

**Anwendung eines dreidimensionalen Computermodells von
CYP3A zur Erzeugung Epitop-spezifischer Peptid-Antikörper
gegen Cytochrom P450 Enzyme**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Hermann Esselmann

geboren am 20. 12. 1961 in Bremen

2002

Referent: Prof. Dr. W. H. Müller
Korreferent: Prof. Dr. V. Kaefer
Tag der Promotion: 02.07.2002

Zusammenfassung

Die Cytochrom P450 Enzyme (CYP) spielen eine bedeutende Rolle im Stoffwechsel eines jeden Organismus. Sie sind in hohem Maße sowohl an Synthese- als auch an Abbauprozessen beteiligt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein dreidimensionales Computermodell von CYP3A zu erstellen, auf dessen Grundlage gegen Oberflächenepitope des CYP3A Peptid-Antikörper erzeugt wurden.

Mit Hilfe der Multiple-Antigenic-Peptide Methode wurden gegen vier unterschiedliche Epitope des CYP3A4 des Menschen bzw. CYP3A2 der Ratte sequenzspezifische Peptid-Antikörper erzeugt.

Durch Untersuchungen mittels Western Blot, ELISA und der Immunhistochemie konnte gezeigt werden, dass die Peptid-Antikörper eine hohe Spezifität für CYP3A4 bzw. CYP3A2 besitzen. In der humanen Leber konnte eine zonale Verteilung von CYP3A4 für alle vier untersuchten Epitope nachgewiesen werden. Eine ebenfalls zonale Verteilung zeigte CYP3A2 in der Leber der Ratte. Durch Dexamethason konnte bei diesem Tier die Expression von CYP3A2 verteilt über das gesamte Leberparenchym induziert werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse war es möglich, auch eine semiquantitative Bestimmung von CYP3A4 mittels ELISA vorzunehmen.

Das Modell ließ sich auch auf andere CYP-Isoformen (CYP1A2, CYP2D6 und CYP2E1) anwenden.

Aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse ist eine Anwendung des beschriebenen Computermodells für vielfältige Fragestellungen bezüglich des Medikamentenmetabolismus sowie der Erkennung individueller Cytochrom P450 Expressionsmuster denkbar.

Schlüsselwörter: Cytochrom P450 Enzyme, Computermodell, Peptid-Antikörper

Abstract

Cytochrome P450 enzymes (CYP) play a pivotal role in the metabolism of every organism. They are involved in numerous synthetic as well as catabolic processes.

The aim of this study was to develop a three-dimensional computer model of CYP3A which was used to select epitopes located on the surface of the molecule for the generation of CYP3A peptide antibodies.

A multiple antigenic peptide approach was chosen to generate sequence specific peptide antibodies against four different epitopes of human CYP3A4 and rat CYP3A2, respectively.

Western blot, ELISA, and immunohistochemistry experiments show that the peptide antibodies were highly specific for CYP3A4 and CYP3A2, respectively. In human liver a zonal distribution of CYP3A4 for all four investigated epitopes was observed. Likewise a zonal distribution of CYP3A2 in rat liver could be shown. After treatment with dexamethason rat CYP3A2 was induced and displayed a uniform distribution over the liver parenchyma.

Furthermore, a semiquantative evaluation of CYP3A4 protein expression by ELISA was established.

This model was also applicable to other CYP isoforms, namely CYP1A2, CYP2D6 and CYP2E1.

This study demonstrates the use of a computer model for the investigation of drug metabolism as well as the detection of individual cytochrome P450 expression patterns.

Keywords: cytochrome P450 enzymes, computer model, peptide antibodies

A. Inhaltsverzeichnis

A	Inhaltsverzeichnis	I
B	Abkürzungen	IV
1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.1.1	Chemikalien	9
2.1.2	Laborhilfsmittel	10
2.1.3	Bakterien	11
2.1.4	Plasmide	11
2.1.5	Enzyme	11
2.1.6	Versuchstiere	11
2.1.7	Humanes Untersuchungsmaterial	12
2.2	Methoden	12
2.2.1	Computersmodellierung von CYP3A4/CYP3A2	12
2.2.2	<i>Multiple Antigenic Peptide</i> -Synthese	12
2.2.2.1	Harzaufarbeitung und Abspaltung der Peptide	14
2.2.2.2	Analyse und Reinigung der Peptide	15
2.2.3	Immunisierung von Kaninchen	15
2.2.3.1	Gewinnung von Antiseren	16
2.2.3.2	Isolierung von IgG über Protein A	16
2.2.4	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA)	17
2.2.5	Expression von CYP-Enzymen in E.coli	18
2.2.5.1	Transformation von E.coli	18
2.2.5.2	Plasmidisolierung	20
2.2.5.3	Zellanzucht	22
2.2.5.4	Spheroplastenpräparation	22
2.2.5.5	Membranpräparation	23
2.2.6	Vorbehandlung der Ratten	24
2.2.7	Enterozytenpräparation	24
2.2.8	Mikrosomenpräparation	25
2.2.9	Proteinbestimmung	26
2.2.10	Cytochrom P450 Bestimmung	26
2.2.10.1	In Mikrosomen	26
2.2.10.2	In Plasmamembranen von E.coli	27
2.2.11	SDS-PAGE	27
2.2.11.1	Coomassie-Blau-Färbung	28
2.2.12	Western Blot	28

2.2.12.1	Ponceau S-Färbung	29
2.2.13	Immunfärbung und densitometrische Bestimmung	29
2.2.14	Cytochrom P450-Enzymaktivitäten	30
2.2.14.1	Test für Ciclosporin	30
2.2.14.2	Probenextraktion	31
2.2.14.3	HPLC-Verfahren	31
2.2.14.4	HPLC-Analyse	32
2.2.14.5	Phenacetin-O-Deethylase Aktivität	32
2.2.14.6	Bufuralol-1'-Hydroxylase Aktivität	33
2.2.14.7	Chlorzoxazon-6-Hydroxylase Aktivität	33
2.2.14.8	Nifedipin-Oxidase Aktivität	33
2.2.14.9	Immuninhibitionstest	34
2.2.15	Immunhistochemische Methoden	35
2.2.15.1	Formalinfixierung und Paraffinschnitte	35
2.2.15.2	Entparaffinierung	35
2.2.15.3	Immunfärbung	35
2.2.15.4	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	36
2.2.15.5	Einfrieren von Gewebe und Herstellung von Gefrierschnitten	36
2.2.15.6	Immunfärbung und Gegenfärbung in Hämatoxylin	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Computermodellierung von CYP3A4/CYP3A2	38
3.2	Auswahl spezifischer Epitope im CYP3A4/2 Modell	39
3.3	Auswahl spezifischer Epitope in CYP1A2, 2C8, 2C10, 2D6 und 2E1	41
3.4	MAP-Synthesen	42
3.5	Titerbestimmungen der Antiseren	43
3.5.1	MAP 11	44
3.5.2	MAP 12	46
3.5.3	MAP 7	46
3.5.4	MAP 5	46
3.5.5	MAP 6	49
3.5.6	MAP 17	49
3.5.7	MAP 18	50
3.5.8	MAP 19	50
3.5.9	MAP 16	52
3.5.10	MAP 1	52
3.5.11	MAP 2	53
3.5.12	MAP 4	53
3.6	Spezifität der Anti-Peptid-Antikörper im Western Blot	54
3.6.1	CYP3A4	54
3.6.2	CYP3A2	56
3.6.3	CYP1A2	58
3.6.4	CYP2E1	60
3.6.5	CYP2D6	61
3.7	Detektion von CYP-Expressionsmustern mittels Western Blot	62
3.7.1	CYP3A4	62

3.7.2	CYP3A2	63
3.7.3	CYP1A2	64
3.7.4	CYP2E1	66
3.7.5	CYP2D6	68
3.8	Semiquantitative Bestimmung von CYP3A4 im Western Blot und ELISA	69
3.9	Kreuzreaktivität der Anti-Peptid-Antikörper mit CYP-Enzymen vom Schwein	70
3.10	Immunhistochemischer Nachweis von Cytochrom P450 Enzymen	72
3.10.1	Lokalisation von CYP3A4 in der humanen Leber	72
3.10.2	Lokalisation von CYP3A4 im humanen Darm	73
3.10.3	Lokalisation von CYP3A2 in der Rattenleber	73
3.11	Quantifizierung von Cytochrom P450 in Mikrosomen	75
3.12	Quantifizierung von CYP1A1, 1A2, 2C10, 2E1 und 3A4 in E.coli	76
3.13	Cytochrom P450-Enzymaktivitäten	77
3.14	Induktion des Ciclosporinmetabolismus	78
3.15	Immunitätsversuche	80
4	Diskussion	81
5	Literatur	89

B. Abkürzungen

A	Absorption
Amp	Ampicillin
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre-DNA
CYP	Cytochrom P450
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl-
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
HL	Humane Leber
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
M	Molar (Mol pro Liter)
mA	Milliampere
mM	Millimolar (Millimol pro Liter)
μM	Micromolar (Micromol pro Liter)
MOPS	3-(N-Morpholino) Propansulfonsäure
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
MAP	<i>Multiple-Antigenic-Peptide</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
POD	Peroxydase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
RP-HPLC	Reversed-Phase-Hochdruckflüssigkeitschromatographie
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylendiamin
TE	Tris-EDTA
TFA	Trifluoressigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-Galaktosid

Abkürzungen der Aminosäuren:

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Iso	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	The	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1. EINLEITUNG

In der biomedizinischen Forschung und Diagnostik werden Antikörper für vielfältige Aufgaben eingesetzt. So dienen sie beispielsweise im ELISA, RIA und FACS, in der Immunhistochemie, den unterschiedlichen Blotting Verfahren und der Immunpräzipitation zur spezifischen Detektion unterschiedlichster Substanzen mit dem Vorteil einer hohen Nachweisempfindlichkeit.

Die Gewinnung solcher Antikörper erfolgt üblicherweise über die Immunisierung von Versuchstieren. Den Tieren wird ein aufgereinigtes Agens (z. B. ein Protein) mehrfach injiziert, und nach 10-14 Tagen wird aus einer Blutprobe das Serum isoliert. Dabei erhält man polyklonale Antiseren, welche aus einem heterogenen Gemisch von Antikörpern bestehen. Durch die Arbeit von Köhler und Milstein (Köhler, 1975) gelang es, auch monoklonale Antikörper herzustellen, die normalerweise in der Natur nicht vorkommen. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass monoklonale Antikörper einfacher zu charakterisieren sind, da sie eine homogene Population ein und desselben Antikörpers mit nur einem spezifischen Bindungsepitop darstellen und *in-vitro* in beliebiger Menge synthetisiert werden können.

Durch Kenntnis der Aminosäuresequenz können heute allerdings auch sehr spezifische polyklonale Antiseren hergestellt werden. Dabei macht man sich die Möglichkeit zu Nutze, nicht ein ganzes Protein, sondern nur bestimmte Bereiche eines solchen Proteins zur Immunisierung zu verwenden. Um eine adäquate Immunreaktion auszulösen, müssen dabei die mehr oder weniger kurzen Peptidketten an größere Trägerproteine gekoppelt werden (Schulz-Utermoehl, 2000).

Zur Beurteilung von Antikörpern werden die Spezifität und die Affinität ihrer Bindung an ein Antigen verwendet. Die Spezifität gibt an, wie gut ein Antikörper zwischen ähnlichen Antigenstrukturen unterscheiden kann. Auf molekularer Ebene wird die Spezifität durch die Wechselwirkungen zwischen dem Antikörper und dem Antigen bestimmt. Dabei treffen zwei Proteinoberflächen aufeinander, die möglichst genau ineinanderpassen sollten. Dies bestimmt dann, wie nahe sich die zwei Oberflächen kommen und damit die Stärke der nichtkovalenten, intermolekularen Bindungen. Die Form der Oberfläche und die Anordnung dieser Bindungen entscheidet über die Spezifität, während die Art und der Energiebeitrag dieser Bindungen wichtige Faktoren für die Affinität sind.

Hat ein anderes Molekül zufällig eine ähnliche Oberfläche wie das Antigen, gegen das der Antikörper erzeugt wurde und kann es dazu ähnliche intermolekulare Bindungen eingehen, kommt es zur Kreuzreaktion des Antikörpers mit diesem Molekül. Häufig werden Kreuzreaktionen zwischen homologen Proteinen unterschiedlicher Spezies beobachtet, deren Aminosäuresequenz sich nur geringfügig unterscheidet. Aber auch völlig unterschiedliche Proteine, die keinerlei Sequenzhomologie besitzen, können vom gleichen Antikörper erkannt werden.

Eine Kreuzreaktion eines Antikörpers darf nicht mit seiner unspezifischen Bindung verwechselt werden. Die Unterscheidung liegt in der Art der Bindung. Die Kreuzreaktion wird prinzipiell über die Antigenbindungsstelle (den Idiotyp) vermittelt und besitzt oft Affinitäten, die der Bindung an das Antigen ähnlich sind. Deshalb ist es nicht möglich, Kreuzreaktionen in der experimentellen Praxis durch Präinkubation mit den "unspezifischen" Antigenen zu entfernen, wie es bei einem polyklonalen Serum möglich wäre, in dem auch Antikörper gegen andere Epitope des gleichen Antigens vorhanden sein können. Unspezifische Bindungen werden dagegen über andere Teile des Antikörpermoleküls vermittelt.

Ein Antikörper kann an einen einzelnen Abschnitt eines Polypeptidstranges binden (sequenzielles oder lineares Epitop). Oft bindet er dann mit vergleichbarer Affinität auch an Oligopeptidstückchen (5-15 Aminosäurereste) aus der Proteinsequenz, die dem sequentiellen Epitop entsprechen.

Tragen Aminosäurereste aus verschiedenen Abschnitten der Peptidkette zur Bindung bei, spricht man von einem konformationellen Epitop. Die Bindung solcher größerer Epitope ist möglich, da die Antigenbindungsstellen der Antikörper eine Proteinoberfläche von bis zu 650 Å² bilden können (Desmyter, 2001).

Praktische Auswirkungen hat die Art des Epitops auf die Verwendbarkeit eines Antikörpers in verschiedenen Immunoassays. Konformationsepitope werden bei der Denaturierung des Antigens meist irreversibel zerstört. Solche Epitope können also im Western Blot nach der denaturierenden SDS-Gelelektrophorese nicht mehr von dem Antikörper erkannt werden.

Die Stärke der Bindung eines Antikörpers an sein Antigen, seine Affinität, ist neben der Spezifität der zweite wichtige Faktor zur Beurteilung der Qualität eines Antikörpers. Die

Stärke dieser Bindung wird durch die Bindungskonstante angegeben. Die Bindungskonstante ist ein Maß für das Reaktionsgleichgewicht, das sich zwischen den an das Antigen bindenden und davon abdissoziierenden Antikörpermolekülen einstellt. Je mehr Antikörper im Gleichgewicht in gebundener Form vorliegen, desto besser ist die Affinität des Antikörpers zu seinem Antigen.

Da diese Arbeit die Herstellung von Antikörpern gegen Cytochrom P450 Enzyme zum Gegenstand haben soll und diese äußerst vielgestaltig sind, wird im Folgenden zunächst auf die unterschiedlichen Cytochrom P450 Enzyme und ihre Bedeutung im Organismus eingegangen.

Die sogenannte Cytochrom P450 (CYP) Enzymfamilie beinhaltet eine Vielzahl verschiedener Isoenzyme.

Die Bezeichnung Cytochrom P450 rührt daher, dass diese Proteine als prosthetische Gruppe eine Häm-Gruppe, also ein Pigment, besitzen und bei 450 nm ein ungewöhnliches Absorptionsspektrum zeigen.

CYP wurden ursprünglich in Mikrosomen der Rattenleber entdeckt. Mikrosomen sind intrazelluläre Membranfraktionen, welche man nach Zellaufschluß und anschließender Zentrifugation erhält. Wird eine solche Mikrosomenfraktion mit einem Reduktionsmittel versetzt und mit Kohlenmonoxid (CO) begast, zeigt sich bei der Analyse im Spektralphotometer im Vergleich zur nicht begasteten Probe eine starke Zunahme der Absorption bei 450 nm. Das vom reduzierten Eisenatom der Hämgruppe fest gebundene CO führt zu dieser Absorptionszunahme (Klingenberg, 1958, Omura, 1964). Andere Hämproteine, wie beispielsweise Hämoglobin, Myoglobin oder Cytochrom c zeigen diesen Effekt nicht. Das hängt damit zusammen, dass im P450 das Eisenatom in einzigartiger Weise durch sechs Koordinationsbindungen festgehalten wird, wobei die vier Stickstoffatome des Porphyrins mit dem Eisenatom einen ebenen, quadratischen Komplex bilden. Proximal und distal dieser Hämebene ist Platz für den fünften und sechsten Liganden. Den fünften Liganden stellt ein Thiolat-Anion dar, der sechste Bindungsplatz bleibt frei und dient zur Bindung von molekularem Sauerstoff. Nach der EC Nomenklatur werden Cytochrom P450 Enzyme deshalb auch als Häm-Thiolat Enzyme bezeichnet (Nomenclature Committee of the Int. Union of Biochem., 1991).

Die Benennung der einzelnen CYP erfolgt laut Nelson (Nelson, 1996) nach folgendem Schema: Unterscheiden sich zwei CYP um mehr als 40% in ihren Aminosäuresequenzen, so

werden sie zwei verschiedenen Familien zugeordnet. Innerhalb dieser Familien werden Unter- oder Subfamilien unterschieden. Diese sind charakterisiert durch eine mehr als 55% betragende Aminosäuresequenzhomologie.

CYP Familie	Subfamilie	Einzelne Isoenzyme
1	A	1, 2
	B	1
	C	1
2	A	6, 7, 13, 18
	B	6, 7,
	C	8, 9, 18, 19
	D	6, 7, 8
	E	1
	F	1
	G	1, 2
	J	2
	R	1
	S	1
	T	2, 3
	U	1
W	1	
3	A	4, 5, 7, 43
4	A	11, 20, 21, 22
	B	1
	F	2, 3, 8 - 12, 22 - 28
	V	2
	X	1
5	A	1
7	A	1
	B	1
8	A	1
	B	1
11	A	1
	B	1, 2
17	keine weitere Subfamilie	keine weiteren Isoenzyme
19	keine weitere Subfamilie	keine weiteren Isoenzyme
20	keine weitere Subfamilie	keine weiteren Isoenzyme
21	A	1, 2
24	keine weitere Subfamilie	keine weiteren Isoenzyme

26	A	1
	B	1
	C	1
27	A	1
	B	1
	C	1
39	keine weitere Subfamilie	keine weiteren Isoenzyme
46	keine weitere Subfamilie	keine weiteren Isoenzyme
51	keine weitere Subfamilie	keine weiteren Isoenzyme

Tab. 1: Übersichtsschema zur Benennung der Cytochrom P450 Enzyme. Beim Menschen wurden bisher die hier dargestellten CYP-Gene sequenziert und zusätzlich einige Pseudogene, die mit einem P und gegebenenfalls einer weiteren Ziffer hinter dem Isoenzym benannt werden (z. B. 3A5P1 und 3A5P2).

Cytochrom P450 Enzyme finden sich in praktisch jedem Organismus. So wurde ihr Vorkommen seit ihrer Erstbeschreibung durch Klingenberg im Jahre 1958 sowohl in Archaeals als auch in Eubakterien, in Algen, Pilzen, niederen und höheren Pflanzen sowie in sämtlichen ein- und mehrzelligen Tieren sowie im Menschen nachgewiesen (Nelson, 1993, Nelson 1996, Nelson, 1999). Wegen ihrer zentralen Bedeutung im Stoffwechselgeschehen werden diese Enzyme sowohl u. a. in der Umwelttoxikologie (Sarasquete, 2001), als auch in der Endokrinologie (Conley, 2001, Wang, 2000) und besonders in der Pharmakologie (Rendic, 2002, Guengerich, 2002) intensiv beforscht. Allein in den letzten zwei Jahren wurden mehr als 5000 Arbeiten zu diesem Thema veröffentlicht.

