat mit dem Reaktionsprodukt der einzelnen Läufe gesammelt. Nach der Entfernung des Lösungsmittels durch Gefriertrocknung (s. u.) fiel das Reaktionsprodukt als hellgelbes Pulvers an (109 mg; Ausbeute 92 %).

2-Chlor-4-nitrophenyl-*S*-glutathion (CNP-SG)

Für die Synthese von 2-Chlor-4-nitrophenyl-*S*-glutathion (CNP-SG) wurden 50 mg 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol (DCNB; 0.26 mmol) in 9 ml Methanol und 120 mg Glutathion (GSH, 0.39 mmol, 1.5 Äquivalente) in 5 ml Kaliumboratpuffer (250 mM; pH 9.0) gelöst. In die DCNB-Lösung wurde dann die GSH-Lösung gegeben, dessen pH-Wert zuvor mit 5 M Kaliumhydroxidlösung auf etwa 9 bis 10 eingestellt wurde. Die Reaktion der Edukte erfolgte im Wasserbad bei 40 °C. Am zweiten Tag wurden

zusätzlich 40 mg GSH (0.13 mmol, 0.5 Äquivalente), gelöst in 500 µl Boratpuffer (250 mM; pH 9.0) und 1 ml Methanol, zugegeben. Jeden Tag wurde eine Reaktionskontrolle mit Hilfe einer HPLC/UV-Analyse (s. u.) durchgeführt. Nach 4 Tagen Reaktionszeit wurde die Lösung mit 50%iger Trifluoressigsäure auf ca. pH 2 gebracht und 6 ml Wasser hinzugefügt. Vor der Isolierung des Reaktionsproduktes mittels semipräparativer HPLC (s. V.1.1.5) wurde die Lösung durch einen 0.22 µm Spritzenfilter filtriert. Jeweils 900 µl des Reaktionsansatzes wurden auf eine Zorbax SB-C18-Säule (150 x 9.4 mm; 5 µm) injiziert. Das Fließmittel bestand aus 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Methanol (B). Für die chromatographische Trennung wurde eine gleichbleibende Fließmittelzusammensetzung von 45 % B mit einer Flussrate von 4 ml/min verwendet. Die Wellenlängen für die UV-Detektion betragen 220 und 340 nm. Es wurde von jeder Injektion die Fraktion von 6.0 bis 7.2 min, die das Reaktionsprodukt CNP-SG enthielt, aufgefangen. Zur Elution des restlichen Eduktes wurde die Säule anschließend mit 100 % B für 4 min gespült und mit einer Fließmittelzusammensetzung von 45 % B reäquilibriert. Nach der Gefriertrocknung (s. u.) der vereinigten Fraktionen wurden 51 mg CNP-SG als gelbliches Pulver erhalten (Ausbeute 42 %).

4-Nitrobenzyl-S-glutathion (NB-SG)

Für den Reaktionsansatz zur Synthese von 4-Nitrobenzyl-S-glutathion (NB-SG) wurden 50 mg 4-Nitrobenzylchlorid (NBCl; 0.29 mmol) in 8 ml Methanol und 135 mg Glutathion (GSH; 0.44 mmol; 1.5 Äquivalente) in 7 ml Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 8.0) gelöst. Der pH-Wert des Puffers wurde nach dem Lösen des Glutathions mit 5 M Kaliumhydroxidlösung wieder auf ca. 7-8 eingestellt. Das gelöste Glutathion wurde in die methanolische Lösung des NBCl gegeben und das Gemisch im Wasserbad bei 37 °C für 4 h zur Reaktion gebracht und anschließend die Probe mit Hilfe einer HPLC/UV-Analyse untersucht (s. u.). Nach dem Ansäuern mit 50%iger Trifluoressigsäure auf ca. pH 2 wurden 5 ml Wasser hinzugefügt und der Reaktionsansatz durch einen 0.22 µm Spritzenfilter filtriert. Anschließend wurde die Isolierung des Reaktionsproduktes durch semipräparative HPLC (s. V.1.1.5) mit UV-Detektion bei 220 und 275 nm durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 900 µl des Ansatzes auf eine Zorbax SB-C18-Säule (150 x 9.4 mm; 5 µm) injiziert. Die Zusammensetzung der mobilen Phase war 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Methanol (B). Die Chromatographie erfolgte mit einer isokratischen

Fließmittelzusammensetzung von 35 % B und einer Flussrate von 4 ml/min. Das zu isolierende Reaktionsprodukt eluierte bei einer Retentionszeit von 6.2 bis 7.2 min von der Säule. Zur Reinigung wurde die Säule mit 100 % B für 4 min gespült und anschließend mit 35 % B für 4 min reäquilibriert. Um 88 mg (Ausbeute 68 %) des Reaktionsproduktes als weißes Pulver zu erhalten, wurden die gesammelten Fraktionen der einzelnen Läufe gefriergetrocknet (s. u.).

Etacrynsäure-Glutathion-S-Konjugat (EA-SG)

Zur Herstellung des Etacrynsäure-Glutathion-S-Konjugates (EA-SG) wurden 50 mg Etacrynsäure (0.165 mmol) in 5 ml Methanol und 51 mg Glutathion (GSH; 0.166 mmol; 1 Äquivalent) in 5 ml Kaliumphosphatpuffer (250 mM; pH 7.4) gelöst. Anschließend wurde die GSH-Lösung der Etacrynsäurelösung zugefügt und der Ansatz im Wasserbad bei 40 °C für 2 h zur Reaktion gebracht. Es wurde eine Reaktionskontrolle mittels HPLC/UV-Analyse durchgeführt (s. u.). Danach wurde der Reaktionsansatz mit 10%iger Trifluoressigsäure auf etwa pH 2 angesäuert und durch einen 0.22 µm Spritzenfilter filtriert. Zur Isolierung von EA-SG mit Hilfe der semipräparativen HPLC (s. V.1.1.5) wurden 900 µl auf eine Zorbax SB-C18-Säule (150 x 9.4 mm; 5 µm) injiziert. Als Fließmittel wurde 0.05 % Trifluoressigsäure (A) und Methanol (B) mit einer isokratischen Fließmittelzusammensetzung von 50 % B und einer Flussrate von 4 ml/min verwendet. Von 7.2 bis 9.0 min wurde das Eluat aufgefangen. Anschließend wurde die Säule mit 100 % B für 4 min gespült und mit 50 % B 4 min lang reäquilibriert. Nach der Gefriertrocknung (s. u.) wurden 86 mg Produkt erhalten (Ausbeute 85 %).

Gefriertrocknung

Vor der Gefriertrocknung der gesammelten Eluate wurde zunächst der organische Lösungsmittelanteil am Rotationsverdampfer entfernt. Die erhaltenen Lösungen wurden im Gefrierschrank bei -80 °C über Nacht eingefroren und anschließend mit der Gefriertrocknungsanlage ALPHA 1-4 LD plus (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland) ca. 2 Tage lang getrocknet.

Reaktionskontrolle und Charakterisierung

Die Reaktionskontrolle der Ansätze erfolgte mit Hilfe einer HPLC/UV-Analyse (s. V.1.1.1). Hierzu wurde der Reaktionsansatz mit 50%igem Methanol (V/V) geeignet verdünnt und 10 µl dieser Lösung auf eine Zorbax SB-C18-Säule (150 x 4.6 mm; 5 µm) injiziert. Das Fließmittel bestand aus 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Methanol (B). Es wurde ein Fließmittelgradient von 40 - 100 % B in 12 min mit einer Flussrate von 1 ml/min angewendet. Zur UV-Detektion des jeweiligen Produktes und der Edukte wurden neben 220 nm zusätzlich die folgenden Wellenlängen eingestellt: 270 nm (EA-SG), 275 nm (NB-SG), 340 nm (DNP-SG; CNP-SG) und 355 nm (QNO-SG). Anhand der Peakflächen der Edukte und der Produkte konnte der Umsatz abgeschätzt werden.

Zur Charakterisierung der hergestellten Glutathion-Konjugate diente eine LC/ESI/MS-Analyse (s. V.1.1.3). Hierfür wurden die Stammlösungen der Substanzen (s. V.2.7.2) mit 50%igem Methanol auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt und im positiven Scan-Modus untersucht. Die erhaltenen *m/z*-Werte der detektierten $[M+H]^+$ -Ionen stimmten in allen Fällen mit den aus der Molmasse berechneten Werten überein.

2.7.2 Stammlösungen

Substrate

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten der Substrate der Glutathion-S-Transferasen und für die Inhibitionsuntersuchungen wurden Stammlösungen und Verdünnungsreihen von 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB), 4-Nitrochinolin-*N*-oxid (NQO), 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol (DCNB) und 4-Nitrobenzylchlorid (NBCl) in DMSO hergestellt. Die verwendeten Assay-Konzentrationen sind in der untenstehenden Tabelle angegeben.

Substrat	Assay-Konzentration	
	Substratsättigungskinetik	Inhibition
CDNB	2.5/10/25/50/100/250/500/750/1000 µM	200 µM
NQO	10/50/100/150/250/500/750/1000/1250/1500 µM	500 µM
DCNB	10/25/50/100/150/250/500/750 µM	500 µM
NBCl	10/25/50/100/150/250/500/750/1000 µM	250 µM

Metaboliten

Für die Quantifizierung der Metaboliten wurden für die Erstellung von Kalibriergeraden die in der untenstehenden Tabelle angegebenen Stammlösungen und Verdünnungsreihen der synthetisierten Glutathion-Konjugate 2,4-Dinitrophenyl-S-glutathion (DNP-SG), 4-Chinolinyl-*N*-oxid-S-glutathion (QNO-SG), 2-Chlor-4-nitrophenyl-S-glutathion (CNP-SG) und 4-Nitrobenzyl-S-glutathion (NB-SG) in DMSO angefertigt.

Metabolit	Stammlösung	Assay-Konzentration
DNP-SG	10 mg/ml	1/5/10/20/30/40/50/75/100 µg/ml
QNO-SG	10 mg/ml	1/5/10/25/50/75/100/125/150 µg/ml
CNP-SG	10 mg/ml	0.1/0.25/1/2.5/5/7.5/10 µg/ml
NB-SG	10 mg/ml	0.5/1/2.5/5/7.5/10/15/20/25/30 µg/ml

Inhibitoren

Zur Validierung der Inhibitionsassays wurden die IC₅₀-Werte literaturbekannter Inhibitoren von Glutathion-S-Transferasen bestimmt. Hierfür wurden Stammlösungen von Etacrynsäure, Hexachlorophen und dem synthetisierten Glutathionkonjugat der Etacrynsäure (EA-SG) in DMSO sowie von Ellagsäure in Boratpuffer pH 9.0 hergestellt. Die jeweilige Enzymrestaktivität wurde mit den in der untenstehenden Tabelle angegebenen Assay-Konzentrationen bestimmt.

Inhibitor	Stamm-lösung	Assay-Konzentration
Etacrynsäure	100 mM	0.0025/0.01/0.025/0.1/0.25/1/2.5/10/25/100/250/1000 µM
EA-SG	10 mM	0.0025/0.01/0.025/0.1/0.25/0.5/1/2.5/10/25/100 µM
Ellagsäure	25 mM	0.01/0.25/0.1/0.25/1/2.5/10/25/100/250 µM
Hexachlorophen	100 mM	0.0025/0.01/0.025/0.1/0.25/0.5/1/2.5/10/25/100/250/1000 µM

Pflanzenextrakte

Zum Screening von pflanzlichen Arzneidrogen auf Inhibition von Glutathion-S-Transferasen wurden Extrakte und Verdünnungen in 80%igem Methanol (V/V) hergestellt (s. V.2.1.1) und jeweils die Assay-Konzentrationen von 10, 50 und 250 µg/ml untersucht. Die Bestimmung der IC₅₀-Werte ausgewählter pflanzlicher

Arzneidrogen wurde mit Trockenextrakten (s. V.2.1.2), die in DMSO gelöst wurden, durchgeführt. Die hierbei untersuchten Assay-Konzentrationen waren 0.025, 0.1, 0.25, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 und 250 µg/ml.

2.7.3 In-vitro-Assays für Glutathion-S-Transferasen

Als Substrate für die GST-Assays wurden 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (CDNB-Assay), 4-Nitrochinolin-*N*-oxid (NQO-Assay), 1,2-Dichlor-4-nitrobenzol (DCNB-Assay) und 4-Nitrobenzylchlorid (NBCI-Assay) verwendet. Nach der Inkubation wurden die entstandenen Glutathion-Konjugate durch eine HPLC/UV-Analyse quantifiziert. Beim CDNB-Assay wurden ebenfalls eine LC/MS/MS-Analyse und eine photometrische Detektion in der Mikrotiterplatte für die Bestimmung eingesetzt.

Inkubation

Das Substrat (Tab. 33), humanes Lebercytosol (Konzentration s. Tab. 33) und der Inhibitor, gelöst in DMSO, bzw. der Pflanzenextrakt, gelöst in DMSO oder Methanol 80 % (V/V), wurden in einen 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 pipettiert. Der pH-Wert des Puffers für den DCNB-Assay betrug 7.4. Nach der Temperierung der Proben bei 25 °C bzw. für den DCNB-Assay bei 37 °C für 5 min wurde die Reaktion durch Zugabe von Glutathion (1 mM) gestartet. Das Gesamtvolumen des Inkubationsansatzes betrug 300 µl. Es wurden Blindproben ohne Protein zur Korrektur des nichtenzymatisch entstandenen Metaboliten und Kontrollproben ohne Inhibitor (100%ige Enzymaktivität) angefertigt. Nach der Inkubationszeit (Tab. 33) wurde die Reaktion mit 150 µl eiskalter MeOH/ZnSO₄-Lösung, die 0.3 % Wasserstoffperoxid enthielt, abgestoppt. Für den NBCI-Assay wurden der Stopplösung 6 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) als Oxidationsmittel zugegeben. Das gefällte Protein wurde durch Zentrifugation bei 12000 x g für 6 min abgetrennt. Jeweils 400 µl des Überstandes wurden in ein HPLC-Vial überführt. In Tab. 33 sind die Inkubationsbedingungen für die einzelnen Assays aufgelistet.

HPLC/UV-Analyse

Zur Quantifizierung der Glutathion-Konjugate (Tab. 33) wurden 50 bzw. 100 µl des Inkubationsansatzes in das HPLC/UV-System (s. V.1.1.1) mit einer Synergi Max-RP-

Tab. 33 Inkubationsbedingungen der Glutathion-S-Transferase-Assays und Parameter der HPLC/UV-Analysen zur Quantifizierung der entstandenen Metaboliten.

