Universität Ulm
Abteilung für Physiologische Chemie
Leiter: Prof. Dr. Thomas Wirth

Aktivität des Cytochrom P450 – abhängigen Monooxygenasesystems in Gegenwart von Alkylphosphocholinen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Torsten Diesinger

Völklingen

2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. K.-M. Debatim

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. D. Müller-Enoch

Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. H. Wolff

Tag der Promotion: 27.04.2006

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis V

1) Einleitung 1

1.1) Natur und Funktion von Cytochrom P450 1
1.1.1) Die chemische Struktur von Cytochrom P450 1
1.1.2) Sauerstoffaktivierung bei Cytochrom P450 3

1.2) Alkylphosphocholine 15
1.2.1) Hexadecylphosphocholin als Antiprotozoenmittel 15
1.2.2) Hexadecylphosphocholin als antitumoröser Wirkstoff 16

1.3) Ziel der Arbeit 19

2) Material und Methoden 20

2.1) Material 20
2.1.1) Handelsprodukte und Hilfsreagentien 20
2.1.2) Lösungen 21

2.2) Methoden 23
2.2.1) Mikrosomenpräparation 23
2.2.2) Rekonstituiertes System 24
2.2.3) Die fluorometrische Bestimmung der Enzymaktivität 25
2.2.4) Die Auswertung der Messergebnisse 27

3) Ergebnisse 32

3.1) Zusammenfassung 32
3.1.1) Evaluation der inhibitorischen 32
3.1.2) Hemmung der Aktivität in Rattenlebermikrosomen 33
3.1.3) Hemmung der Aktivität im rekonstituierten System 34

3.2) rac-OH; Mikrosomenfraktion 37

3.3) rac-OH; rekonstituiertes System 39

3.4) rac-OH; rekonstituiertes System 41

3.5) rac-OC2; Mikrosomenfraktion 43

3.6) rac-OC2; rekonstituiertes System 45

3.7) rac-NC2; Mikrosomenfraktion 47

3.8) rac-NC2; rekonstituiertes System 49

3.9) rac-NH2; rekonstituiertes System 51

4) Diskussion 55

4.1) Etablierte Wirkmechanismen der Alkylphosphocholine 57

4.1.1) Proteinkinasen und Phospholipasen 58

4.1.2) De-novo-Synthese von Phosphatidylcholin (Lecithin) 58

4.1.3) Membranöse Transportsysteme 59

4.1.4) Aktivierung des CD95-Rezeptors 61

4.1.5) Induktion der Zelldifferenzierung 63

4.2 Alkylphosphocholine als Inhibitoren von Cytochrom P450 64

5. Zusammenfassung 72

6. Literaturverzeichnis 74

Widmung und Danksagung 85

Lebenslauf 86

Abkürzungsverzeichnis

A) Allgemeine Abkürzungen

Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asp	Aspartat bzw. Asparaginsäure (in Abhängigkeit vom umgebenden pH-Wert)
BHT	2,6-Ditert-butyl-p-cresol
$^{2,4}C_1$	ein koordinativ an ein Hydroxo-Eisenkomplex (sowohl low-spin als auch high-spin) gebundenes Alkylradikal
CD95	Cluster of Differentiation 95 Rezeptor
CDP-Cholin	Cytidin-5'-diphosphat-Cholin
CMC	kritische mizelläre Konzentration
CO	Kohlenmonoxid
Cpd I	Compound I = Oxo-Eisenporphyrin π-Kation
CSF	Colony stimulating factor
CT	CTP-Cholin-Cytidyl-Transferase
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
CYP	Cytochrom P450
CYP102	Isoenzym 102 der Cytochrom P450-Genfamilie
CYP2B1	Isoenzym 2B1 der Cytochrom P450-Genfamilie
CYP2E1	Isoenzym 2E1 der Cytochrom P450-Genfamilie
CYPcam	aus Pseudomonas putida stammendes CYP
Cys	Cystein

Cyt b_5	Cytochrom b_5
DAG	Diacylglycerol
DLPC	Dilaurylphosphatidylcholin
DMBA	Dimethylbenzanthrazen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES16 OH	1-O-hexadecyl-2-hydroxy-rac-glycero-3-phosphocholin
ET18 OCH_3	1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholin
Fe^{2+}/Fe^{3+}	Eisenion mit der Oxidationszahl 2 bzw. 3
Fp1	NADPH-Cytochrom P450-Reduktase
Fp	2NADH-Cytochrom b5-Reduktase
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat bzw. Glutaminsäure (in Abhängigkeit vom umgebenden pH-Wert)
Gly	Glycin
H_{abs}	Wasserstoffabstraktion
HCl	Salzsäure
HePC	Hexadecylphosphorylcholin bzw Miltefosin
$HePC_6$	Hexadecyl-N,N,N-trimethyl-hexanolamin
HepG2	Hepatoma G2
HL-60 Zelllinie	Zelllinie aus Promyelozyten
H_2O	Wasser
HS	High Spin
IC_{50}	Inhibitor Concentration 50%
IL-2-Rezeptor	Interleukin-2-Rezeptor

IP_3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
KB-Zelllinie	Zelllinie aus humanen Nasopharynx-Karzinomzellen
K_i	Dissozationskoeffizienten des kompetitiven Inhibitors
KIE	kinetic isotope effect
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
K_{mapp}	das in Gegenwart eines Inhibitors beobachtete Km
LS	Low Spin
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MNU	Methylnitrosoharnstoff
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-adinin-dinucleotid-phosphat
Na^+/K^+-ATPase	Natrium/Kalium-Adenosintriphosphatase
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickoxid
O_2	molekularer Sauerstoff
P450	Cytochrom P450
PB	Phenobarbital
pH-Wert	negativ dekadischer Logarithmus der H_3O^+ – Ionenkonzentration
Phe	Phenylalanin
pK-Wert	negativ dekadischer Logarithmus des Zahlenwertes der Gleichgewichtskonstanten K
PKC	Proteinkinase C
PorFe(CH_3OH)	an Häm komplexgebundenes Methanol

Pro	Prolin
PS	Phosphatidylserin
$R^{\bullet}$	Radikal
R_{reb}	Reboundmechanismus
rac-2-NH_2	rac-1-O-phosphocholine-2-amino-octadecan
rac-2-OH	rac-1-O-phosphocholine-2-hydroxy-octadecan
rac-2-N-acetyl	rac-1-O-phosphocholine-2-N-acetyl-octadecan
rac-2-O-acetyl	rac-1-O-phosphocholine-2-O-acetyl-octadecan
R-H	Substrat/Alkan
ROH	Produkt/Alkohol
R-/S-Enantiomer	R(rectus=rechts)-/S(sinister=links)-Enantiomer
Ser	Serin
SRS	substrate-recognition sites: flexible Substratbindungsstelle
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
$^{2,4}T$	Stransition state im low- und high spin Zustand während der Aktivierung der C–H Bindung
Thr	Threonin
$^{4}TS_{Re}$	Intermediat im high-spin Zustand, in welchem ein Elektron in das antibindende Molekülorbital $\sigma^*(d_z^2)$ angehoben wird, wohingegen alle anderen Elektronen in den energetisch niedrigeren Orbitalen verbleiben
TSR	two-state reactivity
V_{max}	maximale Geschwindigkeit der Enzymkatalyse

B) Physikalische Einheiten

g	Gramm
h	Stunde
m	Meter
M	molar (mol/l)
Min	Minute
Mol	Mol
s	Sekunde

C) Präfixe physikalischer Einheiten

k	Kilo (10^{3})
m	Milli (10^{-3})
µ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
p	Pico (10^{-12})

1) Einleitung

Die Einleitung dieser Arbeit gliedert sich in zwei Themenblöcke, über die jeweils mit unterschiedlicher Gewichtung ein inhaltlicher Überblick gegeben werden soll:

- Themenblock 1: Natur und Funktion von Cytochrom P450
- Themenblock 2: Alkylphosphocholine.

Während die Abhandlung des ersten Themenblocks von einer allgemeinen Aussagekraft ist, wird sich der zweite Themenblock speziell mit den zum gegenwärtigen Zeitpunkt vorliegenden wissenschaftlichen Ergebnissen und Theorien beschäftigen.

1.1) Natur und Funktion von Cytochrom P450

1.1.1) Die chemische Struktur von Cytochrom P450

Cytochrom P450 gehört zu der Klasse der Hämoproteine und setzt sich aus einem Protein (Apoprotein oder Apoenzym) und einem Hämmolekül, namentlich Eisen-Protoporphyrin IX, zusammen. Dieses bildet die prosthetische Gruppe von Cytochrom P450 und wird auch in anderen Hämoproteinen (z.B. Myoglobin und Hämoglobin) sowie Enzymen (z.B. Katalase und Peroxidase) gefunden (Halpert, 1998). Der Proteinteil variiert innerhalb der Isoenzymklassen und ist für deren Unterschiede in den physikalischen, chemischen und biochemischen Eigenschaften verantwortlich, welche durch das Molekulargewicht, die Substrat- und Produkt-

spezifität als auch durch die Sensitivität gegenüber Inhibitoren beschrieben werden (Guengerich, 1995).

Die jeweiligen Stickstoffatome der vier Pyrrolringe komplexieren mit dem zentralständigen Eisenion und fixieren dieses in einer oktaedrischen Koordinationssphäre, wodurch die fünfte und sechste Koordinationssphäre räumlich voneinander getrennt werden und somit ein Ligandenaustausch unmöglich wird. Dies erlaubt bei allen Enzymen mit Eisen-Porphyrin-Komplexen als prosthetische Gruppen eine stereospezifische Fixierung des Sauerstoffmoleküls, welches an der sechsten, dem aktiven Zentrum des Moleküls zugewandten Koordinationsstelle, gebunden wird. Über die fünfte Koordinationsstelle ist das Eisenion an das Apoprotein gebunden. Dabei handelt es sich um die Thiolgruppe eines Cysteinrestes, welches sich in der Nähe des carboxyterminalen Endes des Proteins befindet. Die Eisen-Schwefel-Komplexbindung ist ungewöhnlich stark und bewirkt einen Elektronentransfer von einer beträchtlichen Dichte zum Eisenion hin (Black and Coon, 1987; Collman et al., 1976). Dieser elektrochemische Sachverhalt ist für die katalytische Aktivität von Cytochrom P450 unentbehrlich (Ogliaro et al., 2000).

Das Eisenatom existiert formal gesehen in zwei Oxidationszuständen: Fe^{2+} und Fe^{3+}, die sich ihrerseits in den zwei katalytisch relevanten Spin-Stadien low spin (ls) und high spin (hs) befinden können. Die low spin Stadien von Fe^{3+} (S=1/2) und Fe^{2+} (S=0) sind in Hämoproteinen hexakoordiniert, wobei das Eisenion sich in der Ebene der vier Pyrrol-Stickstoffatome befindet und die sechs Liganden die Scheitelpunkte eines Oktaeders besetzen. Die high spin Stadien von Fe^{3+} (S=5/2) und Fe^{2+} (S=2) bewirken jedoch durch die Besetzung der $d(x^2–y^2)$ und $d(z^2)$ Orbitale eine Elektronenverteilung, die im Durchmesser zu groß ist, um mit den vier Stickstoffliganden eine koplanare Konfiguration einzugehen. Somit befindet sich das Eisenion außerhalb der Ebene des Porphyrinrings und bewirkt eine Pentakoordination des Hämoproteins. Diese Konfiguration ist jedoch nur möglich, wenn die Hydroxylgruppe des sechsten Liganden verloren geht, wodurch die Wahrscheinlichkeit ungepaarter Elektronenkonfigurationen zunimmt. Das

fehlende elektrostatische Gegengewicht zum fünften Liganden bewirkt die beschriebene räumliche Verschiebung des zentralen Eisenions in dessen Richtung.

1.1.2) Sauerstoffaktivierung bei Cytochrom P450

Katalytischer Zyklus der Substrathydroxylierung durch Cytochrom P450: von der Substratbindung bis zur Bildung des Oxidants

Der katalytische Zyklus von P450 in seiner Monooxygenasefunktion erfolgt in einer Anzahl verschiedener Schritte, die folgendermaßen zusammengefasst werden können:

a) Bindung des Substrates an die Fe^{3+}-Form des Enzyms, gefolgt von einer Verschiebung zur high-spin Form
b) Erster Reduktionsschritt zur Fe^{2+}-Form
c) Bindung von molekularem Sauerstoff
d) Zweiter Reduktionsschritt
e) Spaltung des molekularen Sauerstoffs

Diese Punkte werden in diesem Abschnitt behandelt.

f) Oxidation des Substrates und Freisetzung des Produktes

Dieser Punkt wird im Abschnitt 1.1.2.2 behandelt.

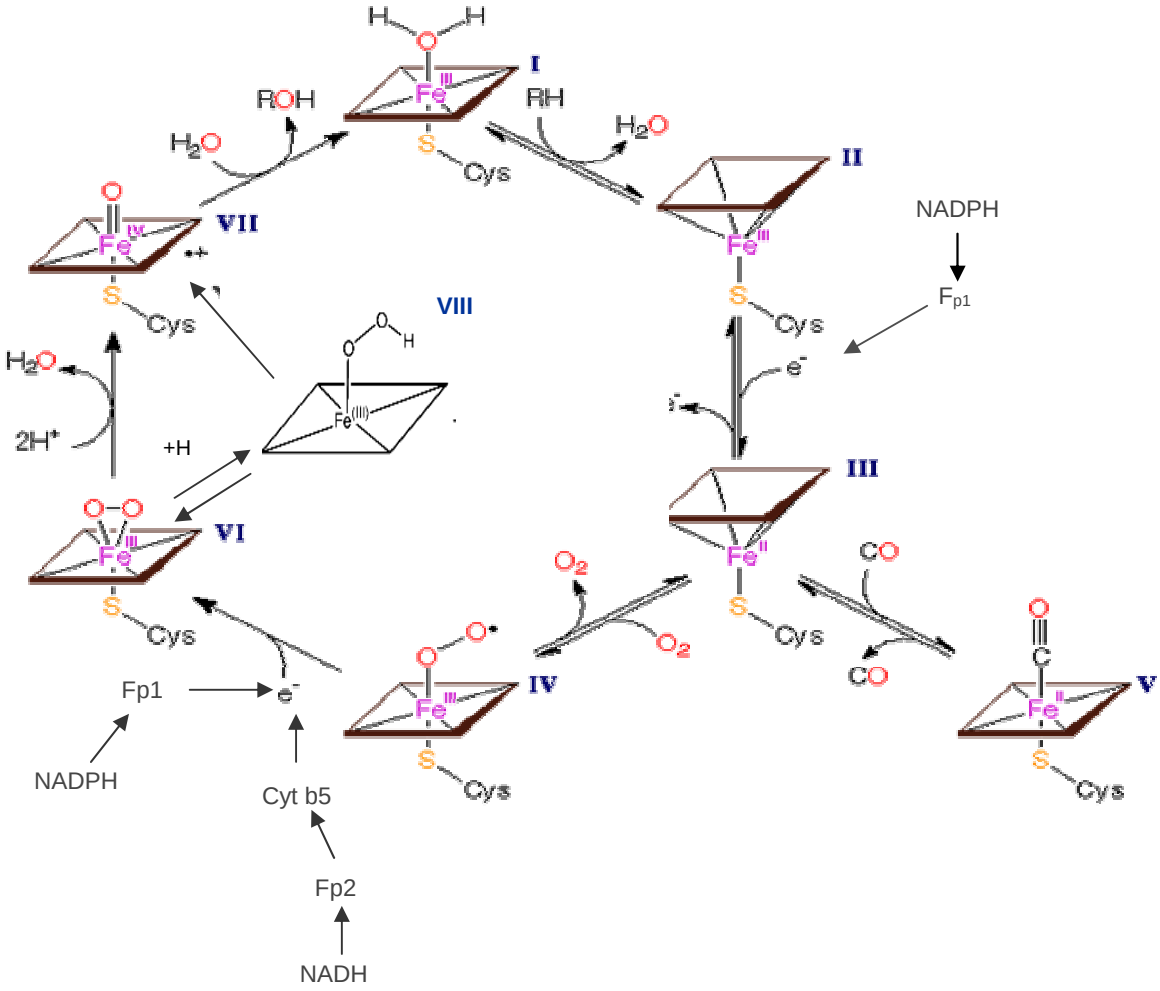


Abbildung 1: Darstellung des katalytischen Zyklus der Substrathydroxylierung durch Cytochrom P450. Die mit römischen Ziffern gekennzeichneten Reaktionsprodukte sowie die daraus resultierenden Reaktionsschritte werden im nachfolgenden Text genau beschrieben.

RH = Substrat; ROH = Produkt; NADPH = Nicotinamid-adinin-dinucleotid-phosphat; NADH = Nicotinamid-adenin-dinucleotid; Fp1 = NADPH-Cytochrom P450-Reduktase; Fp2 = NADH-Cytochrom b5-Reduktase; Cyt b5 = Cytochrom b5.

a) Substratbindung und erster Reduktionsschritt: I – III

Substrate binden an P450 in einer hydrophoben Tasche in der Nähe des katalytischen Zentrums. Dadurch unterscheiden sie sich bedeutend von vielen Liganden, die vorzugsweise mit dem Eisenion interferieren. Die Substratbindung erfolgt meistens im oxidierten Zustand von P450 mit einer Geschwindigkeit von 10^4-10^5 $M^{-1}s^{-1}$ und ist somit um mehrere Größenordnungen schneller als im reduzierten Zustand (Black et al., 1977).

Der erste Schritt im Reaktionszyklus von P450 ist die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes. Die Reaktion der chemisch unterschiedlichen aber obligat lipophilen Substanzen induziert eine strukturelle Veränderung in dem Enzym, welche in der Verschiebung des Eisen-high-spin/-low-spin-Konformationsequilibriums und des Redoxpotentials resultiert:

Das high-spin/low-spin Equilibrium ist eine charakteristische Eigenschaft von Eisen-Hämoproteinen und ist auf die energetischen Aufteilung der 3d-Orbitale des Hämeisens zurückzuführen, welche eine Temperatur-abhängigkeit des Spinequilibriums zeigt: Je höher die Temperatur ist, desto größer ist im Mittel der Abstand der Liganden zum Eisenion und desto geringer sind ihre Wechselwirkungen. Die dadurch bedingte geringere Ligandenfeldaufspaltung der d-Orbitale verschiebt das Spinequilibrium in Richtung des high-spin Zustandes mit einer resultierenden niedrigeren Energiebarriere zwischen den beiden Spinzuständen. Die Transferierung zum high-spin Stadium als auch die Substratbindung sind endothermische Prozesse, die durch einen positiven Enthalpiewert beschrieben werden. Die Entropie hingegen ist hoch genug, um diesen Prozess spontan als entropiegesteuert zu ermöglichen (Ristau et al. 1978). Der bemerkenswerte hohe Entropiewert dieser Transferierung weist auf große Unterschiede in den strukturellen Ausmaßen beider Zustände hin. Diese dürften auf einen Bruch in den van der Waals Kontakten zwischen Häm und Apoprotein (Ristau et al., 1987) und/oder auf eine Freisetzung von Wassermolekülen vom aktiven Zentrum (Raag und Poulos, 1989) zurückzuführen sein. Eine Verschiebung des pK-Wertes von dem an das Eisenion gebundene Wassermolekül während der Spinverschiebung (Rein und Ristau, 1979) verändert die

Polarität der Hämumgebung, welche das Redoxpotential beeinflusst (Kassner, 1972). Poulos et al. (1986) vermuteten, dass die Verdrängung der Wassermoleküle vom aktiven Zentrum, einschließlich des eisengebundenen Wassermoleküls, sowohl für die Verschiebung des Redoxpotentials zu positiveren Werten hin als auch für die Verschiebung des Spinequilibriums zum high-spin Zustand verantwortlich ist. Hingegen sind nur geringe lokale Veränderungen in der Proteinkonformation mit der Spintransferierung assoziiert (Poulos et al., 1986, Dawson et al, 1982).

Diese Spinverschiebung ist für die Weiterführung der enzymatischen Reaktion von besonderer Bedeutung, weil sie den ersten Reduktionsschritt erst ermöglicht. Daher sollte sie als ein Kontrollmechanismus der Enzymreaktion betrachtet werden (Backes and Eyer, 1989).

Das erste Reduktionsäquivalent sowohl für das mikrosomale als auch für das mitochondriale P450 kommt vom NADPH. Das Enzym wird jedoch nicht direkt durch NADPH reduziert, sondern über ein Flavoprotein, welches als NADPH-Cytochrom P450-Reduktase bekannt ist und mit einem Redoxpotential von -270 mV ein wesentlicher Bestandteil des Elektronen-transfersystem ist. Weil aber das mikrosomale P450(Fe^3, hexakoordiniert) in seiner low-spin Form (**I**) ein durchschnittliches Redoxpotential von -360 bis -300 mV besitzt, NADPH hingegen eines von -320 mV, ist die Reduktion nicht begünstigt (Guengerich, 1983). Erst mit der Verschiebung des P450(Fe^{3+}, pentakoordiniert) (**I**) zur high-spin Form (**II**) wird das durchschnittliche Redoxpotential auf -175 mV zu positiveren Werten hin angehoben, wodurch eine sehr rasche Reduktion von P450(Fe^{3+}, pentakoordiniert) (**II**) zu P450(Fe^{2+}, pentakoordiniert) (**III**) im Vergleich zur low-spin Form möglich wird (Backes et al., 1985, 1991).

b) Bindung von molekularem Sauerstoff und zweiter Reduktionsschritt:
III – IV

Wie bereits erwähnt, besitzt molekularer Sauerstoff eine starke Affinität zu der reduzierten Form von P450. Es sind zwei mögliche Resonanzstrukturen des oxidierten Komplexes bekannt: $Fe(II)O_2$ und $Fe(III)O_2^{\cdot -}$. Diese liegen hexakoordiniert und in low-spin Form bei einer Formalladung von -1 vor, wobei in der letztgenannten Struktur das sechste 3d Elektron in einem autooxidativen Prozess zum O_2 Molekül hin transferiert ist und das Eisen formal die Oxidationsstufe III erhält. $Fe(III)O_2^{\cdot -}$ besitzt eine höhere Reaktivität sowohl für den zweiten Reduktionsschritt als auch für die mögliche Freisetzung des Superoxidanionradikals $O_2^{\cdot -}$.

