

Abteilung Physiologische Chemie der Universität Ulm

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Th. Wirth

**Einfluss einkettiger Lipide
auf das Monooxygenasesystem
der Humanleber**

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

Vorgelegt von

Florian Johannes Fintelmann,

geboren in München

Ulm 2003

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Müller-Enoch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gietzen

Tag der Promotion: 23.11.2006

Meinen Eltern gewidmet, denen ich so viel verdanke.

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	1
<u>2. Material und Methoden</u>	5
<u>2.1 Material</u>	5
2.1.1 Chemikalien	5
2.1.2 Enzyme	6
2.1.3 Lösungen	6
2.1.4 Apparate und Einstellungen	8
<u>2.2 Methoden</u>	9
2.2.1 Weiterentwicklung eines fluorometrischen Tests zur Bestimmung der Aktivität von CYP3A4	9
2.2.1.1 Aufnahme der Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Fluorescein	9
2.2.1.2 Bestimmung der Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität und Fluoresceinkonzentration	9
2.2.1.3 Bestimmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität und Optimierung des Versuchsprotokolls	10
2.2.1.4 Bestimmung der Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität und der Umsetzung von Dibenzylfluorescein	10
2.2.1.5 Aufnahme der Fluoreszenzspektren des Reaktionsprodukts	11
2.2.1.6 Rekonstituiertes, vesikuläres CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450- Reduktase-System	11
2.2.2 Bestimmung des Einflusses einkettiger Lipide auf die CYP3A4 Aktivität	12
2.2.2.1 Spezifische Aktivität	12
2.2.2.2 Bestimmung des IC ₅₀ und des AC ₅₀	12
2.2.2.3 Bestimmung des Hemmtyps	13
2.2.2.3.1 Bildung des binären Komplexes	13
2.2.2.3.2 Substratumsetzung ohne Hemmstoff	14
2.2.2.3.3 Substratumsetzung mit Hemmstoff: Kompetitive Hemmung	15
2.2.3 Darstellung, statistische Verfahren	16
<u>3. Ergebnisse</u>	17
<u>3.1 Weiterentwicklung eines fluorometrischen Tests zur Bestimmung der Aktivität von CYP3A4</u>	17
3.1.1 Absorptionsspektrum von Fluorescein	17
3.1.2 Fluoreszenzspektrum von Fluorescein	18

3.1.3	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Fluoresceinkonzentration	19
3.1.4	Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität und der Umsetzung von Dibenzylfluorescein	19
3.1.5	Zwei Fluoreszenzspektren des Reaktionsprodukts	20
3.2	<u>Bestimmung des Einflusses einkettiger Lipide auf die CYP3A4-Aktivität</u>	21
3.2.1	Protokoll zur Bestimmung der IC ₅₀ - und AC ₅₀ -Werte unter optimalen Bedingungen	21
3.2.1.1	Lauroylcarnitin	22
3.2.1.2	Myristoylcarnitin	23
3.2.1.3	2-Monopalmitoylglycerol	24
3.2.1.4	Palmitoyl-L-Carnitin	25
3.2.1.5	L- α -Lysophosphatidylinositol	26
3.2.1.6	Ölsäure	27
3.2.1.7	2-Monooleoylglycerol	28
3.2.1.8	L- α -Lysophosphatidylcholin	29
3.2.1.9	Arachidonsäure	30
3.2.1.10	Phytansäure	31
3.2.2	Protokoll zur Bestimmung des Hemmtyps unter optimalen Bedingungen	32
3.2.2.1	Ölsäure	33
3.2.2.2	L- α -Lysophosphatidylcholin	34
	<u>Tabellarische Zusammenfassung des Einflusses einkettiger Lipide auf CYP3A4</u>	35
4.	<u>Diskussion</u>	36
4.1	<u>Die Methode</u>	36
4.2	<u>Lauroylcarnitin, Myristoylcarnitin, Palmitoylcarnitin: Einfluss der Kettenlänge</u>	38
4.3	<u>Monopalmitoylglycerol und Monooleoylglycerol: Einfluss der Kopfgruppe</u>	39
4.4	<u>Ölsäure und Arachidonsäure: Einfluss des Sättigungsgrads</u>	39
4.5	<u>Die Lysophospholipide Lysophosphatidylcholin und Lysophosphatidylinositol</u>	41
4.6	<u>Phytansäure</u>	42
4.7	<u>Schlussfolgerung</u>	43
	<u>Zusammenfassung</u>	44
	<u>Anhang A: Strukturformeln der verwendeten Lipide</u>	46
	<u>Literaturverzeichnis</u>	48
	<u>Danksagung</u>	57

Abkürzungsverzeichnis

AC ₅₀	Die Konzentration eines Aktivators, die zur Steigerung der Enzymaktivität um 50% nötig ist
A _{Max}	Maximale spezifische Aktivität
CD95	“Cluster of Differentiation“ Antigen 95
COX1	Cyclooxygenase-1
COX2	Cyclooxygenase-2
CYP	Cytochrom P450
DBF	Dibenzylfluorescein
DLPC	L- α -Dilauryl-sn-glycero-3-phosphocholin
EC ₅₀	Die Konzentration eines Agonisten, die zur Erzielung von 50% der für diesen Agonisten maximal möglichen Wirkung am Rezeptor nötig ist
ET-18-OCH ₃	1-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-Phosphocholin
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
IC ₅₀	Die Konzentration eines Inhibitors, die zur Halbierung der Enzymaktivität nötig ist
K _I	Dissoziationskoeffizient, $K_I^{(c)}$
$K_I^{(c)}$	siehe K _I
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
K _S	Scheinbare Michaelis-Menten-Konstante, K_S^0
K_S^0	siehe K _S
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
NADPH	Nikotin(säure)amid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PI	Phosphatidylinositol

1. Einleitung

1.1 Biotransformation

Organismen sind kontinuierlich den unterschiedlichsten fremden Stoffen ausgesetzt. Hierzu gehören sowohl natürliche, als auch synthetisch hergestellte Substanzen wie Arzneistoffe und Umweltgifte. Um sowohl diese Xenobiotika, als auch endogen anfallende Stoffwechselprodukte effektiv aus dem Körper zu eliminieren, ist wegen meist bestehender Lipophilie eine chemische Modifikation nötig. Die in der Leber ablaufende Biotransformation verändert die zu eliminierenden Stoffe enzymatisch in ihren physikalischen Eigenschaften derart, dass sie über Niere oder Galle ausgeschieden werden können. In der Phase I dieses Prozesses finden Funktionalisierungsreaktionen statt: Zur Steigerung der Hydrophilie eines Moleküls werden entsprechende funktionelle Gruppen eingeführt oder freigelegt. Für diesen Schritt sind Hämproteine von zentraler Bedeutung, welche in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert sind: Die Enzyme des Cytochrom P450-Monooxygenasesystems [15, 16, 17].

1.2 Cytochrom P450-Monooxygenasesystem

Cytochrom P450-Enzyme sind mischfunktionelle Monooxygenasen mit einer breiten Substratspezifität. Sowohl Säugetiere, als auch Fische, Vögel, Insekten, Bakterien, Pilze, Hefen und Pflanzen verfügen über dieses phylogenetisch bedeutsame Enzymsystem [67]. Im Juni 2002 waren insgesamt 1925 Cytochrom P450-Gensequenzen bekannt [46]. Die Cytochrom P450-Enzyme werden nach Nebert entsprechend ihrer Sequenzhomologie eingeteilt und benannt. „CYP“ ist das Akronym für Cytochrom P450-Gen-Superfamilie. Die auf „CYP“ folgende arabische Zahl bezeichnet die Familie (Sequenzübereinstimmung mindestens 40%), der folgende Großbuchstabe die Subfamilie (Sequenzübereinstimmung mindestens 55%) und eine zweite arabische Zahl das einzelne Isoenzym [45]. Beim Menschen waren im Jahr 2001, auf 20 Subfamilien verteilt, 39 funktionelle CYP-Enzyme bekannt [3].

1.3 CYP3A4

Der Genlocus der Subfamilie A der Familie 3 befindet sich auf Chromosom 7, q21-q22.1 [6]. Die Subfamilie 3A umfasst die Isoenzyme CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A43 [10]. Das 57 kDA schwere, aus 502 Aminosäuren aufgebaute CYP3A4 wurde beim Menschen vor allem in der Leber und im Darm nachgewiesen [31]. CYP3A4 macht

30 bis 50% der dort vorhandenen P450-Enzyme aus [72]. Wie alle CYP-Isoenzyme ist es nur im Komplex mit dem Enzym NADPH-Cytochrom P450-Reduktase aktiv. Da CYP3A4 an der Metabolisierung von mehr als der Hälfte aller in der klinischen Praxis eingesetzten Arzneimittel beteiligt ist, ist CYP3A4 die für den Menschen wichtigste Cytochrom P450-Monooxygenase [18].

1.4 Lipide

Lipide sind als vielfach einsetzbare Biomoleküle in jeder Zelle des menschlichen Körpers präsent. Sie definieren die Zelle als solche, indem sie den Intra- vom Extrazellulärraum abgrenzen, dienen als Energiespeicher und werden als Signalmoleküle eingesetzt.

Zweikettige Phospholipide interagieren mit dem Cytochrom P450-Monooxygenasesystem. Sie maximieren die katalytische Aktivität von isolierten und rekonstituierten Cytochrom P450-Systemen, da sie die Bildung des binären Komplexes aus NADPH-Cytochrom P450-Reduktase und CYP durch Begrenzung der Enzyme auf eine zweidimensionale Membran erleichtern [38, 41, 62, 63]. Dabei bleiben Zykluszeit und Umsatzrate des arbeitenden Enzymkomplexes unverändert [42, 43].

1.5 Einkettige Lipide

Viner et al. [1987] publizierten Anhaltspunkte dafür, dass die einkettigen Lipide Ölsäure, Myristoyl- und Palmitoyllysolecithin das Cytochrom P450-System der Ratte hemmen. Diese Lipide sind interessanterweise im Gegensatz zu Xenobiotika Teil des physiologischen Intermediärstoffwechsels. Weitere Untersuchungen bewiesen eine starke, kompetitive Hemmung von CYP2B1 durch einkettige Lipide [12].

Auf Grund dieser Vorergebnisse stellt sich die Frage, ob und wie einkettige Lipide des Intermediärstoffwechsels die Aktivität des für den Menschen wichtigsten Cytochrom P450-Enzyms, des CYP3A4, beeinflussen.

1.6 Enzymaktivitätsbestimmung mit fluorogenen Substraten

Das Prinzip einer Enzymaktivitätsbestimmung mit fluorogenen Substraten beruht darauf, dass eine Substanz, die selber nicht fluoresziert, durch das zu untersuchende Enzym metabolisiert wird, wobei ein fluorochromes Produkt entsteht. Wird das Produkt angeregt, emittiert es Licht: Es fluoresziert. Die mit einem Fluoreszenzspektroskop messbare Fluoreszenzintensität (I_F) ist somit eine Funktion der Enzymaktivität (A_E).

Es gilt:

$$[I_F] = f(A_E)$$

Im Gegensatz zu Verfahren, bei denen das Produkt zur Konzentrationsbestimmung isoliert und aufgereinigt werden muss, bietet ein fluorometrischer Test den Vorteil der direkten Aktivitätsbestimmung. Das macht ihn schneller und preisgünstiger.

1.7 Dibenzylfluorescein als fluorogenes Substrat von CYP3A4

Dibenzylfluorescein ist ein Substrat von CYP3A4. Miller et al. [2000] stellten ein Verfahren vor, bei dem Dibenzylfluorescein als fluorogenes Substrat zur Aktivitätsbestimmung von CYP3A4 zum Einsatz kommt. Das korrespondierende fluorochrome Produkt ist Fluorescein.

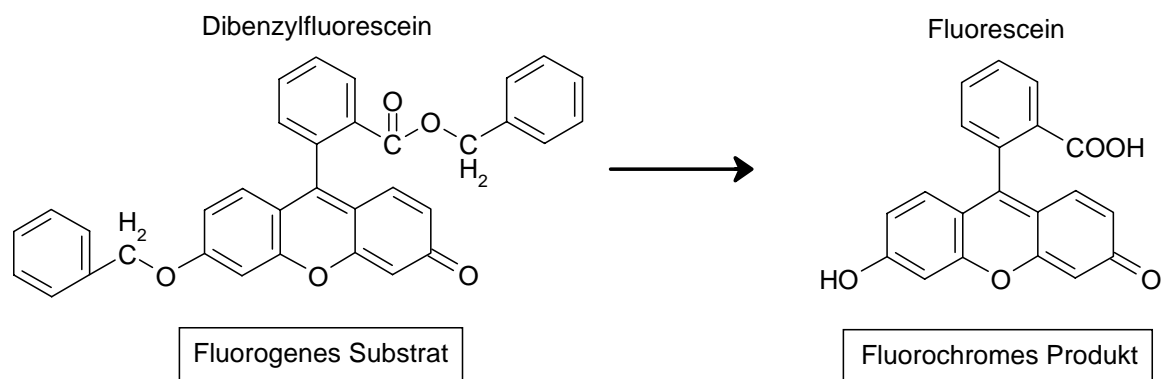


Abb. 1: Umwandlung von Dibenzylfluorescein zu Fluorescein

Da das publizierte Verfahren als maschinelles „high-throughput screening“ konzipiert ist, stellt sich die Frage, ob es durch Weiterentwicklung und Anpassung zur quantitativen Untersuchung von Hemmstoffen und deren Enzymkinetik eingesetzt werden kann.

1.9 Ziele der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Ziele verfolgt:

1. Weiterentwicklung eines fluorometrischen Tests zur Bestimmung der Aktivität von CYP3A4 mit Dibenzylfluorescein als fluorogenem Substrat und dessen Debenzylierungsprodukt Fluorescein als fluorochromem Produkt
2. Anwendung des Testverfahrens zur Klärung der Frage, ob und wie einkettige Lipide des Intermediärstoffwechsels die Aktivität von CYP3A4 beeinflussen

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Folgende, im Handel befindliche Chemikalien wurden verwendet (nach Bezugsquellen geordnet):

Fa. Acros Organics, USA

- Glycerol [C₃H₈O₃]

Fa. Fluka Chemie AG, Schweiz

- Acetonitril [C₂H₃N]

Fa. Gentest Corporation, USA

- Dibenzylfluorescein [C₃₄H₂₄O₅]

Fa. Merck, Deutschland

- Magnesiumchlorid Hexahydrat [MgCl₂·6 H₂O]
- Natriumhydroxid [NaOH]

Fa. Roche Diagnostics GmbH, Deutschland

- NADPH, Natrium Salz [C₂₁H₂₆N₇O₁₇P₃Na₄]

Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

- Arachidonsäure; (5,8,11,14-Eicosatetraenoic acid) Sodium salt [C₂₀H₃₁O₂Na]
- L- α -Dilauroylphosphatidylcholin (C12:0); (1,2-Didodecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) [C₃₂H₆₄NO₈P]
- Ethanol [C₂H₆O]
- Fluorescein [C₂₀H₁₀O₅Na₂]
- Kalium-Hepes; (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) [C₈H₁₇N₂O₄SK]
- L- α -Lysophosphatidylcholin (L- α -Lysolecithin); (1-Acyl-sn-glycero-3-phosphocholine) [C₂₆H₅₄O₇NP]
- L- α -Lysophosphatidylinositol; (Monoacyl-sn-glycero-3-phospho-[1-D-myoinositol]) Sodium salt
- 2-Monooleoylglycerol (C18:1,[cis]-9); 2-Monoolein [C₂₁H₄₀O₄]

- 2-Monopalmitoylglycerol (C16:O) [C₁₉H₃₈O₄]
- Ölsäure; (cis-9-Octadecenoic acid) [C₁₈H₃₄O₂]
- Palmitoyl-L-carnitinchlorid [C₂₃H₄₅NO₄HCl]
- L- α -Phosphatidyl-L-serin
- Phytansäure; (3,7,11,15-Tetramethylhexadecanoic acid) [C₂₀H₄₀O₂]

Fa. Tocris, UK

- (+-)-Lauroylcarnitinchlorid
- (+-)-Myristoylcarnitinchlorid

2.1.2 Enzyme

Für die Vorversuche wurde aufgereinigte Humanleber-Mikrosomenfraktion „HL110“ verwendet; Gehalt an Cytochrom P450-3A4: 13,82 nmol/ml

Die Proben wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Müller-Enoch, Abteilung Physiologische Chemie, Universität Ulm zur Verfügung gestellt.

Folgende Enzyme wurden zur Bestimmung des Einflusses von Lipiden auf die Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität verwendet:

- Rekombinante humane NADPH-P450 Oxidoreduktase; EC:1.6.2.4
Gehalt: 51,7 nmol/ml
Fa. Calbiochem, USA
- Rekombinantes humanes Cytochrom P450-3A4; EC: 1.14.13.67
Gehalt: 15,93-16,68 nmol/ml
Firmen MoBiTec, UK und Oxford Biomedical Research, USA

2.1.3 Lösungen

Sämtliche nicht unmittelbar vor dem Gebrauch hergestellten Lösungen wurden bei +8° Celsius aufbewahrt.

- Dibenzylfluorescein-Lösung; 10⁻³ M MG: [512,0]
Alle 3 Monate hergestellt.

Dibenzylfluorescein wird in Acetonitril gelöst. Die Stammlösung wird bei -25° Celsius konserviert. Unmittelbar vor dem Versuch wird die benötigte Verdünnung hergestellt.

- Fluorescein-Lösung; 10^{-5} M MG: [376,3]
 Alle 6 Monate hergestellt.
 Fluorescein wird in Kalium-Hepes-Puffer (10^{-1} M, pH 7,6) gelöst.

- Kalium-Hepes-Puffer; 10^{-1} M, pH 7,6 MG: [276,4]
 Alle 2 Monate hergestellt.
 2,74 g Kalium-Hepes werden in Aqua bidest gelöst, auf 100 ml aufgefüllt. Der pH wird mit 1 N HCl bei Raumtemperatur eingestellt.

- 20%-Glycerol/Kalium-Hepes-Puffer; 10^{-1} M, pH 7,6
 Alle 2 Monate hergestellt.
 2,74 g Kalium-Hepes werden in Aqua bidest gelöst, auf 100 ml aufgefüllt. Der pH wird mit 1 N HCl bei Raumtemperatur eingestellt. Dann werden 80% Kalium-Hepes-Puffer mit 20% Glycerol (v/v) gemischt.

- MgCl₂-Lösung; 10^{-1} M MG: [203,3]
 Alle 4 Monate hergestellt.
 2,03 g MgCl₂ werden in Aqua bidest gelöst, auf 100 ml aufgefüllt.

- NADPH-Lösung; 10^{-2} M MG: [833,4]
 Unmittelbar vor Gebrauch hergestellt. Auf Eis gelagert.
 4,15 mg NADPH werden in 0,5 ml Kalium-Hepes-Puffer (10^{-1} M, pH 7,6) gelöst.

- NaOH-Lösung; 2 M MG: [40,0]
 Alle 4 Monate hergestellt.
 8 g NaOH werden in Aqua bidest gelöst, auf 100 ml aufgefüllt.

