

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Funktion und Aufbau der menschlichen Haut

Mit einer Ausdehnung von 1,5 bis 2 m² bei einem Erwachsenen und einem Anteil am Körpergewicht von 7 bis 10% stellt sie das Kontaktorgan zwischen Umwelt und Organismus dar. Die Haut nimmt dabei folgende wesentliche Funktionen wahr (nach [143]):

- Als Sinnesorgan dient sie der Wahrnehmung von Schmerz-, Tast- und Temperaturreizen.
- Sie übernimmt Barriere- und Reservoirfunktionen, d.h. der Wasserhaushalt wird reguliert, eine Austrocknung verhindert. Gleichzeitig bietet die Haut Schutz vor dem Eindringen von exogenen Substanzen.
- Die Haut erfüllt grundsätzliche Schutzfunktionen, sie bildet einen mechanischen Schutz, sie schützt den Organismus vor Infektionen, vor Licht und ist mit an der Regulation der Temperatur beteiligt.
- Des Weiteren erfüllt die Haut immunologische Aufgaben und stellt eines der Sekretionsorgane des Menschen dar

Den vielfältigen Funktionen der Haut entspricht ihr anatomischer Aufbau in verschiedenen Schichten. Sie gliedert sich in die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut) und die Subcutis (Unterhaut). In der Abb. 3.1.1 ist der Aufbau der humanen Haut schematisch dargestellt.

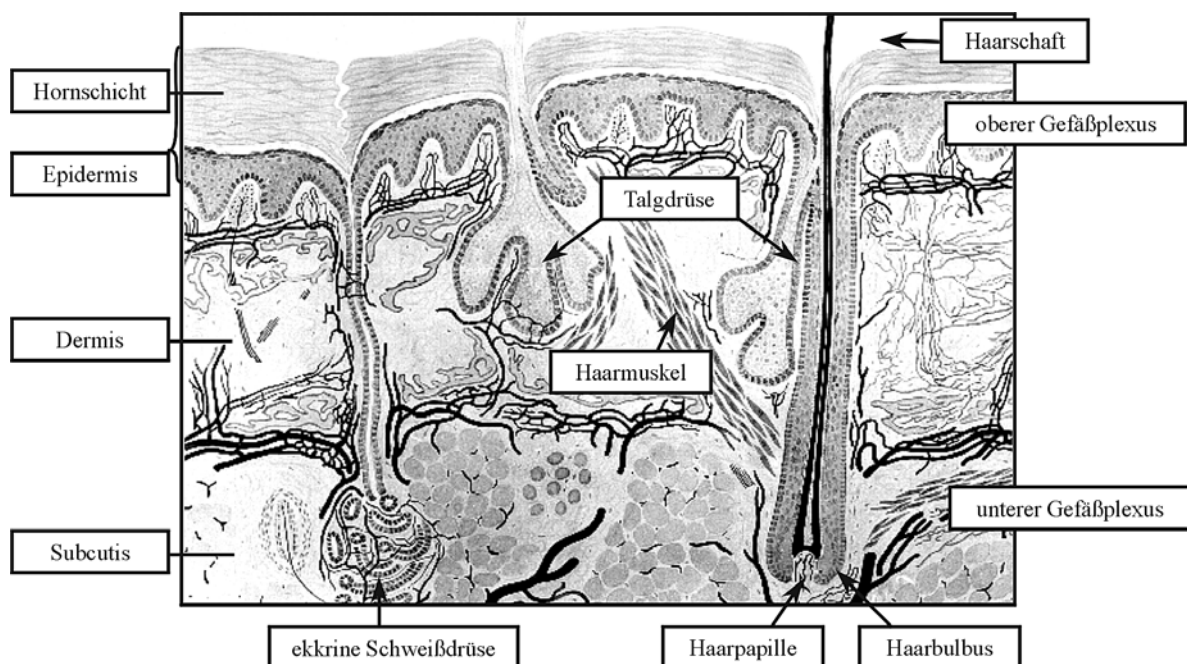


Abb. 3.1.1: Aufbau der menschlichen Haut (modifiziert nach [143])

Die EPIDERMIS ist ebenfalls in horizontalen Schichten angeordnet. Man unterscheidet hier zwischen dem an die Dermis angrenzenden Stratum basale (Basalzellschicht), dem darauf folgenden Stratum spinosum (Stachelzellschicht), sowie dem Stratum granulosum (Körnerzellschicht) und dem abschließenden Stratum corneum (Hornschicht). Die nachfolgenden Abbil-

dungen 3.1.2 a) und b) zeigen einen histologischen Querschnitt und eine schematische Darstellung insbesondere der Epidermis.

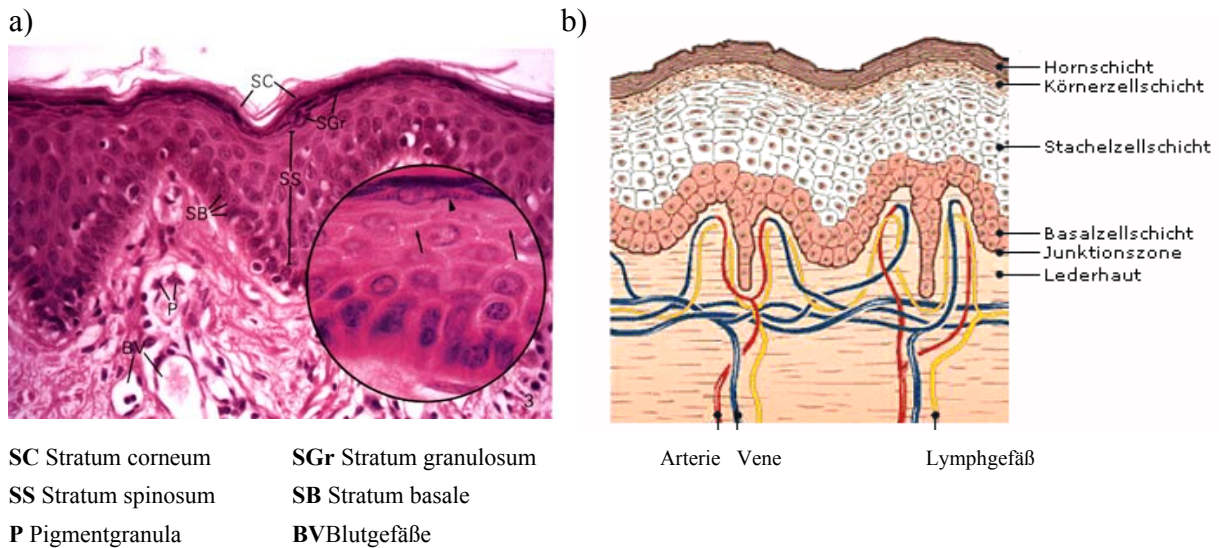


Abb. 3.1.2: Aufbau der menschlichen Epidermis

a) histologischer Querschnitt (Vergrößerung 320-fach, Ausschnitt 640-fach) [168]

b) schematische Darstellung der Kutis (modifiziert nach [4])

Mit ca. 90% sind die Keratinozyten die vorherrschende Zellpopulation in der Epidermis. Unter Normalbedingungen werden die Keratinozyten im Stratum basale gebildet und gelangen im Laufe ihrer Differenzierung durch die anderen Schichten an Hautoberfläche und werden dort als Hornzellen abgeschilfert. Die Bildung der Keratinozyten erfolgt in der tiefsten Schicht der Epidermis, der Basalzellschicht, unter Zellteilung, dabei bleibt zumeist eine Tochterzelle im Verband des Stratum basale, die andere Tochterzelle gelangt (häufig nach weiterer Teilung) als Stachelzelle in das Stratum spinosum. Hier nehmen die Keratinozyten an Volumen zu und flachen ab. Im Stratum granulosum werden die Vorstufen des Keratins der Hornschicht gebildet, es beginnt die Verhornung und das Absterben der Zellen durch zunehmende Degeneration der Zellkerne. In der Hornschicht liegt der ehemalige Keratinozyt als kernlose, voll keratinisierte Zelle vor, die nunmehr als Korneozyt bezeichnet wird. In einem gesunden Organismus dauert dieser Prozess, man bezeichnet ihn auch als epidermale Differenzierung oder Enddifferenzierung, durchschnittlich 28 bis 30 Tage.

Die Vorbereitung der Differenzierung der Keratinozyten beginnt bereits im Stratum basale mit der Synthese von Zytokeratinen. Auf dem Weg durch die Epidermis entstehen Keratinfilamente, welche im oberen Stratum spinosum mit Profilaggrin Aggregate bilden, die im Stratum granulosum sichtbar werden. Durch den Zerfall des Profilaggrin entsteht Filaggrin, das die Vernetzung der Keratinfilamente zu Keratin abschließt. Im oberen Stratum spinosum erfolgt die Synthese einer Reihe von Proteinen, darunter das Involucrin, die sich an die innere Zellmembran der Keratinozyten im Stratum granulosum anlagern. Beim Übergang zum Korneozyt entsteht unter Einwirkung von Transglutaminasen eine quer vernetzte Hüllmembran

mit hoher chemischer Resistenz, sie wird auch als „cornified envelope“ bezeichnet. Aus diesem Grund werden hauptsächlich Profilaggrin, Filaggrin, unterschiedliche Keratine und Involucrin als Marker genutzt, um Aussagen zu Proliferation, Differenzierung und Wachstum von Keratinozyten machen zu können. [26;29;30;94;98;137;143;179;188]

Innerhalb der Zelle kommt den Cytochrom P450- Enzymen für biotransformatorische Prozesse eine besondere Bedeutung zu. In Säugetieren sind diese CYP- Enzyme membranständig im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums (EndR) und der Mitochondrien lokalisiert. Man unterscheidet zwischen dem rauhen EndR (granuläres, rough) mit Ribosomenbesatz und dem glatten EndR (agranuläres, smooth). Das raue EndR wird besonders in Zellen intensiver Proteinsynthese exprimiert. Hier dient es der Synthese und dem Transport dieser Proteine. Das glatte EndR, das nicht von Ribosomen besetzt wird, findet sich besonders in Zellen, die Lipide, Phospholipide, Fettsäuren oder Steroidhormone produzieren, auf- oder abbauen. Im glatten EndR sind auch die gebundenen Enzyme des Cytochrom P-450 lokalisiert. Bei vermehrter Proteinsynthese und zunehmender metabolischer Aktivität nimmt der Anteil an EndR innerhalb der Zelle zu [103;194]

3.2 UV-Strahlung und deren Einfluss auf die Haut

Aufgrund ihrer großen Kontaktfläche zur Umwelt ist die Haut der UV- Strahlung besonders intensiv ausgesetzt. Bei der UV- Strahlung handelt es sich um elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 200 bis 400 nm. Diese wird nochmals unterteilt in die Bereiche UVC (200 – 280 nm); UVB (280 – 320 nm) und UVA (320 – 400 nm), wobei gilt, je kürzer die Wellenlänge, desto energiereicher die Strahlung. Mitunter wird die Grenze zwischen UVA und UVB mit 315 nm angegeben. Während die UVC Strahlung vom Sauerstoff in der Atmosphäre und von der Ozonschicht in der Stratosphäre nahezu vollständig absorbiert wird, erreicht die UVA- Strahlung und der überwiegende Teil der UVB Strahlung die Erdoberfläche und ist somit für die menschliche Haut von Belang. Ein großer Teil der auf der Haut auftreffenden UV-Strahlung wird reflektiert, diffus gestreut oder im Stratum corneum absorbiert (ca. 90% der einfallenden UVB- und 60% der UVA- Strahlung). Daneben kann ein erheblicher Teil in Abhängigkeit von der Wellenlänge in unterschiedliche Hautschichttiefen eindringen. In Abhängigkeit von ihrem Energiegehalt wird UVA und UVB- Strahlung unterschiedlich stark von der Haut absorbiert, wodurch die Strahlung abgeschwächt und die Eindringtiefe begrenzt wird. Allgemein nimmt die Eindringtiefe des UV-Lichtes mit zunehmendem Energiegehalt ab, so dass die kurzwellige, energiereiche UVB-Strahlung bis in die Epidermis, die langwelligere, energieärmere UVA- Strahlung hingegen bis in dermales und teilweise subcutanes Gewebe einzudringen vermag.