Im Säuger dient die Leber als zentraler Ort metabolischer Vorgänge. Es wundert daher nicht, dass neben Lunge, Niere und Dünndarm gerade hier eine Häufung von Cytochrom P450 zu finden ist (Guengerich, 1995). Lebergewebe, enthält den prozentual größten Anteil an Cytochrom P450 aller Gewebe. Das Enzym ist in den Hepatozyten und dort in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert. Diese Lokalisation ist allen CYP gemeinsam, die dem Fremdstoffmetabolismus zugeordnet sind. Demgegenüber finden sich in Organen der Synthese, wie beispielsweise in der Nebennierenrinde, CYP hauptsächlich in der inneren Mitochondrienmembran, dem Ort der Umwandlung von Cholesterin in Steroidhormone.

Cytochrom P450 Enzyme katalysieren die reduktive Spaltung eines Sauerstoffmoleküls, wobei ein Sauerstoffatom zu Wasser reduziert wird, während das andere Sauerstoffatom zur Substratoxidation verwendet wird. Die Elektronen für diese Reduktion werden von NADPH und/oder NADH übertragen. Aufgrund der Elektronenübertragung wird in ein bakterielles/mitochondriales (Typ I) und ein mikrosomales (Typ II) Cytochrom P450-System unterschieden.

Das bakterielle/mitochondriale P450-System besteht in den meisten Fällen aus drei Proteinen: Einer FAD-haltigen NADH oder NADPH abhängigen Reduktase, einem Eisen-Schwefel-Protein und Cytochrom P450. Das mikrosomale P450-System besteht aus zwei Proteinen: Einer membranassoziierten NADPH-abhängigen Cytochrom P450 Reduktase und Cytochrom P450. Hier werden die Elektronen vom NADPH über die FAD- und FMN-haltige P450 Reduktase auf Cytochrom P450 übertragen (Degtyarenko, 1993).

Die Funktionen der Cytochrom P450 Enzyme sind mannigfaltig und abhängig von der Isoform des jeweiligen Enzyms. So werden mit ihrer Hilfe beispielsweise in Pflanzen Flavonoide synthetisiert, in Insekten für diese Tierart spezifische Hormone, z. B. das Ecdyson, sowie in den Keimdrüsen von Säugern Steroide aufgebaut. Darüberhinaus dienen CYP in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Lokalisation und den Bedürfnissen des Organismus vielfachen weiteren Syntheseprozessen, auf die im einzelnen hier nicht eingegangen werden soll. Außerdem spielen CYP eine zentrale Rolle im Fremdstoffmetabolismus der lebenden Zelle. So werden die meisten Pharmaka und Toxine über das Cytochrom P450 Enzymsystem verstoffwechselt (Rendic, 2002). Hier ist besonders das CYP3A zu erwähnen, welches den Hauptanteil der CYP in der Leber darstellt (Wrighton, 2000).

Die Proteinexpression der Cytochrom P450 Enzyme ist abhängig von endogenen sowie von exogenen Einflüssen. Wie bereits erwähnt, enthält grundsätzlich jede Zelle CYP, doch ist ihre Ausprägung in hohem Maße bestimmt von der An- oder Abwesenheit regulatorischer Faktoren. CYP3A7 ist in der fetalen Leber und Plazenta zu finden, nach der Geburt ist es jedoch kaum noch nachzuweisen (de Wildt, 1999). Bestimmte Hormone, wie z. B. die Steroide oder auch das Wachstumshormon GH, induzieren die Bildung von CYP3A (Oinonen, 1995). Auch Medikamente beeinflussen die CYP-Expression. So läßt sich beispielsweise das Phänomen der Medikamenteninteraktion dadurch erklären, dass ein Medikament nicht mehr oder nur verlangsamt verstoffwechselt werden kann, und so entweder in seiner Wirkung verstärkt oder verringert wird, wenn ein anderes Medikament eine höhere Affinität zum spezifischen CYP besitzt oder in höheren Mengen vorhanden ist.

CYP werden in ihrer Funktion zum sog. Phase I Metabolismus gezählt. Dabei werden insbesondere hydrophobe Fremdstoffe dergestalt biochemisch modifiziert (hauptsächlich über die Einführung einer Hydroxylgruppe), dass sie im Phase II Metabolismus durch Glukuronidierung, Sulfatierung oder Acetylierung der Ausscheidung über den Harn oder die Gallenflüssigkeit zugeführt werden können.

Wie bereits erwähnt, sind bereits eine Vielzahl von CYP bekannt. Von einigen ist die Tertiärstruktur mittels Röntgenstrukturanalyse bereits ermittelt worden (Poulos, 1987, Ravichandran, 1993, Hasemann, 1994, Cupp-Vickery, 1994).

Besonders bei den Membran-assoziierten CYP ist es jedoch bisher noch nicht gelungen, diese in der für die Röntgenstrukturanalyse notwendigen kristallinen Form darzustellen, da sie sich aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften dem Zugriff durch die bisherigen Analysemethoden entziehen. Im Jahr 2000 jedoch gelang es der Arbeitsgruppe um Williams und Cosme, das CYP2C5 aus Leberzellen des Kaninchens zu kristallisieren. Ihre Methode bestand darin, durch molekularbiologische Modifizierung des CYP und damit der Entfernung seines sog. Membranankers, dieses in Lösung zu bringen und so der Röntgenstrukturanalyse zugänglich zu machen (Williams, 2000).

Trotz der geringen Sequenzhomologie zwischen den relativ einfach zu isolierenden bakteriellen CYP und den membrangebundenen CYP des Säugers ist die dreidimensionale Tertiärstruktur der Cytochrom P450 Enzyme bei allen Organismen in hohem Maße konserviert. Aufgrund dieser Tatsache wurden bereits seit 1993 (Koymans, 1993) Computermodelle entwickelt, welche einerseits das Studium der Membrantopologie ermöglichten und mit deren Hilfe andererseits die Wechselwirkung zwischen CYP und den Proteinen, die die Elektronen für die Enzymreaktion bereitstellen, untersucht werden konnte. Darauf basierend war es möglich, einzelne Molekülregionen aufzusuchen und gezielt Antikörper gegen diese zu synthetisieren, mit deren Hilfe eine Überprüfung der tatsächlichen Struktur des Moleküls möglich wurde (Cribb, 1995, Boobis, 1996, Dai, 1998).

Mit Hilfe der *in-vitro* Mutagenese, einer Methode zum gezielten Austausch einzelner oder mehrerer Aminosäuren im Protein, wurde auch von molekularbiologischer Seite die Struktur-Funktionsbeziehung von CYP Enzymen untersucht (Amarnah, 1993, Chen, 1994, Azeva, 2001, Belkina, 2001).

Ziel dieser Arbeit

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von CYP-Enzymen und die Charakterisierung funktioneller Aminosäurebereiche ist besonders aus klinischer und pharmakologischer Sicht von Interesse.

Es war daher Ziel dieser Arbeit,

1. eine dreidimensionale Struktur von CYP 3A Enzymen durch Computermodellierung zu erstellen,
2. ausgewählte Sequenzbereiche auf deren funktionelle Bedeutung hin zu untersuchen,
3. die für diese Untersuchungen notwendigen Antikörper herzustellen,
4. die praktische Anwendung dieser epitop-spezifischen Antikörper im Western Blot Verfahren, im ELISA und in der Immunhistochemie zu untersuchen,
5. die spezifische Hemmung von CYP 3A Enzymen *in-vitro* mit Hilfe epitop-spezifischer Antikörper zu untersuchen,
6. sowie die Übertragbarkeit dieser Methodik auf andere CYP-Enzyme zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Acrylamidstammlösung-rotiphorese Gel 30 (30% (w/v)Acrylamid + 0,8% (w/v) Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Agar	Difco, Detroit (USA)
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bicinchoninsäure-Lösung (BCA)	Sigma, Deisenhofen
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Baker, Deventer (NL)
4-Chlor-1-Naphthol	Sigma, Deisenhofen
Chlorzoxazon	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue R	Sigma, Deisenhofen
Dexamethason (Fortecortin-Ampullen)	Merck, Darmstadt
Dichlormethan	Riedel-de Haen, Seelze
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Riedel-de Haen, Seelze
Ficoll	Pharmacia, Freiburg
Freundsches Adjuvans, komplett und inkomplett	Sigma, Deisenhofen
Gelatine	Difco, Detroit (USA)
Glycerol	Sigma, Deisenhofen
Harz: Fmoc-L-Ala-Pep-Syn-KA	Millipore, Eschborn
Hefeextrakt	Difco, Detroit (USA)
D,L-Isocitrat	Roth, Karlsruhe
Isocitrat-Dehydrogenase	Boehringer, Mannheim
Isopropanol	Baker, Deventer (NL)
Isopropylthiogalaktosid (IPTG)	Sigma, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Baker, Deventer (NL)
3-Methylcholanthren	Aldrich, Steinheim
NADP	Boehringer, Mannheim
Natrium-Laurylsarcosin	Sigma, Deisenhofen
tri-Natriumcitrat-2-hydrat	Riedel-de Haen, Seelze

tetra-Natriumdiphosphat	Riedel-de Haen, Seelze
N,N-Dimethylformamid	Millipore, Eschborn
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat	Riedel-de Haen, Seelze
Nifedipin	Sigma, Deisenhofen
Nitrobluetetrazolium (NBT)	Sigma, Deisenhofen
Phenobarbital (Luminal-Ampullen)	Bayer, Leverkusen
Plasmid Maxi Preparation Kit	Quiagen, Düsseldorf
Piperidin 20 % DMF (v/v)	Millipore, Eschborn
Ponceau S-Konzentrat	Sigma, Deisenhofen
Protein A Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Proteinmolekulargewichtsmarker	Pharmacia, Freiburg
Rinderserumalbumin	Serva, Heidelberg
Ringer-Lactat DAB 7	B.Braun, Melsungen
TBTU	Fluka, Neu-Ulm
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Trifluoressigsäure	Millipore, Eschborn
Trypanblau-Lösung	Serva, Heidelberg
Trypton	Difco, Detroit (USA)
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

Alle weiteren Chemikalien der Grade "reinst" oder "p.a." wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen. Die Aminosäure-Derivate für die Peptidsynthesen stammen von der Fa. Bachem (Heidelberg).

Aufgereinigtes humanes CYP1A1, CYP1A2, CYP2D6, CYP2C10, CYP3A4, CYP3A5 und CYP2E1 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. F. P. Guengerich (Vanderbilt University, Nashville, USA), zur Verfügung gestellt. Ebenso Bufuralol, 1'-Hydroxybufuralol und der Pyridinmetabolit von Nifedipin. Ciclosporin und Cyclosporin D stammten von Dr. E. Wiskott (Sandoz, Basel, Schweiz).

2.1.2 Laborhilfsmittel

Filterpapier	Schleicher & Schüll, Dassel
Immobilon-P(PVDF)-Membran	Millipore, Molsheim/Frankreich
Sterilfiltereinheiten (0,22 µm, 0,45 µm)	Millipore, Molsheim/Frankreich
Li Chroprep® RP-8,25 - 40 µm	Merck, Darmstadt
Nucleosil 120-5 C8 30x4 mm ID	Macherey-Nagel, Düren

Nucleosil 120-3 C8 100x4 mm ID

Macherey-Nagel, Düren

Nucleosil 123-3 C8 250x4 mm ID

Macherey-Nagel, Düren

2.1.3 Bakterien

Escherichia Coli: Stamm DH5 α

2.1.4 Plasmide

Die cDNAs zur Expression von humanem CYP1A1-, CYP1A2-, CYP2C10-, CYP2E1- und CYP3A4 in E.coli stammen aus dem Labor von Prof. F.P. Guengerich (Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA). Sämtliche cDNAs waren in modifizierte pCW Plasmidvektoren hineinkloniert worden. Zusätzlich waren die N-Termini der CYP-Proteine modifiziert, um eine höhere Expressionsausbeute in E.coli zu erreichen.

pCW 5479 bp AmpR, LacZ, LacI (Barnes et al., 1991)

pCW '/NF14 (P450 3A4); Gillam, 1993

pCW '/1A1#17 (P450 1A1); Guo, 1994

pCW '/1A2#1024 (P450 1A2); Sandhu, 1994

pCW '/2C10/9 (P450 2C9/10); Sandhu, 1993

pCW '/2E1#18(r) (P450 2E1); Gillam, 1994

2.1.5 Enzyme

Die Isocitrat-Dehydrogenase wurde von Sigma, Deisenhofen bezogen.

2.1.6 Versuchstiere

Die für die Versuche verwendeten männlichen Sprague-Dawley Ratten stammen vom Zentralen Tierlabor der MHH, Hannover. Die Tiere hatten im Durchschnitt ein Gewicht von 180-380 g und wurden in Gruppen in Makrolonkäfigen Typ IV auf Einstreu unter freiem Zugang zu Preßfutter (Altromin) und Wasser gehalten.

Bei den Schweinen handelte es sich um junge Mastschweine der Rasse "Deutsches Hybridschwein", die vom Schlachthof Hannover stammten.

Die zur Immunisierung eingesetzten Kaninchen waren weibliche 3-4 kg schwere Neuseeländer Kaninchen (Charles River), die in Einzelkäfigen gehalten wurden.

2.1.7 Humanes Untersuchungsmaterial

Humanes Untersuchungsmaterial stammte entweder von der Klinik für Abdominal- und Transplantationschirurgie oder der Klinik für Urologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

2.2 Methoden

2.2.1 Computermodellierung von CYP3A4 bzw. 3A2

Die Tertiärstruktur des bakteriellen nicht-membrangebundenen CYP101 aus *Pseudomonas putida*, die Poulos (Poulos, 1987) ermittelte, diente als Grundlage zur Voraussage eines dreidimensionalen Modells von CYP2B4 des Kaninchens (Krüger, 1992). Aufbauend auf diesem Modell wurde ein dreidimensionales Computermodell von CYP3A4 des Menschen bzw. CYP3A2 der Ratte mit Hilfe einer Graphik Workstation von Evans und Sutherland und dem Program SYBYL (Tripos Associates, Inc. St. Louis, Missouri) erstellt.

Das Grundgerüst von CYP2B4 wurde dabei vollständig übernommen. Anschließend wurden die Seitenkettenreste von CYP2B4 gegen die von CYP3A4/2 ausgetauscht. Eventuelle Überlappungen von Seitenketten wurden kontrolliert und durch Änderungen der Torsionswinkel der Bindungen in den Seitenketten korrigiert.

2.2.2 Multiple Antigenic Peptide-Synthese

Die Peptide wurden als *Multiple Antigenic Peptides* (MAPs) synthetisiert (Tam, 1988; Posnett et al., 1988; McLean et al., 1991). Bei dieser Methode macht man sich die Trifunktionalität der Aminosäure Lysin zunutze und verwendet die beiden Aminogruppen eines gebundenen Lysins zur weiteren Peptidbindung. Mit der Kopplung weiterer Lysine verdoppeln sich so die verfügbaren Aminogruppen nach jedem Zyklus. Nach drei Kopplungsschritten erhält man ein

aus sieben Aminosäuren bestehendes Lysingerüst, an dessen acht freie Aminogruppen sukzessive die folgenden Aminosäuren des eigentlichen, zu synthetisierenden Peptids gebunden werden. Durch die gleichzeitige Kopplung der einzelnen Aminosäuren an alle verfügbaren Aminogruppen des Lysingerüsts erhält man schließlich das Peptid in achtfacher Kopie an einem einzigen Molekül.

Die Synthesen erfolgten nach der von Merrifield (1963) entwickelten Festphasenmethode im Durchflußbetrieb ("continuous flow") und mit orthogonalem Schutzschema, wobei als Synthesebaustein Aminosäurederivate benutzt werden, die am Aminoternus mit einer Fluorenylmethyloxycarbonyl-Gruppe (Fmoc) geschützt sind (Atherton, 1989).

Während der Synthese war die wachsende Peptidkette an einen unlöslichen Träger gebunden. Dafür wurde Polystyrol-Harz (Wang Harz, Saxon Biochemicals, Hannover) verwendet. Aus sterischen Gründen wurde das Lysingerüst nicht direkt an das Harz gekoppelt, sondern über ein Alanin, das bereits über einen Linker, ein p-Alkoxybenzyl Rest, am mit 1% (w/v) Divinylbenzolstyrol vernetzten Wang Harz fixiert war.

Die MAPs wurden an einen vorher präparierten Fmoc8Lys7Ala-p-Alkoxybenzyl-Polystyrolrest synthetisiert. Die basenlabile Fmoc-Schutzgruppe wurde mit 20 % Piperidin in DMF abgespalten. Nach dem Auswaschen der Abspaltungslösung mit DMF wurde die nächste Aminosäure, Fmoc-L-Lysin-Fmoc-OH, über die Carboxylgruppe an die freie Aminogruppe des gebundenen Alanins gekoppelt. Die in DMF gelöste Aminosäure wurde im Durchflußbetrieb mehrfach über das Harz geleitet. Das entstandene Dipeptid-Harz-Addukt wurde mit DMF gewaschen, wodurch überschüssige Reagenzien entfernt wurden. Der Syntheszyklus, bestehend aus Abspaltung der N α -Schutzgruppe, Waschen, Kopplung der nächsten Aminosäure und erneutem Waschen, wurde so lange wiederholt, bis die geforderte Kettenlänge erreicht war.

Da die resonanzstabilisierte Carboxylgruppe einer Aminosäure zu unreaktiv ist, um mit einer Aminogruppe eine Peptidbindung einzugehen, wurden die eingesetzten Aminosäuren voraktiviert. Die Aminosäuren wurden in situ aktiviert, das heißt als freie Säure in Gegenwart der Aktivatoren TBTU (2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-tetrafluorborat, Peboc, Wales), HOBt (1-Hydroxy-benzotriazol, Fluka, Neu-Ulm) und DIPEA (Diisopropylethylamin, Fluka, Neu-Ulm) eingesetzt.

Seitengruppen trifunktioneller Aminosäuren wurden durch säurelabile Schutzgruppen blockiert, die während der basischen Fmoc-Abspaltung stabil blieben. Die Hydroxylgruppen

von Serin und Theonin wurden als t-Butylether, die Säuregruppen von Aspartat und Glutamat als t-Butylester geschützt. Arginin wurde als Pmc-(2,2,5,7,8-Pentamethylchroman-6-sulfonyl-) Derivat eingesetzt. Die ϵ -Aminogruppen der Lysineinheiten außerhalb des Lysingerüsts wurden als t-Butyloxycarbonyl-(Boc) Derivate eingesetzt.

Folgende Aminosäuren wurden verwendet: Fmoc-L-Ala, Fmoc-L-Arg(Pmc), Fmoc-L-Asp(OtBu), Fmoc-L-Asn(Trt), Fmoc-L-Gly, Fmoc-L-Gln(Trt), Fmoc-L-Glu(OtBu), Fmoc-L-His(Trt), Fmoc-L-Ile, Fmoc-L-Leu, Fmoc-L-Lys(Boc), Fmoc-L-Met, Fmoc-L-Phe, Fmoc-L-Pro, Fmoc-L-Ser(tBu), Fmoc-L-Thr(tBu), Fmoc-L-Trp, Fmoc-L-Tyr(tBu) and Fmoc-L-Val (Millipore, Eschborn).

Eine spektroskopische Analyse der Synthese wurde bei 312 nm durchgeführt. Sowohl Fmoc-Aminosäure-Derivate als auch das Dibenzofulven-Addukt, das bei der Fmoc-Abspaltung als Intermediat entsteht, zeigen eine hohe Absorption im UV-Bereich. Anhand der Absorptionsprofile ließ sich die Kinetik der Fmoc-Abspaltung und bei Verwendung der Aktivester auch die nachfolgende Kopplungsreaktion verfolgen. Durch den Vergleich der Spektren, die bei der Vor- und Nachsäulen-Detektion erhalten wurden, konnte der Umsatz der aktivierten Fmoc-Aminosäuren kontrolliert werden. Wurden die Aminosäuren als freie Säuren eingesetzt, war eine Kontrolle der Kopplungsschritte nicht möglich, da die starke Absorption des Aktivators TBTU die Absorption der Aminosäuren überdeckte.

2.2.2.1 Harzaufarbeitung und Abspaltung der Peptide

Nach abgeschlossener Synthese wurden die Peptidharze in eine Glasfritte überführt, jeweils 3 mal mit 10 ml 100%igem Isopropanol, Eisessig, Isopropanol und Diethylether gewaschen und anschließend unter Anlegen eines Vakuums getrocknet.