- L- α -Dilauroylphosphatidylcholin-Lösung MG: [621,8]
 Unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.
 2 mg L- α -Dilauroylphosphatidylcholin werden mit 500 μ l 20%-Glycerol/Kalium-Hepes-Puffer (10^{-1} M, pH 7,6) in einem Reagenzglas versetzt und danach bis zu 30 Minuten abwechselnd beschallt (Ultraschallbad „Sonorex TK52“, Fa. Baudelin) und gevortext, bis die Lösung optisch klar ist. Die Wassertemperatur darf dabei +42° Celsius nicht überschreiten.

- L- α -Phosphatidyl-L-serin-Lösung MG: [810,0]
Unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.
2 mg L- α -Phosphatidyl-L-serin werden mit 500 μ l 20%-Glycerol/Kalium-Hepes-Puffer (10^{-1} M, pH 7,6) in einem Reagenzglas versetzt und danach bis zu 30 Minuten abwechselnd beschallt (Ultraschallbad „Sonorex TK52“, Fa. Baudelin) und gevortext, bis die Lösung optisch klar ist. Die Wassertemperatur darf dabei +42° Celsius nicht überschreiten.

- Phospholipidgemisch, binäres
Unmittelbar vor Gebrauch hergestellt
Die L- α -Dilauroylphosphatidylcholin-Lösung und die L- α -Phosphatidyl-L-serin-Lösung werden im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt, und kurz beschallt.

- Untersuchte Lipide
Unmittelbar vor Gebrauch hergestellt
 - L- α -Lysophosphatidylcholin und Palmitoyl-L-Carnitin wurden in Kalium-Hepes-Puffer (10^{-1} M, pH 7,6) gelöst und beschallt.
 - Phytansäure, Ölsäure, 2-Monooleoylglycerol, L- α -Lysophosphatidylinositol, 2-Monopalmitoylglycerol wurden in Ethanol gelöst und beschallt.
 - Myristoylcarnitin, Lauroylcarnitin und Arachidonsäure wurden in Aquabidest gelöst und beschallt.

2.1.4 Apparate und Einstellungen

Alle beschriebenen Messungen wurden bei +37° Celsius in derselben 1000 μ l Quarzküvette („283 QS“; Schichtdicke = 1 cm) durchgeführt. Das Gesamtvolumen jedes Ansatzes betrug 600 μ l.

Die Fluoreszenzintensität wurde mit einem Spektrophotometer („Spectrofluor JY3 D“ von Jobin-Yvon) mit integriertem Wasserbad („Thermomix 1441“ von B. Braun) bestimmt, und mit einem gekoppeltem x/y-Schreiber („Servocorder SR 6254“ von Watanabe) bei stets gleicher Konfiguration von Gain, Integration und Energie aufgezeichnet.

2.2 Methoden

2.2.1 Weiterentwicklung eines fluorometrischen Tests zur Bestimmung der Aktivität von CYP3A4

Um den von Miller et al. [2000] vorgestellten fluorometrischen Test mit Dibenzylfluorescein als fluorogenem Substrat weiterzuentwickeln, wurde zunächst das Absorptions- und Emissionsmaximum von Fluorescein bestimmt.

2.2.1.1 Aufnahme der Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Fluorescein

Zur Aufnahme der Absorptionsspektren (Anregungsspektren) wurden 600 µl Fluorescein-Lösung (10^{-6} M in Kalium-Hepes-Puffer, 10^{-1} M, pH 7,6) in die Küvette pipettiert und die Fluoreszenzintensität bei einer konstanten Emissionswellenlänge von 490 nm gemessen und aufgezeichnet, während die Anregungswellenlänge über einen Bereich von 400 nm bis 650 nm variierte.

Zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren wurde dieselbe Lösung konstant bei ihrem (wie oben beschrieben) ermittelten Absorptionsmaximum angeregt, und die Fluoreszenzintensität gemessen und aufgezeichnet, während die Emissionswellenlänge über einen Bereich von 400 nm bis 650 nm variierte.

Dieselbe Messung wurde auch für 600 µl Fluorescein-Lösung (10^{-6} M in Kalium-Hepes-Puffer, 10^{-1} M, pH 9) durchgeführt.

2.2.1.2 Bestimmung der Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität und Fluoresceinkonzentration

Zur Bestimmung der Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität und Fluoresceinkonzentration wurden einem 600 µl Ansatz aus 20 µl $MgCl_2$ -Lösung (10^{-1} M), 10 µl NADPH-Lösung (10^{-2} M) und Kalium-Hepes-Puffer (10^{-1} M, pH 7,6) steigende Konzentrationen Fluorescein beigemischt und die jeweilige Fluoreszenzintensität bei den (wie unter 2.2.1.1 beschrieben) ermittelten Absorptions- und Fluoreszenzmaxima bestimmt und aufgezeichnet.

Dieselbe Messung wurde auch bei pH 9 durchgeführt.

2.2.1.3 Bestimmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität und Optimierung des Versuchsprotokolls

Das Protokoll von Miller et al. [2000] wurde zunächst wie folgt abgewandelt:

590 µl Ansatz enthielten 4 µl in Acetonitril gelöstes Dibenzylfluorescein (10^{-3} M), 5 µl Humanleber-Mikrosomenfraktion „HL110“, 20 µl $MgCl_2$ -Lösung (10^{-1} M) und 561 µl Kalium-Hepes-Puffer (10^{-1} M, pH 7,6). In dieser Reihenfolge wurden die Substanzen in die Küvette pipettiert und bei $+37^\circ$ Celsius 4 Minuten inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 10 µl NADPH-Lösung (10^{-2} M) gestartet. Nach 10 Minuten erfolgte der Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 10 µl NaOH-Lösung (2 M); der pH stieg von 7,6 auf 9. Hiernach wurde zweimal mit 10 µl Fluorescein-Lösung (10^{-5} M in Kalium-Hepes-Puffer, 10^{-1} M, pH 9) geeicht.

Die Fluoreszenzintensität wurde bei dem (wie unter 2.2.1.1 beschrieben) ermittelten Absorptions- und Emissionsmaximum gemessen und aufgezeichnet. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität wurde über die Reaktionsdauer gemittelt und die spezifische Aktivität berechnet.

Die systematische Variation von Substratkonzentration, pH und zeitlichem Ablauf im Rahmen von Vorversuchen, sowie die Substitution der Humanleber-Mikrosomenfraktion durch ein rekonstituiertes, vesikuläres CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System (unter 2.2.1.6 beschrieben), wurde zur Maximierung der spezifischen Aktivität durchgeführt.

Das Ergebnis sind die unter 3.2.1 und 3.2.2 vorgestellten Versuchsprotokolle, welche zur Bestimmung des Einflusses von einkettigen Lipiden auf die CYP3A4-Aktivität eingesetzt wurden.

2.2.1.4 Bestimmung der Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität und der Umsetzung von Dibenzylfluorescein

Zur Bestimmung der Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität und der Umsetzung von Dibenzylfluorescein zu Fluorescein wurden 20 µl $MgCl_2$ -Lösung (10^{-1} M), 561 µl Kalium-Hepes-Puffer (10^{-1} M, pH 7,6) und 10 µl NADPH-Lösung (10^{-2} M) in die Küvette pipettiert. Der Ansatz wurde 14 Minuten bei $+37^\circ$ Celsius inkubiert, bevor 10 µl NaOH-Lösung (2 M), 4 µl in Acetonitril gelöstes Dibenzylfluorescein (10^{-3} M) und 5 µl Humanleber-

Mikrosomenfraktion „HL110“ zugegeben wurden. Hiernach wurde zweimal mit 10 µl Fluorescein-Lösung (10^{-5} M in Kalium-Hepes-Puffer, 10^{-1} M, pH 9) geeicht.

Die Fluoreszenzintensität wurde bei dem (wie unter 2.2.1.1 beschrieben) ermittelten Absorptions- und Emissionsmaximum gemessen und aufgezeichnet.

2.2.1.5 Aufnahme der Fluoreszenzspektren des Reaktionsprodukts

Zur Aufnahme der Fluoreszenzspektren des Reaktionsprodukts von Protokoll 2.2.1.3 wurde ein Ansatz wiederholt im Lauf der Reaktion bei dem (wie unter 2.2.1.1 beschrieben) ermittelten Absorptionsmaximum angeregt, und die Fluoreszenzintensität gemessen und aufgezeichnet, während die Emissionswellenlänge über einen Bereich von 400 nm bis 650 nm variierte.

2.2.1.6 Rekonstituiertes, vesikuläres CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System

Die eingesetzte Methode wurde von Müller-Enoch et al. [1984] beschrieben.

Das für die Bestimmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität optimierte vesikuläre Rekonstitutionssystem („Preformed Complex“) wurde wie folgt hergestellt:

4 µl binäres Phospholipidgemisch, 4 µl NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (51,7 nmol/ml) und 10 µl rekombinantem humanem Cytochrom P450-3A4 (15,93-16,68 nmol/ml), gemischt mit 10 µl Kalium-Hepes-Puffer (10^{-1} M, pH 7,6).

Das molare Verhältnis von binärem Phospholipidgemisch : Reduktase : CYP3A4 war 140 : 1,97 : 1

Dieser „Preformed Complex“ wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur (ca. +20° Celsius) inkubiert und dann innerhalb von 60 Minuten für das optimierte Versuchsprotokoll zur Bestimmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität verwendet.

2.2.2 Bestimmung des Einflusses einkettiger Lipide auf die CYP3A4-Aktivität

Der Einfluss einkettiger Lipide auf die CYP3A4-Aktivität wurde mit dem weiterentwickelten Testsystem bestimmt.

2.2.2.1 Spezifische Aktivität

Die spezifische Aktivität (A) eines Enzyms ist definiert als gebildetes Produkt pro Zeit, $d[P]/dt$, geteilt durch die bei Reaktionsbeginn vorliegende Enzymkonzentration:

$$A = \frac{\frac{d[P]}{dt}}{[Enzym]} \quad (1)$$

Die spezifische Aktivität kann experimentell bestimmt werden, wenn das gebildete Produkt pro Zeit, $d[P]/dt$, für eine bestimmte initiale Konzentration des Enzyms CYP3A4, $[CYP3A4]_0$, gemessen wird.

Das gebildete Produkt pro Zeit, $d[P]/dt$, eines binären Proteinkomplexes kann durch

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

beschrieben werden. Die Produktionsrate ist proportional zu

- a) der Konzentration der arbeitenden Proteinkomplexe, $[komplex]$,
- b) der Umsatzrate eines Proteinkomplexes, k_E^0 ,
- c) und der Fraktion, R, der Besetzung des katalytischen Zentrums durch die Substratmoleküle, S

Die Enzymaktivität kann also folgendermaßen beschrieben werden:

$$A = \frac{[komplex]}{[CYP3A4]_0} \cdot k_E^0 \cdot R(S) \quad (3)$$

2.2.2.2 Bestimmung des IC₅₀ und des AC₅₀

Zwecks Bestimmung der zur Halbierung der Enzymaktivität nötigen Lipidkonzentration (IC₅₀) bzw. der zur Steigerung der Enzymaktivität um die Hälfte nötigen Lipidkonzentration (AC₅₀) wurde bei konstanter Substratkonzentration von 1 µM die Lipidkonzentration im Laufe einer Versuchsreihe gesteigert.

Die in Kalium-Hepes-Puffer gelösten Lipide wurden in Volumina von 1 bis 10 µl, die in Aqua bidest gelösten Lipide im stets gleichen Volumen von 4 µl, und die in Ethanol gelösten Lipide im stets gleichen Volumen von 4 µl zugegeben.

Jeder 3. Ansatz einer Reihe wurde ohne Lipid, jedoch mit dem den beiden vorherigen Ansätzen zugegebenen Volumina Lösungsmittel gemessen. Die dabei bestimmte Enzymaktivität wurde als 100% spezifische Aktivität festgelegt, und diente als Referenz zur Berechnung der in den beiden vorangegangenen Messungen durch das Lipid hervorgerufenen Hemmung oder Aktivierung.

Im Falle einer Aktivierung wurde die spezifische Aktivität bei der durch die Löslichkeit begrenzten maximalen Lipidkonzentration gemessen.

Das optimierte Protokoll zur Bestimmung des IC_{50} - und der AC_{50} -Werte ist unter 3.2.1 beschrieben.

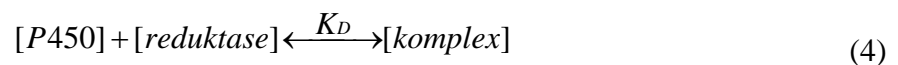
2.2.2.3 Bestimmung des Hemmtyps

Für zwei der wie unter 3.2.1 beschrieben getesteten Lipide wurde der vorliegende Hemmtyp bestimmt. Dazu wurde bei konstanter Inhibitorkonzentration die Substratkonzentration von $0,375 \mu\text{M}$ bis $1,83 \mu\text{M}$ variiert.

Das optimierte Protokoll ist unter 3.2.2 beschrieben.

2.2.2.3.1 Bildung des binären Komplexes

Die Komplexbildung des Cytochrom P450-Enzyms mit der Reduktase kann durch die Massenerhaltungsbeziehung allgemein beschrieben werden. Hier formen die beiden Enzyme einen binären Komplex (P450:Reduktase) [41, 42]:



mit dem Dissoziationskoeffizienten, K_D , für den gilt:

$$K_D = \frac{[P450] \cdot [reduktase]}{[komplex]} \quad (5)$$

Der Anteil des binären Komplexes an der Gesamtkonzentration wird mit Hilfe der Gleichung (5) und des Protein-Erhaltungsgesetzes ($[P450]_0 = [P450] + [komplex]$ und $[Red]_0 = [Red] + [komplex]$) errechnet. Nach Einsetzen und Auflösen der quadratischen Gleichung erhält man folgenden Ausdruck (durch $[P450]_0$ geteilt):

$$\frac{[komplex]}{[P450]_0} = \frac{1}{2} \left(\left[1 + \frac{[Red]_0}{[P450]_0} + \frac{K_D}{[P450]_0} \right] \pm \sqrt{\left[1 + \frac{[Red]_0}{[P450]_0} + \frac{K_D}{[P450]_0} \right]^2 - \frac{4[Red]_0}{[P450]_0}} \right) \quad (6)$$

Von den beiden möglichen Lösungen kann nach graphischer Darstellung der Funktion die Lösung, bei der die Wurzel addiert wird, ausgeschlossen werden. 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. Experimente von Müller-Enoch et al. [1984] wurden mit Hilfe der Gleichung (6) interpretiert: $K_D = (1.4 \pm 0.1) \cdot [P450]_0$ für Lipide, die aus Lebermikrosomen gewonnen wurden ($[P450]_0 = 33 \text{ nM}$) und $K_D = (2.4 \pm 0.2) \cdot [P450]_0$ für DLPC. Große Dissoziationskoeffizienten erhält man, wenn man die beiden Enzyme in Puffer gelöst sind, der kleine Mengen von Glycerol enthält: $K_D = (4 \pm 1) \cdot [P450]_0$.

Wenn man ein anderes Molekül, wie z.B. eine einkettige Fettsäure, I, zu der Enzym-Substrat-Reaktion hinzugibt, kann der Dissoziationskoeffizient, K_D , verändert werden. Der Dissoziationskoeffizient ist dann eine Funktion der Konzentration der einkettigen Fettsäure: $K_D(I)$.

2.2.2.3.2 Substratumsetzung ohne Hemmstoff

Zur Berechnung der Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion bei konstanter Enzymkonzentration und konstanter Temperatur, jedoch variabler Substratkonzentration, dient die Michaelis-Menten-Gleichung [36]:

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

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

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_{\max}} + \frac{1}{[S]} \cdot \frac{K_s^0}{A_{\max}} \quad (8)$$

A_{\max} und K_s^0 können anhand der gezeichneten Geraden ermittelt werden. K_s^0 entspricht der Michaelis-Menten-Konstante und damit in dieser Darstellung dem Schnittpunkt mit der x-Achse (gemessen ohne Hemmstoff).

2.2.2.3.3 Substratumsetzung mit Hemmstoff: Kompetitive Hemmung

Wenn außer dem Substrat, S, noch ein weiteres Molekül, I, wie z.B. eine einkettige Fettsäure, zur Reaktion beigegeben wird, konkurrieren die beiden Moleküle um das aktive Zentrum. Der Teil der Enzymkomplexe, der dann mit Substrat beladen ist, entspricht:

$$\frac{\frac{[S]}{K_s^0}}{1 + \frac{[S]}{K_s^0} + \frac{[I]}{K_I^{(c)}}} \quad (9)$$

Wobei $K_I^{(c)}$ für den Dissoziationskoeffizienten des weiteren Moleküls steht (c steht für kompetitive Hemmung).

Nach Bisswanger [2000] gilt dann für die Lineweaver-Burke-Darstellung folgende Gleichung:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{A_{\max}} + \frac{1}{[S]} \cdot \frac{K_m}{A_{\max}} \quad (10)$$

wobei $K_m = K_s^0 \left(1 + \frac{[I]}{K_I^{(c)}} \right)$.

Die Enzymaktivität wurde für verschiedene Substratkonzentrationen, aber bei unveränderter Hemmstoffkonzentration bestimmt ($[S] = \text{variabel}$ und $[I] = \text{konstant}$). Erneut wurde die inverse Enzymaktivität A^{-1} gegen die Substratkonzentration S^{-1} aufgetragen. Alle Variablen dieser Gleichung sind bekannt oder können mit der Gleichung (10) berechnet werden. Den Dissoziationskoeffizienten $K_I^{(c)}$ erhält man durch Anpassung der Gleichung (10) an die experimentell bestimmten Punkte. Der kompetitive Effekt des zweiten Moleküls I wird durch $K_I^{(c)}$ charakterisiert.

2.2.3 Darstellung, statistische Verfahren

Die Spektren wurden mit einem x/y-Schreiber („Servocorder SR 6254“ von Watanabe) erstellt.

Für die gemessenen Enzymaktivitäten wurde der Mittelwert berechnet. Die Graphiken wurden mit dem Programm Excel von Microsoft erstellt. Die darin dargestellten Punkte sind jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen. Die entsprechenden Einzelmesswerte sind durch Fehlerbalken repräsentiert. Bei sehr geringem Abstand der Einzelmesswerte konnte graphisch nur der Mittelwert dargestellt werden. Mit Excel wurden auch die aus den experimentell bestimmten Werten ableitbaren Trendlinien berechnet.

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des Enzyms waren weitere Messungen nicht möglich; die Durchführung einer Regressionsanalyse erschien angesichts der Datenmenge nicht sinnvoll.