Dieser Superoxid-Eisen-Komplex (**IV**) stellt einen Verzweigungspunkt im katalytischen Zyklus dar, da die Geschwindigkeit der zweiten Reduktion sehr schnell erfolgen muss, um eine Freisetzung des Superoxids zu verhindern. Dieses zweite Elektron stammt entweder von NADPH oder von NADH, dessen Redoxpotential -320 mV beträgt. Im erstgenannten Fall wird der Elektronentransfer wieder über NADPH-Cytochrom P450-Reduktase geleitet, wohingegen im anderen Fall zuerst das Flavoprotein NADH-Cytochrom b_5-Reduktase (Redoxpotential -290 mV) reduziert wird , welches das Elektron zu Cytochrom b_5 (Redoxpotential +30 mV) weiterleitet, das schließlich das Enzym reduziert.

Die Aufnahme des zweiten Elektrons durch das Superoxid-Eisen-Zwischenprodukt (**IV**) führt zur Bildung einer Peroxo-Eisenverbindung (Fe^{3+}, hexakoordiniert, low-spin) mit einer Formalladung von -2 (**VI**). Diese weist eine verlängerte Fe–O Bindungsdistanz bei unveränderten O–O Bindungscharakteristika auf. Erst durch die Protonierung der Peroxo-Eisenverbindung (**VI**) wird die O–O Bindung deutlich geschwächt, wobei die geschätzte Protonenaffinität mit einem Wert von -442,1 kcal x mol^{-1} einhergeht.

Über die Herkunft dieser Protonen werden zwei alternative Wege diskutiert: einerseits über einen enzyminternen Kanal zwischen hochkonservierten Threonin- und Aspartatresten am aktiven Zentrum oder über ein

Wasserstoffbrücken-bildendes Netzwerk, welches sich von der Oberfläche des Enzyms zur unmittelbaren Hämumgebung ausbreitet. Im ersterwähnten Fall ist es das Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe des Threoninrestes, welches mit Wasser Wasserstoffbrücken bildet. Dadurch fungiert das Wassermolekül als eigentlicher Protonendonor der Peroxo-Eisenverbindung. Die entstehende Verbindung ist ein Hydroperoxo-Eisenderivat (Compound O: Fe^{3+}, hexakoordiniert, low-spin) mit einer Formalladung von -1 (**VIII**).

c) Heterolytische Spaltung des molekularen Sauerstoffs: IV – VIII

Aufgrund der Diskrepanzen zwischen der Theorie und den erhaltenen Messergebnissen wurde die Idee einer homolytischen Spaltung der O–O Bindung zugunsten einer heterolytischen Spaltung aufgegeben.

Der in Form eines Hydroperoxids gebundene molekulare Sauerstoff wird unter Wasserabspaltung protoniert und es entsteht eine hochvalente Oxo-Eisenverbindung (Compound I: Fe^{4+}, hexakoordiniert) mit einer neutralen Formalladung und einer formalen Oxidationszahl von +V, da das Eisen(III)ion insgesamt zwei Elektronen zur Bindung mit dem Sauerstoffatom beiträgt (**VII**). Unter Berücksichtigung der Ladungsverhältnisse im gesamten Hämmolekül jedoch besitzt das Eisenion eine Oxidationszahl von +IV, da von dem Porphyrinmolekül über die Sulfhydrylgruppe ein Elektron auf das Eisen transferiert. Dieser „push-Effekt“ des Thiolatliganden unterstützt durch die anwachsende Elektronendichte am Eisenion die heterolytische Spaltung des Häm-gebundenen molekularen Sauerstoffs. Das so gebildete radikalische Intermediat trägt den Namen Oxo-Eisenporphyrin π-Kation (**VII**) und ist jenes Oxidans, das für die Hydroxylierung unreaktiver aliphatischer Kohlenwasserstoffe zuständig ist.

<u>Katalytischer Zyklus der Substrathydroxylierung durch Cytochrom P450: Two-state reactivity (TSR) Mechanismus der Hydroxylierung</u>

Der eigentliche Hydroxylierungsweg einer gesättigten Kohlenwasserstoff-verbindung durch Cytochrom P450 ist schon seit der Entdeckung der

Funktion dieser Enzymfamilie Bestandteil der biochemischen Forschung. In all den Jahren wurden verschiedene Theorien aufgestellt, die wieder durch andere ersetzt wurden, und bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann eine endgültige Antwort noch nicht gegeben werden. Mit dem two-state reactivity (TSR) Mechanismus wurde jedoch ein Weg eingeschlagen, der die verschiedenen widersprüchlichen Theorien vereinigt.

Der *Consensus Mechanismus* wurde in der Pionierzeit anhand der Studien von Groves (Groves et al., 1995) zum ersten Mal formuliert und ist auch unter dem Begriff des Rebound Mechanismus bekannt.

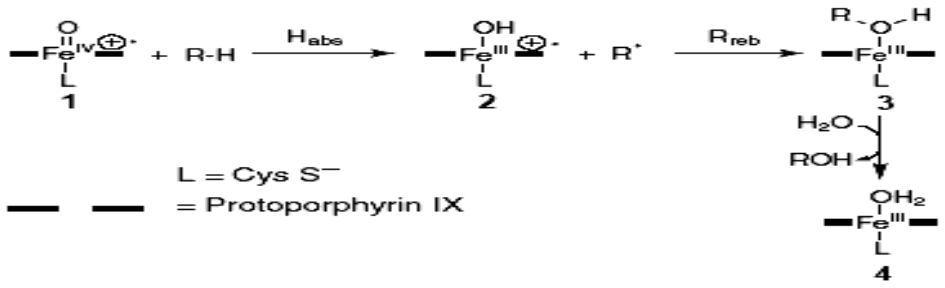


Abbildung 2: Darstellung des Consensus Mechanismus. Die Reaktionsprodukte sowie die daraus resultierenden Reaktionsschritte werden im nachfolgenden Text genau beschrieben.

R–H = Substrat/Alkan; H_{abs} = Wasserstoffabstraktioin; R • = Radikal; R_{reb} = Reboundmechanismus; ROH = Produkt/Alkohol

Der Oxo-Eisenkomplex (Compound I) bewirkt die initiale Wasserstoffabspaltung vom Alkan (RH), welches dadurch zum Radikal wird und zum Hydroxo-Eisenkomplex reagiert. An dieses bindet das Radikal und bildet so den Alkohol-Eisenkomplex, aus welchem die alkoholische Verbindung unter Anlagerung von Wasser als sechster Eisenligand freigesetzt wird.

Die Studien von Newcomb et al. (2000) weckten jedoch Zweifel an der Gegenwart freier Radikale, da die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydroxylierungsreaktion geringer war als die Halbwertszeit der Radikale. Dennoch unterstützten Daten anhand der Ergebnisse sowohl von Rearrangement-Experimenten, die durch die Stereospezifität der hydroxylierten Produkte auf den Substitutionsmechanismus der Hydroxylierungsreaktion schließen ließen, als auch von KIE (kinetic isotope effect)-Profilen die Idee eines Rebound Mechanismus mit der Gegenwart von Radikalen. Da beide Autoren für ihre Theorie empirische Beweise vorlegen konnten, wurde in der Bezeichnung des Groves-Newcomb Mechanismus ein Kompromiss formuliert, der zu der Aussage führte: „Radikale sind sowohl anwesend als auch abwesend und der Rebound Mechanismus ist sowohl richtig als auch falsch.“ (Newcomb et al., 2000)

Der TSR Mechanismus der Alkanhydroxylierung findet für diese paradox anmutende Aussage eine einfache Erklärung, indem nicht von einem Spinzustand, sondern von den zwei Spinzuständen innerhalb der Hydroxylierungsreaktion ausgegangen wird (Shaik et al., 2002). In beiden Zuständen vollzieht sich die Aktivierung der C–H Bindung auf ähnliche Weise wie beim Rebound Mechanismus. Während jedoch im low-spin Zustand keine radikalischen Intermediate gemessen werden können und die Reaktion entlang eines stetigen Energiegefälles abläuft, können im high-spin Zustand radikalische Intermediate detektiert werden, die zu einer Energiebarriere innerhalb der Reaktion führen.

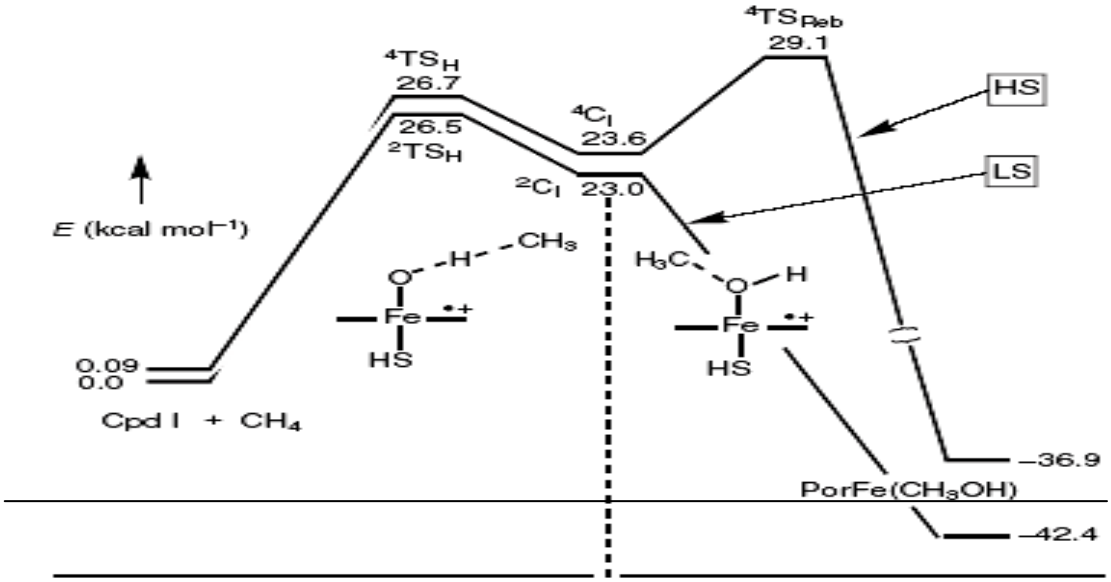


Abbildung 3: Darstellung des TSR Mechanismus. Die Reaktionsprodukte sowie die daraus resultierenden Reaktionsschritte werden im nachfolgenden Text genau beschrieben.

Ordinate = Energieniveau in kcal/mol; Abszisse = Reaktionsverlauf; Cpd I = Compound I = Oxo-Eisenporphyrin π-Kation; CH_4 = Methan; HS = High Spin; LS = Low Spin; $^{2,4}TS_H$ = transition state im low– und high spin Zustand während der Aktivierung der C–H Bindung; $^{2,4}C_1$ = ein koordinativ an ein Hydroxo-Eisenkomplex (sowohl low-spin als auch high-spin) gebundenes Alkylradikal; $^4TS_{Reb}$ = Intermediat im high-spin Zustand, in welchem ein Elektron in das antibindende Molekülorbital $\sigma^*(d_z^2)$ angehoben wird, wohingegen alle anderen Elektronen in den energetisch niedrigeren Orbitalen verbleiben; PorFe(CH_3OH) = an Häm komplexgebundenes Methanol.

Die Reaktion ist anhand ihrer Funktionalität in zwei Phasen aufgeteilt: Die erste Phase entspricht der Aktivierung der C–H Bindung, während die zweite Phase die Rebound Phase darstellt, in welcher die C–O Bindung hergestellt wird (Ogliora et al., 2000).

In beiden Stadien wird innerhalb der ersten Phase ein Energiemaximum erreicht, das als $^{2,4}TS_H$ (transition state im low- und high-spin Zustand während der Aktivierung der C–H Bindung) beschrieben und in dem die Protonierung des Oxo-Eisenkomplexes eingeleitet wird. Die Profile der LS und HS Zustände liegen in der ersten Phase extrem nahe beieinander, trennen sich dann aber beim Übergang in die Rebound Phase. An diesem Bifurkationspunkt liegt ein als $^{4,2}C_1$ bezeichnetes Intermediat vor, das als ein koordinativ an ein Hydroxo-Eisenkomplex (sowohl low-spin als auch high-spin) gebundenes Alkylradikal beschrieben wird. Das Alkylradikal bindet in dem folgenden Schritt an das Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe unter Beachtung der sterischen Anordnung der Bindungspartner. Diese Ausrichtung des Alkylradikals an der freien Seite der Hydoxygruppe erfolgt entweder durch eine Rotation der OH-Bindung oder des Radikals um die Fe–O Bindung (de Visser et al., 2002).

Für beide Spinzustände gilt, dass sowohl die Wasserstoffabstraktion vom Alkan als auch die Reorientierung des Radikals ein endothermer Prozess ist und die C–O Bindung Energie erfordert. Der Unterschied im Ausmaß der aufzubringenden Energie ist jedoch sehr groß. Dieser Unterschied lässt sich anhand der Orbitalbesetzung des Intermediats beschreiben, welche sich bei der Bildung der C–O Bindung entsprechend der beiden Spinzuständen auf charakteristische Weise darstellt:

Während der Konversion der $Por^{+}Fe^{III}OH/R^{\bullet}$ Intermediate in die Alkohol-Eisenprodukte verlieren das Radikal und der Porphyrinring ihre Anfangs-spinzustände sowohl im low-spin als auch im high-spin Zustand. Ursache ist das Auffüllen des Porphyrinorbitals mit einem Elektron, welches formal vom Alkylradikal stammt. Dieses nimmt nun am Orbital der R–O Bindung teil. Obwohl dieser Sachverhalt auf beide Spinzustände zutrifft, gibt es einen wesentlichen Unterschied: Um während des Rebounds den high-spin

Zustand zu sichern, muss ein Elektron in das antibindende Molekülorbital $\sigma^*(d_z^2)$ angehoben werden, wohingegen alle anderen Elektronen in den energetisch niedrigeren Orbitalen verbleiben. Das so gebildete Intermediat wird als $^4TS_{Reb}$ bezeichnet. Weil sich der antibindende Charakter des $\sigma^*(d_z^2)$ Orbital auf die gesamte O–Fe–S Achse erstreckt, wird sich die Fe–O und die Fe–S Bindungslänge während des Rebounds vergrößern. Für die Energiebarriere des high-spin Reboundprozesses sind somit die Elektronenanregung und der Verlust der damit einhergehenden Bindungsstärke verantwortlich. Im Gegensatz dazu ist zum Erhalt des low-spin Zustandes keine Elektronenanregung gegeben. Durch die Verkürzung der Fe–S Bindungslänge wird der Effekt der Verlängerung der Fe–O Bindungslänge gemildert, was sich in einer Eliminierung der Reboundbarriere niederschlägt (de Visser et al., 2002).

Diese Energiedifferenz wirkt sich auf die Halbwertszeit der freien Radikale und somit auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydroxylierungsreaktion aus. Soll es im high-spin Zustand trotz der thermodynamisch ungünstigen Bedingungen zur Bildung der C–O Bindung kommen, so muss die Reorientierung des Radikals maximal günstig sein. Dies geschieht durch eine sterische Umgestaltung (= Rearrangement) der Bindungspartner am Sauerstoffatom der Hydroxylgruppe vor dem eigentlichen Rebound. Deshalb verläuft die Hydroxylierungsreaktion im high-spin Zustand schrittweise und verlangsamt bei einer im Mittel verlängerten Halbwertszeit der Radikale. Im Gegensatz dazu ist im low-spin Zustand der Reboundreaktion der Anteil freier Radikale sehr gering. Ihre sehr geringe Halbwertszeit verdanken sie der thermodynamisch günstigeren Ausgangssituation, die ein Rearrangement nicht benötigt und die Reaktion entlang eines Energiegefälles stetig vorantreibt (de Visser et al., 2002).

Der TSR Mechanismus bietet somit eine zufriedenstellende Lösung für die in der Einleitung dieses Kapitels beschriebene mechanistische Kontroverse an. Durch das Zusammenspiel zweier Mechanismen, von denen der eine ohne Rearrangement entsprechend einer strikten exothermen Reaktion (low-spin),

der andere jedoch schrittweise über eine Energiebarriere (high-spin) zur Produktbildung führt, wird sowohl die Gegenwart von freien Radikalen als auch deren Nichtexistenz begründet.

Es gibt aber mehrere Faktoren, die das Verhältnis zwischen den Intermediaten/Produkten im low-spin und high-spin Zustand bestimmen. Die Höhe der high-spin Reboundbarriere hängt von zwei Faktoren ab: Je größer die Fähigkeit des Alkylradikals ist, als Elektronendonor zu fungieren, desto geringer ist die Reboundbarriere. Diese Barriere verringert sich ebenfalls mit der Zunahme der C–O Bindungsstärke, welche die thermodynamisch treibende Kraft darstellt. Die Reboundbarriere erhöht sich jedoch bei einem energetischen Anstieg des $\sigma^*(d_z^2)$ Orbitals, welcher proportional mit der σ-Bindungsfähigkeit des Thiolatliganden einhergeht. Diese Bindungsfähigkeit wird schließlich durch das Protein selbst bestimmt und zwar sowohl über sterische Einflüsse als auch über den pH-Wert bzw. die effektive Ladungsverteilung im Substratzugangskanal/aktiven Zentrum. Auf diese Weise erklären sich die unterschiedlichen Reboundbarrieren der verschiedenen Isoenzyme. Die relative Konzentration der high-spin/low-spin Komplexe, die den Bifurkationspunkt erreichen, hängt wiederum von dem Ausmaß der Spinumkehr und von der relativen Rate der Bindungsaktivierung der high-spin und low-spin Prozesse ab. Weil im low-spin Zustand einerseits die Wasserstoffabstraktion auf einer niedrigeren Energiebarriere verläuft und andererseits das Ausmaß des Ladungstransfers vom Alkylradikal größer ist als im high-spin Zustand, wird der Reaktionsweg über den low-spin Zustand vorrangig sein.

1.2) Alkylphosphocholine

Die Substanzgruppe der Alkylphosphocholine gehört zu den synthetischen Derivaten der Phosphatidylcholine bzw. der Lysophosphatidylcholine (Thaler et al., 2000). Erstmalig wurden sie Ende der 80-er Jahre auf ihre biologische Wirkung hin untersucht. Bis heute wurden zwei Zielsysteme nachgewiesen, auf welche die Alkylphosphocholine Einfluss nehmen können: Protozoen und Tumore (Croft et al., 2003; Unger and Eibl, 2001 Unger, 1996).
In beiden Fällen üben sie einen zumindest antiproliferativen Effekt aus. Verschiedene Untersuchungen in den vergangenen Jahren zeigten, dass ihre Wirkung in Abhängigkeit vom Zielgewebe und vom verwendeten Derivat unterschiedlich stark sind (Breiser et al.,1987). Die Derivate unterschieden sich nicht nur hinsichtlich ihrer antiproliferativen oder zelltoxischen Potenz, sondern auch in der Form der Applikation, der Pharmakokinetik und -dynamik und der Art und Stärke der Nebenwirkungen.
Am ausführlichsten beschäftigten sich die Untersuchungen mit der Muttersubstanz der Alkylphosphocholine: Hexadecylphosphorylcholin, auch Miltefosin bzw. HePC genannt. Ihr erfolgreicher Einfluss auf Protozoen und tumoröses Gewebe legte den Grundstein für die Weiterentwicklung vieler Derivate.

1.2.1) Hexadecylphosphocholin (HePC, Miltefosin) als Antiprotozoenmittel

Das Alkylphosphocholinanalogon Hexadecylphosphocholin oder Miltefosin (HePC) wurde ursprünglich als antitumoröser Wirkstoff entwickelt, der 1992 erstmals zur Behandlung von Hautmetastasen bei Bronchialtumoren eingesetzt wurde. Erste Berichte über die Aktivität von Phospholipidanaloga gegen die Protozoen Tetrathymena pyriformis und Leishmania donovani

erfolgten in den achziger Jahren zeitgleich mit ihrer Entwicklung als Antitumormedikamente (Hilgard et al. 1988).

Die Ergebnisse der Therapieversuche von Leishmania donovani infizierten Mäusen mit HePC waren im Vergleich zu Kontrollen mit Antimon-Präparaten, die damals neben Amphotericin B zur Standarttherapie der Leishmaniasis gehörten, so vielversprechend, dass HePC für eine orale Behandlung der viszeralen und kutanen Leishmaniasis entwickelt wurde (Desjeux, 1996). Sundar und Mitarbeiter konnten 2002 zeigen, dass 94-97% der an viszeraler Leishmaniasis erkrankten Patienten durch die tägliche Einnahme von 2,5 mg HePC pro kg Körpergewicht innerhalb von 28 Tagen geheilt wurden und auch nach 6 Monaten remissionsfrei blieben.(Sundar et al., 2002). Im selben Jahr erhielt Miltefosin die Marketingautorisierung in Indien, jenem Land, in dem beinahe die Hälfte aller Infizierten leben. Die indische Regierung möchte im Rahmen der Phase 4 Studie Miltefosin als Standardmedikament in ihr National Leishmaniasis Control Programm aufnehmen. Somit kann von einer weiltweiten Nutzung dieses Wirkstoffes ausgegangen werden (Burton et al., 2003).

1.2.2) Hexadecylphosphocholin (HePC, Miltefosin) als antitumoröser Wirkstoff

Muschiol und Mitarbeiter konnten 1987 erstmals zeigen, dass Miltefosin und andere Derivate der Phospholipide eine signifikante antitumoröse Aktivität gegenüber verschiedenen induzierten Brusttumoren der Ratte zeigte, wie den MNU- und den DMBA- induzierten Mammakarzinomen, die auf herkömmliche zytotoxische Substanzen wie z.B. Cisplatin und Cyclophosphamid nicht ansprachen (Muschiol et al., 1987). Aufgrund dieser außergewöhnlichen Wirksamkeit wurde Miltefosin in Verbindung mit Glycerinether und Wasser (Miltex) im Rahmen einer klinischen Phase-II-Studie an Patientinnen mit hautmetastasierten Mammakarzinomen geprüft.

