Aus dem Bereich Theoretische Medizin und Biowissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

In vitro-Studien zur Beteiligung humaner Cytochrom P450 Isoenzyme an der *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu Amphetamin mittels humaner Lebermikrosomen und rekombinanter CYPs

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES 2008

> vorgelegt von: Nicole Marion Kneller geboren am: 19.01.1977 in Kaiserslautern

Tag des Kolloquiums:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. M.D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Krämer

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Thomas Krämer in der Abteilung Experimentelle und Klinische Toxikologie der Fachrichtung 2.4 Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar von 2000 bis 2002.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	4
1. ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY	7
1.1 ZUSAMMENFASSUNG	7
1.2 SUMMARY	8
2. ALLGEMEINER TEIL	9
2.1 EINLEITUNG	9
2.1.1 Amphetamin, Methamphetamin und Amphetamin-abgeleitete Medikamente	9
2.1.1.2 Fenproporex1	0
2.1.2 Die Cytochrom P450 (CYP)-Enzymfamilie1	1
2.1.2.1 Struktur und Funktion1	2
2.1.2.2 Nomenklatur und Vorkommen	3
2.2 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG 1	7
3. EXPERIMENTELLER TEIL	9
3.1 Chemikalien und Reagenzien	9
3.2 IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN MIT RATTENLEBERZELLMIKROSOMEN	0
3.2.1 Präparation und Charakterisierung von Rattenlebermikrosomen	0
3.2.1.1 Präparation von Rattenlebermikrosomen	0
3.2.1.2 Bestimmung des Proteingehaltes 2	1
3.2.1.3 Bestimmung des Cytochrom P450-Gehaltes	2
3.2.2 Mikrosomale Inkubationen von Fenproporex24	4
3.2.3 Bestimmung der Amphetamin-Enantiomeren mittels enantioselektiver GC-MS 2	5
3.2.3.1 GC-MS Methode	5
3.2.4 Kinetische Untersuchungen	6
3.2.5 CYP-Hemm-Assays mit Chinin bzw. Chinidin	8

3.2.6 Inhibition der N-Desalkylierung von Fenproporex zu Amphetamin	29
3.3 IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN AN CDNA-EXPRIMIERTEN HUMANEN CYTOCHROM P450-	
ISOENZYMEN UND HUMANEN LEBERZELLMIKROSOMEN (HLM)	30
3.3.1 Inkubationen mit cDNA-exprimierten CYP-Isoenzymen	30
3.3.2 Inkubationen mit HLM	30
3.3.3 Ermittlung der Inkubationsbedingungen für kinetische Untersuchungen und	
Hemmversuche	31
3.3.4 Enzymkinetik und Hemmung mit spezifischen chemischen Inhibitoren	31
3.3.4.1 Bestimmung der kinetischen Konstanten K_m und V_{max}	31
3.3.4.2 CYP-Hemmversuche mit spezifischen chemischen Inhibitoren	32
3.3.5 Berechnungen und Statistik	32
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	34
4.1 IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN MIT RATTENLEBERZELLMIKROSOMEN	34
4.1.1 Präparation und Charakterisierung von Rattenleberzellmikrosomen	35
4.1.2 Mikrosomale Inkubationen von Fenproporex	35
4.1.3 GC-MS Methode	36
4.1.4 Inhibition der Amphetamin Bildung mittels Chinin	38
4.2 IN VITRO-UNTERSUCHUNGEN AN CDNA-EXPRIMIERTEN HUMANEN CYTOCHROM P450-	
ISOENZYMEN UND HUMANEN LEBERZELLMIKROSOMEN (HLM)	40
4.2.1 Inkubationen mit cDNA-exprimierten CYP-Isoenzymen	40
4.2.2 Inkubationen mit HLM	41
4.2.3 Analytik mittels GC-MS	42
4.2.4 Ermittlung der Inkubationsbedingungen für kinetische Untersuchungen und	
Hemmversuche	42
4.2.4.1 Abhängigkeit der Metabolitenbildung von der Enzym- bzw. Proteinkonzentration	43
4.2.4.2 Abhängigkeit der Metabolitenbildung von der Inkubationszeit	45
4.2.4.3 <i>N</i> -Desalkylierung von Fenproporex	47
4.2.5 Inhibition der Amphetamin-Bildung mittels Chinidin	51
5 LITERATUR	

6. PUBLIKATIONEN	65
7. DANK	66
8. LEBENSLAUF	67

1. ZUSAMMENFASSUNG UND SUMMARY

1.1 Zusammenfassung

Fenproporex ist ein Anorektikum. Es wird durch N-Desalkylierung zu R(-)-Amphetamin und S(+)-Amphetamin metabolisiert. Eine Beteiligung des polymorphen Cytochroms P450 (CYP) Isoenzyms CYP2D6 am Metabolismus solcher Amphetamin-Vorläufersubstanzen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Im Rahmen dieser Studie wurden die humanen, hepatischen CYP Isoenzyme, die an der N-Desalkylierung von Fenproporex beteiligt sind, mittels rekombinanter CYPs und mittels humaner Lebermikrosomen (HLM) identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur CYP2D6 sondern auch CYP1A2, CYP2B6 und CYP3A4 an dieser metabolischen Reaktion beteiligt sind. Die Bildung von Amphetamin aus der Muttersubstanz Fenproporex konnte dabei vom CYP2D6-Hemmstoff Chinidin nicht signifikant verändert werden. Es konnten auch keine Unterschiede in der Amphetamin-Bildungsrate zwischen Poor-Metabolizer HLM und gepoolten HLM (Extensive Metabolizer) festgestellt werden. Diese Studien legen nahe, dass CYP2D6 nicht für die N-Desalkylierung Fenproporex zu Amphetamin entscheidend von ist. Möglicherweise spielt dieses polymorphe Isoenzym jedoch für einen anderen Metabolismus-Schritt, nämlich für die Ring-Hydroxylierung, eine entscheidende Rolle. Dies soll in einer zukünftigen Studie untersucht werden.

1.2 Summary

Fenproporex (FP) is a widely used anorectic and is known to be *N*-dealkylated to R(-)-amphetamine (AM) and S(+)-amphetamine. Involvement of the polymorphic cytochrome P450 (CYP) isoform CYP2D6 in metabolism of such amphetamine precursors is discussed controversially in literature. In this study, the human hepatic CYPs involved in fenproporex dealkylation were identified using recombinant CYPs and human liver microsomes (HLM). These studies revealed that not only CYP2D6 but also CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 catalyzed this metabolic reaction for both enantiomers. Formation of amphetamine was not significantly changed by quinidine and was not different in poor metabolizer HLM compared to pooled HLM. These studies suggested that CYP2D6 is not crucial to the *N*-dealkylation of fenproporex to amphetamine. This polymorphic isoenzyme may play a more important role in another metabolic step, most probably in the ring hydroxylation. Further studies are necessary for elucidating the role of CYP2D6 in fenproporex hydroxylation.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1 Einleitung

2.1.1 Amphetamin, Methamphetamin und Amphetaminabgeleitete Medikamente

Amphetamin (R,S-1-Phenyl-2-propanamin) und Methamphetamin (R,S-N-Methyl-1-phenyl-2-propanamin) sind Psychostimulantien mit hohem Missbrauchspotential, die ihre Wirkung über die Freisetzung von Noradrenalin, Dopamin und Serotonin bzw. über die Hemmung der Wiederaufnahme dieser Neurotransmitter erzielen. Sie haben keine Affinität zu Adrenorezeptoren oder Dopaminrezeptoren. Ihre Effekte resultieren aus einer nicht-exozytotischen, carrier-vermittelten Freisetzung von Neurotransmittern. Die S(+)-Enantiomere eine fünfmal und Methamphetamin von Amphetamin haben stärker stimulierende Wirkung als die R(-)-Enantiomere. Die Hauptmetabolismuswege sind seit Jahren bekannt: aromatische Hydroxylierung, aliphatische Hydroxylierung, N-Desmethylierung, oxidative Desaminierung, N-Oxidation und Konjugation des Stickstoffs. Die phenolischen Metaboliten werden teilweise konjugiert ausgeschieden (Kraemer, Maurer, 2002; Musshoff, 2000). Sowohl Amphetamin und Methamphetamin als auch einige ihrer Derivate unterliegen dem Betäubungsmittelgesetz und wurden in die Liste der verbotenen Substanzen des Internationalen Olympischen Komitees (IOC) und der Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA) aufgenommen. Fahren unter Einfluss von Drogen ("driving under the influence of drugs", "DUID") ist ein Thema, das in den Industrienationen immer größere Bedeutung gewinnt, da es häufig den Grund für Unfälle im Straßenverkehr darstellt. Amphetamin und einige seiner Derivate gehören zu den Substanzen, auf die im Rahmen solcher DUID-Fälle getestet wird (Kraemer, Paul, 2007).

N-alkylierte oder *N*,*N*-bisalkylierte Amphetamin-Derivate wie z.B. Clobenzorex, Famprofazon, Mefenorex, Methamphetamin, Prenylamin, Selegilin oder das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Fenproporex werden therapeutisch als Sympathomimetika, Anorektika, Nicht-opioide Analgetika, Parkinsonmittel oder Vasodilatatoren eingesetzt. Lange Zeit wurde dabei übersehen, dass die Einnahme dieser Substanzen der Grund für positive Amphetamin-Ergebnisse in Drogen-Tests sein könnte. Dies mag damit zusammenhängen, dass in mehreren älteren Publikationen die metabolische Bildung von Amphetamin oder Methamphetamin aus diesen Medikamenten für irrelevant oder gar nicht existent erklärt wurde. Nichtsdestotrotz fielen bei Drogen-Tests (z.B. in der Psychiatrie, am Arbeitsplatz, bei DUID-Untersuchungen) zahlreiche Fälle ungeklärter, positiver Amphetamin-Ergebnisse nach Einnahme dieser Medikamente auf (Moeller, Kraemer, 2002; Kraemer, Maurer, 1998).

2.1.1.2 Fenproporex

Fenproporex (*R*,*S*-3-[(1-phenyl-2-propyl)-amino-]propionitril) ist ein Anorektikum. Zahlreiche Autoren behaupteten, dass Fenproporex kein Abhängigkeitspotential oder zentral-stimulierende Effekte besitze (Cession-Fossion, 1970; Hertel, Fallot-Burghardt, 1978). So wurde postuliert, dass die Cyano-Gruppe die *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu Amphetamin verhindere. Andere Autoren berichteten jedoch über die metabolische *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu Amphetamin (AM) (Tognoni, Morselli, Garattini, 1972; Coutts, Nazarali, Baker, Pasutto, 1986; Nazarali, Baker, Coutts, Pasutto, 1983). Letzteres war in Urin- oder Haarproben nach Einnahme von Fenproporex nachgewiesen worden (de la Torre, Badia, Gonzalez, Garcia, Pretel, Farre, Segura, 1996; Nakahara, 1995; Nakahara, Kikura, 1996; Cody, Valtier, Stillman, 1999). In diesen Publikationen waren allerdings nur die Muttersubstanz und das Amphetamin nicht aber möglicherweise spezifischere Metaboliten berücksichtigt worden.