Die Wirkung, die durch die ultraviolette Strahlung erzielt wird, ist zum Teil erwünscht und lebensnotwendig, andererseits kann es durch zu hohe Strahlen- Belastungen zu teilweise drasti-

schen Schädigungen der Haut kommen. Die UV-Strahlung stimuliert das Immunsystem und fördert das Allgemeinbefinden der Menschen. Bei getrennter Betrachtung der Auswirkungen von UVA und UVB auf den humanen Organismus weiß man, dass UVB-Strahlung in moderaten Dosen z.B. für die Synthese von Vitamin D verantwortlich ist, ein wichtiger Schritt, damit es nicht zu Rachitis, einer Vitamin-D-Mangelkrankheit, kommt. Durch UVB werden auch die Melanozyten stimuliert.

Da Licht der UVB- Wellenlänge in die Epidermis gelangt, können bereits bei einer physiologischen Lichtexposition pathologische Hautreaktionen auftreten. Das klinische Bild zeigt sich besonders bei Überschreiten der minimalen Erythemdosis in Form von Rötung, Erythem- und Blasenbildung. Es kann zu nekrotischen Veränderungen mit dem Absterben von Zellen kommen. Es ist auch möglich, dass die Keratinozyten bis ins Stratum basale geschädigt werden und nicht nur deren Teilungsfähigkeit eingeschränkt wird, sondern es zu Veränderungen an der Erbsubstanz kommt. Hier sind vor allem die Bildung stabiler Dimere aus nicht komplementären Basen oder DNA- Strangbrüche zu nennen. In der Regel werden solche Schäden durch körpereigene Reparatursysteme, zu denen z.B. der programmierte Zelltod (Apoptose) gehört, beseitigt. Ist dieses System überfordert oder ist die Reparatur nicht komplett, resultieren Mutationen, die in der Spätfolge zu Hautkrebs führen können. Einige Zellen, z.B. Melanozyten, sind auch in der Lage, Proteine zu produzieren, durch die die körpereigenen Reparatursysteme unterlaufen werden, wodurch Zellen mit mutierter DNA überleben.

UVA- Strahlen bewirken bei chronischer Einwirkung eine vorzeitige Hautalterung, durch Zerstörung von Kollagenfasern in der Dermis. Daneben ist Bildung reaktiver Sauerstoffspezies von Bedeutung. Diese sehr kurzlebigen aber hoch reaktiven Sauerstoffabkömmlinge besitzen ein großes Potential, der Haut oxidative Schäden zuzufügen. Dies kann sowohl die DNA, als auch Proteine und Lipide betreffen, in der Folge sind DNA- Basenmodifikationen oder Lipidperoxidationen möglich. Während die Eindringtiefe der UVB- Strahlung meist auf die Epidermis begrenzt ist, muss für die UVA- Strahlung mit entsprechenden Schäden auch in tieferen Hautschichten gerechnet werden. [9;51;63;89;144;158;213]

3.3 Die HaCaT- Keratinozyten- Zelllinie

Die Abkürzung HaCaT steht für *Human adult low Calcium high Temperature* keratinocytes. Der Name charakterisiert die Herkunft der Zellen und die Bedingungen bei der Etablierung der Zelllinie. Es handelt sich um eine permanente, epitheliale humane Zelllinie, die als phänotypisch spontan transformiert, aber nicht tumorigen eingestuft wird. Sie entstammt der Peripherie eines primären malignen Melanoms der oberen Rückenhaut eines 62jährigen Patienten. Etabliert und in vielfältiger Hinsicht charakterisiert wurde die HaCaT- Zelllinie Ende der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg von der Arbeitsgruppe Fusenig et al. [26;41;112;197]. Für HaCaT- Zellen ist es charakteristisch,

dass sie ihre volle terminale Differenzierungsfähigkeit in Korneozyten behalten. Eine wichtige Rolle spielt der Calciumgehalt. Wenn der Calciumgehalt von niedrig (0,09 mM [106] bzw. 0,15 mM [48]) auf hoch (1.5 mM [48] bzw. 2.0 mM [106]) (= physiologisch) steigt, so steigt auch die Differenzierungsrate. Dies bedeutet, hohe Ca- Konzentrationen im physiologischen Bereich (> 1,0 mM) führen verstärkt zu einer terminalen Differenzierung und Stratifizierung, wohingegen niedrige Konzentrationen (< 0,1 mM), die Bildung eines adhärenen Monolayers proliferierender Keratinozyten begünstigen [154;155;198].

Für die breite Verwendung der HaCaT- Zellen erwies sich die hohe Immortalität (>140 Passagen möglich) als besonders günstig. In einer Vielzahl von Studien zur Vergleichbarkeit der Eigenschaften von HaCaT und nativen Keratinozyten konnten Gemeinsamkeiten im biochemischen Verhalten, jedoch auch Unterschiede in der Differenzierungsfähigkeit aufgezeigt werden [76;180]. HaCaT- Zellen bilden, ebenso wie NHK (Normal adult Human Keratinocytes = native Keratinozyten), einen Monolayer und zeigen die gleiche phänotypische Morphologie. Es wurden Vergleiche in der Zelladhäsion, den Zellinteraktionen und in der Reaktion auf zytotoxische Ereignisse gefunden [28]. Auch Tests, inwiefern Keratinozyten eine Rolle bei der frühen Immunantwort auf sensibilisierende Agenzien bei der Ausbildung einer allergischen Kontaktdermatitis spielen, wurden mit NHK und HaCaT durchgeführt [117]. Ebenso liegen Daten für den Einsatz von HaCaT, teilweise im Vergleich zu NHK, zur Ermittlung von Toxizitäten vor [17;28;31;46;56]. Für den Einsatz in Studien mit UV-Bestrahlung lieferten HaCaT- Zellen bereits vielfältige Daten [64;71;152;200]. Allerdings wurde nur in einer Studie die biotransformatorische Kapazität zwischen NHK und HaCaT, neben einer weiteren Zelllinie (SVK14), verglichen. Dabei wurden die 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylase (ECOD)-, die 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD)- und die Pentoxyresorufin-O-Dealkylase (PROD)-Aktivität im Zusammenhang mit der Induktion per 3- Methylcholanthren (3-MC) und der Hemmung per Proadifen untersucht. Für die beiden ersten Reaktionen konnte der Nachweis in HaCaT- Zellen erbracht werden, die PROD- Aktivität ließ sich nicht belegen. [42]

3.4 Das Cytochrom P450 – Enzymsystem

Cytochrome sind Proteine, die u.a. in der Atmungskette des tierischen und menschlichen Organismus eine wichtige Rolle spielen, auch in Pflanzen und Mikroorganismen kommen sie vor. Dort sind sie an der Lichtreaktion in den Chloroplasten beteiligt. Die Bezeichnung Cytochrom P450 beruht auf der starken Absorption von Licht der Wellenlänge 450nm nach Reduktion mit Natriumdithionit und Equilibrierung mit Kohlenmonoxid [137]. Bei Cytochrom P450 handelt es sich um die wohl vielfältigste, an metabolischen Reaktionen beteiligte Monooxygenase, die aber auch an anderen Reaktionen, wie Reduktionen beteiligt ist. Im Körper mitverantwortlich für Biotransformationsreaktionen, Hormonbiosynthesen, die Detoxifikation von toxischen Stoffen, spielt das CYP-450 aber auch umgekehrt für die Entstehung toxischer

bis cancerogener Verbindungen aus ehemals unbedenklichen Substanzen eine Rolle [169].

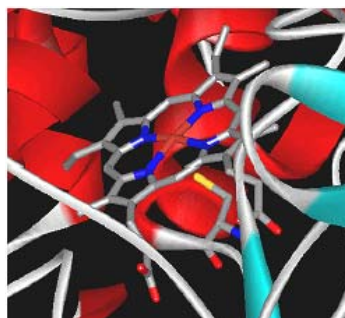


Abb. 3.4.1: Computer- modelliertes Bild mit Blick auf die prosthetische Gruppe des CYP-450 - das Häm aus [53]

Die Untersuchungen zu CYP 450 begannen in den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts. Neben einer Vielzahl von Wissenschaftlern, die sich um die Entdeckung und Mechanismen sowie Induktionsmöglichkeiten und den Nachweis von Spezies- bzw. Geschlechtsunterschiede verdient gemacht haben, werden vor allem die Namen von Omura, T. und Sato, R. mit dem Cytochrom P450 in Verbindung gebracht, die Namensgeber dieses Enzymkomplexes. Verschiedenste Cytochrom P450 Isoenzyme wurden inzwischen in Mensch, Säugetieren, Vögeln, Fischen, Insekten, Pflanzen, Bakterien und Pilzen nachgewiesen [2]. Dabei erstreckt sich deren Verteilung auf nahezu alle Organe und Gewebe mit dem Schwerpunkt an fremdstoffmetabolischer Aktivität in der Leber [22;114].

Erstmals veröffentlichten Nebert et al. 1989 eine Liste von CYP 450- Enzymen mit ihrer Sequenz und Aktivität, der 1991 eine zweite Liste folgte. Diese Liste umfasste 154 Gene, die 27 Genfamilien zuzuordnen waren incl. 10 Familien für Säugetiere [138;139]. Durch die Arbeiten von Nelson et al. und weiteren Arbeitsgruppen konnten bis April 2007 insgesamt 6766 CYP- Gene und 708 Genfamilien identifiziert werden, von denen 101 CYP- Familien auf Tiere entfallen, humane Gene sind gegenwärtig 57 bekannt [6;114;140;141]. In einer Studie von Nelson wurde das komplette CYP- Genmaterial von Maus und Mensch auf genetische Ähnlichkeit und Unterschiede untersucht, um Rückschlüsse auf die Übertragbarkeit der an Mäusen gewonnenen Daten auf den Menschen ziehen zu können [142]. Da die Forschung auf diesem Gebiet ständig weiter geht, stellen Nelson et al., eine auf diesem Fachgebiet derzeit führenden Arbeitsgruppen, neueste Erkenntnisse aktuell im Internet vor [6]. Die auf Nebert zurückgehende Bezeichnung einzelner Cytochrom- Enzyme ergibt sich heute wie folgt:

CYP = Hämthiolatprotein; I = Familie; A = Subfamilie; I = individuelles Enzym ► CYP1A1

Dabei zeichnen sich die Mitglieder einer Familie durch eine mindestens 40%ige Aminosäuresequenzidentität aus. Eine Subfamilie ist laut Nelson [141] durch eine 55%ige Sequenzidentität gekennzeichnet, Ruckpaul [169] beschreibt sie mit 59%iger Identität und Borchert spricht von über 70%iger Homologie der Primärstruktur für eine Subfamilie [22]. Zur Nomenklatur humaner Cytochrom P450- Allele sei an dieser Stelle auf die Internetseite www.imm.ki.se verwiesen [5], dort finden sich, neben den Unterschieden in der Nukleotidsequenz einzelner

Enzyme, Aussagen zu deren Aktivität und eine umfangreiche Referenzliste. Auf der Seite [www. icgeb.org](http://www.icgeb.org) [1] kann man zusätzlich eine sehr umfassende bibliographische Liste zu den Untersuchungen einzelner CYP- Isoenzyme bis 1993 finden.