Es zeigte sich eine außergewöhnliche Wirksamkeit dieser Substanz: Bei insgesamt etwa einem Drittel dieser zum Teil erheblich vorbehandelten Patientinnen kam es zu objektiven Remissionen der Hauttumoren, bei einem weiteren Drittel wurden keine Veränderungen im Wachstumsverhalten der Metastasen beobachtet, wohingegen das letzte Drittel auf diese Therapie nicht ansprach. Insgesamt profitierten etwa zwei Drittel der mit Miltex behandelten Patientinnen von der Therapie. Da die Substanz nur lokal aufgetragen und weitgehend in der Haut metabolisiert wird, sind systemische Nebenwirkungen ausgeschlossen, bei lediglich leichten lokalen Hautirritationen wie z.B. Rötung, Pruritus und Schuppung.
Hilgard und Mitarbeiter veröffentlichten 1992 das in vitro Aktivitätsspektrum von Miltefosin in Zelllinien aus Menschen und Nagetieren (Hilgard et al., 1992). Sowohl die humanen KB und HL-60 Zelllinien als auch die von Mäusen stammende L1210 Leukämiezelllinie hatten die höchste Sensitivität gegenüber Miltefosin, wohingegen die Mäusezelllinien aus NK-Lymphomen und aus gesundem Knochenmark gegenüber der zytotoxischen Wirkung komplett resistent waren. Eine Rattenzelllinie aus einem hepatozellulärem Karzinom und eine humane Zelllinie aus einem Kolonkarzinom zeigten nur eine moderate Sensitivität.
Insgesamt zeigten die Alkylphosphocholine ihre antitumoröse Wirksamkeit an verschiedenen Tumorgeweben, über metastasierte Bronchialkarzinomen und Kolonkarzinomen bis hin zu Leukämien (Konstantinov and Berger, 1998,1999) und Hirntumoren (Jendrossek et al., 2002).

Bisher wurden verschiedene Wirkmechanismen postuliert, die bei den Alkylphosphocholinen in ihrer molekularbiologischen Wirkung auf die Zielzellen zum Tragen kommen: Enzyme, die der Signalverarbeitung bzw. Signalweiterleitung dienen (Proteinkinasen und Phospholipasen), De-novo-Synthese von Phosphatidylcholin (Lecithin), Transportsysteme niedermolekularer Substanzen in der Zellmembran und Aktivierung des CD95-Rezeptors.

Die in dieser Arbeit verwendeten Alkylphosphocholine sind ihrer Muttersubstanz Hexadecylphosphorylcholin strukturell ähnlich. Sie sind Phosphorsäurediesterverbindungen von Octadecanol und Cholin, enthalten jedoch eine zusätzliche funktionelle Gruppe: eine Acetyl-Gruppe (R/S-O-acetyl), eine Hydroxy-Gruppe (R/S-OH), eine Acetamid-Gruppe (R/S-N-acetyl) und eine Amino-Gruppe (R/S-NH_2), die an die Phosphocholinkette in Position 2 angefügt sind.

Die Arbeitsgruppe um J. R. Falk zeigte 1990, dass die Klasse der Lysophospholipide einen hemmenden Effekt auf P450 ausüben. Bei der Betrachtung der Alkylphosphocholine fiel uns auf, dass sie hinsichtlich ihrer Struktur nichts anderes als Deriviate einkettiger Lipide waren, denn sie bestanden aus einer hydrophoben Alkylkette mittlerer Länge und einer polaren Kopfgruppe. Folglich lag die Vermutung nahe, dass ungeachtet aller bisherigen Veröffentlichungen die Gruppe der Alkylphosphocholine als Inhibitoren von Cytochrom P450 wirken könnten.

Anhand dieser Hypothese führten wir verschiedene Versuchsreihen bezüglich der Wirkung der Alkylphosphocholine auf Cytochrom P450 durch, wobei wir zwei subzelluläre Systeme benutzten: die Mikrosomenfraktion und ein rekonstituiertes System aus Cytochrom P450 und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase. Zusätzlich wurde der Effekt des Lösungsmittels Ethanol auf das agierende Enzymsystem getestet.

1.3) Ziel der Arbeit

Folgende Fragen sollen in dieser Arbeit beantwortet werden:

- Hemmen Alkylphosphocholine Cytochrom P450 ?
- Wenn ja, welcher Hemmtyp liegt vor ?
- Unterscheiden sich die Ki-Werte der Alkylphosphocholine in Abhängigkeit vom Reaktionssystem (Mikrosomenfraktion gegenüber rekonstituiertes System) ?
- Hat Ethanol einen Einfluss auf die katalytische Aktivität des Enzymsystems ?
- Gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den Ki-Werten der Alkylphosphocholine und den Ki-Werten der natürlich vorkommenden Lysophospholipide

2) Material und Methoden

2.1) Material

2.1.1) Handelsprodukte und Hilfsreagentien

Es wurden folgende im Handel befindliche Substanzen verwendet (nach Bezugsquellen geordnet):

Fa. Serva Feinbiochemica, Heidelberg:
- Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (EDTA)

Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim:
- 2,6-Ditert-butyl-p-cresol (BHT)
- Trishydroxymethylaminomethan (Tris, Trizma-base)

Fa. Boehringer Mannheim, Mannheim:
- reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH)

Fa. Calbiochem-Novabiochem GmbH (Schwalbach):
- rekombinante humane NADPH-Cytochrome P450 Reduktase

Fa. Ega-Chemie, Steinheim:
- 7-Ethoxycumarin (rekristallisiert)
- 7-Hydroxycumarin / Umbelliferon (rekristallisiert)

U. Massing, Tumour Biology Centre, Freiburg / Germany:
- rac-1-O-phosphocholine-2-hydroxy-octadecan (rac-2-OH)
- rac-1-O-phosphocholine-2-O-acetyl-octadecan (rac-2-O-acetyl)
- rac-1-O-phosphocholine-2-amino-octadecan (rac-2-NH_2)
- rac-1-O-phosphocholine-2-N-acetyl-octadecan (rac-2-N-acetyl)

2.1.2) Lösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden unmittelbar vor Gebrauch frisch hergestellt. Die pH-Werte der Puffer wurden bei Raumtemperatur (ca. 20℃) eingestellt.

Lösungen für die Mikrosomenpräparation:

Puffer A: 0,1 M Tris/Acetat-Puffer, pH 7,4
0,1 M KCl
1 mM EDTA
0,02 mM BHT

Puffer B: 0,1 M Kaliumpyrophosphatlösung, pH 7,4
1 mM EDTA
0,02 mM BHT

Puffer C: 10 mM Tris/Acetat-Puffer, pH 7,4
1mM EDTA
20% (v/v) Glycerin

Lösungen für die fluorometrische Bestimmungder 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität:

Die NADPH-Lösung wurde jeden Tag frisch, $MgCl_2$ alle drei Monate, K-Hepes und 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon) alle sechs Monate und 7-Ethoxycumarin alle zwei Monate hergestellt.

- Kalium-Hepes-Puffer 0,1 M, pH 7,6 (MW: 276,4):
  2,76 g Hepes in 89 ml H_2O bidest. auflösen, dann mit 1M HCL auf pH 7,6 einstellen und mit H_2O bidest. auf 100 ml auffüllen.
- Mg_2Cl Lösung 0,1 M (MW: 213,3)
- Hemmstofflösungen:
  Die verschiedenen Alkylphosphocholine wurden in einem Ansatz von 600 µl gelöst, wobei als Lösungsmittel einerseits H_2O bidest., andererseits Ethanol (Ubason) verwendet wurde. Dabei ergaben sich folgende Konzentrationen:
  - c(rac-2-NH_2)= 6,8432 µM (MW: 487,1 g/mol)
  - c(rac-2-O-acethyl)= 6,7532 µM (MW: 493,6 g/mol)
  - c(rac-2-N-acethyl)= 6,7653 µM (MW: 492,7 g/mol)
  - c(rac-2-OH)= 7,3487 µM (MW: 453,6 g/mol).
- Phospholipidgemisch:
  4 mg Dilaurylphosphatidylcholin (DLPC) wurden mit 1ml Kalium-Hepes-Puffer 0,1 M, pH 7,6 versetzt und danach im Ultraschallbad so lange beschallt, bis die Mischung klar war.
- NADPH 10^{-2} M (MW: 832).
- 7-Ethoxycumarin 10^{-3} M (MW: 190):
  1,9 mg der Substanz wurden in 10 ml H_2O bidest. bei 70℃ über einen Zeitraum von einer Stunde gelöst.
- 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon):
  Aus einer Stammlösung von 10^{-3} M wurde je nach Bedarf eine Messlösung von 10^{-4} M hergestellt.

2.2) Methoden

2.2.1) Mikrosomenpräparation

Zusammenfassend lässt sich dieser Arbeitsschritt folgendermaßen beschreiben:
Die Mikrosomenfraktion wurde durch Zellaufschluss mittels Homogenisation und anschließender differentieller Zentrifugation gewonnen. Dabei wurden durch Scherkräfte die Zellmembranen aufgebrochen und das hoch-organisierte Netzwerk der Membranen des endoplasmatischen Retikulums zerrissen. Die Reste des endoplasmatischen Retikulums bildeten Bruch-stücke, die den Hauptanteil der Mikrosomenfraktion ausmachten.

Die einzelnen Arbeitsschritte lassen sich wie folgt in chronologischer Reihenfolge darstellen:
Die Lebermikrosomenfraktion wurde aus männlichen Sprague-Dawley Ratten (200-250 g) gewonnen. Diese Ratten wurden mit Natrium-Phenobarbital (PB) vorbehandelt, welches ihnen in einer 0,1%-igen Lösung (w/v) für sechs Tage über das Trinkwasser verabreicht wurde. Die Leber wurden chirurgisch entfernt und auf Eis stückchenweise zwischengelagert. Die anschließende Mikrosomenpräparation wurde jeweils nach Guengerich (Guengerich, 1977; Guengerich and Martin, 1980; Wang et al., 1980) bei 4℃ durchgeführt:
Die auf Eis gelagerten Leberstücke wurden zunächst mit einer chirurgischen Schere zerkleinert. Je 3 g wurden in 12 ml Puffer A homogenisiert und für 20 Minuten in einer Kühlzentrifuge (Fa. Beckmann, Modell J2-21 centrifuge) bei 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bei 100000 x g 60 Minuten lang zentrifugiert (Ultrazentrifuge der Fa. Sorvall, Modell OTD 50B). Dieser lieferte das mikrosomale Pallet, welches in 12 ml Puffer B suspendiert und erneut 60 Minuten lang bei 100000 x g zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde wieder verworfen. Das Sediment wurde in 9 ml Puffer B suspendiert und bei 100000 x g rezentrifugiert. Die hierdurch

gewonnene Mikrosomenfraktion wurde in Puffer C suspendiert und bei -20 ℃ in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Der spezifische Gehalt dieser Mikrosomenfraktion betrug 27 nmol P450/ml.

Alle hierbei verwendeten Puffer enthielten EDTA oder BHT, um die Peroxidation membrangebundener Lipide zu verzögern. Hämoglobin und Nucleinsäuren wurden nach von der Hoeven and Coon (1976) durch das im Puffer B enthaltene Kaliumpyrophosphat eliminiert, um eine Beeinträchtigung der nachfolgenden Messungen zu vermeiden.

2.2.2) Rekonstituiertes CYP2B1: NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase-System

Zur Isolierung des in einem elektrophoretisch homogenen Zustand vorliegenden Cytochrom-P450-Isoenzyms-2B1 wurde das von Guengerich et al. (1986) entwickelte Verfahren mit einigen Abänderungen angewandt. Mit Hilfe der von Omura and Sato beschrieben Methoden (1964) konnte ein spezifischer Gehalt von 11 nmol CYP2B1/ml ermittelt werden.

Die von der Fa. Calbiochem-Novabiochem GmbH (Schwalbach) erworbene rekombinante humane NADPH-Cytochrom P450-Reduktase lag in einer Konzentration von 23,8 nmol Reduktase/ml mit einer spezifischen Aktivität von 44 u/mg Protein vor. Die Aktivität der Reduktase wurde anhand der Methode von Yasukochi and Masters (1976) bestimmt.

Das Rekonstitutionssystem („Preformed Complex“) wurde durch Mischung von reinem CYP2B1 mit rekombinanter humaner NADPH-Cytochrom P450-Reduktase in einem molaren Verhältnis von 1:2 hergestellt, wodurch sich für CYP2B1 eine Konzentration von 5,5 µM und für die Reduktase eine Konzentration von 11 µM ergab. In einer 0,1 M Tris-HCL-Puffer-Lösung, die einen pH-Wert von 7,6 und 20% Glycerol enthielt, wurde das System

schließlich für 2 Stunden bei einer Temperatur von 25℃ mit einem Endvolumen von 20-60 µl stehen gelassen. Im Anschluss an die Vorinkubation der beiden Enzyme wurden aliquote Volumen dieser rekonstituierten CYP2B1:Reduktase-Komplexe zur Messung ihrer Enzymaktivität mit 7-Ethoxycumarin als Substrat verwendet.

2.2.3) Die fluorometrische Bestimmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase Aktivität

Die Bestimmung erfolgte in Anlehnung an die Methode von Ullrich und Weber (1972). Dieses Verfahren beruht auf der O-Dealkylierung von 7-Ethoxycumarin durch die beiden Enzyme Cytochrom-P450 und NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase zum fluoreszierenden 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon). Dieses wurde bei 360 nm angeregt und emittierte dann Licht bei 460nm. Die Messungen wurden bei 37℃ mit Hilfe eines Spektrophotometers vom Typ Jobin-Yvon JY 3D mit gekoppeltem x/y-Schreiber (Watanabe Serrocoder SR 6254) durchgeführt. In einem Gesamtvolumen von 600 µl wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von verschiedenen Substrat- und Hemmkonzentrationen ermittelt.

In 600 µl Lösung waren enthalten:

- 7-Ethoxycumarin in einer Konzentration von 20-200 µM. Dies entspricht einem Volumen von 12-120 µl.
- $MgCl_2$ mit einer Konzentration von $5x10^{-2}$ M.
- Kalium-Hepes-Puffer mit einer Konzentration von 0,1 M und einem pH-Wert von 7,6. Das Volumen richtete sich nach den Volumina der Reaktionspartner.
- Alkylphosphocholine als Inhibitoren in einer Konzentration von 6,7532-7,3487 µM (vgl. die genaue Zuordnung in 2.1.2)

- Cytochrom P450 im mikrosomalen System mit einer Konzentration von 27nm/ml.
- CYP2B1 im rekonstituierten System mit einer Konzentration von 5,5 µM.
- NADPH-Cytochrom P450 Reduktase im rekonstituierten System mit einer Konzentration von 11µM.

In der oben dargestellten Reihenfolge wurden die Reaktionspartner in eine 1 ml Quarzküvette gegeben. Das Endvolumen betrug immer 590 µl. Diese Mischung wurde dann bei 37℃ drei Minuten lang inku biert. Danach wurde die Reaktion mit 10 µl einer 10^{-2} M NADPH-Lösung gestartet und nach einem Zeitraum von sechs Minuten abgebrochen. Anschließend wurde jeweils für einen Messtag mit 10 µl einer 10^{-4} M Umbelliferon-Lösung geeicht. Bei jeder Messung wurde der Anstieg der Fluoreszenz über 5 Minuten gemittelt und die nmol des entstandenen Umbelliferons pro Minute pro nmol eingesetztem Cytochrom-P450 bzw. CYP2B1 ermittelt.

Es wurden jeweils drei Messreihen durchgeführt, innerhalb welcher für jeden Messpunkt zwei Bestimmungen durchgeführt wurden: In der ersten Messreihe wurde die Aktivität der Cytochrom-P450-Fraktion – sowohl als Mikro-somenfraktion als auch als Bestandteil des rekonstituierten Systems – ermittelt und als Leerwert gesetzt. Aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm ließ sich die enzymatische Maximalgeschwindigkeit Vmax errechnen. In der zweiten Messreihe wurde das Inhibitorvolumen bei konstantem Substratvolumen variiert, um jenes Inhibitorvolumen zu ermitteln, welches eine Aktivitätsminderung um nahezu 50% erbrachte. Mit diesem konstanten Inhibitorvolumen wurde die dritte Messreihe bei variierenden Substratvolumina gestartet. Aus den gemessenen Aktivitätswerten konnte anhand zweier graphischer Darstellungen einerseits der IC_{50}-Wert., andererseits der Ki-Wert und der Kmapp-Wert des jeweiligen Inhibitors bestimmt werden.

2.2.4) Die Auswertung der Messergebnisse

Wichtig: Die Messwerte wurden anhand von Doppelbestimmungen ermittelt, aus welchen dann der Durchschnittswert errechnet wurde. Weitere Messungen waren aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit an biologischem Material nicht vertretbar.

Im Rahmen der enzymkinetischen Auswertung der Messdaten wurde mit Hilfe des Computerprogrammes Excell eine Regressionsanalyse erstellt.

Die Berechnung der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität A ist definiert als gebildetes Produkt pro Zeit , $d[P]/dt$, geteilt durch die Ausgangskonzentration von Cytochrom P450 $[P450]_0$:

$$A = \frac{\frac{d[P]}{dt}}{[P450]}. \qquad (1)$$

Die Enzymaktivität A kann in einem Experiment bestimmt werden, wenn das gebildete Produkt pro Zeit $d[P]/dt$ für eine bestimmte Ausgangskonzentration von Cytochrom P450 $[P450]_0$ gemessen wird.

Das gebildete Produkt pro Zeit $d[P]/dt$ eines binären Proteinkomplexes kann durch folgende Formel beschrieben werden

$$\frac{d[P]}{dt} = [komplex] \cdot k_E^0 \cdot R(S). \qquad (2)$$

Die Produktionsrate ist proportional zu:

- der Konzentration der arbeitenden Proteinkomplexe, $[komplex]$

- der Umsatzrate eines Proteinkomplexes k_E^0
- und der Fraktion R der Besetzung des katalytischen Zentrums durch die Substratmoleküle S.

Die Enzymaktivität kann also folgendermaßen beschrieben werden:

$$A = \frac{[komplex]}{[P450]_0} \cdot k_E^0 \cdot R(S) \tag{3}$$

Die Bildung des binären Komplexes:

Die Komplexbildung von Cytochrom P450 mit der NADPH-Cytochrom P450-Reduktase kann durch die Massenerhaltungsbeziehung ganz allgemein beschrieben werden. Hier formen die beiden Enzyme einen binären Komplex (P450:Reduktase)

$$[P450] + [reduktase] \xleftrightarrow{K_D} [komplex] \tag{4}$$

mit dem Dissoziationskoeffizient K_D

$$K_D = \frac{[P450] \cdot [reduktase]}{[komplex]}. \tag{5}$$

Der Anteil des binären Komplexes an der Anfangskonzentration von Cytochrom P450 wird mit Hilfe der Gleichung (5) und des Protein-Erhaltungsgesetzes ($[P450]_0 = [P450] + [komplex]$; $[\mathrm{Re}\,d]_0 = [\mathrm{Re}\,d] + [komplex]$) errechnet. Nach Einsetzen und Auflösen der quadratischen Gleichung erhält man folgenden Ausdruck:

$$\frac{[komplex]}{[P450]_0} = \frac{1}{2}\left(\left[1 + \frac{[\mathrm{Re}d]_o}{[P450]_0} + \frac{K_D}{[P450]_0}\right] \pm \sqrt{\left[1 + \frac{[\mathrm{Re}d]_0}{[P450]_0} + \frac{K_D}{[P450]_0}\right]^2 - \frac{4[\mathrm{Re}d]_0}{[P450]_0}}\right). \tag{6}$$

Von den beiden möglichen Lösungen scheidet nach der graphischen Darstellung der Funktion die Lösung aus, bei der die Wurzel addiert wird. Die einzig sinnvolle Lösung ist damit diejenige, bei der die Wurzel subtrahiert wird.

Der Dissoziationskoeffizient K_D hängt von den physikalischen und chemischen Bedingungen in der Umgebung der membranbindenden Domänen ab. Kleine Dissoziationskoeffizienten erhält man, wenn die beiden Enzyme in Lipidmembranen verankert sind, wohingegen große Dissoziationskoeffizienten gemessen werden, wenn beide Enzyme in Puffer, der kleine Mengen von Glycerol enthält, gelöst sind.
Wenn man ein anderes Molekül, wie z.B. die in dieser Arbeit verwendete Klasse der Alkylphosphocholine, zu dieser Reaktion hinzugibt, wird sich der Dissoziationskoeffizient K_D verändern. Dieser wird dann zu einer Funktion der Konzentration des verwendeten Inhibitors: $K_{D(I)}$.

Die Umsatzrate eines arbeitenden Enzymkomplexes:

Der arbeitende Enzymkomplex kann durch seine Umsatzrate k_E^0 charakterisiert werden. Diese kann unter optimalen Bedingungen bestimmt werden, wenn

- $[\mathrm{Re}\,d]_0 \to \infty$, da dann jedes Cytochrom P450 Enzym einen arbeitenden binären Komplex bildet.
- $[S] \to \infty$, da dann jeder arbeitende, binäre Komplex mit einem Substratmolekül beladen ist.

Die Substratumsetzung ohne Hemmstoff:

Zur Berechnung der Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion bei konstanter Enzymkonzentration und konstanter Temperatur, jedoch variabler Substratkonzentration, gilt die *Michaelis-Menten-Gleichung:*

$$A = \frac{A_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}. \qquad (7)$$

Nach der Darstellung nach Lineweaver-Burk (x-Achse: $[S]^{-1}$ und y-Achse: A^{-1}) ergibt sich hieraus eine Gerade mit folgender Gleichung:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_{\max}} + \frac{1}{[S]} \cdot \frac{K_m}{A_{\max}}. \qquad (8)$$

$A_{\max}$ und K_m können aus der gezeichneten Gerade ermittelt werden.

K_m entspricht der Michaelis-Menten-Konstante und somit derjenigen Substratkonzentration, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist. In der graphischen doppelt-reziproken Darstellung bildet der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse den Wert $-\frac{1}{K_m}$ ab, aus welchem sich durch eine einfache mathematischen Äquivalenzumformung der K_m-Wert berechnen lässt.

Die Substratumsetzung mit Hemmstoff – kompetitiver Hemmungstyp:

Wenn außer dem Substrat noch ein weiteres Molekül, welches ebenfalls vom Enzym katalysiert wird, zum Reaktionssystem zugegeben wird, konkurrieren beide Moleküle um das aktive Zentrum des Enzyms.
Nach Bisswanger (2000) gilt dann für die Lineweaver-Burk-Darstellung folgende Gleichung:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_{\max}} + \frac{1}{[S]} \cdot \frac{K_{mapp}}{A_{\max}}, \text{ wobei } K_{mapp} = K_s^0 \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I^{(c)}}\right). \qquad (9)$$

$K_I^{(c)}$ steht für den Dissoziationskoeffizienten des kompetitiven Inhibitors und kann durch folgende Gleichgewichtsgleichung dargestellt werden:

$$K_I^{(c)} = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]}. \qquad (10)$$

K_{mapp} (*apparent=scheinbar*) ist das in Gegenwart eines Inhibitors beobachtete K_m.