2.1.2 Die Cytochrom P450 (CYP)-Enzymfamilie

Die Cytochrom P450 Enzyme haben die größte Bedeutung hinsichtlich des Phase I Metabolismus von Fremdstoffen, aber auch von körpereigenen Substanzen. Diese sogenannten Funktionalisierungsreaktionen dienen der Einführung oder Freilegung funktioneller Gruppen, die anschließend im Rahmen der Phase II Reaktionen, den Konjugationsreaktionen, an endogene polare Moleküle, wie z.B. Glukuronsäure, gekoppelt werden. Hierdurch wird in der Regel eine Hydrophilisierung und damit eine verbesserte Ausscheidbarkeit aus dem Organismus erzielt. Darüber hinaus stellt der Metabolismus ein Entgiftungs- und Inaktivierungssystem dar. Seltener kann der Phase I Metabolit jedoch auch deutlich toxischer als die Muttersubstanz sein oder es werden toxische Intermediate oder freie Radikale gebildet. CYP Enzyme können also auch zur Giftung beitragen (Rendic, Di Carlo, 1997). Bei sogenannten Prodrugs stellt der Metabolit das eigentliche Wirkprinzip dar (Forth, Henschler, Rummel, Förstermann, Starke, 2001). Die Aufklärung der Metabolismuswege von Arzneistoffen ist also notwendig für ihre Risiko- und Wirksamkeitsabschätzung (Ono, Hatanaka, Hotta, Satoh, Gonzalez, Tsutsui, 1996).

2.1.2.1 Struktur und Funktion

Cytochrom P450 Enzyme sind Hämoproteine, die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert sind. Das Zentralatom Eisen liegt im im Low-spin-Zustand als Fe³⁺ vor. Es hat sechs Liganden, von denen vier mit dem Stickstoff aus dem Porphyrinring des Häms koordiniert sind. Über die fünfte Koordinationsstelle ist das Häm-Eisen mit einem Cystein-Schwefel des Apoproteins verbunden. Man nennt CYP-Enzyme deshalb auch Häm-Thiolat-Komplexe. Der sechste Ligand ist durch Wasser besetzt (Pfeifer, Pflegel, Borchert, 1995).

CYP-Enzyme katalysieren hauptsächlich Oxidationen, seltener Reduktionen. Im Rahmen der Reaktion wird aus molekularem Sauerstoff (O₂) ein Sauerstoffatom in das Substrat eingeführt, das zweite zu Wasser reduziert. CYP-Enzyme werden wegen dieses Mechanismus auch mischfunktionelle Monooxigenasen genannt. In Abbildung 1 ist der Reaktionszyklus dargestellt. Außer molekularem Sauerstoff werden zur Reaktion noch das Coenzym NADPH-Cytochrom P450-Oxidoreduktase benötigt, über das das erste Elektron im Reaktionszyklus ausschließlich bereitgestellt wird. Das zweite Elektron kann ebenfalls von diesem Enzym oder aber auch über das zweite Redoxsystem, Cytochrom b5 und NADPH Cytochrom b5-Reduktase, geliefert werden.



Abb. 1: Redoxzyklus von CYP-Reaktionen (aus (Rang, Dale, Ritter, 1999), S. 81)

2.1.2.2 Nomenklatur und Vorkommen

Cytochrom P450 Enzyme zeigen im reduzierten Zustand im Komplex mit Kohlenmonoxid ein Absorptionsmaximum des Differenzspektrums bei 450 nm. Hiervon leitet sich der Name P450 ab. Die Einteilung und Nomenklatur der CYP-Gene erfolgt nach der Homologie der Aminosäuresequenzen. CYP steht für Cytochrom P450, gefolgt von einer arabischen Ziffer für die Familie, einem Großbuchstaben für die Subfamilie und einer arabischen Ziffer für die Isoform (Nelson, Koymans, Kamataki, Stegeman, Feyereisen, Waxman, Waterman, Gotoh, Coon, Estabrook, Gunsalus, Nebert, 1996) (siehe Tabelle 1).

	Tab.	1: Nomenklatur	innerhalb	der CYP-Enz	vmfamilie
--	------	----------------	-----------	-------------	-----------

	Sequenzhomologie	Beispiel für Nomenklatur
Familie	> 40%	CYP2
Subfamilie	> 55%	CYP2C
lsoform		CYP2C19

CYP-Enzyme kommen ubiquitär vor: in Bakterien, Pflanzen und Tieren. Die bekannten CYP-Gene gehen vermutlich auf ein gemeinsames Vorläufergen zurück, das vor 3-3,5 Milliarden Jahren entstanden sein dürfte. Beim Menschen unterscheidet man 14 CYP-Genfamilien und 20 Subfamilien. Insgesamt sind 33 menschliche CYP-Isoformen bekannt, von denen 12 aus 7 Subfamilien der Genfamilien 1, 2 und 3 für den Fremdstoffmetabolismus relevant sind (siehe Abbildung 2). Die übrigen CYP-Enzyme katalysieren die Biotransformation endogener Substrate. Die am Arzneistoffwechsel beteiligten Enzyme zeigen eine breite Substratspezifität.



Relevant for Drug Metabolism:

Abb. 2: Cytochrom P450 Enzyme beim Menschen und relevante Isoformen für den Fremdstoffmetabolismus (verändert nach, S.42).

In Säugetieren sind CYP-Enzyme in nahezu allen Geweben zu finden. Den höchsten Anteil mit 90-95% des gesamten CYPs enthält die Leber. Davon entfallen 60-65% auf Enzyme des Fremdstoffmetabolismus. Abbildung 3 zeigt die prozentuale Verteilung der einzelnen Isoformen in der humanen Leber sowie den relativen Anteil der Isoformen am Fremdstoffmetabolismus.



Abb. 3: Relative Mengenverteilung der CYP-Isoenzyme in der menschlichen Leber (links) und deren relative Beteiligung am Fremdstoffmetabolismus (rechts).

Bemerkenswert ist, daß das nur zu etwa 2% vorkommende CYP2D6 einen Anteil von 30% am Arzneistoffwechsel hat. Dies ist auch aus dem Grund von Bedeutung, daß CYP2D6 polymorph exprimiert wird. Unter genetischem Polymorphismus versteht man das Auftreten bestimmter Mutationen, aufgrund derer bestimmte Enzyme nicht exprimiert werden oder in ihren katalytischen Eigenschaften verändert sind. Man spricht von defizienten (poor), normalen (extensive) und im Falle von CYP2D6 auch extrem schnellen (ultrarapid) Metabolisierern für ein bestimmtes Isoenzym. Etwa 7% der Kaukasier sind defizient für CYP2D6 (poor metabolizers) (Smith, Abel, Hyland, Jones, 1998; Bertilsson, 1995) und 1-3% unter Asiaten und Afrikanern. 80-85% der Kaukasier sind extensive und 1-10% ultrarapid Metabolisierer (Meyer, 2000). CYP2D6 Aktivitäten variieren daher interindividuell um das tausendfache (Yan, Caldwell, 2001). Genetischer Polymorphismus ist bis heute bekannt für CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 und eben CYP2D6. Das CYP2C19Gen fehlt bei 2-6% der kaukasischen Bevölkerung und bei bis zu 20% der Asiaten (Flockhart, 1995). Aber auch nicht polymorph exprimierte CYP-Isoenzyme wie CYP3A4 können in ihrem Auftreten variieren. Dies wird hauptsächlich durch Induktion oder Inhibition der Aktivität durch Arzneistoffe oder Umweltchemikalien verursacht. So kann die enzymatische Funktion von CYP3A4 um das 20-fache variieren (Eichelbaum, Burk, 2001). Wird die Aktivität eines CYP-Isoenzyms durch Induktion oder Inhibition verändert, kann sich die biologische Aktivität von Fremdstoffsubstraten dramatisch ändern. Solche Effekte bezeichnet man als drug-drug, drug-chemical oder chemical-chemical Interaktionen.

2.2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Untersuchungen speziell zum CYP-Metabolismus werden heute auch als integraler Bestandteil der Arzneistoffentwicklung und Risikobewertung von Fremdstoffen betrachtet (Guengerich, Hosea, Parikh, Bell, Johnson, Gillam, Shimada, 1998). Arbeiten zu diesem Thema schließen Studien an CYP-Enzymen in experimentellen Tiermodellen, aber auch in humanen Systemen ein. Besonders die Abschätzung von Fremdstoffinteraktionen wie z.B. kompetitive Inhibition auf der Ebene des CYP-Metabolismus erfordert die Aufklärung der Isoformenabhängigkeit in den wichtigsten CYP-katalysierten Reaktionen einer Substanz.

Das erste Ziel dieser Arbeit war, die humanen hepatischen CYPs zu identifizieren, die die *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu R(-)-Amphetamin

und S(+)-Amphetamin katalysieren. Darüber hinaus sollten die kinetischen Konstanten für diese Reaktionen ermittelt werden.

In weiteren Untersuchungen sollte die Bildung von R(-)-Amphetamin and S(+)-Amphetamin aus der Muttersubstanz Fenproporex in humanen Lebermikrosomen mit CYP2D6 poor metabolizer Genotyp (PM HLM) mit derjenigen in gepoolten humanen Lebermikrosomen jeweils in Anwesenheit und Abwesenheit des spezifischen CYP2D6 Inhibitors Chinidin verglichen werden.

Mit den Ergebnissen aus diesen Studien sollte dann diskutiert werden, inwieweit der CYP2D6 Polymorphismus einen relevanten Einfluss auf die Amphetaminentstehung aus Fenproporex und damit auf die forensische Interpretation hat.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Folgende Mikrosomen stammten von Gentest, bezogen über NatuTec (Frankfurt/Main): Baculovirus infizierte Insektenzellmikrosomen, 1 nmol/mL humanes cDNA-exprimiertes CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 oder CYP3A4 enthaltend (Supersomes®), Baculovirus infizierte Insektenzellmikrosomen ohne CYP-Expression (control Supersomes®) und gepoolte humane Leberzellmikrosomen (HLM, 20 mg microsomales Protein/mL, 400 pmol Gesamt-CYP/mg Protein). Die Mikrosomen wurden nach Erhalt bei 37°C aufgetaut, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –80°C gelagert.