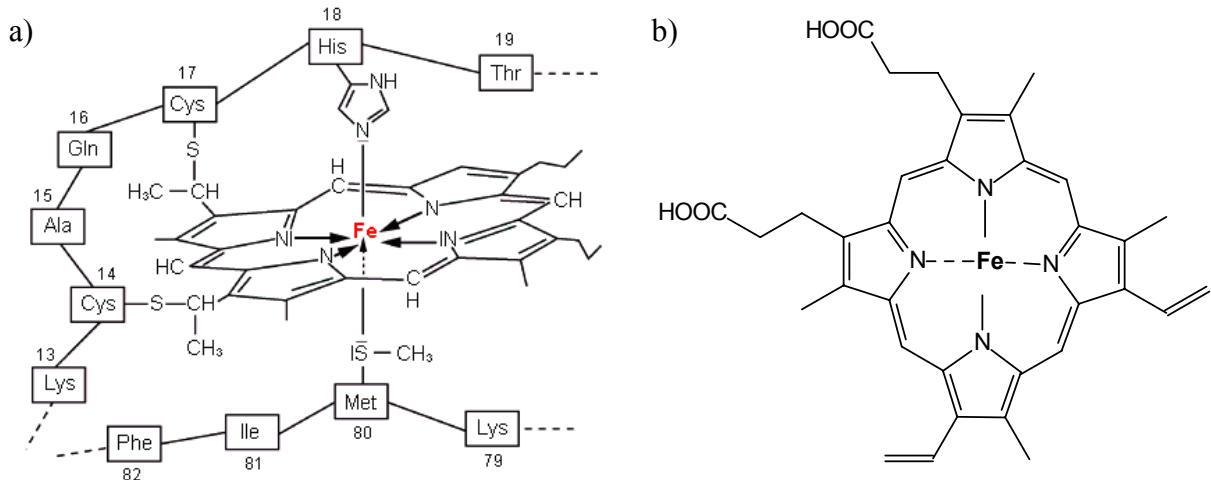
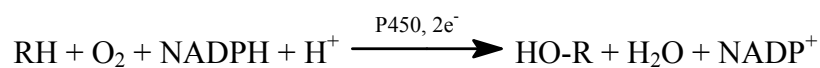


Abb. 3.4.2: Cytochrom- Strukturen:

a) Cytochrom c [3]

b) prosthetische Gruppe des CYP 450 nach [214]

Die Abbildung 3.4.2 a) zeigt einen Ausschnitt des Cytochrom c, einem Protein der Atmungskette, darin wird andeutungsweise die räumliche Struktur des Porphyrin- Ringsystems sichtbar, auch gut erkennbar ist das Eisen als Zentralatom mit seinen vier Pyrrol- Stickstoff- Liganden und die zweimalige koordinative Bindung des Porphyrin zum Schwefel der Cysteine der Seitenkette. Den 5. Liganden bildet hier ein Schwefelatom aus dem Methionin der Seitenkette. Im CYP 450, das dem Cytochrom b zugeordnet wird, entstammt dieser 5. Hämeisenligand einem Cysteinrest, den man aufgrund der Bindung über den Schwefel auch als Mercaptidschwefelliganden bezeichnet. Er ist für die katalytischen und spektralen Eigenschaften des P-450 verantwortlich [22]. Die Formel in der Abbildung 3.4.2 b) stellt die prosthetische Gruppe des CYP 450, das Häm, dar. Im Ruhezustand wird die 6. Koordinationstelle des P-450 durch ein Wassermolekül besetzt. Erst mit der Bindung eines Substratmoleküls wird dieser 6. Ligand verdrängt und die eigentliche Umsetzung entsprechend dem Schema in Abb. 3.4.3 beginnt [22]. Alle CYP- Hämthiolatproteine zeichnen sich grundsätzlich durch das gleiche Reaktionsprinzip aus, sie binden molekularen Sauerstoff, spalten diesen reaktiv und überführen ein Atom Sauerstoff auf das Substrat. Das zweite Sauerstoffatom wird in Form von Wasser freigesetzt. Formal lässt sich dies vereinfacht in einer Gleichung darstellen:



Aus dem Substrat RH wurde der hydrophilere Metabolit R-OH, der in der Folge durch Phase-II- Reaktionen weiter an Hydrophilie zunimmt, womit dessen Ausscheidbarkeit aus dem Organismus erleichtert wird.

Das Schema der P-450 Monooxygenasereaktion lässt sich vereinfacht wie in der folgenden Abbildung wiedergeben (die Darstellung erfolgte angelehnt an [22;93;114;169;214]).

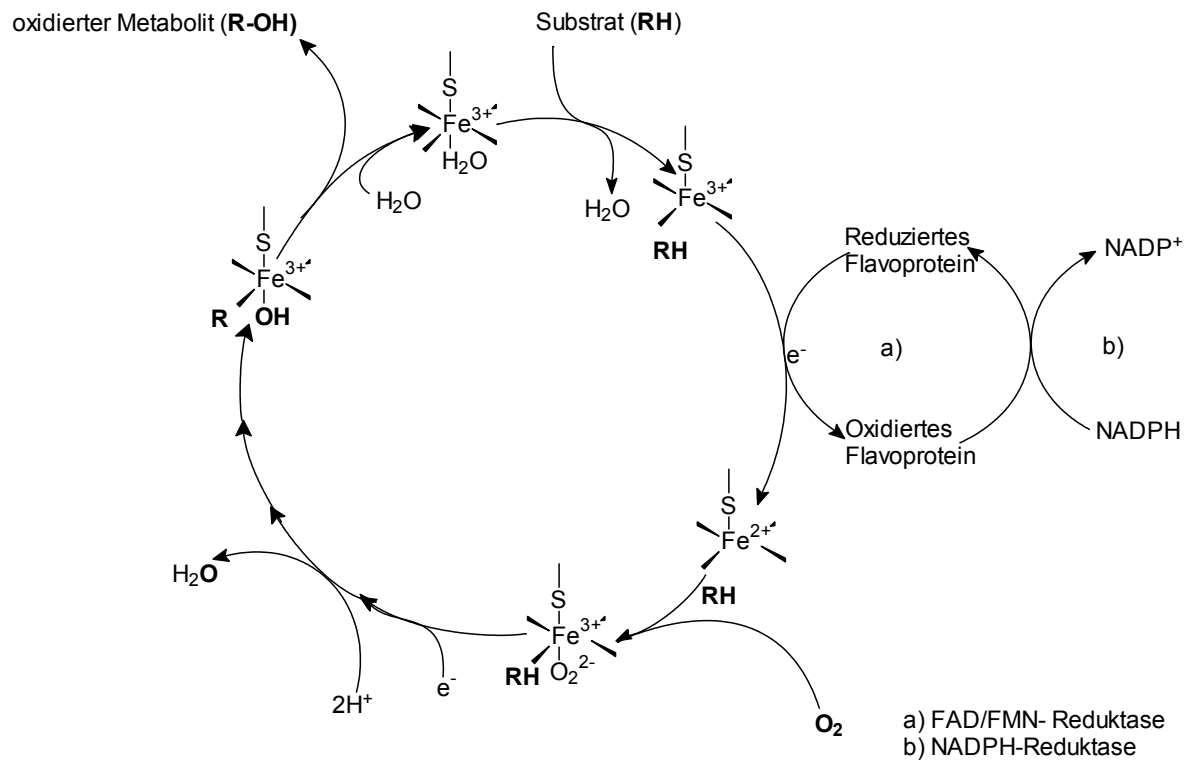


Abb. 3.4.3: Schema der P450 Monooxygenasereaktion

Beginnend mit der Anlagerung des Substrates wird das Wasser als 6. Eisen- Ligand verdrängt. Ein durch die NADPH- Reduktase bereitgestelltes Elektron wird auf das P450 übertragen, es resultiert ein Fe(II)-Komplex. Dieser ist in der Lage das Sauerstoffmolekül zu binden, woraus ein oxygeniertes Intermediat entsteht (auch als "Superoxokomplex" oder "Superoxidanion" bezeichnet). Unter Aufnahme eines weiteren Elektrons und Ausbildung einer Peroxozwischenstufe wird in Gegenwart von Protonen Wasser eliminiert. Über weitere Intermediate wird letztlich das oxygenierte Substratmolekül abgespalten, so dass nach Anlagerung von Wasser das CYP-450 zur erneuten Substrataufnahme bereit steht. (Es sind nur die wesentlichen Schritte graphisch dargestellt.)

S stellt den 5. Hämeisenliganden, den Mercaptidschwefelliganden dar. RH ist das Substrat und ROH das oxygenierte Produkt.

Von den vielen bislang entdeckten CYP 450- Enzymen spielen für die Biotransformation im menschlichen Organismus einige wenige eine überragende Rolle. Zu den Hauptenzymen der humanen Leber, dem Organ mit der größten metabolischen Aktivität, zählen 3A4, 2E1, 2C9, 1A2 und 2D6 mit einem Anteil von zusammen über 90% [22]. Es sind alle P450- Enzyme in Säugetieren membranständig, hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum (EndR) und nur zu einem geringen Anteil in den Membranen von Mitochondrien zu finden. Bei Ruckpaul findet sich eine Abbildung, die die Komponenten für den Elektronentransport in den Membranen des EndR veranschaulicht [169].

3.4.1 Die Familie CYP 1

Die Familie CYP1 spielt für den Organismus eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung besonders schädlicher, kanzerogener Substanzen. Es sind hier vor allem die Isoenzyme CYP1A1 und 1A2 charakteristisch. Daneben gibt es noch CYP1B1, das dem 1A1 funktionell näher steht als dem 1A2, allerdings gibt es zu 1B1 längst nicht so viele Studien wie zu den beiden anderen Enzymen [11;164;183;184]. In der menschlichen Haut konnte CYP1B1 bereits nachgewiesen werden [9] auch unter dem Einfluss von UVB-Strahlung [99]. Bei Villard et al. war das 1B1 Gegenstand der Untersuchung an HaCaT- Zellen unter UVB- Bestrahlung [200].