Die Abspaltung der Peptide vom Harz erfolgte mit Trifluoressigsäure/Ethandithiol/Wasser (94/3/3; v/v/v), wobei gleichzeitig die säurelabilen Seitenketten-Schutzgruppen entfernt wurden. Diese Gruppen bilden zum Teil hochreaktive Carboniumionen als Intermediate, die funktionelle Seitengruppen der Aminosäuren angreifen können. Um diese Nebenreaktionen zu vermeiden, wurden der Abspalllösung nukleophile Kationenfänger ("Scavenger") zugesetzt. Nach einer Reaktionszeit von 90 min wurde das abgespaltene, in Trifluoressigsäure/Ethandithiol/Wasser (94/3/3; v/v/v) gelöste Peptid mit tert. Butylmethylether präzipitiert, in 10 % (v/v) Essigsäure aufgenommen und anschließend lyophilisiert.

2.2.2.2 Analyse und Reinigung der Peptide

Die Rohprodukte wurden mittels Reversed-Phase-HPLC aufgereinigt. Dazu wurden sie in Wasser gelöst und mittels einer C₁₈-Säule (Vydac, 10 µm, 25 mm x 250 mm) mit einem linearen Gradienten von 10-80% 0,1 % (v/v) TFA/0,1 % (v/v) TFA in Acetonitril/Wasser (80/20; v/v) in 60 min bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,7 ml/min aufgetrennt. Die Detektion erfolgte bei 230 nm. Die Hauptfraktionen der analytischen Chromatographie wurden getrennt gesammelt und durch Sequenzierung und Aminosäureanalyse charakterisiert. Die Sequenzierung erfolgte auf der Grundlage des Edman-Abbaus in einem Festphasen-Mikrosequenzator (473 Protein Sequencer, Applied Biosystems, Weiterstadt). Dazu wurde das zu analysierende Peptid in Wasser gelöst und auf eine Polybren-beschichtete Glasfaser-Membran (Whatman) aufgetragen. Die Analyse der gebildeten Phenylthiohydantoin-(PTH) Aminosäure-Derivate erfolgte mit einem Reversed-Phase-Gradientensystem (C₁₈-Säule, 2,1 mm x 250 mm) nach einem Standard-Programm der Fa. Applied Biosystems. Durch Vergleich mit dem Elutionsprofil eines PTH-Aminosäurestandard-Gemisches wurden die PTH-Derivate identifiziert.

Für die Aminosäureanalyse wurden die Peptide 90 min in 6 N HCl bei 160 °C hydrolysiert. Primäre Aminosäuren wurden mit o-Phtalaldehyd (OPA), sekundäre Aminosäuren mit 9-Fluorenyl-Chloroformat (FMOC) derivatisiert. Die Auftrennung der Aminosäuren erfolgte im Analysator mit einem Reversed-Phase-Gradientensystem (C₁₈-Säule, 2,1 mm x 250 mm) nach einem Standard-Programm der Fa. Hewlett Packard. Über das erhaltene Diagramm konnte das Verhältnis der einzelnen Aminosäuren bestimmt werden.

Darüber hinaus wurde die Reinheit der Peptide durch Kapillarelektrophorese kontrolliert.

Dazu wurde eine offene Kapillare ("fused silica") mit 75 µm Innendurchmesser und 50 cm Länge verwendet. Die Proben wurden durch Druckinjektion (1 bis 5 sec) aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 80 µA. Die Dauer der Analysen betrug zwischen 15 und 20 min.

2.2.3 Immunisierung von Kaninchen

Zur Herstellung von Anti-Peptid-Antiseren wurden mindestens zwei Kaninchen pro MAP immunisiert. Im ersten Immunisierungsschema wurden die Tiere mit unterschiedlichen Antigenmengen immunisiert (0,25 mg, 0,5 mg und 1,0 mg MAP pro Tier und

Immunisierung). Alle weiteren Immunisierungsschemata wurden mit 0,5 mg entsprechendem MAP durchgeführt.

Jedem Tier wurde vor der Erstimmunisierung Blut aus der Ohrvene entnommen und nach 2.2.3.1. aufgearbeitet (Nullserum).

Probenvorbereitung und Durchführung der Immunisierung basierte auf der Methode von Steinbruch und Audran (1969). MAP wurde in 0,9% steriler NaCl gelöst und zur unspezifischen Aktivierung des Immunsystems im Verhältnis 1:1 mit "Komplettem Freundschens Adjuvans" (Fa. Behring, Marburg) auf der Basis einer Öl/Wasser-Emulsion emulgiert. Die Mischung wurde so lange zwischen zwei 5 ml Spritzen, die über einen Dreiwegehahn miteinander verbunden waren, hin- und hergeschoben, bis eine stabile Emulsion vorlag, erkennbar an der deutlichen Steigerung der Viskosität der Lösung. Die Immunisierung erfolgte durch mehrfache subcutane Injektionen des Emulgators unter die Rückenhaut eines 3-4 kg schweren Neuseeländer-Kaninchens. Pro Einstich wurden 50 - 100 µl (Gesamtvolumen: 0,5 - 1 ml) mit einer 0,4 x 19 mm Kanüle appliziert. Weitere Immunisierungen wurden mit inkompletten Freundschens Adjuvans in Abständen von 3-4 Wochen mit der gleichen Antigenmenge so lange wiederholt ("Boostern") bis keine Erhöhung des Antikörpertiters mehr zu erzielen war.

2.2.3.1 Gewinnung von Antiseren

8 bis 10 Tage nach der letzten Injektion wurde den Tieren aus einer Ohrvene ca. 8 ml Blut entnommen. Zur Gewinnung von Serum wurde das Blut 45 min lang bei Raumtemperatur und danach über Nacht bei 4 °C zur Koagulation stehengelassen, dann bei 1000 g für 15 min zentrifugiert. Das so erhaltene Serum (der Überstand) wurde sorgfältig abgenommen, zur Lagerung in 100 µl bis 500 µl Portionen aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Blut für Nullserum wurde unmittelbar vor der Erstimmunisierung entnommen und entsprechend aufgearbeitet.

Die Titerbestimmung der Antikörper erfolgte gegen das zur Immunisierung eingesetzte MAP im ELISA (2.2.4.). Die Spezifität der Antikörper wurde im Western Blot (2.2.12.) untersucht.

2.2.3.2 Isolierung von IgG über Protein A

Protein A ist ein Wandbestandteil von *Staphylococcus aureus*. Es besitzt die besondere Eigenschaft, sehr spezifisch die Fc-Region von Immunglobulinen, insbesondere IgG, zu

binden (Hjelm, 1975). Die IgG-Fraktionen der Antiseren wurden durch Affinitätschromatographie mit ImmunoPure IgG Purification Kit aufgereinigt. Hierzu wurde gemäß Anleitung des Herstellers (Pierce Rockford, IL, USA) verfahren. Die Protein A Sepharose Säule wurde mit 5 ml ImmunoPure IgG Bindungs-Puffer äquilibriert. Das Antiserum wurde in Bindungs-Puffer verdünnt (1 ml Antiserum zu 3 ml Bindungspuffer) und auf die Protein A Sepharose gegeben. Anschließend wurde mit 10 ml des gleichen Puffers gewaschen. Zur Elution der gebundenen IgGs wurde die Säule mit 5 ml ImmunoPure IgG Elutions-Puffer gespült. Die Eluate (je 1 ml Fraktionen) wurden in Eppendorf-Cups aufgefangen und sofort durch Zugabe von 100 µl Bindungspuffer auf einen pH von 7 zurücktitriert. Der IgG-Gehalt der Fraktionen wurde photometrisch bei 280 nm im Kontron-Photometer ermittelt. Gepoolte Fraktionen (2-3 ml) wurden über Nacht gegen 25mM Tris-HCl pH 7,4, bei 4°C, dialysiert. Bevor das Dialysat lyophilisiert wurde, wurde der Proteingehalt nach 2.2.9 bestimmt. Nach der Gefriertrocknung der IgGs wurden diese mit Phosphatpuffer (pH 7,4) auf eine Konzentration zwischen 1-20 µg /µl eingestellt, um für Immunitätsversuche zur Hemmung spezifischer Cytochrome P450 Enzymaktivitäten möglichst konzentriertes IgG zur Verfügung zu haben.

Da die Säule mehrere Male für IgG-Isolierungen benutzt werden konnte, wurde sie mit 8 ml 0,1 M Zitronensäure pH 3,0 regeneriert und zur Lagerung anschließend mit 5 ml Wasser, das 0,02 % (w/v) Natriumazid enthielt, gewaschen und bei 4 °C gelagert.

2.2.4 Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay (ELISA)

Prinzipiell wird bei einem ELISA das Antigen, gelöst in Puffer, in Vertiefungen einer 96-Loch Platte gegeben und dort an der Oberfläche unspezifisch gebunden. Zu dem am Gefäßboden adsorbierten Antigen wird der zu testende Antikörper hinzugegeben. Er bindet am Antigen, während ungebundene Proteine ausgewaschen werden. Der Antikörper kann nach Kopplung an einen Liganden, der wiederum an das Enzym Peroxidase gekoppelt ist, quantitativ dargestellt werden. Für die Titerbestimmungen der jeweiligen Anti-Seren wurde ein ELISA in Anlehnung an die Methode von Peters (1985) durchgeführt. Es wurden 96-Loch-Platten Maxi-Sorp® der Fa. Nunc (Kopenhagen) verwendet. Zur Vorbeschichtung wurden je 100 µl/Loch einer mit Beschichtungs-Puffer (0,1 M NaHCO₃ / Na₂CO₃ pH 9,6 oder PBS pH 7,4) verdünnten Antigenlösung (25 ng MAP) eingesetzt. Mikrosomale Proteine wurden mit 1 µg/100 µl und aufgereinigte CYP-Enzyme mit 25 ng/100 µl als Antigen eingesetzt.

Die Inkubation erfolgte entweder über Nacht bei 4 °C oder 3 h bei Raumtemperatur. Die Proteinlösung wurde anschließend abgesaugt und mit 0,05% Tween-20 in PBS dreimal gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen an der festen Phase (Plattenboden) wurden mit 0,1% (v/v) Tween, 1% BSA in PBS für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Vor der Zugabe des ersten Antikörpers wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Antiserum bzw. Nullserum, in unterschiedlichen Konzentrationen). Nach einer Inkubationsdauer von 1,5 h bei Raumtemperatur wurden die Platten erneut gewaschen (s.o.). Als Enzymkonjugat wurde Peroxidase-markiertes IgG (Ziege-anti-Kaninchen IgG=2.Antikörper) in einer Verdünnung von 1:3000 eingesetzt. Zur Bindung des Konjugates wurden die Platten für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten ein zweimaliges Waschen mit 0,05% Tween-20 in PBS, ein einmaliges mit PBS und die Zugabe der Substratlösung (100 µl/Loch).

Substratlösung

3 mM	Orthophenylendiamin
49 mM	Zitronensäure
111 mM	Na ₂ HPO ₄ (pH 5,0)
8 µl	H ₂ O ₂ (35% v/v)

Die Farbreaktion wurde nach 3-8 min durch Zugabe von je 100 µl/Loch 2 N H₂SO₄ gestoppt. Die Messung erfolgte in einem ELISA-Reader der Firma Dynatec bei einer Wellenlänge von 492 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm.

2.2.5 Expression von CYP-Enzymen in E.coli

2.2.5.1 Transformation von E.coli

100 µl kompetenter E.coli Zellen (Stamm DH5α) wurden zusammen mit 10 ng entsprechender Plasmid-DNA in vorgekühlte 15 ml Polypropylen Röhrchen pipettiert, vorsichtig gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 Sekunden bei 42°C hitzegeschockt und sofort für weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden 0,9 ml SOC-Medium hinzugefügt (Maniatis et al., 1982), für 1 h bei 220/min im Brutschrank geschüttelt, anschließend auf LBamp-Platten ausplattiert (5-200 µl) und für weitere 12 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden kleine, einzelne

Kolonien gepickt und in 2 ml LB-Medium (50 µg Ampicillin /l) für weitere 12 h bei 37°C im Brutschrank geschüttelt (Frequenz 220/min). Zur Herstellung von Glycerinstocks wurden 850 µl der Bakteriensuspension mit 150 µl 20 % (m/v) Glycerol versetzt und bei -70°C eingefroren. Zur Kontrolle der Transformation wurde eine Minipräparation der Plasmide durchgeführt.

SOC Medium (100 ml)

2,0 g Bakto-Trypton
0,5 g Bacto-Hefeextrakt
1 ml 1 M NaCl
0,25 ml 1 M KCl
1 ml 1M MgCl₂-6H₂O
1 ml 1 M MgSO₄-7H₂O
1 ml 2 M Glukose

LB-Medium (für 1 L) bzw. LBamp Platten (für 1 L)

10 g Bakto-Tryptone
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
0,3 ml 10 N NaOH
für Platten: 15 g Agar hinzufügen, autoklavieren, und nach Abkühlen auf 60°C
Zugabe von 100 mg Ampicillin (Stammlösung 100mg/ml in H₂O)

TB-Medium (Terrific Broth)

12 g Bakto-Tryptone
24 g Hefeextrakt
2 g Bakto-Peptide
1 ml 1 M NaCl
40 ml 10% (v/v) Glycerol
gelöst in 900 ml Wasser
nach dem Autoklavieren der Lösung wurden hinzugefügt:
100 ml K-Phosphat-Puffer für TB
1 ml 1 M Thiamin
250 µl Spurenelement-Lösung

1ml Ampicillin (100mg/ml)

1 ml 1M IPTG

K-Phosphatpuffer für TB (1 Liter Wasser)

23,1g KH_2PO_4

125,4g K_2HPO_4

Spurenelement-Lösung

2,7g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,2g $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

0,2g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,2g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,1g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,1g CuCl_2

0,05g H_3BO_3

10 ml konz. HCl

auf 100 ml auffüllen und autoklavieren.

2.2.5.2 Plasmid-Isolierung

Die Isolierung erfolgte mit den Fertig-Lösungen aus dem Qiagen-Maxi-Prep-Kit. Das Prinzip der Isolierung besteht in einer alkalischen SDS-Lyse der Bakterien.

1 ml einer über Nacht Kultur wurde 5 min bei 12.000 x g (Eppendorf Ultrazentrifuge) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Sediment in 100 μl P1 (4 °C) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert.

P1-Lösung (pH 8,0)

10 $\mu\text{g/ml}$ RNase A

50 mmol/l Tris/HCl

10 mmol/l EDTA

Anschließend wurde eine alkalische SDS-Lyse durch Zusatz von 200 μl P2-Lösung durchgeführt. Die Lösung wurde gut geschüttelt und für 5 min auf Eis inkubiert.

P2-Lösung

200 mmol/l	Natriumhydroxid
1% (w/v)	Natrium-Laurylsarcosin

Durch Zusatz von 150 µl P3-Lösung wurde anschließend eine Fällung der Proteine und hochmolekularer DNA erreicht. Der Fällungsansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert, um eine optimale Präzipitation zu erzielen.

P3-Lösung (pH 5,5)

3,0 mol/l	Kaliumacetat
-----------	--------------

Durch Zentrifugation bei 12.000 x g (5 min / 4°C) wurden die ausgefällten hochmolekularen Zellbestandteile sedimentiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues, steriles Röhrchen überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt, gut geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte durch eine Zentrifugation bei 12.000 x g (45 min/4 °C). Das Sediment wurde vorsichtig mit 250 µl Isopropanol gespült und anschließend luftgetrocknet. Nach dem Trocknen wurde die Plasmid-DNA in 30 µl TE-Puffer aufgenommen.

TE-Puffer (pH 8,0)

10 mmol/l	Tris/HCl
1 mmol/l	EDTA

Zur Quantifizierung des DNA-Gehalts wurde ein Aliquot entnommen und 1:1000 in sterilem Wasser verdünnt. Die Quantifizierung erfolgte in einem Spektralphotometer bei 260 nm. Eine Extinktion von 1 OD entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

Zur Kontrolle der Transformation wurde die Plasmid-DNA (1µg) in einem 1 % (w/v) TBE-Agarosegel unter Verwendung von TBE als Laufpuffer in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Gibco/BRL Horizon 58) bei einer Spannung von 60 V aufgetrennt. Der Agarose wurde nach dem Aufschmelzen 0,5 µg Ethidiumbromid/ml Gel zur Anfärbung der DNA-Banden zugesetzt. Die Plasmid-DNA wurde vor dem Auftragen mit 1/6 Volumenteil Orange G-Puffer gemischt.

TBE-Puffer (pH 8,3)

89 mmol/l	Tris/HCl
89 mmol/l	Borsäure
2,5 mmol/l	EDTA

Orange G-Puffer

50% (w/v)	Saccharose
1% (w/v)	Natrium-Laurylsarcosin
0,5% (w/v)	Orange G
gelöst in (6x) TBE-Puffer	

Die Puffer wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm). Als Längenstandard wurde ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen (1 kb DNA ladder, Gibco).

2.2.5.3 Zellanzucht

Jeweils 5 ml LBamp Medium wurden mit transformierten E.coli Zellen aus den gefrorenen Glycerinstammkulturen angeimpft und in 50 ml Falcon-Röhrchen bei 37 °C über Nacht und einer Schüttelfrequenz von 220 inkubiert. Zur Expression von CYP1A1, 1A2, 2C9/10, 2E1 and 3A4 in E.coli wurden 2 ml dieser Vorkultur als Inoculum für eine 200 ml Hauptkultur in TB Medium eingesetzt. Die Expression der CYP-Enzyme wurde induziert durch Zugabe von 1mM IPTG gleich zu Beginn der Hauptkultur, die für 24 h bei 30 °C und einer Schüttelfrequenz von 220 inkubiert wurde.

2.2.5.4 Spheroplastenpräparation

Nach 24 h wurden die Zellen in vorgekühlte Zentrifugenbecher umgefüllt und bei -20°C für 1 h belassen bevor sie abzentrifugiert wurden (5000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen gewogen und in zweifach TES Puffer (15 ml/g Feuchtwicht) bei 4°C resuspendiert.

2fach TES (Tris-Acetat-Sucrose) (pH 7,6)

100 mM Tris-Acetat
500 mM Sucrose

0,5 mM EDTA

Nach Zugabe von Lysozym (Stammlösung: 50 mg/ml; Enkonzentration: 0,5 mg/ml) und H₂O (15 ml/g Feuchtgewicht) wurden die Zellen für 30 min unter gelegentlichem Schütteln auf Eis gelagert und anschließend bei 10.000 xg bei 4 °C für 10 min zentrifugiert.

Das zähe Sediment (Spheroblasten) wurde in Sonifizierungspuffer (2ml/g Feuchtgewicht) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.5.5 Membranpräparation

Während des Auftauvorgangs der gefrorenen Spheroblasten wurden Proteinaseinhibitoren mit folgender Endkonzentration hinzugefügt: Leupeptin (200 µM), 2 µM; PMSF (100 mM), 1 mM; Aprotinin (4 U/ml), 0,04 U/ml. Damit die Proteinaseinhibitoren die intrazellulären Proteinaseen möglichst schnell blockieren konnten, wurden die Zellspheroblasten mit einem Ultraschallstab aufgeschlossen (jeweils 2 x 20 sec, bei 70% Ausgangsleistung, Branson Sonifier). Dabei wurden die Zellen in einem Eis-Salz-Bad gekühlt.

Sonifizierungspuffer

100 mM K-Phosphat-Puffer (pH 7,4)

6 mM Mg-Acetat

20% (v/v) Glycerol

0,1 mM DTT

Das Lysat wurde bei 10.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Zur Isolierung der Membranen wurde der Überstand anschließend bei 180.000 x g und 4 °C für 65 min zentrifugiert (Rotor TFT 65.13 Kontron). Der Überstand wurde als cytosolische Fraktion bezeichnet, das Sediment als Membranfraktion. Das Membransediment wurde in 1 ml TES - Puffer resuspendiert und in einem 2ml Glas/Teflon Potter-Elvehjem homogenisiert.

Der Proteingehalt und der Cytochrom P450-Gehalt der beiden Fraktionen wurde, wie unter 2.2.9 und 2.2.10 beschrieben, bestimmt. Die Proben wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.6 Vorbehandlung der Ratten

Zur Induktion spezifischer CYP-Enzyme wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 220-250 g über einen Zeitraum von drei Tagen mit spezifischen Induktoren behandelt. Die Tiere erhielten täglich eine intraperitoneale Injektion mit 3-Methylcholanthren (Induktion von CYP1A1 und 1A2, Eisen et al., 1986) (40 mg in Pflanzenöl/kg Körpergewicht), Phenobarbital (Induktor von CYP 2-Enzymen, Waxman und Azaroff, 1992) oder Dexamethason (spezifischer Induktor von CYP3A2 in der Ratte, Wrighton et al., 1985; Watkins et al., 1985) (80 mg/kg Körpergewicht). Am vierten Tag wurden die Tiere unter Ethernarkose durch Dekapitation getötet und Leber, Niere und Darm entnommen.