Fenproporex wurde von Herrn Professor Pfleger, Homburg, zur Verfügung gestellt. Methanolische Lösung von Amphetamin-D11 (1000 mg/L), Chinin und Chinidin wurden von Promochem und Amphetamin-Hydrochlorid von Lipomed bezogen. 0.1 M *S*-(-) Heptafluorbutyrylprolylchlorid (HFBPCI) in Dichlormethan wurde gemäß Peters (Peters, Kraemer, Maurer, 2002) synthetisiert.

NADP⁺ wurde von Biomol (Hamburg), Isocitrat und Isocitratdehydrogenase von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Ammoniumformiat und Superoxid-Dismutase stammten von Fluka (Neu-Ulm). Alle weiteren verwendeten Chemikalien stammten von E. Merck (Darmstadt) und entsprachen p.a. Qualität.

3.2 *In vitro*-Untersuchungen mit Rattenleberzellmikrosomen

3.2.1 Präparation und Charakterisierung von

Rattenlebermikrosomen

Die Rattenlebermikrosomen wurden aus Lebern männlicher Wistar-Ratten präpariert, die freundlicherweise von PhD. D. Stevens, FR Physiologie, Universitätsklinik Homburg, zur Verfügung gestellt wurden.

3.2.1.1 Präparation von Rattenlebermikrosomen

Die Ratten wurden unter Anästhesie getötet, die Lebern entnommen und sofort weiterverarbeitet. Alle folgenden Schritte wurden in einem Klimaraum bei 4 °C durchgeführt.

- Die zuvor in 0,154 M Kaliumchlorid-Lösung gewaschenen Lebern wurden mit einem Skalpell vorzerkleinert und mit dem gleichen Volumen isotonischer (0,154 M) KCI-Lösung mit Zusatz von EDTA (1 M) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 0,01 mg/mL) vermischt. Anschließend wurde die Suspension mit einem Potter (Glas-Teflon-Homogenisator) in Aliquoten homogenisiert.
- Die Homogenisate wurden insgesamt 30 min bei einer Temperatur von 4°C mit einer Kontron-Zentrifuge (St. Leon-Rot, mit dem Rotor A8.24) zentrifugiert. Nach 5 min bei 2.000 g wurde die Geschwindigkeit alle 5 min

um 2.000 g bis letztlich 10.000 g gesteigert. Der Fettüberstand wurde abpipettiert und verworfen.

- Der flüssige Überstand, der die Mikrosomen und das Cytosol enthält wurde in Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt und 75 min bei 4°C und 100.000 g in einer Ultra-Zentrifuge I8-60M der Firma Beckmann (Palo Alto, USA) mit dem Rotor Ti50.2 im Vakuum zentrifugiert, um die Mikrosomen vom Cytosol abzutrennen.
- Der die Mikrosomen enthaltende Zentrifugations-Rückstand wurde in gleichen Volumina KCI-Lösung resuspendiert. Durch erneute Zentrifugation bei 100.000 g für 75 min wurde die gewaschene Mikrosomen-Fraktion wieder abgetrennt. Der Rückstand wurde erneut 1:1 in KCI-Puffer mit 0,1 M EDTA-Zusatz resuspendiert, in Eppendorf-Plastikreaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –80°C gelagert.

3.2.1.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Die Methode nach Bradford wurde wegen höherer Stabilität und einfacherer Handhabbarkeit der Methode nach Lowry vorgezogen. Zur Durchführung wurde der Proteinbestimmungs-Assay der Firma Bio-Rad[®] (München) eingesetzt. Als Proteinstandard wurde bovines Serumalbumin (BSA) gewählt, da dieses ähnliche Absorptionseigenschaften zeigt wie die Cytochrome.

Das Prinzip der Messung beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximum einer sauren Lösung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm nach 595 nm bei Bindung an ein Protein (Bradford, 1976). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die Ergebnisse sind jedoch abhängig vom verwendeten Test und Standard-Protein. Die Ergebnisse verschiedener Methoden sind deshalb nicht vergleichbar.

Durchführung:

Aus einer BSA-Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe über den Konzentrationsbereich 0 – 1,4 mg/mL erstellt. Die Mikrosomen- und Cytosol-Probenlösungen wurden in einen geeigneten Bereich verdünnt (angestrebter Bereich etwa 10 – 70 mg Protein/mL). Das Farbreagenz wurde in angegebener Konzentration zu den Standardlösungen und Proben hinzugegeben. Nach jeweils fünfminütiger Inkubationszeit wurden die Lösungen photometrisch bei 595 nm vermessen und die Meßwerte anhand der Eichgerade ermittelt. Es wurde ein Spektrophotometer SP8-500 der Firma Pye Unicam (Cambridge, England) verwendet.

3.2.1.3 Bestimmung des Cytochrom P450-Gehaltes

Die P450-Aktivität wurde durch Bestimmung des CO-Differenzspektrums nach Omura und Sato ermittelt (Omura, Sato, 1964).

Durchführung:

Die Mikrosomen-Suspension wurde mit 0,1 M Phosphat-Puffer pH 7,4 auf ein Ansatzvolumen von 6 mL mit einer resultierenden Proteinkonzentration von 1 mg/mL verdünnt. Die Lösung wurde auf zwei Quarzküvetten aufgeteilt und die Basislinie zwischen 370 und 500 nm photometrisch ermittelt. Da es sich um eine trübe Lösung handelt, tritt Lichtstreuung an den ungelösten Partikeln auf (Tyndall-Effekt). Um eine zu starke Streuung zu verhindern, muß die Meßküvette möglichst nahe am Photomultiplier vermessen werden. Diese Voraussetzung war mit Verwendung des Spektrophotometers DW 2000 der Firma Aminco Chance (Büttelborn) gegeben. Anschließend wurde die Probenküvette 30 Sekunden mit Kohlenmonoxid begast und eine Spatelspitze Natriumdithionit zugegeben. Hierdurch wurde das gesamte Häm-Eisen zum Fe²⁺ reduziert und konnte so CO an der 6. Koordinationsstelle binden (Kohlenmonoxid-Komplex). Bei der Aufzeichnung des Differenzspektrums ergab sich das namensgebende charakteristische Absorptionsmaximum bei 450 nm. Der isosbestische Punkt des Gemisches liegt bei einer Absorption von 490 nm. Die Cytochrom P450-Konzentration wurde wie folgt auf der Grundlage des Lambert-Beerschen Gesetzes errechnet:

$$C = \frac{E_{490-450 \text{ nm}}}{\epsilon * d} * 1000$$

C = nmol CYP/mg Protein ϵ = 91 mM⁻¹* cm⁻¹ d = Schichtdicke der Küvette in cm

Bei 420 nm liegen die Absorptionsmaxima von sowohl Hämoglobin als auch CYP-Abbauprodukten, die auf eine zu starke Erwärmung der Mikrosomen bei der Aufarbeitung und damit auf eine Aktivitätsminderung hinweisen können.

Insofern ist durch diese Messung auch eine Qualitätsabschätzung der Mikrosomen möglich.

3.2.2 Mikrosomale Inkubationen von Fenproporex

Das Inkubationsgemisch bestand aus Substrat (Fenproporex), Rattenlebermikrosomen (0,5 mg Protein/mL) und 200 U/mL Superoxid-Dismutase (SOD) in einem Endvolumen 50 uL. 0.1 M von Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) wurde als Inkubationslösungsmittel eingesetzt. Als Inkubationsgefäße verschließbare dienten Eppendorf-Plastikreaktionsgefäße. Die Substrate wurden zuvor in Phosphatpuffer gelöst. Um das Reaktionsgemisch vorzutemperieren, wurde zunächst für 10 min bei 37°C im Wasserbad vorinkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des NADPH-generierenden Systems (bestehend aus 1,2 mM NADP⁺, 5 mM 2 U/mL Isocitrat, 5 mM MgCl₂ und Isocitratdehydrogenase (Endkonzentrationen) gestartet. Nach Inkubation für 2 min bei 37°C, wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µL wäßriger Perchlorsäure (60%, m/m) gestoppt. Durch Inkubationen mit verschiedenen Proteingehalten und Inkubationszeiten wurden diese Parameter so aufeinander abgestimmt, daß bei den gewählten Bedingungen innerhalb des initialen linearen Bereiches der Umsetzungsraten gearbeitet wurde. Es wurden 5 µL des methanolischen internen Standards (Amphetamin-D11; 0,01 mg/mL), 25 µL Carbonat-Puffer (5% G/V; pH9) und 25 µL HFBP zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur auf einem Schüttler belassen. Danach wurden die derivatisierten Analyten in 100 µL Ethylacetat extrahiert und 3 µL des Überstandes wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) analysiert (Verfahren modifiziert nach (Peters, Kraemer, Maurer, 2002)).

Parallel wurden Kontroll- und Leeransätze inkubiert: Kontrollinkubationen enthielten kein NADPH-generierendes System. Dieses wurde erst nach dem Abstoppen zugegeben. Durch dieses Vorgehen sollten Artefaktbildungen bei der Aufarbeitung, z.B. Oxidationsprodukte der Substrate, identifiziert werden. Leerinkubationen wurden ohne Zugabe von Substrat durchgeführt, um mögliche analytische Interferenzen durch die Matrix ausschließen zu können.

3.2.3 Bestimmung der Amphetamin-Enantiomeren mittels enantioselektiver GC-MS

3.2.3.1 GC-MS Methode

Die Proben wurden mittels eines Agilent Technologies (AT) 6890 Series GC System kombiniert mit einem AT 5973 network massenselektiven Detektor (MSD), einem AT 7683 series Injektor und einer AT Chem Station G1701CA Version C.00.00 21-Dec-1999 analysiert.

GC Bedingungen: Splitless injection mode; Säule, 5 % Phenyl-Methyl-Siloxane (HP-5MS, 30 m] 0.25 mm I.D., 250 nm Filmdicke); injection port Temperatur, 280°C; Carrier Gas, Helium; Flussrate, 1 mL/min; Säulentemperatur, 100°C mit 30°C/min auf 180°C aufgeheizt, mit 5°C/min auf 230°C und dann wieder mit 30°C/min auf 310°C. *MS Bedingungen:* Transfer line heater, 280°C; NICI (negative ion chemical ionization), Methan (2 mL/min); Quellentemperatur, 150°C; Lösungsmittel-Delay, 9 min; selected ion monitoring (SIM) Modus; 9-11 min *m*/z 399 (target ion), 379, 439 for AM-d₁₁; 388 (target ion), 368, 428 für Amphetamin. Die Amphetamin-Enantiomere wurden durch Vergleich der Peakflächenverhältnisse (Enantiomer des Analyten zu dem entsprechenden Enantiomer des Internen Standards) gegen Kalibrationskurven, bei denen die Peakflächenverhältnisse von zugesetzten Kalibrierungsstandards gegen ihre Konzentration aufgetragen (lineares Regressionsmodell) wurden, quantifiziert.