Die Enzyme CYP1A1 und vor allem 1A2 erwiesen sich in Kombination mit Phase-II-Reaktionen als bedeutsam für Metabolisierungen aufgrund von genetischen Unterschieden, sowohl innerhalb einer Bevölkerungsgruppe, als auch zwischen dem asiatischen und kaukasischen Typ (darunter ist die weiße Bevölkerung zu verstehen). Aus diesen Erkenntnissen ergeben sich, potentielle Risiken für individuelle Arzneimitteltoxizitäten. Man spricht auch von pharmakogenetischem Polymorphismus, wegen dessen medizinischer Bedeutung wurde und wird vielfältig besonders an der Leber, aber auch an anderen Organen geforscht. Dadurch existiert inzwischen eine Vielzahl von Untersuchungen mit Vergleichen zwischen dem Verhalten an menschlichen Leberzellen und extrahepatischem Gewebe [80;81;112;127;131;176;192].

Es wurden für beide Enzyme gleiche bzw. nahezu gleiche Kodierungssequenzen sowohl in Menschen, Hunden, Hasen, Mäusen, Ratten und Hamstern gefunden. Die Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz beider Enzyme liegt je nach Spezies zwischen 67,6% (Maus), 71,7% (Mensch) und 73,6% (Hund). Die prozentuale Ähnlichkeit (Homologie) der Aminosäuresequenz zwischen Tier und Mensch gestaltet sich wie folgt [93]:

CYP 1A1: Affe-94,1%; Hund-81,2%; Maus-79,4%; Ratte-78,6%; Regenbogenforelle-56%

CYP 1A2: Hund-81,3%; Hase-77,5%; Ratte-74,4%; Maus-72,1%

Beide CYP1A- Enzyme sind induzierbar durch 3-MC, β -NP und andere Polyzyklische Kohlenwasserstoffe (z.B. enthalten im Tabakrauch) sowie durch TCDD. Für 1A2 spielt außerdem Isosafrol als Induktor eine Rolle. Als Inhibitor kommt vor allem α - NP in Betracht [114] (weitere Ausführungen im Kapitel 3.4.5).

Während CYP1A1 in vielen Geweben des Menschen exprimiert wird, wie z.B. in Lunge, Niere, Plazenta und Haut, beschränkt sich der Nachweis von CYP1A2 hauptsächlich auf die Leber, wo es einen Anteil von ca. 5% an den gesamten CYP- Enzymumsetzungen hat [22;93]. Die Substratspezifität des 1A1 erstreckt sich hauptsächlich auf Umsetzungen von polyzyklischen Aromaten. Dagegen ist 1A2 an der Metabolisierung von einer Reihe medizinisch relevanter Substrate beteiligt, wie den Umsetzungen von Verapamil und Coffein [38] oder der O-Deethylierung von Phenacetin, die auch als Modellreaktion zur Charakterisierung des Isoenzym 1A2 herangezogen wird [85;126;130;145;182;202]. Weitere Modellreaktionen, die die Enzyme 1A1/ 1A2 charakterisieren sind die EROD und die Coffein-N-Demethylation [147].

3.4.2 Die Familie CYP 2

Für menschliches Gewebe sind die Nachweise der Cytochrome 2A6, 2A7, 2B6 und 2B7, sechs verschiedener 2C- Gene, des CYP 2D6 und des CYP 2E1 beschrieben [178]. Von großer Bedeutung scheint dabei das an der Coumarin-7-Hydroxylierung beteiligte CYP 2A6 zu sein, eine Reaktion, die häufig als Modellreaktion dient [147]. Dieses Enzym ist auch an der 7-Ethoxycoumarin-O- Deethylierung beteiligt. Das CYP2A7 ist weniger untersucht, mit einer 96%igen Ähnlichkeit in der Nucleotidsequenz zu CYP2A6 steht es diesem recht nah. Die Coumarin-7-Hydroxylierung und die 7-ECOD wurden für CYP2A7 nicht nachgewiesen. [93] Bei Ioannides, C. [93], ist in einer Zusammenfassung vieler Studien der Nachweis von Enzymen der CYP2B-Subfamilie für menschliches Gewebe als schwer detektierbar beschrieben es scheint zwar einigen Autoren gelungen zu sein, jedoch am Rande der Nachweisgrenzen.

Aus der CYP 2C- Subfamilie wird, neben CYP2C8, C18, C19 vor allem das CYP 2C9 häufig im Zusammenhang mit Arzneistoffbedingten Wechsel- und Nebenwirkungen genannt. Das entsprechende Gen wird für den S-Mephenytoin- Polymorphismus verantwortlich gemacht, der 2-5% der Kaukasier und bis zu 23% der Asiaten betrifft. Das Enzym ist beispielsweise an der Umsetzung von Warfarin, Phenytoin und der Epoxidation von Arachidonsäure beteiligt. [93;178]

Bei der CYP 2D- Subfamilie ist vor allem 2D6 für den Mensch von Bedeutung, da auch dieses Gen einem Polymorphismus unterliegt. 7 bis 8% der Kaukasier besitzen ein Mutation in diesem Gen und sind daher nicht in der Lage, z.B. Spartein und über 20 weitere Substanzen umzusetzen. Die Ausstattung mit CYP 2D6 wird auch im Zusammenhang mit dem Lungenkrebsrisiko von Rauchern diskutiert. Als Modellreaktion zur Charakterisierung des 2D6 wird vielfach die Dextromethorphan-O-Demethylierung herangezogen [145;147],

Bei der CYP 2E- Subfamilie spielt für den Menschen nur das 2E1 eine Rolle, so ist dieses Gen an der Metabolisierung von niedermolekularen Lösungsmitteln beteiligt. Aus dem Bereich der Arzneimittel stellt z.B. Chlorzoxazon ein CYP2E1- Substrat dar, auch Nitrosamine sowie Nitroso- und Azoverbindungen können durch 2E1 umgesetzt werden [93;147]. Aufgrund der Substrate von 2E1 wird es oft im Kontext mit dem Auftreten von Leberschäden, insbesondere nach Alkoholeinwirkung genannt. Es scheint generell an Reaktionen beteiligt zu sein, die zu einer erhöhten Toxizität der Produkte führen. [178] Für menschliches Gewebe wurde eine Beteiligung von CYP2E1 an der 7-ECOD beschrieben [206].

3.4.3 Die Familie CYP 3

Mit Abstand die größte Bedeutung für den Arzneistoffwechsel besitzt das wohl am meisten untersuchte Isoenzym dieser Familie, das CYP3A4. Daneben spielen in humanem Gewebe noch die Enzyme 3A3, 3A5, 3A7 eine Rolle. Die ebenfalls oft charakterisierten Enzyme 3A1 und 3A2 konnten hauptsächlich in Untersuchungen an Ratten gewonnen werden [205]. Weitere Subfamilien wurden in menschlichem Gewebe bislang nicht nachgewiesen. Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz zwischen 3A3 und 3A4 liegt bei 98%, aus diesem Grund ist noch

nicht völlig geklärt, ob es sich wirklich um zwei verschiedene Gene oder nur Allelvarianten eines Gens handelt. Während 3A4 das vorherrschende Enzym in der adulten menschlichen Leber ist, konnte 3A3, wenn überhaupt, nur in äußerst geringen Mengen in humanem hepatischem Gewebe nachgewiesen werden. Außer der Leber kommt 3A4 noch im Gewebe des Verdauungstraktes vor, wie dem Zwölffingerdarm, dem Dünn- und Dickdarm, dem Magen, der Speiseröhre und im Dickdarm. [123]

CYP3A5 wurde sowohl in der Leber von Erwachsenen als auch von Kindern gefunden, ebenso wie in beider Nierengewebe. Das Vorhandensein in menschlichem Lungen- und Magengewebe wurde ebenfalls belegt [104;161]. Dagegen handelt es sich bei 3A7 um ein CYP-Enzym, das ausschließlich in der fötalen Leber und Niere gefunden wurde. Nach der Geburt und mit fortschreitender Entwicklung lässt die Expressierung dieses CYP- Enzyms nach und das CYP3A4 wird zum Hauptisoenzym in der menschlichen Leber, welches in Föten noch nicht nachweisbar ist [107;123]. Ein Nachweis von CYP3A7 in einer humanen Keratinozytenzellkultur von Erwachsenen konnte nicht erbracht werden, genauso wenig, wie der Nachweis von 3A4. Die Bestrahlung mit UVA/UVB änderte daran nichts. Dagegen konnte in dieser Untersuchung CYP3A5 ohne Bestrahlung, als auch unter dem UVA- bzw. UVB- Einfluss nachgewiesen werden [74].

Als Modellreaktionen dienen vor allem die Hydroxylierungen von Steroiden insbesondere die des Testosterons. Neben der 6 β - Hydroxylaseaktivität spielt beim Nachweis der CYP3A4-Aktivität außerdem die Erythromycin-N-Demethylase eine Rolle [204]. Hinzu kommen die Nifedipinoxidation [193], die Dextromethorphan-N-Demethylierung [97;145] und die Metabolisierung von CiclosporinA [58;199]. Von Maurel, P. gibt es eine Aufstellung mit humanen CYP3A- Substraten, die 44 Reaktionen mit den zugehörigen Referenzen auflistet [123]. Neu hinzugekommen ist die Substanzklasse der Protease- Hemmstoffe [44].

3.4.4 Die Familie CYP 4

Obwohl bislang elf Subfamilien des CYP4 nachgewiesen wurden (CYP4A bis CYP4M), ist nur die CYP4A- Subfamilie mit ihren 14 Genen sehr ausführlich untersucht wurden. Für humanes Gewebe wurde die Existenz von 4A9, 4A11, 4B1, 4F2 und 4F3 belegt. Dabei konnte für den Mensch der Nachweis von CYP4A in der Leber und der Niere erbracht werden [93;141;185]. Als endogene Substrate von CYP4A im menschlichen Organismus gelten Fettsäuren, Prostaglandine und Leukotriene. Dagegen scheint CYP4A wenig Einfluss auf die Metabolisierung exogener Substanzen zu haben. Die Untersuchung diverser Modellreaktionen (ECOD, EROD und Testosteron- Metabolisierung) an HepG2- Zellen erbrachte keine Aktivität [16], ebenso wenig wie vergleichbare Untersuchungen an Hasen [212]. Auch Untersuchungen an Mikrosomen aus menschlichen Nierenzellen ließen keine Metabolisierung von Xenobiotika erkennen [100]. Unter Verwendung von Induktoren, die die Peroxisomenproliferation steigerten, war eine erhöhte Metabolisierungsrate einiger Stoffe zu beobachten, zudem wurde über eine Erhöhung der Azoreduktase- Aktivität unter Clofibrat berichtet [93;113;162].