2.2.7 Enterozytenisolation

Die Isolation der Enterozyten (Dünndarmepithelzellen) basierte auf der Chelations-Elutionsmethode von Weiser (1973) modifiziert nach Porteous et al. (1979) und Pinkus (1981). Nach Entnahme des Dünndarms wurde dieser mit 1,32 % NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurde eine Seite des Darms zugebunden, das Lumen mit Lösung A gefüllt und 20 min lang bei 37 °C inkubiert. Der Darm wurde dann entleert und die Mukosazellen durch zweimaliges Füllen und Inkubieren (20 min, 37 °C) mit Lösung B abgelöst. Die mit Enterozyten angereicherte Lösung B wurde 3 min bei 300 x g zentrifugiert, die pelletierten Zellen anschließend in Puffer A (2.2.4.) resuspendiert, nochmal zentrifugiert und im gleichen Puffer wieder aufgenommen. Aus den so gewonnenen Mukosazellen wurden dann mit der unter 2.2.4. beschriebenen Differentialzentrifugationsmethode Mikrosomen isoliert.

Lösung A (pH 7,3):		Lösung B (pH 7,4):	
96,0 mM	NaCl	137,0 mM	NaCl
27,0 mM	Na ₂ -Citrat	8,2 mM	Na ₂ HPO ₄
5,6 mM	KH ₂ PO ₄	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
1,5 mM	KCl	3,2 mM	KCl
		1,5 mM	EDTA
		1,0 mM	Dithioerythritol
		0,1 % w/v	BSA

Frisch entnommene humane Dünndarmproben wurden in gekühlter (4 °C) Ringer-Lactat-Lösung gereinigt. Zur Isolierung humaner Enterozyten wurden 2 bis 6 cm lange Duodenumabschnitte direkt in Lösung A bzw. B inkubiert und die Zellen durch Zentrifugation von Lösung B gewonnen.

2.2.8 Mikrosomenpräparation

Die Mikrosomen wurden durch Differentialzentrifugation nach Guengerich (1982) aus tiefgefrorenen (-80 °C) Organen (Leber) oder frisch präparierten Organen bzw. Zellen (Enterozyten, Hepatozyten) gewonnen. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C. Ganze Organe wurden zuerst mit einer Schere in kleinere Stücke zerteilt und in wenig Puffer A in einem handelsüblichen Haushaltszerkleinerer der Fa. Moulinex grob zerkleinert. Die weitere Durchführung gilt sowohl für Gewebe als auch für Zellaufarbeitungen. Das Material wurde in der dreifachen Menge Puffer A aufgenommen (1 g Frischgewicht auf 3 ml Puffer A) und in einem Glas-Teflon-Homogenisator homogenisiert. Zur Abtrennung von Zelltrümmern, Zellkernen, Zellmembranen und Mitochondrien wurde bei 10000 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert (Sorvall-DuPont Superspeed RC2-B). Der Überstand wurde gesammelt und für 1 h bei 1 x 100.000 x g in einer Ultrazentrifuge (Beckman TL-100, Rotor 70 Ti) bei 4 °C zentrifugiert. Das mikrosomale Pellet wurde ohne die Glycogen- und Fettschicht in Puffer B aufgenommen und nochmals für 1h bei 1 x 100.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in Puffer C aufgenommen und homogenisiert. Die Mikrosomen wurden bei -80 °C mit Konzentrationen von 10 bis 30 mg Protein/ml eingefroren.

Puffer A (pH 7,4)

0,1 M	Phosphatpuffer (pH 7,4)
0,1 M	KCl
1,0 mM	EDTA

Puffer B (pH 7,4)

0,1 M	Phosphatpuffer (pH 7,4)
0,1 M	Natriumpyrophosphat
1,0 mM	EDTA

Puffer C (pH 7,4)

0,1 M	Phosphatpuffer (pH 7,4)
-------	-------------------------

20,0 % (w/v) Glycerol
1,0 mM EDTA

0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4)

2,681 g/l KH_2PO_4
14,293 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

Bei der Verarbeitung von Darmgewebe wurden Puffer A und B 0,1 mM DTT hinzugefügt.

2.2.9 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes wurde photometrisch nach der von Smith et al. (1985) beschriebenen Methode durchgeführt. Die Messung beruht auf der Bildung eines Farbkomplexes aus 2 Molekülen Bicinchoninsäure und einem Kupfer(I)ion, welches bei Anwesenheit von Protein durch Reduktion von Cu^{2+} im alkalischen Medium entsteht. Das Reagenz wurde frisch aus Kupfer(II)sulfatlösung (4 %, w/v) und Bicinchoninsäurelösung (BCA-Solution von Sigma) 1:50 (v/v) hergestellt. Die Mikrosomensuspension wurde mit 0,1 M K-Phosphatpuffer in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:100 bis 1:500) vorverdünnt. 100 μl der Mikrosomenansätze wurden mit jeweils 100 μl der Reagenzlösung versetzt und für 30 min bei 60 °C inkubiert. Die Extinktion des Farbkomplexes wurde bei 550 nm im Photometer gemessen und der Gehalt anhand einer mit Rinderserumalbumin erstellten Eichkurve bestimmt.

Zur Bestimmung des IgG-Gehalts nach Protein-A Aufreinigung wurde eine photometrische Bestimmung durchgeführt. Einer $\text{OD}_{280\text{nm}}$ von 1,45 (bei 1 cm Schichtdicke) entspricht dabei einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml (Catty, 1988).

2.2.10 Cytochrom P450-Bestimmung

2.2.10.1 In Mikrosomen

Kohlenmonoxid bildet mit zweiwertigem Eisen der Hämgruppe des Cytochroms P450 einen Komplex, der bei einer Wellenlänge von 450 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Mit dem molaren Extinktionskoeffizienten von $91 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ kann über die gemessene Extinktion dann der Cytochrom P450 Gehalt der entsprechenden Mikrosomenfraktion ermittelt werden.

Die Bestimmung des Cytochrom P450-Gehaltes in der Mikrosomensuspension (1mg/ml Protein) wurde nach den von Estabrook et al. (1978) und Omura et al. (1964) beschriebenen Methoden durchgeführt. Eine Probe der Mikrosomensuspension wurde dazu auf 1 mg/ml Protein mit 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 verdünnt und auf zwei Plastik-Halbmikroprobenküvetten verteilt. Nach Aufnahme der Basislinie im Meßbereich zwischen 400-500 nm (Spektralphotometer, Uvikon 930, Kontron Instruments-Tegimenta, Rotkreuz/Schweiz) wurde eine Küvette (Probenküvette) mit Kohlenmonoxid für ca. 1 min begast. Dies geschah über einen Schlauch, an welchem am unteren Ende eine Pasteurpipette befestigt wurde. Um ein zu starkes Aufschäumen der Lösung zu vermeiden, mußte das Gas sehr langsam eingeleitet werden. Anschließend gab man zur Proben- und Referenzküvette eine Spatelspitze $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ zur Reduktion des dreiwertigen Eisens von Cytochrom P450. Beide Lösungen wurden dann im Bereich von 400-500 nm gegeneinander vermessen. Die Konzentrationsberechnung des Cytochrom P450 Gehalts (in nmol Cytochrom P450/mg mikrosomalem Protein) erfolgte mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten ($\Delta E_{450-490}$) von $91 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ für diese Wellenlänge. ΔE entspricht hierbei der Differenz der Extinktionen bei 450 und 490 nm (Guengerich, 1982).

2.2.10.2 In Plasmamembranen von E.coli

Eine Probe der Membranfraktion wurde dazu auf 1-2 mg/ml Protein in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 20 % (v/v) Glycerol und 0,2 % (v/v) Emulgen 913 verdünnt. Die Durchführung und Bestimmung erfolgte analog der unter 2.2.10.1 beschriebenen.

2.2.11 SDS-PAGE

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Das Trenngel enthielt 10% (w/v) Polyacrylamid, 25 mmol/l Tris, 0,1% (w/v) SDS, 2 mmol/l EDTA, pH 8,6. Das Sammelgel bestand aus 5% (w/v) Polyacrylamid in 15 mmol/l Tris, 0,1% (w/v) SDS, 2 mmol/l EDTA, pH 6,8. Die Acrylamidstammlösung setzte sich aus 30% (w/v) Acrylamid und 0,8% (w/v) Bisacrylamid zusammen. Für die Polymerisierung von 10 ml Gel wurden 15 mg Ammoniumperoxodisulfat und 10 μl TEMED zugesetzt. Der Laufpuffer bestand aus 25 mmol/l Tris, 0,1% (w/v) SDS, 1 mmol/l EDTA und 192 mmol/l Glycin, pH 8,3.

Die Proteinproben wurden mit 0,1% (w/v) SDS, 25 mmol/l Tris, 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol und 0,001% (w/v) Bromphenolblau vorbehandelt (im Verhältnis 1:1 (v/v)) und für 4 min auf 95 °C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 30 mA für 60 min in einer Minigel-Elektrophoresekammer der Fa. Biorad (München) (Netzgerät vom Typ Pharmacia LKB Electrophoresis Power Supply EPS 500/400, Pharmacia, Freiburg).

Phosphorylase b (MW 96 kD), BSA (MW 67 kD), Ovalbumin (MW 45 kD), Aldolase (MW 40 kD), Carboanhydrase (MW 29 kD) und Sojabohnen-Trypsininhibitor (MW 20 kD) wurden als Eichproteine eingesetzt.

2.2.11.1 Coomassie-Blau-Färbung

Für die Standardfärbung wurde das Gel ca. zwei Stunden in 0,01% (w/v) Coomassie-brillant-blue R 250, 50% (v/v) Methanol und 10% (v/v) Essigsäure geschwenkt. Zur Entfärbung wurde das Gel zunächst in 50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure für 2,5 h, dann in 10% (v/v) Methanol, 5% (v/v) Essigsäure über Nacht geschüttelt.

2.2.12 Western Blot

Die Durchführung erfolgte nach der Methode von Towbin et al. (1979). Über ihre hydrophoben Anteile werden Proteine von der PVDF-Membran gebunden (Gershoni und Palade, 1983). Der Blotpuffer wurde gemäß der Bedienungsanleitung der Fa. Biometra (Göttingen) hergestellt:

Blotpuffer

25 mM	Tris, pH 8,3
193 mM	Glycin
20 % (v/v)	Methanol

Zur Aktivierung der PVDF-Membran wurde diese kurz in Methanol getaucht, um sie hydrophil zu machen, 2 min in destilliertem Wasser gespült und anschließend in Blotpuffer äquilibriert. Die auf Größe des Gels zugeschnittenen Filterpapiere (Fa. Schleicher & Schüll, Dassel) wurden ebenfalls in Blotpuffer eingeweicht. Der Proteintransfer erfolgte in einer Blotkammer (Fa. Biometra, Göttingen) bei einem konstanten Stromfluß von 1,3 mA/cm² Membranfläche bei gleichzeitiger Wasserkühlung für 60 min.

Nach Beendigung des Transfers (nach 60 min) wurde das Gel zur Kontrolle mit Coomassie-brilliant-blue R 250 und die PVDF-Membran mit Ponceau S gefärbt und letztere anschließend weiterverarbeitet.

2.2.12.1 Ponceau S-Färbung

Die Proteine auf der PVDF-Membran konnten mittels Ponceau S-Färbung lokalisiert werden. Das Konzentrat des Färbemittels mit 2% (w/v) Ponceau S, 30 % (w/v) Sulfosalicylsäure und 30 % (w/v) TCA wurden 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt, die Membran darin einige Sekunden gefärbt, und dann die unspezifische Färbung in destilliertem Wasser wieder herausgelöst. Die nun rotgefärbten Proteinbanden ließen sich durch mehrmaliges Wässern wieder entfärben. Vorher konnte die Membran anhand der Farbmarkierung geschnitten werden.

2.2.13 Immunfärbung und densitometrische Bestimmung

Die PVDF-Membran wurde zunächst für 30 min in PBST PBS/Tween 20 (0,05% w/v) gespült und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur in 1% (w/v) BSA/TBST geblockt. Nach dem Blocken wurde dreimal für 10 min mit PBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h mit den entsprechenden Antiseren (1:500 bis 1:5000 verdünnt in PBST) inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden dann durch dreimaliges Waschen (je 10 min) der Membran in PBST entfernt. Die spezifische Detektion der CYP-Enzyme beruhte auf der Detektion von Antigen-Antikörper-Komplexen durch die Alkalische Phosphatase (AP).

Durch die Bindung eines sekundären Antikörpers, der kovalent mit Alkalischer Phosphatase verbunden ist, kommt es nach Zugabe einer Substratlösung zu einem violett-blauen Präzipitat (Blake, 1984).

Hierzu wurde mit einem in PBST verdünnten (1:5000 oder 1:10.000) Alkalische Phosphatase-Konjugat (Ziege-anti-Kaninchen IgG Alkalische Phosphatase konjugierter Antikörper, Dianova, Hamburg) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch mehrmaliges Waschen in PBST-Lösung wurde anschließend nicht gebundener Antikörper entfernt. Danach erfolgte die Zugabe der NBT/BCIP Substratlösung. Pro PVDF-Membran wurden 2 ml Substratlösung verwendet. Nachdem die Banden sichtbar wurden (wenige Sekunden bis 5 min) wurde die Substratlösung entfernt und die Reaktion mit 20 mM EDTA in H₂O gestoppt.

Zur densitometrischen Bestimmung der Proteinbanden wurde die Membran eingescannt (Epson, GT-9500) und mit dem Quantity One® Programm, Version 4.2 (Biorad, München) ausgewertet.

2.2.14 Cytochrom P450-Enzymaktivitäten

Zur Charakterisierung mikrosomaler Präparationen wurden die Enzymaktivitäten der CYP-Enzyme CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 und CYP3A gemessen. Es wurde die Methode von Sattler et al. (1992) in Anlehnung an Guengerich et al. (1986) verwendet.

Die Analyse der Phenacetin-O-Deethylierung, Bufuralol 1'-Hydroxylierung, Chlorzoxazon-6-Hydroxylierung und Nifedipin-Oxidierung konnte so mit den gleichen chromatographischen Verfahren (Säulen und Eluenten) wie für die Analytik von Ciclosporin durchgeführt werden. Die Analyse erfolgte an einem HP 1090A Chromatograph (2.2.14.4.). Die Elutionsgradienten für Phenacetin, Bufuralol, Chlorzoxazon und Nifedipin sind unten angegeben. Die CYP-Substrate und ihre Metabolite hatten folgende Retentionszeiten ($\pm 0,5$ min): Phenacetin 24 min; Paracetamol 10 min; Bufuralol 31 min; 1-Hydroxy-Bufuralol 14 min; Chlorzoxazon 17 min; Hydroxy-Chlorzoxazon 8 min; Nifedipin 22 min; der Pyridinmetabolit von Nifedipin 21 min. Die Quantifizierung erfolgte über eine externe Eichkurve mit den Metaboliten als Standards.

2.2.14.1 Test für Ciclosporin

Zur Bestimmung der CYP3A-Aktivität wurden Mikrosomen mit Ciclosporin inkubiert. Dazu wurde folgende Stammlösungen angesetzt: 1mg/ml Ciclosporin gelöst in Methanol. Der Inkubationsansatz enthielt 1,0 mg/ml mikrosomales Protein in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) dem 0,5 ml eines NADPH-erzeugenden Systems zugegeben wurden.

NADPH-erzeugendes System

0,1 M	Phosphatpuffer, pH 7,4
18,0 mM	Isocitrat
10,0 mM	MgCl ₂
2,0 mM	EDTA
0,84 mM	NADP
0,7 U/ml	Isocitrat-Dehydrogenase

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von Ciclosporin (Endkonzentration im Test: 10 µM). Die Ansätze wurden 120 min im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml Acetonitril abgestoppt. Anschließend erfolgte die Extraktion der Proben.

2.2.14.2 Probenextraktion

Die Extraktion der Proben für Ciclosporin erfolgte nach dem Verfahren von Strohmeyer (1989). Den Proben für Ciclosporin wurden vor der Extraktion 25 µl Cyclosporin D (10 µg/ml) als interner Standard zugefügt.

Die mit 0,5 ml Acetonitril versetzten Probenansätze wurden zur Proteinfällung für 2 min bei 2000 x g zentrifugiert. Die Überstände konnten dann auf mit LiChroprep[®] (25-40 µm) (Merck, Darmstadt) gefüllte Glasextraktionssäulen gegeben werden, die unmittelbar zuvor durch Zugabe von 3 ml Acetonitril und 3 ml Wasser (pH 3) aktiviert worden waren. Die Proben wurden bei einem gleichmäßigen Unterdruck von 7 mm Hg durch die Säulen gesaugt. Zu diesem Zeitpunkt war darauf zu achten, daß die Säulen auf keinen Fall trockengesaugt wurden. Die Proben wurden dann mit 3 ml Methanol/Wasser pH 3,0 (50/50 v/v) und 0,5 ml Hexan gespült. Danach wurden die Säulen im Luftstrom trockengesaugt, aus der Absaugebank genommen und in 10 ml-Glaszentrifugenröhrchen gesetzt. Auf die Extraktionssäulen wurde dann 1,5 ml Dichlormethan pipettiert und dieses für 5 min bei 450 x g durch die Säulen zentrifugiert. Hierdurch wurden Ciclosporin und Cyclosporin D sowie die Ciclosporinmetabolite von den Säulen eluiert. Dichlormethan wurde unter Stickstoff-Begasung bei 56 °C eingedampft. Die Proben wurden in 300 µl Acetonitril/Wasser pH 3,0 (50:50) (v/v) aufgenommen, mit 0,5 ml Hexan überschichtet und für 20 sec kräftig gemischt. Anschließend wurden die Proben zur Phasentrennung für 2 min bei 2500 x g zentrifugiert. Die untere, wässrige Acetonitril/Wasser-Phase wurde vorsichtig mit einer Glaspasteurpipette entnommen und in ein HPLC-Probengefäß überführt.

2.2.14.3 HPLC-Verfahren

Die Reversed-Phase High Pressure Liquid Chromatography (RP-HPLC) trennt unterschiedliche Substanzen durch deren multiplikative Verteilung zwischen mobiler und stationärer Phase. Der sehr geringe Durchmesser der Säulen (2-10 mm) und die kleine

Packungsdichte ($r < 25$ mm) ermöglichen eine hohe Trennstufenzahl. Polaritätsgradienten können so bis zu einem Druck von 30 MPa gefahren werden.

Die Auftrennung und Detektion von Ciclosporin und dessen Metabolite erfolgte mittels RP-HPLC. Für die analytische Methodik wurden ein Hewlett-Packard 1090A Chromatograph mit einem 1040A Dioden-Array-Detektor und einem HP 85B Computer (Hewlett-Packard, Waldbronn) zur Steuerung der Anlage, sowie ein Eluentenmischer, ein 655-A40 automatischer Probengeber, ein 655A variabler UV-Monitor und ein D-2000 Integrator verwendet. Die Daten wurden aufgenommen und mit der HP-ChemStation Software (Version C.01.05. Hewlett Packard, Waldbronn) analysiert.

2.2.14.4 HPLC-Analyse

Für die HPLC-Analyse von Ciclosporin und dessen Metabolite wurde eine 250 x 4 mm C₈, 3 µm Säule (Nucleosil^R, Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Wasser mit einem pH von 3,0, mit konzentrierter H₂SO₄ eingestellt, und Acetonitril wurden als Eluenten verwendet. Die Säulentemperatur betrug 65 °C, der Fluß 0,7 ml/min und die Detektionswellenlänge 205 nm. Der Elution folgte ein Säulenspülschritt mit 95 % Acetonitril und eine Reäquilibrierungsphase von 10 min, durch den die Ausgangsbedingungen wiederhergestellt wurden. Die Spülphase war nötig, um während des Gradienten nicht-eluierte Substanzen von der Säule zu entfernen, die sonst zu einer Belegung der verfügbaren Bindungsstellen und zu einer Verminderung der Säulenkapazität geführt hätten.

Ciclosporin sowie dessen Metabolite wurden über ihre relativen Retentionszeiten bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mit dem internen Standard Cyclosporin D.