3.2.4 Kinetische Untersuchungen

Linearität der Metabolitenbildungsraten in Bezug auf Proteingehalt und Inkubationszeit ist eine Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Michaelis-Menten-Kinetik. Die Inkubationsbedingungen wurden in dieser Hinsicht durch Versuchsreihen mit Inkubationen bei verschiedenen Proteingehalten und verschiedenen Inkubationszeiten optimiert. Die für weitere Untersuchungen gewählten Parameter 0,5 mg mikrosomales Protein/mL und 2 min lieferten Umsetzungsraten im linearen Bereich der Initialgeschwindigkeit. Die Enzymkinetik-Assays zur Bestimmung der Km- und Vmax-Werte wurden mit steigenden Substratkonzentrationen durchgeführt. Für Fenproporex wurden die Konzentrationen 2, 5, 10, 20, 30, 50, 100 und 200 µM gewählt. Die Substrate wurden in Phosphatpuffer gelöst. Die Inkubationen wurden jeweils dreifach durchgeführt.

Die Auswertung der Daten erfolgte zunächst visuell im Eadie-Hofstee-Plot durch Auftragung von V gegen V/[S] (Gleichung 1). [S] steht hierbei für die Substratkonzentration, V für die Reaktionsgeschwindigkeit und V_{max} für die maximale Geschwindigkeit oder Umsatzrate. K_m entspricht der Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit.

$$V = V_{max} - \frac{K_m \times V}{[S]}$$
(1)

Durch dieses Linearisierungsverfahren können Abweichungen von einfacher Michaelis-Menten-Kinetik leicht erkannt werden, da man in diesen Fällen keine Gerade, sondern unterschiedlich gekrümmte Verläufe erhält (Clarke, 1998). Zeigte sich der Eadie-Hofstee-Plot linear, wurde Gleichung 2 zur Berechnung von K_m und V_{max} eingesetzt.

$$V = \frac{V_{max} \times [S]}{K_{m} + [S]}$$
(2)

Zeigte sich der Eadie-Hofstee-Plot konkav, was meistens eine biphasische Kinetik bedeutet, wurde Gleichung 3 zur Berechnung verwendet, die sich aus 2 Termen der einfachen Michaelis-Menten-Beziehung zusammensetzt (Korzekwa, Krishnamachary, Shou, Ogai, Parise, Rettie, Gonzalez, Tracy, 1998).

$$V = \frac{V_{max,1} \times [S]}{K_{m,1} + [S]} + \frac{V_{max,2} \times [S]}{K_{m,2} + [S]}$$
(3)

Um die K_m - und V_{max} -Werte mittels nichtlinearer Regression zu berechnen, wurde die GraphPad Software (siehe 3.3.5) eingesetzt.

Linearisierungen wie Lineweaver-Burk werden heute nicht mehr empfohlen, da kleine, und damit vielleicht ungenauere Meßwerte überbewertet werden.

3.2.5 CYP-Hemm-Assays mit Chinin bzw. Chinidin

Zur Abschätzung ob ein Einfluss von CYP2D1 (Isoenzym, das dem polymorphen CYP2D6 beim Menschen entspricht) vorliegt, wurde ein spezifischer chemischer Inhibitor für CYP2D1, nämlich Chinin, eingesetzt. Fenproporex und Inhibitor wurden mit den Mikrosomen bei 37°C für 10 min vorinkubiert und die Reaktion anschließend mit dem NADPH-generierenden System gestartet.

Chinin und sein Diastereomer Chinidin zeigen Unterschiede im Ausmaß der kompetitiven Inhibition in humanen und Rattenlebermikrosomen. Chinidin hat deutlich kleinere K_i-Werte und damit eine höhere Affinität in humanen Lebermikrosomen und Chinin entsprechend in Rattenlebermikrosomen (Kobayashi, Murray, Watson, Sesardic, Davies, Boobis, 1989; Boobis, Sesardic, Murray, Edwards, Singleton, Rich, Murray, de-la-Torre, Segura, Pelkonen, Pasanen, Kobayashi, Zhi-Guang, Davies, 1990). Es wurde jeweils der potentere Inhibitor bei den jeweiligen Hemmversuchen eingesetzt.

3.2.6 Inhibition der *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu Amphetamin

Das Ausmaß der Hemmung der N-Desalkylierung von Fenproporex zu Amphetamin durch den spezifischen Inhibitor Chinin wurde durch Vergleich von Inkubationen mit Inhibitor-Zugabe mit solchen ohne Inhibitor-Zugabe (Kontrollen) bestimmt. Die Inkubationen wurden bei 1 µM, 10 µM und 20 µM Inhibitorkonzentration durchgeführt. Die beiden niedrigeren Inhibitorkonzentrationen sollten unspezifische Reaktionen anderer Isoformen noch nicht beeinflussen (Bourrie, Meunier, Berger, Fabre, 1996). Die Kontrollinkubationen wurden ohne Inhibitor durchgeführt. Da der Inhibitor jedoch in Methanol gelöst zugesetzt wurde, wurden die Kontrollen auf den gleichen Methanol-Gehalt eingestellt, um einen evtl. Lösungsmitteleffekt auf die Mikrosomenaktivität zu korrigieren.

Die Inhibition der Reaktionen wurde ausgedrückt als Abnahme in Prozent in der Metabolitenproduktion basierend auf den Peakflächenverhältnissen der Metaboliten mit den internen Standards aus Inkubationen mit und ohne Inhibitor.

3.3 *In vitro-*Untersuchungen an cDNA-exprimierten humanen Cytochrom P450-Isoenzymen und humanen Leberzellmikrosomen (HLM)

3.3.1 Inkubationen mit cDNA-exprimierten CYP-Isoenzymen

Um eine generelle Beteiligung von bestimmten CYP-Isoenzymen am Metabolismus von Fenproporex zu untersuchen, wurden Inkubationen mit jeweils 50 µM Fenproporex und 50 pmol/mL CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 oder CYP3A4 analog zu den Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen durchgeführt. Für die Ansätze mit CYP2A6 und CYP2C9 wurde der Phosphatpuffer durch 45 mM bzw. 90 mM Tris-Puffer (pH 7,4) ersetzt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Mikrosomenpräparationen gestartet.

3.3.2 Inkubationen mit HLM

Analog zu den Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen bestand ein Inkubationsansatz (Endvolumen 50 μ L) aus Phosphatpuffer (90 mM, pH 7,4), 5 mM Mg²⁺, 5 mM Isocitrat, 1,2 mM NADP⁺, 2 U/mL Isocitratdehydrogenase, 200 U/mL Superoxiddismutase und Substrat. Die Substrate wurden zuvor in Inkubationspuffer gelöst. Die Reaktionen wurden mit eisgekühlten Mikrosomen (HLM) gestartet, bei 37°C im Wasserbad durchgeführt und durch Zugabe von 5 μ L Perchlorsäure (60%, m/m) beendet. Nach Zentrifugation der Proben

wurden die Überstände nach entsprechender Probenaufarbeitung (siehe 3.2.2) analysiert.

3.3.3 Ermittlung der Inkubationsbedingungen für kinetische

Untersuchungen und Hemmversuche

Proteingehalt und Inkubationszeit lagen für alle weiteren Inkubationen im linearen Bereich der Metabolitenbildung, um die für die Michaelis-Menten-Kinetik unabdingbaren Initialbedingungen sicherzustellen. Zu diesem Zweck wurden Vorversuche mit verschiedenen Proteingehalten und Inkubationszeiten durchgeführt.

3.3.4 Enzymkinetik und Hemmung mit spezifischen chemischen Inhibitoren

3.3.4.1 Bestimmung der kinetischen Konstanten K_m und V_{max}

Die kinetischen Konstanten wurden durch Inkubationen mit einer Reihe von verschiedenen Substratkonzentrationen (Fenproporex: 1 bis 750 µM) ermittelt. Jede Inkubation wurde zweifach durchgeführt. Die eingesetzten Proteingehalte waren wie folgt: 0,5 mg/mL für HLM; für Inkubationen mit Fenproporex und cDNA-exprimierten CYP-Isoenzymen: jeweils 30 pmol CYP2B6/mL, CYP2D6/mL, CYP3A4/mL oder CYP1A2/mL. Die Inkubationszeiten für die Fenproporex-Assays lagen bei 15 min für HLM und jeweils 3 min für CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4 und CYP1A2. Weniger als 20% Substrat wurden in allen

Inkubationen metabolisiert. Die Vorgehensweise zur Berechnung der K_m - und V_{max} -Werte wurde bereits unter Kapitel 3.2.4 beschrieben.

3.3.4.2 CYP-Hemmversuche mit spezifischen chemischen Inhibitoren

Chinidin (1 μ M und 3 μ M; entsprechend etwa 10-fach K_i) wurde als spezifischer Inhibitor für CYP2D6 eingesetzt. Die zugrunde gelegten K_i-Werte wurden dabei der Literatur entnommen.

Fenproporex wurde im Hemmassay in Konzentrationen nahe der entsprechenden K_m-Werte zugegeben (50 μ M). Der Gehalt an HLM Protein entsprach 0,5 mg/mL. Zur Hemmung der *N*-Desalkylierung wurde 10 min inkubiert. Die Kontrollinkubationen wurden ohne Inhibitor-Zugabe, aber korrigiert in Bezug auf den Methanolgehalt, durchgeführt (n=4). Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates gestartet.

Die Inhibition der untersuchten Reaktionen wurde dargestellt als Prozentsatz der Abnahme der Metabolitenbildung basierend auf den Peakflächen aus Inkubationen mit und ohne Inhibitor. Die Signifikanz der Hemmung wurde mittels eines einseitigen Mann-Whitney-Tests unter Verwendung der GraphPad Software (siehe 3.3.5) ermittelt.