Die Enzymaktivität wurde für verschiedene Substratkonzentrationen bei konstanter Hemmstoffkonzentration bestimmt ($[S]$ ist variabel und $[I]$ ist konstant).

Den Dissoziationskoeffizienten $K_I^{(c)}$ erhält man durch eine Anpassung der Gleichung (10) an die experimentell bestimmten Punkte und ist ein Maß für die Affinität des Inhibitors an das katalytische Zentrum des Enzyms.

3) Ergebnisse

3.1) Zusammenfassung

3.1.1) Evaluation der inhibitorischen Potenz der Alkylphosphocholine auf Cytochrom P450 in Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität

Vier racemische Alkylphosphocholine: rac-1-O-phosphocholin-2-N-acetyl-octadecan (rac-2-N-acetyl), rac-1-O-phosphocholin-2-amino-octadecan (rac-2-NH_2), rac-1-O-phosphocholin-2-O-acetyl-octadecan (rac-2-O-acetyl) und rac-1-O-phosphocholin-2-hydroxy-octadecan (rac-2-OH) wurden in Wasser oder Ethanol gelöst und hinsichtlich ihres inhibitorischen Effektes auf die 7-Ethoxycumarin-O-Deethylierung untersucht. Dabei wurden zwei Reaktionssysteme verwendet: Rattenlebermikrosomen mit einem hohen CYP2B1-Gehalt aus PB-behandelten Ratten und rekonstituierte Systeme aus isoliertem CYP2B1 und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase.

Die IC50-Werte lagen zwischen 6,3 – 46,8 µM für die verwendeten Alkylphosphocholine, wodurch ein Vergleich mit dem Medikament Ketoconazol möglich wird, das als eines der bekanntesten Inhibitoren von Cytochrom P450 ein IC50-Ranking von 3 – 40 µM besitzt (Newton et al., 1995; Draper et al., 1997; Haehner et al., 2004). Da die Werte für einzelne Alkylphosphocholine jedoch innerhalb des mikrosomalen und des rekonstituierten Systems erheblich differierten, muss eine getrennte Betrachtung erfolgen:

- mikrosomales System: IC50-Werte = 31,1 – 46,8 µM.
- rekonstituiertes System, in Wasser gelöst: IC50-Werte = 6,3 – 20,5 µM.
- rekonstituiertes System, in Ethanol gelöst: IC50-Werte = 6,5 – 13,5 µM.

Die deutlich erhöhten Werte im mikrosomalen System dürften sich auf eine Beteiligung von anderen Cytochrom P450-Isoenzymen an der Reaktionshemmung der CYP2B1-Isoform durch die Alkylphosphocholine zurückführen lassen: einerseits aufgrund einer reinen Konzentrationsminderung der CYP2B1-Isoform durch den Volumenanteil der anderen Isoenzyme, andererseits durch eine Konzentrationsminderung der „effektiven“ Alkylphosphocholine, die mit jenen Isoenzymen wechselwirken, die nicht 7-Ethoxycumarin als Substrat haben.

Anhand der Ergebnisse von Haehner et al. (2004), welche im rekonstituierten System ein IC50-Ranking von 2,2 – 3,5 µM erhielten, ist es legitim, den aus der Messreihe der rekonstituierten Systeme ausscherenden IC50-Wert von rac-2-NH_2 bei der Interpretation nicht zu berücksichtigen. Folglich ergaben sich für die rekonstituierten Systeme unabhängig vom Lösungsmittel niedrige IC50-Werte, was eine hohe inhibitorische Potenz der verwendeten Alkylphosphocholine wiederspiegelt.

3.1.2) Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität in Rattenlebermikrosomen durch Alkylphosphocholine

Die Abbildungen 4, 7 und 9 zeigen jeweils ein Lineweaver-Burk-Diagramm, in welchem die reziproke Substratkonzentration (1/[S]) gegen die reziproke 7-Ethoxycumarin-O-Deethylierungsaktivität (1/v) einer mikrosomalen Cytochrom P450-Fraktion aufgetragen ist. Die verwendeten Alkylphosphocholine wurden jeweils in Wasser gelöst.

Der Km-Wert der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylierung lag bei 167 µM. Die maximale Enzymaktivität (Vmax) wurde am Ordinatenschnittpunkt ermittelt und betrug ohne Inhibitor 2,5 nmol 7-Ethoxycumarin x (min x nmol P450)$^{-1}$.

Bei einer festen Konzentration von 46,8 µM rac-OH und einer differierenden 7-Ethoxycumarinkonzentation änderte sich Vmax nicht, während der Kmapp-Wert auf 400 µM anstieg. Der korrespondierende Ki-Wert lag bei 33,54 µM.
Vergleichendes lässt sich über die anderen Alkylphosphocholine sagen:
Bei einer festen Konzentration von 31,1 µM rac-OC2 bzw. 34,6 µM rac-NC2 und einer differierenden 7-Ethoxycumarinkonzentation änderte sich Vmax nicht, während der Kmapp-Wert auf 258,06 µM bzw. 367,65 µM anstieg. Der korrespondierende Ki-Wert lag bei 57,04 µM bzw. 28,80 µM.
Das Ki-Ranking lag somit bei 28,80 – 57,04 µM.
Hinsichtlich des Hemmungstyps lässt sich zusammenfassend sagen, dass die verwendeten Alkylphosphocholine eine strenge kompetitive Hemmung des Substrates 7-Ethoxycumarin in der Rattenlebermikrosomenfraktion bewirken.

3.1.3) Kompetitive Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität in rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450 Reduktasesystemen durch Alkylphosphocholine

Die Abbildungen 5, 6, 8, 10 und 11 stellen Lineweaver-Burk-Diagramme der vier verwendeten Alkylphosphocholine rac-OH, rac-OC2, rac-NH2 und rac-NC2 innerhalb eines rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktasesystems mit 7-Ethoxycumarin als Substrat dar. Als Lösungsmittel wurde sowohl Wasser als auch Ethanol verwendet.
Die maximale Enzymaktivität Vmax ohne Inhibitor war sowohl für die in Wasser als auch für die in Ethanol gelösten Reaktionssysteme gleich und betrug 5 nmol 7-Ethoxycumarin x (min x nmol P450)$^{-1}$.
Die Km-Werte der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylierung differierten in Abhängigkeit vom Lösungsmittel:

Für das in Wasser gelöste Enzymsystem wurde ein Km-Wert von 133 µM gemessen, wohingegen das in Ethanol gelöste System einen höheren Wert von 182 µM ergab. Dies könnte auf den kompetitiv inhibitorischen Effekt von Ethanol auf Cytochrom P450 zurückzuführen sein, den wir in einer vorangegangenen Messreihe unter Verwendung von Lebermikrosomen ermitteln konnten: Der errechnete Ki-Wert lag bei 81,94 mM und war somit über das 10^3- fache größer als die in dieser Arbeit verwendenten Alkylphosphocholine. Man sollte aber bedenken, dass diese Messreihe mit einer anderen Mikrosomencharge und in einem größeren zeitlichen Abstand zur eigentlichen Messreihe duchgeführt wurde.

Es ist hier anzumerken, dass der Km-Wert für das in Wasser gelöste Enzymsystem unserer Arbeitsgruppe bereits anhand vorangegangener Messreihen vorlag und somit als gegeben in die Berechnung der Ki-Werte einfloss. Seine graphische Darstellung wurde in dieser Arbeit jedoch nicht berücksichtigt

Für die in Wasser gelösten Alkylphosphocholine ergaben sich folgende Werte:

Bei einer festen Konzentration von 6,80 µM rac-OH und einer differierenden 7-Ethoxycumarinkonzentation änderte Vmax sich nicht, während der Kmapp-Wert auf 434,78 µM anstieg. Der korrespondierende Ki-Wert lag bei 3,00 µM.

Vergleichendes lässt sich über die anderen Alkylphosphocholine sagen:

Bei einer festen Konzentration von 6,30 µM rac-OC2 bzw. 20,50 µM rac-NH2 und einer differierenden 7-Ethoxycumarinkonzentation änderte sich Vmax nicht, während der Kmapp-Wert auf 800,00 µM bzw. 666,67 µM anstieg. Der korrespondierende Ki-Wert lag bei 1,26 µM bzw. 5,11 µM.

Das Ki-Ranking lag somit bei 1,26 – 5,11 µM.

Für die in Ethanol gelösten Alkylphosphocholine ergaben sich folgende Werte:

Bei einer festen Konzentration von 13,50 µM rac-OH bzw. 6,50 µM rac-NC2 und einer differierenden 7-Ethoxycumarinkonzentation änderte sich Vmax

nicht, während der Kmapp-Wert auf 555,56 µM bzw. 1000,00 µM anstieg. Der korrespondierende Ki-Wert lag bei 6,58 µM bzw. 1,45 µM.

Das Ki-Ranking lag somit bei 1,45 – 6,58 µM.

Hinsichtlich des Hemmungstyps lässt sich zusammenfassend sagen, dass die verwendeten Alkylphosphocholine eine strenge kompetitive Hemmung des Substrates 7-Ethoxycumarin in rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktasesystemen bewirken.

3.2) rac-OH; Mikrosomenfraktion

Graphische Darstellung

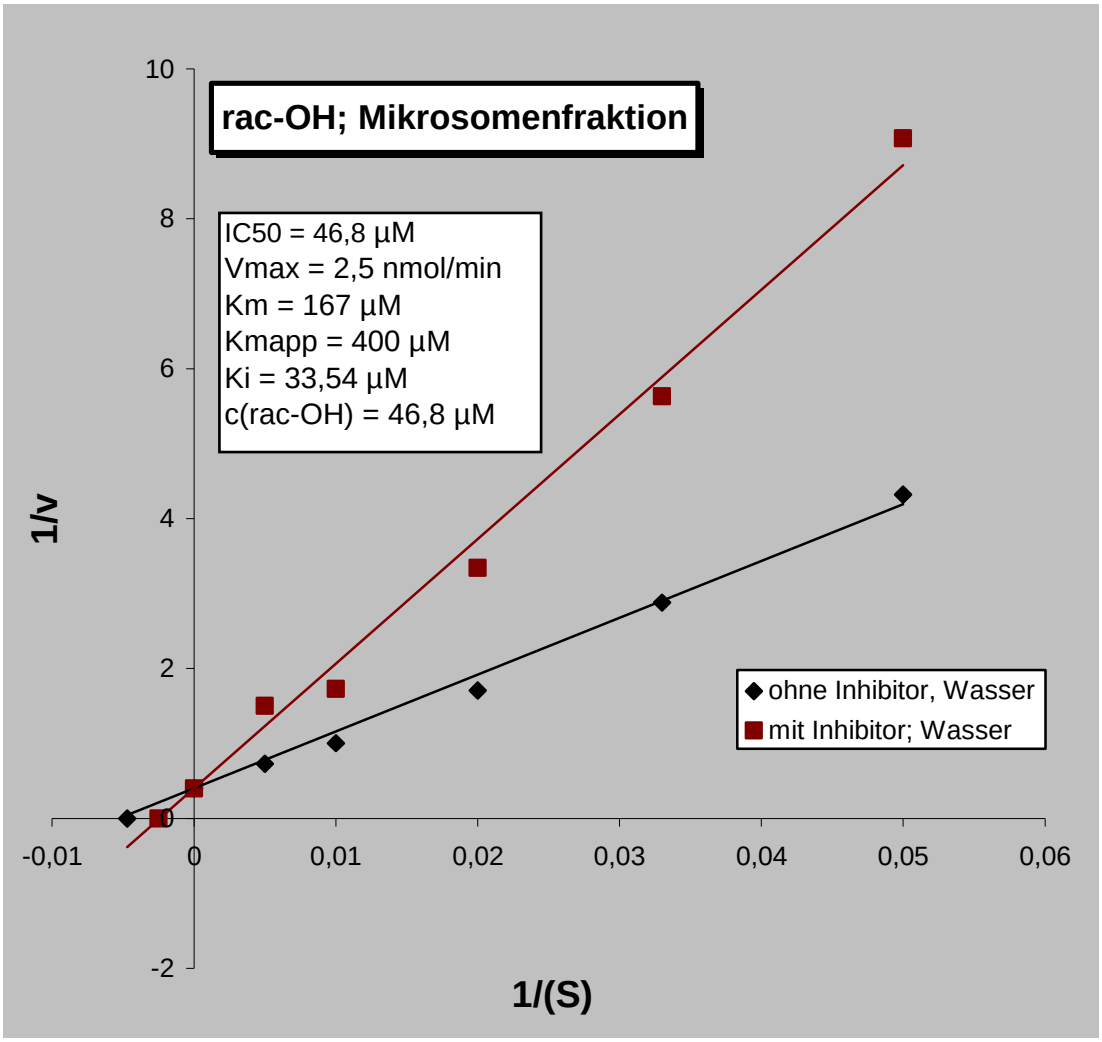


Abbildung 4: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität in Rattenlebermikrosomen durch 1-O-phosphocholine-2-hydroxy-octadecan (rac-2-OH), in Wasser gelöst.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$. Die Substratkonzentration trägt die Einheit µM

Diagrammbeschreibung

Die Abbildung 4 stellt anhand eines Lineweaver-Burk Diagramms den Hemmeffekt des Inhibitors rac-1-O-phosphocholine-2-hydroxy-octadecan (rac-2-OH) auf die 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität dar.

Die Lebermikrosomenfraktion von PB-behandelten Ratten enthielt 72 pmol Cytochrom P450 und wurde unter Standartbedingungen und dem Zusatz von variierenden 7-Ethoxycumarinkonzentationen (20 – 200 µM) und konstanter Inhibitorkonzentration nach den im Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Bedingungen für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Raten der 7-Hydroxycumarinbildung (Umbelliferon) durch die Methode der Fluoreszenzspektroskopie gemessen.

Der Km-Wert und der Vmax-Wert ohne Inhibitor wurden graphisch auf 167 µM und 2,5 nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$ bestimmt.

Der Kmapp-Wert und der Ki-Wert in Gegenwart des Inhibitors mit einer Konzentration von 46,8 µM wurden graphisch ermittelt und betrugen 400 µM und 33,54 µM. Der Vmax-Wert mit Inhibitor blieb gegenüber dem Wert ohne Inhibitor konstant.

Folglich handelte es sich um einen strengen kompetitiven Hemmtyp.

3.3) rac-OH; rekonstituiertes System

Graphische Darstellung

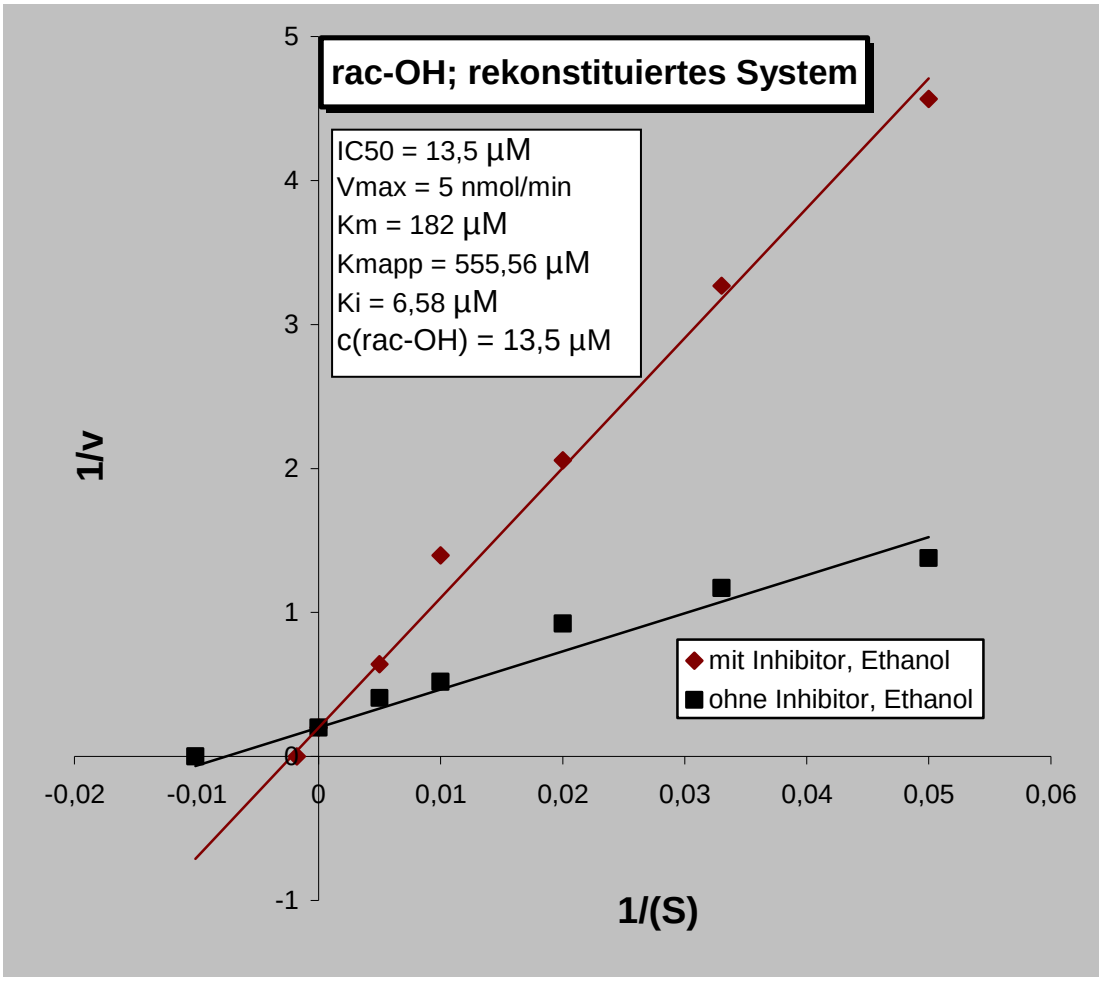


Abbildung 5: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität in einem rekonstituierten System durch 1-O-phosphocholine-2-hydroxy-octadecan (rac-2-OH), in Ethanol gelöst.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$. Die Substratkonzentration trägt die Einheit µM.

Diagrammbeschreibung

Die Abbildung 5 stellt anhand eines Lineweaver-Burk Diagramms den Hemmeffekt des Inhibitors rac-1-O-phosphocholine-2-hydroxy-octadecan (rac-2-OH) auf die 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität dar.

Das in Ethanol gelöste rekonstituierte CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktasesystem (molares Verhältnis von 1:2) setzte sich aus CYP2B1 mit einer Konzentration von 27,5 pmol und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase mit einer Konzentration von 55 pmol zusammen. Das System wurde nach den unter dem Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Bedingungen und dem Zusatz von variierenden 7-Ethoxycumarin-konzentationen (20 – 200 µM) und konstanter Inhibitorkonzentration für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Raten der 7-Hydroxycumarinbildung (Umbelliferon) durch die Methode der Fluoreszenzspektroskopie gemessen.

Der Km-Wert und der Vmax-Wert ohne Inhibitor wurden graphisch auf 182 µM und 5 nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$ bestimmt.

Der Kmapp-Wert und der Ki-Wert in Gegenwart des Inhibitors mit einer Konzentration von 13,5 µM wurden graphisch ermittelt und betrugen 555,56 µM und 6,58 µM. Der Vmax-Wert mit Inhibitor blieb gegenüber dem Wert ohne Inhibitor konstant.

Folglich handelte es sich um einen strengen kompetitiven Hemmtyp.

3.4) rac-OH; rekonstituiertes System

Graphische Darstellung

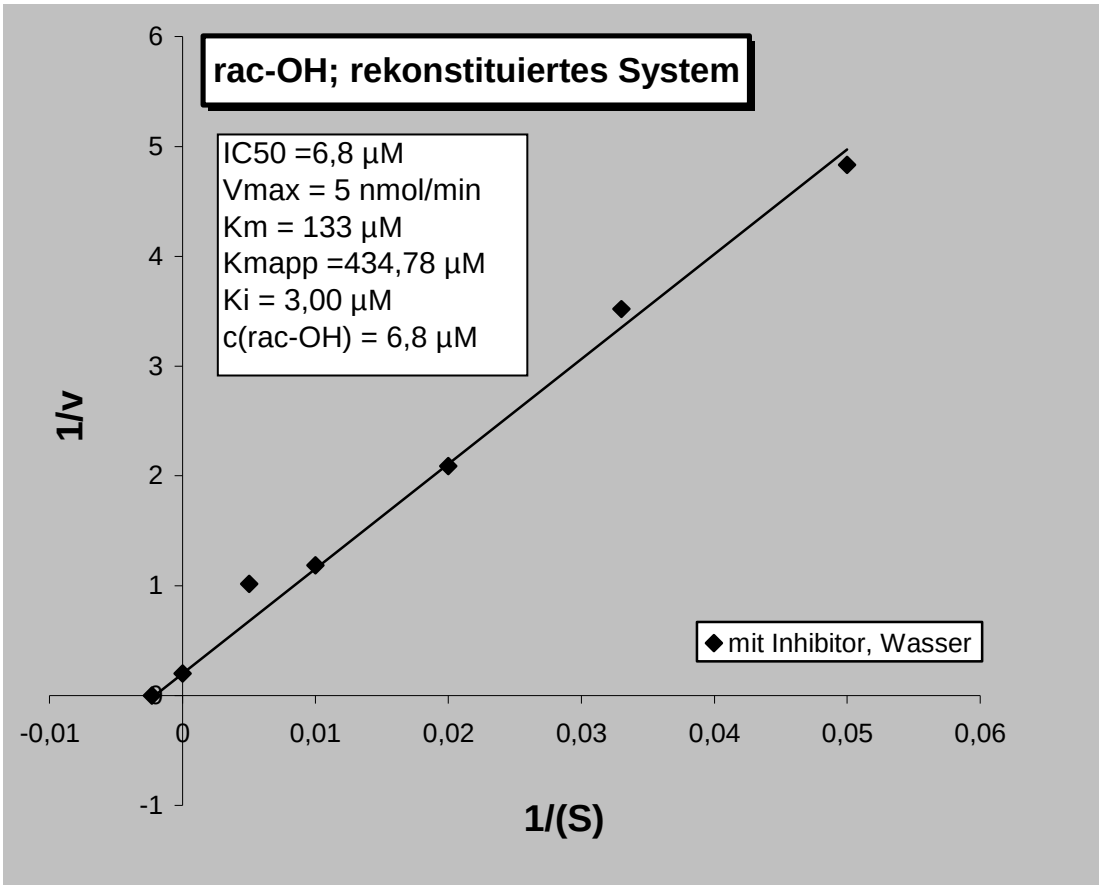


Abbildung 6: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität in einem rekonstituiertem System durch 1-O-phosphocholine-2-hydroxy-octadecan (rac-2-OH), in Wasser gelöst.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$. Die Substratkonzentration trägt die Einheit µM.