	CDNB-Assay	NQO-Assay	DCNB-Assay	NBCI-Assay
Inkubation				
Substrat	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol	4-Nitrochinolin-N-oxid	1,2-Dichlor-4-nitrobenzol	4-Nitrobenzylchlorid
Substratkonzentration	200 µM	500 µM	500 µM	250 µM
Metabolit	DNP-SG	QNO-SG	CNP-SG	NB-SG
GSH-Konzentration	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
Puffer pH-Wert	6.5	6.5	7.4	6.5
Proteinkonz. (HLC)	0.025 mg/ml	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.25 mg/ml
Inkubationszeit	5 min	5 min	30 min	10 min
Temperatur	25 °C	25 °C	37 °C	25 °C
HPLC/UV-Analyse				
Säule	Phenomenex Synergi Max-RP (150 x 4.6 mm; 4 µm)			
Fließmittel	0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) / Methanol mit 0.05 % Trifluoressigsäure (B)			
Flussrate	1.0 ml/min	1.0 ml/min	1.0 ml/min	1.0 ml/min
Injektionsvolumen	50 µl	50 µl	100 µl	100 µl
Gradient, % B (min)	40(0)→70(6)	25(0)→55(6)	45(0)→75(6)	35(0)→65(6)
R _t Metabolit	4.7 min	4.7 min	5.2 min	5.3 min
UV-Detektion	340 nm	355 nm	340 nm	275 nm

Säule (150 x 4.6 mm; 4 µm) injiziert. Die Säule wurde auf 30 °C temperiert. Als mobile Phase dienten 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Methanol mit 0.05 % Trifluoressigsäure (B). Die chromatographische Trennung erfolgt mit Hilfe eines Fließmittelgradienten (Tab. 33) innerhalb von 6 min und einer Flussrate von 1.0 ml/min. Anschließend wurde die Säule mit 100 % B für 4 min gespült und danach für 2.5 min mit der ursprünglichen Fließmittelzusammensetzung reäquilibriert (Flussrate 1.0 ml/min). Die Detektionswellenlängen und die Retentionszeiten für die einzelnen Metaboliten sind in Tab. 33 angegeben.

LC/MS/MS-Analyse von DNP-SG

Erfolgte die Quantifizierung des Metaboliten 2,4-Dinitrophenyl-S-glutathion (DNP-SG) mittels LC/MS/MS-Analyse, wurde den Proben der interne Standard 4-Chinolinyl-N-oxid-S-glutathion (QNO-SG, 10 µg/ml) mit der Stopplösung zugesetzt. 2 µl des Inkubationsansatzes wurden in das LC/MS/MS-System mit angeschlossenem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (s. V.1.1.3) auf eine Synergi Max-RP-Säule (50 x 2.0 mm; 4 µm), die auf 30 °C temperiert wurde, injiziert. Die Zusammensetzung der mobilen Phase war 0.1 % Ameisensäure in Wasser (A) und Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure (B). Es wurde ein Fließmittelgradient von 5 - 45 % B in 4 min mit einer Flussrate von 0.6 ml/min angewendet. 1.5 min nach der Probeninjektion wurde das Eluat in das Massenspektrometer geleitet (valve to MS) und DNP-SG (Retentionszeit 3.2 min) sowie der interne Standard QNO-SG (Retentionszeit 2.1 min) im positiven MRM-Modus analysiert. Für jeden Analyten wurde ein Qualifier- (q) und ein Quantifier-Übergang (Q) gemessen (Tab. 34). Stickstoff wurde zur Verneblung des Eluates (Druck 50 psi), als Trocknungsgas (Flussrate 8 l/min, Temperatur 300 °C), als Sheathgas (Flussrate 10 l/min, Temperatur 300 °C) und als Kollisionsgas (Flussrate 1 ml/min) verwendet. Die Spannung der Kapillare betrug -3500 V und als Nozzle-Voltage wurden 500 V eingestellt. Durch Umschalten des Ventils am Massenspektrometer nach 4 min Chromatographiezeit gelangte das Eluat aus der HPLC-Säule nicht mehr in das Massenspektrometer und wurde direkt in den Fließmittelabfall geleitet (valve to waste). Nun wurde die HPLC-Säule mit 100 % B für 2 min gespült und anschließend für die Analyse der nächsten Probe mit den Ausgangsbedingungen für 4 min reäquilibriert.

Tab. 34 Parameter des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers für den Glutathion-S-Transferase-Assay mit 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol als Substrat. Zeitsegment (TS), Ventilstellung (Valve), Elektronenmultiplierspannung (Delta EMV), Precursor-Ion (Prec Ion), Produkt-Ion (Prod Ion), Fragmentorspannung (Frag), Kollisionsenergie (CE), Ionenanalysenzeit (Dwell time), Qualifizierübergang (q), Quantifizierübergang (Q).

TS	Zeit [min]	Valve	Delta EMV [V]	Compound	Prec Ion (m/z)	Prod Ion (m/z)	Frag [V]	CE [eV]	Dwell time [ms]
1	0.0	to waste	-	-	-	-	-	-	-
2	1.5	to MS	0	QNO-SG (IS)	451	178 (Q)	150	25	50
					451	145 (q)	150	25	50
				DNP-SG	474	345 (Q)	135	12	50
					474	242 (q)	135	20	50
3	4.0	to waste	-	-	-	-	-	-	

Photometrische Bestimmung von DNP-SG in der Mikrotiterplatte

In jede Kavität einer klaren Mikrotiterplatte wurden 300 µl des Inkubationsansatzes pipettiert und die Mikrotiterplatte in das Mithras LB 940 Photometer (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland) gestellt. Für die absorptionsspektroskopische Messung wurde ein monochromatischer Filter mit einer Lichtdurchlässigkeit bei 355 nm eingesetzt und als Messzeit pro Kavität 0.1 s gewählt. Für die Lampenenergie wurde die Zahl 1 eingegeben, so dass das Messgerät die optimale Energie für die Messung automatisch einstellt.

2.7.4 Assay zur Konjugation mit den Glutathion-Derivaten

Zur Untersuchung der Akzeptanz der Glutathion-Derivate, wie z. B. Glutathionethylester, *N*-Dansylglutathion, *N*-FMOC-Glutathion und *N*-Biotinylglutathion, durch die Glutathion-S-Transferasen wurde das jeweilige Glutathion-Derivat (1 mM) mit humanem Lebercytosol (0.1 mg/ml) bzw. humanen Lebermikrosomen (0.1 mg/ml) in einem 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.4 umgesetzt. Nach 5 min Vorwärmzeit bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe des Substrates 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol (200 µM) gestartet. Das Gesamtvolumen des Inkubationsansatzes betrug 300 µl. Es wurden Blindproben ohne Protein und ohne Glutathion-Derivate, die 100 % Substratgehalt entsprechen, sowie Blindproben ohne Protein aber mit den jeweiligen Glutathion-Derivaten angefertigt. Nach 10 min Inkubation bei

37 °C wurde die Reaktion mit 150 µl eiskalter MeOH/ZnSO₄-Lösung, die 0.3 % Wasserstoffperoxid enthielt, abgestoppt. Das gefällte Protein wurde durch Zentrifugation bei 12000 x g für 6 min abgetrennt. Jeweils 400 µl des klaren Überstandes wurden in ein HPLC-Vial überführt.

25 µl des Inkubationsansatzes wurden in das HPLC/UV-System (s. V.1.1.1) auf eine Synergi Max-RP-Säule (150 x 4.6 mm; 4 µm) injiziert. Die Temperatur der Chromatographiesäule betrug 30 °C. Als mobile Phase wurde 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Methanol mit 0.05 % Trifluoressigsäure (B) verwendet. Es wurde ein Fließmittelgradient von 40 - 100 % B in 12 min bei einer Flussrate von 1.0 ml/min angewendet. Die Retentionszeit des bei 254 nm detektierten Substrates 1-Chlor-2,4-dinitrobenzol betrug 8.4 min. Nach der chromatographischen Trennung wurde die Säule mit 100 % B für 3 min gespült und anschließend für 2.5 min mit der ursprünglichen Fließmittelzusammensetzung reäquilibriert.

2.8 In-vitro-Inhibitionsassay der Glutathionreduktase

Stammlösungen

Zur Quantifizierung des reduzierten Glutathions (GSH) wurde eine Verdünnungsreihe der Referenzsubstanz in Kaliumphosphatpuffer (100 mM; pH 7.4) hergestellt und diese Proben genauso wie die inkubierten Assayproben (s. u.) behandelt. Die hierbei eingesetzten Glutathionkonzentrationen waren 1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40 und 50 µg/ml. Um ausgewählte pflanzliche Arzneidrogen auf Inhibition dieser Enzyme zu testen, wurden die unter V.2.1.2 hergestellten Trockenextrakte in einer Assay-Konzentration von 1, 10 und 100 µg/ml untersucht.

Inkubation

Für die Untersuchung der Inhibition der Glutathionreduktase wurde der Inhibitor, gelöst in DMSO, bzw. der Pflanzenextrakt, gelöst in DMSO, mit humanem Lebercytosol (0.025 mg/ml) und oxidiertem Glutathion (GSSG, 150 µM) in einen 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.4 gegeben. Nach der Vorinkubation von 5 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von NADPH (1 mM) gestartet. Das Gesamtvolumen des Inkubationsansatzes betrug 300 µl. Es wurden Kontrollproben ohne Inhibitor (100%ige Enzymaktivität) angefertigt und zur Korrektur des im

humanen Lebercytosol bereits enthaltenen Glutathions Blindproben untersucht, zu denen kein NADPH zugegeben wurde. Nach 10 min Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mit 150 µl eiskalter MeOH/ZnSO₄-Lösung, die 3 mM DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure), Ellmans-Reagenz) und 30 µg/ml des internen Standards DNP-SG (2,4-Dinitrophenyl-S-glutathion, s. V.2.7.1) enthielt, abgestoppt. Nach der Zentrifugation bei 12000 x g für 6 min zur Abtrennung des gefällten Proteins wurden 400 µl des Überstandes in neue 1.5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und in jede Probe 50 µl einer 10%igen Ameisensäurelösung pipettiert. Nach der erneuten Zentrifugation bei 12000 x g für 6 min wurden jeweils 400 µl des Überstandes in ein HPLC-Vial überführt.

HPLC/UV-Analyse

50 µl des mit Ameisensäure versetzten Inkubationsansatzes wurden in das HPLC/UV-System (s. V.1.1.1) auf eine Synergi Max-RP-Säule (150 x 4.6 mm; 4 µm) injiziert. Die Temperatur der Chromatographiesäule betrug 30 °C. Die Zusammensetzung der mobilen Phase bestand aus 0.05 % Trifluoressigsäure in Wasser (A) und Methanol mit 0.05 % Trifluoressigsäure (B). Es wurde ein Fließmittelgradient von 35 - 55 % B in 7 min bei einer Flussrate von 1.0 ml/min angewendet. Die UV-Detektion des derivatisierten Glutathions (TNB-SG; Retentionszeit 5.2 min) und des internen Standards (DNP-SG; Retentionszeit 6.2 min) erfolgte bei 325 nm. Nach der Chromatographie wurde die Säule zur Elution des überschüssigen Derivatisierungsreagenz mit 100 % B für 4 min gespült und anschließend mit der ursprünglichen Fließmittelzusammensetzung, die zu Beginn des Gradienten vorlag, reäquilibriert (s. Tab.).

Zeit [min]	Fließmittel (% B)	Flussrate [ml/min]
0.00	35.0	1.0
7.00	55.0	1.0
7.01	100.0	1.0
11.00	100.0	1.0
11.01	35.0	1.0
13.50	35.0	1.0

2.9 Auswertung der Messdaten

2.9.1 Bestimmung der Umsetzungsgeschwindigkeit

Glutathion-S-Transferasen, Glutathionreduktase und Carboxylesterasen

Bei den HPLC/UV-basierten In-vitro-Assays für die Glutathion-S-Transferasen, für die Glutathionreduktase und für die Carboxylesterasen musste zuerst eine Korrektur der Peakflächen des Metaboliten erfolgen, um nur die durch enzymatische Reaktion entstandene Metabolitkonzentration zu erhalten. Hierfür wurde die Differenz aus dem Mittelwert der Peakflächen der Proben (Inkubation mit Enzym) und dem Mittelwert der Peakflächen der Blindproben (Inkubation ohne Enzym) gebildet (Gl. 11). Die durch enzymatische Reaktion entstandene Probenkonzentration (Gl. 12) wurde aus den korrigierten Peakflächen mit Hilfe der Kalibriergerade für den jeweiligen Metaboliten berechnet. Die Umsetzungsgeschwindigkeit V in nmol Metabolit / mg Protein / min für die Substrate wurde aus der ermittelten durch enzymatische Reaktion entstandenen Metabolitkonzentration mit Hilfe der molaren Masse des Metaboliten, der eingesetzten Proteinkonzentration der humanen Lebersubzellfraktion und der Inkubationszeit berechnet (Gl. 13).

$$A_{\text{korr}} = A_{\text{Probe}} - A_{\text{BW}} \quad (\text{Gl. 11})$$

$$C_{\text{Met}} = \frac{A_{\text{korr}} - b}{a} \quad (\text{Gl. 12})$$

$$V = \frac{C_{\text{Met}} \times 1000}{M_{\text{Met}} \times C_{\text{Prot}} \times t} \quad (\text{Gl. 13})$$

A_{korr} = korrigierte Peakfläche

A_{Probe} = Peakfläche des Metaboliten der Probe

A_{BW} = Peakfläche des Metaboliten der Blindprobe

C_{Met} = enzymatisch entstandene Metabolitkonzentration in $\mu\text{g/ml}$

a = Steigung der Kalibriergeraden des Metaboliten

b = y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden des Metaboliten

V = Umsetzungsgeschwindigkeit in nmol Metabolit / mg Protein / min

M_{Met} = molare Masse des Metaboliten in g/mol

C_{Prot} = Proteinkonzentration der eingesetzten Zellfraktion in mg/ml

t = Inkubationszeit in min

Cytochrom-P450-Enzyme

Zur Berechnung der Umsetzungsgeschwindigkeit für die Substrate durch die CYP-Enzyme wurde zunächst die Metabolitkonzentration in den inkubierten Proben aus den Daten der LC/MS/MS- bzw. HPLC/Fluoreszenzanalyse bestimmt. Hierzu wurden die Quotienten aus den Peakflächen des Metaboliten und des den Proben zugesetzten internen Standards (Area Ratios) von jeder Probeninjektion gebildet (Gl. 14). Aus den Area Ratios wurde schließlich mit Hilfe der Kalibriergeraden die Metabolitkonzentration in der Probe (Gl. 15) erhalten. Um die Umsetzungsgeschwindigkeit V der CYP-Enzyme in pmol Metabolit / pmol CYP-Enzym / min zu erhalten, wurde die ermittelte Probenkonzentration auf die molare Masse des Metaboliten, die bei der Inkubation eingesetzte CYP-Konzentration und die Inkubationszeit bezogen (Gl. 16).

$$AR = \frac{A_{\text{Met}}}{A_{\text{IS}}} \quad (\text{Gl. 14})$$

$$C_{\text{Met}} = \frac{AR - b}{a} \quad (\text{Gl. 15})$$

$$V_{\text{CYP}} = \frac{C_{\text{Met}} \times 1000}{M_{\text{Met}} \times C_{\text{CYP}} \times t} \quad (\text{Gl. 16})$$

$$V_{\text{HLM}} = \frac{C_{\text{Met}} \times 1000}{M_{\text{Met}} \times C_{\text{HLM}} \times C_{\text{CYP(HLM)}} \times t} \quad (\text{Gl. 17})$$

AR = Peakflächenverhältnis des Metaboliten und des internen Standards (Area Ratio)

A_{Met} = Peakfläche des Metaboliten

A_{IS} = Peakfläche des internen Standards

C_{Met} = Metabolitkonzentration in ng/ml

a = Steigung der Kalibriergeraden des Metaboliten

b = y-Achsenabschnitt der Kalibriergeraden des Metaboliten

V_{CYP} = Umsetzungsgeschwindigkeit in pmol Metabolit / pmol CYP-Enzym / min

M_{Met} = molare Masse des Metaboliten in g/mol

C_{CYP} = eingesetzte CYP-Konzentration in pmol/ml

t = Inkubationszeit in min

V_{HLM} = Umsetzungsgeschwindigkeit durch HLM in pmol Metabolit / pmol CYP-Enzym / min

C_{HLM} = eingesetzte HLM-Konzentration in mg/ml

$C_{\text{CYP(HLM)}}$ = CYP-Konzentration der verwendeten HLM in pmol / mg Protein

Bei Verwendung von humanen Lebermikrosomen (HLM) musste für die Berechnung der Umsetzungsgeschwindigkeit die eingesetzte Proteinkonzentration und der chargenspezifische CYP-Gehalt berücksichtigt werden (Gl. 17).