3.3.5 Berechnungen und Statistik

Alle kinetischen und statistischen Berechnungen wurden unter Verwendung der GraphPad Prism 3.02 Software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) durchgeführt. Die Michaelis-Menten-Parameter K_m und V_{max} wurden über das ein- oder zweiphasische Enzymmodell mit nichtlinearer Regressionsanalyse Prusoff (Cheng, Prusoff, 1973) bestimmt. Die statistische Signifikanz der Hemmungen wurde mittels des nicht-parametrischen einseitigen Mann-Whitney-Tests überprüft.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 In vitro-Untersuchungen mit Rattenleberzell-

mikrosomen

Die Metabolisierungswege von Fenproporex im Ganztier Ratte und auch im Menschen (Abb. 4) wurden bereits beschrieben (Kraemer, Theis, Weber, Maurer, 2000). Vorversuche mit Rattenlebermikrosomen und Cosubstrat NADPH legten nahe, daß die initialen metabolischen Schritte über CYP-Enzyme katalysiert wurden. Deshalb sollte im weiteren die CYP-Isoformen Abhängigkeit der *N*-Desalkylierung von Fenproporex zuerst unter Verwendung von Rattenlebermikrosomen und spezifischen Inhibitoren untersucht werden.



Abb. 4: Metabolismus von Fenproporex (nach: Kraemer, Theis, Weber, Maurer 2000)

4.1.1 Präparation und Charakterisierung von Rattenleberzellmikrosomen

Die Aufarbeitung der Leberproben wurde an Literaturmethoden angelehnt (Berthou, Ratanasavanh, Riche, Picart, Voirin, Guillouzo, 1989; von-Bahr, Groth, Jansson, Lundgren, Lind, Glaumann, 1980). Die kritische Phase bei der Präparation reicht von der Entnahme der Leber bis zur ersten Zentrifugation. Freiwerdende Peptidasen können den CYP-Gehalt vermindern. Aus diesem Grund wurden alle Schritte im Kühlraum bei 4°C durchgeführt und darüber hinaus EDTA als Chelatbildner für z. B. Ca²⁺ zur Inhibition von Ca²⁺-abhängigen Proteasen (Pearce, McIntyre, Madan, Sanzgiri, Draper, Bullock, Cook, Burton, Latham, Nevins, Parkinson, 1996) und PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) als Protease-Inhibitor zugesetzt.

Die für die hier beschriebenen Versuche verwendete Rattenlebermikrosomencharge hatte einen Proteingehalt von 35,3 mg/mL und einen CYP-Gehalt von 1,4 nmol/mg Protein. Diese Werte lagen im angestrebten Bereich.

4.1.2 Mikrosomale Inkubationen von Fenproporex

Die Substratlösungen wurden in Inkubationspuffer angesetzt. Gegenüber der Lösung in organischen Lösungsmitteln wie z.B. dem häufig verwendeten Methanol hatte dies mehrere Vorteile: zum einen konnte eine negative Beeinflussung der Mikrosomenaktivität durch das organische Lösungsmittel ausgeschlossen werden (Busby, Jr., Ackermann, Crespi, 1999; Easterbrook, Lu, Sakai, Li, 2001; Yin, Tran, Greenberg, Fischer, 2001; Chauret, Gauthier, Nicoll-Griffith, 1998), zum anderen konnte ein Ausfällen der Substrate beim Zupipettieren zum Inkubationsmedium bzw. das Auftreten von übersättigten, evtl. instabilen Lösungen ebenfalls ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnten größere Volumina pipettiert werden, was den Pipettierfehler verminderte.

Um mögliche Oxidationsreaktionen während der Inkubation und Aufarbeitung zu verhindern, wurde den Inkubationsgemischen SOD zugegeben. SOD verhindert unspezifische Oxidationen durch Katalyse der Abbaureaktion reaktiver Sauerstoffspezies (Hiramatsu, Kumagai, Unger, Cho, 1990).

4.1.3 GC-MS Methode

Zur enantioselektiven Bestimmung von Amphetamin wurde ein validiertes GC-MS Verfahren nach leichten Modifikationen eingesetzt. Die Verwendung eines deuterierten internen Standards (AM-d₁₁) erlaubt dabei eine sichere Quantifizierung. Die Derivatisierung mit HFBP hat einerseits den Vorteil, dass die Amphetamin-Enantiomere in die entsprechenden Diastereomere überführt werden und andererseits eignen sich die Derivate wegen der hohen Elektronegativität für die sehr empfindliche negativ chemische Ionisationstechnik der Massenspektrometrie.

In Abbildung 5 sind die Massenspektren und die Strukturformeln der HFBP-Derivate der S(+)-Enantiomere von Amphetamin und des Internen Standards Amphetamin-d11 abgebildet. Die zur Selected Ion Monitoring (SIM) Bestimmung gewählten Ionen sind markiert.



Abb. 5: Massenspektren und Strukturformeln der HFBP-Derivate der S(+)-Enantiomere von Amphetamin und Amphetamin-d11.

In Abbildung 6 sind typische Massenfragmentogramme eines Inkubationsansatzes nach Extraktion und Derivatisierung zu sehen. Die Diasteromere sind basisliniengetrennt. Die Analyse dauert lediglich elf Minuten.



Abb. 6: Typische Massenfragmentogramme für Inkubationsüberstände nach Extraktion und Derivatisierung von 100 µM Fenproporex.

4.1.4 Inhibition der Amphetamin Bildung mittels Chinin

Für die Inhibitionsstudien wurde der chemische Inhibitor Chinin bei Konzentrationen eingesetzt, die dem mehrfachen des K_i-Wertes entsprachen. Solche Inhibitorkonzentrationen erzielen ausreichend hohe Hemmungen, sind aber auch noch ausreichend selektiv, d. h. sie beeinflussen nicht den oxidativen Metabolismus anderer Isoform-spezifischer Substrate. Das Substrat wurde beim K_m-Wert eingesetzt, um bestmögliche und vergleichbare Hemmungen zu erhalten.



Abb. 7: Amphetaminbildungsraten in Gegenwart des CYP 2D1-Inhibitors Chinin als Prozentsatz des Kontrollmittelwertes (ohne Inhibitor) für die Fenproporex-*N*-Desalkylierung zu Amphetamin. Jeder Balken entspricht dem Mittelwert aus vier Inkubationen.

Die folgenden Versuche wurden dann mit humanen Lebermikrosomen bzw. cDNA-exprimierten humanen Cytochrom P450-Isoenzymen durchgeführt.

4.2 *In vitro-*Untersuchungen an cDNA-exprimierten humanen Cytochrom P450-Isoenzymen und humanen Leberzellmikrosomen (HLM)

4.2.1 Inkubationen mit cDNA-exprimierten CYP-Isoenzymen

Initial wurde ein Screening mit den neun für den Fremdstoffmetabolismus bedeutendsten Isoenzymen der humanen Leber durchgeführt. Es sollten diejenigen CYP-Isoenzyme identifiziert werden, die grundsätzlich in der Lage waren, die untersuchten metabolischen Reaktionen zu katalysieren. Entsprechend den Empfehlungen des Herstellers der Mikrosomen, waren die gewählten Bedingungen drastisch genug, um eine Aussage zur generellen Beteiligung eines Isoenzyms treffen zu können. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse dieses Screenings dargestellt: Die *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu Amphetamin wurde hauptsächlich durch CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 und CYP3A4 katalysiert.



Abb. 8: Bildungsraten (V in [pmol/min/pmol CYP]) von Amphetamin aus Fenproporex (200 μ M FP) mit 50 pmol/mL der jeweiligen CYP Isoenzyme und mit Insektenzell Kontrollmikrosomen (n=2). Die schwarzen Balken entsprechen den R(-)-Enantiomeren und die grauen Balken den S(+)-Enantiomeren.

4.2.2 Inkubationen mit HLM

Mit Ausnahme von mikrosomalem Proteingehalt und Inkubationszeit wurden die Inkubationen analog den Inkubationen mit Rattenlebermikrosomen durchgeführt. Die gepoolten humanen Lebermikrosomen (HLM) wurden käuflich erworben und waren bereits charakterisiert, so daß im Gegensatz zu den selbst präparierten Rattenlebermikrosomen keine Bestimmung des Protein- oder CYP-Gehalts erforderlich war.

4.2.3 Analytik mittels GC-MS

Zur enantioselektiven Bestimmung von Amphetamin wurde auch hier ein validiertes GC-MS Verfahren nach leichten Modifikationen eingesetzt. Die Verwendung eines deuterierten internen Standards (AM-d₁₁) erlaubt dabei eine sichere Quantifizierung. Die Derivatisierung mit HFBP hat einerseits den Vorteil, dass die Amphetamin-Enantiomere in die entsprechenden Diastereomere überführt werden und andererseits eignen sich die Derivate wegen der hohen Elektronegativität für die sehr empfindliche negativ chemische Ionisationstechnik der Massenspektrometrie. Die entsprechenden Derivate und die Massenfragmentogramme sind bereits beispielhaft in Kapitel 4.1.3 dargestellt.

4.2.4 Ermittlung der Inkubationsbedingungen für kinetische Untersuchungen und Hemmversuche

Für die Inkubationen mit den durch das Screening selektierten, beteiligten Isoenzymen sowie für die Inkubationen mit HLM wurden die kinetischen Profile der untersuchten Reaktionen ermittelt. Alle Inkubationen zur Enzymkinetik wurden unter Initialbedingungen bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeiten durchgeführt. Dies ist eine der Grundvoraussetzungen für Michaelis-Menten-Kinetik. Hierzu ist eine weitgehend konstante Substratkonzentration über den Inkubationszeitraum Bedingung (Tucker, Houston, Huang, 2001). Generell sollten weniger als 20% Substrat während des Inkubationszeitraumes abgebaut werden. Es muß jedoch auch ausreichend Metabolit für eine analytische Detektion und Quantifizierung gebildet werden. Die Vorversuche dienten dazu, einen optimalen Kompromiss zwischen minimalem Substratverbrauch und initialer Geschwindigkeit einerseits und ausreichender Metabolitenkonzentration für die analytische Bestimmung andererseits zu finden.

Zur Optimierung der Inkubationsbedingungen für eine annähernd lineare Metabolitenbildungsrate im Hinblick auf CYP-Konzentration (cDNA-exprimierte CYPs) bzw. mikrosomale Proteinkonzentration (HLM) und Inkubationszeit wurden diese Komponenten in verschiedenen Vorversuchsserien variiert.

4.2.4.1 Abhängigkeit der Metabolitenbildung von der Enzym- bzw. Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der CYP-Konzentration (cDNA-exprimierte CYPs) bzw. der mikrosomalen Proteinkonzentration (HLM) wurden eine mittlere Substratkonzentration von 200 µM und eine Inkubationszeit von 10 min gewählt. Diese Bedingungen waren ausreichend, um auch bei geringen Enzymkonzentrationen eine für die Detektion ausreichende Metabolitenkonzentration sicherzustellen.