Anmerkung: Die Leergerade ist im Diagramm nicht dargestellt. Der entsprechende Km-Wert wurde aus vorangegangenen Messreihen übernommen.

Diagrammbeschreibung

Die Abbildung 6 stellt anhand eines Lineweaver-Burk Diagramms den Hemmeffekt des Inhibitors rac-1-O-phosphocholine-2-hydroxy-octadecan (rac-2-OH) auf die 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität dar.

Das in Wasser gelöste rekonstituierte CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktasesystem (molares Verhätlnis von 1:2) setzte sich aus CYP2B1 mit einer Konzentration von 27,5 pmol und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase mit einer Konzentration von 55 pmol zusammen. Das System wurde nach den unter dem Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Bedingungen und dem Zusatz von variierenden 7-Ethoxycumarin-konzentationen (20 – 200 µM) und konstanter Inhibitorkonzentration für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Raten der 7-Hydroxycumarinbildung (Umbelliferon) durch die Methode der Fluoreszenzspektroskopie gemessen.

Der Km-Wert und der Vmax-Wert ohne Inhibitor wurden bereits graphisch auf 133 µM und 5 nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$ vorbestimmt.

Der Kmapp-Wert, und der Ki-Wert in Gegenwart des Inhibitors mit einer Konzentration von 6,8 µM wurden graphisch ermittelt und betrugen 434,78 µM und 3,00 µM. Der Vmax-Wert mit Inhibitor blieb gegenüber dem Wert ohne Inhibitor konstant.

Folglich handelte es sich um einen strengen kompetitiven Hemmtyp.

3.5) rac-OC2; Mikrosomenfraktion

Graphische Darstellung

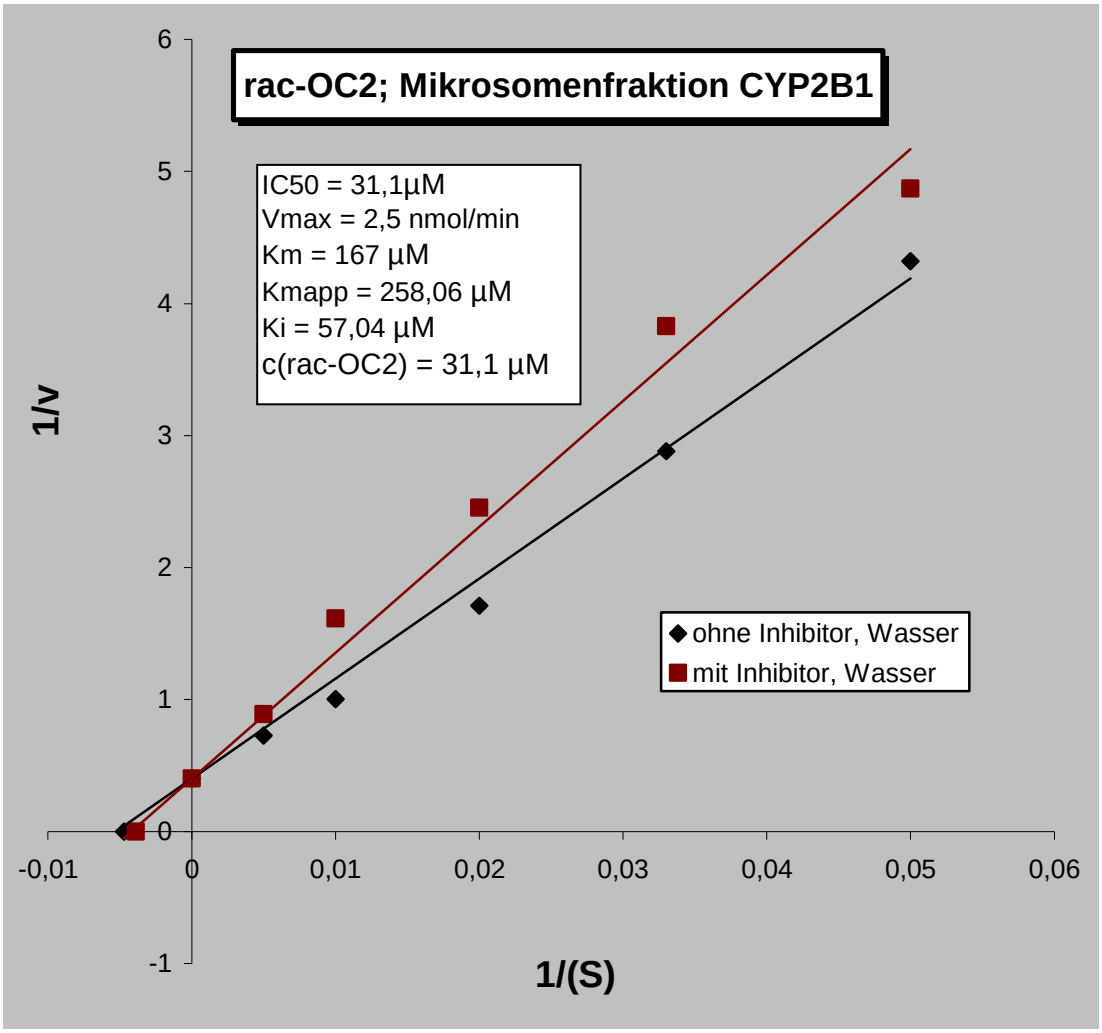


Abbildung 7: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität in Rattenlebermikrosomen durch rac-1-O-phosphocholine-2-O-acetyl-octadecan (rac-2-O-acetyl), in Wasser gelöst.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$. Die Substratkonzentration trägt die Einheit µM.

Diagrammbeschreibung

Die Abbildung 7 stellt anhand eines Lineweaver-Burk Diagramms den Hemmeffekt des Inhibitors rac-1-O-phosphocholine-2-O-acethyl-octadecan (rac-2-O-acetyl) auf die 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität dar.
Die Lebermikrosomenfraktion von PB-behandelten Ratten enthielt 27 nmol Cytochrom P450 und wurde unter Standardbedingungen und dem Zusatz von variierenden 7-Ethoxycumarinkonzentationen (20 – 200 µM) und konstanter Inhibitorkonzentration nach den im Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Raten der 7-Hydroxycumarinbildung (Umbelliferon) durch die Methode der Fluoreszenzspektroskopie gemessen.
Der Km-Wert und der Vmax-Wert ohne Inhibitor wurden graphisch auf 167 µM und 2,5 nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$ bestimmt.
Der Kmapp-Wert, und der Ki-Wert in Gegenwart des Inhibitors mit einer Konzentration von 31,1 µM wurden graphisch ermittelt und betrugen 258,06 µM und 57,04 µM. Der Vmax-Wert mit Inhibitor blieb gegenüber dem Wert ohne Inhibitor konstant.
Folglich handelte es sich um einen strengen kompetitiven Hemmtyp.

3.6) rac-OC2; rekonstituiertes System

Graphische Darstellung

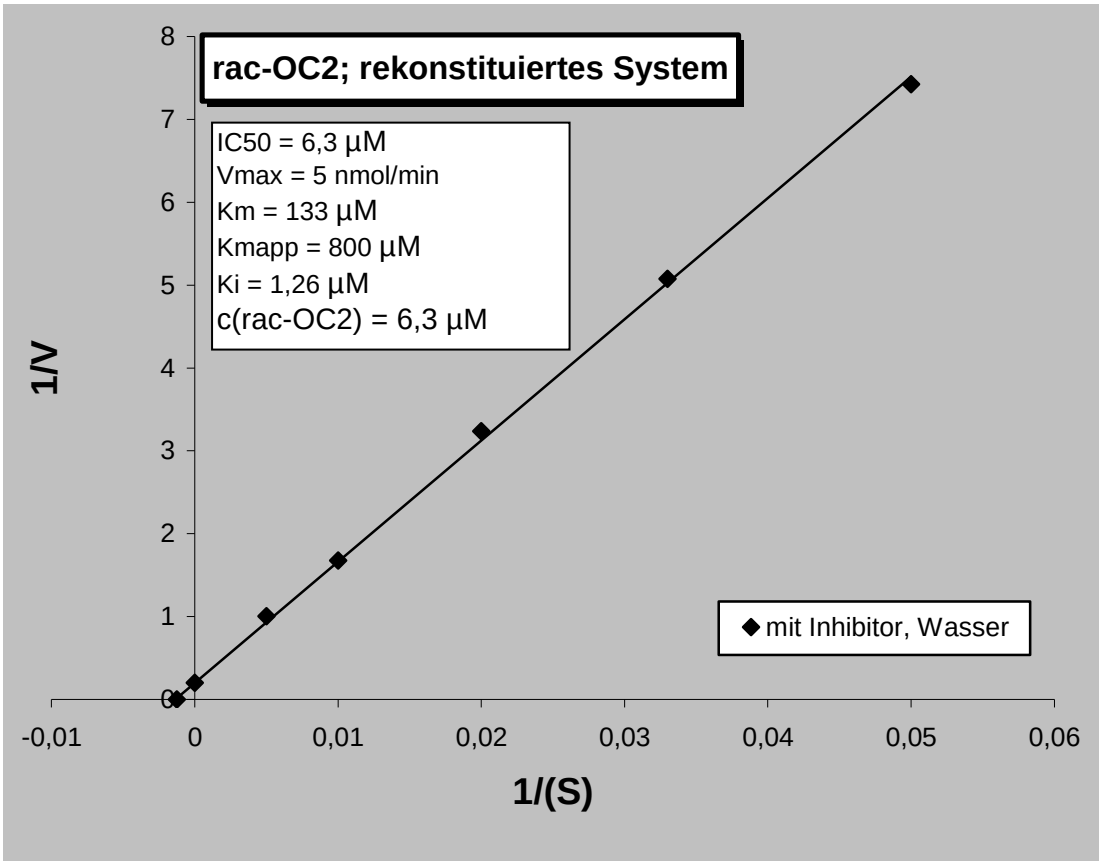


Abbildung 8: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität in einem rekonstituiertem System durch rac-1-O-phosphocholine-2-O-acetyl-octadecan (rac-2-O-acetyl), in Wasser gelöst.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$. Die Substratkonzentration trägt die Einheit µM.

Anmerkung: Die Leergerade ist im Diagramm nicht dargestellt. Der entsprechende Km-Wert wurde aus vorangegangenen Messreihen übernommen.

Diagrammbeschreibung

Die Abbildung 8 stellt anhand eines Lineweaver-Burk Diagramms den Hemmeffekt des Inhibitors rac-1-O-phosphocholine-2-O-acetyl-octadecan (rac-2-O-acetyl) auf die 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität dar.

Das in Wasser gelöste rekonstituierte CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktasesystem (molares Verhältnis von 1:2) setzte sich aus CYP2B1 mit einer Konzentration von 27,5 pmol und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase mit einer Konzentration von 55 pmol zusammen. Das System wurde nach den unter dem Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Bedingungen und dem Zusatz von variierenden 7-Ethoxycumarin-konzentationen (20 – 200 µM) und konstanter Inhibitorkonzentration für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Raten der 7-Hydroxycumarinbildung (Umbelliferon) durch die Methode der Fluoreszenzspektroskopie gemessen.

Der Km-Wert und der Vmax-Wert ohne Inhibitor wurden bereits graphisch auf 133 µM und 5 nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$ vorbestimmt.

Der Kmapp-Wert, und der Ki-Wert in Gegenwart des Inhibitors mit einer Konzentration von 6,3 µM wurden graphisch ermittelt und betrugen 800 µM und 1,26 µM. Der Vmax-Wert mit Inhibitor blieb gegenüber dem Wert ohne Inhibitor konstant.

Folglich handelte es sich um einen strengen kompetitiven Hemmtyp.

3.7) rac-NC2; Mikrosomenfraktion

Graphische Darstellung

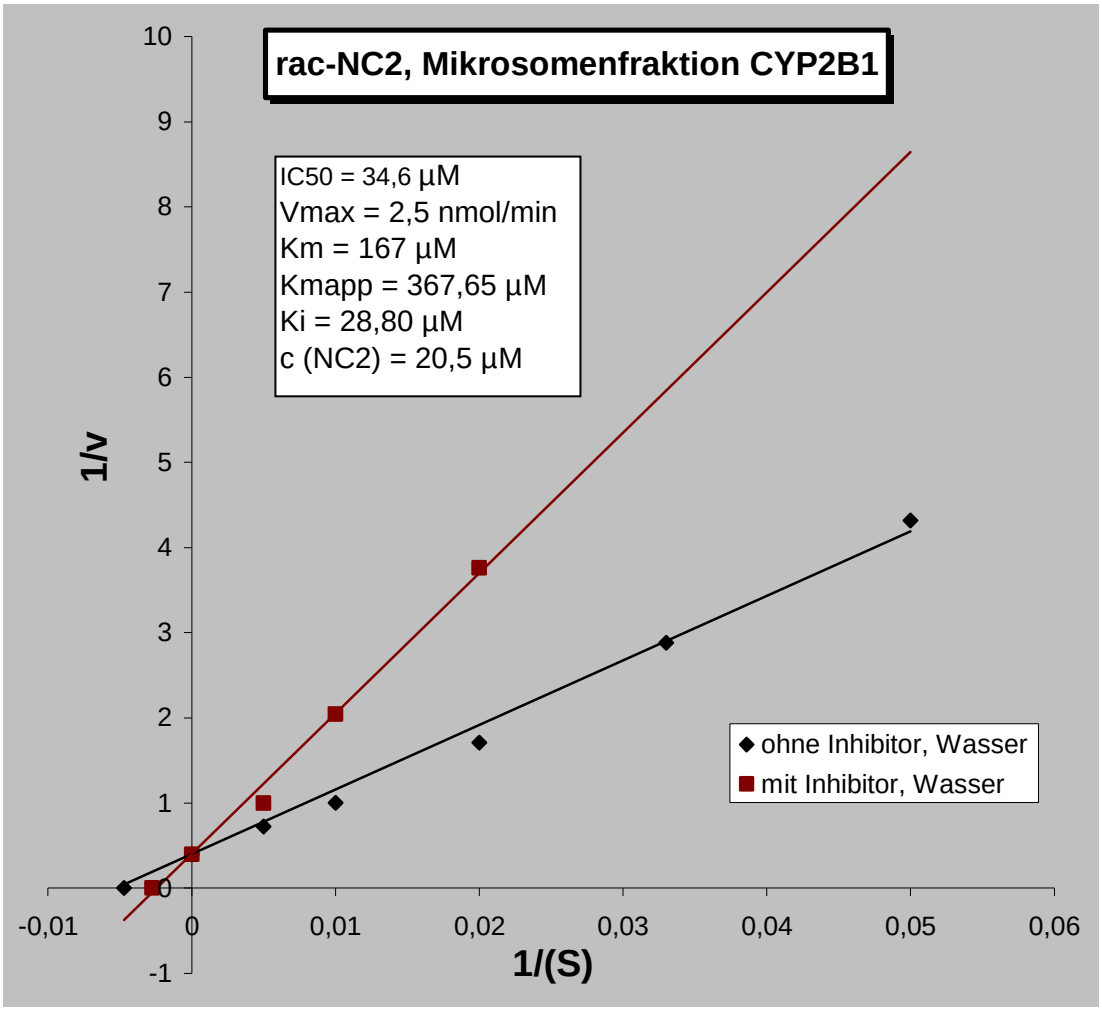


Abbildung 9: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität in Rattenlebermikrosomen durch rac-1-O-phosphocholine-2-N-acetyl-octadecan (rac-2-N-acetyl), in Wasser gelöst.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$. Die Substratkonzentration trägt die Einheit µM.

Diagrammbeschreibung

Die Abbildung 9 stellt anhand eines Lineweaver-Burk Diagramms den Hemmeffekt des Inhibitors rac-1-O-phosphocholine-2-N-acetyl-octadecan (rac-2-N-acetyl) auf die 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität dar.
Die Lebermikrosomenfraktion von PB-behandelten Ratten enthielt 27 nmol Cytochrom P450 und wurde unter Standardbedingungen und dem Zusatz von variierenden 7-Ethoxycumarinkonzentationen (20 – 200 µM) und konstanter Inhibitorkonzentration nach den im Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Raten der 7-Hydroxycumarinbildung (Umbelliferon) durch die Methode der Fluoreszenzspektroskopie gemessen.
Der Km-Wert und der Vmax-Wert ohne Inhibitor wurden graphisch auf 167 µM und 2,5 nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$ bestimmt.
Der Kmapp-Wert, und der Ki-Wert in Gegenwart des Inhibitors mit einer Konzentration von 34,6 µM wurden graphisch ermittelt und betrugen 367,65 µM und 28,80 µM. Der Vmax-Wert mit Inhibitor blieb gegenüber dem Wert ohne Inhibitor konstant.
Folglich handelte es sich um einen strengen kompetitiven Hemmtyp.

3.8) rac-NC2; rekonstituiertes System

Graphische Darstellung

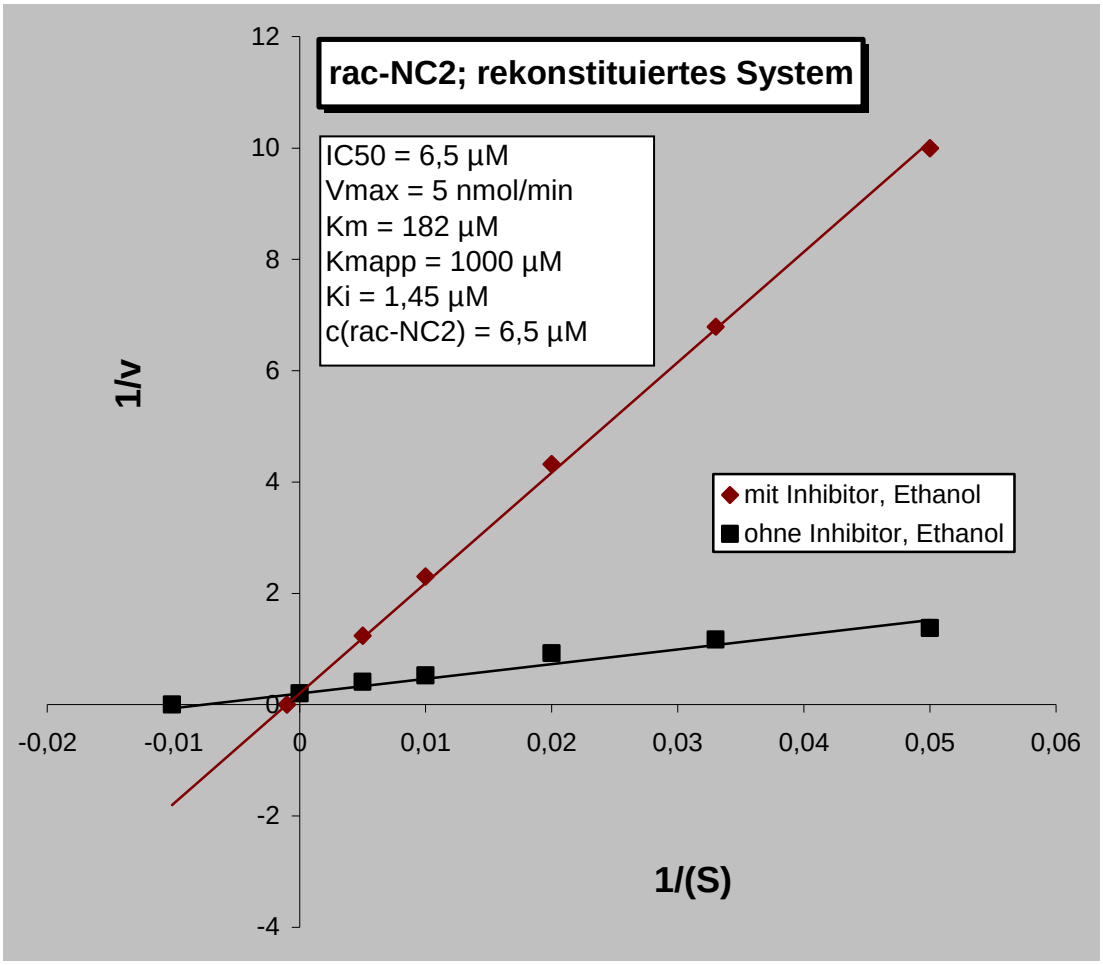


Abbildung 10: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität in einem rekonstituierten System durch rac-1-O-phosphocholine-2-N-acetyl-octadecan (rac-2-N-acetyl), in Ethanol gelöst.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$. Die Substratkonzentration trägt die Einheit µM.

Diagrammbeschreibung

Die Abbildung 10 stellt anhand eines Lineweaver-Burk Diagramms den Hemmeffekt des Inhibitors rac-1-O-phosphocholine-2-N-acetyl-octadecan (rac-2-N-acetyl) auf die 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität dar.

Das in Ethanol gelöste, rekonstituierte CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktasesystem (molares Verhältnis von 1:2) setzte sich aus CYP2B1 mit einer Konzentration von 27,5 pmol und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase mit einer Konzentration von 55 pmol zusammen. Das System wurde nach den unter dem Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Bedingungen und dem Zusatz von variierenden 7-Ethoxycumarin-konzentationen (20 – 200 µM) und konstanter Inhibitorkonzentration für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Raten der 7-Hydroxycumarinbildung (Umbelliferon) durch die Methode der Fluoreszenzspektroskopie gemessen.

Der Km-Wert und der Vmax-Wert ohne Inhibitor wurden graphisch auf 182 µM und 5 nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$ bestimmt.

Der Kmapp-Wert, und der Ki-Wert in Gegenwart des Inhibitors mit einer Konzentration von 6,5 µM wurden graphisch ermittelt und betrugen 1000 µM und 1,45 µM. Der Vmax-Wert mit Inhibitor blieb gegenüber dem Wert ohne Inhibitor konstant.

Folglich handelte es sich um einen strengen kompetitiven Hemmtyp.