2.9.2 Bestimmung der inhibitorischen Aktivität

Bestimmung der Restaktivität

Die Restaktivität bezeichnet die prozentuale Substratumsetzungsgeschwindigkeit in Anwesenheit des Inhibitors im Vergleich zu einer Kontrollprobe ohne Inhibitor (100 % Enzymaktivität). Da die Linearität des Messsignals des Metaboliten gegenüber seiner Konzentration im vorliegenden Konzentrationsbereich bereits durch eine Kalibrierung mit Hilfe der Standardsubstanz des Metaboliten überprüft wurde, kann für die Bestimmung der Restaktivität anstatt der Metabolitkonzentration direkt die Peakfläche verwendet werden (Gl. 18). Ist eine Korrektur der Peakflächen mit Hilfe einer Blindprobe aufgrund des Auftretens einer nichtenzymatischen Reaktion, wie z. B. bei den Glutathion-S-Transferase-Assays, erforderlich, erfolgte die Berechnung der Restaktivität nach (Gl. 19). Für die LC/MS/MS- und die LC/LC/Fluoreszenz-Assays, bei denen ein interner Standard hinzugefügt wurde, wurden die Peakflächenverhältnisse (Area Ratios) der Metaboliten und des internen Standards der einzelnen Proben verwendet (Gl. 20).

$$RA = \frac{A_{\text{Met}}(\text{P})}{A_{\text{Met}}(\text{K})} \times 100 \quad (\text{Gl. 18})$$

$$RA = \frac{A_{\text{Met}}(\text{P}) - A_{\text{Met}}(\text{BW})}{A_{\text{Met}}(\text{K}) - A_{\text{Met}}(\text{BW})} \times 100 \quad (\text{Gl. 19})$$

$$RA = \frac{A_{\text{Met}}(\text{P})/A_{\text{IS}}(\text{P})}{A_{\text{Met}}(\text{K})/A_{\text{IS}}(\text{K})} \times 100 \quad (\text{Gl. 20})$$

RA = Restaktivität in Prozent

$A_{\text{Met}}(\text{P})$ = Peakfläche des Metaboliten der Probe mit Inhibitor

$A_{\text{Met}}(\text{K})$ = Peakfläche des Metaboliten der Kontrolle ohne Inhibitor

$A_{\text{Met}}(\text{BW})$ = Peakfläche des Metaboliten der Blindprobe ohne Enzym

$A_{\text{IS}}(\text{P})$ = Peakfläche des internen Standards in der Probe mit Inhibitor

$A_{\text{IS}}(\text{K})$ = Peakfläche des internen Standards in der Kontrolle ohne Inhibitor

Inhibitionskurven und IC₅₀-Werte

Zur graphischen Darstellung der Inhibitionskurven wurde der dekadische Logarithmus der InhibitorKonzentration (x-Achse) gegenüber der Restaktivität in % (y-Achse) aufgetragen. Die IC₅₀-Werte und die Steigungen (n_H ; Hill-Koeffizient) dieser Inhibitionskurven wurden durch nichtlineare Regression mit Hilfe des Softwareprogrammes SigmaPlot® (Version 10.0, Systat Software, Chicago, USA) ermittelt. Wurde durch die vorhandenen Messwerte der gesamte Verlauf der Inhibitionskurve beschrieben, d. h. sank die Restaktivität bei der höchsten getesteten Konzentration auf nahezu 0 %, wurde die Regression mit Hilfe der 4-Parameter-Gleichung nach Hill durchgeführt (Gl. 21). Konnte das Enzym durch die höchste eingesetzte InhibitorKonzentration nicht vollständig gehemmt werden, wurde für die Regression zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes die 3-Parameter-Gleichung nach Hill verwendet (Gl. 22). War die inhibitorische Aktivität so gering, dass bei der höchsten getesteten InhibitorKonzentration eine Restaktivität von > 50 % vorhanden war, wurden die Messpunkte durch eine Linie verbunden und der IC₅₀-Wert mit größer als der höchsten getesteten InhibitorKonzentration angegeben.

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x) \times n_H}} \quad (\text{Gl. 21})$$

$$y = \frac{\max}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x) \times n_H}} \quad (\text{Gl. 22})$$

y = Restaktivität des Enzyms in % der Kontrolle

\max = angestrebtes Maximum der Inhibitionskurve

\min = angestrebtes Minimum der Inhibitionskurve

IC₅₀ = InhibitorKonzentration für eine 50%ige Hemmung der Enzymaktivität

x = dekadischer Logarithmus der InhibitorKonzentration

n_H = Steigung der Inhibitionskurve (Hill-Koeffizient)

2.9.3 Linearisierung zur Bestimmung von pK_S-Werten

Die Linearisierung der Messdaten zur photometrischen Bestimmung des pK_S-Wertes einer Säure kann durch eine Modifizierung der Henderson-Hasselbalch-Gleichung erfolgen. Zunächst werden die Absorptionen (A_{gem}) derselben Substanzkonzentration bei einer bestimmten Wellenlänge, die idealerweise dem Absorptionsmaximum der deprotonierten Form entspricht, bei verschiedenen pH-Werten gemessen. Zusätzlich

ist die Absorption der ungeladenen Form (A_{BH}) und der deprotonierten Form (A_{B^-}) notwendig. Durch die Protolyse der Säure setzt sich die Gesamtkonzentration (C_0) aus den Konzentrationen der einzelnen Formen (C_{BH} ; C_{B^-}) zusammen (Gl. 23). Beide Formen besitzen wellenlängenabhängig ihren eigenen Absorptionskoeffizienten (ε_{BH} ; ε_{B^-}). Durch Einsetzen in das Lambert-Beersche-Gesetz ergibt sich (Gl. 24).

$$C_0 = C_{\text{BH}} + C_{\text{B}^-} \quad (\text{Gl. 23})$$

$$A_{\text{gem}} = \varepsilon_0 \times C_0 \times b = (\varepsilon_{\text{BH}} \times C_{\text{BH}} + \varepsilon_{\text{B}^-} \times C_{\text{B}^-}) \times b \quad (\text{Gl. 24})$$

Durch Umstellung von (Gl. 24) nach den Parametern C_{B^-} und C_{BH} werden (Gl. 25) und (Gl. 26) erhalten, die in die Henderson-Hasselbalch-Gleichung eingesetzt werden können (Gl. 27).

$$C_{\text{B}^-} = \frac{A_{\text{gem}} - \varepsilon_{\text{BH}} \times C_0}{\varepsilon_{\text{B}^-} - \varepsilon_{\text{BH}}} \quad (\text{Gl. 25})$$

$$C_{\text{BH}} = \frac{\varepsilon_{\text{B}^-} \times C_0 - A_{\text{gem}}}{\varepsilon_{\text{B}^-} - \varepsilon_{\text{BH}}} \quad (\text{Gl. 26})$$

$$\text{pH} = \text{p}K_{\text{S}} + \lg \frac{C_{\text{B}^-}}{C_{\text{BH}}} = \text{p}K_{\text{S}} + \lg \frac{A_{\text{gem}} - \varepsilon_{\text{BH}} \times C_0}{\varepsilon_{\text{B}^-} \times C_0 - A_{\text{gem}}} \quad (\text{Gl. 27})$$

Bei sehr kleinen pH-Werten (pH_{min}) geht die Konzentration der deprotonierten Form (C_{B^-}) gegen null und die gemessene Absorption (A_{gem}) ist auf die ausschließlich vorliegende Säureform zurückzuführen. Die gesamte Konzentration (C_0) entspricht der ungeladenen Form (C_{BH}). Es gilt (Gl. 28). Im Gegensatz dazu geht bei sehr hohen pH-Werten (pH_{max}) die Konzentration der ungeladenen Form (C_{BH}) gegen null und die gesamte Konzentration (C_0) liegt deprotoniert (C_{B^-}) vor (Gl. 29).

$$A_{\text{gem}}(\text{pH}_{\text{min}}) = A_{\text{BH}} = \varepsilon_{\text{BH}} \times C_{\text{BH}} = \varepsilon_{\text{BH}} \times C_0 \quad (\text{Gl. 28})$$

$$A_{\text{gem}}(\text{pH}_{\text{max}}) = A_{\text{B}^-} = \varepsilon_{\text{B}^-} \times C_{\text{B}^-} = \varepsilon_{\text{B}^-} \times C_0 \quad (\text{Gl. 29})$$

Mit Hilfe der Beziehungen bei den extremen pH-Werten kann in (Gl. 27) der entsprechende Term durch (Gl. 28) und (Gl. 29) ersetzt werden (Gl. 30). Durch Umstellung ergibt sich eine Geradengleichung (Gl. 31). Der pH-Wert entspricht der Variablen x und der logarithmische Term wird auf die Ordinate aufgetragen. Die Steigung dieser Geraden beträgt 1 und der Achsenabschnitt dem negativen pK_S -Wert.

$$\text{pH} = \text{p}K_S + \lg \frac{A_{\text{gem}} - A_{\text{BH}}}{A_{\text{B}^-} - A_{\text{gem}}} \quad (\text{Gl. 30})$$

$$\lg \frac{A_{\text{gem}} - A_{\text{BH}}}{A_{\text{B}^-} - A_{\text{gem}}} = \text{pH} - \text{p}K_S \quad (\text{Gl. 31})$$

VI ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Häufig verwendete Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
AA	Ammoniumacetat
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AHMC	3-[2-(<i>N,N</i> -Diethylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin
AKBA	3- <i>O</i> -Acetyl-11-keto- β -boswelliasäure
AMHC	3-[2-(<i>N,N</i> -Diethyl- <i>N</i> -methylamino)ethyl]-7-hydroxy-4-methylcumarin
AMMC	3-[2-(<i>N,N</i> -Diethyl- <i>N</i> -methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcumarin
BBH	2-Benzyl-7-benzyloxyharman
BC	7-Benzyloxy-cumarin
β C-GSH	β -Carbolin-markiertes Glutathion
BFC	7-Benzyloxy-4-trifluormethylcumarin
BHH	2-Benzyl-7-hydroxyharman
Bio-GSH	<i>N</i> -Biotinyliertes Glutathion
BMC	7-Benzyloxy-4-methylcumarin
BMH	2-Benzyl-7-methoxyharman
BNPP	Bis(<i>p</i> -nitrophenyl)phosphat
BuC	7-Butyloxy-cumarin
BuFC	7-Butyloxy-4-trifluormethylcumarin
BuMC	7-Butyloxy-4-methylcumarin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
CDNB	1-Chlor-2,4-dinitrobenzol
CE	Collision Energy
CEC	3-Cyan-7-ethoxycumarin
CES	Carboxylesterasen
CHC	3-Cyan-7-hydroxycumarin
CHMC	3-Cyan-7-hydroxy-4-methylcumarin
CID	Collision-Induced Dissociation

CNP-SG	2-Chlor-4-nitrophenyl-S-glutathion
CoA	Coenzym A
CYP	Cytochrom P450
Da	Dalton
DAB	Deutsches Arzneibuch
DAD	Diodenarraydetektor
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DCNB	1,2-Chlor-4-nitrobenzol
DEDTC	Diethyldithiocarbamat
dGSH	<i>N</i> -Dansyliertes Glutathion
d. h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP-SG	2,4-Dinitrophenyl-S-glutathion
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	D,L-Dithiothreitol
Dwell time	Ionenanalysenzeit
EA-SG	Glutathion-S-Konjugat der Etacrynsäure
EC	7-Ethoxycumarin
EFC	7-Ethoxy-4-trifluormethylcumarin
EIC	Extracted Ion Chromatogramm (extrahiertes Ionenchromatogramm)
Em	Emission
EMC	7-Ethoxy-4-methylcumarin
EMV	Elektron Multiplier Voltage
ER	endoplasmatisches Retikulum
ES	Enzym-Substrat-Komplex
ESI	Elektrospray-Ionisierung
eV	Elektronenvolt
Ex	Excitation
FA	Ameisensäure
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDA	Food and Drug Administration
FLD	Fluoreszenzdetektor

FMN	Flavinmononukleotid
FMOC-GSH	<i>N</i> -Fluorenylmethoxycarbonyliertes Glutathion
Frag	Fragmentorspannung
g	Erdbeschleunigung
Gl.	Gleichung, Berechnungsformel
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
GSH-EE	Glutathionethylester
GSSG	Glutathiondisulfid, oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferasen
h	Stunde
HC	7-Hydroxycumarin
HCBH	7-Hydroxy-9-(4-carboxybenzyl)harman
HFC	7-Hydroxy-4-trifluormethylcumarin
HIM	humane intestinale Mikrosomen
HLC	humanes Lebercytosol
HLM	humane Lebermikrosomen
HL-S9	Überstand nach Zentrifugation eines Zellhomogenates der humanen Leber bei 9000 x g für 20 min
HMC	7-Hydroxy-4-methylcumarin
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration für eine 50%ige Hemmung
IC _{~90}	Inhibitorkonzentration für eine etwa 90%ige Hemmung
Inj. vol.	Injektionsvolumen
IS	interner Standard
k	Geschwindigkeitskonstante
KBA	11-Keto- β -boswelliasäure
kDa	Kilodalton
K _i	Inhibitionskonstante
K _{ic}	kompetitive Inhibitionskonstante
K _{iu}	unkompetitive Inhibitionskonstante
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LC	Flüssigkeitschromatographie

log	Logarithmus
LOQ	Limit of Quantification
LU	Luminescence Units
M	Molar
M4NB	Methyl-4-nitrobenzoat
mAU	Milli Absorption Units
MC	7-Methoxycumarin
MCBH	7-Methoxy-9-(4-carboxybenzyl)harman
MeOH	Methanol
MFC	7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHH	2-Methyl-7-hydroxyharman
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
MMC	7-Methoxy-4-methylcumarin
MMF	Mycophenolatmofetil
MMH	2-Methyl-7-methoxyharman
µmol	Mikromol
MPA	Mycophenolsäure
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometrie
ms	Millisekunde
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MUA	4-Methylumbelliferylacetat
<i>m/z</i>	Verhältnis von Masse zu Ladung
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)

NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
4-NBA	4-Nitrobenzoesäure
NBCl	4-Nitrobenzylchlorid
NB-SG	4-Nitrobenzyl-S-glutathion
n. d.	nicht detektierbar
ng	Nanogramm
n _H	Hill-Koeffizient
NHS-OH	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NQO	4-Nitrochinolin- <i>N</i> -oxid
PA	Phenylacetat
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PenC	7-Pentyloxycumarin
PenFC	7-Pentyloxy-4-trifluormethylcumarin
PenMC	7-Pentyloxy-4-methylcumarin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
pK _S	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
pM	Picomolar
pmol	Picomol
PMT	Photomultiplier-Tube
PNP	<i>p</i> -Nitrophenol
PNPA	<i>p</i> -Nitrophenylacetat
Prec Ion	Precursor-Ion
ProC	7-Propyloxycumarin
Prod Ion	Produkt-Ion
ProFC	7-Propyloxy-4-trifluormethylcumarin
ProMC	7-Propyloxy-4-methylcumarin
psi	Pound Per Square Inch
q	Qualifier Ion

Q	Quantifier Ion
QNO-SG	4-Chinolinyln- <i>N</i> -oxid- <i>S</i> -glutathion
R ²	Bestimmtheitsmaß
rek.	rekombinant
RLM	Rattenlebermikrosomen
RP	Reversed Phase
R _t	Retentionszeit
s.	siehe
[S]	Substratkonzentration
S9	Überstand nach Zentrifugation eines Zellhomogenates bei 9000 x g
SIM	Selected Ion Monitoring
S/N	Signal-to-Noise Ratio
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
s. u.	siehe unten
SULT	Sulfotransferasen
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
TIC	Total Ion Current (Totalionenstrom)
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoesäure
TNB-SG	Glutathion-Addukt der 5-Thio-2-nitrobenzoesäure
TS	Zeitsegment
u. a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
UGT	Glucuronosyltransferasen
UV	Ultraviolett
V	Umsetzungsgeschwindigkeit
v. a.	vor allem
VIS	Visible
V _{max}	maximale Umsetzungsgeschwindigkeit
VWD	Variabler Wellenlängendetektor
xGSH	Glutathion-(<i>glycin</i> - ¹³ C ₂ , ¹⁵ N)
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
λ _{max}	Absorptionsmaximum

VII VERÖFFENTLICHUNGEN

1 Originalarbeiten

Frank A, Schaefflein L, Völker M, Unger M, 2013. Evaluation of harmene derivatives as new substrates for the in vitro phenotyping of human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes. *eingereicht*.

Fetzner L, Burhenne J, Weiss J, Völker M, Unger M, Mikus G, Haefeli WE, 2011. Daily honey consumption does not change CYP3A activity in humans. *J Clin Pharmacol* **51**: 1223-1232.

2 Posterpräsentationen

Völker M, Unger M, Wendt J, Zhang L, 2012. Identification of glutathione conjugates by liquid chromatography high resolution time of flight mass spectrometry and high performance fragment ion analysis. 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Vancouver, BC, Canada.

Völker M, Kühn A, Pradel G, Unger M, 2010. Quantitative determination of xanthurenic acid in erythrocyte lysates using LC/ESI/MS/MS. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Braunschweig.

Völker M, Unger M, 2009. Development of an efficient liquid chromatography-mass spectrometry-based glutathion S-transferase assay. 2nd International Symposium of the Collaborative Research Center SFB 630, Würzburg.

Unger M, Rikanović C, Völker M, Frank A, Gulder T, Bringmann G, 2009. Inhibition of cytochrome P450 2D6 by *N,C*-coupled arylisoquinolinium salts. 2nd International Symposium of the Collaborative Research Center SFB 630, Würzburg.

Völker M, Frank A, Unger M, 2009. Inhibition of the bioactivation of clopidogrel by drugs and natural products. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Jena.

Völker M, Unger M, 2008. Development of an efficient reversed-HPLC-based glutathione S-transferase assay. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Bonn.

3 Vorträge

Unger M, Völker M, Schaefflein L, Fank A, 2010. Inhibition of prodrug activation by herbal extracts and secondary plant metabolites. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Braunschweig.

Völker M, Unger M, 2008. Glutathione and glutathione derivatives for the LC/MS and LC/fluorescence-based identification of electrophilic drug metabolites. 4th Joint PhD Students Meeting of the Collaborative Research Centers SFB 630, 766, 544, Kloster Bronnbach.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Meyer UA, 1996. Overview of enzymes of drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm* **24**: 449-459.
- 2 Food and Drug Administration (FDA), 2006. Guidance for industry: drug interaction studies - study design, data analysis, and implications for dosing and labelling (Draft; <http://www.fda.gov>).
- 3 Food and Drug Administration (FDA), 2008. Guidance for industry: safety testing of drug metabolites (<http://www.fda.gov>).
- 4 Guengerich FP, 2003. Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Mol Interv* **3**: 194-204.
- 5 Furge LL, Guengerich FP, 2006. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism and chemical toxicology: An introduction. *Biochem Mol Biol Educ* **34**: 66-74.
- 6 Klingenberg M, 1958. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **75**: 376-386.
- 7 Omura T, Sato R, 1962. A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* **237**: 1375-1376.
- 8 Omura T, Sato R, 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J Biol Chem* **239**: 2379-2385.
- 9 Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H, 2008. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Arch Toxicol* **82**: 667-715.
- 10 Ruckpaul K, 1993. Cytochrom P450 abhängige Enzyme - Targetenzyme für die Arzneistoffentwicklung? *Pharm Unserer Zeit* **22**: 296-304.
- 11 Guengerich FP, 2007. Mechanisms of cytochrome P450 substrate oxidation: MiniReview. *J Biochem Mol Toxicol* **21**: 163-168.
- 12 Guengerich FP, 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* **14**: 611-650.
- 13 Goepfert AR, Scheerens H, Vermeulen NP, 1995. Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. *Crit Rev Toxicol* **25**: 25-65.
- 14 Lewis DFV, 2004. 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics* **5**: 305-318.
- 15 Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato R, Waterman MR, 1987. The P450 gene superfamily: recommended nomenclature. *DNA* **6**: 1-11.
- 16 Nelson DR, 2009. The cytochrome P450 homepage. *Hum Genomics* **4**: 59-65.
- 17 Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP, 1994. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver

- microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* **270**: 414-423.
- 18 Transon C, Lecoœur S, Leemann T, Beaune P, Dayer P, 1996. Interindividual variability in catalytic activity and immunoreactivity of three major human liver cytochrome P450 isozymes. *Eur J Clin Pharmacol* **51**: 79-85.
- 19 Lewis DF, Lake BG, Dickins M, 2004. Substrates of human cytochromes P450 from families CYP1 and CYP2: analysis of enzyme selectivity and metabolism. *Drug Metabol Drug Interact* **20**: 111-142.
- 20 Eiermann B, Engel G, Johansson I, Zanger UM, Bertilsson L, 1997. The involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in the metabolism of clozapine. *Br J Clin Pharmacol* **44**: 439-446.
- 21 Becquemont L, Le Bot MA, Riche C, Funck-Brentano C, Jaillon P, Beaune P, 1998. Use of heterologously expressed human cytochrome P450 1A2 to predict tacrine-fluvoxamine drug interaction in man. *Pharmacogenetics* **8**: 101-108.
- 22 Tassaneeyakul W, Birkett DJ, Veronese ME, McManus ME, Tukey RH, Quattrochi LC, Gelboin HV, Miners JO, 1993. Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P450 1A1 and 1A2. *J Pharmacol Exp Ther* **265**: 401-407.
- 23 Ha HR, Chen J, Krahenbuhl S, Follath F, 1996. Biotransformation of caffeine by cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Eur J Clin Pharmacol* **49**: 309-315.
- 24 Sesardic D, Boobis AR, Murray BP, Murray S, Segura J, de la Torre R, Davies DS, 1990. Furafylline is a potent and selective inhibitor of cytochrome P450IA2 in man. *Br J Clin Pharmacol* **29**: 651-663.
- 25 Yamazaki H, Tanaka M, Shimada T, 1999. Highly sensitive high-performance liquid chromatographic assay for coumarin 7-hydroxylation and 7-ethoxycoumarin O-deethylation by human liver cytochrome P450 enzymes. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **721**: 13-19.
- 26 Nakajima M, Yamamoto T, Nunoya K, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, Funae Y, Shimada N, Kamataki T, Kuroiwa Y, 1996. Role of human cytochrome P4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab Dispos* **24**: 1212-1217.
- 27 Draper AJ, Madan A, Parkinson A, 1997. Inhibition of coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* **341**: 47-61.
- 28 Mo SL, Liu YH, Duan W, Wei MQ, Kanwar JR, Zhou SF, 2009. Substrate specificity, regulation, and polymorphism of human cytochrome P450 2B6. *Curr Drug Metab* **10**: 730-753.
- 29 Court MH, Duan SX, Hesse LM, Venkatakrisnan K, Greenblatt DJ, 2001. Cytochrome P-450 2B6 is responsible for interindividual variability of propofol hydroxylation by human liver microsomes. *Anesthesiology* **94**: 110-119.
- 30 Faucette SR, Hawke RL, Lecluyse EL, Shord SS, Yan B, Laethem RM, Lindley CM, 2000. Validation of bupropion hydroxylation as a selective marker of human cytochrome P450 2B6 catalytic activity. *Drug Metab Dispos* **28**: 1222-1230.

- 31 Ogburn ET, Jones DR, Masters AR, Xu C, Guo Y, Desta Z, 2010. Efavirenz primary and secondary metabolism in vitro and in vivo: identification of novel metabolic pathways and cytochrome P450 2A6 as the principal catalyst of efavirenz 7-hydroxylation. *Drug Metab Dispos* **38**: 1218-1229.
- 32 Roy P, Yu LJ, Crespi CL, Waxman DJ, 1999. Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug Metab Dispos* **27**: 655-666.
- 33 Walsky RL, Obach RS, 2007. A comparison of 2-phenyl-2-(1-piperidinyl)propane (PPP), 1,1',1''-phosphinothioylidynetrisaziridine (thioTEPA), clopidogrel, and ticlopidine as selective inactivators of human cytochrome P450 2B6. *Drug Metab Dispos* **35**: 2053-2059.
- 34 Li XQ, Bjorkman A, Andersson TB, Ridderstrom M, Masimirembwa CM, 2002. Amodiaquine clearance and its metabolism to *N*-desethylamodiaquine is mediated by CYP2C8: a new high affinity and turnover enzyme-specific probe substrate. *J Pharmacol Exp Ther* **300**: 399-407.
- 35 Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez FJ, Harris JW, 1994. Selective biotransformation of taxol to 6 α -hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res* **54**: 5543-5546.
- 36 Wang J-S, Neuvonen M, Wen X, Backman JT, Neuvonen PJ, 2002. Gemfibrozil inhibits CYP2C8-mediated cerivastatin metabolism in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **30**: 1352-1356.
- 37 Ogilvie BW, Zhang D, Li W, Rodrigues AD, Gipson AE, Holsapple J, Toren P, Parkinson A, 2006. Glucuronidation converts gemfibrozil to a potent, metabolism-dependent inhibitor of CYP2C8: implications for drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* **34**: 191-197.
- 38 Miners JO, Birkett DJ, 1998. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol* **45**: 525-538.
- 39 Bort R, Mace K, Boobis A, Gomez-Lechon MJ, Pfeifer A, Castell J, 1999. Hepatic metabolism of diclofenac: role of human CYP in the minor oxidative pathways. *Biochem Pharmacol* **58**: 787-796.
- 40 Ufer M, Svensson JO, Krausz KW, Gelboin HV, Rane A, Tybring G, 2004. Identification of cytochromes P450 2C9 and 3A4 as the major catalysts of phenprocoumon hydroxylation in vitro. *Eur J Clin Pharmacol* **60**: 173-182.
- 41 Komatsu K, Ito K, Nakajima Y, Kanamitsu S, Imaoka S, Funae Y, Green CE, Tyson CA, Shimada N, Sugiyama Y, 2000. Prediction of in vivo drug-drug interactions between tolbutamide and various sulfonamides in humans based on in vitro experiments. *Drug Metab Dispos* **28**: 475-481.
- 42 Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A, 2010. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* **38**: 92-99.
- 43 Karam WG, Goldstein JA, Lasker JM, Ghanayem BI, 1996. Human CYP2C19 is a major omeprazole 5-hydroxylase, as demonstrated with recombinant cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **24**: 1081-1087.

- 44 Dayer P, Desmeules J, Leemann T, Striberni R, 1988. Bioactivation of the narcotic drug codeine in human liver is mediated by the polymorphic monooxygenase catalyzing debrisoquine 4-hydroxylation (cytochrome P-450 db1/bufl). *Biochem Biophys Res Commun* **152**: 411-416.
- 45 Yu A, Haining RL, 2001. Comparative contribution to dextromethorphan metabolism by cytochrome P450 isoforms in vitro: can dextromethorphan be used as a dual probe for both CYP2D6 and CYP3A activities? *Drug Metab Dispos* **29**: 1514-1520.
- 46 Akutsu T, Kobayashi K, Sakurada K, Ikegaya H, Furihata T, Chiba K, 2007. Identification of human cytochrome P450 isozymes involved in diphenhydramine *N*-demethylation. *Drug Metab Dispos* **35**: 72-78.
- 47 Koyama E, Chiba K, Tani M, Ishizaki T, 1997. Reappraisal of human CYP isoforms involved in imipramine *N*-demethylation and 2-hydroxylation: a study using microsomes obtained from putative extensive and poor metabolizers of *S*-mephenytoin and eleven recombinant human CYPs. *J Pharmacol Exp Ther* **281**: 1199-1210.
- 48 Coutts RT, Bach MV, Baker GB, 1997. Metabolism of amitriptyline with CYP2D6 expressed in a human cell line. *Xenobiotica* **27**: 33-47.
- 49 Otton SV, Crewe HK, Lennard MS, Tucker GT, Woods HF, 1988. Use of quinidine inhibition to define the role of the sparteine/debrisoquine cytochrome P450 in metoprolol oxidation by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **247**: 242-247.
- 50 Kroemer HK, Mikus G, Kronbach T, Meyer UA, Eichelbaum M, 1989. In vitro characterization of the human cytochrome P-450 involved in polymorphic oxidation of propafenone. *Clin Pharmacol Ther* **45**: 28-33.
- 51 Koop DR, 1992. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J* **6**: 724-730.
- 52 Sheets JJ, Mason JI, Wise CA, Estabrook RW, 1986. Inhibition of rat liver microsomal cytochrome P-450 steroid hydroxylase reactions by imidazole antimycotic agents. *Biochem Pharmacol* **35**: 487-491.
- 53 He K, Iyer KR, Hayes RN, Sinz MW, Woolf TF, Hollenberg PF, 1998. Inactivation of cytochrome P450 3A4 by bergamottin, a component of grapefruit juice. *Chem Res Toxicol* **11**: 252-259.
- 54 Zhou S, Yung Chan S, Cher Goh B, Chan E, Duan W, Huang M, McLeod HL, 2005. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clin Pharmacokinet* **44**: 279-304.
- 55 Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL, 1977. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* **310**: 584-586.
- 56 Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ, 1979. Defective *N*-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol* **16**: 183-187.
- 57 Zhou S-F, Liu J-P, Chowbay B, 2009. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev* **41**: 89-295.