Die Auftragung der Amphetaminkonzentrationen gegen die CYP-Konzentrationen am Beispiel von cDNA-exprimiertem CYP2B6 ist in Abbildung 9 dargestellt.



Abb. 9: Enzymkonzentrations-Abhängigkeit der Fenproporex N-Desalkylierung zu Amphetamin katalysiert durch CYP2B6 (200 µM Fenproporex, 10 min; PA = Peakfläche).

Die linearen Abschnitte wurden durch Regressionsanalysen über verschiedene Konzentrationsbereiche ermittelt. Nicht alle Metabolitenbildungsraten verhielten sich bis zur höchsten Enzymkonzentration linear. Dies ist unter anderem erklärbar durch vermehrte unspezifische Substrat-Proteinbindungen (McLure, Miners, Birkett, 2000). So gebundenes Substrat steht zur Metabolisierung nicht mehr zur Verfügung, weshalb die Proteinkonzentration im Inkubat möglichst gering gehalten werden sollte.

Das Diagramm für die Inkubationen mit verschiedenen Konzentrationen HLM Protein (Abbildung 10) zeigt annähernd lineare Verläufe. Es wurden für weitere Untersuchungen jeweils 0,5 mg mikrosomales Protein/mL eingesetzt.



Abb. 10: Enzymkonzentrations-Abhängigkeit der Fenproporex-*N*-Desalkylierung katalysiert durch HLM (200 μ M Fenproporex, 10 min; PAR = Peakflächenverhältnis).

4.2.4.2 Abhängigkeit der Metabolitenbildung von der Inkubationszeit

Ein weiterer zu optimierender Parameter war die Inkubationszeit. Diese sollte möglichst kurz gehalten werden, um sicherzugehen, daß die aktuelle Reaktionsgeschwindigkeit möglichst nahe am wahren Wert der initialen Geschwindigkeit liegt.

Die entsprechenden Peakflächen/Zeit-Auftragungen sind in Abbildung 11 beispielhaft für Inkubationen mit cDNA-exprimiertem CYP2B6 dargestellt. Die linearen Abschnitte wurden durch Regressionsanalysen über verschiedene Inkubationszeiträume ermittelt. Eine Abnahme der Umsatzrate mit der Inkubationszeit ist unter anderem durch Produkthemmung des Enzyms erklärbar. Auch kann die Aktivität des Enzyms durch Denaturierungsvorgänge über die Zeit abnehmen.

Für alle weiteren Versuche wurden 10 min für die verschiedenen CYPs, sowie 15 min für HLM gewählt.



Abb. 11: Zeit-Abhängigkeit der Fenproporex *N*-Desalkylierung katalysiert durch CYP2B6 (PAR = Peakflächenverhältnis).

Abbildung 12 zeigt das Diagramm für Inkubationen mit HLM. Für weitere Untersuchungen wurde eine Inkubationszeit von 15 min gewählt.



Abb. 12: Zeit-Abhängigkeit der Fenproporex–Desalkylierung katalysiert durch HLM (20 μM Fenproporex, 0,5 mg HLM Protein/mL; PA = Peak Area).

4.2.4.3 *N*-Desalkylierung von Fenproporex

Die Konzentrationsbereiche der Substrate für die K_m - und V_{max} -Bestimmungen wurden im unteren Bereich durch die Nachweisgrenze des Metaboliten limitiert und im oberen Bereich durch die begrenzte Löslichkeit des Substrates.

In Abbildung 13 sind die Michaelis-Menten-Plots für die *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu Amphetamin, katalysiert durch CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 und CYP3A4, dargestellt. Die Ergebnisse für die Bildung von R(-)-Amphetamin sind jeweils auf der linken Seite und die für die Bildung von S(+)-Amphetamin auf der rechten Seite.



Abb. 13 : Michaelis-Menten-Plots für die *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu Amphetamin, katalysiert durch CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 und CYP3A4. Die

Ergebnisse für die Bildung von R(-)-Amphetamin sind jeweils auf der linken Seite und die für die Bildung von S(+)-Amphetamin auf der rechten Seite.

In den Tabellen 2 bis 5 sind die kinetischen Parameter (Km und Vmax) für die *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu den jeweiligen Amphetamin-Enantiomeren katalysiert durch die entsprechenden CYP-Isoenzymen gegeben. Sie wurden nach Michaelis-Menten Gleichung 1 berechnet.

Tabelle 2: Kinetische Parameter (Km und Vmax) für die *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu den jeweiligen Amphetamin-Enantiomeren katalysiert durch CYP1A2. (Berechnet nach Michaelis-Menten Gleichung 1)

CYP1A2	
R(-)-AM	S(+)-AM
Km ¹	Km ¹
276	135
Vmax ²	Vmax ²
3,1	2,4
1 0	

¹ in $[\mu M]$ ² in [pmol/min/pmol CYP]

Tabelle 3: Kinetische Parameter (Km und Vmax) für die *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu den jeweiligen Amphetamin-Enantiomeren katalysiert durch CYP2B6. (Berechnet nach Michaelis-Menten Gleichung 1)

CYP2B6	
R(-)-AM	S(+)-AM
Km ¹	Km ¹
169	73

Vmax ²	Vmax ²
7,8	3,8
¹ in [µM] ² in [pmol/min/pmol CYP]	

Tabelle 4: Kinetische Parameter (Km und Vmax) für die *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu den jeweiligen Amphetamin-Enantiomeren katalysiert durch CYP2D6. (Berechnet nach Michaelis-Menten Gleichung 1)

CYP2D6	
R(-)-AM	S(+)-AM
Km ¹	Km ¹
283	104
Vmax ²	Vmax ²
1,7	0,3
¹ in [µM] ² in [pmol/min/pmol CYP]	

Tabelle 5: Kinetische Parameter (Km und Vmax) für die *N*-Desalkylierung von Fenproporex zu den jeweiligen Amphetamin-Enantiomeren katalysiert durch CYP3A4. (Berechnet nach Michaelis-Menten Gleichung 1)

CYP3A4	
R(-)-AM	S(+)-AM
Km ¹	Km ¹
806	837
Vmax ²	Vmax ²
7,3	3,6
1 = 1 = 1 = 2 = 1 = 1 = 1 = 1 = 1 = 1 =	

¹ in $[\mu M]$ ² in [pmol/min/pmol CYP]

4.2.5 Inhibition der Amphetamin-Bildung mittels Chinidin

Um die mögliche Bedeutung von CYP2D6 für die Fenproporex *N*-Desalkylierung zu Amphetamin zu überprüfen, wurde der CYP2D6 spezifische Inhibitor Chinidin (1 μ M oder 3 μ M) zu Inkubationsansätzen hinzugegeben und die Bildungsraten von *R*(-)-Amphetamin und *S*(+)-Amphetamin mit Inkubationen ohne Inhibitor-Zugabe verglichen. Abbildung 14 zeigt, dass die Metabolitenbildungsrate in Gegenwart von 1 μ M Inhibitor und 50 μ M Fenproporex nicht signifikant verringert wurde. In Gegenwart von 3 μ M Inhibitor und 50 μ M Fenproporex wurde die Amphetaminbildung des *S*(+)-Enantiomers signifikant (P Wert 0,0145) verringert.

Um darüber hinaus die Bedeutung von CYP2D6 für die Fenproporex *N*-Desalkylierung zu Amphetamin zu untersuchen und um entsprechende Unterschiede zwischen Poor Metabolizern und Extensive Metabolizern festzustellen, wurde die Metabolitenbildungsrate von R(-)-Amphetamin und S(+)-Amphetamin in gepoolten humanen Lebermikrosomen mit denen in humanen Lebermikrosomen von Poor Metabolizern verglichen.

Allerdings konnten dabei keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, wie in Abbildung 14 zu sehen ist. In Gegenwart von 3μ M Inhibitor wurde die Amphetaminbildung des *S*(+)-Enantiomers signifikant (P Wert 0,0151) verringert.

Für die Inhibitionsstudien wurde der chemische Inhibitor Chinidin bei Konzentrationen eingesetzt, die dem mehrfachen des K_i-Wertes entsprachen. Solche Inhibitorkonzentrationen erzielen ausreichend hohe Hemmungen, sind aber auch noch ausreichend selektiv, d. h. sie beeinflussen nicht den oxidativen Metabolismus anderer Isoform-spezifischer Substrate. Das Substrat wurde beim K_m-Wert eingesetzt, um bestmögliche und vergleichbare Hemmungen zu erhalten.



Abb. 14. Amphetamin Bildung (R(-)-Enantiomer oberer Teil, S(+)-Enantiomer unterer Teil) aus Fenproporex in PM HLM (rechter Balken) und der Effekt von 1 oder 3 μ M Chinidin auf die Metabolitenbildung in pHLM (mittlere Balken) in Inkubationsansätzen mit jeweils 50 μ M Fenproporex. Kontrollen mit pHLM ohne Inhibitor (linker Balken) wurden als 100% betrachtet. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus 6 Inkubationen (± Standard-Fehler des Mittelwertes; * = P Wert 0.01 to 0.05).

Diese in vitro-Ergebnisse hatten gezeigt, dass CYP2D6 offensichtlich nicht das für die Bildung von Amphetamin aus Fenproporex hauptsächlich verantwortliche Isoenzym war. Allerdings spiegeln solche in vitro-Experimente nicht immer die tatsächlichen in vivo-Verhältnisse wider. In vivo-Experimente am Menschen konnten aus ethischen Gründen nicht durchgeführt werden. In einer weiteren Arbeit im Arbeitskreis waren deshalb in vivo-Experimente an speziellen Rattenstämmen durchgeführt worden, die als Modell für den humanen Extensive bzw. Poor Metabolizer dienen (Kraemer, Pflugmann, Bossmann, Kneller, Peters, Paul, Springer, Staack, Maurer, 2004). Dort hatten sich dann tatsächlich auch signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Metabolisierern ergeben. Zu allen überprüften Zeitpunkten waren die Amphetaminkonzentrationen im Blut der Dark Agouti Ratten (PM Modell) signifikant höher als im EM Modell (Wistar Ratten). Offensichtlich war CYP2D6 sogar für niedrigere Amphetaminkonzentrationen im Blut verantwortlich. Dies wurde dann noch dadurch bestätigt, dass Wistar Ratten (EM) nach Gabe von Chinin (CYP2D1-Hemmstoff) ähnlich hohe Amphetamin-Konzentrationen erreichten wie die Dark Agouti Ratten. Wie in 4.1 beschrieben gibt es als zweiten Metabolisierungsweg neben der N-Desalkylierung von Fenproporex auch noch die Hydroxylierung am Ring. Aufgrund der Ergebnisse unserer Studien könnte man nun annehmen, dass diese Ringhydroxylierung über CYP2D6 katalysiert wird. Das würde bei den PM zu einer geringeren Hydroxylierungsrate von Muttersubstanz und Amphetamin führen. Das würde einerseits die Menge an Muttersubstanz erhöhen, die zur N-Desalkylierung zur Verfügung steht, und andererseits mehr unverändertes Amphetamin zurücklassen. Zumindest für die Hydroxylierung von Amphetamin und Methamphetamin ist die Beteiligung von CYP2D6 an der Ringhydroxylierung schon gezeigt worden (Lin, Di Stefano, Schmitz, Hsu, Ellis, Lennard, Tucker, Cho, 1997; Bach, Coutts, Baker, 1999; Lin, Kumagai, Hiratsuka, Narimatsu, Suzuki, Funae, Distefano, Cho, 1995; Moody, Ruangyuttikarn, Law, 1990; Law, Slawson, Moody, 2000). Für Selegilin (*R-(-)-N-*methyl-(1-phenyl-2-propyl)-2-propinylamin) -ebenfalls ein Amphetamin Precursor, der zu Amphetamin und Methamphetamin *N-*desalkyliert wird- wird eine CYP2D-Beteiligung an der Ringhydroxylierung zumindest diskutiert (Scheinin, Anttila, Dahl, Karnani, Nyman, Taavitsainen, Pelkonen, Bertilsson, 1998).