3. Ergebnisse

3.1 Weiterentwicklung eines fluorometrischen Tests zur Bestimmung der Aktivität von CYP3A4

3.1.1 Absorptionsspektrum von Fluorescein

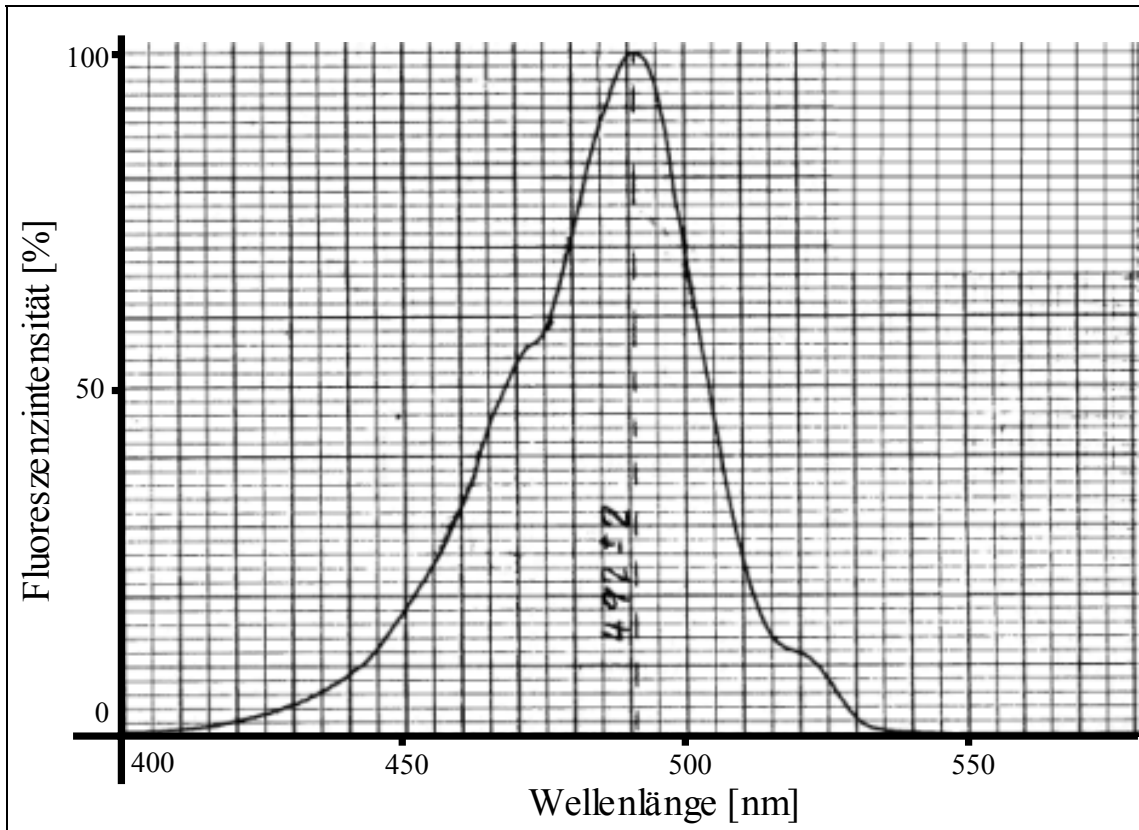


Abb. 2: Ausschnitt aus dem Absorptionsspektrum von Fluorescein

Das Absorptionsspektrum von 600 μl Fluorescein (10^{-6} M in Kalium-Hepes-Puffer, 10^{-1} M, pH 7,6) über den Wellenbereich von 400 bis 580 nm bei einer konstanten Emissionswellenlänge (λ_E) von 523 nm. 100% entspricht der maximal gemessenen Fluoreszenzintensität.

Das für Fluorescein nach 2.2.1.1 bestimmte Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 492 ± 2 nm.

Es besteht kein Unterschied zwischen den bei pH 7,6 und den bei pH 9 aufgenommenen Spektren.

3.1.2 Fluoreszenzspektrum von Fluorescein

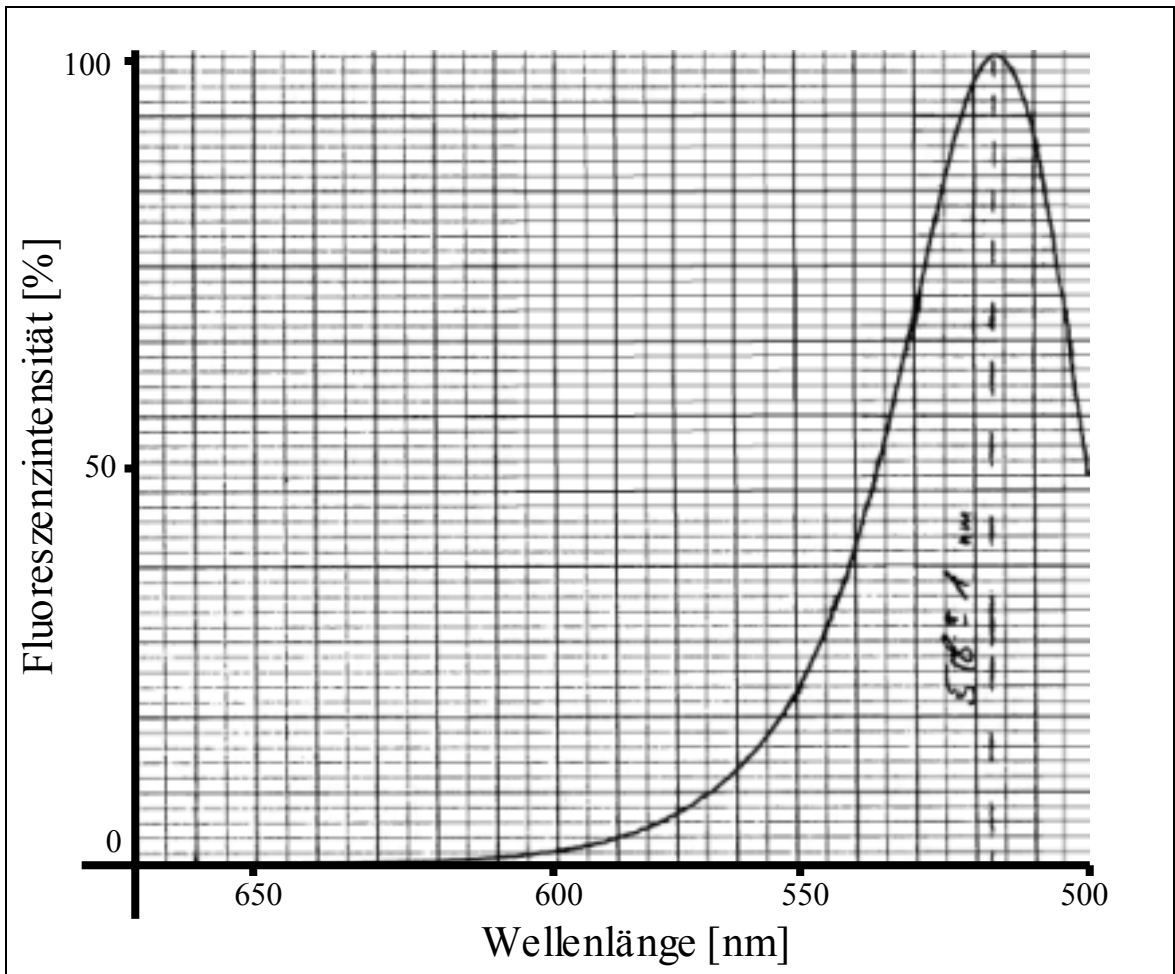


Abb. 3: Ausschnitt aus dem Fluoreszenzspektrum von Fluorescein

Das Fluoreszenzspektrum von 600 μl Fluorescein (10^{-6} M in Kalium-Hepes-Puffer, 10^{-1} M, pH 7,6) über den Wellenbereich von 500 bis 670 nm bei einer konstanten Absorptionswellenlänge (λ_A) von 491 nm. 100% entspricht der maximal gemessenen Fluoreszenzintensität.

Das für Fluorescein nach 2.2.1.1 bestimmte Emissionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 518 ± 1 nm.

Es besteht kein Unterschied zwischen den bei pH 7,6 und den bei pH 9 aufgenommenen Spektren.

3.1.3 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Fluoresceinkonzentration

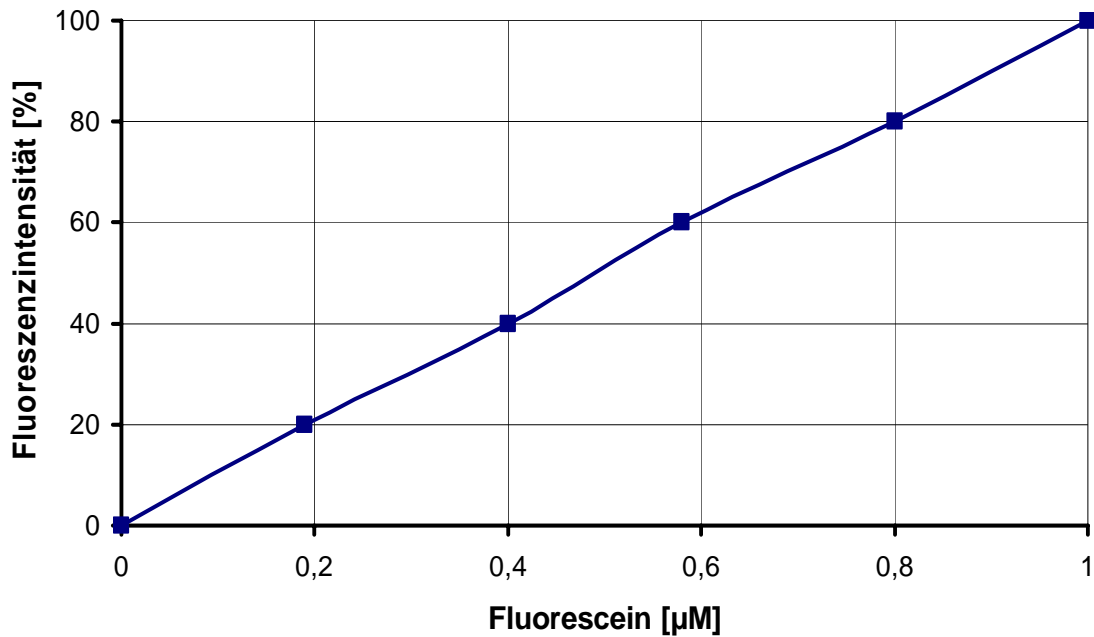


Abb. 4: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Fluoresceinkonzentration

Bei Absorption von 491 nm und Fluoreszenz von 518 nm Wellenlänge wurde die Fluoreszenzintensität eines 600 µl Ansatzes aus 20 µl MgCl₂-Lösung (10⁻¹ M), 10 µl NADPH-Lösung (10⁻² M) und Kalium-Hepes-Puffer (10⁻¹ M, pH 7,6) sowie der angegebenen Konzentrationen (10⁻⁶ M) Fluorescein-Lösung bestimmt (■). 100% entspricht der maximal gemessenen Fluoreszenzintensität.

Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen. Die entsprechenden Einzelwerte sind durch Fehlerbalken dargestellt. Bei sehr geringem Abstand der Einzelmesswerte konnte graphisch nur der Mittelwert dargestellt werden.

Die nach 2.2.1.2 bestimmte Fluoreszenzintensität steigt linear mit der im Ansatz vorliegenden Fluorescein- Konzentration an.

Es besteht kein Unterschied zwischen den bei pH 7,6 und den bei pH 9 aufgenommenen Fluoreszenzintensitäten.

3.1.4 Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität und der Umsetzung von Dibenzylfluorescein

Für den nach 2.2.1.4 durchgeführten Versuch wurde gemessen:

$$\text{Fluoreszenzintensität}_{\text{bei Versuchsbeginn}} = \text{Fluoreszenzintensität}_{\text{bei Versuchsende}}$$

3.1.5 Zwei Fluoreszenzspektren des Reaktionsprodukts

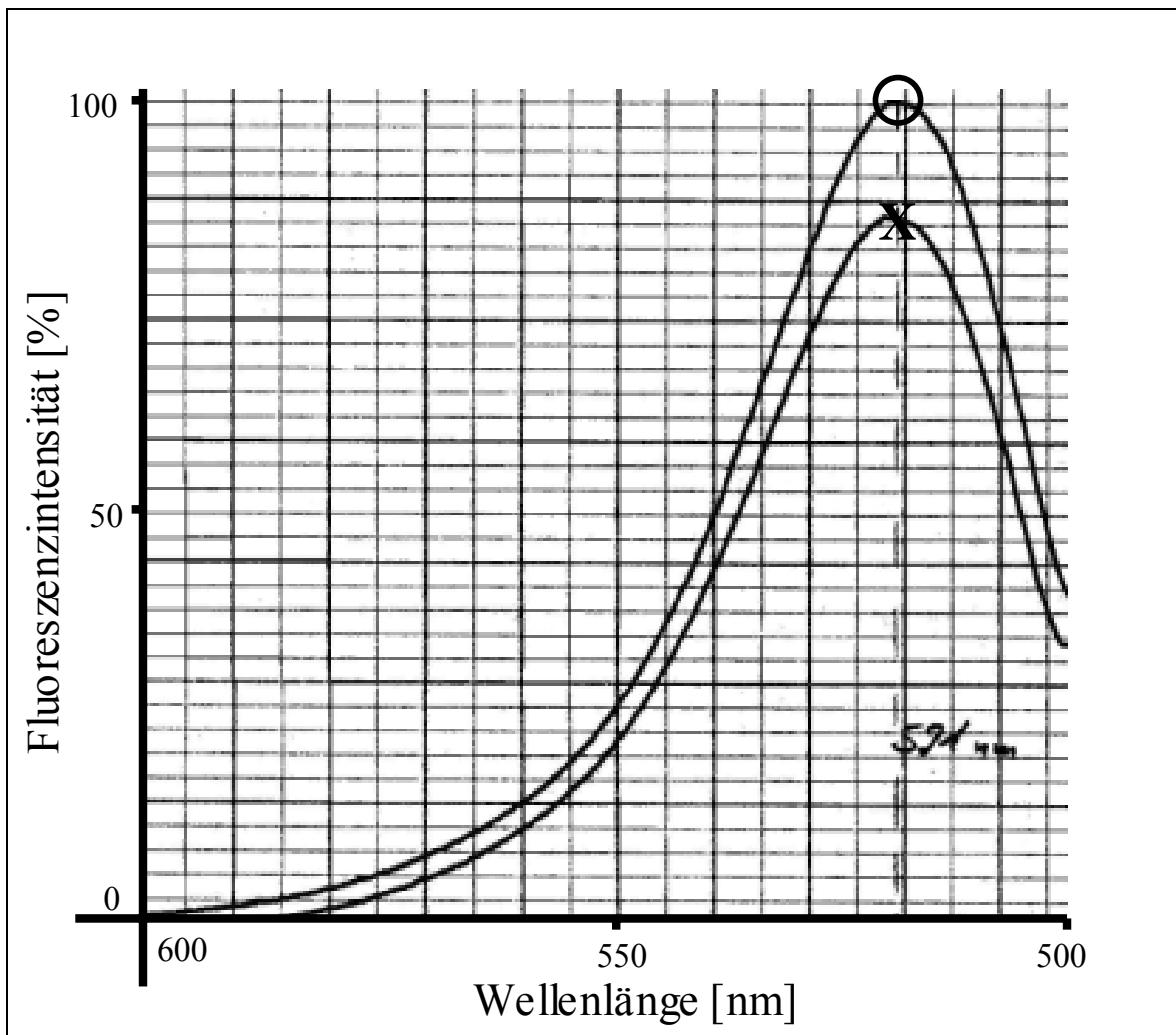


Abb. 5: Ausschnitt aus zwei Fluoreszenzspektren des Reaktionsprodukts

Das Fluoreszenzspektrum eines 600 μl Ansatzes von 4 μl in Acetonitril gelöstem Dibenzylfluorescein (10^{-3} M), 5 μl Humanleber-Mikrosomenfraktion „HL110“, 20 μl MgCl_2 (10^{-1} M) und 561 μl Kalium-Hepes-Puffer (10^{-1} M, pH 7,6) und 10 μl (10^{-2} M) NADPH-Lösung über den Wellenbereich von 500 bis 670 nm bei einer konstanten Absorptionswellenlänge von 491 nm.

Die Messung wurde zwei Mal während einer Reaktion durchgeführt. X markiert die maximale Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt x [min], O markiert die maximale Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt x+5 [min].

100% entspricht der maximal gemessenen Fluoreszenzintensität.

Während der nach 2.2.1.5 durchgeführten Reaktion wurden im Abstand von 5 Minuten zwei Fluoreszenzspektren aufgenommen. Beide zeigen ein Maximum bei 521 nm, unterscheiden sich aber in Bezug auf ihre Fluoreszenzintensität. Für das später aufgenommene Spektrum fällt die maximale Fluoreszenzintensität 15% stärker aus.

3.2 Bestimmung des Einflusses einkettiger Lipiden auf die CYP3A4-Aktivität

Zur Bestimmung des Einflusses einkettiger Lipide auf die CYP3A4-Aktivität wurde ein bekanntes Testsystem weiterentwickelt. Ausgangspunkt waren die unter 2.2.2.2 und 2.2.2.3 beschriebenen Abläufe, sowie die Bestimmung der Fluoreszenzintensität des fluorochromen Produkts Fluorescein unter optimalen Versuchsbedingungen.

3.2.1 Protokoll zur Bestimmung der IC₅₀- und AC₅₀-Werte unter optimalen Bedingungen

Die 10⁻³ M Dibenzylfluorescein-Stammlösung wurde mit Acetonitril und Kalium-Hepes-Puffer (10⁻¹ M, pH 7,6) im Verhältnis 3 : 2 : 5 verdünnt, und auf +37° Celsius temperiert.

Jeder Ansatz enthielt 2 µl verdünnte Dibenzylfluorescein-Stammlösung (Konzentration im Ansatz: 1 µM), 4 µl rekonstituiertes, vesikuläres CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System, X µl gelöstes Lipid (X steht für das jeweilige Volumen der Lipidlösung), 20 µl MgCl₂-Lösung (10⁻¹ M), 564 – X µl Kalium-Hepes-Puffer (10⁻¹ M, pH 7,6). In dieser Reihenfolge wurden die Substanzen in die Küvette pipettiert und bei +37° Celsius 4 Minuten inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 10 µl NADPH-Lösung (10⁻² M) gestartet. Nach 5 Minuten wurde zweimal mit 10 µl Fluorescein-Lösung (10⁻⁵ M in Kalium-Hepes-Puffer, 10⁻¹ M, pH 7,6) geeicht.

Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Absorptionswellenlänge von 491 nm und einer Emissionswellenlänge von 518 nm gemessen und aufgezeichnet. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität wurde über die Reaktionsdauer gemittelt und die spezifische Aktivität berechnet.

Die Optimierung des Testsystems ermöglichte die Steigerung der spezifischen Aktivität um das 39,5-fache: Von 0,02 nmol Fluorescein x min⁻¹ x nmol CYP3A4⁻¹ auf 0,79 nmol Fluorescein x min⁻¹ x nmol CYP3A4⁻¹.

Die unter 3.2.1.1 bis 3.2.1.10 dargestellten Daten wurden mit dem wie oben beschrieben optimierten Protokoll ermittelt.