- 58 Rettie AE, Jones JP, 2005. Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 477-494.
- 59 Zhou S-F, 2009. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: part I. *Clin Pharmacokinet* **48**: 689-723.
- 60 Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M, 2004. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **369**: 23-37.
- 61 Streetman DS, Bertino JS, Jr., Nafziger AN, 2000. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes. *Pharmacogenetics* **10**: 187-216.
- 62 Daly AK, King BP, Leathart JBS, 2006. Genotyping for cytochrome P450 polymorphisms. *Methods Mol Biol* **320**: 193-207.
- 63 Hosokawa M, Furihata T, Yaginuma Y, Yamamoto N, Koyano N, Fujii A, Nagahara Y, Satoh T, Chiba K, 2007. Genomic structure and transcriptional regulation of the rat, mouse, and human carboxylesterase genes. *Drug Metab Rev* **39**: 1-15.
- 64 Hosokawa M, 2008. Structure and catalytic properties of carboxylesterase isozymes involved in metabolic activation of prodrugs. *Molecules* **13**: 412-431.
- 65 Holmes RS, Wright MW, Laulederkind SJ, Cox LA, Hosokawa M, Imai T, Ishibashi S, Lehner R, Miyazaki M, Perkins EJ, Potter PM, Redinbo MR, Robert J, Satoh T, Yamashita T, Yan B, Yokoi T, Zechner R, Maltais LJ, 2010. Recommended nomenclature for five mammalian carboxylesterase gene families: human, mouse, and rat genes and proteins. *Mamm Genome* **21**: 427-441.
- 66 Sun Z, Murry DJ, Sanghani SP, Davis WI, Kedishvili NY, Zou Q, Hurley TD, Bosron WF, 2004. Methylphenidate is stereoselectively hydrolyzed by human carboxylesterase CES1A1. *J Pharmacol Exp Ther* **310**: 469-476.
- 67 Dean RA, Christian CD, Sample RH, Bosron WF, 1991. Human liver cocaine esterases: ethanol-mediated formation of ethylcocaine. *FASEB J* **5**: 2735-2739.
- 68 Pindel EV, Kedishvili NY, Abraham TL, Brzezinski MR, Zhang J, Dean RA, Bosron WF, 1997. Purification and cloning of a broad substrate specificity human liver carboxylesterase that catalyzes the hydrolysis of cocaine and heroin. *J Biol Chem* **272**: 14769-14775.
- 69 Humerickhouse R, Lohrbach K, Li L, Bosron WF, Dolan ME, 2000. Characterization of CPT-11 hydrolysis by human liver carboxylesterase isoforms hCE-1 and hCE-2. *Cancer Res* **60**: 1189-1192.
- 70 Jewell C, Ackermann C, Payne NA, Fate G, Voorman R, Williams FM, 2007. Specificity of procaine and ester hydrolysis by human, minipig, and rat skin and liver. *Drug Metab Dispos* **35**: 2015-2022.
- 71 Hatfield MJ, Potter PM, 2011. Carboxylesterase inhibitors. *Expert Opin Ther Pat* **21**: 1159-1171.

- 72 Heymann E, Krisch K, 1967. Phosphorsäure-bis-[*p*-nitro-phenylester], ein neuer Hemmstoff mikrosomaler Carboxylesterasen. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **348**: 609-619.
- 73 Wang J, Williams ET, Bourgea J, Wong YN, Patten CJ, 2011. Characterization of recombinant human carboxylesterases: fluorescein diacetate as a probe substrate for human carboxylesterase 2. *Drug Metab Dispos* **39**: 1329-1333.
- 74 Wadkins RM, Hyatt JL, Wei X, Yoon KJ, Wierdl M, Edwards CC, Morton CL, Obenauer JC, Damodaran K, Beroza P, Danks MK, Potter PM, 2005. Identification and characterization of novel benzil (diphenylethane-1,2-dione) analogues as inhibitors of mammalian carboxylesterases. *J Med Chem* **48**: 2906-2915.
- 75 Wadkins RM, Hyatt JL, Yoon KJ, Morton CL, Lee RE, Damodaran K, Beroza P, Danks MK, Potter PM, 2004. Discovery of novel selective inhibitors of human intestinal carboxylesterase for the amelioration of irinotecan-induced diarrhea: synthesis, quantitative structure-activity relationship analysis, and biological activity. *Mol Pharmacol* **65**: 1336-1343.
- 76 Li P, Callery PS, Gan LS, Balani SK, 2007. Esterase inhibition attribute of grapefruit juice leading to a new drug interaction. *Drug Metab Dispos* **35**: 1023-1031.
- 77 Meister A, 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* **263**: 17205-17208.
- 78 Arrick BA, Nathan CF, 1984. Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. *Cancer Res* **44**: 4224-4232.
- 79 Deponte M, 2013. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1830**: 3217-3266.
- 80 Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR, 2005. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 51-88.
- 81 Wu B, Dong D, 2012. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* **33**: 656-668.
- 82 Armstrong RN, 1997. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* **10**: 2-18.
- 83 Mathew N, Kalyanasundaram M, Balaraman K, 2006. Glutathione S-transferase (GST) inhibitors. *Expert Opin Ther Pat* **16**: 431-444.
- 84 Patskovsky Y, Patskovska L, Almo SC, Listowsky I, 2006. Transition state model and mechanism of nucleophilic aromatic substitution reactions catalyzed by human glutathione S-transferase M1a-1a. *Biochemistry* **45**: 3852-3862.
- 85 Deponte M, Becker K, 2005. Glutathione S-transferase from malarial parasites: structural and functional aspects. *Methods Enzymol* **401**: 241-253.
- 86 Ithayaraja CM, 2011. Mini-review: metabolic functions and molecular structure of glutathione reductase. *Int J Pharm Sci Rev Res* **9**: 104-115.
- 87 Berkholz DS, Faber HR, Savvides SN, Karplus PA, 2008. Catalytic cycle of human glutathione reductase near 1 Å resolution. *J Mol Biol* **382**: 371-384.

- 88 Morin C, Besset T, Moutet JC, Fayolle M, Bruckner M, Limosin D, Becker K, Davioud-Charvet E, 2008. The aza-analogues of 1,4-naphthoquinones are potent substrates and inhibitors of plasmodial thioredoxin and glutathione reductases and of human erythrocyte glutathione reductase. *Org Biomol Chem* **6**: 2731-2742.
- 89 Rautio J, Kumpulainen H, Heimbach T, Oliyai R, Oh D, Jaervinen T, Savolainen J, 2008. Prodrugs: design and clinical applications. *Nat Rev Drug Discovery* **7**: 255-270.
- 90 Parise FR, Polli MC, Barberato FS, Garcia M, Ferreira EI, 2010. Prodrugs available on the Brazilian pharmaceutical market and their corresponding bioactivation pathways. *Braz J Pharm Sci* **46**: 393-420.
- 91 Huttunen KM, Raunio H, Rautio J, 2011. Prodrugs - from serendipity to rational design. *Pharmacol Rev* **63**: 750-771.
- 92 Ho PM, Maddox TM, Wang L, Fihn SD, Jesse RL, Peterson ED, Rumsfeld JS, 2009. Risk of adverse outcomes associated with concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors following acute coronary syndrome. *JAMA* **301**: 937-944.
- 93 Walgren JL, Mitchell MD, Thompson DC, 2005. Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit Rev Toxicol* **35**: 325-361.
- 94 Schubert-Zsilavec M, 2011. Arzneimittelrücknahmen: Rückrufe im Rückblick. *Pharm Ztg* **156**: 2590-2593.
- 95 Roth RA, Ganey PE, 2010. Intrinsic versus idiosyncratic drug-induced hepatotoxicity - two villains or one? *J Pharmacol Exp Ther* **332**: 692-697.
- 96 Amar PJ, Schiff ER, 2007. Acetaminophen safety and hepatotoxicity - where do we go from here? *Expert Opin Drug Saf* **6**: 341-355.
- 97 Stedman C, 2002. Herbal hepatotoxicity. *Semin Liver Dis* **22**: 195-206.
- 98 Stickel F, Patsenker E, Schuppan D, 2005. Herbal hepatotoxicity. *J Hepatol* **43**: 901-910.
- 99 Johnson BM, Qiu SX, Zhang S, Zhang F, Burdette JE, Yu L, Bolton JL, van Breemen RB, 2003. Identification of novel electrophilic metabolites of *piper methysticum* Forst (kava). *Chem Res Toxicol* **16**: 733-740.
- 100 Johnson BM, van Breemen RB, 2003. In vitro formation of quinoid metabolites of the dietary supplement *Cimicifuga racemosa* (black cohosh). *Chem Res Toxicol* **16**: 838-846.
- 101 Guengerich FP, 2008. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* **21**: 70-83.
- 102 Guengerich FP, 2003. Cytochrome P450 oxidations in the generation of reactive electrophiles: epoxidation and related reactions. *Arch Biochem Biophys* **409**: 59-71.
- 103 Kalgutkar AS, Gardner I, Obach RS, Shaffer CL, Callegari E, Henne KR, Mutlib AE, Dalvie DK, Lee JS, Nakai Y, O'Donnell JP, Boer J, Harriman SP, 2005. A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. *Curr Drug Metab* **6**: 161-225.

- 104 Ma S, Subramanian R, 2006. Detecting and characterizing reactive metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **41**: 1121-1139.
- 105 Wen B, Fitch WL, 2009. Analytical strategies for the screening and evaluation of chemically reactive drug metabolites. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **5**: 39-55.
- 106 Evans DC, Watt AP, Nicoll-Griffith DA, Baillie TA, 2004. Drug-protein adducts: an industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development. *Chem Res Toxicol* **17**: 3-16.
- 107 Yan Z, Caldwell GW, 2004. Stable-isotope trapping and high-throughput screenings of reactive metabolites using the isotope MS signature. *Anal Chem* **76**: 6835-6847.
- 108 Castro-Perez J, Plumb R, Liang L, Yang E, 2005. A high-throughput liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for screening glutathione conjugates using exact mass neutral loss acquisition. *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**: 798-804.
- 109 Guengerich FP, 1996. In vitro techniques for studying drug metabolism. *J Pharmacokinet Biopharm* **24**: 521-533.
- 110 Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH, 2003. An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol Appl Pharmacol* **189**: 233-246.
- 111 Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R, 2006. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2**: 875-894.
- 112 Lipscomb JC, Poet TS, 2008. In vitro measurements of metabolism for application in pharmacokinetic modeling. *Pharmacol Ther* **118**: 82-103.
- 113 Mitoma C, Posner HS, Reitz HC, Udenfriend S, 1956. Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Arch Biochem Biophys* **61**: 431-441.
- 114 Pearce RE, McIntyre CJ, Madan A, Sanzgiri U, Draper AJ, Bullock PL, Cook DC, Burton LA, Latham J, Nevins C, Parkinson A, 1996. Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity. *Arch Biochem Biophys* **331**: 145-169.
- 115 Langner A, Borchert H-H, Mehnert W, 2011. Biopharmazie: Pharmakokinetik – Bioverfügbarkeit – Biotransformation, 4. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- 116 Gonzalez FJ, Korzekwa KR, 1995. Cytochromes P450 expression systems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**: 369-390.
- 117 Tolonen A, Turpeinen M, Pelkonen O, 2009. Liquid chromatography-mass spectrometry in in vitro drug metabolite screening. *Drug Discov Today* **14**: 120-133.
- 118 Unger M, Frank A, 2004. Simultaneous determination of the inhibitory potency of herbal extracts on the activity of six major cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography/mass spectrometry and automated online extraction. *Rapid Commun Mass Spectrom* **18**: 2273-2281.

- 119 Prakash C, Shaffer CL, Nedderman A, 2007. Analytical strategies for identifying drug metabolites. *Mass Spectrom Rev* **26**: 340-369.
- 120 Michaelis L, Menten ML, 1913. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z* **49**: 333-369.
- 121 Atkins WM, 2005. Non-Michaelis-Menten kinetics in cytochrome P450-catalyzed reactions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 291-310.
- 122 Venkatakrisnan K, von Moltke LL, Greenblatt DJ, 2001. Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *J Clin Pharmacol* **41**: 1149-1179.
- 123 Tracy TS, Hummel MA, 2004. Modeling kinetic data from in vitro drug metabolism enzyme experiments. *Drug Metab Rev* **36**: 231-242.
- 124 Hill AV, 1910. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol* **40(Suppl)**: iv-vii.
- 125 Bisswanger H, 2000. Enzymkinetik, 3. Auflage, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- 126 Lineweaver H, Burk D, 1934. Determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc* **56**: 658-666.
- 127 Eadie GS, 1942. The inhibition of cholinesterase by physostigmine and prostigmine. *J Biol Chem* **146**: 85-93.
- 128 Hofstee BHJ, 1952. The evaluation of the constants V_m and K_m in enzyme reactions. *Science* **116**: 329-331.
- 129 Scatchard G, 1949. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* **51**: 660-672.
- 130 Hanes CS, 1932. Studies on plant amylases. I. Effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem J* **26**: 1406-1421.
- 131 Bernus I, Dickinson RG, Hooper WD, Eadie MJ, 1994. Early stage autoinduction of carbamazepine metabolism in humans. *Eur J Clin Pharmacol* **47**: 355-360.
- 132 Madabushi R, Frank B, Drewelow B, Derendorf H, Butterweck V, 2006. Hyperforin in St. John's wort drug interactions. *Eur J Clin Pharmacol* **62**: 225-233.
- 133 Maronpot RR, Yoshizawa K, Nyska A, Harada T, Flake G, Mueller G, Singh B, Ward JM, 2010. Hepatic enzyme induction: histopathology. *Toxicol Pathol* **38**: 776-795.
- 134 Lin HL, Kent UM, Hollenberg PF, 2002. Mechanism-based inactivation of cytochrome P450 3A4 by 17 α -ethynylestradiol: evidence for heme destruction and covalent binding to protein. *J Pharmacol Exp Ther* **301**: 160-167.
- 135 Grimm SW, Einolf HJ, Hall SD, He K, Lim HK, Ling KH, Lu C, Nomeir AA, Seibert E, Skordos KW, Tonn GR, van Horn R, Wang RW, Wong YN, Yang TJ, Obach RS, 2009. The conduct of in vitro studies to address time-dependent inhibition of drug-metabolizing enzymes: a perspective of the