3.9) rac-NH2; rekonstituiertes System

Graphische Darstellung

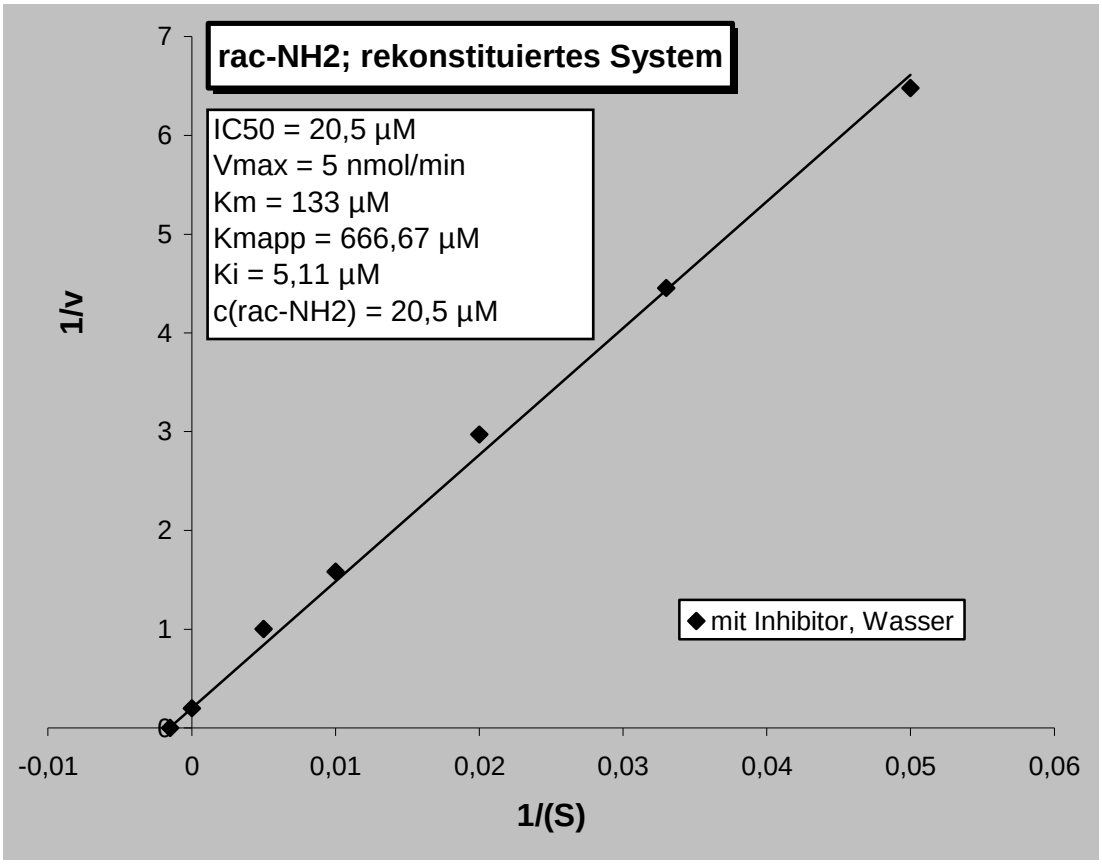


Abbildung 11: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität in einem rekonstituierten System durch rac-1-O-phosphocholine-2-amino-octadecan (rac-2-NH_2), in Wasser gelöst.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$. Die Substratkonzentration trägt die Einheit µM.

Anmerkung: Die Leergerade ist im Diagramm nicht dargestellt. Der entsprechende Km-Wert wurde aus vorangegangenen Messreihen übernommen.

Diagrammbeschreibung

Die Abbildung 11 stellt anhand eines Lineweaver-Burk Diagramms den Hemmeffekt des Inhibitors rac-1-O-phosphocholine-2-amino-octadecan (rac-2-NH_2) auf die 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität dar.

Das in Wasser gelöste rekonstituierte CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktasesystem (molares Verhätlnis von 1:2) setzte sich aus CYP2B1 mit einer Konzentration von 27,5 pmol und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase mit einer Konzentration von 55 pmol zusammen. Das System wurde nach den unter dem Abschnitt Material und Methoden beschriebenen Bedingungen und dem Zusatz von variierenden 7-Ethoxycumarin-konzentationen (20 – 200 µM) und konstanter Inhibitorkonzentration für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Raten der 7-Hydroxycumarinbildung (Umbelliferon) durch die Methode der Fluoreszenzspektroskopie gemessen.

Der Km-Wert und der Vmax-Wert ohne Inhibitor wurden graphisch auf 133 µM und 5 nmol gebildetes Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$ bestimmt.

Der Kmapp-Wert, und der Ki-Wert in Gegenwart des Inhibitors mit einer Konzentration von 20,5 µM wurden graphisch ermittelt und betrugen 666,67 µM und 5,11 µM. Der Vmax-Wert mit Inhibitor blieb gegenüber dem Wert ohne Inhibitor konstant.

Folglich handelte es sich um einen strengen kompetitiven Hemmtyp.

Zusammenfassung der Messergebnisse

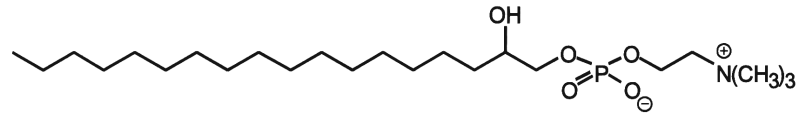
Tabelle 1: Darstellung der Zusammenfassung der errechneten Messergebnisse mit den in dieser Arbeit verwendeten Alkylphosphocholinen als Inhibitoren von Cytochrom P450.

Maßeinheit der enzymkinetischen Parameter IC50, Km, Kmapp, und Ki: µM

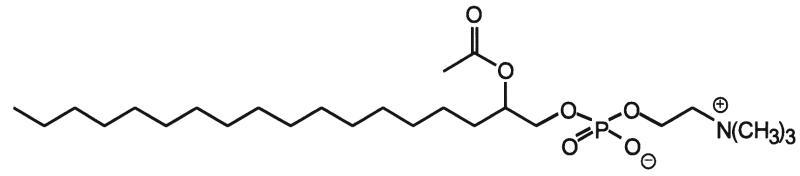
Maßeinheit des enzymkinetischen Parameters Vmax: nmol Umbelliferon x (min x nmol CYP2B1)$^{-1}$

		IC50	Vmax	Km	Kmapp	Ki
Mikrosomenfraktion ; Wasser	rac-OH	46,80	2,50	167,00	400,00	33,54
	rac-OC2	31,10	2,50	167,00	258,06	57,04
	rac-NC2	34,60	2,50	167,00	367,65	28,80
rekonstituiertes System; Wasser	rac-OH	6,80	5,00	133,00	434,78	3,00
	rac-OC2	6,30	5,00	133,00	800,00	1,26
	rac-NH2	20,50	5,00	133,00	666,67	5,11
rekonstituiertes System; Ethanol	rac-OH	13,50	5,00	182,00	555,56	6,58
	rac-NC2	6,50	5,00	182,00	1000,00	1,45

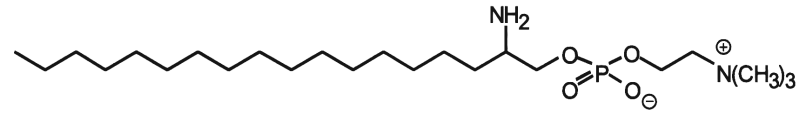
Strukturformeln der verwendeten Alkylphosphocholine



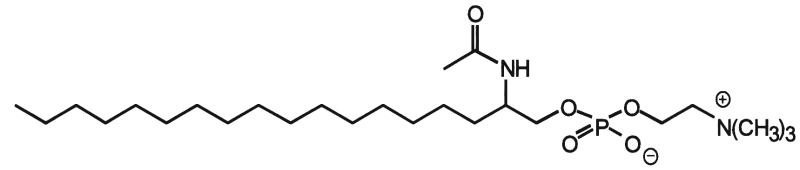
rac-1-O-phosphocholine-2-hydroxy-octadecane (rac-2-OH)



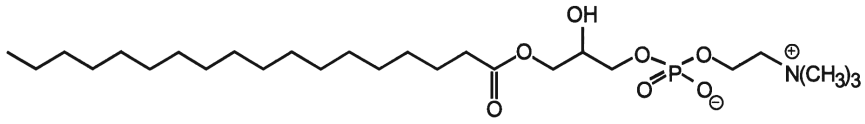
rac-1-O-phosphocholine-2-O-acetyl-octadecane (rac-2-O-acetyl)



rac-1-O-phosphocholine-2-amino-octadecane (rac-2-NH_2)



rac-1-O-phosphocholine-2-N-acetyl-octadecane (rac-2-N-acetyl)



1-Stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (Lysolecithin)

Abbildung 12: Darstellung der Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Alkylphosphocholine. Die Benennung der jeweiligen Derivate befinden sich bereits in der Abbildung.

4) Diskussion

Am Anfang der laborchemischen Synthese der Alkylphosphocholine stand die Entdeckung, dass Lysolecithin die Phagozytose durch Makrophagen stimuliert. Folglich wurde die Hypothese aufgestellt, dass Lysophospholipide im Allgemeinen als physiologische Mediatoren von immunologischen Reaktionen fungieren könnten. Durch diese Annahme war der Grundstein zu der Entwicklung von Wirkstoffen gelegt, die sich in ihrem Metabolismus von den natürlich vorkommenden Lysophospholipiden unterscheiden. Wegen ihrer längeren Halbwertszeit, die auf eine verminderte Abbaugeschwindigkeit im Kreislaufsystem zurückzuführen ist, wurden sie als potente Immunmodulatoren angesehen. Die Leitsubstanz dieser gesamten Wirkstoffklasse war 1-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine (ET18 OCH_3), welche in der Tat einige interessante immunpharmakologische Eigenschaften hat.

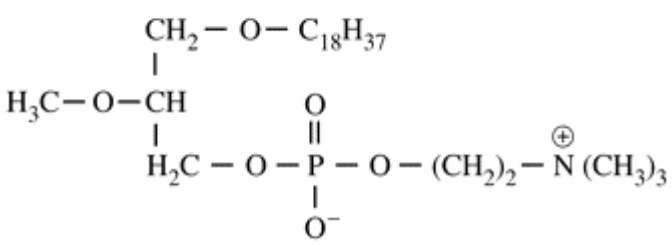


Abbildung 13: Darstellung der Strukturformel von ET18 OCH_3

Anhand von Untersuchungen der Pharmakologie der Alkyllysophospholipide stellte sich heraus, dass diese Substanzgruppe konzentrationsabhängige zytotoxische Effekte in verschiedenen Gewebskulturen zeigt (Kötting et al., 1992; Maschner et al., 1992; Unger et al., 1991). Weil ihre enzymatische Spaltung durch Phospholipasen und Acyltransferasen zu einer geringen

Halbwertszeit in biologischen Systemen führt, wurden stabilere Derivate synthetisiert. Fleer und Mitarbeiter konnten 1987 zeigen, dass ihrer Zytotoxität mit ihrer Substratspezifität für die Enzyme Phospholipase C und D korreliert (Fleer et. Al., 1987). Von diesen Studien ausgehend folgerte man, dass die Glycerolstruktur kein essentielles strukturelles Element für die antitumoröse Aktivität dieser Moleküle ist. Mehr noch, durch den Verlust der Glycerolstruktur wurde eine Resistenz gegenüber den metabolisierenden Enzymen geschaffen, wodurch die zytotoxische Konzentration in den Zielzellen erhöht werden konnte. Das war die Geburtsstunde von Hexadecylphosphocholin (HePC, Miltefosin), dem Prototyp der Alkylphosphocholine, einer neuen Generation von Antitumormedikamenten, die ihre Wirksamkeit auch im großen Feld der durch Protozoen verursachten Infektionskrankheiten entfalten:

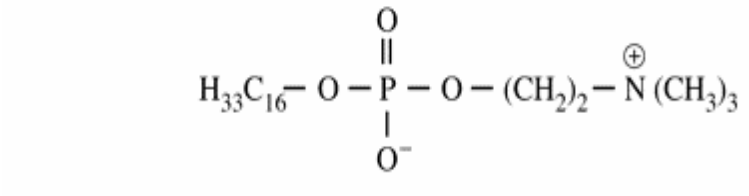


Abbildung 14: Darstellung der Strukturformel von Hexadecylphosphocholin

In den letzten 15 Jahren seit der Entwicklung von ET18 OCH3 und HePC sind viele Analogsubstanzen entwickelt worden, die in verschiedenen Zellsystemen unterschiedliche Wirkungen zeigen. Diesen Wirkungen entsprechend gibt es eine Vielfalt von postulierten Wirkmechanismen in den Zielzellen, die die Suche nach einem vermutlich existierenden Haupttarget zunehmend erschweren.

Anhand der in dieser Arbeit dargestellten Messergebnisse konnte erstmalig ein Wirkmechanismus aufgedeckt werden, der die Hemmung von jenen Isoenzymen zugrunde legt, die der Cytochrom P450 Superfamilie angehören.

Bevor jedoch eine ausführliche Betrachtung dieser Messergebnisse erfolgt, muss zuerst eine allgemeine Interpretation von dem bis zum heutigen Zeitpunkt angesammelten Wissen über postulierte Wirkmechanismen der Alkylphosphocholine erfolgen, um ihren Charakter als biologische Messengermoleküle ergründen zu können.

4.1) Etablierte Wirkmechanismen der Alkylphosphocholine

Wie im Voraufgegangenen bereits erwähnt, gibt es eine Vielzahl von Wirkmechanismen, die im Laufe der Jahre von den verschiedenen Forschergruppen formuliert wurden. Diese Wirkmechanismen unterscheiden sich je nach Wirkstoff und Zellgewebe. Dennoch kann man sagen, dass es bisher vier Zielgruppen gibt, auf die die Alkylphsophocholine einwirken sollen:

1. Enzyme, die der Signalverarbeitung bzw. Signalweiterleitung dienen: Proteinkinasen und Phospholipasen
2. De-novo-Synthese von Phosphatidylcholin (Lecithin)
3. Transportsysteme niedermolekularer Substanzen in der Zellmembran
4. Aktivierung des CD95-Rezeptors

Daneben existieren noch weitere Wirkmechanismen, die für Miltefosin spezifisch sind, von denen insbesondere die Induktion der Zelldifferenzierung und die antiinvasiven Effekte hervorzuheben sind.

4.1.1) Enzyme, die der Signalverarbeitung bzw. -weiterleitung dienen: Proteinkinasen und Phospholipasen

Die von Überall und Mitarbeiter durchgeführten in vitro Studien ergaben, dass Miltefosin die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) sowohl in zellfreien Extrakten als auch in intakten Zellen hemmt (Überall et al., 1982). Man erkannte jedoch anhand weiterführender Studien, dass dieser Mechanismus, der sich auch auf weitere Derivate der Alkylphosphocholine anwenden läßt, nicht der einzige war. Zusätzlich wurde eine Hemmung der Phospholipase C und der Phospholipase A_2 bei gleichzeitiger Aktivierung der Phospholipase D formuliert.

Somit kann diese Wirkstoffgruppe als ein multifunktionaler Effektor des Phosphoinositolmetabolismus und somit der G-Protein gekoppelten zellulären Signaltransduktion angesehen werden. Denn die Beeinflussung der Homöostase membranintegrierter Inositolphospholipide wirkt sich auf eine Vielzahl von second messengers aus, wie z.B. IP_3 und Diacylglycerol, die für diverse Zellfunktionen, Zellwachstum und -teilung von herausragender Bedeutung sind (Eibl and Unger, 1996). Somit ist es mehr als wahrscheinlich, dass eine Interaktion innerhalb dieser Signalkaskade zu einer Blockade der Zellteilung und somit zu einem verminderten Tumorwachstum führt.

4.1.2) De-novo-Synthese von Phosphatidylcholin (Lecithin)

Das Glycerophospholipid Lecithin ist ein integraler Baustein biologischer Membranen. Die Biosynthese erfolgt aus Diacylglycerin (DAG) und Cytidindiphosphat-Cholin (CDP-Cholin), welches aus Cholin über Phospho-cholin entsteht. DAG und CDP-Cholin reagieren zu Phosphatidylcholin unter Abspaltung von Cytidinmonophosphat. Die Arbeitsgruppe um Jose M. Jimenez-Lopez untersuchte die Wirkung von Alkylphosphocholinen auf HepG2 Zellen und fand heraus, dass sie die Biosynthese von

Phosphocholinen reduzieren (Jimenez-Lopez et. al., 2002). Entgegen den Ergebnissen von Geilen et al., die mit MDCK Zellen arbeiteten (Geilen et al., 1994), wurde die verminderte Synthese der Phosphocholine nicht durch eine reduzierte zelluläre Aufnahme von Cholin bestimmt, sondern durch eine Aktivitätsänderung des Enzyms CTP-Cholin-Cytidyl-Transferase (CT), welches die Reaktion von Phosphocholin zu CDP-Cholin über die Transferierung von Cytidylmonophosphat katalysiert. Es ist hinreichend bekannt, dass dieses Enzym in zwei unterschiedlichen Aktivitätsformen in Abhängigkeit von seinem Milieu existiert: CT ist inaktiv, wenn es im Cytosol gelöst ist und aktiv, wenn es an Membranen gebunden ist. Die Ergebnisse zeigten, dass die Alkylphsophocholine nur die Verteilung des Enzyms und nicht dessen Gesamtaktivität beeinflussen. Sie verhindern den Transport des Enzyms vom ER über den Golgi-Apparat zur Membran, können aber bereits das an die Membran gebundene Enzym aus diesem Verbund nicht mehr herauslösen. Somit üben sie einen regulierenden Effekt auf die Translokation des Enzyms CTP-Cholin-Cytidyl-Transferase zwischen Membranen und Cytosol aus, welches wiederum für den antiproliferativen Effekt der Alkylphosphocholine auf die HepG2 Zelllinie verantwortlich sein könnte.

4.1.3) Transportsysteme niedermolekularer Substanzen in der Zellmembran

Die Arbeitsgruppe um D. Berkovic veröffentlichte 1995 die Ergebnisse zu Untersuchungen von Effekten von Alkylphosphocholine (im speziellen HePC) auf den Membranphospholipidmetabolismus in humanen Tumorzellen (Berkovic et al., 1995). Dabei entdeckten sie, dass die Alkylphsophocholine die Aufnahme einer Vielfalt von unterschiedlichen Substanzen hemmen, die für die zelluläre Integration unabkömmlich sind.

Dem Mechanismus für diese Beobachtungen legten sie eine interessante These zugrunde, denn sie gingen eher von einem nicht-spezifischen

Membraneffekt als von einer auf spezielle Carrierproteine gerichteten Aktion durch die Alkylphosphocholine aus. Die Alkylphsophocholine sollten mit den zellulären Uptakemechanismen entweder über eine allgemeine Unordnung der Membranstrukturen oder über Lipid-Protein-Interaktionen wechselwirken. Grundlage seien ihre physikalischen Eigenschaften als Lysophospholipid-strukturen, die zu einem Wechsel in der Molekülkonformation und in der Aktivität vieler Carriersysteme führen würden.

Diese Annahmen wurden durch bestimmte voraufgegangene Ergebnisse unterstützt: Experimente zu zellulären Uptakes mit dem physiologischen Membranphospholipid ES-16-OH und dem HePC Analogon $HePC_{6,}$ die identische physikochemische Eigenschaften wie die Alkylphosphocholine haben, zeigten eine Uptakeinhibition von Inositol. Dieser Effekt wurde durch eine längere Inkubationszeit außer Kraft gesetzt, wahrscheinlich durch den bereits bei HePC beschriebenen Transfer der Phosphocholingruppe zu Diacylglycerol. Der Inhibitionsmechanismus von Inositol wurde anhand von Studien über den Sättigungscharakter von Carriern und anhand von Lieweaver-Burk Diagrammen als nicht-kompetitiv beschrieben. Hoffman und Mitarbeiter entdeckten 1992 in HL60 Zellen nicht nur den verminderten Uptake von Inositol, sondern auch von Methionin, Desoxyglucose, Histidin und Arachidonsäure unter Verwendung von Alkylphosphocholinen und Lysophosphocholin (Hoffman et al., 1992). Diese Beobachtung machten auch Posse und Mitarbeiter hinsichtlich der Uptakehemmung von Cholin (Posse et al., 1994). Der unspezifische Mechanismus der Uptakehemmung wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass die Inhibition sehr schnell erfolgte, was spezifische zelluläre Effekte aufgrund der verminderten intrazellulären Konzentration unwahrscheinlich macht. Dennoch wurde eine Downregulation von Membrancarriermolekülen beschrieben, wie z.B. beim epidermal growth factor (Kosano, H.; Takatani, O., 1989). Folglich dürften die Alkylphosphocholine durch eine Beeinflussung der Aktivität der Na/K-ATPase indirekt eine Uptakeinhibition bewirken (Zheng, B. et al., 1990), denn durch den verminderten Na-Einstrom werden bestimmte indirekte Transportsystem gehemmt.

4.1.4) Aktivierung des CD95-Rezeptors

Die in dieser Arbeit verwendeten synthetischen Alkylphosphocholine wurden erstmals 1994 von Massing und Eibl synthetisiert (Massing U.; Eibl, H., 1994). Das Ziel war die Weiterentwicklung der Alkylphsophocholine zu Substanzen mit einer höheren antineoplastischen Aktivität und mit geringeren Nebenwirkungen im Vergleich zu der Standartsubstanz HePC.
Die neuen Alkylphosphocholine sind HePC strukturell ähnlich, enthalten jedoch eine zusätzliche funktionelle Gruppe: eine Acetyl-Gruppe (R/S-O-acetyl), eine Hydroxy-Gruppe (R/S-OH), eine Acetamid-Gruppe (R/S-N-acetyl) und eine Amino-Gruppe (R/S-NH_2), die an die Phosphocholinkette in Position 2 angefügt sind und als R- und S-Enantiomere vorliegen. Um die gleiche effektive Länge der apolaren Hydrocarbonkette wie HePC zu erreichen, wurde als Grundlage der neuen Substanzen eine Octadecylkette anstatt einer Hexadecylkette verwendet. Diese Analoga des Lysophosphatidylcholins haben somit eine lange Alkylkette und ein Phosphocholinrest als polare Kopfgruppe, was den minimalen strukturellen Anforderungen an eine antineoplastische Wirkung entsprach.
Die Substanzen wurden in vitro an HL-60 Leukämiezellen auf ihre antineoplastische Potenz hin untersucht. Es zeigten sich eine dosisabhängige Wachstumshemmung einschließlich zytotoxischer Effekte, deren Ausmaß sich in der unterschiedlichen chemischen Struktur der Substanzen wiederspiegelte. Im Allgemeinen waren die S-konfigurierten Isomere toxischer als die R-konfigurierten. Es zeigte sich, dass R-OH und R-O-actyl eine geringere Aktivität als die anderen Isomere hatten, was auf eine bevorzugte enzymatische Deaktivierung durch phospholipidmodifizierende Enzyme hinweist. Dabei muss man bedenken, dass nur die R-Konfiguration als natürliche Konfiguration enzymatisch verwertet werden kann. In diesem Fall wurden diese Isomere durch Transacylierung oder Reacylierung in „R-O-acyl“ Metabolite überführt, die in

ihren chemischen Strukturen dem Phosphatidylcholin ähnlich sind und somit auf die Zellen als nicht toxisch wirkten (Hildenbrand et al., 1999).