3.2.1.1 Lauroylcarnitin

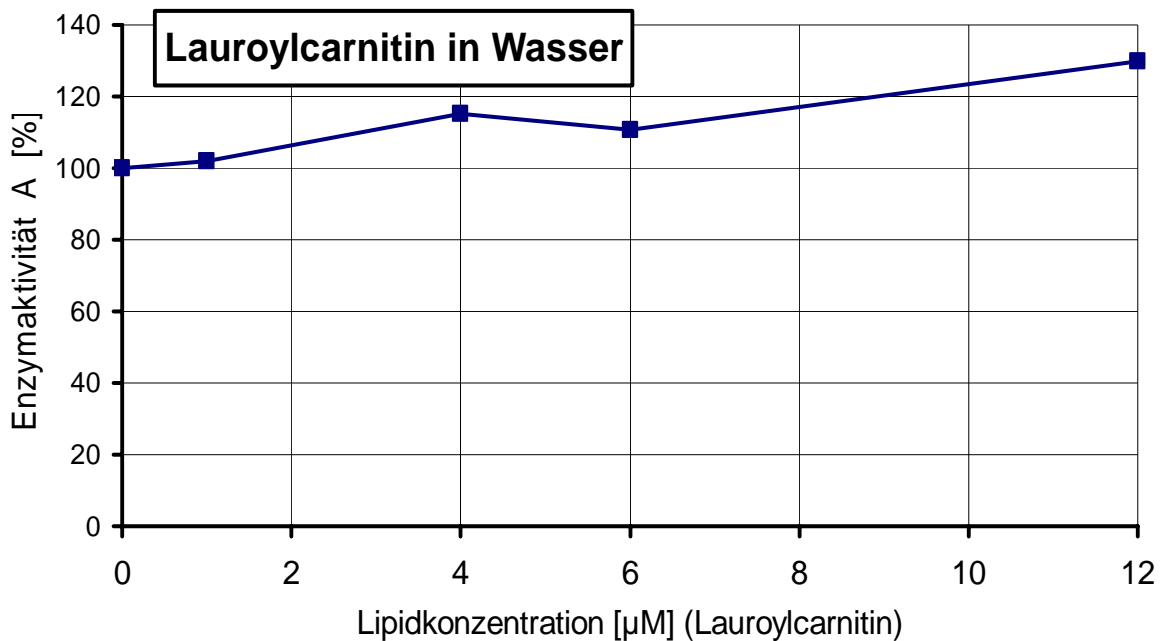


Abb. 6: Aktivierung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität durch Lauroylcarnitin

Die Debenzylierung von Dibenzylfluorescein wurde im rekonstituierten, vesikulären CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe der angegebenen Konzentrationen (10^{-6} M) von in Wasser gelöstem Lauroylcarnitin bei konstanter Substratkonzentration ($[1 \mu\text{M}]$) bestimmt (■).

Die Enzymaktivität A in spezifischer Aktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Fluorescein} \times \text{nmol CYP3A4}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

100% entspricht der gemessenen Enzymaktivität ohne Lipid.

Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen. Die entsprechenden Einzelmesswerte sind durch Fehlerbalken dargestellt. Bei sehr geringem Abstand der Einzelmesswerte konnte graphisch nur der Mittelwert dargestellt werden.

Lauroylcarnitin, ein Derivat der gesättigten C_{12} -Fettsäure (Strukturformel: siehe Anhang A), zeigt eine Steigerung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität.

Der AC_{50} liegt bei ca. $20 \mu\text{M}$ (Ergebnis nicht gezeigt).

3.2.1.2 Myristoylcarnitin

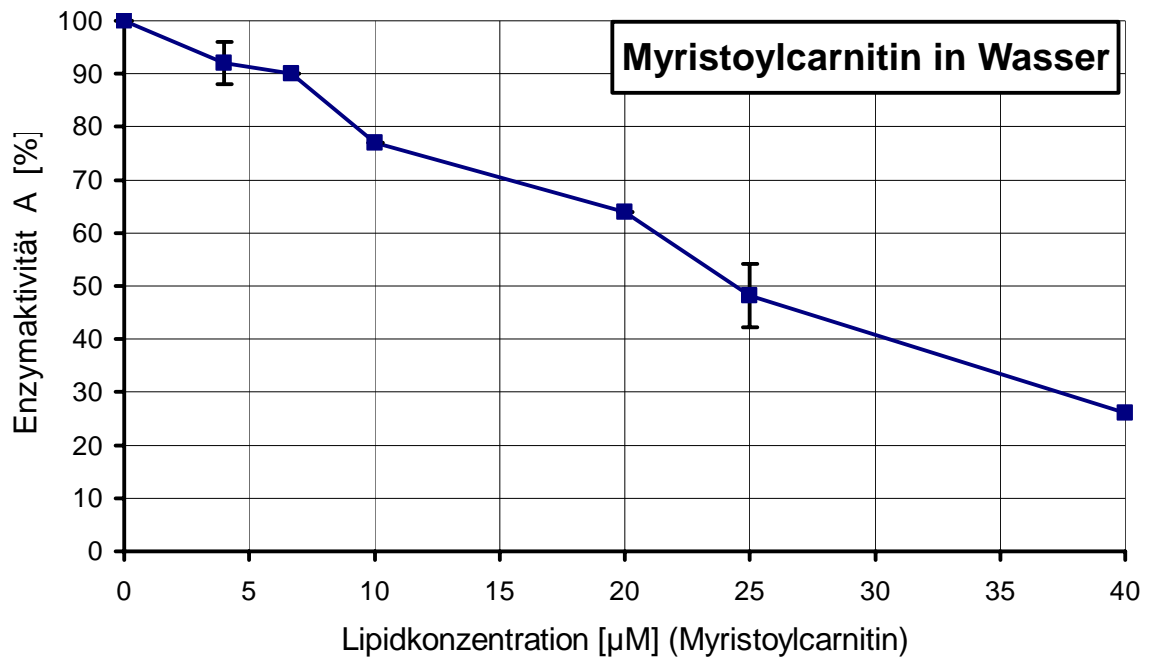


Abb. 7: Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität durch Myristoylcarnitin

Die Debenzylierung von Dibenzylfluorescein wurde im rekonstituierten, vesikulären CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe der angegebenen Konzentrationen (10^{-6} M) von in Wasser gelöstem Myristoylcarnitin bei konstanter Substratkonzentration ($[1 \mu\text{M}]$) bestimmt (■).

Die Enzymaktivität A in spezifischer Aktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Fluorescein} \times \text{nmol CYP3A4}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

100% entspricht der gemessenen Enzymaktivität ohne Lipid.

Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen. Die entsprechenden Einzelmesswerte sind durch Fehlerbalken dargestellt. Bei sehr geringem Abstand der Einzelmesswerte konnte graphisch nur der Mittelwert dargestellt werden.

Myristoylcarnitin, ein Derivat der gesättigten C_{14} -Fettsäure (Strukturformel: siehe Anhang A), zeigt eine Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität.

Der IC_{50} liegt bei ca. $25 \mu\text{M}$.

3.2.1.3 2-Monopalmitoylglycerol

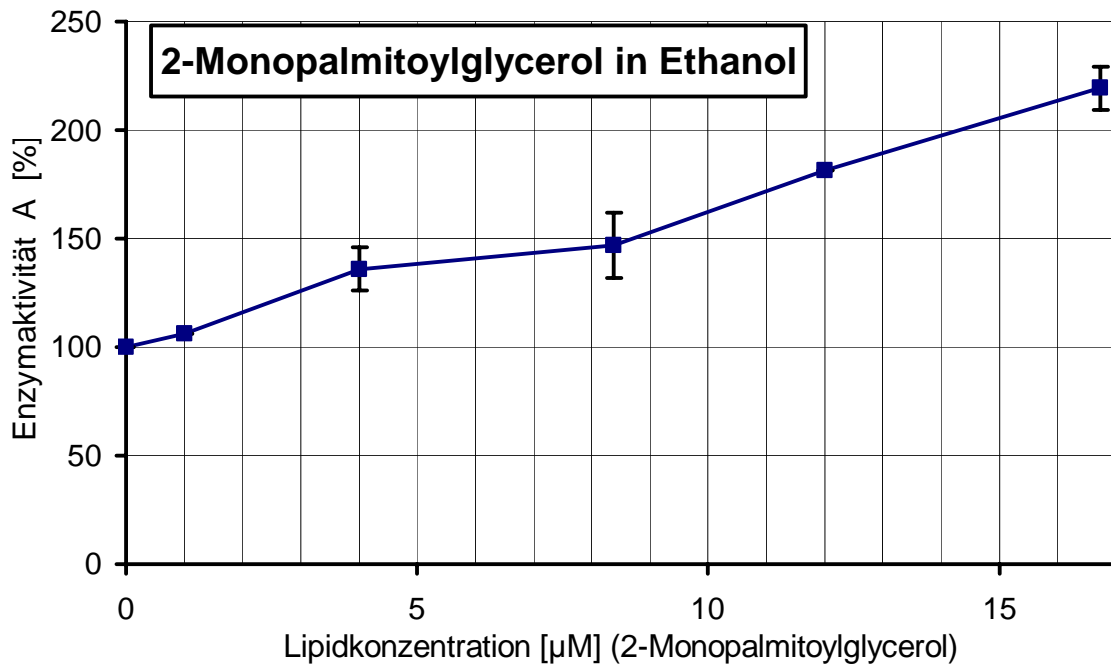


Abb. 8: Aktivierung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität durch 2-Monopalmitoylglycerol

Die Debenzylierung von Dibenzylfluorescein wurde im rekonstituierten, vesikulären CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe der angegebenen Konzentrationen (10^{-6} M) von in Ethanol gelöstem 2-Monopalmitoylglycerol bei konstanter Substratkonzentration ($[1 \mu\text{M}]$) bestimmt (■).

Die Enzymaktivität A in spezifischer Aktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Fluorescein} \times \text{nmol CYP3A4}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

100% entspricht der gemessenen Enzymaktivität ohne Lipid.

Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen. Die entsprechenden Einzelmesswerte sind durch Fehlerbalken dargestellt. Bei sehr geringem Abstand der Einzelmesswerte konnte graphisch nur der Mittelwert dargestellt werden.

2-Monopalmitoylglycerol (2-Monohexadecanoylglycerol), eine C_{16} -Fettsäure mit einer Glycerolkopfgruppe (Strukturformel: siehe Anhang A), zeigt eine Steigerung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität.

Der AC_{50} liegt bei ca. $7,5 \mu\text{M}$.

3.2.1.4 Palmitoyl-L-Carnitin

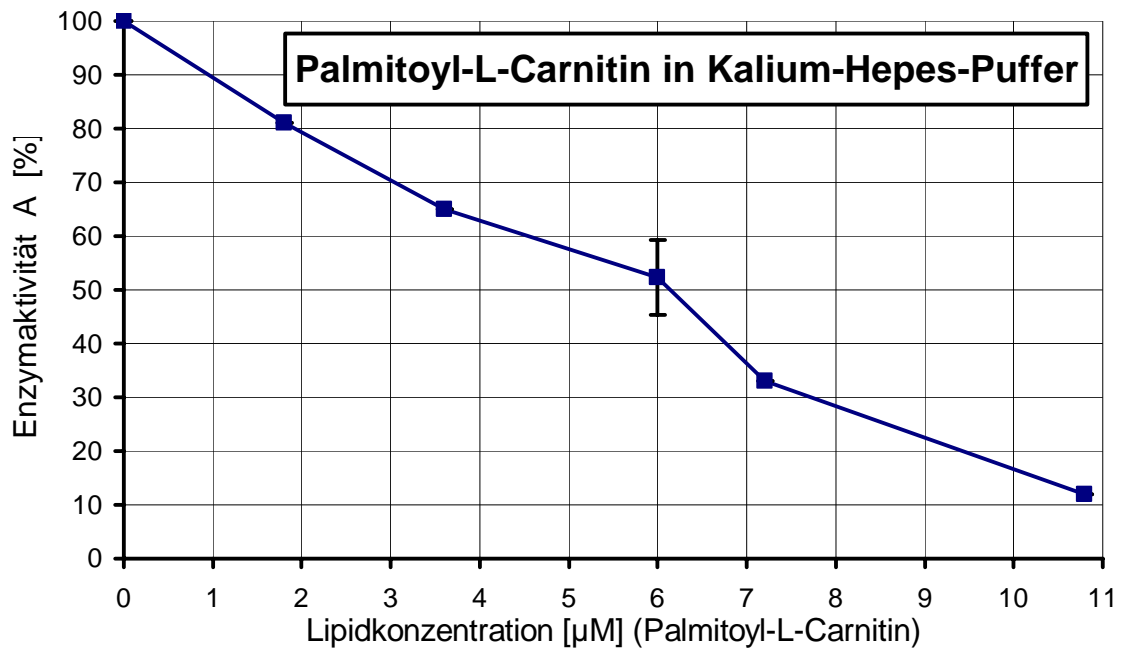


Abb. 9: Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität durch Palmitoyl-L-Carnitin

Die Debenzylierung von Dibenzylfluorescein wurde im rekonstituierten, vesikulären CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe der angegebenen Konzentrationen (10^{-6} M) von in Kalium-Hepes-Puffer gelöstem Palmitoyl-L-Carnitin bei konstanter Substratkonzentration ($[1 \mu\text{M}]$) bestimmt (■). Die Enzymaktivität A in spezifischer Aktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Fluorescein} \times \text{nmol CYP3A4}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

100% entspricht der gemessenen Enzymaktivität ohne Lipid.

Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen. Die entsprechenden Einzelmesswerte sind durch Fehlerbalken dargestellt. Bei sehr geringem Abstand der Einzelmesswerte konnte graphisch nur der Mittelwert dargestellt werden.

Palmitoyl-L-Carnitin, eine als Zwischenprodukt der mitochondrialen Fettsäureoxidation bekannte C_{16} -Fettsäure mit Carnitinkopfgruppe (Strukturformel: siehe Anhang A), zeigt eine Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität.

Der IC_{50} liegt bei ca. $6 \mu\text{M}$.

3.2.1.5 L- α -Lysophosphatidylinositol

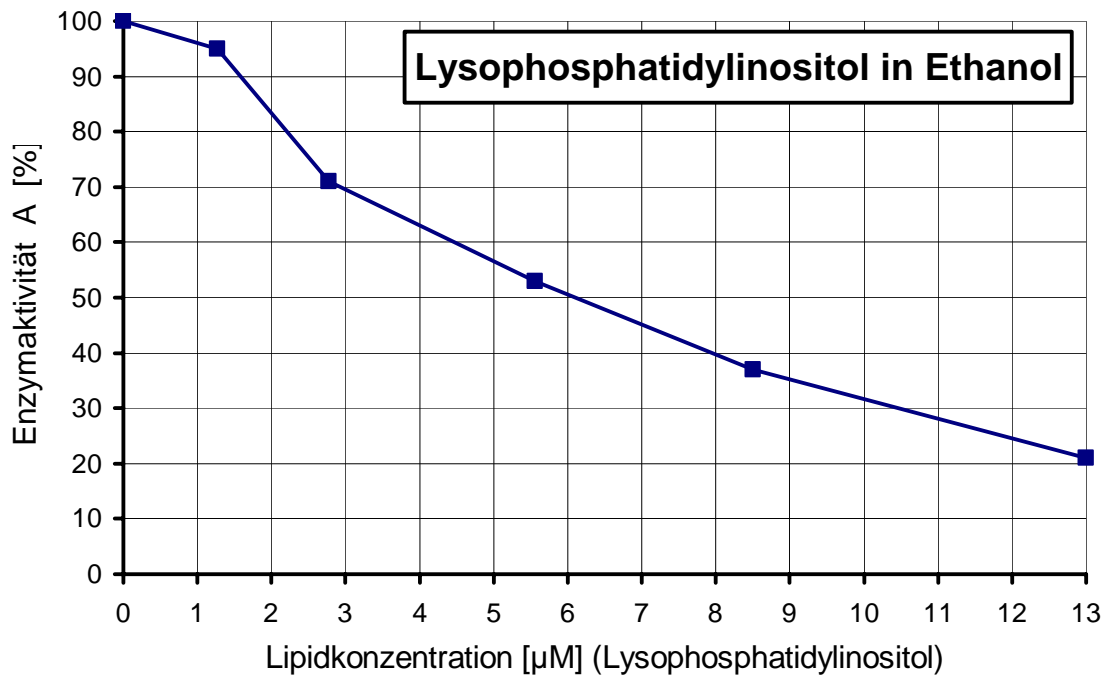


Abb. 10: Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität durch L- α -Lysophosphatidylinositol

Die Debenzylierung von Dibenzylfluorescein wurde im rekonstituierten, vesikulären CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe der angegebenen Konzentrationen (10^{-6} M) von in Ethanol gelöstem L- α -Lysophosphatidylinositol bei konstanter Substratkonzentration ($[1 \mu\text{M}]$) bestimmt (■).

Die Enzymaktivität A in spezifischer Aktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Fluorescein} \times \text{nmol CYP3A4}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

100% entspricht der gemessenen Enzymaktivität ohne Lipid.

Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen. Die entsprechenden Einzelmesswerte sind durch Fehlerbalken dargestellt. Bei sehr geringem Abstand der Einzelmesswerte konnte graphisch nur der Mittelwert dargestellt werden.

L- α -Lysophosphatidylinositol, ein Lysophospholipid mit C_{18} -Seitenkette und Inositol als Alkohol (Strukturformel: siehe Anhang A), zeigt eine Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität.

Der IC_{50} liegt bei ca. $6 \mu\text{M}$.

3.2.1.6 Ölsäure

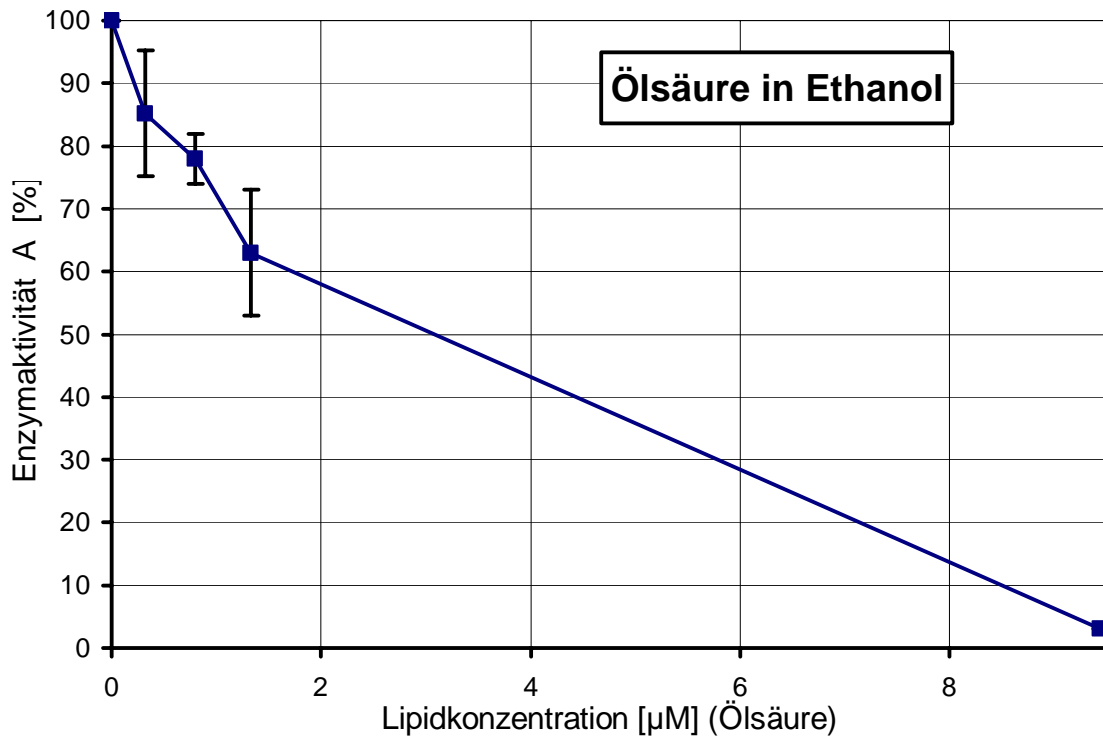


Abb. 11: Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität durch Ölsäure

Die Debenzylierung von Dibenzylfluorescein wurde im rekonstituierten, vesikulären CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe der angegebenen Konzentrationen (10^{-6} M) von in Ethanol gelöster Ölsäure bei konstanter Substratkonzentration ($[1 \mu\text{M}]$) bestimmt (■).