2.2.14.5 Phenacetin-O-Deethylase Aktivität

Die Messung der Phenacetin-O-Deethylase-Aktivität (Distlerath, 1985) erfolgte durch Zugabe von 10 µl Phenacetin (5 mM in 50% Methanol/50% Wasser (v/v)) als Substrat in den Versuchsansatz (2.2.14.1.). Nach einer Inkubationszeit von 60 min wurde die Reaktion mit 250 µl Acetonitril und 750 µl Dichlormethan gestoppt. Die eingedampften Phasen wurden in 250 µl Methanol/Wasser (pH 3,0) aufgenommen, und mit der anschließenden HPLC-Analyse wurde die Bildung von Paracetamol bei $\lambda = 246$ nm (Dibbern, 1978) bestimmt. Der Acetonitril/Wasser (pH 3,0)-Gradient wurde 8 min isokratisch bei 12% (v/v) Acetonitril und

dann in 12 min linear auf 45 % (v/v) Acetonitril gefahren. Phenacetin eluierte nach einer Retentionszeit von 24 min, Paracetamol nach 10 min. Die Quantifizierung erfolgte über eine Eichkurve mit Paracetamol als externem Standard.

2.2.14.6 Bufuralol-1'-Hydroxylase Aktivität

Die Aktivität der Bufuralol-1'-Hydroxylase wurde in Anlehnung an Haefelfinger (1980) bestimmt.

Die Durchführung erfolgte wie in 2.2.14.1 mit 4 mM Bufuralol (in 50% Methanol/50% Wasser (v/v)) als Substrat. Die Reaktion wurde nach 20 min mit 250 µl Acetonitril gestoppt. Nachfolgend wurden 650 µl Dichlormethan und 100 µl NaOH (1 M) zugefügt. Nach dem Eindampfen der Dichlormethanphasen wurden diese in 250 µl 75% Acetonitril/25% Wasser (pH 3) (v/v) aufgenommen.

Die Analyse der Proben erfolgte durch chromatographische Auftrennung mit einem linearen Gradienten von 25% Acetonitril und 75% Wasser (pH 3) (v/v) bis 45% Acetonitril und 55% Wasser (pH 3) (v/v) nach 40 min und UV-Absorptionsmessung bei $\lambda = 254$ nm (Wolff, 1985).

2.2.14.7 Chlorzoxazon-6-Hydroxylase Aktivität

Die Messung von Chlorzoxazon erfolgte nach einem modifizierten HPLC-Verfahren (Peter, 1990). Der Versuchsansatz entsprach dem in 2.2.14.1. beschriebenen; 20 mM Clorzoxazon (gelöst in 60 mM NaOH) als Substrat wurden hinzugefügt. Die Reaktion wurde nach 20 min mit 25 µl H₃PO₄ (43 % w/w) und 900 µl Dichlormethan gestoppt. Nach Eindampfen der Dichlormethanphasen wurde die Fraktion in 250 µl 50 % Acetonitril/50 % Wasser (pH 3) (v/v) gelöst. Die Analyse der Proben erfolgte durch chromatographische Auftrennung mit einem linearen Gradienten (siehe 2.2.15.1.) und UV-Absorptionsmessung bei $\lambda = 287$ nm.

2.2.14.8 Nifedipin-Oxidase Aktivität

Nifedipin und sein Pyridinmetabolit wurden nach einem modifizierten HPLC-Verfahren (Guengerich et al. 1986) unter lichtgeschützten Bedingungen gemessen. Der Ansatz wurde wie in 2.2.14.1. mit mikrosomalem Protein in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,85) und 200 µM

Nifedipin (50 % Aceton/50 % Wasser (v/v)) als Substrat inkubiert. Die Inkubationsdauer betrug 10 min und wurde mit 900 μ l Dichlormethan abgestoppt, nachfolgend wurden 100 μ l einer 1 M Na_2CO_3 -Lösung mit 2 M NaCl zugesetzt. Die Probe wurde nach dem Eindampfen in 200 μ l Methanol gelöst.

Die Proben wurden bei einem Fluß von 0,7 ml/min mit einem linearen Gradienten von 30 % Acetonitril und 70 % Wasser (pH 3) (v/v) bis 55 % Acetonitril und 45 % Wasser (pH 3) (v/v) nach 40 min aufgetrennt und bei einer Detektionswellenlänge von $\lambda = 254$ nm detektiert.

2.2.14.9 Immuninhibitionsansätze

Der Ansatz basiert auf der Methode von Guengerich et al. (1986) mit folgenden Modifikationen des Ansatzes von 2.2.14.1: Das Gesamtvolumen betrug 0,5 ml. Mikrosomen (50 pmol P450) wurden mit IgG (1 bis 15 mg/nmol P450) für 30 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden 150 μ l des NADPH-erzeugenden Systems und Substrat in entsprechender Menge im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion wurden die Proben wie unter 2.2.14.2. bzw. 2.2.14.8. beschrieben extrahiert und analysiert.

2.2.15 Immunhistochemische Methoden

2.2.15.1 Formalinfixierung und Paraffinschnitte

Zur Fixierung wurde das Gewebe für mindestens 48 h in 4 % (v/v) Formalin gelagert. Formalin-fixiertes Gewebe wurde 24 h lang unter fließendem Leitungswasser gewässert und anschließend mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (2.2.15.2.) entwässert. Die in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden an einem Mikrotom (Fa. Leitz, Wetzlar) bei einem Neigungswinkel von 15° und einer Schnittdicke von 7 µm geschnitten.

Die Schnitte wurden auf einem Wassertropfen-beschichteten Objektträger manuell geglättet, anschließend auf der Wasseroberfläche eines auf 37 °C temperierten Wasserbads geglättet und dann auf Eiweiß-Glycerin-beschichtete Objektträger aufgezogen.

Die frisch aufgezogenen Schnitte wurden auf einem Heizblock (37 °C) getrocknet und anschließend bei 60 °C im Heizofen gelagert.

2.2.15.2 Entparaffinierung

Die Objektträger wurden durch folgende Lösungsmittelreihe entparaffiniert: Xylol I, 5 min, Xylol II, 5 min, 100% Alkohol, 2 min, 96% Alkohol, 2 min, 80% Alkohol, 1,5 min, 70% Alkohol, 1 min, 50% Alkohol, 1 min, H₂O, 4 min, PBS, 2 min.

2.2.15.3 Immunfärbung

Die weiteren Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Zuerst wurden die Schnitte für 30 min mit Schweine-Null-Serum (Verdünnung 1:200 in PBS) abgeblockt, anschließend gewaschen und dann über Nacht bei 4 °C mit dem 1. Antikörper (Verdünnungen von 1:100 bis 1:4000 in PBS) inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit PBS gewaschen und mit dem 2. Antikörper (IgG-B; Biotin-SP-conjugated anti-rabbit IgG antibody, Dianova, Hamburg) für 60 min bei Raumtemperatur (Verdünnung 1:100) inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS, bevor der PAP-Komplex mit Streptavidin (1:100 in PBS) und Biotin-SP-Peroxidase (1:1000 in PBS) hinzugesetzt wurde. Anschließend wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, wieder gewaschen und das Substrat Diaminobenzidin (DAB) (25 mg DAB ad 200ml Tris-HCl pH 7,6 + 0,4 ml 1% H₂O₂) zugegeben. Es folgten eine weitere Waschung mit PBS und daran anschließend die sog. "aufsteigende Alkoholreihe"

(50% Alkohol, 1 min, 70% Alkohol, 1 min, 80% Alkohol, 1,5 min, 96% Alkohol, 2 min, 100% Alkohol, 2 min, Xylol, 2 min)

Die Schnitte wurden mit Deckgläschen in Entellan (Merck, Darmstadt) eingebettet.

2.2.15.4 Hämatoxilin/Eosin-Färbung

Zur Beurteilung der Schnittqualität wurde eine Hämatoxilin/Eosin-Färbung durchgeführt.

Hämalaun-Lösung nach Meyer

1g Hämatoxilin, ad 1000 ml H₂O

0,2g Na-jodat (NaJO₃)

50g K-Al-sulfat (KAl(SO₄)₂),

50g Chloralhydrat

1g kristalline Citronensäure

Eosinlösung: 2 g Eosin in 200 ml H₂O lösen und 2 Tropfen Eisessig dazugeben.

Die getrockneten Paraffinschnitte wurden in der aufgelisteten Reihenfolge mit folgenden Reagenzien behandelt: Xylol, 5 min Xylol, 5 min 100% Alkohol, 30 sec 96% Alkohol, 30 sec 80% Alkohol, 30 sec 70% Alkohol, 30 sec 50% Alkohol, 30 sec H₂O, 30 sec Hämalaun, 6 min H₂O (fließend), 10 sec Eosin, 3 min H₂O, 30 sec 50% Alkohol, 30 sec 70% Alkohol, 30 sec 80% Alkohol, 30 sec 96% Alkohol, 30 sec 100% Alkohol, 30sec Xylol I, Lagerung in Xylol II. Die Schnitte wurden in Entellan eingedeckelt.

2.2.15.5 Einfrieren von Gewebe und Herstellung von Gefrierschnitten

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden Gewebeproben direkt in mit flüssigem Stickstoff vorgekühltem Isopentan eingefroren, anschließend mit Aluminiumfolie umwickelt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Zur Herstellung von Semidünnschnitten (5 - 7 μm) wurden die Gewebeproben mit Gewebekleber (Tissue Tek) auf einen auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgekühlten Metallblock gefroren und die Schnitte in einem Kryostat 1720 (Fa. Leitz, Wetzlar) bei einer Temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ angefertigt.

Zur Beschichtung der Objektträger wurden diese für 5 sec in eine Aceton-Silan (3-Aminopropyl-triethoxysilan)-Lösung (2 ml Silan auf 100 ml Aceton) getaucht, anschließend zweimal je 5 min in Aceton gewaschen und am Schluß für 5 min in H_2O gespült. Danach wurden die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Gefrierschnitte wurden direkt auf die silanisierten Objektträger übertragen und bei Raumtemperatur getrocknet, in Aceton für 10 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert und anschließend in TBS überführt.

2.2.15.6 Immunfärbung und Gegenfärbung in Hämatoxin

Die Schnitte wurden in einer feuchten Kammer für 30 min mit Schweine-Null-Serum (Verdünnung 1:100 in TBS pH 7,4) abgeblockt, danach dreimal in 0,1% Tween 20 in TBS gewaschen und mit dem 1. Antikörper (Verdünnungen von 1:50 bis 1:8000 in TBS) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimal gewaschen (s.o.) und mit einem 2. Antikörper (Esel-anti-Kaninchen-AP-konjugiertes IgG, Verdünnung 1:200 in TBS/1% BSA) für 60 min inkubiert. Es folgte der dreifache Waschschrift, bevor eine Alkalische-Phosphatase-Färbung mit dem Vectastain-Substrat-Kit durchgeführt wurde. Dazu wurden 4,5 μl Reagenz 1 in 250 μl Tris-HCl pH 8,2 pipettiert, dann mit 4,5 μl Reagenz 2 versetzt, gemischt und zum Schluß 4,5 μl Reagenz 3 dazugegeben. Zur Hemmung der endogenen alkalischen Phosphatase wurde der Substratlösung 2,5 μl Levamisol (100mM; Endkonzentration: 1 mM) hinzugefügt. Die Schnitte wurden 20 min mit Substratlösung inkubiert und anschließend 5 min in H_2O gewässert. Danach erfolgte eine Gegenfärbung in Hämatoxin-Lösung (Fertiglösung nach Delafield, Fa. Merck, Darmstadt) für 15 sec. Die Schnitte wurden 5 min in H_2O gewässert und sofort danach in Kaiser's Gelatine (Fa. Merck, Darmstadt) eingedeckelt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Computermodellierung von CYP3A4/CYP3A2

Der erste Schritt der Modellierung von CYP3A4/2 basierte auf der Zuordnung der Aminosäuren des CYP3A2/4 zu den Aminosäuren des CYP101 bzw. CYP2B4. Abbildung 1 zeigt das Alignment der Aminosäuresequenzen von CYP3A4/2 im Vergleich zu CYP101 und CYP2B4.

		Helix A	
101	M---TTETIQSNANLAPL-----PPHVPEHLVDFDFMYNPSNLSAGVQEAWAVLQESN		50
2B4	MEF---SLLLLLAFLAGLLLLLFRGHPKAHGRLPPGPSPLVGLNLLQM-DRK-GLLRSFLRLREKY		62
3A2	-----GLGRFDMECYKKY		68
3A4	-----GFCMFDMECHKKY		68
		Helix B BND BPR Helix C	
101	VPDLVWTRCNGGHWIATRGLIREAYEDYRHFSSSECFIPREAGEAYDFIPTSMDPPEQRQFRALAN		117
2B4	GDVFTVYLGSRPVVVLCTDAIREALVDQAEAFSGRGKIAVVDPIFQGYGVIFANGERWRALRRFSL		129
3A2	GKIWGLFDGQTPVFAIMDTEMIKNVLVKECFVSFTNRRDFGPGVIMGKAVSVAK DEEWKRYRALLSP		135
3A4	GKVVGFYDQQPVLAITDPDMIKTVLVKECYSVFTNRRPFGPGVFMKSAISIAE DEEWKRLRSLLSP		135
		123 A 133	
		Helix C Helix D Ins 2 Helix E	
101	QV--VGMPVVDKLENRIQELACSLIESLRPQGG-----CNFTEDYAEFPPIRIFMLL		167
2B4	ATMRDFGMGKRSVEERIQQEARCLVEELRKSkgALLDNTLLFHSITSNICSIIVFGKRFYKDPVFL		196
3A2	TFTSGRLKEMFPIIEQYGDILVKYLYKQEAETGKPVTKKVFVGAYSMDVITSTSTFGVNVDSLNNPKDP		202
3A4	TFTSGKLEKEMVPIIAQYGDVLRNLRREAETGKPVTLKDVFGAYSMDVITSTSTFGVNIIDLNNPQDP		202
		Ins 3 Helix F Helix G	
101	AGLPE-----EDIPHLKYLTDQMTRPDGSMTFAEAKEALYDYLIPIIEQRRQ		214
2B4	RLLDLFFQSFSLISSQVFELFPGLKHFPGTHRQIYRNLQEINTFIGQSVEKHRATLDPSNPRD		263
3A2	FVEKTKKLLRFDFDFPLFSLVVLFPFLTPIYEMLNICMFPKDSIAFFQKRVHRIKETRLDSKHKHRV		269
3A4	FVENTKLLRFDFLDFPFLSITVFPFLIPILEVLNICVFPREVTNFLRKSVMKESRLEDTQKHRV		269
		Helix H Helix I Helix J	
101	KPGTDAISIVANGQVNGRPITSDEAKRMCGLLVGGLDTVVNFLSFSMEFLAKSPEHRQELIE----		262
2B4	FIDVYLLRMEKDKSDPSSEFHHQNLILTVLSLFFAGTETTSTTLRYGFLMLKYPHVTERTVQKEIEQ		330
3A2	DFLQMLNAHNNSKDEVSHKALSDVEIIAQSVIFIFAGYETTSSVLSFVLYFLATHPDIQK KLQEEI		336
3A4	DFLQMLIDS Q-NSKETESHKAL SDLELVAQSIIFIFAGYETTSSVLSFIMYELATHPDVQ KLQEEI		335
		278 B 288 330	
		Ins 4 Helix K 3 ₁₀ Helix	
101	-----RPERIPAACEELLRRFSLVADGRILTSDYEFHGVQLKKGDQILLPQMLSGL		329
2B4	VIGSHRPPALDDRAMPYTDAVIHEIQRLGDLIPFGVPHTVTKDTQFRGYVIPKNTEVFVLSALH		395
3A2	DGALPSKAP PPTYDIVMEMEYLDMLNETLRLYPIGNRLERVCCKDIELDGLFIPKGSVVTIPTYALH		401
3A4	DAVLPNKA PPTYDVTVLQMEYLDMLVNETLRLFPFIAMRLERVCKKDVEINGMFIKPGWVVMIPSYALH		400
		C 343	
		Ins 5 Helix L	
101	DERENACPMHVDESQR-----KVSHTTFHGSHLCLGQHLARREIIVTLKEWLTRIPDFSIAIP		386
2B4	DPRYFETPNTFNPGHFLDANGALKRNEGFMFSLGKRICLGEGIARTELFLEFTTILQNFASIAPVP		464
3A2	HDPQHWPKEEFHPERFSKENKGSIHYPVYLPFGNGPRNCIDMRFALNMKALTKVLQNFQPCPK		470
3A4	RDPKYWTEPEKFLPERF SKKNKDNIDPYI YTPFGSGPRNCIGMRFALNMKALIRVLQNFQPCPK		469
		420 D 431	
101	GAQIQHKSGIVSGVQALPLVWDPATKAV	415	
2B4	PEDIDLTRESGCVNPPSYQIRFLAR--	491	
3A2	ETQIPLKLSRQAILEPEKPIVLKVLPR--	501	
3A4	ETQIPLKLSLGLLQPEKPVVLKVESR--	500	

Abb. 1: Aminosäuresequenzvergleich zwischen CYP101, CYP2B4 und CYP3A4 bzw. CYP3A2.

Der Sequenzvergleich in Abbildung 1 als Ergebnis dieser Zuordnung zeigt eine gute Übereinstimmung der Sequenzen, die in CYP101 die Helices A-L bilden mit entsprechenden Sequenzen des CYP3A2 bzw. CYP3A4, die nach der Computermodellierung dieselbe Sekundärstruktur aufwiesen.

Hierbei wurde auf einem Modell für CYP2B4 aufgebaut, das von Krüger (1992) zur fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung der Membrantopologie von CYP2B4 entwickelt wurde. Der Modellierung von CYP3A4/2 lag dieses Modell zu Grunde. Auf der Grundlage der von Gotoh und Fujii-Kuriyama beschriebenen Alignments der Cytochrom P450-Enzyme wurden die Seitenketten des CYP2B4 Modells gegen die von CYP3A2/4 komplett ausgetauscht. Die im CYP3A4/2 Modell vorkommenden Insertionen hatten, im Vergleich zu CYP101, folgende Strukturveränderungen zur Folge. Insertion 1 führte zu einer Verlängerung von Helix C (am C-Terminus) auf der cytoplasmatischen Seite um zwei Aminosäuren. Die vier größeren Insertionen wurden zwischen den Helices D und E, E und F, J und K, sowie in einem turnreichen Gebiet (Mäander) auf der cytoplasmatischen Seite zwischen Helix 3₁₀ und Helix L eingefügt (Abb. 1). Die sehr polare 2. Insertion zwischen Helix D und E führte zu einer Verlängerung von Helix D um eine und Helix E um zwei Windungen. Die 3. Insertion zwischen Helix E und F enthielt zwei kurze helikale Sequenzen, die durch Turns miteinander verbunden wurden. Die 4. Insertion zwischen Helix J und K führte zu einer Verlängerung von Helix J um sieben und Helix K um zwei Aminosäuren und zur Ausbildung eines Turns. Die letzte Insertion zwischen Helix 3₁₀ und Helix L führte wiederum zur Ausbildung von Turns.

3.2 Auswahl spezifischer Epitope im CYP3A4/2 Modell

Mit Hilfe des Computermodells wurden Aminosäurebereiche des CYP3A4/2 Modells gewählt, die sich aufgrund ihrer Position auf der Oberfläche des CYP Modells befanden und eine oder mehrere positive Ladungen trugen. Wie in den Abbildungen 2 und 3 des CYP3A4/2 Modells dargestellt, befinden sich alle vier ausgewählten Bereiche auf der dem Zytoplasma zugewandene Seite - proximalen Seite - und sind somit theoretisch für Antikörper zugänglich. Insofern stellen diese Bereiche geeignete Epitope zur Herstellung Epitop-spezifischer Antikörper dar. Diese Epitopbereiche bestanden aus folgenden Aminosäuresequenzen: Epitopbereich A: DEEWKRYRALL (123 - 133), Epitopbereich B: QNSKETESHKA (278 - 288), Epitopbereich C: KLQEEIDAVLPNKA (330 - 343) und Epitopbereich D: SKKNKDNIDPYI (420 - 431).