3.4.5 Induktion und Inhibition

Die INDUKTOREN sind je nach Cytochrom- Familie, teilweise auch nach Subfamilie völlig verschieden, zumindest unterscheiden sie sich in ihrer Affinität zu den einzelnen Enzymen. Zum Teil geht von einem Induktor eine recht spezifische Induktion eines oder nur weniger CYP- Enzyme aus, manchmal werden durch einen Induktor auch gleichzeitig mehrere CYP- Enzyme aus verschiedenen Familien induziert [171]. Prinzipiell teilt man Induktoren in sieben Gruppen ein, u.a. den Methylcholanthren- und den Phenobarbital- Typ. Bei ersterem erfolgt ein Eingriff in die CYP- Synthese bei dem die Proliferation des EndR und damit das Lebergewicht unbeeinflusst bleibt. Induktoren von PB- Typ, zu denen eine ganze Reihe von Arzneistoffen zählen, steigern die Proliferation des EndR und bewirken damit eine Zunahme des Lebergewichtes. Als starke Induktoren dieses Typs sind z.B. die Barbiturate und Hydantoine, Rifampicin und Tolbutamid zu nennen. [137]

Die *Cytochrom 1-Familie* wird besonders spezifisch durch die planaren Moleküle polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe induziert, Vertreter sind beispielsweise Benzo[a]pyren (im Zigarettenrauch enthalten), Benz[a]anthracen, β -Naphthoflavon und 3-MC [171]. Aber auch zahlreiche polychlorierte oder polybromierte Biphenyle und Dibenzop-dioxine, wie besonders TCDD, sind starke Induktoren des CYP1A1/2 [49;65;73;79]. Im Zellinneren werden diese Moleküle an den zytosolischen Ah-Rezeptor ("Aryl hydrocarbon" = Kohlenwasserstoff) gebunden, der wiederum an das Protein hsp90 ("heat-shock-protein") gebunden ist. Aufgrund der Bindung dissoziiert das Hitzeschockprotein ab. Der übrig bleibende Komplex bindet an das ARNT- Protein ("Ah-receptor nuklear translocator") und wandert in aktivierter Form an bestimmte Stellen der Kern- DNA, so genannte "xenobiotic responsive elements", an die er schließlich andockt. Durch diese Aktivierung wird die Transkription der oben erwähnten Enzyme induziert [7;172]. Der Mechanismus des Ablaufs ist in Abb. 3.4.4 angelehnt an andere Autoren graphisch dargestellt [51;93;137].

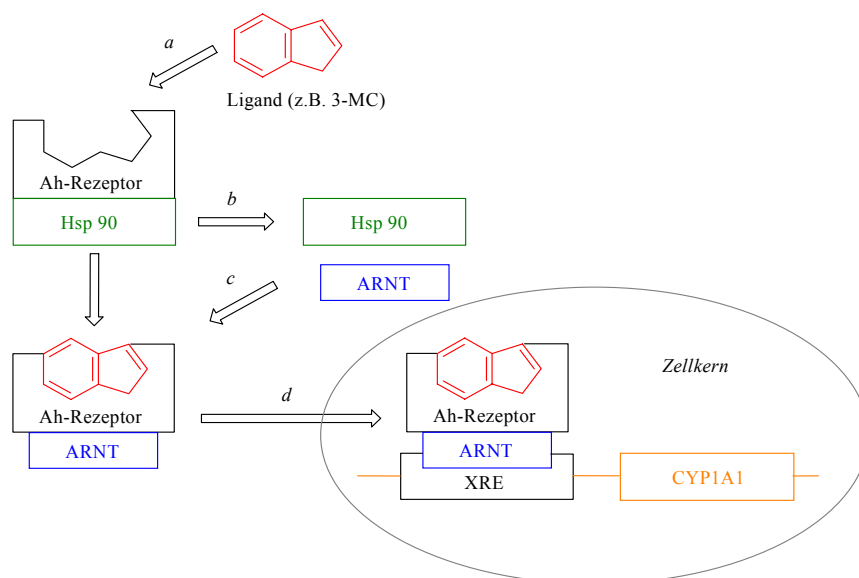


Abb. 3.4.4: Mechanismus der CYP1A1-Induktion durch Aktivierung des Ah- Rezeptors [51]

Die Induktionskapazität einzelner Enzyme unterscheidet sich, ähnlich der Substratspezifität, u.a. dahingehend, in welchem Gewebe die Umsetzung erfolgt. So konnte ein Dioxin-Derivat in der Hasen-Leber CYP1A1 und 1A2 induzieren, dasselbe Derivat vermochte in Lunge und Niere nur CYP1A1 zu induzieren [115]. Die gewebeabhängige Induktionskapazität gestaltet sich wie folgt: Leber > Niere > Lunge > Intestinales Gewebe > Milz > Hoden [73]. Aber nicht nur hinsichtlich der Gewebe gibt es Unterschiede in der Induzierbarkeit, auch Geschlecht, Alter und verschiedene Spezies lieferten differenzierte Ergebnisse für gleiche Induktoren [81;122;127;192]. Als recht selektiver Induktor des CYP1A2 gilt Isosafrol, das in Rattenlebermikrosomen 1A2 induzierte, dagegen kaum Effekte auf CYP1A1 zeigte [173].

Die **Cytochrom 2-Familie** ist nicht durch so klare Strukturen der Induktoren gekennzeichnet, wie CYP1. Vielmehr gibt es hier nicht nur strukturelle Variationen, sondern auch Unterschiede hinsichtlich der Induktoren zwischen den einzelnen Subfamilien. Daneben sind die schon oben genannten Faktoren wie Gewebe, Geschlecht und Spezies von starkem Einfluss. Als Induktoren der CYP2-Familie wurden belegt: Phenobarbital und andere Barbiturate sowie Hydantoine; Dexamethason; Rifampicin; Proadifen; Clotrimazol; Benzodiazepine, daneben halogenierte Pestizide und Stoffwechselprodukte von Pflanzen. Dagegen zeigte 3-MC keinen induzierenden Effekt auf CYP2-Enzyme. Die durch die CYP2E-Familie umgesetzten niedermolekularen Lösungsmittel, wie Aceton, Ethanol und Pyridin induzieren gleichzeitig ihre eigene Umsetzung. Außerdem wird Isoniazid als Induktor von CYP2E-Enzymen genannt. [93] In die Gruppe der Induktoren von Enzymen der **Cytochrom 3-Familie** fällt eine Vielzahl der am Markt befindlichen Arzneistoffe mit unterschiedlich stark ausgeprägten Induktionskapazitäten. Hervorzuheben sind hier einige, häufig auch für Modellreaktionen eingesetzte, Substanzen. Ein schon Anfang der 70iger Jahre des 20. Jahrhunderts an Rattenleber charakterisierter Induktor ist Pregnenolon-16 α -carbonitril [191], das als Induktor menschlicher CYP3A keine Rolle spielt. Für den Menschen relevant sind u.a. Substanzen wie Carbamazepin, Dexamethason, einige Statine, Omeprazol, Phenobarbital, Phenytoin, Rifampicin und Terbinafin, als auch Clotrimazol, Erythromycin und Troleandomycin (TAO), die gleichzeitig Induktor, Inhibitor und Substrat sind [123]. Auch jüngere Antiepileptika sind hier von Belang [19].

Bei der **Cytochrom 4-Familie** sind vor allem Peroxisomen-Proliferatoren von Bedeutung. Als Induktor kam in den meisten Untersuchungen Clofibrat zum Einsatz, daneben fand Methylclofenapat Verwendung. Allerdings standen für Clofibrat nicht nur CYP4A-induzierende Wirkungen, sondern auch eine Erhöhung der Level an CYP2B1/2, 2C6 und 3A1 und die Induktion von Azoreduktasen. Eine Abbildung über entsprechende Peroxisomen-Proliferatoren mit ihren Strukturen findet sich bei Ioannides,C. [93]

Mit der Selektivität der INHIBITOREN verhält es sich ähnlich, wie für die Induktoren geschildert. Jedoch kann hier noch weniger eine Zuordnung zu einzelnen Cytochrom-Familien und erst recht nicht zu einzelnen Enzyme erfolgen. Deshalb anschließend nur eine grobe Charakterisierung der CYP-Familien mit darauf folgenden Erläuterungen zu den Inhibitoren, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Prinzipiell kann die Enzymhemmung durch eine verminderte Synthese, den verstärkten Ab-

bau oder einen Funktionsverlust des CYP- Enzyms, hervorgerufen durch Konformationsveränderung, erfolgen [151]. Es ist eine direkte Konkurrenz zwischen Inhibitor und Substrat am aktiven Zentrum des Enzyms möglich (kompetitive Hemmung), als auch eine Bindung außerhalb des aktiven Enzymzentrums. Letztere führt meist zu Veränderungen des aktiven Zentrums in deren Folge das Substrat nicht mehr (ausreichend) metabolisiert werden kann (nicht-kompetitive, allosterische Hemmung) [32;137].

Als Inhibitor der **Cytochrom 1-Familie** wird hauptsächlich α -NP genannt, daneben finden noch 1-Ethynylpyren (CYP1A1) und Furafyllin (1A2) Erwähnung, für die eine relative Spezifität zu den angegebenen Enzymen postuliert wurde [114]. Chang et al. belegten eine CYP 1A- hemmende Wirkung für Diethyldithiocarbamat [39].

In der **Cytochrom 2-Familie** sind hemmende Wirkungen von α -NP [39;148], den Azol- Antimykotika [120] und Methoxsalen [120] auf CYP2A beschrieben. Ferner spielte bei Mäusen noch Metyrapon eine Rolle. Für die im menschlichen Gewebe nur selten nachgewiesene Subfamilie 2B kämen noch Secobarbital, Troleandomycin, Proadifen [14;33] und Phenytoin hinzu. Als recht spezifischer CYP2D- Inhibitor gilt Chinidin [27]. Für CYP2E1 sind die Aussagen etwas schwieriger, da dieses Enzym die Umsetzung verschiedener Substrate katalysiert. So verschieden wie die Substrate (z.B. Chlorzoxazon, Paracetamol, Coffein) sind auch deren zugehörige Inhibitoren. Als CYP2E1- Inhibitoren werden Diethyldithiocarbamat, Disulfiram und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, wie z.B. Diallylsulfide genannt. [93]

Bei der Enzymhemmung der **Cytochrom 3-Familie** spielen vor allem die Makrolide Erythromycin und TAO, das Gestagen Gestoden sowie der kompetitive Inhibitor Ketoconazol eine Rolle [123]. Daneben erwiesen sich Clotrimazol und Miconazol als starke Hemmer des CYP-3A4 [124]. Weiter sind hier zu nennen: Antidepressiva (z.B. Fluvoxamin, Sertralin, Paroxetin), Clarithromycin und Cimetidin, welches nicht alle CYP3A- Substrate beeinflusst [44].

Über die Hemmung der Enzyme der **Cytochrom 4- Familie** gibt es nur wenige Angaben. Meist wurde Metyrapon, welches auch CYP2- Enzyme hemmt, eingesetzt [60;136].

Für den Inhibitor **α -Naphthoflavon** steht die Hemmung der CYP1A1/2- Enzyme im Vordergrund, darüber hinaus konnten auch inhibierende Effekte auf 2C8/9 belegt werden. Bei erhöhten α -NP- Konzentrationen von 10 μ M wurde an HepG2- Zellen zusätzlich eine Hemmung der Enzyme 2A6 und 2B6 festgestellt, während die Enzyme 2E1, 3A3, 3A4 und 3A5 unbeeinflusst blieben [39].