Die Enzymaktivität A in spezifischer Aktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Fluorescein} \times \text{nmol CYP3A4}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

100% entspricht der gemessenen Enzymaktivität ohne Lipid.

Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen. Die entsprechenden Einzelmesswerte sind durch Fehlerbalken dargestellt. Bei sehr geringem Abstand der Einzelmesswerte konnte graphisch nur der Mittelwert dargestellt werden.

Ölsäure (cis-9-Octadecensäure), ein C_{18} -Fettsäure mit einer Doppelbindung (Strukturformel: siehe Anhang A), zeigt eine Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität.

Der IC_{50} liegt bei ca. $3 \mu\text{M}$.

3.2.1.7 2-Monooleoylglycerol

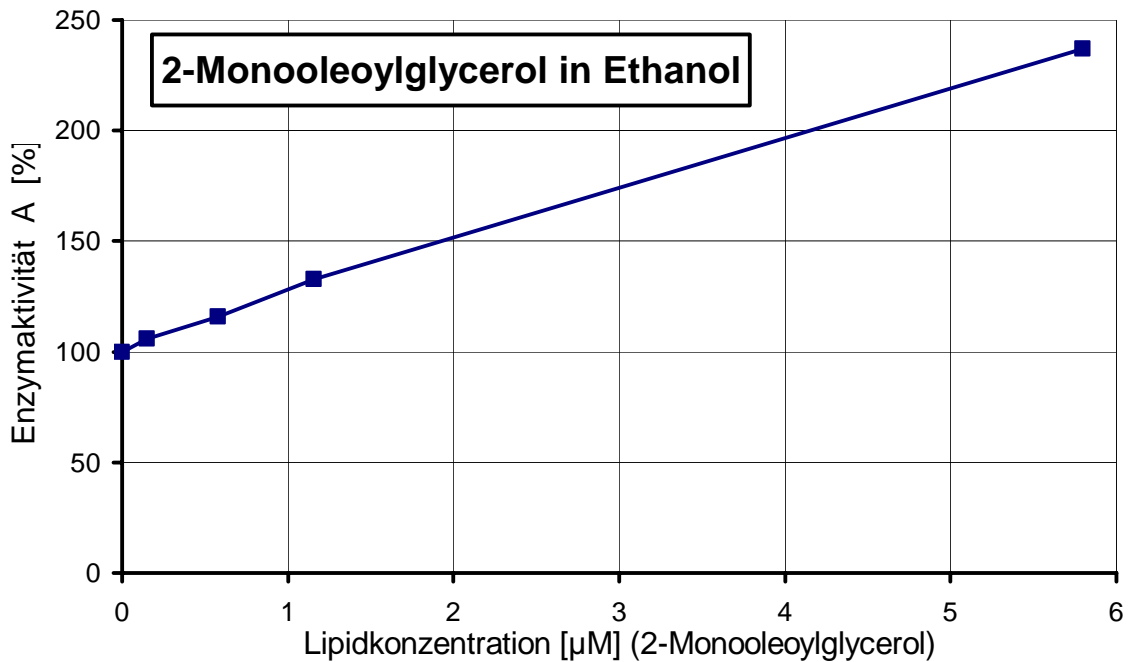


Abb. 12: Aktivierung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität durch 2-Monooleoylglycerol

Die Debenzylierung von Dibenzylfluorescein wurde im rekonstituierten, vesikulären CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe der angegebenen Konzentrationen (10^{-6} M) von in Ethanol gelöstem 2-Monooleoylglycerol bei konstanter Substratkonzentration ($[1 \mu\text{M}]$) bestimmt (■).

Die Enzymaktivität A in spezifischer Aktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Fluorescein} \times \text{nmol CYP3A4}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

100% entspricht der gemessenen Enzymaktivität ohne Lipid.

Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen. Die entsprechenden Einzelmesswerte sind durch Fehlerbalken dargestellt. Bei sehr geringem Abstand der Einzelmesswerte konnte graphisch nur der Mittelwert dargestellt werden.

2-Monooleoylglycerol (2-Monoolein), Ölsäure (C_{18}) mit einer Glycerolkopfgruppe (Strukturformel: siehe Anhang A), zeigt eine Steigerung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität.

Der AC_{50} liegt bei ca. $1,9 \mu\text{M}$.

3.2.1.8 L- α -Lysophosphatidylcholin

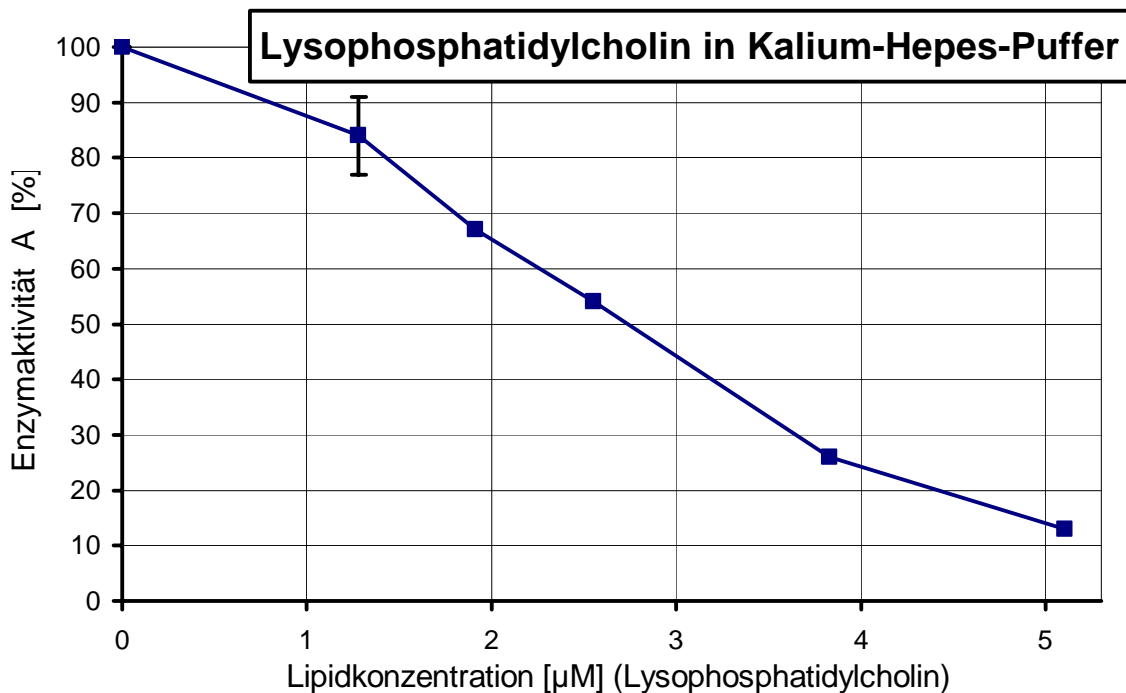


Abb. 13: Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität durch L- α -Lysophosphatidylcholin

Die Debenzylierung von Dibenzylfluorescein wurde im rekonstituierten, vesikulären CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe der angegebenen Konzentrationen (10^{-6}M) von in Kalium-Hepes-Puffer gelöstem L- α -Lysophosphatidylcholin bei konstanter Substratkonzentration ($[1\ \mu\text{M}]$) bestimmt (■).

Die Enzymaktivität A in spezifischer Aktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Fluorescein} \times \text{nmol CYP3A4}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

100% entspricht der gemessenen Enzymaktivität ohne Lipid.

Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen. Die entsprechenden Einzelmesswerte sind durch Fehlerbalken dargestellt. Bei sehr geringem Abstand der Einzelmesswerte konnte graphisch nur der Mittelwert dargestellt werden.

L- α -Lysophosphatidylcholin (L- α -Lysolecithin, 1-Acyl-sn-glycero-3-phosphocholin), ein Lysophospholipid mit einer C_{18} -Seitenkette und Cholin als Alkohol (Strukturformel: siehe Anhang A), zeigt eine Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität.

Der IC_{50} liegt bei ca. $2,7\ \mu\text{M}$.

3.2.1.9 Arachidonsäure

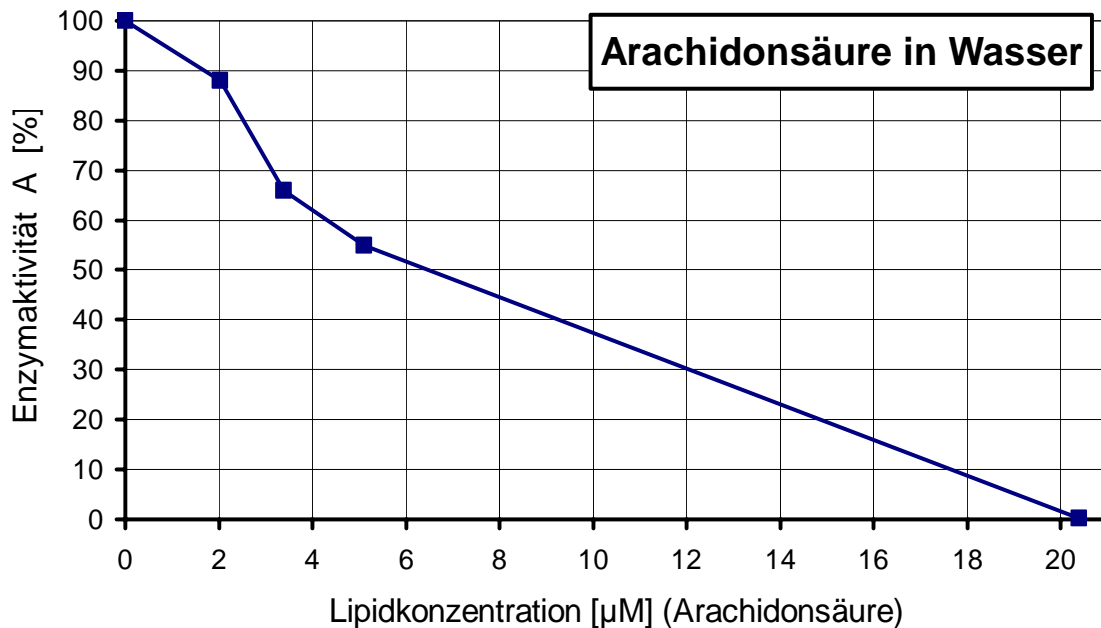


Abb. 14: Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität durch Arachidonsäure

Die Debenzylierung von Dibenzylfluorescein wurde im rekonstituierten, vesikulären CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe der angegebenen Konzentrationen (10^{-6} M) von in Wasser gelöster Arachidonsäure bei konstanter Substratkonzentration ($[1 \mu\text{M}]$) bestimmt (■).

Die Enzymaktivität A in spezifischer Aktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Fluorescein} \times \text{nmol CYP3A4}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

100% entspricht der gemessenen Enzymaktivität ohne Lipid.

Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen. Die entsprechenden Einzelmesswerte sind durch Fehlerbalken dargestellt. Bei sehr geringem Abstand der Einzelmesswerte konnte graphisch nur der Mittelwert dargestellt werden.

Arachidonsäure (5,8,11,14-Eicosatetraensäure), eine C_{20} -Fettsäure mit 4 Doppelbindungen (Strukturformel: siehe Anhang A), zeigt eine Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität.

Der IC_{50} liegt bei ca. $6 \mu\text{M}$.

3.2.1.10 Phytansäure

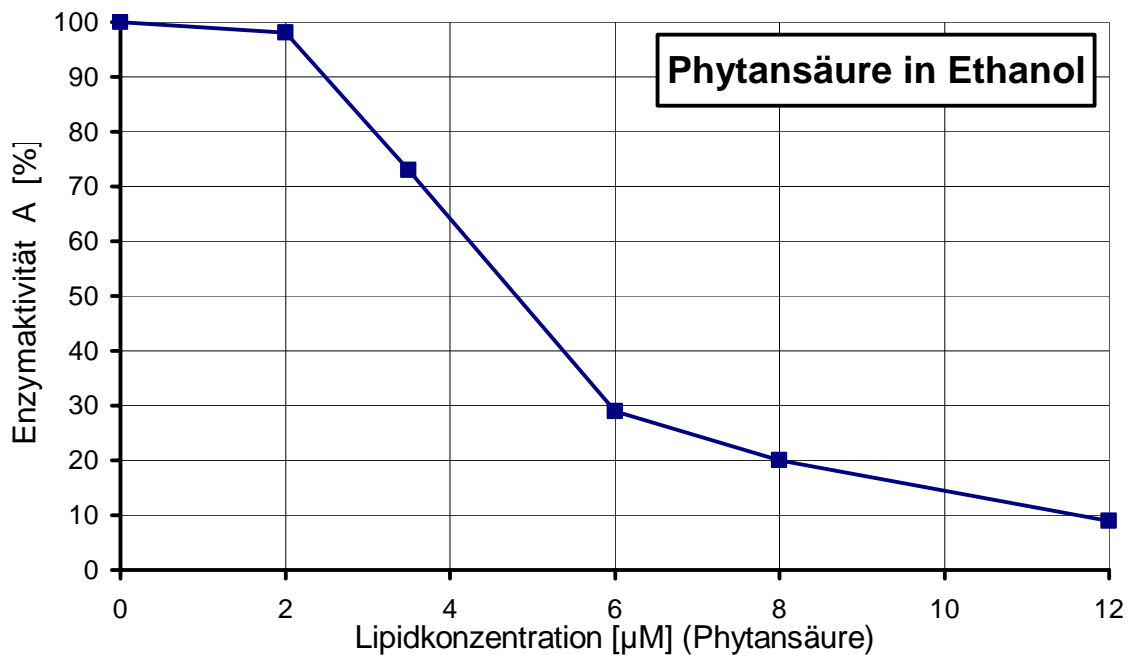


Abb. 15: Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität durch Phytansäure

Die Debenzylierung von Dibenzylfluorescein wurde im rekonstituierten, vesikulären CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe der angegebenen Konzentrationen (10^{-6} M) von in Ethanol gelöster Phytansäure bei konstanter Substratkonzentration ($[1 \mu\text{M}]$) bestimmt (■).

Die Enzymaktivität A in spezifischer Aktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Fluorescein} \times \text{nmol CYP3A4}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

100% entspricht der gemessenen Enzymaktivität ohne Lipid.

Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen. Die entsprechenden Einzelmesswerte sind durch Fehlerbalken dargestellt. Bei sehr geringem Abstand der Einzelmesswerte konnte graphisch nur der Mittelwert dargestellt werden.

Phytansäure (3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure), eine C_{20} -Fettsäure (Strukturformel: siehe Anhang A), zeigt eine Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität.

Der IC_{50} liegt bei ca. $5 \mu\text{M}$.

3.2.2 Protokoll zur Bestimmung des Hemmtyps unter optimalen Bedingungen

Von der 10^{-3} M Dibenzylfluorescein-Stammlösung wurden jeweils vor Versuchsbeginn fünf Verdünnungen hergestellt, und auf $+37^{\circ}$ Celsius temperiert.

Tabelle 1: Zur Bestimmung des Hemmtyps hergestellte Verdünnungen der Dibenzylfluorescein-Stammlösung

Verdünnung	Anteile Dibenzylfluorescein- Stammlösung (10^{-3} M)	Anteile Acetonitril	Anteile Kalium-Hepes-Puffer (10^{-1} M, pH 7,6)
1	11	0	9
2	9	1	10
3	3	2	5
4	9	11	20
5	9	31	40

Mit folgendem Ansatz wurde bei konstanter Lipidkonzentration die Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität mit jeder der 5 Verdünnungen getestet:

Jeder 590 μ l Ansatz enthielt 2 μ l verdünnte Dibenzylfluorescein-Stammlösung (Konzentration im Ansatz: 0,375-1,83 μ M), 4 μ l rekonstituiertes, vesikuläres CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System, X μ l gelöstes Lipid (X steht für das konstante Volumen der Lipidlösung), 20 μ l $MgCl_2$ -Lösung (10^{-1} M), 564 – X μ l Kalium-Hepes-Puffer (10^{-1} M, pH 7,6). In dieser Reihenfolge wurden die Substanzen in die Küvette pipettiert und bei $+37^{\circ}$ Celsius 4 Minuten inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 10 μ l NADPH-Lösung (10^{-2} M) gestartet. Nach 5 Minuten wurde zweimal mit 10 μ l Fluorescein-Lösung (10^{-5} M in Kalium-Hepes-Puffer, 10^{-1} M, pH 7,6) geeicht.

Die Fluoreszenzintensität wurde bei einer Absorptionswellenlänge von 491 nm und einer Emissionswellenlänge von 518 nm gemessen und aufgezeichnet. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität wurde über die Reaktionsdauer gemittelt und die spezifische Aktivität berechnet.

Die unter 3.2.2.1 bis 3.2.2.2 dargestellten Daten wurden wie oben beschrieben ermittelt.

3.2.2.1 Ölsäure

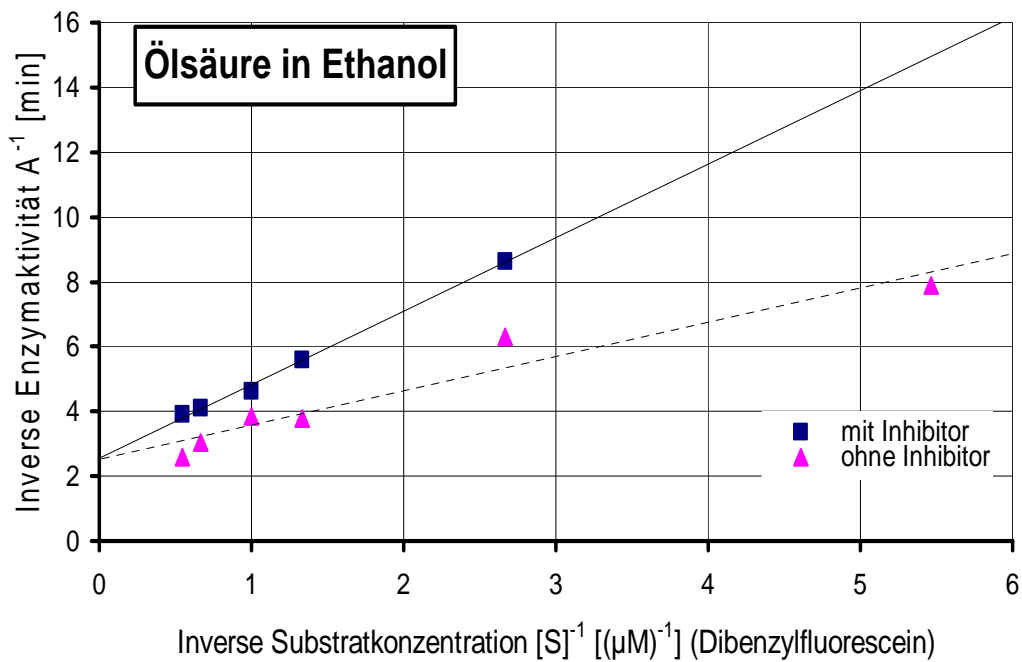


Abb. 16: Kompetitive Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität durch Ölsäure

Die Debenzylierung von Dibenzylfluorescein wurde im rekonstituierten, vesikulären CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von $0,786 \mu\text{M}$ in Ethanol gelöster Ölsäure bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt (■). Ferner ist die Aktivität ohne Hemmstoff eingezeichnet (▲).