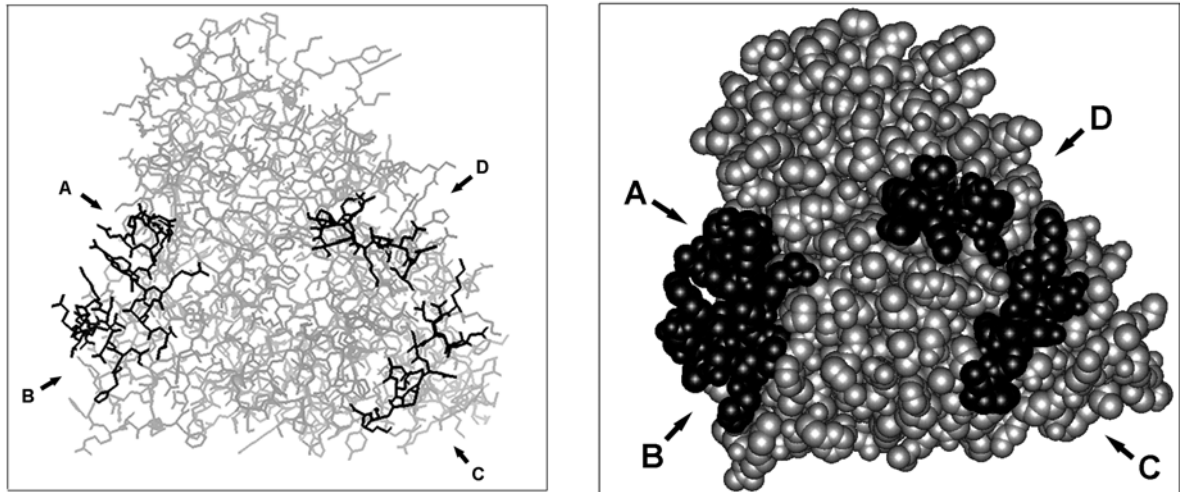


Abb 2: Computermodell von CYP3A4/2. Ansicht der proximalen Seite mit Position der Epitopbereiche A bis D.

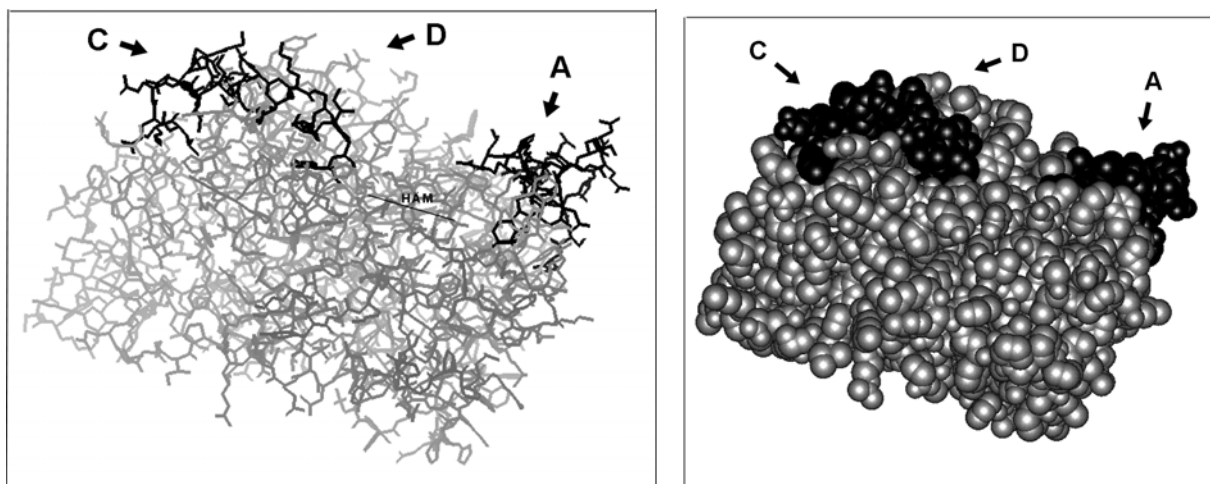


Abb. 3: Computermodell von CYP3A4/2 in Seitenansicht mit Position der Epitopbereiche A bis D.

Ein weiteres Kriterium bei der Auswahl dieser Epitopbereiche bestand darin, Sequenzbereiche innerhalb des CYP3A4/2 Modells ausfindig zu machen, die eine möglichst geringe Sequenzhomologie zu anderen CYP haben. Dieses Kriterium wird von den vier Sequenzbereichen erfüllt.

3.3 Auswahl spezifischer Epitope in CYP1A1, 1A2, 2C8, 2C10, 2D6 und 2E1

Ausgehend vom CYP3A4/2 Modell und dem Alignment von Gotoh und Fujii-Kuriyama (1989) wurden Sequenzbereiche in CYP1A1, 1A2, 2C8, 2C10, 2D6 und 2E1 ausgewählt, die entweder Epitopbereich A (CYP1A1, 1A2, 2D6) oder Epitopbereich D (CYP1A2, 2C8, 2C10 und 2E1) entsprachen. Auch diese Bereiche sollten theoretisch für Antikörper zugänglich sein und somit geeignete Epitope zur Herstellung Epitop-spezifischer Antikörper darstellen. Aus Übersichtsgründen sind diese Aminosäuresequenzen inklusive der bereits unter 3.2 beschriebenen in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Bereich A	Helix C	CYP
123-133	DEEWKRYRALL	CYP3A2 Ratte
130-140	GPVWAARRRLA	CYP1A1/CYP1A2
118-128	GVFLARYGPAW	CYP2D6
Bereich B	Helix H und Turn	
278-288	QNSKETESHKA	CYP3A4
Bereich C	Helix J und Turn	
331-344	KLQEEIDGALPSKA	CYP3A2
330-343	KLQEEIDAVLPNKA	CYP3A4
Bereich D	Mäander	
420-431	SKKNKDNIDPYI	CYP3A4
431-445	LTADGTAINKPLSEK	CYP1A2 Mensch
433-446	LTNDNTAIDKTLSEK	CYP1A2 Ratte
415-428	LNENGFKFKYSDFK	CYP2E1
413-424	LDEGDNFKKSDY	CYP2C10
413-424	LDKNGNFKKSDY	CYP2C8

Tab. 2: Übersichtsschema der ausgewählten Aminosäuresequenzen aus den Bereichen A bis D mit Angabe der Aminosäurepositionen in den jeweiligen CYP. Angaben zu Sekundärstrukturen basieren auf dem CYP3A-Modell.

3.4 MAP-Synthesen

Die Reinheit der MAPs wurde durch RP-HPLC und Kapillarzonenelektrophorese kontrolliert. Eine Überprüfung der Aminosäuresequenz erfolgte durch Edmann-Abbau.

Die Ausbeute an gereinigtem Rohpeptid nach Harzabspaltung und Aufreinigung durch RP-HPLC lag, je nach MAP, zwischen 33% und 18%. Abbildung 4 zeigt exemplarisch ein analytisches RP-HPLC-Elutionsprofil des aufgereinigten MAP 5.

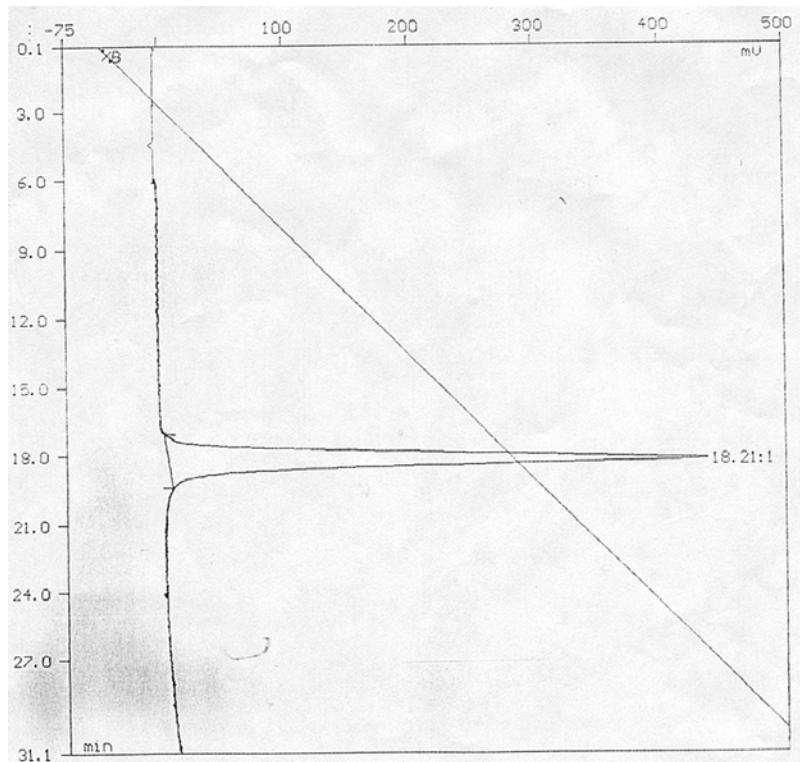


Abb. 4: Analytisches RP-HPLC-Elutionsprofil des aufgereinigten MAP 5: (Säule Vydac, RP C-18, 10 μm , 25 mm x 250 mm, Biotek, Heidelberg) mit einem linearen Gradienten von 10-80% 0,1% (v/v) TFA/0,1% (v/v) TFA in Acetonitril/Wasser (80/20; v/v) in 60 min bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,7 ml/min. Die Detektion erfolgte bei 230 nm. Die Elution des MAP erfolgte bei 18,2 min.

In Tabelle 3 werden die Gesamtmengen der hochaufgereinigten MAPs zusammengefaßt. Die Gesamtmenge lag zwischen 10,6 mg für MAP16 und 35,1 mg für MAP6.

MAP	Menge	Sequenz	Position
MAP 11:	21,4mg	DEEWKRYRALL	(3A2: 123-133)
MAP 12:	28,7mg	SKKNKDNIDPYI	(3A4: 420-431)
MAP 7:	19,6mg	QNSKETESHKA	(3A4: 278-288)
MAP 6:	35,1mg	KLQEEIDGALPSKA	(3A2: 331-344)
MAP 5:	28,1mg	KLQEEIDAVLPNKA	(3A4: 330-343)
MAP 1:	17,9mg	LNENKFKYSDYFK	(2E1: 415-428)
MAP 4:	22,5mg	LDEGDNFKKSDY	(2C10: 413-424)
MAP 2:	25,2mg	LDKNGNFKKSDY	(2C8: 413-424)
MAP 16:	10,6mg	GVFLARYGPAW	(2D6: 118-128)
MAP 17:	16mg	GPVWAARRRLA	(1A2: 130-140)
MAP 18:	18,2mg	LTADGTAINKPLSEK	(1A2: 431-445)
MAP 19:	19,5mg	LTNDNTAIDKTLSEK	(1A2: 433-446)

Tab. 3: Gesamtmengen der hochaufgereinigten MAPs und deren Aminosäuresequenz.

3.5 Titerbestimmungen der Antiseren

Zur schnelleren Orientierung bezüglich der finalen Antikörpertiter der immunisierten Kaninchen sind in Tabelle 4 diese zusammengefaßt dargestellt. Angegeben wird sowohl das zur Immunisierung verwendete MAP, die Antigenmenge, die dem Tier pro Immunisierung injiziert wurde, das dazugehörige CYP, gegen das immunisiert wurde als auch die interne Numerierung der immunisierten Kaninchen. Der jeweilige angegebene finale Titer entspricht einer Antiserumverdünnung, bei der eine halbmaximale Bindung im linearen Bereich der Bindungskurve vorlag.

Die für weitergehende Untersuchungen verwendeten Antiseren sind in Tabelle 4 durch Fettdruck hervorgehoben.

MAP	MAP (mg)	CYP	Kaninchen	Titer (final)
12	1	3A4	3	1:3.500
	1		4	1:12.500
	0,5		5	1:26.000
	0,5		8	1:10.000
	0,25		9	1:9.000
11	1	3A2	10	1:100.000
	1		11	1:125.000
	0,5		13	1:2.700
	0,5		14	1:238.000
	0,25		16	1:167.000
	0,25		51	1:67.000
5	0,5	3A4	825	1:294.000
	0,5		828	1:250.000
	0,5		829	1:4.400
7	0,5	3A4	830	1:14.700
	0,5		831	nicht bestimmbar
	0,5		832	1:4.300
6	0,5	3A2	833	1:100.000
	0,5		834	1:37.000
16	0,5	2D6	78	1:5.500
	0,5		83	1:4.000
17	0,5	1A2/1A2	82	1:600
	0,5		87	1:500
18	0,5	1A2	89	1:110.000
	0,5		97	1:222.000
19	0,5	1A2	103	1:42.000
	0,5		104	1:250.000
	0,5		105	1:166.00
1	0,5	2E1	835	1:36.000
	0,5		836	1:500
2	0,5	2C8	837	1:26.300
	0,5		857	1:12.000
4	0,5	2C10	858	1:35.700
	0,5		859	1:5.400

Tab. 4: Übersicht der immunisierten Kaninchen mit Angabe der finalen Titer. Die durch kursiven Fettdruck hervorgehobenen Antiseren wurden für weitergehende Untersuchungen eingesetzt.

3.5.1 MAP 11

In Abb. 5 sind die Antikörpertiter für Kaninchen 10, 11, 13, 14, 16 und 51 dargestellt. Eine deutliche Erhöhung der Antikörper-Titer konnte durch die Boosterimmunisierungen bei 5 von 6 Kaninchen erzielt werden. Der höchste Titer wurde bei Kaninchen 14 (1:238.000) gemessen.

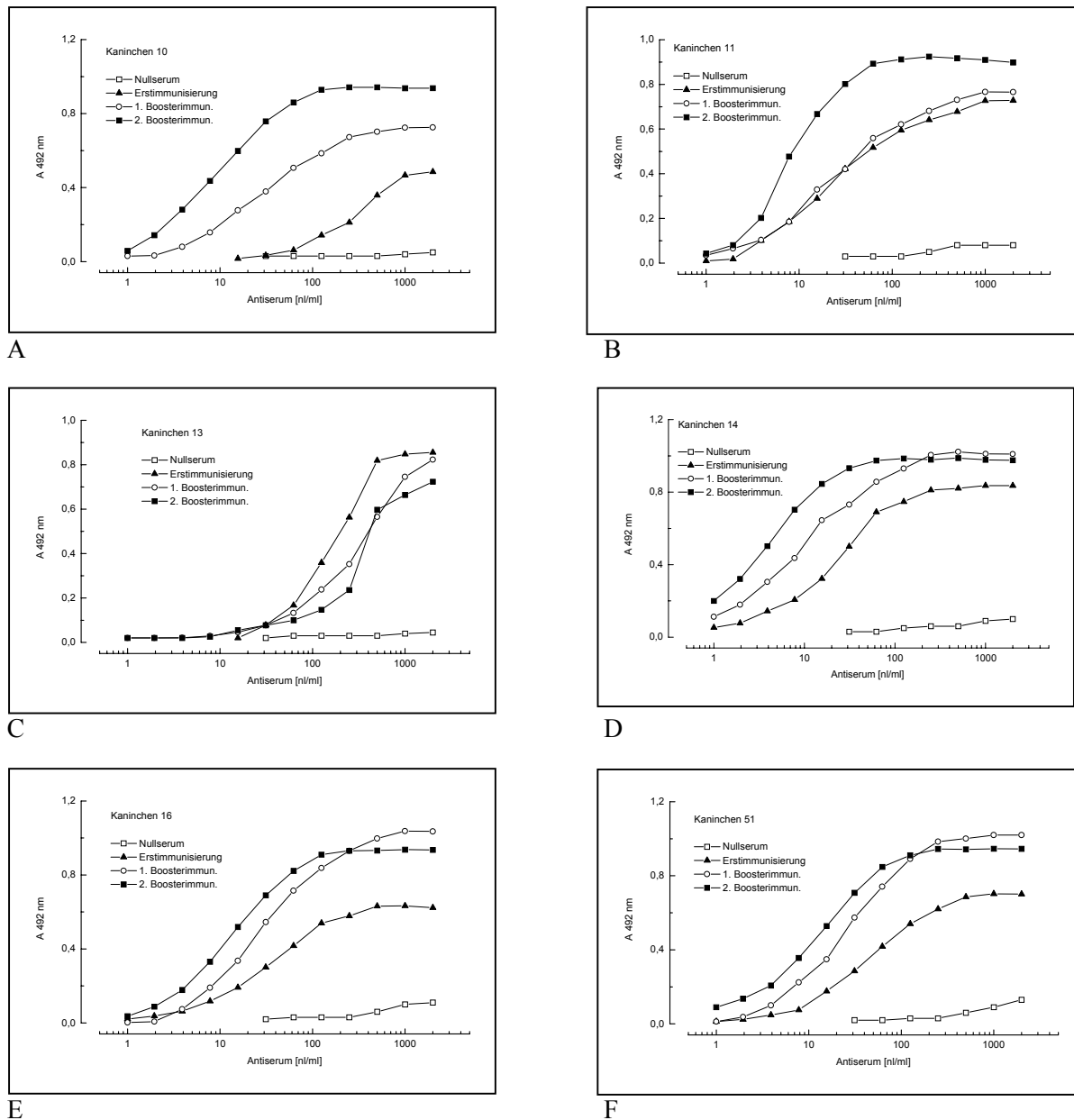


Abb. 5: Bestimmung der Antikörpertiter gegen MAP 11 (Bereich A: DEEWKRYRALL, CYP3A2) mittels ELISA. Jeweils 25 ng des Antigens (0,1 ml/Loch) wurden pro Loch an Mikrotiterplatten gebunden. Nullserum und Antiserum (Erstimmunisierung, 1. Booster- und 2. Boosterimmunisierung) wurden in verschiedenen Verdünnungen zugegeben und die gebundenen Antikörper mit einem Peroxidase-markierten Anti-Antikörper nachgewiesen. Die Messung erfolgte bei 492 nm. Folgende Antigenmengen wurden pro Immunisierung eingesetzt: Kaninchen 10 (A), 11 (B), je 1 mg, Kaninchen 13 (C), 14 (D), je 0,5 mg, und Kaninchen 16 (E), 51 (F), je 0,25 mg.

Die Titer der anderen vier Tiere betragen: Kaninchen 16 (1:167.000), Kaninchen 11 (1:125.000), Kaninchen 10 (1:100.000) und Kaninchen 51 (1:67.000). Bei Kaninchen 13 betrug der Titer 1:2.700 nach der letzten Immunisierung.

3.5.2 MAP 12

In Abb. 6 sind die Antikörpertiter für Kaninchen 3, 4, 5, 8 und 9 dargestellt. Die Titer der Kaninchen betragen: Kaninchen 3 (1:3.500), Kaninchen 4 (1:12.500), Kaninchen 5 (1:26.000), Kaninchen 8 (1:10.000) und Kaninchen 9 (1:9.000).

3.5.3 MAP 7

In Abb. 7A - 7C sind die Antikörpertiter für Kaninchen 830, 831 und 832 dargestellt. Die Titer der Kaninchen betragen: Kaninchen 830 (1:14.700), Kaninchen 831 (nicht bestimmbar) und Kaninchen 832 (1:4.400).

3.5.4 MAP 5

Die Antikörpertiter für Kaninchen 825, 828 und 829 sind in Abb. 7D - 7F dargestellt. Die Titer der Kaninchen betragen: Kaninchen 825 (1:294.000), Kaninchen 828 (1:250.000) und Kaninchen 829 (1:4.400).