Proadifen wird unterschiedlich beschrieben, als spezifisch für CYP2B1 [114], aber auch als ein genereller Inhibitor, der auf mehrer Enzyme der CYP2B- Subfamilie wirkt [14;33]. Daneben erwies es sich als Inhibitor der CYP2A6- vermittelten Coumarin- 7-Hydroxylase in humanen Lebermikrosomen [148]. An der Ratte konnten für Proadifen neben den hemmenden Effekten auf CYP2B gleichzeitig induzierende Effekte desselben Enzyms ausgemacht werden [15]. Dieses Verhalten ist auch für andere CYP2B- Inhibitoren beschrieben [93]. Als Mechanismus der Hemmung wird vermutet, dass Proadifen durch P-450 N-deethyliert und zum N-Oxid (oder Nitroso- Derivat) umgewandelt wird, dieses vermag in der Folge als Ligand des

Häm zu agieren [114]. Bei Ioannides, C. findet sich im Kapitel Molecular Modeling eine Abbildung, die die These, dass das Stickstoffatom des Proadifen als Ligand des Häm fungiert, stützt [93]. Dort sind für Proadifen außerdem induzierende Effekte auf CYP 3A- Enzyme beschrieben.

Bei **TAO** handelt es sich um einen Inhibitor, der gleichzeitig seinen eigenen Abbau katalysiert und das Substrat darstellt. So konnten an menschlichen und Rattenleber- Mikrosomen einige CYP 450- Enzyme induziert und andere gehemmt werden [123;150]. Die Hemmung bezieht sich vor allem auf CYP3A- Enzyme. Es konnte der Nachweis der Inhibition von Testosteron- Hydroxylierungsprodukten anhand primärer Hepatozytenzellkulturen von Ziege, Schaf und Rind erbracht werden [8]. In einer breit angelegten Studie, zur Untersuchung von Inhibitoren des menschlichen Cytochrom P-450 erwies sich TAO als potenter Inhibitor von CYP3A3 und 3A4 neben, in etwas geringerem Umfang, 3A5, während CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9 und 2E1 unbeeinflusst blieben [39]. TAO wird heute als ein selektiver Inhibitor der CYP3A- Subfamilie verwendet.

Metyrapon ist gekennzeichnet als CYP2B- und CYP4A- Inhibitor. Da, wie schon erwähnt, für humanes Gewebe CYP2B-Enzyme kaum eine Rolle spielen, sind hemmende Wirkungen vorwiegend auf die Beeinflussung der CYP4A- Enzyme zurückzuführen [68].

3.5 Biotransformation

Biotransformationen stellen für Mensch und Tier eine lebensnotwendige Grundlage zur Ausscheidung von Xenobiotika aus dem Organismus dar. Die dabei ablaufenden Prozesse geschehen in 2 Phasen, die als Phase-I- und Phase-II- Reaktionen bezeichnet werden.

3.5.1 Phase-I-Reaktionen

Reaktionen, welche zur Phase I des Fremdstoffmetabolismus gehören, zeichnen sich durch die Bildung neuer funktioneller Gruppen (z.B. -OH) aus. Es kann auch eine Umwandlung vorhandener funktioneller Gruppen erfolgen (z.B. O- und N- Dealkylierungen). (Eine Übersicht ohne Anspruch auf Vollständigkeit bietet die Tabelle 3.5.1.)

Tab. 3.5.1: Überblick über Phase-I-Reaktionen nach [214]

<u>Monooxygenase- Aktivität</u> (Oxidation)	<u>Oxidase- Aktivität</u>	<u>Reduktase- Aktivität</u>
·Aromatische Oxidation	·Aromatische Hydroxylierung	·Azo- Reduktion
·Aliphatische Oxidation	·Oxidation von Ethanol (ADH)	·Nitro- Reduktion aromatischer Verbindungen
·Epoxidierung	·Katechol Oxidation (MAO)	·Reduktive Dehalogenierung
·O- Dealkylierung		
·N- Dealkylierung		
·S- Dealkylierung		
·Oxidative Deaminierung		
·N- Hydroxylierung		
·N- und S-Oxidierung		
·Desulfurierung		

In der Folge der Reaktion steigt die Hydrophilie der ursprünglichen Verbindung. An den Pha-

se-I-Reaktionen sind eine Vielzahl von Cytochrom-Enzymen beteiligt, aber auch andere Enzyme, wie Alkoholdehydrogenasen (ADH), Monoaminoxidasen (MAO), die Flavin-Monooxygenase und noch weitere Enzyme zählen hierzu. Da Phase-I-Metabolite häufig noch wirksame Verbindungen darstellen, bzw. erst diese neu entstandenen Metabolite auf den Organismus toxisch wirken, schließen sich im Körper so genannte Phase-II-Reaktionen zur weiteren Detoxifikation an.

3.5.2 Phase-II-Reaktionen

Bei den Enzymen, die Phase-II-Reaktionen katalysieren, handelt es sich nicht um Cytochrom-P450-Enzyme. Die entstehenden Phase-II-Metabolite sind, mit Ausnahme von Acetyl- und Methylverbindungen, sehr hydrophil, so dass sie leicht aus dem Körper ausgeschieden werden können. Nur in seltenen Fällen besitzen diese Substanzen noch eine pharmakologische oder toxische Wirkung, als Beispiel sei das Morphin-6-glucuronid genannt, das dem Morphin in seiner Wirksamkeit überlegen ist. Enzyme, welche Phase-II-Reaktionen katalysieren, gehören zu den Transferasen, dabei sind relevant:

- *Glucuronidierung* vermittelt durch UDP-Glucuronosyltransferasen
- *Sulfatierung* durch Sulfotransferasen
- *Glutathion-Konjugation* durch Glutathion-S-Transferasen
- *Acetylierung* durch N-Acetyltransferasen
- *Acylierung* durch Acyltransferasen
- *Methylierung* durch Methyltransferasen (S-Methyltransferasen und COMT)
- *Konjugation mit Aminosäuren* durch N-Acyltransferasen

Einige Autoren verwenden auch den Begriff von Phase-III-Reaktionen und fassen darunter hauptsächlich Hydrolyse-Reaktionen der Phase-II-Metabolite zusammen, die Bedeutung für den enterohepatische Kreislauf besitzen [22;23;214].

3.5.3 Bestimmung der Enzymaktivität

Zur biochemischen Charakterisierung einzelner Enzyme oder Enzymfamilien werden häufig so genannte Enzymvermittelte Indikatorreaktionen herangezogen. Da diese Reaktionen für das jeweilige Enzym Modellcharakter besitzen, werden sie auch als Modellreaktionen bezeichnet. Im Idealfall repräsentiert eine solche Reaktion die Aktivität eines einzelnen Isoenzym [108].

3.5.3.1 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung (EROD)

Die EROD ist eine sehr häufig verwendete Modellreaktion zur Charakterisierung der Isoenzyme CYP 1A1 und 1A2. Beide Enzyme besitzen beim Menschen eine Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz von ca.72%. Es ist mit dieser Modellreaktion nicht möglich, zwischen 1A1 und 1A2 zu differenzieren, da beide Enzyme dieses Substrat umsetzen [93]. CYP 1A2 lässt sich anhand der Phenacetin-O-Deethylase (POD) näher charakterisieren, da Phenacetin allgemein als spezifisches Substrat dieses Enzyms gilt [85;171]. In der vorliegenden Arbeit an

HaCaT- Keratinozyten fand die Phenacetin-O-Deethylierung keine Anwendung, da Studien erbrachten, dass die Phenacetin-O-Deethylase- Aktivität vor allem für die Umsetzung durch CYP1A2 in der Leber charakteristisch ist, während in extrahepatischem Gewebe, wie z.B. der Plazenta, diese Umsetzung durch andere Enzyme vermittelt wurde [182].

Die EROD beruht auf der recht spezifischen O- Deethylierung des Phenoxazonderivates 7-Ethoxyresorufin in Gegenwart von NADPH + H⁺ und Sauerstoff. Die Umsetzung erfolgt durch Angriff des aktivierten Sauerstoffs am α -C-Atom zum Heteroatom unter Bildung eines Halbacetals, das infolge seiner geringen Stabilität zu Acetaldehyd und dem stark fluoreszierendem Resorufin gespalten wird, dieses kann direkt im Kulturmedium erfasst werden. Die dazugehörige Reaktionsgleichung gibt Abb. 3.5.1 wieder.

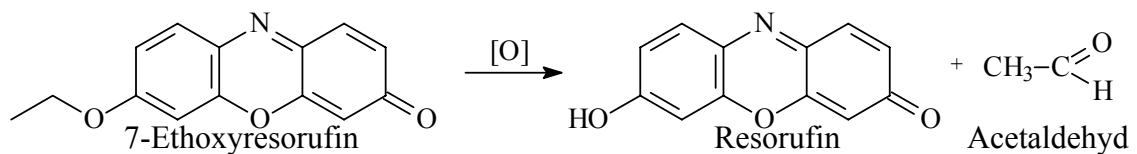
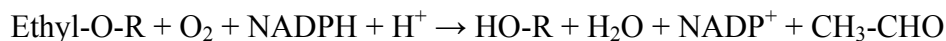


Abb. 3.5.1: 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung

Formal lässt sich jede Deethylierung wie folgt zusammenfassen:



Der Fluoreszenz- Assay zur Ermittlung der EROD geht hauptsächlich auf Burke et al. zurück, und fand schon 1976 bei der Untersuchung an isolierten Darm- Mikrosomen der Ratte Anwendung [191]. Ein Jahr später wurden menschliche Lymphozyten [34] zum Einsatz gebracht und in der Folge Mikrosomen aus Leber, Lunge und Darm sowohl von Ratten als auch von Hamstern untersucht [35]. Ab Mitte der achtziger Jahre diente dieser Assay für vielfältigste Metabolisierungs- Untersuchungen an menschlichen Hepatozyten [77] und Leberzelllinien, wie HepG2 [78]. Die Verwendung der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung zur fremdstoffmetabolischen Charakterisierung menschlicher Hautzellen wurde erst Anfang bis Mitte der neunziger Jahre vorangetrieben [8;125;159]. Mit der Etablierung der HaCaT- Zelllinie [26] stand diese auch für entsprechende Biotransformationsuntersuchen anhand der EROD zur Verfügung [8;42;46;48;110;209].

3.5.3.2 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung (ECOD)

Ebenso wie die EROD, wird auch die ECOD sehr oft als Modellreaktion zur Charakterisierung von Cytochrom- Isoenzymen herangezogen. Obwohl überwiegend durch CYP 1A1/A2 deethyliert [178], konnten auch Umsetzungen von 7-Ethoxycoumarin (EC) durch die Enzyme 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2E1, 3A3, 3A4 und 3A5 in menschlichem Gewebe belegt werden [93], daneben spielten bei Testungen an Ratten noch die Enzyme CYP 2A2, 2B1 und 3A2 für die ECOD eine Rolle [55;178]. Obwohl es sich bei der ECOD somit nicht um eine allzu spezifische Umsetzung handelt, ist doch der Vergleich zur 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylierung, die fast ausschließlich durch CYP 1A1/A2 erfolgt, interessant.