Maximale Enzymaktivität $A_{\text{max}} = 0,4 \text{ [min}^{-1}]$. $K_m = 0,42 \text{ [}\mu\text{M}]$. $K_s^0 = 0,89 \text{ [}\mu\text{M}]$

Die Enzymaktivität in spezifischer Aktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Fluorescein} \times \text{nmol CYP3A4}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen. Die entsprechenden Einzelmesswerte sind durch Fehlerbalken dargestellt. Bei sehr geringem Abstand der Einzelmesswerte konnte graphisch nur der Mittelwert dargestellt werden.

Ölsäure zeigt eine kompetitive Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität. Bei gleichbleibender A_{max} von $0,4 \text{ [min}^{-1}]$ zeigt sich eine Verschiebung von K_s^0 .

Der aus der Geraden errechnete K_I Wert liegt bei $1,49 \mu\text{M}$ ($A_{\text{max}} = 0,4 \text{ [min}^{-1}]$; $K_m = 0,42$).

3.2.2.2 L- α -Lysophosphatidylcholin

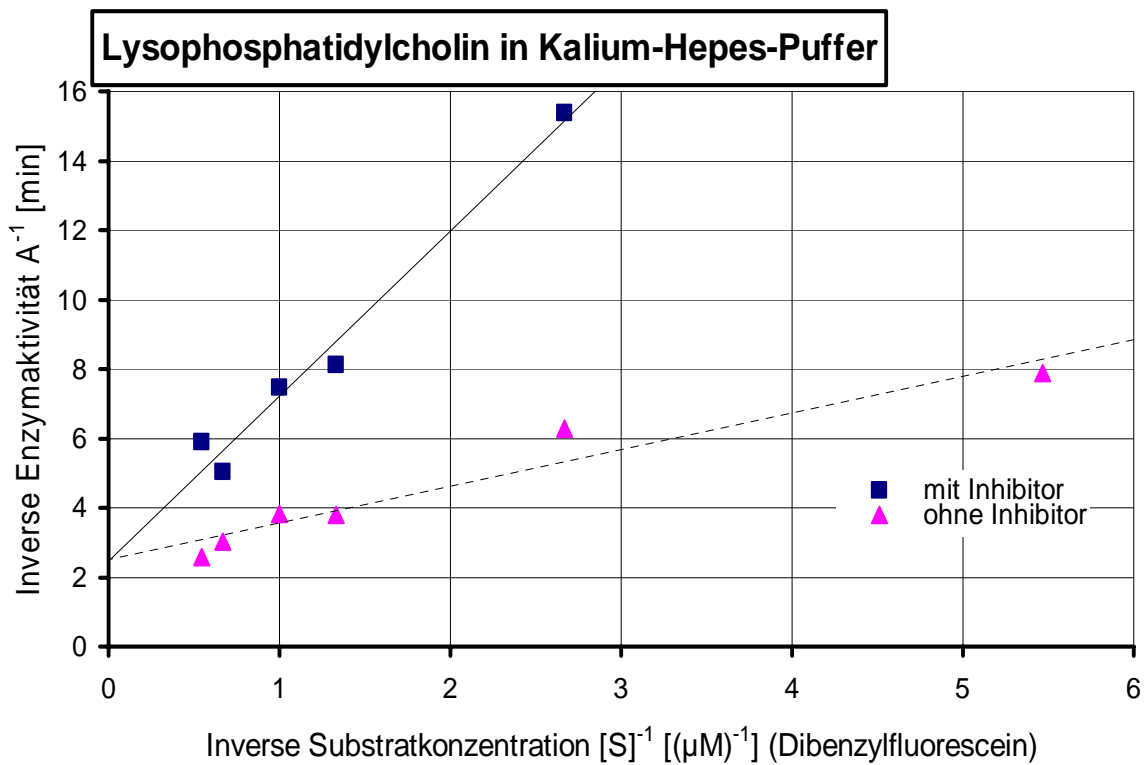


Abb. 17: Kompetitive Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität durch L- α -Lysophosphatidylcholin

Die Debenzylierung von Dibenzylfluorescein wurde im rekonstituierten, vesikulären CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von 2,17 μM in Kalium-Hepes-Puffer gelöstem L- α -Lysophosphatidylcholin bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt (■). Ferner ist die Aktivität ohne Hemmstoff eingezeichnet (▲).

Maximale Enzymaktivität $A_{\text{max}} = 0,4$ [min^{-1}]. $K_m = 0,42$ [μM]. $K_S^0 = 1,9$ [μM]

Die Enzymaktivität in spezifischer Aktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Fluorescein} \times \text{nmol CYP3A4}^{-1} \times \text{min}^{-1}$.

Die angegebenen Werte sind jeweils Mittelwerte aus zwei Messungen. Die entsprechenden Einzelmesswerte sind durch Fehlerbalken dargestellt. Bei sehr geringem Abstand der Einzelmesswerte konnte graphisch nur der Mittelwert dargestellt werden.

L- α -Lysophosphatidylcholin zeigt eine kompetitive Hemmung der Dibenzylfluorescein-Debenzylierungs-Aktivität. Bei gleichbleibender A_{max} von 0,4 [min^{-1}] zeigt sich eine Verschiebung von K_S^0 .

Der aus der Geraden errechnete K_I Wert liegt bei 2,79 μM ($A_{\text{max}} = 0,4$ [min^{-1}]; $K_m = 0,42$).

Tabelle 2: Zusammenfassung des Einflusses einkettiger Lipide auf CYP3A4

Einkettige Fettsäure	<i>Wirkung</i>	IC_{50} [μM]	AC_{50} [μM]	A_{Max} [min] ⁻¹	K_S [μM]	$K_I^{(c)}$ [μM]
Lauroylcarnitin	Aktivierung	-	20	-	-	-
Myristoylcarnitin	Inhibition	25	-	-	-	-
2-Monopalmitoylglycerol	Aktivierung	-	7,5	-	-	-
Palmitoyl-L-Carnitin	Inhibition	6	-	-	-	-
L- α -Lysophosphatidylinositol	Inhibition	6	-	-	-	-
Ölsäure	Inhibition	3	-	0,4	0,89	1,49
2-Monooleoylglycerol	Aktivierung	-	1,9	-	-	-
L- α -Lysophosphatidylcholin	Inhibition	2,7	-	0,4	1,9	2,79
Arachidonsäure	Inhibition	6	-	-	-	-
Phytansäure	Inhibition	5	-	-	-	-

- AC_{50} Die Konzentration eines Aktivators, die zur Steigerung der Enzymaktivität um 50% nötig ist
- A_{Max} Maximale spezifische Aktivität
- IC_{50} Die Konzentration eines Inhibitors, die zur Halbierung der Enzymaktivität nötig ist
- K_S Scheinbare Michaelis-Menten-Konstante, K_S^0
- $K_I^{(c)}$ Dissoziationskoeffizient, K_I

4. Diskussion

Einkettige Lipide sind uns als essentielle Nahrungsbestandteile, Energiespeicher und Vorläufer von Signalmolekülen vertraut. Wenig bekannt hingegen ist der Einfluss einkettiger Fettsäuren auf das Monooxygenasesystem der Humanleber. Deswegen wurde in dieser Arbeit der Einfluss prominenter Vertreter der einkettigen Lipide auf CYP3A4 mit einer optimierten fluoreszenzspektroskopischen Methode untersucht.

Bei der Auswahl der Lipide wurde darauf geachtet, Kettenlänge, Kopfgruppe und Sättigungsgrad zu variieren, da diese Faktoren für die biologische Wirkung eines Lipids entscheidend sind. Des Weiteren war wichtig, dass sämtliche untersuchte Lipide im physiologischen Intermediärstoffwechsel vorkommen.

4.1 Die Methode

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode basiert auf dem von Miller et al. [2000] vorgestellten Verfahren. Bei der Weiterentwicklung des Testsystems wurde der Zusammensetzung des Inkubationspuffers besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Es ist bekannt, dass diese sowohl das Verhalten des Enzyms CYP3A4, als auch die Konformation seines aktiven Zentrums beeinflusst. Die entwickelten Protokolle respektieren die bezüglich der Magnesium-, Acetonitril- und Ethanolkonzentration als unbedenklich anerkannten Höchstgrenzen [7, 9, 35, 50].

In der Literatur ist das Absorptionsmaximum von Fluorescein mit 492 nm, und sein Emissionsmaximum mit 523 nm Wellenlänge angegeben. Diese Werte stimmen mit den unter optimalen Versuchsbedingungen gemessenen Absorptions- und Fluoreszenzspektren von Fluorescein überein. Des Weiteren bestätigte sich, dass im Verlauf der durch CYP3A4 katalysierten Reaktion Fluorescein entsteht, wie die Zunahme der Amplitude bei 523 nm Wellenlänge des wiederholt während der Reaktion aufgenommenen Emissionsspektrums zeigt. Die Umsetzung von Dibenzylfluorescein zu Fluorescein ist nachweislich an die Anwesenheit von CYP3A4 gebunden; sie findet ohne Enzym nicht statt. Da zudem ein linearer Zusammenhang zwischen der Fluoresceinkonzentration und der gemessenen Fluoreszenzintensität besteht, wurde der weiterentwickelte fluorometrische Test zur Bestimmung des Einflusses einkettiger Lipide auf ein rekonstituiertes, vesikuläres CYP3A4:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase System eingesetzt. Der Einsatz dieses rekonstituierten Monooxygenasesystems der Humanleber ermöglichte klare Ergebnisse,

die mit Verwendung von Mikrosomenfraktionen, Zellen oder Lebergewebsschnitten unmöglich gewesen wären, da dort eine Vielzahl von Enzymen und Proteinen das Verhalten einkettiger Lipide beeinflussen kann.

Die ermittelten **AC₅₀-Werte** sind dennoch nur eingeschränkt aussagekräftig, da im Falle einer Aktivierung die spezifische Aktivität bei der durch die Löslichkeitsgrenze vorgegebenen maximalen Lipidkonzentration gemessen wurde. Somit ist es denkbar, dass der AC₅₀ *in vivo* über dem hier vorgestellten Wert liegt.

Auch für die im Folgenden vorgestellten **IC₅₀-Werte** gilt eine Einschränkung: Es muss berücksichtigt werden, dass es sich beim verwendeten Substrat um Dibenzylfluorescein handelt. Dies ist wichtig, da von Kenworthy et al. [1999] gezeigt wurde, dass die bei *in vitro* Studien zur Inhibition von CYP3A4 ermittelten IC₅₀-Werte vom verwendeten Substrat abhängen. Stresser et al. [2000] stellten einen analogen Vergleich mit vier fluorogenen Substraten und 21 bekannten Inhibitoren an. Wieder zeigte sich, dass die für eine Substanz X ermittelte Hemmwirkung vom verwendeten Substrat abhängt. Die Korrelation der mit den fluorogenen Substraten erzielten Ergebnisse lag zwischen 80 und 85%. Im Rahmen dieser Studie wurde auch das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Substrat Dibenzylfluorescein untersucht, und mit den Nachweismethoden Nifedipin-oxidasetest, Testosteron 6 β -Hydroxilierung und Midazolamhydroxilierung verglichen. Dabei wurden die Korrelationskoeffizienten 0.71, 0.9 und 0.89 errechnet [57]. Beim Vergleich der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten IC₅₀-Werte mit Ergebnissen, die durch Anwendung anderer Substrate erzielt wurden, müssen diese Korrelationskoeffizienten im Sinne von Korrekturfaktoren unbedingt berücksichtigt werden.

Zur Absicherung der hier ermittelten Werte bietet es sich an, die IC₅₀-Werte der in dieser Arbeit untersuchten Lipide erneut mit anderen Substraten zu bestimmen. Wie Thummel und Wilkinson [1998] ausführen, wäre die Durchführung einer *in vivo* Studie jedoch sinnvoller als die mehrfache Bestimmung von IC₅₀-Werten. Da *in vitro* Experimente nie alle intrazellulär relevanten Faktoren berücksichtigen können, reicht ihre Aussagekraft auch nach mehrfacher Wiederholung bestenfalls dafür aus, Anhaltspunkte bzw. Richtungsweiser für klinische Studie zu sein. Die in dieser Arbeit dokumentierte Aussage, dass einkettige Lipide bereits in mikromolaren Konzentrationen die Aktivität von CYP3A4 modulieren, ist demnach wichtiger als der exakte IC₅₀-Wert des einzelnen Lipids.

4.2 Lauroylcarnitin, Myristoylcarnitin, Palmitoylcarnitin: Einfluss der Kettenlänge

Die Kettenlängen der untersuchten Fettsäuren bewegen sich zwischen 12 und 20 Kohlenstoffatomen, was dem Bereich der größten biologischen Wirkung zu entsprechen scheint [47, 71].

Durch einen Vergleich der Wirkungen von **Lauroylcarnitin**, **Myristoylcarnitin** und **Palmitoylcarnitin** auf CYP3A4 lässt sich die Bedeutung der Kettenlänge aufzeigen. Als Derivate der gesättigten Fettsäuren Laurinsäure (C₁₂), Myristinsäure (C₁₄) und Palmitinsäure (C₁₆) unterscheiden sie sich bei identischer Kopfgruppe lediglich in der Länge ihres Lipidrests.

Während Palmitoylcarnitin (Rest: C₁₆) mit einem IC₅₀ von 6 µM ein starker Inhibitor ist, weist Myristoylcarnitin (Rest: C₁₄) mit einem IC₅₀ von 25 µM eine ca. 4-fach schwächere Potenz auf. Lauroylcarnitin hingegen, dessen Lipidrest mit 12 Kohlenstoffatomen der Kürzeste ist, wirkt nicht mehr als Inhibitor, sondern als Aktivator. Die von Müller-Enoch et al. [2001] an CYP2B1 der Rattenleber für Laurinsäure, Myristinsäure und Palmitoylcarnitin bestimmten Dissoziationskoeffizienten bestätigen die mit Kettenlänge zunehmende Hemmwirkung. Vermutlich steht sie mit dem Zugang des Substrats zum aktiven Zentrum in Verbindung. Das würde auch die Aktivierung durch Lauroylcarnitin erklären: Während das lange Palmitoylcarnitin den Weg zum aktiven Zentrum versperrt, ist das kurze Lauroylcarnitin der Interaktion von Substrat und Enzymkomplex förderlich. Nach Korzekwa et al. [1998] entspricht dies einer „heterotropisch positiven Kooperativität“ genannten atypischen Enzymkinetik, welche auf der gleichzeitigen Bindung zweier Substratmoleküle am aktiven Zentrum beruht.

Auch bei anderen Enzymen fiel der Trend einer mit der Länge des gesättigten Lipidrests korrelierenden Inhibition auf. Imamura et al. [1999] fanden ihn bei Untersuchung der kardialen Carbonylreduktase. Die Aktivierung durch Laurinsäure bestätigt sich ebenfalls bei anderen Enzymsystemen, so zum Beispiel bei der kardialen Hexokinase [56].

Die im Plasma von Gesunden bestimmten Spiegel von Laurinsäure und Myristinsäure liegen mit 0,3 µM und 5 µM unterhalb der für ihre Carnitin-Derivate ermittelten AC₅₀- bzw. IC₅₀-Werte von 20 µM bzw. 25 µM [26, 52]. Beide Lipide werden aber derzeit als Therapeutika diskutiert. So sollen Laurin- und Myristinsäure das Wachstum oraler Bakterienstämme hemmen, und Laurinsäure gegen *Helicobacter pylori* wirksam sein [51, 58]. Unter Therapie mit den Fettsäuren könnte der Plasmaspiegel die AC₅₀- bzw. IC₅₀-Werte erreichen. Die hier dokumentierten Ergebnisse lassen auf eine daraus resultierende Beeinträchtigung des Cytochrom P450-Systems schließen.

Die Palmitinsäurekonzentration im Blutplasma liegt mit 25 μM jedoch auch beim Gesunden über dem bei 6 μM festgelegten IC_{50} [26]. Damit stellt sich die Frage, wie hoch der intrazelluläre Spiegel an freier Palmitinsäure ist. Die Literatur kann zu diesem Zeitpunkt keine Antwort geben. Die Hoffnung ruht auf dem als „Lipidomics“ bezeichneten, schnell wachsenden Forschungszweig, der mit ausgefeilten Arbeitsmethoden derzeit versucht, *in vivo* Lipidkonzentrationen zu ermitteln [19].

4.3 Monopalmitoylglycerol und Monooleoylglycerol: Einfluss der Kopfgruppe

Der Einfluss der Kopfgruppe lässt sich an **2-Monopalmitoylglycerol** und **2-Monooleoylglycerol** zeigen, den mit Glycerol veresterten Fettsäuren Palmitin- und Ölsäure. Ausgehend von dem für Palmitoylcarnitin bestimmten IC_{50} von 6 μM überrascht die Tatsache, dass 2-Monopalmitoylglycerol aktivierend auf CYP3A4 wirkt. Da aber auch 2-Monooleoylglycerol CYP3A4 aktiviert, für **Ölsäure** jedoch ein IC_{50} von 3 μM bestimmt wurde, wird der Einfluss der Kopfgruppe offensichtlich.

Die Kopfgruppen von 2-Monopalmitoylglycerol und 2-Monooleoylglycerol weisen durch die Verknüpfung der Säure mit Glycerol eine Esterbindung auf. Damit sind die Moleküle ungeladen, und zugleich lipophiler als Palmitoylcarnitin und Ölsäure. Im Unterschied dazu ist die Kopfgruppe von Palmitoylcarnitin amphiphil, das Molekül ist ein Zwitterion. Die sich in Abhängigkeit vom pH-Wert ändernde Ladung der Ölsäure macht das Molekül hydrophil.

Durch eine lipophile Kopfgruppe wird also der hemmende Einfluss eines einkettigen Lipids auf CYP3A4 abgeschwächt, während er durch eine hydrophile Kopfgruppe verstärkt wird. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von Robert Fintelmann für CYP2B1 ermittelten [12].

4.4 Ölsäure und Arachidonsäure: Einfluss des Sättigungsgrads

Doppelbindungen scheinen für die biologische Wirksamkeit von Bedeutung zu sein. So ergaben Untersuchungen an Hyaluronidase, Chondroitinase, Topoisomerase und kardialer Hexokinase, dass einfach ungesättigte Fettsäuren diese Enzyme stärker hemmen als gesättigte Fettsäuren [56, 60, 61]. In dieser Arbeit vertritt das eben diskutierte **2-Monooleoylglycerol** zusammen mit **Ölsäure** und **Arachidonsäure** die Gruppe der ungesättigten Lipide.