Offensichtlich spiegeln die *in vitro*-Ergebnisse bezüglich der Amphetamin-Bildung in pHLM, PM HLM und Chinidin-behandelten pHLM nicht die *in vivo*-Ergebnisse aus den verschiedenen Rattenmodellen wider. Das mag durch die deutlich geringere Hydroxylierungsrate unter *in vitro*-Bedingungen erklärbar sein. Hier sollte man bedenken, dass die entstandenen Hydroxy-Metaboliten unter *in vivo*-Bedingungen sofort nach ihrer Funktionalisierung konjugiert werden und so aus dem Reaktions-gleichgewicht entfernt werden. Unter *in vitro*-Bedingungen findet eine solche Konjugation nicht statt. Tatsächlich zeigte sich, dass die gemessene Konzentration an Hydroxy-Fenproporex in den getesteten *in vitro*-Systemen extrem gering war im Vergleich zu der von Amphetamin.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Fenproporex *N*-Desalkylierung zu Amphetamin durch vier verschiedene CYP Isoenzyme katalysiert wird: CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6 und CYP3A4. Unabhängig davon, welches dieser 4 Isoenzyme nun die Hauptrolle bei dieser Reaktion spielt, kann jedes einzelne davon für interindividuelle Schwankungen verantwortlich sein. CYP1A2 ist induzierbar (z.B. durch Zigarettenrauch) (Sesardic, Pasanen, Pelkonen, Boobis, 1990), CYP2D6 wird polymorph exprimiert (Ingelman-Sundberg, 2002), die CYP3A4-Expression in der Leber schwankt interindividuell um das 40fache (Wojnowski, 2004) und auch CYP2B6 wurde in neuerer Zeit als polymorph beschrieben (Klein, Lang, Saussele, Barbosa-Sicard, Schunck, Eichelbaum, Schwab, Zanger, 2005; Eichelbaum, Ingelman-Sundberg, Evans, 2005).

Wie die *in vivo*-Ergebnisse gezeigt haben, könnten bei PM Individuen (immerhin 7% der Kaukasier) nach Einnahme von Fenproporex höhere Amphetaminkonzentrationen im Blut auftreten als bei Extensive Metabolizern. Dies könnte in der Forensischen Toxikologie oder bei der Doping-Kontrolle eine Rolle spielen. Außerdem könnte die Einnahme von Medikamenten, die CYP2D6 Hemmstoffe sind (z.B. Paroxetin und Fluoxetin (Crewe, Lennard, Tucker, Woods, Haddock, 1992)), ebenfalls zu erhöhten Amphetaminkonzentrationen im Blut führen. Gewissheit darüber können allerdings nur *in vivo*-Studien am Menschen bringen, die im Rahmen dieser Arbeit allerdings aus ethischen Gründen nicht durchgeführt werden konnten.

5. LITERATUR

- Bach,M.V., R.T.Coutts, G.B.Baker (1999) Involvement of CYP2D6 in the in vitro metabolism of amphetamine, two N- alkylamphetamines and their 4methoxylated derivatives. Xenobiotica 29: 719-732
- Berthou, F., D.Ratanasavanh, C.Riche, D.Picart, T.Voirin, A.Guillouzo (1989) Comparison of caffeine metabolism by slices, microsomes and hepatocyte cultures from adult human liver. Xenobiotica 19: 401-417
- Bertilsson,L. (1995) Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. Clin.Pharmacokinet. 29: 192-209
- Boobis,A.R., D.Sesardic, B.P.Murray, R.J.Edwards, A.M.Singleton, K.J.Rich, S.Murray, R.de-la-Torre, J.Segura, O.Pelkonen, M.Pasanen, S.Kobayashi, T.Zhi-Guang, D.S.Davies (1990) Species variation in the response of the cytochrome P-450- dependent monooxygenase system to inducers and inhibitors. Xenobiotica 20: 1139-1161
- Bourrie, M., V.Meunier, Y.Berger, G.Fabre (1996) Cytochrome P450 isoform inhibitors as a tool for the investigation of metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes. J.Pharmacol.Exp.Ther. 277: 321-332
- Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem. 72: 248-254
- Busby,W.F., Jr., J.M.Ackermann, C.L.Crespi (1999) Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNAexpressed human cytochromes P-450. Drug Metab.Dispos. 27: 246-249

- Cession-Fossion,A. (1970) [Some pharmacological properties of fenproporex in rats]
 Sur quelques proprietes pharmacologiques du fenproporex chez le rat. Arch.Int.Pharmacodyn.Ther. 187: 192-198
- Chauret, N., A.Gauthier, D.A.Nicoll-Griffith (1998) Effect of Common Organic Solvents on in Vitro Cytochrome P450-Mediated Metabolic Activities in Human Liver Microsomes. Drug Metab.Dispos. 26: 1-4
- Cheng,Y., W.H.Prusoff (1973) Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. Biochem.Pharmacol. 22: 3099-3108
- Clarke,S.E. (1998) In vitro assessment of human cytochrome P450.
 Xenobiotica 28: 1167-1202
- Cody, J.T., S.Valtier, S.Stillman (1999) Amphetamine and fenproporex levels following multidose administration of fenproporex. J.Anal.Toxicol. 23: 187-194
- Coutts,R.T., A.J.Nazarali, G.B.Baker, F.M.Pasutto (1986) Metabolism and disposition of N-(2-cyanoethyl)amphetamine (fenproporex) and amphetamine: study in the rat brain. Can.J.Physiol.Pharmacol. 64: 724-728
- Crewe,H.K., M.S.Lennard, G.T.Tucker, F.R.Woods, R.E.Haddock (1992) The effect of selective serotonin re-uptake inhibitors on cytochrome P4502D6 (CYP2D6) activity in human liver microsomes. Br.J.Clin.Pharmacol. 34: 262-265
- de la Torre,R., R.Badia, G.Gonzalez, M.Garcia, M.J.Pretel, M.Farre, J.Segura (1996) Cross-reactivity of stimulants found in sports drug testing by two fluorescence polarization immunoassays. J.Anal.Toxicol. 20: 165-170

- Easterbrook, J., C.Lu, Y.Sakai, A.P.Li (2001) Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. Drug Metab.Dispos. 29: 141-144
- Eichelbaum, M., O.Burk (2001) CYP3A genetics in drug metabolism. Nat.Med. 7: 285-287
- Eichelbaum, M., M.Ingelman-Sundberg, W.E.Evans (2005)
 Pharmacogenomics and Individualized Drug Therapy. Annu.Rev.Med.
 [Epub ahead of print]
- Flockhart, D.A. (1995) Drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P450 2C19. Clin.Pharmacokinet. 29 Suppl 1: 45-52
- Forth,W., D.Henschler, W.Rummel, U.Förstermann, K.Starke (2001)
 Pharmakologie und Toxikologie. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W.,
 Förstermann, U., Starke, K. 8. München, Urban & Fischer.
- Guengerich,F.P., N.A.Hosea, A.Parikh, P.L.Bell, W.W.Johnson,
 E.M.Gillam, T.Shimada (1998) Twenty years of biochemistry of human P450s: purification, expression, mechanism, and relevance to drugs. Drug Metab.Dispos. 26: 1175-1178
- Hertel,G., W.Fallot-Burghardt (1978) [Treatment of obese female patients with fenproporex within the framework of gynecologic practice] Behandlung adiposer Patientinnen mit Fenproporex im Rahmen einer gynakologischen Fachpraxis. Fortschr.Med. 96: 2380-2382
- Hiramatsu,M., Y.Kumagai, S.E.Unger, A.K.Cho (1990) Metabolism of methylenedioxymethamphetamine: formation of dihydroxymethamphetamine and a quinone identified as its glutathione adduct. J.Pharmacol.Exp.Ther. 254: 521-527

- 24. Ingelman-Sundberg,M. (2002) Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. Toxicology 181-182: 447-452
- Klein,K., T.Lang, T.Saussele, E.Barbosa-Sicard, W.H.Schunck, M.Eichelbaum, M.Schwab, U.M.Zanger (2005) Genetic variability of CYP2B6 in populations of African and Asian origin: allele frequencies, novel functional variants, and possible implications for anti-HIV therapy with efavirenz. Pharmacogenet.Genomics 15: 861-873
- Kobayashi,S., S.Murray, D.Watson, D.Sesardic, D.S.Davies, A.R.Boobis (1989) The specificity of inhibition of debrisoquine 4-hydroxylase activity by quinidine and quinine in the rat is the inverse of that in man. Biochem.Pharmacol. 38: 2795-2799
- Korzekwa,K.R., N.Krishnamachary, M.Shou, A.Ogai, R.A.Parise, A.E.Rettie, F.J.Gonzalez, T.S.Tracy (1998) Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites. Biochemistry 37: 4137-4147
- Kraemer, T., H.H.Maurer (1998) Determination of amphetamine, methamphetamine and amphetamine-derived designer drugs or medicaments in blood and urine [review]. J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl. 713: 163-187
- Kraemer, T., H.H.Maurer (2002) Toxicokinetics of amphetamines: Metabolism and toxicokinetic data of designer drugs, of amphetamine, methamphetamine and their N-alkyl derivatives [review]. Ther.Drug Monit. 24: 277-289
- 30. Kraemer, T., L.D.Paul (2007) Bioanalytical procedures for determination of drugs of abuse in blood. Anal.Bioanal.Chem. 388: 1415-1435