Die, auf der O- Deethylierung von 7-EC beruhende und in Gegenwart von NADPH + H⁺ und Sauerstoff ablaufende, Reaktion liefert das stark fluoreszierende Produkt 7-Hydroxycoumarin

(HC), häufig auch als Umbelliferon bezeichnet. Es kann bei leicht alkalischem pH-Wert direkt im Kulturmedium erfasst werden. Die dazugehörige Reaktionsgleichung gibt Abb. 3.5.2 wieder.

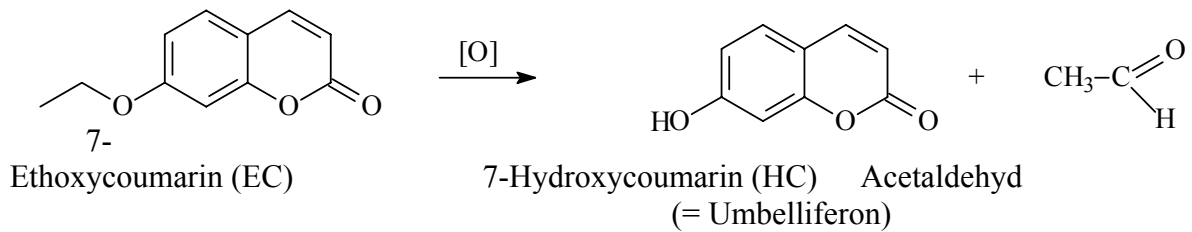
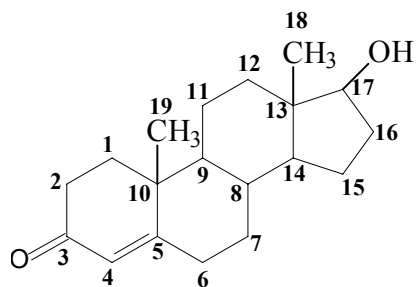


Abb. 3.5.2: 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylierung

Dieser Assay hat seine Ursprünge 1972 in den Untersuchungen von Ullrich und Weber an Mäuselebermikrosomen [196]. Darin wurden auch Mäuse untersucht, die im Vorfeld Phenobarbital verabreicht bekamen, was zu einer ca. 3-fachen Erhöhung der ECOD- Aktivität führte – ein Beleg für die Induzierbarkeit der an der Umsetzung beteiligten Enzyme. Tiere, denen Benzo[a]pyren oder nur das Substrat 7-Ethoxycoumarin injiziert wurde, zeigten diese Erhöhung nicht. Als Inhibitoren erwiesen sich in dieser Studie insbesondere Kohlenmonoxid, Metirapon und Hexanol. Erfolgte die Bestimmung des 7-HC zu dieser Zeit noch per Dünnschichtchromatographie, so veränderten sich die Detektionsmethoden im Lauf der Jahre, es wurde auch die HPLC- Analytik herangezogen [101]. Heute arbeitet man hauptsächlich mit fluorimetrischer Detektion [82]. Nach der Arbeit mit Mikrosomen der Maus folgten bald Untersuchungen an menschlichen Leberzellen, gewonnen nach verschiedenen Lebererkrankungen im Vergleich zur gesunden Leber [59;87;88;187;195]. Gleichzeitig fanden sich erste Arbeiten, die ECOD an Hautzellen nutzten, und zwar an von der Maus gewonnenen Mikrosomen [153]. 1982 wurde von Damen et al. die kutane O-Dealkylaseaktivität verschiedener Spezies, u.a. von Maus, Rhesus-Affe und Mensch, untersucht. Dabei konnte für Mensch und Affe keine Aktivität ermittelt werden, bei den Mäusen ließ sie sich durch die subkutane Gabe von Induktoren wie Phenobarbital induzieren. Versuche der in vitro Induktion scheiterten [45]. Zur Untersuchungen von ECOD an HaCaT- Zellen findet sich in der Literatur bislang nur eine Studie mit dem Nachweis der ECOD und EROD- Aktivität [42]. Darin wurden außerdem NHK und die Zelllinie SVK14 getestet.

3.5.3.3 Testosteron- Metabolisierung

Bei der Metabolisierung des Testosterons sind neben der Reduktion zu 4-Androsten-3,17-



Testosteron

Dion (katalysiert durch die 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase) hauptsächlich Hydroxylierungen von Bedeutung. Untersuchungen an Ratten ergaben, dass vielfältigste CYP-Isoenzyme daran beteiligt sind, die zum Teil konstitutiv vorhanden oder induzierbar sind. Es gibt bei dieser Umsetzung auch geschlechtsspezifische Unterschiede. Verschiedene Isoenzyme katalysieren die Metabolisierung zu teilweise gleichen Produkten, wobei meist ein Hydroxylierungsprodukt von hauptsächlich einem

Isoenzym umgesetzt wird (85%), die anderen daran beteiligten Enzyme haben nur einen geringen Anteil. Mengenmäßig dominieren in Ratten neben der Androstendion-Bildung, die 2C11-vermittelte 2 α - und 16 α -OH-Testosteronbildung, sowie die 3A2-vermittelte 6 β -Hydroxylierung, die alle hauptsächlich für männliche Ratten charakteristisch sind [75;101]. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die CYP-Enzyme der Ratte, den entsprechend zugeordneten CYP-Enzymen des Menschen (soweit möglich) und den entstehenden Testosteron-Hydroxylierungsprodukten [114].

Tab. 3.5.2: CYP- Isoenzyme der Rattenleber, das dem Menschen zugeordnete adäquate CYP- Isoenzym und die beim Testosteron- Metabolismus vorwiegend entstehenden Hydroxylierungsprodukte (modifiziert nach [114])

CYP Ratte	CYP Mensch	Konstitutiv/ Induzierbar	Testosteron- Metabolisierungsprodukt (das Hervorgehobene stellt den Hauptweg dar)
1A1	1A1	I	6 β
1A2	1A2	K	6 β
2A1		K	7 α , 6 α
2A2		K	15 α , 6 β , 7 α , 16 α , (7 β)
2B1	2B6/2B7	I	16 α , 17, 16 β
2B2		K	16 α , 16 β
2C6		K	2 α , 16 α , 17
2C7		K	16 α
2C11	2C9	K	16 α , 2 α , 17, 6 β
2C12		K	15 β , (15 α)
2C13	2C8	K	6 β , 15 α , 16 α , 7 α
2D1	2D6	K	6 β
3A1	3A3/3A4	I	6 β
3A2	3A5/3A7	K	6 β , 2 β

Wie schon erwähnt, handelt es sich bei den Daten der Tabelle 3.5.2 um Ergebnisse, die an Ratten gewonnen wurden. Bereits zwischen 1970 und 1980 wurde klar, dass sich das Verhalten in menschlichem Gewebe von dem der Ratten unterschied, insbesondere die bei den Tieren sehr stark ausgeprägte geschlechtliche Spezifität einzelner Isoenzyme, fand sich in dem Maß beim Mensch nicht wieder [170]. Auch unterscheidet sich die Menge der einzelnen Testosteronhydroxylierungsprodukte der humanen Hepatozyten von denen der Nager. In einer Studie von Kern et al. wurde deutlich, dass die vorherrschenden Produkte der Testosteronumsetzung in einer Primärkultur menschlicher Hepatozyten vor allem der 6 β -OH- und der 2 β -OH- Metabolit sind, gefolgt von der Bildung von Androstendion. Es spielten in geringerem Umfang eine Rolle: 7 α -OH-, 16 α -OH-, 6 α -OH-, 15 α -OH-, 11 α -OH und das 16 β -OH-Testosteron. Der Einsatz des Induktors Rifampicin führte in diesen Untersuchungen nach 9-tägiger Kulturzeit zu einer 5,8fachen Erhöhung der Menge 6 β -OH-T in den menschlichen Hepatozyten, ein Effekt auf Rattenhepatozyten blieb aus. Besonders stark induzierbar war die Bildung der Metabolite 7 α -OH- und 11 α -OH- Testosteron in humanen Hepatozyten [101]. Untersuchungen an der humanen HepG2- Zelllinie führten hauptsächlich zu 6 β -OH-T, daneben entstanden noch 2 β -OH-T und 15 β -OH- Testosteron als Produkte der CYP3A- katalysierten Hydroxylierung von Testosteron. Daneben wurde noch eine durch CYP4B1 bedingte Umsetzung zu 6 β -OH-Testo beobachtet [206].

Frühe Untersuchungen zur Testosteronmetabolisierung in Hautzellen aus dem Jahr 1987 be- laufen sich auf Untersuchungen an Mikrosomen der Dermis, der Epidermis und der gesamten Haut von Ratten in Gegenwart von NADPH und Sauerstoff. Dabei konnten 6 β -OH-, 7 α -OH- und 16 α -OH-Testosteron nachgewiesen werden. Die größten Mengen erschienen davon in der Epidermis. Dort war eine Hemmung durch Proadifen und Metyrapon möglich. [135]

Anfang der neunziger Jahre des 20. Jahrhunderts kamen dann auch Untersuchungen an huma- ner Haut bzw. Modellen der Haut zur Charakterisierung des Testosteron- Metabolismus hinzu [167;186]. Nach der Etablierung der HaCaT- Zelllinie wurde auch sie auf ihren Testosteron- Metabolismus hin untersucht. Allerdings stand bei dieser Studie die Charakterisierung der 5 α - Reduktase im Vordergrund, eine Bestimmung der Testosteron- Hydroxylierungsprodukte er- folgte nicht [12]. In einer noch jüngeren Studie aus dem Jahr 2001, wurden 3 Zelllinien huma- nen Ursprungs, HaCaT- Zellen, die Sebozytenzelllinie SZ95 und die MeWo Melanom-Zellen, auf ihre Testosteronumsetzung hin untersucht. Es wurden dabei die 17 β -Hydroxysteroiddehy- drogenase (HSD), die 5 α -Reduktase und die 3 α -HSD genauer charakterisiert. In allen Zellty- pen dominierte die 17 β -HSD- vermittelte Umsetzung zu Androstendion mit anschliessender Bildung von 5 α -Androstandion katalysiert durch die 5 α -Reduktase. In der Folge wurde durch die 3 α -HSD das 5 α -Androstandion zu Androsteron umgesetzt, mit der stärksten Aktivität in HaCaT- Zellen. Es wurden außerdem in allen Zelltypen geringe Mengen von 5 α -Dihydro- testosterone und 5 α -Androstandiol gefunden. Für HaCaT- Keratinozyten fand man so heraus, dass deren Aufgabe im Androgenstoffwechsel hauptsächlich im Abbau der Androgene, wie z.B. Testosteron, liegt. [62]

3.5.3.4 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen-Reduktion (DAB)

Bei der Reduktion von 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen (DAB) handelt es sich um eine Clofibrat- induzierbare Modellreaktion zur Charakterisierung des Cytochroms 4A. Verglichen mit den bisher beschriebenen Modelreaktionen kommt dieser eine eher untergeordnete Bedeu- tung zu. Standen bei der Charakterisierung von Phase-I-Reaktionen bisher Monooxygenase- und Oxidase- Aktivitäten im Mittelpunkt, spielen hier Reduktase- Aktivitäten, speziell die Azo- Reduktionen im Vordergrund. Neben der Entgiftung von Azoverbindungen durch CYP 4A, spielen auch die mikrosomale NADPH- Cytochrom P-450-Reduktase und zytosolische Reduktasen eine Rolle. [90-92;113;129;162;190;208]

Die Metabolisierung des DAB kann nicht nur reduktiv, sondern auch oxidativ per N-Deme- thylierung, Ringhydroxylierung und N-Hydroxylierung unter Beteiligung Phenobarbital- und 3-Methylcholanthren- induzierbarer Cytochrome erfolgen. [132;171]

Die Bestimmung beruht auf der Methode von Huang et al. [91]. Das durch die Reduktion von DAB gebildete 4-(N,N-Dimethylamino)anilin wird durch nachfolgende Extraktion aufgerei- nigt, an Fluorescamin gekuppelt und das entstehende Produkt fluorimetrisch bestimmt. Durch die Wahl definierter Reinigungsschritte kann gewährleistet werden, dass nur das, bei der re- duktiven Spaltung entstehende, Anilinderivat nachgewiesen wird. Das bedeutet, dass mit dieser Methode zwar die Bestimmung des CYP 4A- vermittelten Anteils der Umsetzung be-

stimmerbar ist, jedoch kann auch über zytosolische oder mikrosomale Reduktasen gebildetes 4-(N,N-Dimethylamino)anilin mit erfasst werden. Es bleibt weiterhin der Anteil des DAB unberücksichtigt, der, wie oben angesprochen, oxidativ umgesetzt wird. [51;91;162]

Die beiden folgenden Abbildungen geben die Reaktionsgleichungen der Bestimmung wieder.