Mountfield et al. [2000] untersuchten eine Reihe von Chemikalien, die oft als Hilfsstoffe bei der galenischen Aufbereitung von Arzneimitteln eingesetzt werden. Dabei fiel auf, dass CYP3A4 durch **Ölsäure** gehemmt wird. Auf Grund des IC_{50} von 2 mM maßen sie dem Resultat jedoch keine Bedeutung zu. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine Hemmung von CYP3A4 durch Ölsäure ermittelt, der IC_{50} lag jedoch bei 3 μ M, und damit unter der im Plasma von Gesunden vorliegenden Ölsäurekonzentration von 27 μ M [26]. Dieses bedeutsame Resultat wirft die Frage auf, wie hoch der intrazelluläre Spiegel freier Ölsäure ist.

Der Unterschied zwischen dem von Mountfield et al. [2000] erarbeiteten, und dem in dieser Arbeit vorgestellten IC_{50} muss unter Berücksichtigung des verwendeten Substrats betrachtet werden. Während Mountfield et al. [2000] mit 7-Benzylloxy-4-(trifluoromethyl)-Coumarin arbeiteten, wurde hier Dibenzylfluorescein verwendet. Es wurde bereits diskutiert, wie sich das Substrat auf den ermittelten IC_{50} auswirken kann [57]. Davon abgesehen kann jedoch die Hemmung von CYP3A4 durch Ölsäure, deren Mechanismus mit einem $K_I^{(c)}$ von 1,49 μ M als kompetitiv identifiziert werden konnte, als gesichert gelten.

Der **Arachidonsäure** kommt als Muttersubstanz sämtlicher Eikosanoide eine herausragende Bedeutung für Homöostase und Entzündungsreaktionen im menschlichen Organismus zu [13]. Bylund et al. [1998] wiesen darauf hin, dass Arachidonsäure ein Substrat von CYP3A4 ist. Deswegen kann davon ausgegangen werden, dass der in dieser Arbeit bestimmte IC_{50} von 6 μ M auf Grund einer kompetitiven Hemmung zustande kam.

Von Yamazaki und Shimada [1999] liegen ebenfalls Ergebnisse vor, die eine Inhibition von CYP3A4 durch Arachidonsäure belegen. Mit dem Nifedipinoxidasetest ermittelten sie eine 40% Aktivitätsminderung bei einer Arachidonsäurekonzentration von 50 μ M. Der in der vorliegenden Arbeit bestimmte IC_{50} von 6 μ M ist jedoch um das zehnfache niedriger. Es ist davon auszugehen, dass die Differenz auf Verwendung unterschiedlicher NADPH-P450-Reduktase Enzyme beruht. Während Yamazaki und Shimada [1999] die des Kaninchens verwendeten, kam in dieser Arbeit die humane Form zum Einsatz. Müller-Enoch und Gruler [2000] konnten zeigen, dass sich die NADPH-P450-Reduktase des Kaninchens und die des Menschen auf Grund unterschiedlicher Aminosäuresequenzen in der N-terminalen membranbindenden Domäne in ihrer Affinität zum humanen CYP3A4 unterscheiden, was die Dissoziationskonstante um den Faktor 15 verändert. Der in dieser Arbeit ermittelte IC_{50} kommt demnach dem für den Menschen zutreffenden Wert näher.

Von Relevanz könnte die Inhibition von CYP3A4 durch Arachidonsäure bei Stressreaktionen sein. Evans et al. [2001] berichten, dass die zytosolische Phospholipase (Typ IV), deren Aufgabe die Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranen ist, durch zellspezifische Vorgänge in das endoplasmatische Retikulum transloziert werden kann. Durch unmittelbare Nähe zu den ebenfalls dort lokalisierten Cytochrom P450-Monooxygenasen könnte somit der Arachidonsäurespiegel trotz Einwirkung der ebenfalls in der Membran des glatten endoplasmatischen Retikulums gelegenen Enzyme COX1 und COX2 lokal kurzfristig stark ansteigen, und so CYP3A4 inhibieren [54].

4.5 Die Lysophospholipide Lysophosphatidylcholin und Lysophosphatidylinositol

Das auch **Lysolecithin** genannte **Lysophosphatidylcholin** ist ein Lysophospholipid mit einer gesättigten C₁₈-Seitenkette. Es entsteht durch die Einwirkung der Enzyme Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT) und Phospholipase A₂ (PLA₂) auf Phosphatidylcholin. Lysophosphatidylcholin ist als möglicher Faktor in der Pathogenese der Artherosklerose und des systemischen Lupus Erythematoses im Gespräch [30, 34].

Darüber hinaus ist Lysophosphatidylcholin für die Krebsforschung interessant, in der seit einiger Zeit mit der zytostatischen und zytotoxischen Wirkung von Lysophospholipiden experimentiert wird [2, 4]. Dabei standen Analoga von Lysophosphatidylcholin lange im Mittelpunkt des Interesses [21]. Der Nutzen des als Edelfosine[®] bekannten 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-Phosphocholin (ET-18-OCH₃) zur Befreiung autologer Knochenmarkstransplantate von Krebszellen wird inzwischen in klinischen Studien getestet [1, 73, 29]. Ein weiteres Alkylphosphocholin, das Hexadecylphosphocholin, ist in Deutschland bereits als Miltex[®] zur Behandlung bösartiger Hautveränderungen bei Brustkrebs zugelassen. Neuste Ergebnisse versprechen zudem gute Erfolge bei der Behandlung der gefährlichen viszeralen Leishmaniose [59]. Bislang ungelöst ist jedoch die Frage, auf welchen Mechanismen die zytostatisch-zytotoxische Wirkung der Alkylphosphocholine beruht. Es werden eine Reihe von Effekten diskutiert, seit Neuestem die Auslösung von Apoptose durch intrazelluläre Aktivierung von Fas/CD95 [14]. In dieser Arbeit wurde die kompetitive Inhibition von CYP3A4 durch den Prototyp aller Alkylphosphocholine, Lysophosphatidylcholin, dokumentiert. Da der $K_I^{(c)}$ mit 2,79 μM klein ausfällt, und der ermittelte IC₅₀ von 2,7 μM niedrig ist, kann von einer Beeinträchtigung des Cytochrom P450-Enzymsystems bei Behandlung mit Alkylphosphocholinen ausgegangen werden. Die sich in Folge der eingeschränkten

Elimination anreichernden Xenobiotika könnten zur zytostatisch-zytotoxischen Wirkung beitragen.

Lysophosphatidylinositol, ein Derivat von Phosphatidylinositol, besitzt als Lysophospholipid nur eine Fettsäurekette, die in der vorliegenden Arbeit 18 Kohlenstoffatome zählt. Lysophosphatidylinositol wurde untersucht, da Phosphatidylinositol eine herausragende Stellung unter den Phospholipiden einnimmt. Im Unterschied zu den Kopfgruppen anderer Phospholipide kann sein Inositolring reversibel an den Positionen 3', 4' und 5' phosphoryliert werden. Die Kombinatorik ermöglicht sieben verschiedene Botenstoffe, die als Phosphoinositide zusammengefasst werden. Der prominenteste ist sicher Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat: Die Phospholipase C macht aus ihm die intrazellulären Botenstoffe Inositol-1,4,5-triphosphat und Diacylglycerol, die eine zentrale Rolle in der über G-Proteine gesteuerten Signaltransduktion spielen. Doch auch die anderen sechs Phosphoinositide sind von Bedeutung. Ihnen wird eine Schlüsselrolle bei der Translokation von Proteinen zugeschrieben. Angesichts von 30.000 bis 40.000 menschlichen Genen ist dies eine wichtige Aufgabe. Exprimierte Proteine müssen zu funktionellen Komplexen zusammengesetzt, und an ihren Einsatzort transportiert werden. Bei einer Reihe von Proteinen wurden Domänen identifiziert, welche Phosphatidylinositol binden [49]. Diese Lipidmarkierung hilft bei einer Vielzahl zellulärer Prozesse, von der Exo- und Endozytose, über die Regulation von Wachstum und Genexpression bis zur Organisation des Zytoskeletts [24, 53].

Da Phosphatidylinositol-Kinasen auch im endoplasmatischen Retikulum nachgewiesen wurden, kann auf die Präsenz von Phosphoinositiden in unmittelbarer Nähe zu CYP3A4 geschlossen werden. Da der ermittelte IC_{50} von 6 μ M auch auf einer kompetitiven Hemmung beruhen kann, könnte CYP3A4 am Phosphatidylinositol-Stoffwechsel („PI-Turnover“) beteiligt sein.

4.6 Phytansäure

Phytansäure ist ein Oxidationsprodukt des Phytols, eines in großen Mengen in Milchprodukten, Fleisch und Fisch vorkommenden Hydrolyseproduktes des Chlorophyllmoleküls. Phytol wird vom menschlichen Metabolismus in Phytansäure (3,7,11,15-tetramethyl-Hexadecanoinsäure) umgewandelt [55]. Phytansäure wird in den Peroxisomen durch alpha- und beta-Oxidation abgebaut. Ist dieser Abbau gestört, manifestieren sich die Krankheiten Zellweger Syndrom, neonatale Adrenoleukodystrophie,

rhizomelische Chondrodysplasia punctuata und die (infantile) Refsum-Krankheit, die alle mit einer erhöhten Phytansäurekonzentration im Serum einhergehen [22, 70]

Ten Brink et al. [1992] ermittelten den Phytansäurespiegel im Plasma von Patienten, jedoch ohne Berücksichtigung der Faktoren Alter und Ernährungsgewohnheiten. Die Plasmaspiegel bewegten sich deutlich über dem in dieser Arbeit bestimmten IC_{50} von 5 μ M. Beispielsweise wurde bei einem 32-jährigen, an der Refsum-Krankheit erkrankten Patienten, ein Wert von 875 μ M gemessen. Die Beeinträchtigung der Biotransformation dieser Patienten scheint damit unumgänglich. Lemotte et al. [1996] stellten allerdings fest, dass Phytansäure den Transkriptionsfaktor Retinoid-X-Rezeptor alpha mit einer EC_{50} von 3 μ M aktiviert. Der von Kliewer et al. [1998] identifizierte Mechanismus, die Bindung des aktivierten Retinoid-X-Rezeptors an einen Promotor der CYP3A Gene und daraus resultierende Expression, erscheint somit Teil eines Regelkreises zu sein, der die Gesamtaktivität von CYP3A4 konstant hält. Bei Ratten konnte die vermehrte Expression von Cytochrom P450-Isoenzymen durch Behandlung mit Retinoid-X-Rezeptor Agonisten bereits bewiesen werden [23]. Sofern dieser Regelkreis auch beim Menschen existiert, kommt er wahrscheinlich auch beim Stoffwechselgesunden zum Tragen, bei dem sich der Phytansäurespiegel zwischen 1,9 und 39,9 μ M bewegt [20, 39, 48, 66, 69].

4.7 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden konnte, dass einkettige Lipide bereits in mikromolaren Konzentrationen die Aktivität von CYP3A4 modulieren. In welchem Maß dies in menschlichen Leber- und Darmzellen der Fall ist, hängt von der intrazellulären Konzentration der untersuchten Lipide und anderen, in dieser Arbeit nicht berücksichtigten intrazellulären Mechanismen ab.

Da bekannt ist, dass CYP3A4 an der Biotransformation von mehr als der Hälfte aller in der klinischen Praxis eingesetzten Arzneimittel beteiligt ist, verdienen potentielle Inhibitoren große Aufmerksamkeit. Bisher wurden neben Arzneimitteln und Chemikalien nur die Nahrungsbestandteile Ethanol und Grapefruit-Saft eingehend untersucht. Zukünftig sollte auch einkettigen Lipiden Beachtung geschenkt werden. Die hier gezeigte Beeinflussung der Aktivität des für den Menschen wichtigsten Enzyms der Cytochrom P450-Familie könnte für den Patienten eine veränderte Verfügbarkeit und Toxizität der ihm verabreichten Medikamente durch physiologisch relevante Fette bedeuten.

Zusammenfassung

Der Autor behandelt die Frage, welchen Einfluss einkettige Lipide auf das Monooxygenasesystem der Humanleber haben.

Dies wird an der für den Menschen wichtigsten Monooxygenase, dem Cytochrom P450-3A4 (CYP3A4), untersucht. Alle Experimente werden *in vitro* durchgeführt. Als Modell dient ein aus rekombinantem humanem CYP3A4, rekombinanter humaner Nikotin(säure)amid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Cytochrom P450-Reduktase (NADPH-Cytochrom P450-Reduktase) und Phospholipiden bestehendes vesikuläres Rekonstitutionssystem. Zur Aktivitätsbestimmung des Enzymsystems wird ein optimierter, direkter fluorometrischer Test eingesetzt, der auf der Umwandlung des fluorogenen Substrats Dibenzylfluorescein (DBF) in das fluorochrome Produkt Fluorescein basiert.

Für die inhibierenden Lipide Myristoylcarnitin (MyCa; Rest: C₁₄), Palmitoyl-L-carnitin (PaCa; Rest: C₁₆), L- α -Lysophosphatidylinositol (LPI; Rest: C₁₈), L- α -Lysophosphatidylcholin (LPC; Rest: C₁₈), Ölsäure (OA; C₁₈), Arachidonsäure (AA; C₂₀) und Phytansäure (PA; Rest: C₁₆) wird jeweils die zur Halbierung der Enzymaktivität nötige Lipidkonzentration (IC₅₀) ermittelt. IC₅₀ von MyCa: 25 μ M. IC₅₀ von PaCa: 6 μ M. IC₅₀ von LPI: 6 μ M. IC₅₀ von LPC: 2,7 μ M. IC₅₀ von OA: 3 μ M. IC₅₀ von AA: 6 μ M. IC₅₀ von PA: 5 μ M. Die bei OA und LPC beobachtete Kinetik wird als kompetitive Hemmung identifiziert, wobei der Dissoziationskoeffizient bei OA 1,49 μ M und bei LPC 2,79 μ M beträgt.

Für die aktivierenden Lipide Lauroylcarnitin (LaCa; Rest: C₁₂), 2-Monopalmitoylglycerol (MPG; Rest: C₁₆) und 2-Monooleoylglycerol (MOG; Rest: C₁₈) wird jeweils die zur Steigerung der Enzymaktivität um 50% nötige Lipidkonzentration (AC₅₀) ermittelt. AC₅₀ von LaCa: 20 μ M. AC₅₀ von MPG: 7,5 μ M. AC₅₀ von MOG: 1,9 μ M.

Die gemessenen AC₅₀-Werte hängen von der Löslichkeit des jeweiligen Lipids ab, während die gemessenen IC₅₀-Werte vom verwendeten Substrat DBF beeinflusst werden.

Der Vergleich der gesättigten Lipide PaCa, MyCa und LaCa zeigt, dass die Inhibition mit abnehmender Kettenlänge schwächer wird. LaCa aktiviert im Sinne einer heterotropischen positiven Kooperativität. Der Vergleich der Lipide PaCa, MPG, MOG und OA zeigt, dass eine lipophile Kopfgruppe das Inhibitionspotential abschwächt. Ungesättigte Lipide inhibieren stärker als gesättigte. OA und LPC inhibieren auf Grund eines kompetitiven Mechanismus. Da LPC inhibiert, ist von einer ähnlichen Wirkung der Alkylphosphocholine Edelfosine[®] und Miltex[®] auf CYP3A4 auszugehen. Da die Inhibition

durch LPI auf einem kompetitiven Mechanismus beruhen kann, ist CYP3A4 vielleicht am Stoffwechsel der für die Translokation von Proteinen bedeutenden Phosphoinositide beteiligt. Die auch beim Stoffwechselgesunden durch PA mögliche Inhibition wird *in vivo* durch eine gesteigerte Expression von CYP3A4 ausgeglichen.

Schlussfolgernd konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass einkettige Lipide bereits in mikromolaren Konzentrationen die Aktivität von CYP3A4 modulieren. In welchem Maß dies in menschlichen Leber- und Darmzellen der Fall ist, hängt von der intrazellulären Konzentration der untersuchten Lipide und anderen, in dieser Arbeit nicht berücksichtigten intrazellulären Mechanismen ab.

Da bekannt ist, dass CYP3A4 an der Biotransformation von mehr als der Hälfte aller in der klinischen Praxis eingesetzten Arzneimittel beteiligt ist, verdienen potentielle Inhibitoren große Aufmerksamkeit. Bisher wurden neben Arzneimitteln und Chemikalien nur die Nahrungsbestandteile Ethanol und Grapefruit-Saft eingehend untersucht. Zukünftig sollte auch einkettigen Lipiden Beachtung geschenkt werden. Die hier gezeigte Beeinflussung der Aktivität des für den Menschen wichtigsten Enzyms der Cytochrom P450-Familie könnte für den Patienten eine veränderte Verfügbarkeit und Toxizität der ihm verabreichten Medikamente durch physiologisch relevante Fette bedeuten.