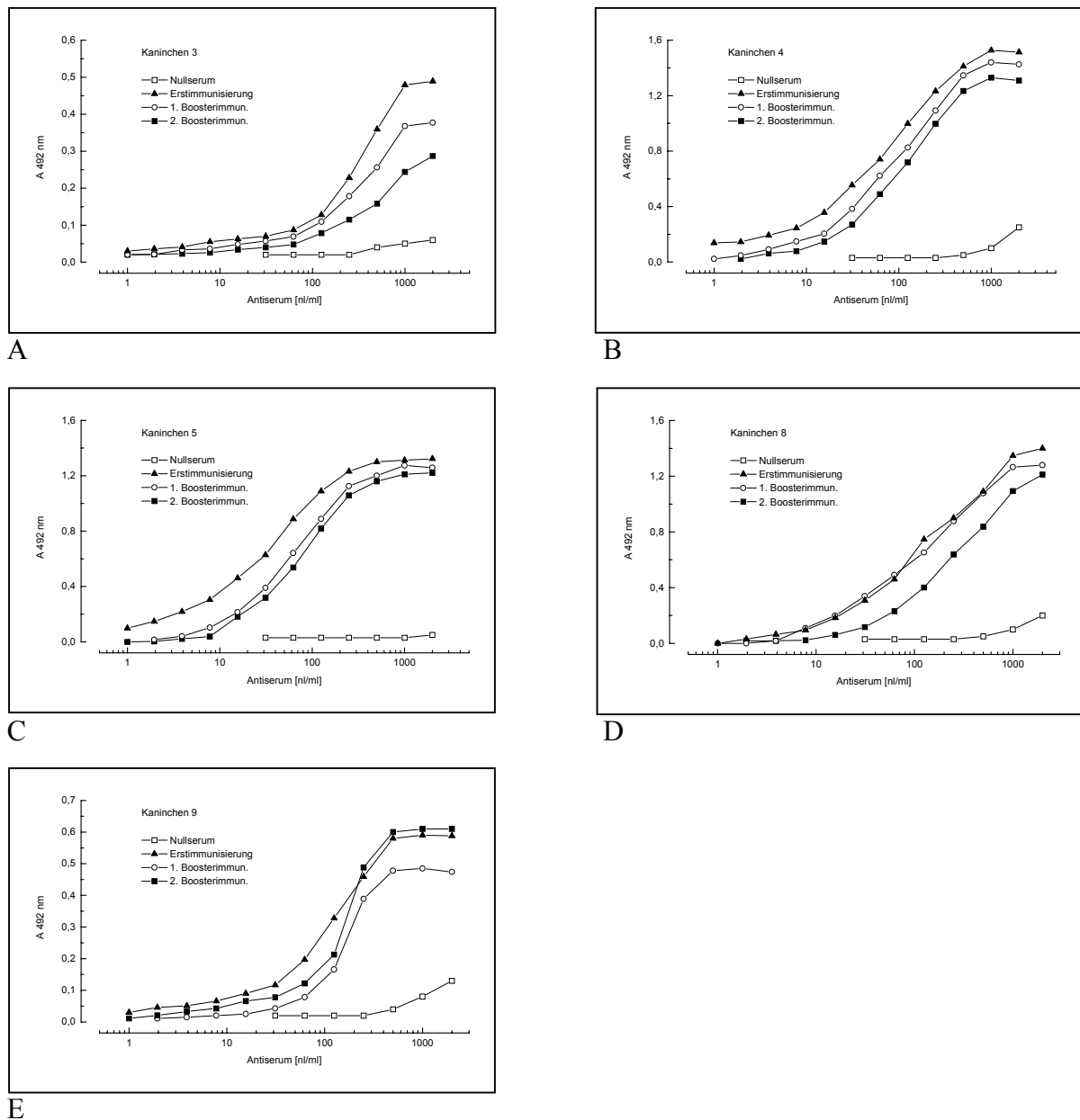


Abb. 6: Bestimmung der Antikörpertiter gegen MAP 12 (Bereich D: SKKNKDNI DPYI, CYP3A4) mittels ELISA. Jeweils 25 ng des Antigens (0,1 ml/Loch) wurden pro Loch an Mikrotiterplatten gebunden. Nullserum und Antiserum (Erstimmunisierung, 1. Booster- und 2. Boosterimmunisierung) wurden in verschiedenen Verdünnungen zugegeben und die gebundenen Antikörper mit einem Peroxidase-markierten Anti-Antikörper nachgewiesen. Die Messung erfolgte bei 492 nm. Folgende Antigenmengen wurden pro Immunisierung eingesetzt: Kaninchen 3 (A), 4 (B), je 1 mg, Kaninchen 5 (C), 8 (D), je 0,5 mg, und Kaninchen 9 (E), 0,25 mg.

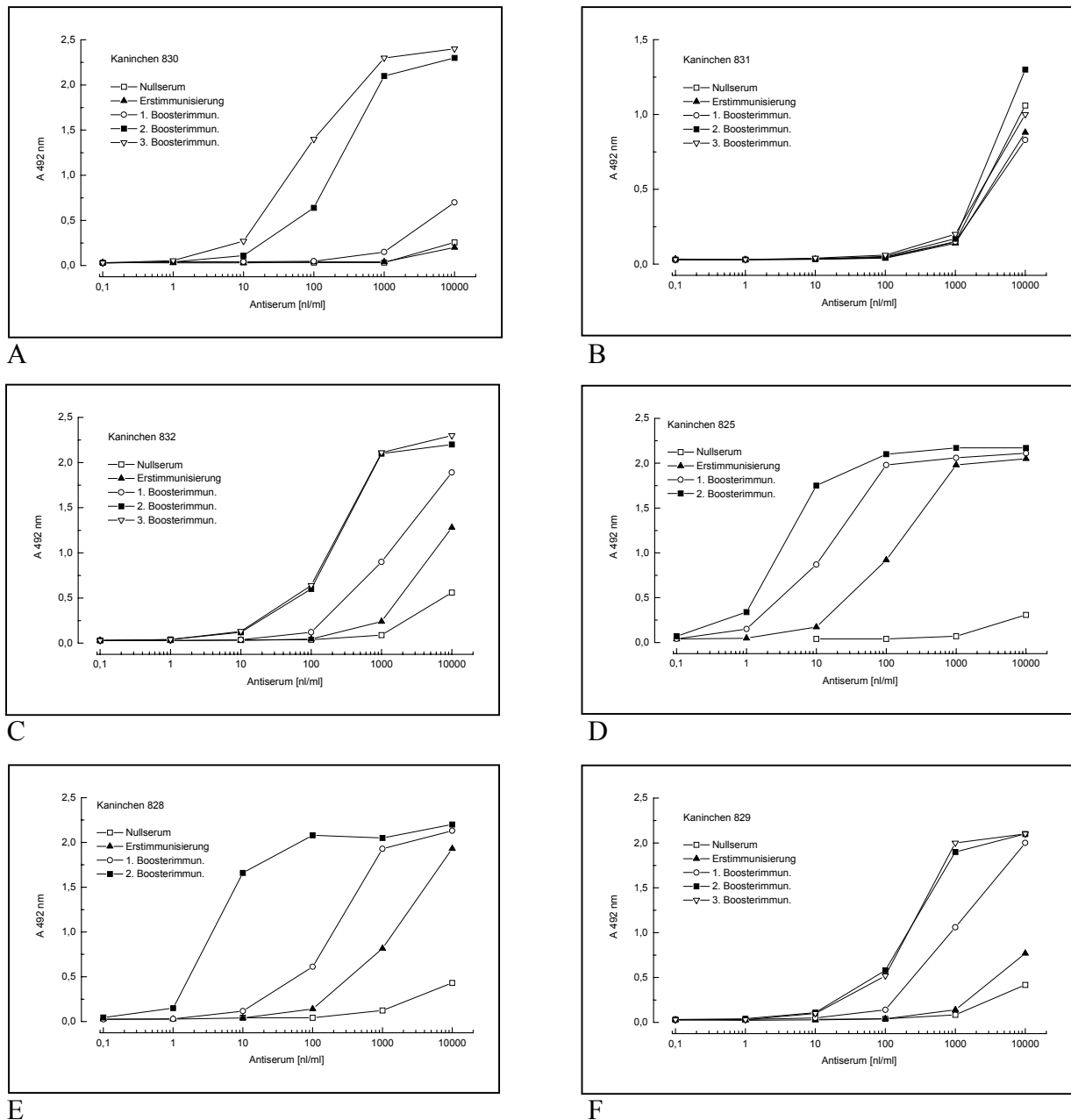


Abb. 7: Bestimmung der Antikörpertiter gegen MAP 7 (Bereich B: QNSKETESHKA, CYP3A4) und MAP 5 (Bereich C: KLQEEIDAVLPNKA, CYP3A4) mittels ELISA. Jeweils 25 ng des Antigens (0,1 ml/Loch) wurden pro Loch an Mikrotiterplatten gebunden. Nullserum und Antiserum (Erstimmunisierung, 1. 2. und 3. Boosterimmunisierung) wurden in verschiedenen Verdünnungen zugegeben und die gebundenen Antikörper mit einem Peroxidase-markierten Anti-Antikörper nachgewiesen. Die Messung erfolgte bei 492 nm. MAP 7: Kaninchen 830 (A), 831 (B) und 832 (C). MAP 5: Kaninchen 825 (D), 828 (E) und 829 (F). Antigenmenge pro Immunisierung: 0,5 mg.

3.5.5 MAP 6

Die Antikörpertiter für Kaninchen 833 und 834 sind in Abb. 8 dargestellt. Die Titer der Kaninchen betragen: Kaninchen 833 (1:100.000), Kaninchen 834 (1:37:000).

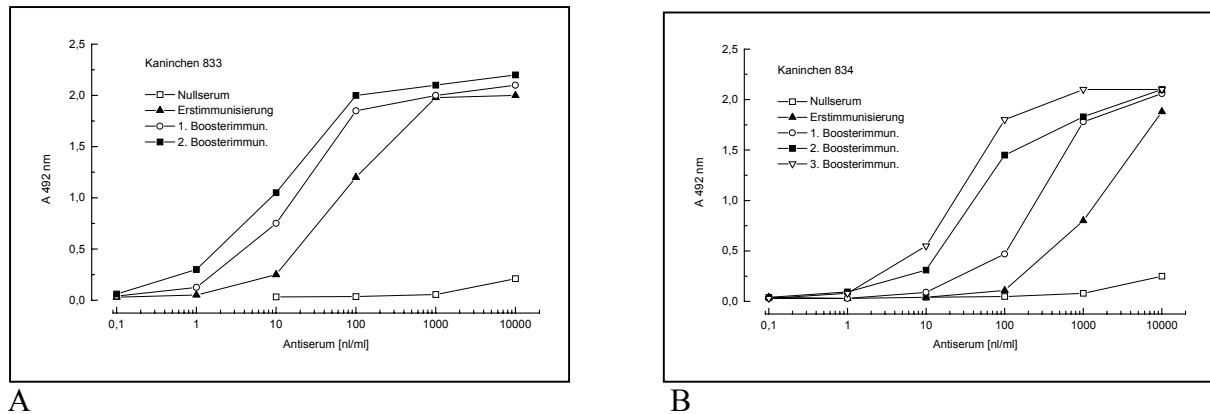


Abb. 8: Bestimmung der Antikörpertiter gegen MAP 6 (Bereich C: KLQEEIDGALPSKA; CYP3A2) mittels ELISA. Jeweils 25 ng des Antigens (0,1 ml/Loch) wurden pro Loch an Mikrotiterplatten gebunden. Nullserum und Antiserum (Erst-immunisierung, 1. 2. und 3. Boosterimmunisierung) wurden in verschiedenen Verdünnungen zugegeben und die gebundenen Antikörper mit einem Peroxidase-markierten Anti-Antikörper nachgewiesen. Die Messung erfolgte bei 492 nm. Kaninchen 833 (A) und Kaninchen 835 (B). Antigenmenge pro Immunisierung: 0,5 mg

3.5.6 MAP 17

Die Antikörpertiter für Kaninchen 84 und 87 sind in Abb. 9 dargestellt. Die Titer der Kaninchen betragen: Kaninchen 84 (1:600) und Kaninchen 87 (1:500).

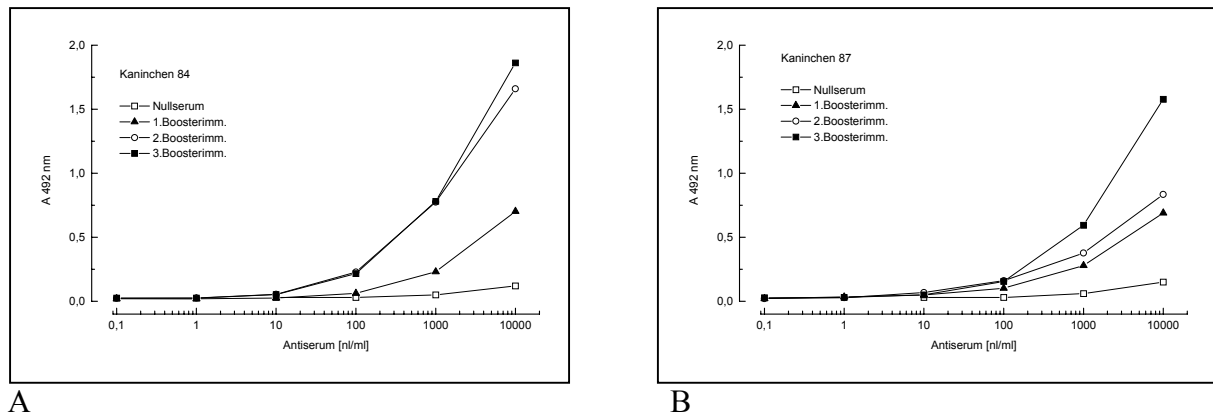


Abb. 9: Bestimmung der Antikörpertiter gegen MAP 17 (Bereich A: GPVWAARRRLA; CYP1A2/1A1) mittels ELISA. Jeweils 25 ng des Antigens (0,1 ml/Loch) wurden pro Loch an Mikrotiterplatten gebunden. Nullserum und Antiserum (Erst-immunisierung, 1. 2. und 3. Boosterimmunisierung) wurden in verschiedenen Verdünnungen zugegeben und die gebundenen Antikörper mit einem Peroxidase-markierten Anti-Antikörper nachgewiesen. Die Messung erfolgte bei 492 nm. Kaninchen 84 (A) und Kaninchen 87 (B). Antigenmenge pro Immunisierung: 0,5 mg.

3.5.7 MAP 18

Die Antikörpertiter für Kaninchen 89 und 97 sind in Abb. 10 A und 10 B dargestellt. Die Titer der Kaninchen betragen: Kaninchen 89 (1:110.000) und Kaninchen 97 (1:222.000).

3.5.8 MAP 19

In Abb. 10 C - F sind die Antikörpertiter für Kaninchen 103, 104 und 105 dargestellt. Die Titer der Kaninchen betragen: Kaninchen 103 (1:42.000), Kaninchen 104 (1:250.000) und Kaninchen 105 (1:166.000).

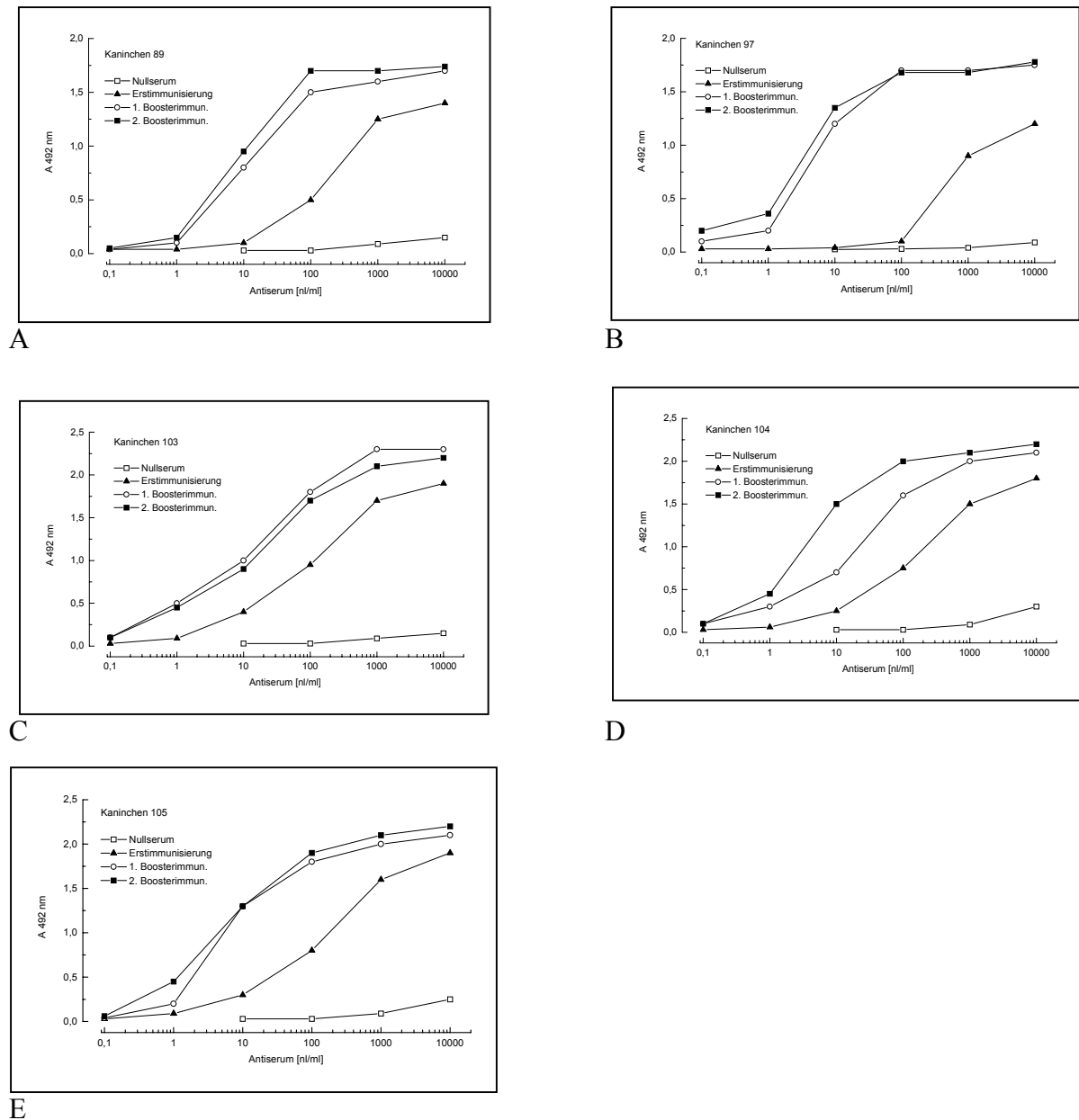


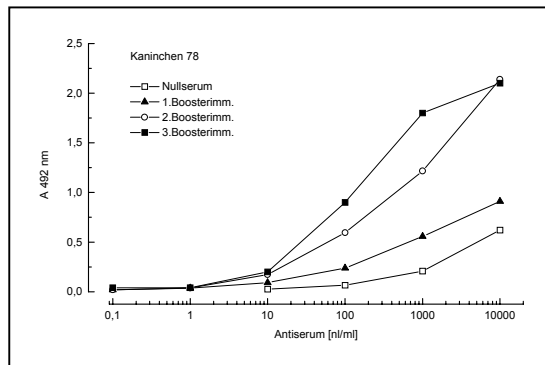
Abb 10: Bestimmung der Antikörpertiter gegen MAP 18 (Bereich D: LTADGTAINKPLSEK, CYP1A2, human) und MAP 19 (Bereich D: LTNDNTAIDKTLSEK, CYP1A2, Ratte) mittels ELISA. Jeweils 25 ng des Antigens (0,1 ml/Loch) wurden pro Loch an Mikrotiterplatten gebunden. Nullserum und Antiserum (Erstimmunisierung, 1. Booster- und 2. Boosterimmunisierung) wurden in verschiedenen Verdünnungen zugegeben und die gebundenen Antikörper mit einem Peroxidase-markierten Anti-Antikörper nachgewiesen. Die Messung erfolgte bei 492 nm. MAP 18: Kaninchen 89 (A) und 97 (B). MAP 19: Kaninchen 103 (C), 104 (D) und 105 (E). Antigenmenge pro Immunisierung: 0,5 mg.

3.5.9 MAP 16

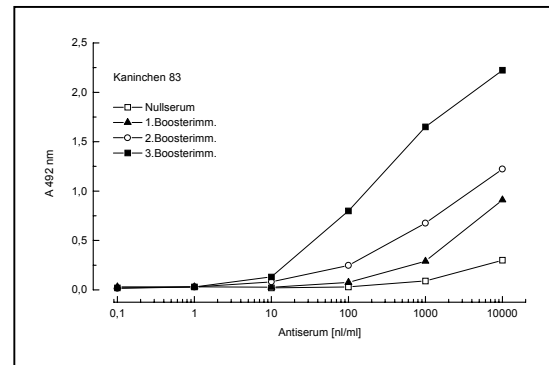
Die Antikörpertiter für Kaninchen 78 und 83 sind in Abb. 11 A und B dargestellt. Die Titer der Kaninchen betragen: Kaninchen 78 (1:5.5000) und Kaninchen 83 (1:4.000).