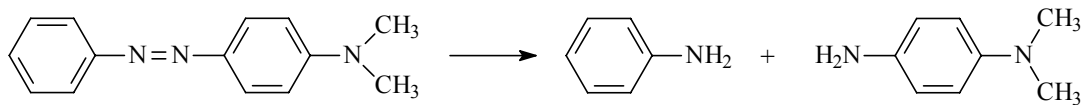


Abb. 3.5.3: Azoreduktion von 4-(N,N-Dimethylamino)azobenzen

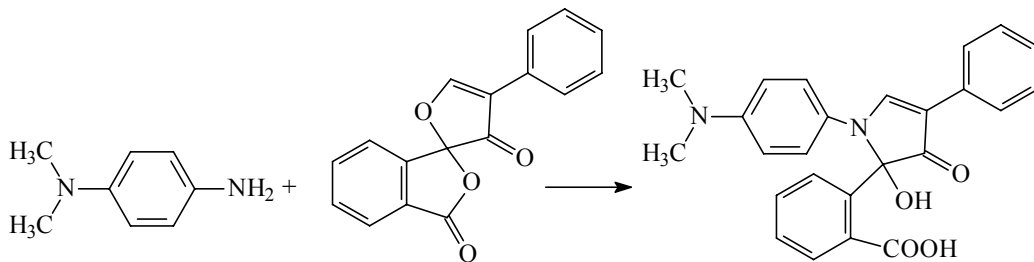


Abb. 3.5.4: Kupplung von 4-(N,N-Dimethylamino)anilin an Fluorescamin

3.6 Viabilitätsassays (Zytotoxizitätsbestimmungen)

Viabilitätsbestimmungen dienen der Erfassung geschädigter und toter Zellen. Unter dem Zelltod wird der irreversible Verlust von essentiellen zellulären Funktionen und Strukturen verstanden (M. Pirmohamed und K. Park in [210]). Zu dessen Ermittlung gibt es eine Reihe von Methoden, die jeweils unter verschiedenen Aspekten durchgeführt werden. Hinsichtlich der Exposition eines Agens kann grundsätzlich in zwei Hauptklassen eingeteilt werden. Zum einen gibt es die Kurzzeittests, zu denen alle üblichen Vitalitätstests gehören, und zum anderen gibt es Langzeittests. Deren wichtigster Unterschied besteht in der Erfassung des Erhaltes der Reproduktionsfähigkeit von Zellen. Kurzzeittests erfassen nur Zellen, die zum Zeitpunkt der Untersuchung (d.h. nach Noxenexposition) tot sind. Verspätete Reaktionen auf toxische Einflüsse oder aber im Gegenzug Reparaturmechanismen in den Zellen werden nicht berücksichtigt. Genauer spricht man daher bei den Kurzzeittests von der Ermittlung der *akuten* Toxizität und bei den Langzeittests von der Bestimmung der *Überlebensfähigkeit* [61].

Die meisten Kurzzeittests beruhen auf dem Vorhandensein geschädigter Membranen toter Zellen, mit deren Hilfe Farbstoffausschluss- oder der Farbstoffaufnahmetests (Trypanblau-, Kristallviolett, Neutralrottest) entwickelt wurden. Auch die Freisetzung von Inhalten, die vitale Zellen zurückhalten, kann bestimmt werden (LDH- Test). Zu Vitalitätstests werden häufig auch metabolische Reaktionen herangezogen, die das Verhalten spezifischer Enzyme nutzen (MTT- Test). Ebenso besteht die Möglichkeit, nach Zelllyse das vorher in die DNA eingebauete ^3H - Thymidin zu detektieren [61;210].

3.6.1 Neutralrottest

Im quantitativen Neutralrot (NR)- Test wird, wie oben erwähnt, die Membranintegrität nach Noxenexposition untersucht. Dabei wird während der Inkubationsphase der Farbstoff zunächst von allen Zellen aufgenommen, durch anschließendes Waschen (zumeist mit PBS) spült man dann sowohl überschüssigen Farbstoff, als auch das NR aus den toten Zellen heraus. Zellen mit intakter Membran haben den Farbstoff in ihr Lumen aufgenommen und halten ihn zurück. Die Lyse der ehemals lebenden, NR enthaltenden Zellen, setzt den Farbstoff frei und ermöglicht so eine quantitative photometrische Bestimmung bei 540 nm [24;25;116].

3.6.2 MTT- Test

Mit dem MTT- Test werden mitochondriale Schädigungen in den Zellen erfasst, das bedeutet, es ist mit diesem Test möglich, schwerere und tiefgehendere Zellschäden zu charakterisieren. Es handelt sich dabei ebenfalls um einen Assay zur Bestimmung von Lebensfähigkeit und Proliferationsfähigkeit bzw. zur Ermittlung der akuten Toxizität einer Substanz [24]. Er geht auf Mosmann [133] zurück und ist charakterisiert durch die Umwandlung des löslichen, schwach gelben Tetrazoliumsalses MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in blau- violette, wasserunlösliche Formazan- Kristalle (Abb. 3.6.1). Dabei handelt es sich um eine reduktive Spaltung durch mitochondriale Dehydrogenasen, die nur in metabolisch aktiven Zellen von Bedeutung sind. Dies bedeutet, dass mit dem Ansteigen der Anzahl lebender Zellen eine Erhöhung der metabolischen Aktivität einhergeht und dies wiederum direkt mit der Menge gebildeter Formazan- Kristalle korreliert, messbar anhand der Absorption bei 570 nm nach Lyse der Kristalle und der Zellen durch ein Detergens. Dafür verwenden unterschiedliche Autoren verschiedene Detergenzien. So enthält das Cell Proliferation Kit I eine salzsaure SDS- Lösung [157], der Assay nach Mosmann verwendet salzsaure Isopropanollösung [133] und andere Autoren nutzen eine Mischung aus SDS, DMSO und Eisessig [116]. Der MTT- Assay zeigt Aktivitätsunterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien und mit dem Alter einer Kultur auf [201]. Auch Carmicheal et al. [37] stellten Unterschiede zwischen diversen Tumorzelllinien in der MTT- Reduktionskapazität und der damit verbundenen Chemosensitivität fest. Alle Autoren kommen zu dem Schluss, dass es notwendig ist, für jeden Zelltyp die optimalen Assay- Bedingungen zu ermitteln.

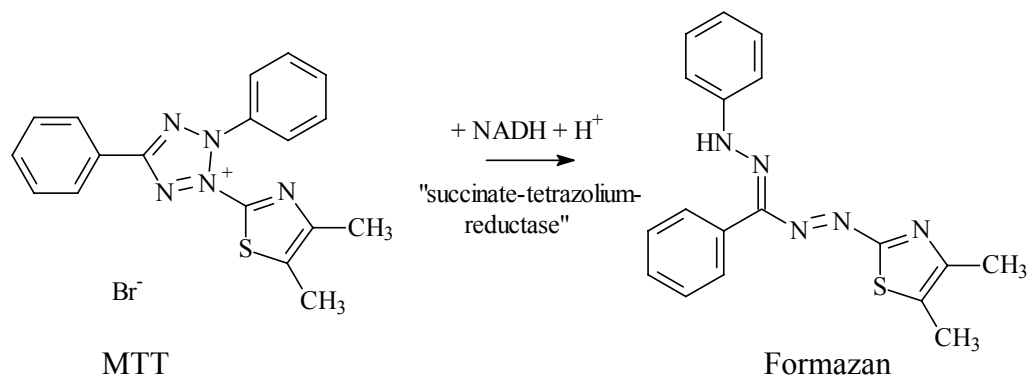


Abb. 3.6.1: Reduktive Spaltung des MTT zu Formazan

Für HeLa- Zellen konnte der Nachweis erbracht werden, dass der NR-, der MTT- und der Kristallviolett- Assay bis auf einige wenige Ausnahmen übereinstimmende Werte in Toxizitätsstudien lieferten [40].

3.7 BioRad- Proteinbestimmung

Bei dem BioRad- Assay handelt es sich um ein kommerzielles Kit (Bio-Rad, München), das auf der Bradford- Methode basiert. Bei dieser Methode entsteht ein farbiger Komplex aus den nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten kationischer Proteine und dem Farbstoff Coomassie-Brillantblau G-250 im sauren Milieu. Dadurch kommt es zur bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums des Coomassie-Brillantblau von 465 nm nach 595 nm, die am Farbumschlag von braun nach blau optisch ersichtlich ist. Die Extinktionszunahme bei 595 nm stellt ein Maß der Proteinkonzentration der bestimmten Lösung dar.

Der Bradford- Assay ist von den Färbetests zur Proteinbestimmung einer der sensitivsten und schnellsten. Bereits nach 5 min kann der Protein- Farbstoff- Komplex vermessen werden und bleibt bis zu einer Stunde stabil. Auch die Anfälligkeit gegenüber Reduktionsmitteln und anderen störenden Substanzen ist vergleichsweise gering, so haben Triton X-100 und SDS bis zu einem Gehalt von 0,1 % keinen Einfluss auf die Methode. Mit dem BioRad- Assay lassen sich nur lösliche Proteine bestimmen. Das bedeutet, dass membrangebundene Proteine und Ganz- Zell- Lysate erst aufgeschlossen und damit in eine lösliche Form überführt werden müssen. Zumeist geschieht dies mit Detergentien.

Der Nachteil dieses Assays liegt in dessen Subjektivität durch den Bezug auf ein Standardprotein. So ist es möglich, dass es bei Verwendung von gleichen Konzentrationen unterschiedlicher Standardproteine zu Differenzen kommen kann [118;156].