- Kraemer, T., T.Pflugmann, M.Bossmann, N.M.Kneller, F.T.Peters,
 L.D.Paul, D.Springer, R.F.Staack, H.H.Maurer (2004) Fenproporex Ndealkylation to amphetamine-enantioselective in vitro studies in human liver microsomes as well as enantioselective in vivo studies in Wistar and Dark Agouti rats. Biochem.Pharmacol. 68: 947-957
- Kraemer, T., G.A. Theis, A.A. Weber, H.H. Maurer (2000) Studies on the metabolism and toxicological detection of the amphetamine-like anorectic fenproporex in human urine by gas chromatography-mass spectrometry and fluorescence polarization immunoassay (FPIA). J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl. 738: 107-118
- Law,M.Y., M.H.Slawson, D.E.Moody (2000) Selective involvement of cytochrome P450 2D subfamily in in vivo 4-hydroxylation of amphetamine in rat. Drug Metab.Dispos. 28: 348-353
- Lin,L.Y., E.W.Di Stefano, D.A.Schmitz, L.Hsu, S.W.Ellis, M.S.Lennard, G.T.Tucker, A.K.Cho (1997) Oxidation of methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine by CYP2D6. Drug Metab.Dispos. 25: 1059-1064
- Lin,L.Y., Y.Kumagai, A.Hiratsuka, S.Narimatsu, T.Suzuki, Y.Funae,
 E.W.Distefano, A.K.Cho (1995) Cytochrome P4502D isozymes catalyze the 4-hydroxylation of methamphetamine enantiomers. Drug Metab.Dispos. 23: 610-614
- McLure, J.A., J.O.Miners, D.J.Birkett (2000) Nonspecific binding of drugs to human liver microsomes. Br.J.Clin.Pharmacol. 49: 453-461
- Meyer, U.A. (2000) Pharmacogenetics and adverse drug reactions. Lancet
 356: 1667-1671
- Moeller, M.R., T.Kraemer (2002) Drugs of abuse monitoring in blood for control of driving under the influence of drugs [review]. Ther.Drug Monit. 24: 210-221

- Moody,D.E., W.Ruangyuttikarn, M.Y.Law (1990) Quinidine inhibits in vivo metabolism of amphetamine in rats: impact upon correlation between GC/MS and immunoassay findings in rat urine. J.Anal.Toxicol. 14: 311-317
- 40. Musshoff,F. (2000) Illegal or legitimate use? Precursor compounds to amphetamine and methamphetamine [review]. Drug Metab.Rev. 32: 15-44
- 41. Nakahara,Y. (1995) Detection and diagnostic interpretation of amphetamines in hair. Forensic Sci.Int. 70: 135-153
- 42. Nakahara,Y., R.Kikura (1996) Hair analysis for drugs of abuse. XIII. Effect of structural factors on incorporation of drugs into hair: the incorporation rates of amphetamine analogs. Arch.Toxicol. 70: 841-849
- Nazarali,A.J., G.B.Baker, R.T.Coutts, F.M.Pasutto (1983) Amphetamine in rat brain after intraperitoneal injection of N-alkylated analogues.
 Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry 7: 813-816
- 44. Nelson, D.R., L.Koymans, T.Kamataki, J.J.Stegeman, R.Feyereisen, D.J.Waxman, M.R.Waterman, O.Gotoh, M.J.Coon, R.W.Estabrook, I.C.Gunsalus, D.W.Nebert (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics 6: 1-42
- Omura, T., R.Sato (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver micosomes-I. Evidence for its hemoprotein nature. J.Biol.Chem. 239: 2370-2378
- Ono,S., T.Hatanaka, H.Hotta, T.Satoh, F.J.Gonzalez, M.Tsutsui (1996) Specificity of substrate and inhibitor probes for cytochrome P450s: evaluation of in vitro metabolism using cDNA-expressed human P450s and human liver microsomes. Xenobiotica 26: 681-693

- Pearce,R.E., C.J.McIntyre, A.Madan, U.Sanzgiri, A.J.Draper, P.L.Bullock, D.C.Cook, L.A.Burton, J.Latham, C.Nevins, A.Parkinson (1996) Effects of freezing, thawing, and storing human liver microsomes on cytochrome P450 activity. Arch.Biochem.Biophys. 331: 145-169
- Peters,F.T., T.Kraemer, H.H.Maurer (2002) Drug testing in blood: validated negative-ion chemical ionization gas chromatographic-mass spectrometric assay for determination of amphetamine and methamphetamine enantiomers and its application to toxicology cases. Clin.Chem. 48: 1472-1485
- 49. Pfeifer, S., P.Pflegel, H.H.Borchert (1995) Biopharmazie: Pharmakokinetik-Bioverfügbarkeit-Biotransformation. Berlin, Ullstein Mosby.
- 50. Rang,H.P., M.M.Dale, J.M.Ritter (1999) Pharmacology. 4 London, Churchill Livingston.
- Rendic,S., F.J.Di Carlo (1997) Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. Drug Metab.Rev. 29: 413-580
- Scheinin,H., M.Anttila, M.L.Dahl, H.Karnani, L.Nyman, P.Taavitsainen,
 O.Pelkonen, L.Bertilsson (1998) CYP2D6 polymorphism is not crucial for the disposition of selegiline. Clin.Pharmacol.Ther. 64: 402-411
- 53. Sesardic, D., M.Pasanen, O.Pelkonen, A.R.Boobis (1990) Differential expression and regulation of members of the cytochrome P450IA gene subfamily in human tissues. Carcinogenesis 11: 1183-1188
- 54. Smith, D.A., S.M.Abel, R.Hyland, B.C.Jones (1998) Human cytochrome P450s: selectivity and measurement in vivo. Xenobiotica 28: 1095-1128
- Tognoni,G., P.L.Morselli, S.Garattini (1972) Amphetamine concentrations in rat brain and human urine after fenproporex administration. Eur.J.Pharmacol. 20: 125-126

- Tucker,G.T., J.B.Houston, S.M.Huang (2001) Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential--toward a consensus. Pharm.Res. 18: 1071-1080
- von-Bahr,C., C.G.Groth, H.Jansson, G.Lundgren, M.Lind, H.Glaumann (1980) Drug metabolism in human liver in vitro: establishment of a human liver bank. Clin.Pharmacol.Ther. 27: 711-725
- Wojnowski,L. (2004) Genetics of the variable expression of CYP3A in humans [review]. Ther.Drug Monit. 26: 192-199
- 59. Yan,Z., G.W.Caldwell (2001) Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery. Curr.Top.Med.Chem. 1: 403-425
- Yin,H., P.Tran, G.E.Greenberg, V.Fischer (2001) Methanol solvent may cause increased apparent metabolic instability in in vitro assays. Drug Metab.Dispos. 29: 185-193

6. PUBLIKATIONEN

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden als Vortrag, als Proceeding und als *peer reviewed* Originalarbeit publiziert:

T. Kraemer, **N.M. Kneller**, F.T. Peters and H.H. Maurer. CYP2D6 polymorphism is not crucial for the N-dealkylation of prenylamine to amphetamine – In-vitro studies using rat and human liver microsomes. *Abstract Book of the XIIth GTFCh Symposium in Mosbach*, **2001**.

T. Kraemer, **N.M. Kneller**, F.T. Peters and H.H. Maurer. CYP2D6 polymorphism is not crucial for the N-dealkylation of amphetamine derivatives – In-vitro studies using rat and human liver microsomes. *Abstract Book of the 39th International TIAFT Meeting in Prague*, **2001**.

T. Kraemer, P.A. Marks, **N.M. Kneller**, F.T. Peters, D. Springer, L.D. Paul, R.F. Staack and H.H. Maurer. Involvement of Human Hepatic Cytochrome P450 Isoenzymes in the Metabolism of the Amphetamine Precursor Drug Clobenzorex. *Abstract Book of the XIIIth GTFCh Symposium in Mosbach*, **2003**.

T. Kraemer, **N.M. Kneller**, P.A. Marx, F.T. Peters and H.H. Maurer. Identification of cytochrome P450 isoforms involved in the metabolism of the amphetamine precursor drug clobenzorex in human liver microsomes. In *Proceedings of the XIIIth GTFCh Symposium in Mosbach*, F. Pragst and R. Aderjan, Eds. Helm-Verlag, Heppenheim (Germany), **2003.**

T. Kraemer, M. Bossmann, T. Pflugmann, **N.M. Kneller**, F.T. Peters and H.H. Maurer. Fenproporex N-dealkylation to amphetamineenantioselective in vitro studies in human liver microsomes as well as enantioselective in vivo studies in Wistar and Dark Agouti rats. *Biochem. Pharmacol.* 68: 947-957 (2004).

7. DANK

Die wissenschaftlichen Anregungen und die Unterstützung vieler Personen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich möchte mich deshalb herzlich bedanken bei:

Herrn Univ.-Prof. Dr. Hans H. Maurer für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis. Hier konnte ich jederzeit Fragen stellen und erhielt hilfreiche Antworten und Anregungen.

Herrn Prof. Dr. Thomas Krämer für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas und für die stete Hilfe und Beratung bei der Durchführung der Versuche und Abfassung der vorliegenden Arbeit, insbesondere für die Bereitschaft, jederzeit bei Problemen zu helfen.

Meinen Kollegen im Arbeitskreis Liane Paul, Carsten Kratzsch, Frank Peters, Dietmar Springer und Roland Staack für die freundliche Unterstützung, Hilfestellungen und wissenschaftlichen Diskussionen.

Herrn A.A. Weber für die ständige Einsatzbereitschaft, Wartung und Pflege der Meßgeräte und für seine Hilfe bei technischen Fragen.

8. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name:	Kneller
Vorname:	Nicole Marion
Geburtsdatum:	19.01.1977
Geburtsort:	Kaiserslautern
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Konfession:	evangelisch
Eltern:	Renate Johanna Kneller, geb. Schröer
	Rudolf Hermann Kneller

Schulausbildung

1983-1987	Grundschule Ramstein-Miesenbach
1987-1996	Gymnasium Landstuhl
21.06.1996	Allgemeine Hochschulreife

Studium

1996-2003	Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes
15.09.1998	Ärztliche Vorprüfung
31.08.1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
28.03.2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
29.04.2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

01.07.2003 - 30.09.2004	Ärztin im Praktikum in der Chirurgischen Abteilung des St.
	Johannis Krankenhaus Landstuhl
seit 01.10.2004	Assistenzärztin in der Chirurgischen Abteilung des St.
	Johannis Krankenhaus Landstuhl