- pharmaceutical research and manufacturers of America. *Drug Metab Dispos* **37**: 1355-1370.
- 136 Kitz R, Wilson IB, 1962. Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J Biol Chem* **237**: 3245-3249.
- 137 Andersson T, Andren K, Cederberg C, Edvardsson G, Heggelund A, Lundborg P, 1990. Effect of omeprazole and cimetidine on plasma diazepam levels. *Eur J Clin Pharmacol* **39**: 51-54.
- 138 Dixon M, 1953. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J* **55**: 170-171.
- 139 Cornish-Bowden A, 1974. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem J* **137**: 143-144.
- 140 Cheng Y, Prusoff WH, 1973. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**: 3099-3108.
- 141 Brandt RB, Laux JE, Yates SW, 1987. Calculation of inhibitor K_i and inhibitor type from the concentration of inhibitor for 50 % inhibition for Michaelis-Menten enzymes. *Biochem Med Metab Biol* **37**: 344-349.
- 142 Unger M, 2008. Neue In-vitro-Methoden zur Untersuchung der Inhibition von Cytochrom-P450-Enzymen und UDP-Glucuronosyltransferasen durch pflanzliche Arzneidrogen. Habilitationsschrift, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- 143 Frank A, 2009. Untersuchungen zur Anwendbarkeit und Validität von In-vitro-Methoden bezüglich der Inhibition von Cytochrom-P450-Enzymen durch Arzneipflanzenextrakte. Dissertation, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- 144 Crespi CL, Stresser DM, 2000. Fluorometric screening for metabolism-based drug-drug interactions. *J Pharmacol Toxicol Methods* **44**: 325-331.
- 145 Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB, 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**: 7130-7139.
- 146 Ellman GL, 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**: 70-77.
- 147 Dansette PM, Libraire J, Bertho G, Mansuy D, 2009. Metabolic oxidative cleavage of thioesters: evidence for the formation of sulfenic acid intermediates in the bioactivation of the antithrombotic prodrugs ticlopidine and clopidogrel. *Chem Res Toxicol* **22**: 369-373.
- 148 Takahashi M, Pang H, Kawabata K, Farid NA, Kurihara A, 2008. Quantitative determination of clopidogrel active metabolite in human plasma by LC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* **48**: 1219-1224.
- 149 Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, Uzabiaga MF, Fedeli O, Savi P, Pascal M, Herbert JM, Maffrand JP, Picard C, 2002. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos* **30**: 1288-1295.
- 150 Farid NA, McIntosh M, Garofolo F, Wong E, Shwajch A, Kennedy M, Young M, Sarkar P, Kawabata K, Takahashi M, Pang H, 2007. Determination of the active and inactive metabolites of prasugrel in human plasma by liquid

- chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **21**: 169-179.
- 151 Dansette PM, Thebault S, Bertho G, Mansuy D, 2010. Formation and fate of a sulfenic acid intermediate in the metabolic activation of the antithrombotic prodrug prasugrel. *Chem Res Toxicol* **23**: 1268-1274.
- 152 Hagihara K, Kazui M, Kurihara A, Iwabuchi H, Ishikawa M, Kobayashi H, Tanaka N, Okazaki O, Farid NA, Ikeda T, 2010. Biotransformation of prasugrel, a novel thienopyridine antiplatelet agent, to the pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* **38**: 898-904.
- 153 Tang M, Mukundan M, Yang J, Charpentier N, LeCluyse EL, Black C, Yang D, Shi D, Yan B, 2006. Antiplatelet agents aspirin and clopidogrel are hydrolyzed by distinct carboxylesterases, and clopidogrel is transesterificated in the presence of ethyl alcohol. *J Pharmacol Exp Ther* **319**: 1467-1476.
- 154 Hagihara K, Kazui M, Kurihara A, Yoshiike M, Honda K, Okazaki O, Farid NA, Ikeda T, 2009. A possible mechanism for the differences in efficiency and variability of active metabolite formation from thienopyridine antiplatelet agents, prasugrel and clopidogrel. *Drug Metab Dispos* **37**: 2145-2152.
- 155 Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A, 2010. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* **38**: 92-99.
- 156 Drepper MD, Spahr L, Frossard JL, 2012. Clopidogrel and proton pump inhibitors - where do we stand in 2012? *World J Gastroenterol* **18**: 2161-2171.
- 157 Hagihara K, Nishiya Y, Kurihara A, Kazui M, Farid NA, Ikeda T, 2008. Comparison of human cytochrome P450 inhibition by the thienopyridines prasugrel, clopidogrel, and ticlopidine. *Drug Metab Pharmacokinet* **23**: 412-420.
- 158 Ko JW, Sukhova N, Thacker D, Chen P, Flockhart DA, 1997. Evaluation of omeprazole and lansoprazole as inhibitors of cytochrome P450 isoforms. *Drug Metab Dispos* **25**: 853-862.
- 159 Liu KH, Kim MJ, Shon JH, Moon YS, Seol SY, Kang W, Cha IJ, Shin JG, 2005. Stereoselective inhibition of cytochrome P450 forms by lansoprazole and omeprazole in vitro. *Xenobiotica* **35**: 27-38.
- 160 Andersson T, Miners JO, Veronese ME, Tassaneeyakul W, Meyer UA, Birkett DJ, 1993. Identification of human liver cytochrome P450 isoforms mediating omeprazole metabolism. *Br J Clin Pharmacol* **36**: 521-530.
- 161 Chiba K, Kobayashi K, Manabe K, Tani M, Kamataki T, Ishizaki T, 1993. Oxidative metabolism of omeprazole in human liver microsomes: cosegregation with S-mephenytoin 4'-hydroxylation. *J Pharmacol Exp Ther* **266**: 52-59.
- 162 Karam WG, Goldstein JA, Lasker JM, Ghanayem BI, 1996. Human CYP2C19 is a major omeprazole 5-hydroxylase, as demonstrated with recombinant cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **24**: 1081-1087.

- 163 Yamazaki H, Inoue K, Shaw PM, Checovich WJ, Guengerich FP, Shimada T, 1997. Different contributions of cytochrome P450 2C19 and 3A4 in the oxidation of omeprazole by human liver microsomes: effects of contents of these two forms in individual human samples. *J Pharmacol Exp Ther* **283**: 434-442.
- 164 Abelo A, Andersson TB, Antonsson M, Naudot AK, Skanberg I, Weidolf L, 2000. Stereoselective metabolism of omeprazole by human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **28**: 966-972.
- 165 Li XQ, Weidolf L, Simonsson R, Andersson TB, 2005. Enantiomer/enantiomer interactions between the S- and R- isomers of omeprazole in human cytochrome P450 enzymes: major role of CYP2C19 and CYP3A4. *J Pharmacol Exp Ther* **315**: 777-787.
- 166 Kreutzkamp B, 2009. Sekundärprävention mit Clopidogrel - CYP2C19*2-Genvariante als häufige Ursache für Therapieversagen. *Arzneimitteltherapie* **27**: 288-289.
- 167 Ogilvie BW, Yerino P, Kazmi F, Buckley DB, Rostami-Hodjegan A, Paris BL, Toren P, Parkinson A, 2011. The proton pump inhibitor, omeprazole, but not lansoprazole or pantoprazole, is a metabolism-dependent inhibitor of CYP2C19: implications for coadministration with clopidogrel. *Drug Metab Dispos* **39**: 2020-2033.
- 168 Breitzkreutz J, 2009. Technologische und biopharmazeutische Aspekte. Thrombozytenaggregationshemmer zur peroralen Anwendung. *Pharm Unserer Zeit* **38**: 330-337.
- 169 Bouman HJ, Schomig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhauser C, Waldmann C, Schmalz HG, ten Berg JM, Taubert D, 2011. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med* **17**: 110-116.
- 170 Dansette PM, Rosi J, Bertho G, Mansuy D, 2012. Cytochromes P450 catalyze both steps of the major pathway of clopidogrel bioactivation, whereas paraoxonase catalyzes the formation of a minor thiol metabolite isomer. *Chem Res Toxicol* **25**: 348-356.
- 171 Williams ET, Jones KO, Ponsler GD, Lowery SM, Perkins EJ, Wrighton SA, Ruterbories KJ, Kazui M, Farid NA, 2008. The biotransformation of prasugrel, a new thienopyridine prodrug, by the human carboxylesterases 1 and 2. *Drug Metab Dispos* **36**: 1227-1232.
- 172 Chen CH, Yang JC, Uang YS, Lin CJ, 2012. Differential inhibitory effects of proton pump inhibitors on the metabolism and antiplatelet activities of clopidogrel and prasugrel. *Biopharm Drug Dispos* **33**: 278-283.
- 173 Higashino K, Takahashi Y, Yamamura Y, 1972. Release of phenyl acetate esterase from liver microsomes by carbon tetrachloride. *Clin Chim Acta* **41**: 313-320.
- 174 Zhou J, Ain RJ, Riley CM, Schowen RL, 1995. Spectrophotometric assay for porcine liver esterase activity. *Anal Biochem* **231**: 265-267.

- 175 Fujiyama N, Miura M, Kato S, Sone T, Isobe M, Satoh S, 2010. Involvement of carboxylesterase 1 and 2 in the hydrolysis of mycophenolate mofetil. *Drug Metab Dispos* **38**: 2210-2217.
- 176 Krüger P, Daneshfar R, Eckert GP, Klein J, Volmer DA, Bahr U, Müller WE, Karas M, Schubert-Zsilavec M, Abdel-Tawab M, 2008. Metabolism of boswellic acids in vitro and in vivo. *Drug Metab Dispos* **36**: 1135-1142.
- 177 Walsky RL, Obach RS, 2004. Validated assays for human cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos* **32**: 647-660.
- 178 Tang C, Shou M, Rodrigues AD, 2000. Substrate-dependent effect of acetonitrile on human liver microsomal cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) activity. *Drug Metab Dispos* **28**: 567-572.
- 179 Vuppugalla R, Chang SY, Zhang H, Marathe PH, Rodrigues DA, 2007. Effect of commonly used organic solvents on the kinetics of cytochrome P450 2B6- and 2C8-dependent activity in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **35**: 1990-1995.
- 180 Kobayashi K, Nakajima M, Chiba K, Yamamoto T, Tani M, Ishizaki T, Kuroiwa Y, 1998. Inhibitory effects of antiarrhythmic drugs on phenacetin O-deethylation catalysed by human CYP1A2. *Br J Clin Pharmacol* **45**: 361-368.
- 181 Ching MS, Blake CL, Malek NA, Angus PW, Ghabrial H, 2001. Differential inhibition of human CYP1A1 and CYP1A2 by quinidine and quinine. *Xenobiotica* **31**: 757-767.
- 182 Spaldin V, Madden S, Adams DA, Edwards RJ, Davies DS, Park BK, 1995. Determination of human hepatic cytochrome P4501A2 activity in vitro use of tacrine as an isoenzyme-specific probe. *Drug Metab Dispos* **23**: 929-934.
- 183 Obach RS, Reed-Hagen AE, 2002. Measurement of Michaelis constants for cytochrome P450-mediated biotransformation reactions using a substrate depletion approach. *Drug Metab Dispos* **30**: 831-837.
- 184 Soucek P, 1999. Novel sensitive high-performance liquid chromatographic method for assay of coumarin 7-hydroxylation. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **734**: 23-29.
- 185 Shimada T, Yamazaki H, Guengerich FP, 1996. Ethnic-related differences in coumarin 7-hydroxylation activities catalyzed by cytochrome P4502A6 in liver microsomes of Japanese and Caucasian populations. *Xenobiotica* **26**: 395-403.
- 186 Pearce R, Greenway D, Parkinson A, 1992. Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes: effects on coumarin, dicumarol, and testosterone oxidation. *Arch Biochem Biophys* **298**: 211-225.
- 187 Hesse LM, Venkatakrisnan K, Court MH, von Moltke LL, Duan SX, Shader RI, Greenblatt DJ, 2000. CYP2B6 mediates the in vitro hydroxylation of bupropion: potential drug interactions with other antidepressants. *Drug Metab Dispos* **28**: 1176-1183.
- 188 Li XQ, Bjorkman A, Andersson TB, Ridderstrom M, Masimirembwa CM, 2002. Amodiaquine clearance and its metabolism to N-desethylamodiaquine is

- mediated by CYP2C8: a new high affinity and turnover enzyme-specific probe substrate. *J Pharmacol Exp Ther* **300**: 399-407.
- 189 Dravid PV, Frye RF, 2008. Determination of *N*-desethylamodiaquine by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry: application to in vitro drug metabolism studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **863**: 129-134.
- 190 Miners JO, Smith KJ, Robson RA, McManus ME, Veronese ME, Birkett DJ, 1988. Tolbutamide hydroxylation by human liver microsomes. Kinetic characterisation and relationship to other cytochrome P-450 dependent xenobiotic oxidations. *Biochem Pharmacol* **37**: 1137-1144.
- 191 Meier UT, Dayer P, Male PJ, Kronbach T, Meyer UA, 1985. Mephenytoin hydroxylation polymorphism: characterization of the enzymatic deficiency in liver microsomes of poor metabolizers phenotyped in vivo. *Clin Pharmacol Ther* **38**: 488-494.
- 192 Hall SD, Guengerich FP, Branch RA, Wilkinson GR, 1987. Characterization and inhibition of mephenytoin 4-hydroxylase activity in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **240**: 216-222.
- 193 Shimada T, Shea JP, Guengerich FP, 1985. A convenient assay for mephenytoin 4-hydroxylase activity of human liver microsomal cytochrome P-450. *Anal Biochem* **147**: 174-179.
- 194 Yin H, Racha J, Li SY, Olejnik N, Satoh H, Moore D, 2000. Automated high throughput human CYP isoform activity assay using SPE-LC/MS method: application in CYP inhibition evaluation. *Xenobiotica* **30**: 141-154.
- 195 Relling MV, Evans WE, Fonne-Pfister R, Meyer UA, 1989. Anticancer drugs as inhibitors of two polymorphic cytochrome P450 enzymes, debrisoquin and mephenytoin hydroxylase, in human liver microsomes. *Cancer Res* **49**: 68-71.
- 196 Chiba K, Saitoh A, Koyama E, Tani M, Hayashi M, Ishizaki T, 1994. The role of *S*-mephenytoin 4'-hydroxylase in imipramine metabolism by human liver microsomes: a two-enzyme kinetic analysis of *N*-demethylation and 2-hydroxylation. *Br J Clin Pharmacol* **37**: 237-242.
- 197 Lemoine A, Gautier JC, Azoulay D, Kiffel L, Belloc C, Guengerich FP, Maurel P, Beaune P, Leroux JP, 1993. Major pathway of imipramine metabolism is catalyzed by cytochromes P-450 1A2 and P-450 3A4 in human liver. *Mol Pharmacol* **43**: 827-832.
- 198 Kerry NL, Somogyi AA, Bochner F, Mikus G, 1994. The role of CYP2D6 in primary and secondary oxidative metabolism of dextromethorphan: in vitro studies using human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* **38**: 243-248.
- 199 Schmider J, Greenblatt DJ, Fogelman SM, von Moltke LL, Shader RI, 1997. Metabolism of dextromethorphan in vitro: involvement of cytochromes P450 2D6 and 3A3/4, with a possible role of 2E1. *Biopharm Drug Dispos* **18**: 227-240.
- 200 Peter R, Bocker R, Beaune PH, Iwasaki M, Guengerich FP, Yang CS, 1990. Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIIE1. *Chem Res Toxicol* **3**: 566-573.