Während der letzten Jahre ist des öfteren darüber diskutiert worden, ob Lysophospholipide und deren Analoga aufgrund ihrer Detergentien-ähnlichen Struktur die Plasmamembranen zerstören. In der Tat stören die Alkylphosphocholine in hohen Konzentrationen die Integrität der Plasmamembranen, in niedrigen Konzentrationen jedoch, mit Werten im mikromolaren Bereich, beobachtet man keine Zelllyse (Kaufmann-Kolle and Fleer, 1992).

Massing und Eibl legten in ihrer Arbeit dar, dass die Zytotoxizität ihrer Alkylphosphocholine das Ergebnis einer induzierten Apoptosis ist, denn die klassischen Veränderungen an Zellen, die einer Apoptosis unterliegen, können unter der Behandlung der Zellreihen mit den Alkylphosphocholinen in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit beobachtet werden: Einer der frühesten Veränderungen ist der als Externalisation bezeichnete Transfer von Phosphatidylserin (PS) zu der äußeren Hälfte der Plasmamembran. Darauf folgt die Bildung von Membranprotrusionen, die sich in vesikuärer Form abschnüren, und die Kondensation des Zellkerns. Vergleichbar mit der CD95-Rezeptor-induzierten Apoptose werden Caspasen und Endonukleasen nach der Inkubation mit Alkylphosphocholine aktiviert (Krug, Massing, 2002). Anhand zahlreicher molekularbiologischer Experimente konnte die Behauptung aufgestellt werden, dass der CD95-Rezeptor eine wesentliche Rolle in der durch Alkylphosphocholine induzierten Apoptose spielen muss (Matzke et al., 2001). Obwohl der molekulare Mechanismus dieser Rezeptoraktivierung bis heute noch nicht geklärt worden ist, zeigten Massing und Eibl, dass es sich um hochspezifische Mechanismen in der Aktivierung des CD95-Rezeptors und der darauffolgenden Signalkaskade handeln muss.

4.1.5) Induktion der Zelldifferenzierung und antiinvasive Eigenschaften

Speziell im Zusammenhang mit Miltefosin wurden noch weitere Wirkmechanismen beschrieben, die an dieser Stelle kurz erläutert werden:
Unabhängig von der Signaltransduktion dürfte die Proteinkinase C (PKC) noch andere Funktionen innerhalb von Zellprozessen haben. Minana und Mitarbeiter (1990) sowie Parodi und Mitarbeiter (1990) behaupten, dass PKC eine Schlüsselrolle in der zellulären Differenzierung spiele und dass die Hemmung dieses Enzyms in Neuroblastomzellen der Maus und des Menschen eine solche Differenzierung induziere (Minina et al., 1990; Parodi et al., 1990).
Es konnte in vitro gezeigt werden, dass Miltefosin ein potenter Induktor der Tumorzelldifferenzierung ist (Hilgard et al., 1989) In vivo ging die durch Miltefosin induzierte Remission der Mammakarzinome mit histologischen Zeichen der Tumordifferenzierung einher: während der Therapie wurde die typische Struktur eines Adenokarzinoms schrittweise durch die morphologischen Eigenschaften einer physiologisch gesunden milchproduzierenden Brustdrüse ersetzt. Diese Beobachtung wurde auch auf molekularbiologischer Basis durch die vermehrte Produktion des chromosomalen Histonproteins H1° unterstützt, welches zur Zelldif ferenzierung beiträgt (Hochhut et al., 1990).
Ein in diesem Zusammenhang wesentlicher Aspekt ist die bei systemischer Behandlung wiederholt beobachtete Induktion einer Leukozytose, vornehmlich von Granulozyten (Hilgart et al., 1988). Es konnte gezeigt werden, dass Miltefosin einerseits das Koloniewachstum von CSF-abhängigen Vorläuferzellen stimuliert, andererseits vermehrt IL-2-Rezeptoren und TNF gebildet werden. Dennoch hemmt Miltefosin die Migration von Granulozten auf einen chemotaktischen Stimulus hin, was mit einer Hemmung der intrazellulären Aktinpolymerisation assoziiert ist. Schon länger ist bekannt, dass die Polymerisation der Aktinmonomere unter der Kontrolle der PKC steht (Lassing et al., 1985).

4.2) Alkylphosphocholine als Inhibitoren von Cytochrom P450

Wie bereits am Anfang dieses Kapitels dargestellt und im vorangegangenen Ergebnisteil bewiesen wurde, gibt es ein neues, von unserer Arbeitsgruppe erstmalig entdecktes Target der Alkylphsophocholine: Cytochrom P450.
Bereits 1987 zeigte die Arbeitsgruppe um R. I. Viner, dass einkettige Lipide, die durch die katalytische Wirkung von Phospholipase A_2 aus membranintegrierten Phospholipiden freigesetzt werden, die enzymatische Aktivität von Cytochrom P450 in Rattenlebermikrosomen hemmen (Viner et al., 1987).
Grundlage für die Vorstellung, dass die Alkylphosphocholine Inhibitoren von Cytochrom P450 sein könnten, waren die Ergebnisse von Müller-Enoch und Mitarbeiter zu dem Einfluss einkettiger Lipide auf das mikrosomale Enzymsystem, explizit Cytochrom P450 (Müller-Enoch et al., 2001). Bei den Untersuchungen variierten die Lipide sowohl in der Länge ihrer apolaren Kohlenstoffkette als auch in ihrer polaren Kopfgruppe, wobei alle Lipide natürlich in der lebenden Zelle vorkamen, z.B. Palmitinsäure, Arachidonsäure, L-α-Lysophosphatidyl-inositol, u.s.w. Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten einkettigen Lipide Cytochrom P450 sowohl kompetitiv als auch nicht-kompetitiv hemmen. Im Falle der kompetitiven Inhibition wird ein starker Zusammenhang zwischen Struktur und Ausmaß des Hemmeffekts der einkettigen Lipide beobachtet. Allgemein gilt, dass je niedriger der Ki-Wert (Dissoziationskoeffizient zwischen Inhibitormolekül und Enzymkomplex) ist, desto stärker die Hemmung. Dabei werden die höchsten Ki-Werte für die gesättigten freien Fettsäuren gefunden, wobei das Ausmaß der Hemmung von der Länge der Alkylkette abhängt: Im Bereich zwischen C_{12} und C_{18} gilt, dass je länger die Alkylkette, umso größer der Ki-Wert ist. Die ungesättigten Fettsäuren hingegen haben bei gleicher Alkylkettenlänge

einen niedrigeren Ki-Wert und verursachen somit eine stärkere Hemmung als die gesättigten Fettsäuren.

Von den einkettigen Lipiden unterscheiden sich die doppelkettigen Phospholipide nicht nur in ihrer Struktur, sondern vor allem in ihrer Funktion: Als essentieller Bestandteil biologischer Membranen ist es ihre Hauptaufgabe, die Bildung des binären Enzymkomplexes zwischen Cytochrom P450 und dessen Reduktase zu erleichtern. Müller-Enoch und Gruler berichteten im Jahre 2000, dass doppelkettige Phospholipide keinen Einfluss auf das zeitliche Ausmaß des katalytischen Zyklus oder der Wechselzahl des katalytisch arbeitenden Enzymkomplexes haben (Müller-Enoch, D.; Gruler, H., 2000). Die maximale enzymatische Aktivität wird unabhängig von den verwendeten Phospholipiden erreicht, wenn jedes Cytochrom P450 mit der Reduktase komplexiert ist und jeder Komplex ein Substratmolekül gebunden hat.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied in den biophysikalischen Eigenschaften zwischen den einkettigen Lipiden und den Phospholipiden besteht in der Größe ihrer jeweiligen kritischen mizillären Konzentration (CMC), die die Konzentration einer Lipidlösung angibt, ab welcher die einzelnen Moleküle Mizellen bilden (Smith and Tanford, 1972). Diese einschichtig kugelförmigen Strukturen können einige Dutzend bis ein paar Tausend Moleküle enthalten, wobei die hydrophoben Alkylketten unter Wasserausschluss im Inneren aggregieren und die hydrophilen Kopfgruppen sich auf der Oberfläche befinden und mit Wasser interferieren (Hamori and Michaels, 1971). Die CMC der doppelkettigen Lipide ist sehr gering, was auf die vermehrten hydrophoben Wechselwirkungen entlang der beiden Alkylketten zurückzuführen ist, wie für L-α-Dipalmitoyl-phosphatidylcholin mit einer CMC = 0,5 nM dargestellt werden konnte. Dagegen ist die CMC für einkettige Lipide um eine Größenordung von ca. 10^6 höher als bei den doppelkettigen Lipiden. Dies zeigte der für Lysopalmitoyl-phosphatidylcholin gemessene CMC-Wert von 0,5 mM. Eine der Konsequenzen dieser unterschiedlichen Löslichkeiten in Wasser ist, dass doppelkettige Lipide schon in geringen Konzentrationen dazu drängen, Lipidaggregate wie

Mizellen, Liposomen oder Bilayermembranen zu bilden. Einkettige Lipide hingegen sind auch noch in viel höheren Konzentrationen in wässrigen Lösungsmitteln löslich und können in ihrer solitär gelösten Form Einfluss auf ihre unmittelbare Umgebung ausüben.

Die Betrachtung der Alkylphosphocholine machte deutlich, dass sie hinsichtlich ihrer Struktur nichts anderes als Deriviate einkettiger Lipide sind, die sich von den Phosphatidylcholinen bzw. den Lysophosphatidylcholinen ableiten. Denn auch sie bestehen aus einer hydrophoben Alkylkette mittlerer Länge und einer polaren Kopfgruppe, die sich aus einer Esterverbindung zwischen einer Phosphorsäure und dem Alkohol Cholin zusammensetzt. Folglich lag die Vermutung nahe, dass ungeachtet aller bisherigen Veröffentlichungen die Gruppe der Alkylphosphocholine als Inhibitoren von Cytochrom P450 wirken könnte.

2004 führten wir die ersten Versuche zu dem Einfluss der Alkylphosphocholine auf Cytochrom P450 durch. Wie im Kapitel Material und Methoden bereits beschrieben wurde, verglichen wir zwei Versuchssysteme miteinander, nämlich eine durch PB-induzierte Rattenlebermikrosomen-fraktion und ein rekonstituiertes System aus Cytochrom P450 und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase. Als Alkylphosphocholine wurden die von Massing und Eibl synthetisierten Substanzen verwendet, die in dieser Arbeit bereits mehrfach beschrieben wurden. Es stellte sich heraus, dass alle Substanzen einen hemmenden Effekt auf die katalytische Enzymaktivität haben, unabhängig von ihrem Versuchssystem. Um den Einfluss des Inhibitor-Lösungsmittels Ethanol auf die katalytische Aktivität des Enzymsystems mit zu berücksichtigen, führten wir eine weitere Messreihe durch, in welcher Ethanol als Lösungsmittel in einem rekonstituierten Versuchssystem verwendet wurde.

Wir konnten berechnen, dass es sich bei allen verwendeten Alkylphospho-cholinen um einen kompetitiven Hemmungstyp handelt.

Interessanterweise besteht ein Unterschied zwischen den Ki-Werten der in Wasser gelösten Alkylphosphocholine im mikrosomalen zum rekonstituierten System: In der Mikrosomenfraktion liegen die Ki-Werte bei 29 – 34 µM,

wohingegen im rekonstituierten System die Ki-Werte nur bei 1 – 5 µM liegen. Das entspricht in etwa einem Unterschied in Höhe einer Zehnerpotenz. Eine mögliche Erklärung für die ca. zehnfach höhere Affinität des Inhibitors im rekonstituierten System gegenüber der Mikrosomenfraktion dürfte sein, dass die in den Membranen des Mikrosomensystems gelösten Reaktanten eine verminderte effektive Konzentration aufweisen. Weil hierbei das Verhältnis zwischen Reaktanten und Membranlipiden weit auf der Seite der Lipide liegt, ist die Wahrscheinlichkeit der Bildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes um ein Vielfaches geringer als die Wahrscheinlichkeit, dass die einzelnen Reaktionspartner solitär gelöst vorliegen.

Eine vergleichbare Argumentation könnte auch bei der Beschreibung der IC50-Werte erfolgen, die entsprechend den unterschiedlichen Ki-Werten ebenfalls in Abhängigkeit vom Versuchssystem variieren: Für das mikrosomale System ergeben sich IC50-Werte für in Wasser gelöste Alkylphosphocholine von 31,1 – 46,8 µM, wohingegen dieselbigen im rekonstituierten System IC50-Werte von nur 6,3 – 20,5 µM erbringen. Auch hier unterscheiden sich die Werte um ein Vielfaches. Neben dem bereits ausgeführten Argumentationsgedanken könnte folgende Überlegung diesen Sachverhalt begründen: In den Mikrosomenfraktionen existieren nicht nur Isoenzyme der Klasse 2B1, sondern noch eine Vielfalt von weiteren Cytochrom P450-Isoenzymen. Diese können die Alkylphosphocholine binden und sie dadurch in ihrer effektiven Konzentration als Inhibitoren schwächen, wodurch sie dem Gesamthemmeffekt in der Lösung verloren gehen. Dadurch erhöht sich automatisch die Inhibitorkonzentration, die für die Hemmung der katalytischen Aktivität um 50% des Anfangswertes (ohne Inhibitor) notwendig ist.

Bei einem Vergleich der Hemmparameter für den Inhibitor rac-OH, der in einem rekonstituierten System einerseits in Wasser und andererseits in Erhanol gelöst ist, kann man folgendes festhalten: die IC50- und die Ki-Werte beider Lösungssysteme sind von der gleichen Größen-ordnung. Anhand dieser Messdaten läßt sich somit kein signifikanter

zusätzlicher Hemmeffekt des Lösungsmittels Ethanol auf das Enzymsystem feststellen.

In diesem Zusammenhang ist der Vergleich der hier dargestellten Ki-Werte mit jenen Werten interessant, die Müller-Enoch und Mitarbeiter im Jahre 2001 schon vorstellten und auf deren Arbeit bereits eingegangen wurde: Gesättigte freie Fettsäuren von Laurinsäure (C_{12}) bis zu Stearinsäure (C_{18}) zeigen Ki-Werte von 50-100 µM. Ungesättigte Fettsäuren zeigen jedoch gegenüber gesättigten Fettsäuren bei gleicher Kettenlänge einen größeren Hemmeffekt, z.B. besitzt Ölsäure einen Ki-Wert von 1,5 µM, Stearinsäure hingegen einen von 120 µM. Im Falle der Monoglycerolester von 1-Monooleoyl- und 1-Monostearylglycerol sind die Unterschiede in den Ki-Werten mit 1,1 µM und 15,5 µM nicht so groß wie bei den freien Fettsäuren. Lysophosphatidylcholin, welches in seiner α-Position vorwiegend Palmitin- und Stearinsäure trägt, besitzt einen Ki-Wert von 3,0 µM.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ki-Werte für die synthetischen Alkylphosphocholine zeigen, dass der Substituent in Position C-2 (OH; O-acetyl; NH_2; N-acetyl) des Octadecanolrestes keinen wesentlichen Einfluss auf die inhibitorische Potenz dieser Moleküle besitzt. Die inhibitorischen Effekte sind für alle Alkylphosphocholine groß und vergleichbar mit denen von L-α-lysophosphatidylcholin (Ki = 3,0 µM), α-monopalmitoylglycerol (Ki = 3,5 µM) und L-α-lysophosphatidylinositol (Ki = 1,5 µM), welche ebenfalls eine lange lipophile Alkylkette (C_{18}) tragen, die mit unterschiedlichen polaren Kopfgruppe verestert sind. Dieser Sachverhalt läßt den Schluss zu, dass der lange lipophile Anteil der Moleküle für den inhibitorischen Effekt, der amphoterische bzw. hydrophile Anteil hingegen für die Löslichkeit der Moleküle entscheidend ist. Nur in ihrer so vorhandenen solitär gelösten Form können die Moleküle einen Zugang zum katalytischen Zentrum der Enzyme finden.

Aufgrund der kompetitiven Hemmung der CYP2B1-Enzymaktivität entwickelten wir die Theorie, dass die Alkylphospocholine aufgrund ihrer amphoterischen Struktur zweierlei Arten der intermolekularen Wechsel-wirkungen mit dem Enzym eingehen können:

Die mit 18 Kohlenstoffatomen relativ lange apolare Alkylkette interagiert mit dem lipophilen Substratzugangskanal des Enzyms, an dessen Oberfläche vorwiegend Aminosäuren mit unpolaren Resten vorhanden sind, über van-der-Waals-Bindungen. Diese Bindungen sind relativ stark, weil einerseits die Alkylkette eine doch beachtliche Größe besitzt, andererseits eine angemessene sterische Kompatibilität zwischen den Aminosäureresten des Substratzugangskanals und der Alkylkette vorhanden ist. In der Summe führt dies zu einer Optimalisierung der Bindungsverhältnisse im Substratzugangskanal.

Die andere Art der Wechselwirkung geht auf die Bildung von Wasserstoffbrücken zurück bzw. ist von ionischem Charakter. Man darf davon ausgehen, dass die polare Kopfgruppe am Eingangsbereich des Substratzugangskanals mit den sie umgebenen vorwiegend polaren Aminosäureresten interferiert. Dies geschieht über zwei Arten der Bindung: Wasserstoffbrückenbindung und ionische Bindung, in Abhängigkeit vom Ionisierungsgrad und von der Art der Aminosäurereste.

Eine dritte Kraft mag aus thermodynamischer Sicht die Alkylphosphocholine in der beschriebenen Art am Enzym fixieren: Die unterhalb der CMC gelösten Alkylphosphocholine drängen aufgrund ihres amphiphilen Charakters nach einem Medium, dass den gleichen Charakter besitzt wie sie. Dieses finden sie bei P450 innerhalb des Substratzugangskanals und dem Eingang zu demselbigen. Aus diesem Grund ist die Interaktion der Alkylphosphocholine mit P450 in einem wässrigen Milieu, wie das des Zytosols und des Interstitiums aus thermodynamischer Sicht günstig und die kompetitive Hemmung der Cytochrom P450-Aktivität durch die Alkylphosphocholine energetisch stabil.

Diese Annahmen werden durch die von Stanley V. Smith und Mitarbeiter im Jahre 2000 veröffentlichten Erkenntnisse zur Konformationsänderung von humanem Cytochrom P450 2E1 durch Ethanol und andere Substanzen unterstützt (Smith et al., 2000; Lewis et al., 2000):

Anhand computergestützter Berechnungen wurde ein dreidimensionales CYP2E1-Arachidonsäure-Modell entwickelt, in welchem das aktive Zentrum gleichzeitig von der Arachidonsäure und von einem als Ligand gebundenen Wassermolekül besetzt wird. Die Aussagekraft dieses Molekülmodells wurde sowohl durch differenzspektroskopische Messungen als auch durch Experimente der CO Flash Photolyse argumentativ untermauert. Danach erfolgt die Bindung der Arachidonsäure sowohl entlang des hydrophoben Substratzugangskanals als auch an dessen Eingang über zwei Argininseitenketten (R76 und R100). Hydrophobe und ionische Wechselwirkungen schaffen eine räumliche Anordnung, in welcher zwischen dem distalen Ende der Arachidonsäure und der Hämgruppe noch genügend Raum für die Besetzung mehrerer Wassermoleküle ist, die durch die Arachidonsäure bei ihrer Bindung an das Enzym nicht verdrängt werden.

(Zur anschaulichen Verdeutlichung sei auf die Abbildung 15 der Seite 71 verwiesen.)

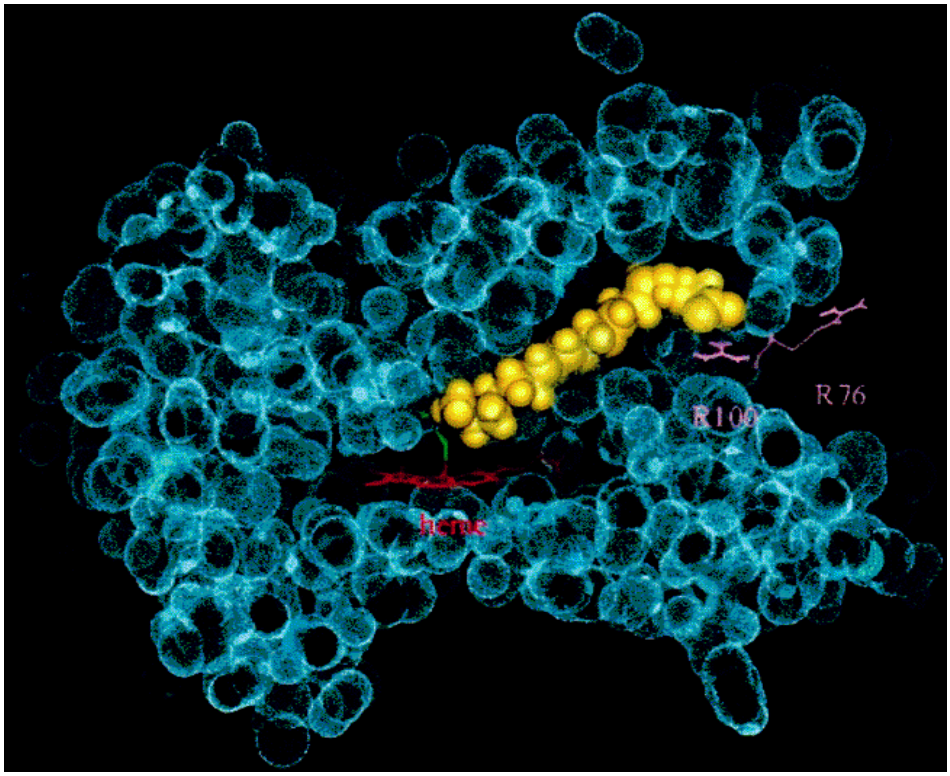


Abbildung 15: Dreidimensionale Darstellung des P450 2E1 Komplexes mit Arachidonsäure. Die Arachidonsäure (gelb) ist innerhalb des Substratzugangskanals gebunden. Die Hämgruppe (rot) und das CO-Molekül (grün, dargestellt im Rahmen der CO Photolysis Studie) sind ebenfalls abgebildet. Die beiden Argininreste (Position 76 und 100) ermöglichen den elektrostatischen Kontakt zu der Carboxylgruppe der Arachidonsäure.