Anhang A: Strukturformeln der verwendeten Lipide,
in alphabetischer Reihenfolge

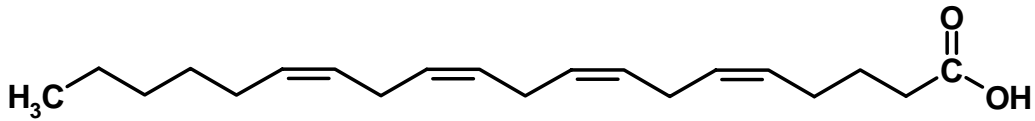


Abb. 18: Arachidonsäure

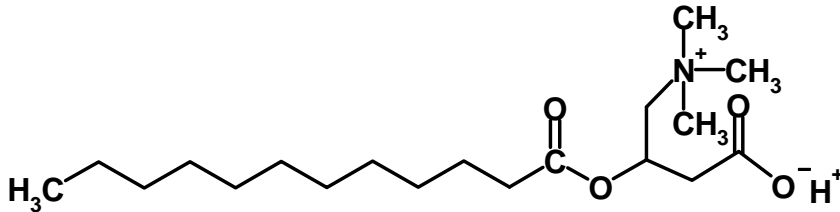


Abb. 19: Lauroylcarnitin

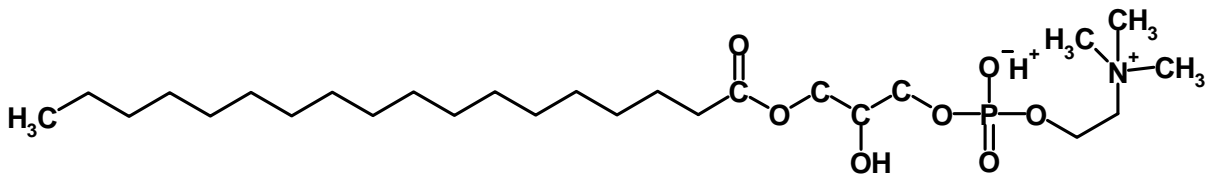


Abb. 20: L- α -Lysophosphatidylcholin

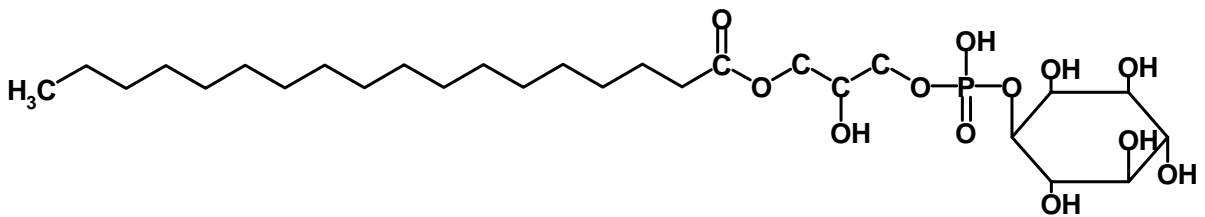


Abb. 21: L- α -Lysophosphatidylinositol

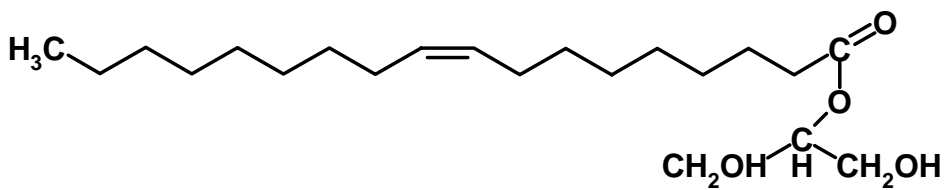


Abb. 22: 2-Monooleoylglycerol

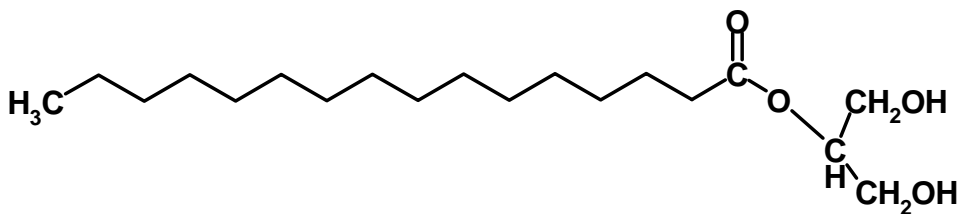


Abb. 23: 2-Monopalmitoylglycerol

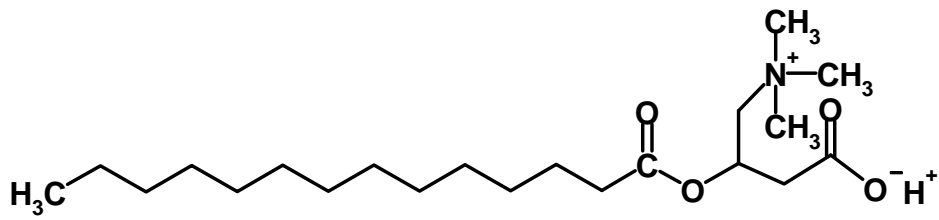


Abb. 24: Myristoylcarnitin

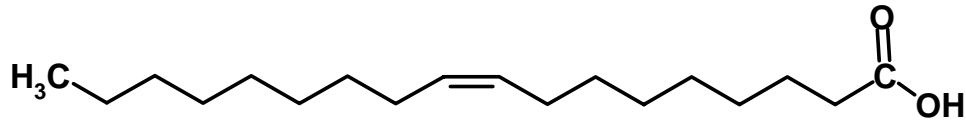


Abb. 25: Ölsäure

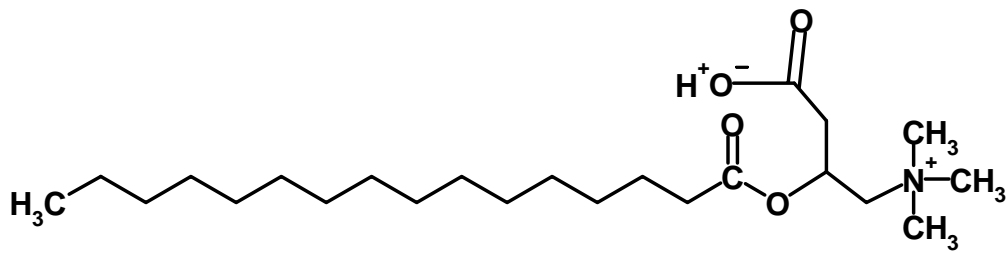


Abb. 26: Palmitoylcarnitin

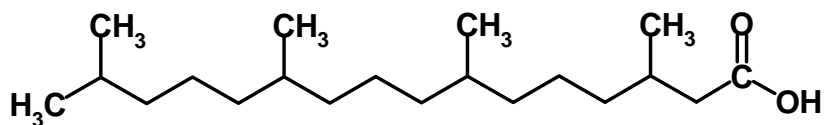


Abb. 27: Phytansäure

Literaturverzeichnis

- 1 Anderson GS, Tsujino I, Miyagi K, Sampson R, Sieber F: Preferential inactivation of paediatric solid tumour cells by sequential exposure to Merocyanine 540-mediated photodynamic therapy and Edelfosine: implications for the ex vivo purging of autologous haematopoietic stem cell grafts. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology* 69: 87-95 (2003)
- 2 Andreesen R, Modolell M, Weltzien HU, Eibl H, Common HH, Lohr GW, Munder PG: Selective destruction of human leukemic cells by alkyl-lysophospholipids. *Cancer research* 38: 3894-9 (1978)
- 3 Arora V, Iversen PL: Redirection of drug metabolism using antisense technology. *Curr Opin Mol Ther* 3: 249-57 (2001)
- 4 Berdel WE: Membrane-interactive lipids as experimental anticancer drugs. *British journal of cancer* 64: 208-11 (1991)
- 5 Bisswanger H: *Enzymkinetik*. Wiley-VCH, Weinheim, S. 87-99 (2000)
- 6 Brooks BA, McBride OW, Dolphin CT, Farrall M, Scambler PJ, Gonzalez FJ, Idle JR: The gene CYP3 encoding P450pcn1 (nifedipine oxidase) is tightly linked to the gene COL1A2 encoding collagen type 1 alpha on 7q21-q22.1. *Am J Hum Genet* 43: 280-4 (1988)
- 7 Busby WF Jr, Ackermann JM, Crespi CL: Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 27: 246-9 (1999)
- 8 Bylund J, Kunz T, Valmsen K, Oliw EH: Cytochromes P450 with bisallylic hydroxylation activity on arachidonic and linoleic acids studied with human recombinant enzymes and with human and rat liver microsomes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 284: 51-60 (1998)

- 9 Chauret N, Gauthier A, Nicoll-Griffith DA: Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 26: 1-4 (1998)
- 10 Domanski TL, Finta C, Halpert JR, Zaphiropoulos PG: cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450. *Mol Pharmacol* 59: 386-92 (2001)
- 11 Evans JH, Spencer DM, Zweifach A, Leslie CC: Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A2 translocation to internal membranes. *The Journal of biological chemistry* 276: 30150-60 (2001)
- 12 Fintelmann RE: Einfluss einkettiger Lipidmoleküle auf die Aktivität des binären membrangebundenen Cytochrom P450-Enzymsystems der Leber. Medizinische Dissertation, Universität Ulm 2002
- 13 Funk CD: Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294: 1871-5 (2001)
- 14 Gajate C, Mollinedo F: The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 98: 3860-3 (2001)
- 15 Gonzalez FJ: The molecular biology of cytochrome P450s. *Pharmacological reviews* 40: 243-88 (1988)
- 16 Guengerich FP, Shimada T: Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 4: 391-407 (1991)
- 17 Guengerich FP: Human cytochrome P450 enzymes. In: Ortiz de Montellano PR (Hrsg.), *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Plenum Press, New York, S. 473-535 (1995)

- 18 Guengerich FP: Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annual review of pharmacology and toxicology* 39: 1-17 (1999)
- 19 Han X, Gross RW: Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *Journal of lipid research* 44: 1071-9 (2003)
- 20 Harris HM, Applegarth DA, Clarke LA, Wong J: Phytanic acid, pristanic acid, and very-long-chain fatty acid methyl esters measured simultaneously by capillary gas chromatography. *Clinical chemistry* 35: 703-4 (1989)
- 21 Hilgard P, Klenner T, Stekar J, Unger C: Alkylphosphocholines: a new class of membrane-active anticancer agents. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 32: 90-5 (1993)
- 22 Hoefler G, Hoefler S, Watkins PA, Chen WW, Moser A, Baldwin V, McGillivray B, Charrow J, Friedman JM, Rutledge L, et al.: Biochemical abnormalities in rhizomelic chondrodysplasia punctata. *The Journal of pediatrics* 112: 726-33 (1988)
- 23 Howell SR, Shirley MA, Ulm EH: Effects of retinoid treatment of rats on hepatic microsomal metabolism and cytochromes P450. Correlation between retinoic acid receptor/retinoid x receptor selectivity and effects on metabolic enzymes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 26: 234-9 (1998)
- 24 Hurley JH, Meyer T: Subcellular targeting by membrane lipids. *Current opinion in cell biology* 13: 146-52 (2001)
- 25 Imamura Y, Migita T, Anraku M, Otagiri M: Inhibition of rabbit heart carbonyl reductase by fatty acids. *Biological & pharmaceutical bulletin* 22: 731-3 (1999)
- 26 Jungling E, Kammermeier H: A one-vial method for routine extraction and quantification of free fatty acids in blood and tissue by HPLC. *Analytical biochemistry* 171: 150-7 (1988)

- 27 Kenworthy KE, Bloomer JC, Clarke SE, Houston JB: CYP3A4 drug interactions: correlation of 10 in vitro probe substrates. *British journal of clinical pharmacology* 48: 716-27 (1999)
- 28 Kliewer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB, Willson TM, Zetterstrom RH, Perlmann T, Lehmann JM: An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 92: 73-82 (1998)
- 29 Koenigsmann MP, Notter M, Knauf WU, Papadimitriou CA, Oberberg D, Reufi B, Mucke C, Thiel E, Berdel WE: Chemopurging of peripheral blood-derived progenitor cells by alkyl-lysophospholipid and its effect on haematopoietic rescue after high-dose therapy. *Bone marrow transplantation* 18: 549-57 (1996)
- 30 Koh JS, Wang Z, Levine JS: Cytokine dysregulation induced by apoptotic cells is a shared characteristic of murine lupus. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165: 4190-201 (2000)
- 31 Kolars JC, Lown KS, Schmiedlin-Ren P, Ghosh M, Fang C, Wrighton SA, Merion RM, Watkins PB: CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics* 4: 247-59 (1994)
- 32 Korzekwa KR, Krishnamachary N, Shou M, Ogai A, Parise RA, Rettie AE, Gonzalez FJ, Tracy TS: Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites. *Biochemistry* 37: 4137-47 (1998)
- 33 Lemotte PK, Keidel S, Apfel CM: Phytanic acid is a retinoid X receptor ligand. *European journal of biochemistry / FEBS* 236: 328-33 (1996)
- 34 Lusis AJ: Atherosclerosis. *Nature* 407: 233-41 (2000)
- 35 Maenpaa J, Hall SD, Ring BJ, Strom SC, Wrighton SA: Human cytochrome P450 3A (CYP3A) mediated midazolam metabolism: the effect of assay conditions and

- regioselective stimulation by alpha-naphthoflavone, terfenadine and testosterone. *Pharmacogenetics* 8: 137-55 (1998)
- 36 Michaelis L, Menten ML: Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Z* 49: 333-369 (1913)
- 37 Miller VP, Stresser DM, Blanchard AP, Turner S, Crespi CL: Fluorometric high-throughput screening for inhibitors of cytochrome P450. *Annals of the New York Academy of Sciences* 919: 26-32 (2000)
- 38 Miwa GT, Lu AY: The association of cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome P-450 reductase in phospholipid membranes. *Archives of biochemistry and biophysics* 234: 161-6 (1984)
- 39 Molzer B, Kainz-Korschinsky M, Sundt-Heller R, Bernheimer H: Phytanic acid and very long chain fatty acids in genetic peroxisomal disorders. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry. Zeitschrift fur klinische Chemie und klinische Biochemie* 27: 309-14 (1989)
- 40 Mountfield RJ, Senepin S, Schleimer M, Walter I, Bittner B: Potential inhibitory effects of formulation ingredients on intestinal cytochrome P450. *International journal of pharmaceutics* 211: 89-92 (2000)
- 41 Muller-Enoch D, Churchill P, Fleischer S, Guengerich FP: Interaction of liver microsomal cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome P-450 reductase in the presence and absence of lipid. *The Journal of biological chemistry* 259: 8174-82 (1984)
- 42 Müller-Enoch D: Localization of cytochrome P450 in membranes: Reconstituted systems. In: Schenkman JB, Greim H (Hrsg.), *Handbook of Experimental Pharmacology, Band 105, Cytochrome P450*, Springer, Berlin Heidelberg New York, S. 71-83 (1993)
- 43 Muller-Enoch D, Gruler H: Complexation of membrane-bound enzyme systems. *Z Naturforsch [C]*. 55: 747-52 (2000)

- 44 Muller-Enoch D, Fintelmann R, Nicolaev A, Gruler H: Enzyme activity of the cytochrome P-450 monooxygenase system in the presence of single chain lipid molecules. *Z Naturforsch [C]*. 56: 1082-90 (2001)
- 45 Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, et al.: The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12: 1-51 (1993)
- 46 Nelson DR: Comparison of P450s from human and fugu: 420 million years of vertebrate P450 evolution. *Arch Biochem Biophys* 409: 18-24 (2003)
- 47 Oda M, Ueno T, Kasai N, Takahashi H, Yoshida H, Sugawara F, Sakaguchi K, Hayashi H, Mizushima Y: Inhibition of telomerase by linear-chain fatty acids: a structural analysis. *The Biochemical journal* 367: 329-34 (2002)
- 48 Poulos A, Sharp P, Fellenberg AJ, Johnson DW: Accumulation of pristanic acid (2, 6, 10, 14 tetramethylpentadecanoic acid) in the plasma of patients with generalised peroxisomal dysfunction. *European journal of pediatrics* 147: 143-7 (1988)
- 49 Sato TK, Overduin M, Emr SD: Location, location, location: membrane targeting directed by PX domains. *Science* 294: 1881-5 (2001)
- 50 Schrag ML, Wienkers LC: Topological alteration of the CYP3A4 active site by the divalent cation Mg(2+). *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 28: 1198-201 (2000)
- 51 Shapiro S, Guggenheim B: The action of thymol on oral bacteria. *Oral microbiology and immunology* 10: 241-6 (1995)
- 52 Shimomura Y, Sugiyama S, Takamura T, Kondo T, Ozawa T: Quantitative determination of the fatty acid composition of human serum lipids by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography* 383: 9-17 (1986)

- 53 Simonsen A, Wurmser AE, Emr SD, Stenmark H: The role of phosphoinositides in membrane transport. *Current opinion in cell biology* 13: 485-92 (2001)
- 54 Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM: Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annual review of biochemistry* 69: 145-82 (2000)
- 55 Steinberg D, Avigan J, Mize C, Eldjarn L, Try K, Refsum S: Conversion of U-C14-phytol to phytanic acid and its oxidation in hereditary ataxia polyneuritis. *Biochemical and biophysical research communications* 19: 783-9 (1965)
- 56 Stewart JM, Blakely JA: Long chain fatty acids inhibit and medium chain fatty acids activate mammalian cardiac hexokinase. *Biochimica et biophysica acta* 1484: 278-86 (2000)
- 57 Stresser DM, Blanchard AP, Turner SD, Erve JC, Dandeneau AA, Miller VP, Crespi CL: Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: analysis of 27 test compounds with four fluorometric substrates. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 28: 1440-8 (2000)
- 58 Sun CQ, O'Connor CJ, Robertson AM: Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS immunology and medical microbiology* 36: 9-17 (2003)
- 59 Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, Junge K, Bryceson A, Berman J: Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *The New England journal of medicine* 347: 1739-46 (2002)
- 60 Suzuki K, Shono F, Kai H, Uno T, Uyeda M: Inhibition of topoisomerases by fatty acids. *Journal of enzyme inhibition* 15: 357-66 (2000)
- 61 Suzuki K, Terasaki Y, Uyeda M: Inhibition of hyaluronidases and chondroitinases by fatty acids. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 17: 183-6 (2002)

- 62 Taniguchi H, Imai Y, Iyanagi T, Sato R: Interaction between NADPH-cytochrome P-450 reductase and cytochrome P-450 in the membrane of phosphatidylcholine vesicles. *Biochimica et biophysica acta* 550: 341-56 (1979)
- 63 Taniguchi H, Pyerin W: Phospholipid bilayer membranes play decisive roles in the cytochrome P-450-dependent monooxygenase system. *Journal of cancer research and clinical oncology* 114: 335-40 (1988)
- 64 ten Brink HJ, Stellaard F, van den Heuvel CM, Kok RM, Schor DS, Wanders RJ, Jakobs C: Pristanic acid and phytanic acid in plasma from patients with peroxisomal disorders: stable isotope dilution analysis with electron capture negative ion mass fragmentography. *Journal of lipid research* 33: 41-7 (1992)
- 65 Thummel KE, Wilkinson GR: In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annual review of pharmacology and toxicology* 38: 389-430 (1998)
- 66 Tsai MY, Cooper K: Long-chain aliphatic fatty acids and phytanic acid simultaneously measured by dual-column capillary chromatography. *Clin Chem* 35: 1989-91 (1989)
- 67 Ullrich V: Cytochrome P450 and biological hydroxylation reactions. *Topics in current chemistry* 83: 67-104 (1979)
- 68 Viner RI, Novikov KN, Kozlov IuP, Kagan VE: Inhibition of the dealkylating activity of cytochrome P-450 isoforms in rat liver microsomes by the products of phospholipase A2-induced phospholipid hydrolysis. *Biokhimiia* 52: 459-68 (1987)
- 69 Wanders RJ, Smit W, Heymans HS, Schutgens RB, Barth PG, Schierbeek H, Smit GP, Berger R, Przyrembel H, Eggelte TA, et al.: Age-related accumulation of phytanic acid in plasma from patients with the cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 166: 45-56 (1987)

- 70 Wanders RJ, van Roermund CW, Schutgens RB, Barth PG, Heymans HS, van den Bosch H, Tager JM: The inborn errors of peroxisomal beta-oxidation: a review. *Journal of inherited metabolic disease* 13: 4-36 (1990)
- 71 Wanten GJ, Janssen FP, Naber AH: Saturated triglycerides and fatty acids activate neutrophils depending on carbon chain-length. *European journal of clinical investigation* 32: 285-9 (2002)
- 72 Watkins PB: Noninvasive tests of CYP3A enzymes. *Pharmacogenetics* 4: 171-84 (1994)
- 73 Wierenga PK, Setroikromo R, Vellenga E, Kampinga HH: Purging of acute myeloid leukaemia cells from stem cell grafts by hyperthermia: enhancement of the therapeutic index by the tetrapeptide AcSDKP and the alkyl-lysophospholipid ET-18-OCH(3). *British journal of haematology* 111: 1145-52 (2000)
- 74 Yamazaki H, Shimada T: Effects of arachidonic acid, prostaglandins, retinol, retinoic acid and cholecalciferol on xenobiotic oxidations catalysed by human cytochrome P450 enzymes. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 29: 231-41 (1999)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. rer. nat. D. Müller-Enoch danke ich herzlichst für die Überlassung des Themas, sowie für unermüdliche Unterstützung und Zuspruch.

Den Mitarbeitern der Abteilung Physiologische Chemie danke ich für die gute Zusammenarbeit, und so manches aufmunternde Gespräch nach 19 Uhr.

Meinem Bruder Robert danke ich für seine Vorarbeit, sowie viele gute Ratschläge.

Alya Danish und Catherine Mercier danke ich für das Verständnis, welches sie mir während der schriftlichen Ausarbeitung dieser Arbeit entgegen brachten.