- 201 Shimada T, Tsumura F, Yamazaki H, 1999. Prediction of human liver microsomal oxidations of 7-ethoxycoumarin and chlorzoxazone with kinetic parameters of recombinant cytochrome P-450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **27**: 1274-1280.
- 202 Hanioka N, Yamamoto M, Iwabu H, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Naito S, Shimizu T, Masuda K, Katsu T, Narimatsu S, 2007. Functional characterization of human and cynomolgus monkey cytochrome P450 2E1 enzymes. *Life Sci* **81**: 1436-1445.
- 203 Tassaneeyakul W, Veronese ME, Birkett DJ, Gonzalez FJ, Miners JO, 1993. Validation of 4-nitrophenol as an in vitro substrate probe for human liver CYP2E1 using cDNA expression and microsomal kinetic techniques. *Biochem Pharmacol* **46**: 1975-1981.
- 204 Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Jones DR, Eckstein J, Ruterbories K, Hamman MA, Hall SD, Wrighton SA, 2002. Comparative metabolic capabilities of CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A7. *Drug Metab Dispos* **30**: 883-891.
- 205 Thummel KE, O'Shea D, Paine MF, Shen DD, Kunze KL, Perkins JD, Wilkinson GR, 1996. Oral first-pass elimination of midazolam involves both gastrointestinal and hepatic CYP3A-mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther* **59**: 491-502.
- 206 von Moltke LL, Greenblatt DJ, Schmider J, Duan SX, Wright CE, Harmatz JS, Shader RI, 1996. Midazolam hydroxylation by human liver microsomes in vitro: inhibition by fluoxetine, norfluoxetine, and by azole antifungal agents. *J Clin Pharmacol* **36**: 783-791.
- 207 Lee CA, Kadwell SH, Kost TA, Serabjit-Singh CJ, 1995. 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**: 157-167.
- 208 Kobayashi K, Nakajima M, Oshima K, Shimada N, Yokoi T, Chiba K, 1999. Involvement of CYP2E1 as a low-affinity enzyme in phenacetin O-deethylation in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **27**: 860-865.
- 209 Wester MR, Lasker JM, Johnson EF, Raucy JL, 2000. CYP2C19 participates in tolbutamide hydroxylation by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **28**: 354-359.
- 210 Coller JK, Somogyi AA, Bochner F, 1999. Comparison of (S)-mephenytoin and proguanil oxidation in vitro: contribution of several CYP isoforms. *Br J Clin Pharmacol* **48**: 158-167.
- 211 von Moltke LL, Greenblatt DJ, Grassi JM, Granda BW, Venkatakrishnan K, Schmider J, Harmatz JS, Shader RI, 1998. Multiple human cytochromes contribute to biotransformation of dextromethorphan in-vitro: role of CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A. *J Pharm Pharmacol* **50**: 997-1004.
- 212 Ono S, Hatanaka T, Hotta H, Tsutsui M, Satoh T, Gonzalez FJ, 1995. Chlorzoxazone is metabolized by human CYP1A2 as well as by human CYP2E1. *Pharmacogenetics* **5**: 143-150.

- 213 Zerilli A, Ratanasavanh D, Lucas D, Goasduff T, Dreano Y, Menard C, Picart D, Berthou F, 1997. Both cytochromes P450 2E1 and 3A are involved in the *o*-hydroxylation of *p*-nitrophenol, a catalytic activity known to be specific for P450 2E1. *Chem Res Toxicol* **10**: 1205-1212.
- 214 Hamaoka N, Oda Y, Hase I, Asada A, 2001. Cytochrome P4502B6 and 2C9 do not metabolize midazolam: kinetic analysis and inhibition study with monoclonal antibodies. *Br J Anaesth* **86**: 540-544.
- 215 Draper AJ, Madan A, Smith K, Parkinson A, 1998. Development of a non-high pressure liquid chromatography assay to determine testosterone hydroxylase (CYP3A) activity in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **26**: 299-304.
- 216 Akkemik E, Budak H, Ciftci M, 2010. Effects of some drugs on human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase: an in vitro study. *J Enzyme Inhib Med Chem* **25**: 871-875.
- 217 Kronbach T, Mathys D, Gut J, Catin T, Meyer UA, 1987. High-performance liquid chromatographic assays for bufuralol 1'-hydroxylase, debrisoquine 4-hydroxylase, and dextromethorphan *O*-demethylase in microsomes and purified cytochrome P-450 isozymes of human liver. *Anal Biochem* **162**: 24-32.
- 218 Zhang T, Zhu Y, Gunaratna C, 2003. Simultaneous determination of metabolites from multiple cytochrome P450 probe substrates by gradient liquid chromatography with UV detection. *Curr Sep* **20**: 87-91.
- 219 Khan KK, He YQ, Domanski TL, Halpert JR, 2002. Midazolam oxidation by cytochrome P450 3A4 and active-site mutants: an evaluation of multiple binding sites and of the metabolic pathway that leads to enzyme inactivation. *Mol Pharmacol* **61**: 495-506.
- 220 Easterbrook J, Lu C, Sakai Y, Li AP, 2001. Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* **29**: 141-144.
- 221 Hickman D, Wang JP, Wang Y, Unadkat JD, 1998. Evaluation of the selectivity of in vitro probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P450 monooxygenase activities. *Drug Metab Dispos* **26**: 207-215.
- 222 Busby WF, Jr., Ackermann JM, Crespi CL, 1999. Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* **27**: 246-249.
- 223 Khojasteh SC, Prabhu S, Kenny JR, Halladay JS, Lu AY, 2011. Chemical inhibitors of cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes: a re-evaluation of P450 isoform selectivity. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **36**: 1-16.
- 224 Rodrigues AD, Surber BW, Yao Y, Wong SL, Roberts EM, 1997. [*O*-ethyl ¹⁴C]phenacetin *O*-deethylase activity in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **25**: 1097-1100.
- 225 Kunze KL, Trager WF, 1993. Isoform-selective mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 1A2 by furafylline. *Chem Res Toxicol* **6**: 649-656.

- 226 Racha JK, Rettie AE, Kunze KL, 1998. Mechanism-based inactivation of human cytochrome P450 1A2 by furafylline: detection of a 1:1 adduct to protein and evidence for the formation of a novel imidazomethide intermediate. *Biochemistry* **37**: 7407-7419.
- 227 Taavitsainen P, Juvonen R, Pelkonen O, 2001. In vitro inhibition of cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes by a potent CYP2A6 inhibitor, *trans*-2-phenylcyclopropylamine (tranylcypromine), and its nonamine analog, cyclopropylbenzene. *Drug Metab Dispos* **29**: 217-222.
- 228 Salsali M, Holt A, Baker GB, 2004. Inhibitory effects of the monoamine oxidase inhibitor tranylcypromine on the cytochrome P450 enzymes CYP2C19, CYP2C9, and CYP2D6. *Cell Mol Neurobiol* **24**: 63-76.
- 229 Richter T, Murdter TE, Heinkele G, Pleiss J, Tatzel S, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM, 2004. Potent mechanism-based inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine. *J Pharmacol Exp Ther* **308**: 189-197.
- 230 Ko JW, Desta Z, Soukhova NV, Tracy T, Flockhart DA, 2000. In vitro inhibition of the cytochrome P450 (CYP450) system by the antiplatelet drug ticlopidine: potent effect on CYP2C19 and CYP2D6. *Br J Clin Pharmacol* **49**: 343-351.
- 231 Schmider J, Greenblatt DJ, von Moltke LL, Karsov D, Shader RI, 1997. Inhibition of CYP2C9 by selective serotonin reuptake inhibitors in vitro: studies of phenytoin *p*-hydroxylation. *Br J Clin Pharmacol* **44**: 495-498.
- 232 Kobayashi K, Yamamoto T, Chiba K, Tani M, Ishizaki T, Kuroiwa Y, 1995. The effects of selective serotonin reuptake inhibitors and their metabolites on *S*-mephenytoin 4'-hydroxylase activity in human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* **40**: 481-485.
- 233 Crewe HK, Lennard MS, Tucker GT, Woods FR, Haddock RE, 1992. The effect of selective serotonin re-uptake inhibitors on cytochrome P4502D6 (CYP2D6) activity in human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* **34**: 262-265.
- 234 Ring BJ, Binkley SN, Roskos L, Wrighton SA, 1995. Effect of fluoxetine, norfluoxetine, sertraline and desmethyl sertraline on human CYP3A catalyzed 1'-hydroxy midazolam formation in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **275**: 1131-1135.
- 235 Walsky RL, Astuccio AV, Obach RS, 2006. Evaluation of 227 drugs for in vitro inhibition of cytochrome P450 2B6. *J Clin Pharmacol* **46**: 1426-1438.
- 236 Kobayashi K, Ishizuka T, Shimada N, Yoshimura Y, Kamijima K, Chiba K, 1999. Sertraline *N*-demethylation is catalyzed by multiple isoforms of human cytochrome P-450 in vitro. *Drug Metab Dispos* **27**: 763-766.
- 237 Obach RS, Cox LM, Tremaine LM, 2005. Sertraline is metabolized by multiple cytochrome P450 enzymes, monoamine oxidases, and glucuronyl transferases in human: an in vitro study. *Drug Metab Dispos* **33**: 262-270.
- 238 Chiba M, Xu X, Nishime JA, Balani SK, Lin JH, 1997. Hepatic microsomal metabolism of montelukast, a potent leukotriene D4 receptor antagonist, in humans. *Drug Metab Dispos* **25**: 1022-1031.

- 239 Walsky RL, Gaman EA, Obach RS, 2005. Examination of 209 drugs for inhibition of cytochrome P450 2C8. *J Clin Pharmacol* **45**: 68-78.
- 240 Walsky RL, Obach RS, Gaman EA, Gleeson JP, Proctor WR, 2005. Selective inhibition of human cytochrome P450 2C8 by montelukast. *Drug Metab Dispos* **33**: 413-418.
- 241 Obach RS, 2000. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J Pharmacol Exp Ther* **294**: 88-95.
- 242 Zou L, Harkey MR, Henderson GL, 2002. Effects of herbal components on cDNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. *Life Sci* **71**: 1579-1589.
- 243 Baldwin SJ, Bloomer JC, Smith GJ, Ayrton AD, Clarke SE, Chenery RJ, 1995. Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9. *Xenobiotica* **25**: 261-270.
- 244 Newton DJ, Wang RW, Lu AY, 1995. Cytochrome P450 inhibitors. Evaluation of specificities in the in vitro metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **23**: 154-158.
- 245 Back DJ, Tjia JF, Karbwang J, Colbert J, 1988. In vitro inhibition studies of tolbutamide hydroxylase activity of human liver microsomes by azoles, sulphonamides and quinolines. *Br J Clin Pharmacol* **26**: 23-29.
- 246 Leemann T, Transon C, Dayer P, 1993. Cytochrome P450TB (CYP2C): a major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver. *Life Sci* **52**: 29-34.
- 247 Tassaneeyakul W, Guo LQ, Fukuda K, Ohta T, Yamazoe Y, 2000. Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450. *Arch Biochem Biophys* **378**: 356-363.
- 248 Ching MS, Blake CL, Ghabrial H, Ellis SW, Lennard MS, Tucker GT, Smallwood RA, 1995. Potent inhibition of yeast-expressed CYP2D6 by dihydroquinidine, quinidine, and its metabolites. *Biochem Pharmacol* **50**: 833-837.
- 249 Broly F, Libersa C, Lhermitte M, Bechtel P, Dupuis B, 1989. Effect of quinidine on the dextromethorphan O-demethylase activity of microsomal fractions from human liver. *Br J Clin Pharmacol* **28**: 29-36.
- 250 Galetin A, Clarke SE, Houston JB, 2002. Quinidine and haloperidol as modifiers of CYP3A4 activity: multisite kinetic model approach. *Drug Metab Dispos* **30**: 1512-1522.
- 251 Ono S, Hatanaka T, Hotta H, Satoh T, Gonzalez FJ, Tsutsui M, 1996. Specificity of substrate and inhibitor probes for cytochrome P450s: evaluation of in vitro metabolism using cDNA-expressed human P450s and human liver microsomes. *Xenobiotica* **26**: 681-693.
- 252 Eagling VA, Tjia JF, Back DJ, 1998. Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* **45**: 107-114.

- 253 Chang TK, Gonzalez FJ, Waxman DJ, 1994. Evaluation of triacetyloleandomycin, α -naphthoflavone and diethyldithiocarbamate as selective chemical probes for inhibition of human cytochromes P450. *Arch Biochem Biophys* **311**: 437-442.
- 254 Sheets JJ, Mason JI, 1984. Ketoconazole: a potent inhibitor of cytochrome P-450-dependent drug metabolism in rat liver. *Drug Metab Dispos* **12**: 603-606.
- 255 Gibbs MA, Thummel KE, Shen DD, Kunze KL, 1999. Inhibition of cytochrome P-450 3A (CYP3A) in human intestinal and liver microsomes: comparison of K_i values and impact of CYP3A5 expression. *Drug Metab Dispos* **27**: 180-187.
- 256 Wrighton SA, Ring BJ, 1994. Inhibition of human CYP3A catalyzed 1'-hydroxy midazolam formation by ketoconazole, nifedipine, erythromycin, cimetidine, and nizatidine. *Pharm Res* **11**: 921-924.
- 257 Yamamoto T, Suzuki A, Kohno Y, 2002. Application of microtiter plate assay to evaluate inhibitory effects of various compounds on nine cytochrome P450 isoforms and to estimate their inhibition patterns. *Drug Metab Pharmacokinet* **17**: 437-448.
- 258 Koenigs LL, Peter RM, Thompson SJ, Rettie AE, Trager WF, 1997. Mechanism-based inactivation of human liver cytochrome P450 2A6 by 8-methoxypsoralen. *Drug Metab Dispos* **25**: 1407-1415.
- 259 Wiedenfeld H, Edgar J, 2011. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. *Phytochem Rev* **10**: 137-151.
- 260 Lekehal M, Pessayre D, Lereau JM, Moulis C, Fouraste I, Fau D, 1996. Hepatotoxicity of the herbal medicine germander: metabolic activation of its furano diterpenoids by cytochrome P450 3A depletes cytoskeleton-associated protein thiols and forms plasma membrane blebs in rat hepatocytes. *Hepatology* **24**: 212-218.
- 261 Salminen KA, Meyer A, Jerabkova L, Korhonen LE, Rahnasto M, Juvonen RO, Imming P, Raunio H, 2011. Inhibition of human drug metabolizing cytochrome P450 enzymes by plant isoquinoline alkaloids. *Phytomedicine* **18**: 533-538.
- 262 Unger M, Holzgrabe U, Jacobsen W, Cummins C, Benet LZ, 2002. Inhibition of cytochrome P450 3A4 by extracts and kavalactones of *Piper methysticum* (Kava-Kava). *Planta Med* **68**: 1055-1058.
- 263 Mathews JM, Etheridge AS, Black SR, 2002. Inhibition of human cytochrome P450 activities by kava extract and kavalactones. *Drug Metab Dispos* **30**: 1153-1157.
- 264 Huang Y, Jiang B, Nuntanakorn P, Kennelly EJ, Shord S, Lawal TO, Mahady GB, 2010. Fukinolic acid derivatives and triterpene glycosides from black cohosh inhibit CYP isozymes, but are not cytotoxic to Hep-G2 cells in vitro. *Curr Drug Saf* **5**: 118-124.
- 265 Li J, Gödecke T, Chen S-N, Imai A, Lankin DC, Farnsworth NR, Pauli GF, van Breemen RB, Nikolić D, 2011. In vitro metabolic interactions between black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) and tamoxifen via inhibition of cytochromes P450 2D6 and 3A4. *Xenobiotica* **41**: 1021-1030.