(aus Smith, S., V.; Koley, A., P.; Dai, R.: *Conformational Modulation of Human Cytochrome P450 2E1 by Ethanol and Other Substrates: A CO Flash Photolysis Study.* Biochemistry, 39 (19), 5737, 2000)

5) Zusammenfassung

Vor nahezu 15 Jahren wurde eine neue Substanzgruppe synthetisiert, die sich hinsichtlich ihrer Struktur von den Phosphatidylcholinen ableitete: die Gruppe der Alkylphosphocholine. Ihre Muttersubstanz ist Hexadecylphosphorylcholin, auch als Miltefosin oder kurz HePC bezeichnet. Fast zeitgleich wurden dieser Substanz zwei verschiedene Wirkungen entlockt, und es zeigte sich anhand weiterer Untersuchungen, dass ihre Wirkung als Antiprotozoenmittel, v.a. gegen Leishmania donovani, und ihr antitumoröser Effekt vielversprechende neue Therapieansätze versprachen. Da diese Substanz jedoch nicht intravenös gegeben werden konnte, suchte man nach weiterentwickelten Wirkstoffen, die auch eine intravenöse Therapie mit verminderten Nebenwirkungen möglich machen sollte. Folglich entstand eine Vielzahl von Alkylphosphocholinen mit unterschiedlicher Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Tumorgeweben und variierender Pharmakodynamik und -kinetik.

Im Rahmen der Weiterentwicklung des Moleküldesigns der Alkylphosphocholine wurden bis heute vier grundlegende Wirkmechanismen entdeckt: eine multifunktionale Beeinflussung des Phosphoinositolmetabolismus und der Biosynthese der Phosphatidylcholine, eine unspezifische Einflussnahme auf verschiedene membranöse Uptakemechanismen sowie eine Aktivierung des CD95 Rezptors. Dennoch bleibt die Suche nach einem gemeinsamen Grundmechanismus bestehen.

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal bewiesen, dass Substanzen aus der Gruppe der Alkylphosphocholine Isoenzyme der Cytochrom P450-Familie kompetitiv hemmen. Die in den rekonstituierten Systemen gemessenen Ki-Werte (Dissozationskoeffizienten des kompetitiven Inhibitors) sind im Vergleich zu den in den Mikrosomenfraktionen ermittelten Ki-Werte um den Faktor 10 verringert, wobei die Wahl des Lösungsmittels (Wasser bzw.

Ethanol) keinen signifikanten Unterschied zeigt. Insgesamt besitzen diese Alkylphosphocholine im rekonstituierten System durch ihre Substitution in Position C-2 (OH; O-acetyl; NH_2; N-acetyl) des Octadecanolrestes keinen nennenswerten Unterschied in ihrer inhibitorischen Potenz im Vergleich zu den natürlich vorkommenden Lysophospholipiden. Dennoch zeigt diese Substanzgruppe über ihre amphoterische Struktur ein unglaublich kluges Moleküldesign, denn die lipophile Alkylkette blockiert den Substratzugangskanal und die polare Kopfgruppe dessen Eingang. Allegorisch gesprochen dichten diese Moleküle in Form eines „Stopfens“ einerseits das Enzym in seiner katalytischen Fähigkeit gegenüber interaktionsfreudigen Molekülen/ Ionen ab, indem sie den Substratzugang zum katalytischen Zentrum des Enzyms unterbinden. Andereseits unterbinden sie die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, die während dem CYP450-Hydroxylierungszyklus entstehen können.

Aufgrund der Strukturhomologien der CYP450 Enzyme der Genfamilie 2 ist die Wirksamkeit der Alkylphosphocholine auch bei anderen Vertretern innerhalb dieser Familie anzunehmen. Eine medizinisch äußerst relevante Bedeutung erfährt diese Substanzgruppe dann, wenn man die grundlegende Stellung einer Überexpression von Vertretern der CYP2-Genfamilie innerhalb verschiedener Pathogenitätsmechanismen für bestimmte Erkrankungen berücksichtigt. Die funktionnelle Ausschaltung dieses Enzymsystems könnte folglich einen positiven Effekt auf den Verlauf solcher Krankheiten ausüben. Außerdem dürfte das Moleküldesign der Alkylphosphocholine hinsichtlich ihrer raumabdichtenden Wirkung innerhalb des Substratzugangskanals noch nicht ausgeschöpft sein: eine Verstärkung der polaren Kopfgruppe durch zusätzliche negativ geladene Gruppen und eine Optimierung der hydrophoben Eigenschaft der Alkylkette könnten zu einer deutlichen Erhöhung der inhibitorischen Potenz dieser neuen Wirkstoffklasse führen.

6) Literaturverzeichnis

Backes WL, Eyer CS: *Cytochrome P450 LM2 Reduction: Substrate Effects on the Rate of Reductase-LM2*. Association. J. Biol. Chem. 264: 6252-6259 (1989)

Backes WL, Tamburini PP, Schenkman JB: *Kinetics of cytochrome P450 reduction: evidence for faster reduction of the high-spin ferric state.* Biochemistry 10: 5130-5136 (1991)

Berkovic D, Grunwald U, Grunwald U, Menzel W, Unger C; Fleer EAM: *Effects of hexadecylphosphocholine on Membrane Phospholipid Metabolism in Human Tumour Cells.* European Journal of Cancer 31: 2080-2085 (1995)

Blank J, Ruckpaul K: *Lipid-Protein Interactions*. In: John B. Schenkmann, Helmut Greim Cytochrome P450, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S.581-597 (1993)

Breiser A, Fleer EA, Damenz W, Drube A, Berger M, Nagel GA, Kim D J, Eibl H, Unger C: *Distribution und metabolism of hexadecylphosphocholine in mice.* Lipids 22: 925-926 (1987)

Burton A: *Miltefosine – oral victory over visceral leishmaniasis.* Lancet Inf. Dis. 3: 64 (2003)

Collman JP, Brauman JI, Thomas RH, Suskick KS: *Nature of O_2 and CO binding to metalloporphyrins and heme proteins.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 3333-3337 (1976)

Croft SL, Seifert K, Duchene M: *Antiprotozoal activities of phospholipids analogues.* Molecular and Biochemical Parasitology 126: 165-172 (2003)

Desjeux P: *Leishmaniasis. Public health aspects and control.* Clin. Dermatol. 14: 417-423 (1996)

Draper AJ, Madan A, Parkinson A: *Inhibition of coumarin 7-hydroxylase activity in human liver microsomes.* Arch. Biochem. Biophys. 341: 47-61 (1997)

Eibl H, Unger C: *Phospholipide als Antitumormittel: Möglichkeiten einer selektiven Therapie.* In: Unger C, Eibl H, Nagel GA Die Zellmembran als Angriffspunkt der Tumotherapie, Zuckerschwerdt Verlag München, S 1-18 (1987)

Falk JR, Lumin S, Guengerich FP, Capdevila JH.: *Cytochrome P450-dependent oxidation of arachdonic acid to 16-, 17- and 18-hydroxyeicosatetraenoic acids.* J. Biol. Chem. 265: 10244-10249 (1990)

Fleer EAM, Unger C, Kim DJ, Eibl H.: *Metabolism of ether phospholipids and analogs in neoplastic cells.* Lipids 22: 856-861 (1987)

Geilen CC, Wieder T, Haase A, Reutter W, Morre DM, Morre JD: *Uptake, subcellular distribution and metabolism of the phospholipid analoque hexadecylphosphocholine in MDCK cells.* Biochemica et Biophysica Acta 1211: 14-22 (1994)

Groves JT, Hang Y-Z: *Models and mechanisms of cytochrome P450 action.* In: Ortiz de Montellano PR Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry, edn 2, Plenum Press New York, S. 3-48 (1995)

Guengerich FP: *Preparation and properties of highly purified cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450-reductase from pulmonary microsomes of untreated rabbits.* Mol. Pharmakol. 13: 911-923 (1977)

Guengerich FP, Martin MV: *Purification of cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450 reductase and epoxid hydratase from single preparation of rat liver microsomes*. Arch. Biochem. Biophys. 205: 365-379 (1980)

Guengerich FP, Shimida T, Wolff T: *Structure and function of cytochrome P450.* Adv. Exp. Med. Biol. 197,: 83-94 (1986)

Guengerich FP: *Human cytochrome P450 enzymes.* In: Ortiz de Montelano PR Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry, Plenum Press New York, S 377-530 (2005)

Haehner T, Massing U, Diesinger T, Müller-Enoch D: *Inhibition of Cytochrome P450 Mediated Enzyme Activity by Alkylphosphocholines.* Zeitschrift für Naturforschung 59: 599-605 (2004)

Haehner T, Refaie MOI, Müller-Enoch D: *Drug-Drug interactions evaluated by a higly active reconstituted native human cytochrome P450 3A4 and human NADPH-cytochrome P450 reductase system*. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 54: 78-83 (2004)

Halpert JR, Domanski TL, Adali O: *Structure-Funktion of Cytochromes P450 and Flavin-Containing Monoaxygenases. Implications for Drug Metabolism.* Drug metabolism and Disposition 26: 1223-1231 (1998)

Hamori E, Michaels AM: *Determination of critical micelle concentration of aqueous lysolecithin solutions*. Biochem. Biophys. Acta 231: 496-504 (1971)

Hildenbrand B, Unger C, Massing U: *2-Hydroxy- and 2-O-acetyl-octadecylphosphocholines: cytotixic efficacy and influence or cellular phospholipids metabolism.* J. Cancer. Res. Clin. Oncol. 125: 84 (1999)

Hilgard P, Stekar J, Voegeli R, Engel J, Schumacher W, Eibl H, Unger C, Berger MR: *Characterization of the antitumor activity of hexadecylphosphocholine (D-18506)*. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 24: 1457-1461 (1988)

Hilgard P, Harleman JH, Unger C: *The antineoplastic activity of hexadecylphosphocholine (HPC) is associates with tumor cell differentation (abstract 2310).* Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 30: 580 (1989)

Hilgard P, Klenner T, Stekar J, Unger C: *Alkylphosphocholines: a new class of membrane-active anticancer agents*. Cancer Chemother Pharmacol 32: 90-95 (1993)

Hochhuth CH, Berkovic D, Eibl H, Unger C, Deonecke D: *Effects of antineoplastic phospholipids on parameters of cell differentiation in U937 cells.* J. Cancer Res. Clin. Oncol 116: 459-466 (1990)

Hoffmann DR, Thomas VL, Snyder F: *Inhibition of cellular transport systems by alkyl phospholipid analogs in HL 60 human leukemia cells.* Biochem. Biophys. Acta 1127: 74-80 (1992)

Janig GR, Makower A, Ruckpaul K: *Chemical modification of cytochrome P450 LM2. Characterization of tyrosin as axial heme iron ligand trans thiolate.* Biochim. Biophys. Acta. 31: 8-18 (1984)

Jendrossek V, Hammersen K, Erdlenbruch B, Kugler W, Krugener R, Eibl H, Lakomek M: *Structure-activity relationships of alkylphosphocholine derivates: antineoplastic action on brain tumor cell lines in vitro.* Cancer Chemother Pharmacol 50: 71-79 (2002)

Jimenez-Lopez JM, Carrasco MP, Segovia JL, Marco C: *Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis and the proliferation of HepG2 cells.* Eur. J. Biochem. 269: 4649-4655 (2002)

Kassner RJ: *A theoretical model for the effects of local nonpolar heme environments on the redox potentials in cytochromes.* J. Am. Chem. Soc. 95: 2674-2677 (1972)

Kaufmann-Kolle P, Fleer EAM: *Morphological changes of adherent and nonadherend cells by treatment with hexadecylphosphocholine and 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phospho choline observed by scanning electron microscopy.* In: Eibl H, Hilgard P, Unger C Alkylphosphocholines: new drugs in cancer therapie, Bd 34, Karger Basel, S 47-58 (1992)

Konstantinov SM, Berger MR: *Alkylphosphochlines: Effects on human leukemic cell lines and normal bone marrow cells.* Int. J. Cancer: 77: 778-786 (1998)

Konstantinov SM, Eibel H, Berger MR: *BCR-ABL influences the antileukaemic efficacy of alkylphosphocholines.* British Journal of Haematology, 107: 365-374 (1999)

Kosano H, Takatani U: *Reduction of epidermal growth factor (EGF) in human breast cancer cell lines in relation to EGF internalization.* Cancer Res. 49: 2868-2870 (1989)

Kötting J, Berger MR, Unger C, Eibl H: A*lkylphosphocholines: influence of structural variation on biodistribution at antineoplastically active concentrations.* Cancer Chemother Pharmacol 30: 105-112 (1992)

Krug HF, Massing U: *Neue Wege in der Tumortherapie: synthetische Lipide als „Todessignale“.* BIOspektrum 8: 23-45 (2002)

Lassing I, Lindberg U: *Specific interaction between phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat and profilactin.* Nature 314: 472-474 (1985)

Lewis DFV, Bird MG, Dickins M, Lake BG, Eddershaw PJ, Tarbit MH, Goldfarb PS: *Molecular modelling of Human CYP2E1 by homology with the CYP102 haemoprotein domain: investigation of the interactions of substrates and inhibitors within the putative active site of the human CYP2E1 isoform.* Xenobiotica 30: 1-25 (2000)

Maschner N, Kötting J, Unger C, Eibl H: *Distribution of hexadecylphosphocholine and octadecyl-methyl-glycero-3-phosphocholine in rat tissues during steady-state treatment.* Cancer Chemother Pharmacol, 31: 18-22 (1992)

Massing U, Eibl H: *Synthesis of enantiomerically pure 1-O-phosphocholine-2-O-acyl-octadecane and 1-O-phosphocholine-2-N-acyl-octadecane*. Chem. Phys. Lipids. 69: 105-120 (1994)

Matzke A, Massing U, Krug HF: *Killing tumor cells by alkylphosphocholines: Evidence for involvement of CD95.* European Journal of Cell Biology 80: 1-10 (2001)

Minana MD, Felipo V, Grisolia S: *Inhibition of Protein kinase C induces differentation in Neuro-2a cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4335-4339 (1990)

Müller-Enoch D, Gruler H: *Complexatioin of membrane-bound enzyme systems.* Zeitschrift für Naturforschung 55: 747-752 (2000)

Müller-Enoch D, Fintelmann R, Nicolaev A, Gruler H: *Enzyme Activity of the Cytochrome P450 Monooxygenase System in the Presence of Single Chain Lipid Molecules.* Zeitschrift für Naturforschung 56: 1082-1090 (2001)

Muschiol C, Unger C, Eibl H: *Alkylphosphocholines: toxicity and anticancer properties.* Lipids 22: 930-934 (1987)

Newcomb M, Shen R, Coon MJ: *Cytochrome P450 catalyzed hydroxylation of mechanistics probes that distinguish between radicals and cations.*

Evidence for cationic but not radical intermediates. J. Am. Chem. Soc. 122: 2677-2686 (1999)

Newcomb M, Toy PH: *Hypersensitive radical probes and the mechanisms of cytochrome P450 catalyzed hydroxylation reactions.* Acc. Chem. Res. 33: 449-455 (2000)

Newton DJ, Wang RW, Lu AY: *Cytochrome P450 Inhibitors. Evaluation of specificities in the in vitro metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes*. Drug Metab. Dispos. 23: 154-158 (1995)

Ogliaro F, Cohen S, Filatov M, Harris N, Shaik S: *The High-Valent Compound of Cytochrome P450: The Nature of the Fe–S Bond and the Role of the Thiolate Ligand as an Internal Electron Donor.* Angewandte Chemie 39: 1-15 (2000)

Omura T, Sato R: *The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. Solubilization, purification and properties.* J. Biol. Chem. 239: 2379-2385 (1964)

Parodi MT, Varesio L, Tonini G: *The specific inhibitor of protein kinase C, 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-methylpiperazin (H7) induces morphological change and cell differentiation of human neural crest-derived cell lineages.* FEBS Lett. 269: 4-6 (1990)

Posse de Chaves E, Vance DE, Vance JE: *Alkylphosphocholines inhibit choline uptake and phosphatidycholine biosynthesis in rat symphatic neurons and impair axonal extension.* Biochem. J. 312: 411-417 (1994)

Poulos TL, Finzel BC, Howard AJ: *Crystal structure of substrat-free Pseudomonas putita cytochrome P450.* Biochemistry 25: 5314-5322 (1986)

Raag R, Poulos TL: *The structural basis for substrate-induced changes in redox potential and spin equilibrium in cytochrome P450cam.* Biochemistry 28: 917-922 (1989)

Rein H, Ristau O, Ruckpaul K: *The importance of the spin equilibrium in cytochrome P450 for the reduction rate of the heme iron.* Acta. Biol. Me. Ger. 38: 187-200 (1979)

Rietjens I, Ancher LJ, Veeger C: *On the role of phospholipids in the reconstituted cytochrome P450 system. A model study using dilauroyl and distearyl glycerophosphocholine.* European Journal of Biochemistry. 8:1083 (1995)

Ristau O, Rein H, Ruckpaul K: *Quantitativ analysis of the spin equilibrium fo cytochrome P450 LM2 fraction from rabbit liver microsomes.* Biochem. Biophys. Acta. 536: 226-234 (1978)

Segal M: *Understanding Cytochrome P450-Ligand Interactions.* http://www.tem.phy.cam.ac.uk/~mds21/thesis/node45.html

Shaik S, Schwarz H, Schröder D: *Two-state reactivity mechanism of hydroxylation and epoxidation by cytochrome P450 revealed by theory.* Current Opinion in Chemical Biology 6: 556-567 (2002)

Smith R, Tanford C: *The critical micelle concentration of L-α-dipalmitoyl-phosphatidylcholine in water/methonal solutions.* J. Mol. Biol. 67: 75-83 (1972)

Smith SV, Koley AP, Dai R, Robinson RC, Leong H, Markowitz A, Friedman FK: *Conformational Modulation of Human Cytochrome P450 2E1 by Ethanol and Other Substrates: A CO Flash Photolysis Study.* Biochemistry, 39:5737 (2000)

Sundar S, Jha TK, Berman J: *Oral miltefosin for Indian Visceral Leishmaniasis.* New Engl. J. Med. 347: 1739-1746 (2002)

Thaler A, Hottkowitz T, Eibl H: *Seperation and quantifikation of alkylphosphocholines by reversed phase high performance liquid chromatography.* Chemistry and Physics of Lipids 107: 131-139 (2000)

Überall F, Oberhuber H, Maly K, Zaknun J, Demuth L, Grunicke HH: *Hexadecylphosphocholine inhibits inositol phosphate formation and protein kinase C activity.* Cancer Res. 51: 807-812 (1982)

Ulrich V, Weber P: *The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes. A direct fluorometric test.* Hoppe-Seylers Z Physiol. Chem. 353: 1171-1177 (1972)

Unger C, Fleer EAM, Damenz W, Hilgard P, Nagel G, Eibl H: *Hexadecylphosphocholine: determination of serum concentrations in rats.* J. Lipid Mediators, 3, 71-78: (1991)

Unger C: *Current concepts of treatment in medical oncology: new anticancer drugs.* J Cancer Res Clin Oncol 122: 189-198 (1996)

Unger C, Eibl H: *Arzneimittelentwicklung aus Phospholipiden.* Onkologie 24: 18-23 (2001)

de Visser SP, Ogliaro F, Sharma PK, Shaik S: *Hydrogen bonding modulates the selectivity of enzymatic oxidation by P450: a chameleon oxidant behavior by Compound I*. Angewandte Chemie 41: 1947-1951 (2002)

Viner RI, Novikov KN, Kagan VE: *Inhibition of the dealkylating activity of isoforms of cytochrome P450 in rat liver microsomes by products of the hydrolysis of phospholipids by phospholipase A_2.* Biokhimiya 52: 459-468 (1987)

Wang P, Mason PS, Guengerich FP: *Purification of human liver cytochrome P450 and comparison to the enzyme isolated from rat liver.* Arch. Biochem. Biophhys. 199: 206-219 (1980)

Yasukochi Y, Masters BS: *Some properties of a detergent-solubilized NADPH-cytochrome c (cytochrome P450) redactase purified by biospecific affinity chromatography*. J. Bio. Chem. 25: 5337-5344 (1976)

Zheng B, Oishi K, Shoji M: Inhibition of protein kinase C, (sodium plus potassium)-adenosine triphosphatase, und sodium pump by synthetic phospholipids analoques. Cancer Res. 50: 3025-3031 (1990)

Widmung und Danksagung

Meinem Lehrer Roman Paul, ohne dessen Begeisterungsfähigkeit für die Naturwissenschaft der Weg für diese Arbeit nicht gelegt worden wäre.

Ich möchte denjenigen Menschen danken, die für das Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beigetragen haben:

Prof. Dr. Müller-Enoch für seine wunderbare Betreuung

Dr. Thomas Haehner, der mir als Freund immer beratend zur Seite stand

Den *Mitarbeitern der Abteilung für Physiologische Chemie* für Ihre Freundlichkeit und Unterstützung

Bianca, Andreas, Anika und Mirko für Ihre uneingeschränkte Hilfe bei der Bearbeitung des Textes

Meinen Eltern für Ihre umfassende Liebe

Lebenslauf

Torsten Diesinger

Geboren am 09.08.1977 in Völklingen, Saarland
Staatangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1984 – 1988	Grundschule Ludweiler
1988 – 1997	Realgymnasium Völklingen
März 1997	Teilnahme an der Endrunde der Biologie-Olympiade in Kiel
Mai 1997	Abitur am Realgymnasium Völklingen

Wehrdienst

1998	Ableistung des Grundwehrdienstes in Germersheim und Trier

Universitätsstudium

1998 – 2005	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
2003 – 2005	Studium der Philosophie an der Universität Ulm
2002 – 2004	Durchführung des experimentellen Teils der Doktorarbeit in der Abteilung Physiologische Chemie, Universität Ulm (Leiter: Prof. Dr. T. Wirth), im Labor von Prof. Dr. D. Müller-Enoch
2005	Abschluß des Medizinstudiums
2005	Abschluß des Vordiploms der Philosophie