- 266 Donato MT, Jimenez N, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, 2004. Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **32**: 699-706.
- 267 Crespi CL, Miller VP, Penman BW, 1997. Microtiter plate assays for inhibition of human, drug-metabolizing cytochromes P450. *Anal Biochem* **248**: 188-190.
- 268 White IN, 1988. A continuous fluorometric assay for cytochrome P-450-dependent mixed function oxidases using 3-cyano-7-ethoxycoumarin. *Anal Biochem* **172**: 304-310.
- 269 Chauret N, Dobbs B, Lackman RL, Bateman K, Nicoll-Griffith DA, Stresser DM, Ackermann JM, Turner SD, Miller VP, Crespi CL, 2001. The use of 3-[2-(*N,N*-diethyl-*N*-methylammonium)ethyl]-7-methoxy-4-methylcoumarin (AMMC) as a specific CYP2D6 probe in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **29**: 1196-1200.
- 270 Onderwater RC, Venhorst J, Commandeur JN, Vermeulen NP, 1999. Design, synthesis, and characterization of 7-methoxy-4-(aminomethyl)coumarin as a novel and selective cytochrome P450 2D6 substrate suitable for high-throughput screening. *Chem Res Toxicol* **12**: 555-559.
- 271 Huitink GM, 1988. Studies of 7-hydroxycoumarins. *Talanta* **35**: 973-976.
- 272 Sun WC, Gee KR, Haugland RP, 1998. Synthesis of novel fluorinated coumarins: excellent UV-light excitable fluorescent dyes. *Bioorg Med Chem Lett* **8**: 3107-3110.
- 273 Auterhoff H, Kovar K-A, 1998. Identifizierung von Arzneistoffen, 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- 274 Knoll H, Seidel A, Hennig H, Soboleva I, Zaitzev N, Kuzmin MG, 1986. Untersuchungen zu den Sondeneigenschaften von 7-Hydroxy-cumarinen in micellarer Cetyl-triethyl-ammoniumbromid-Lösung - Hilfsmittel zur Beschreibung von micellaren Systemen. *J Prakt Chem* **328**: 558-566.
- 275 Reen RK, Ramakanth S, Wiebel FJ, Jain MP, Singh J, 1991. Dealkylation of 7-methoxycoumarin as assay for measuring constitutive and phenobarbital-inducible cytochrome P450s. *Anal Biochem* **194**: 243-249.
- 276 Mayer RT, Netter KJ, Heubel F, Hahnemann B, Buchheister A, Mayer GK, Burke MD, 1990. 7-Alkoxyquinolines: new fluorescent substrates for cytochrome P450 monooxygenases. *Biochem Pharmacol* **40**: 1645-1655.
- 277 Yamazaki H, Inoue K, Mimura M, Oda Y, Guengerich FP, Shimada T, 1996. 7-Ethoxycoumarin *O*-deethylation catalyzed by cytochromes P450 1A2 and 2E1 in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **51**: 313-319.
- 278 Porrogi P, Kobori L, Kohalmy K, Gulyas J, Vereczkey L, Monostory K, 2008. Limited applicability of 7-methoxy-4-trifluoromethylcoumarin as a CYP2C9-selective substrate. *Pharmacol Rep* **60**: 972-979.
- 279 Stresser DM, Turner SD, Blanchard AP, Miller VP, Crespi CL, 2002. Cytochrome P450 fluorometric substrates: identification of isoform-selective probes for rat CYP2D2 and human CYP3A4. *Drug Metab Dispos* **30**: 845-852.

- 280 Ekins S, VandenBranden M, Ring BJ, Wrighton SA, 1997. Examination of purported probes of human CYP2B6. *Pharmacogenetics* **7**: 165-179.
- 281 Renwick AB, Surry D, Price RJ, Lake BG, Evans DC, 2000. Metabolism of 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin by human hepatic cytochrome P450 isoforms. *Xenobiotica* **30**: 955-969.
- 282 Yu AM, Idle JR, Krausz KW, Kupfer A, Gonzalez FJ, 2003. Contribution of individual cytochrome P450 isozymes to the O-demethylation of the psychotropic β -carboline alkaloids harmaline and harmine. *J Pharmacol Exp Ther* **305**: 315-322.
- 283 Desta Z, Wu GM, Morocho AM, Flockhart DA, 2002. The gastroprokinetic and antiemetic drug metoclopramide is a substrate and inhibitor of cytochrome P450 2D6. *Drug Metab Dispos* **30**: 336-343.
- 284 Nakamura K, Yokoi T, Inoue K, Shimada N, Ohashi N, Kume T, Kamataki T, 1996. CYP2D6 is the principal cytochrome P450 responsible for metabolism of the histamine H₁ antagonist promethazine in human liver microsomes. *Pharmacogenetics* **6**: 449-457.
- 285 Dehal SS, Kupfer D, 1997. CYP2D6 catalyzes tamoxifen 4-hydroxylation in human liver. *Cancer Res* **57**: 3402-3406.
- 286 Douglas KT, Sharma RK, Walmsley JF, Hider RC, 1983. Ionization processes of some harmala alkaloids. *Mol Pharmacol* **23**: 614-618.
- 287 Vert FT, Zabala SI, Olba TA, 1983. Acidity constants of β -carbolines in the ground and excited singlet states. *J Photochem* **23**: 355-368.
- 288 Balon M, Munoz MA, Hidalgo J, Carmona MC, Sanchez M, 1987. Fluorescence characteristics of β -carboline alkaloids in highly concentrated hydroxide solutions. *J Photochem* **36**: 193-204.
- 289 Dieckhaus CM, Fernandez-Metzler CL, King R, Krolkowski PH, Baillie TA, 2005. Negative ion tandem mass spectrometry for the detection of glutathione conjugates. *Chem Res Toxicol* **18**: 630-638.
- 290 Gan J, Harper TW, Hsueh MM, Qu Q, Humphreys WG, 2005. Dansyl glutathione as a trapping agent for the quantitative estimation and identification of reactive metabolites. *Chem Res Toxicol* **18**: 896-903.
- 291 Zhu M, Ma L, Zhang H, Humphreys WG, 2007. Detection and structural characterization of glutathione-trapped reactive metabolites using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry and mass defect filtering. *Anal Chem* **79**: 8333-8341.
- 292 Maggs JL, Williams D, Pirmohamed M, Park BK, 1995. The metabolic formation of reactive intermediates from clozapine, a drug associated with agranulocytosis in man. *J Pharmacol Exp Ther* **275**: 1463-1475.
- 293 Pirmohamed M, Williams D, Madden S, Templeton E, Park BK, 1995. Metabolism and bioactivation of clozapine by human liver in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **272**: 984-990.
- 294 Dragovic S, Boerma JS, van Bergen L, Vermeulen NP, Commandeur JN, 2010. Role of human glutathione S-transferases in the inactivation of reactive metabolites of clozapine. *Chem Res Toxicol* **23**: 1467-1476.

- 295 Jian W, Yao M, Zhang D, Zhu M, 2009. Rapid detection and characterization of in vitro and urinary *N*-acetyl-L-cysteine conjugates using quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and polarity switching. *Chem Res Toxicol* **22**: 1246-1255.
- 296 Dragovic S, Gunness P, Ingelman-Sundberg M, Vermeulen NP, Commandeur JN, 2013. Characterization of human cytochrome P450s involved in the bioactivation of clozapine. *Drug Metab Dispos* **41**: 651-658.
- 297 Hazai E, Vereczkey L, Monostory K, 2002. Reduction of toxic metabolite formation of acetaminophen. *Biochem Biophys Res Commun* **291**: 1089-1094.
- 298 Laine JE, Auriola S, Pasanen M, Juvonen RO, 2009. Acetaminophen bioactivation by human cytochrome P450 enzymes and animal microsomes. *Xenobiotica* **39**: 11-21.
- 299 Soglia JR, Harriman SP, Zhao S, Barberia J, Cole MJ, Boyd JG, Contillo LG, 2004. The development of a higher throughput reactive intermediate screening assay incorporating micro-bore liquid chromatography-micro-electrospray ionization-tandem mass spectrometry and glutathione ethyl ester as an in vitro conjugating agent. *J Pharm Biomed Anal* **36**: 105-116.
- 300 Okada R, Maeda K, Nishiyama T, Aoyama S, Tozuka Z, Hiratsuka A, Ikeda T, Kusuhara H, Sugiyama Y, 2011. Involvement of different human glutathione transferase isoforms in the glutathione conjugation of reactive metabolites of troglitazone. *Drug Metab Dispos* **39**: 2290-2297.
- 301 Pabst MJ, Habig WH, Jakoby WB, 1974. Glutathione S-transferase A. A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration. *J Biol Chem* **249**: 7140-7147.
- 302 Satoh K, 1995. The high non-enzymatic conjugation rates of some glutathione S-transferase (GST) substrates at high glutathione concentrations. *Carcinogenesis* **16**: 869-874.
- 303 Stanley JS, Lay JO, Jr., Miller DW, DeLuca DC, 1989. Identification of the glutathione conjugate of 4-nitroquinoline 1-oxide formed in the reaction catalyzed by murine glutathione transferases. *Carcinogenesis* **10**: 587-591.
- 304 Arttamangkul S, Bhalgat MK, Haugland RP, Diwu Z, Liu J, Klaubert DH, 1999. 5-(Pentafluorobenzoylamino)fluorescein: A selective substrate for the determination of glutathione concentration and glutathione S-transferase activity. *Anal Biochem* **269**: 410-417.
- 305 Fujikawa Y, Urano Y, Komatsu T, Hanaoka K, Kojima H, Terai T, Inoue H, Nagano T, 2008. Design and synthesis of highly sensitive fluorogenic substrates for glutathione S-transferase and application for activity imaging in living cells. *J Am Chem Soc* **130**: 14533-14543.
- 306 Utzinger GE, Strait LA, Tuck LD, 1963. The oxidation of glutathione with formic acid and hydrogen peroxide. *Experientia* **19**: 324-327.
- 307 Deutsch JC, Santhosh-Kumar CR, Kolhouse JF, 1999. Glutathione oxidation in real time by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* **862**: 161-168.

- 308 Aceto A, Di Ilio C, Lo Bello M, Bucciarelli T, Angelucci S, Federici G, 1990. Differential activity of human, rat, mouse and bacteria glutathione transferase isoenzymes towards 4-nitroquinoline 1-oxide. *Carcinogenesis* **11**: 2267-2269.
- 309 Ploemen JH, van Ommen B, van Bladeren PJ, 1990. Inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathione conjugate. *Biochem Pharmacol* **40**: 1631-1635.
- 310 Appiah-Opong R, Commandeur JN, Axson C, Vermeulen NP, 2008. Interactions between cytochromes P450, glutathione S-transferases and Ghanaian medicinal plants. *Food Chem Toxicol* **46**: 3598-3603.
- 311 Awasthi S, Srivastava SK, Ahmad F, Ahmad H, Ansari GA, 1993. Interactions of glutathione S-transferase-pi with ethacrynic acid and its glutathione conjugate. *Biochim Biophys Acta* **10**: 173-178.
- 312 Hayeshi R, Mutingwende I, Mavengere W, Masiyanise V, Mukanganyama S, 2007. The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin. *Food Chem Toxicol* **45**: 286-295.
- 313 Kimura Y, Ito H, Ohnishi R, Hatano T, 2010. Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. *Food Chem Toxicol* **48**: 429-435.
- 314 Das M, Singh SV, Mukhtar H, Awasthi YC, 1986. Differential inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by plant phenols. *Biochem Biophys Res Commun* **141**: 1170-1176.
- 315 Mize CE, Langdon RG, 1962. Hepatic glutathione reductase. I. Purification and general kinetic properties. *J Biol Chem* **237**: 1589-1595.
- 316 Ulusu NN, Tandogan B, 2007. Purification and kinetic properties of glutathione reductase from bovine liver. *Mol Cell Biochem* **303**: 45-51.
- 317 Roth M, 1971. Fluorescence reaction for amino acids. *Anal Chem* **43**: 880-882.
- 318 de Montigny P, Stobaugh JF, Givens RS, Carlson RG, Srinivasachar K, Sternson LA, Higuchi T, 1987. Naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde/cyanide ion: a rationally designed fluorogenic reagent for primary amines. *Analytical Chemistry* **59**: 1096-1101.
- 319 Fahey RC, Newton GL, Dorian R, Kosower EM, 1981. Analysis of biological thiols: quantitative determination of thiols at the picomole level based upon derivatization with monobromobimanes and separation by cation-exchange chromatography. *Anal Biochem* **111**: 357-365.
- 320 Ghosh PB, Whitehouse MW, 1968. 7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole: a new fluorogenic reagent for amino acids and other amines. *Biochem J* **108**: 155-156.
- 321 Russell J, McKeown JA, Hensman C, Smith WE, Reglinski J, 1997. HPLC determination of biologically active thiols using pre-column derivatisation with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *J Pharm Biomed Anal* **15**: 1757-1763.

- 322 Chen W, Zhao Y, Seefeldt T, Guan X, 2008. Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. *J Pharm Biomed Anal* **48**: 1375-1380.
- 323 Smith IK, Vierheller TL, Thorne CA, 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal Biochem* **175**: 408-413.
- 324 Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B, 1979. Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) - a reexamination. *Anal Biochem* **94**: 75-81.
- 325 Acan NL, Tezcan EF, 1991. Kinetic properties of sheep brain glutathione reductase. *Enzyme* **45**: 121-124.
- 326 Frank A, Unger M, 2006. Analysis of frankincense from various *Boswellia* species with inhibitory activity on human drug metabolising cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography mass spectrometry after automated on-line extraction. *J Chromatogr A* **1112**: 255-262.