3.5.10 MAP 1

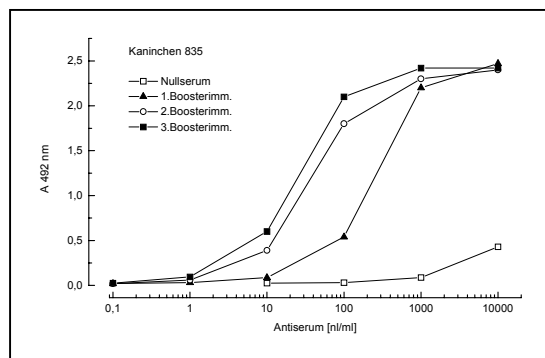
Die Antikörpertiter für Kaninchen 835 und 836 sind in Abb. 11 C und D dargestellt. Die Titer der Kaninchen betragen: Kaninchen 835 (1:36.000) und Kaninchen 836 (1:500).



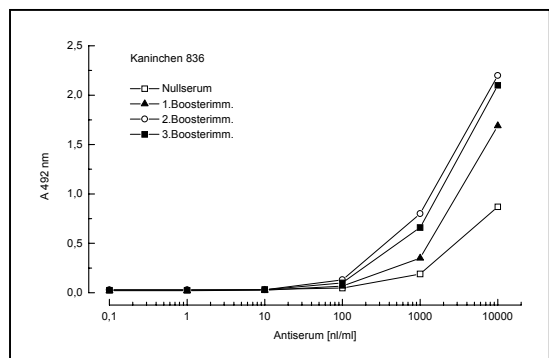
A



B



C



D

Abb. 11: Bestimmung der Antikörpertiter gegen MAP 16 (Bereich A: GVFLARYGPAW; CYP2D6) und MAP 1 (Bereich D: LNENGKFKYSDYFK, CYP2E1) mittels ELISA. Jeweils 25 ng des Antigens (0,1 ml/Loch) wurden pro Loch an Mikrotiterplatten gebunden. Nullserum und Antiserum (Erstimmunisierung, 1., 2. und 3. Boosterimmunisierung) wurden in verschiedenen Verdünnungen zugegeben und die gebundenen Antikörper mit einem Peroxidase-markierten Anti-Antikörper nachgewiesen. Die Messung erfolgte bei 492 nm. MAP 16: Kaninchen 78 (A) und 83(B). MAP 1: Kaninchen 835 (C) und 836 (D). Antigenmenge pro Immunisierung: 0,5 mg.

3.5.11 MAP 2

Die Antikörpertiter für Kaninchen 837 und 857 sind in Abb. 12 A und B dargestellt. Die Titer der Kaninchen betragen: Kaninchen 837 (1:26.300) und Kaninchen 857 (1:12.000).

3.5.12 MAP 4

Die Antikörpertiter für Kaninchen 858 und 859 sind in Abb. 12 C und D dargestellt. Die Titer der Kaninchen betragen: Kaninchen 858 (1:35.700) und Kaninchen 859 (1:5400).

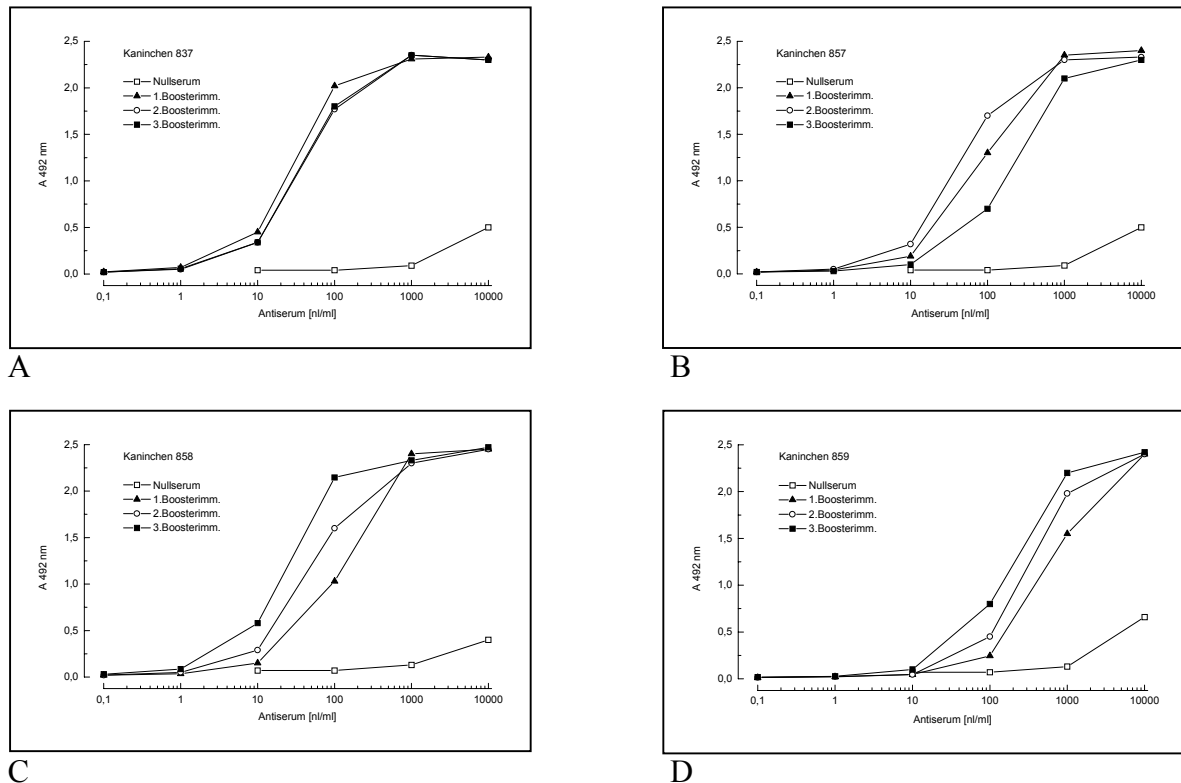


Abb. 12: Bestimmung der Antikörpertiter gegen MAP 2 (Bereich D: LDKNGNFKKSDY; CYP2C8) und MAP 4 (Bereich D: LDEGDNFKKSDY; CYP2C10) mittels ELISA. Jeweils 25 ng des Antigens (0,1 ml/Loch) wurden pro Loch an Mikrotiterplatten gebunden. Nullserum und Antiserum (Erstimmunisierung, 1., 2. und 3. Boosterimmunisierung) wurden in verschiedenen Verdünnungen zugegeben und die gebundenen Antikörper mit einem Peroxidase-markierten Anti-Antikörper nachgewiesen. Die Messung erfolgte bei 492 nm. MAP 2: Kaninchen 837 (A) und 857 (B). MAP 4: Kaninchen 858 (C) und 859 (D). Antigenmenge pro Immunisierung: 0,5 mg.

3.6 Spezifität der Anti-Peptid-Antikörper im Western Blot

In Vorversuchen wurden die Antiseren auf ihre Spezifität im Western Blot getestet. Die aus den Vorversuchen als spezifisch auf ihr jeweiliges Antigen reagierenden Antiseren werden für die weiteren Untersuchungen eingesetzt. Dafür werden heterolog in *E. coli* exprimierte CYP-Enzyme oder aufgereinigte CYP-Enzyme über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Western Blot auf PVDF-Membran transferiert. Die durchgeführten Immunfärbungen geben darüber Aufschluß, ob die Anti-Peptid-Antikörper das Epitop unter diesen Bedingungen erkennen können und wie spezifisch diese Bindung ist. Kreuzreaktionen mit anderen CYP-Enzymen können auf diese Weise festgestellt werden.

3.6.1 CYP3A4

Die Spezifität der Antikörper für CYP3A4 wird mit aufgereinigten CYP Proteinen im Western Blot untersucht. Dabei zeigt sich, dass die Antikörper der Kaninchen 51, 830, 825 und 8, die jeweils mit verschiedenen MAPs aus den Epitopbereichen A, B, C und D immunisiert wurden, spezifisch mit CYP3A4 im Western Blot reagieren (Abb. 13).

Die Antikörper des mit MAP 7, Epitopbereich B (QNSKETESHKA, 278-288), immunisierten Kaninchens 830 zeigen dabei eine starke Kreuzreaktion mit CYP3A5. Diese Reaktion ist zu erwarten, da beide Enzyme in diesem Bereich dieselbe Primärsequenz aufweisen. Die Antikörper von Kaninchen 8 und 51 zeigen ebenfalls eine leichte Kreuzreaktion mit CYP3A5, wohingegen Antikörper von Kaninchen 825 CYP3A5 überhaupt nicht erkennen. Aus den in Abbildung 13 dargestellten Western Blots ergibt sich, dass die Antikörper von allen vier mit verschiedenen MAPs immunisierten Kaninchen spezifisch mit CYP3A4 bzw. CYP 3A5 reagieren, sonst aber keine Kreuzreaktion mit CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1, CYP2C10 bzw. CYP2D6 zeigen.

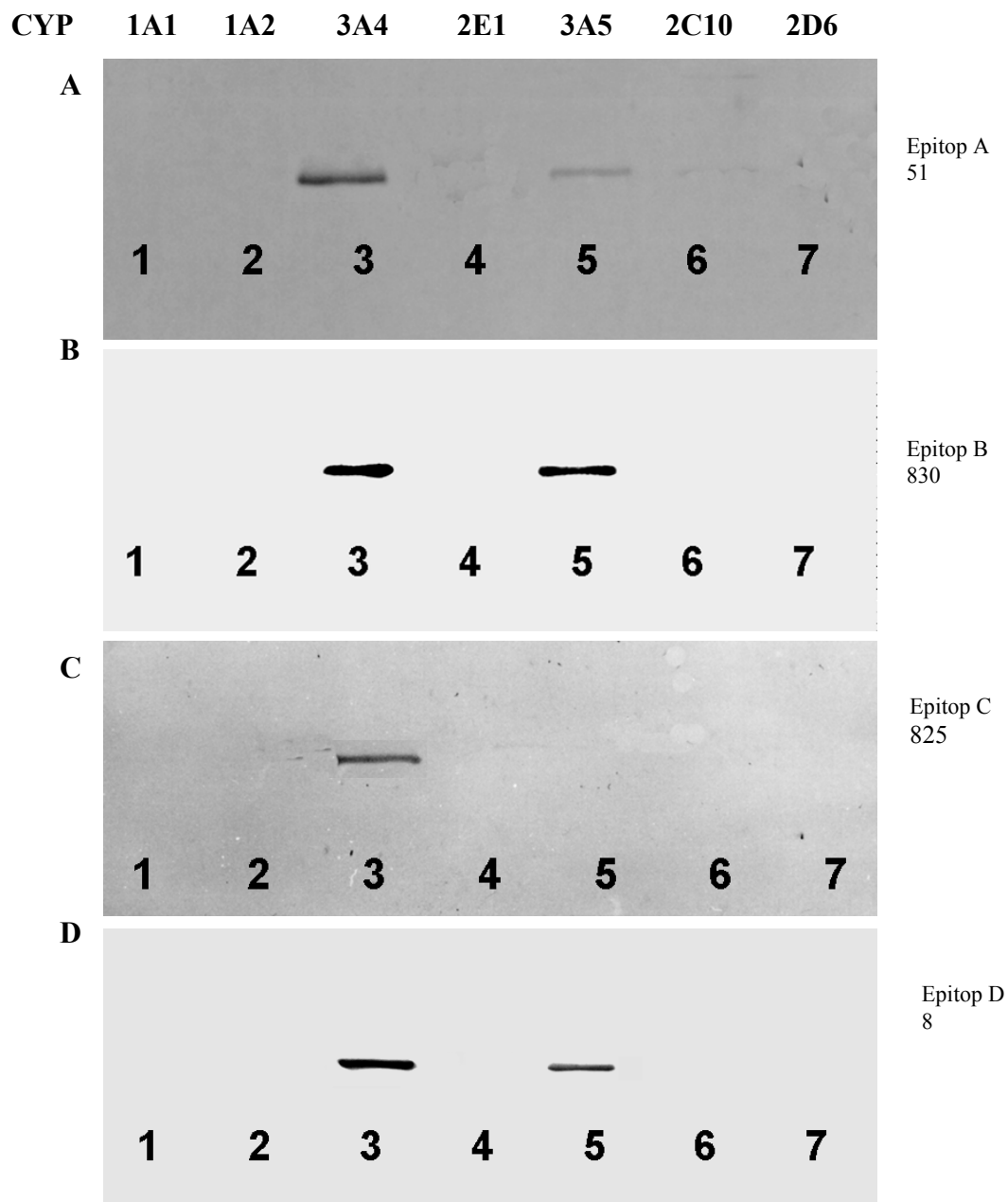


Abb. 13: Western Blots zur Spezifität der Anti-CYP3A4-Antikörper. Aufgereinigte humane CYP-Enzyme wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf PVDF-Membran mit Anti-CYP3A4 Antikörpern inkubiert. Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten 2.Ak und NBT/BCIP als Substrat. Spuren 1-7 je 0,1 µg CYP-Protein: CYP1A1 (1), CYP1A2 (2), CYP3A4 (3), CYP2E1 (4), CYP3A5 (5), CYP2C10 (6), CYP2D6 (7).

A: Anti-CYP3A4/51, Epitop A (DEEWKRYRALL, 123-133), Verdünnung 1 : 2000.

B: Anti-CYP3A4/830, Epitop B (QNSKETESHKA, 278-288), Verdünnung 1:2000.

C: Anti-CYP3A4/825, Epitop C (KLQEEIDAVLPNKA, 330-343), Verdünnung 1 : 2000.

D: Anti-CYP3A4/8, Epitop D (SKKNKDNIDPYI, 420-431), Verdünnung 1 : 2000.

3.6.2 CYP3A2

Die Sequenz von MAP 11, Epitopbereich A (DEEWKRYRALL, 123-133) entspricht der im CYP3A2 der Ratte vorhandenen Sequenz. Diese unterscheidet sich von der im CYP3A4 des Menschen vorhandenen Sequenz um zwei Aminosäuren. Anstatt Y129 und A131 im CYP3A2 findet sich L129 und S131 im CYP3A4. Da kein aufgereinigtes CYP3A2 aus der Ratte zur Verfügung stand, wurden Rattenlebermikrosomen Dexamethason-behandelter Tiere (spezifischer CYP3A-Induktor) und nicht behandelte Tiere, sowie aufgereinigte CYP zur Untersuchung der Spezifität eingesetzt. Der in Abbildung 14 A dargestellte Western Blot zeigt, dass die Antikörper des mit MAP 11 immunisierten Kaninchens 51 spezifisch mit CYP3A4 und CYP3A5 des Menschen reagieren. In Rattenlebermikrosomen der unbehandelten Tiere als auch der mit Dexamethason behandelten Tiere wird eine einzelne Proteinbande, die auf der gleichen Höhe wie CYP3A4 liegt, detektiert. Keine Kreuzreaktionen treten mit humanem CYP1A2, CYP2C10 oder CYP2E1 auf.

Die Spezifität der Antikörper des mit MAP 6, Epitopbereich C (KLQEEIDGALPSKA, 331-344 im CYP3A2) immunisierten Kaninchens 833 ist in Abbildung 14 B dargestellt. Wie aus der Abbildung 14 B zu entnehmen ist, wird in Rattenlebermikrosomen Dexamethason behandelte Tiere eine einzelne Proteinbande detektiert, die auf gleicher Höhe wie CYP3A4 liegt, welches ebenfalls detektieren läßt. Kreuzreaktionen mit humanem CYP1A2, CYP2C10, CYP2E1 oder CYP3A5 treten nicht auf. In Rattenlebermikrosomen unbehandelte Tiere tritt keine spezifische Bandenfärbung auf.

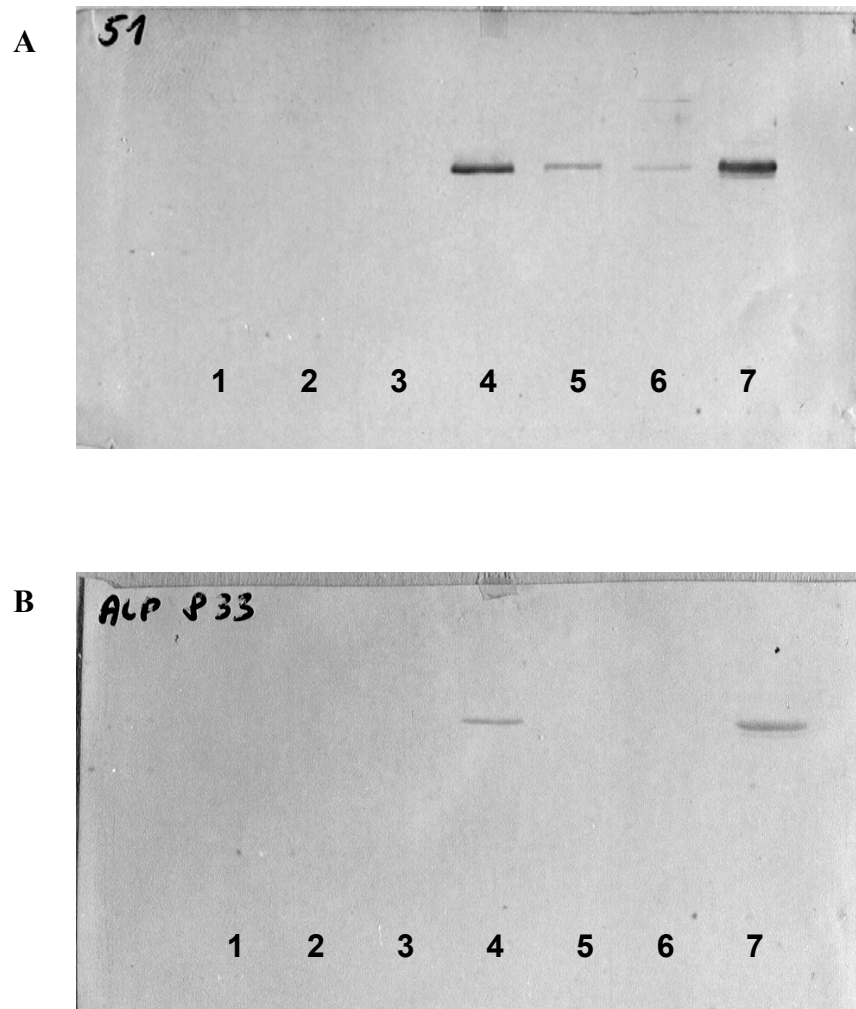


Abb. 14: Western Blots zur Spezifität des Anti-CYP3A2-Antikörper 51 (A) und 833 (B). Aufgereinigte humane CYP-Enzyme und Rattenlebermikrosomen un behandelter Tiere sowie mit Dexamethason behandelte Tiere wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf PVDF-Membran mit Anti-CYP3A2 Antikörpern inkubiert (Verdünnung: 1:2000). Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten 2.Ak und NBT/BCIP als Substrat.

Spur 6: 10 μ g Rattenlebermikrosomen (unbehandelte Tiere), Spur 7: 10 μ g Rattenlebermikrosomen (Dexamethason behandelte Tiere)

Spur 1: CYP1A2, Spur 2: CYP2C10, Spur 3: CYP2E1, Spur 4: CYP3A4, Spur 5: CYP3A5. Je 0,1 μ g Protein.

3.6.3 CYP1A2

Die Spezifität der Antikörper für CYP1A2 aus Mensch (Antiseren 89 und 97) und Ratte (Antiserum 104) wird mit aufgereinigten CYP-Proteinen im Western Blot untersucht. Da kein aufgereinigtes CYP1A2 aus der Ratte zur Verfügung stand, werden Rattenlebermikrosomen als Positivkontrolle eingesetzt. Aus der CYP1A Subfamilie wird nur CYP1A2, nicht aber CYP1A1, konstitutiv in der Leber exprimiert (Guengerich, 1995, Soucek, 1992).

Der in Abbildung 15 dargestellte Western Blot mit aufgereinigten CYP-Enzymen und Lebermikrosomen des Menschen und der Ratte zeigt, daß Anti-CYP1A2/89 ausschließlich mit CYP1A2 sowie einer auf gleicher Höhe liegenden, singulären Proteinbande in humanen Lebermikrosomen reagiert. Mit CYP1A1, 2C10, 2E1, 3A4 oder 2D6 bzw. Rattenlebermikrosomen treten keine Kreuzreaktionen auf. Mit gleich hoher Spezifität reagiert Anti-CYP1A2/97 im Western Blot (Abb. 21 B).

Der dargestellte Western Blot in Abbildung 16 zeigt, dass die Antikörper von Kaninchen 104, der gegen CYP1A2 der Ratte gerichtet war, nur ein einzelnes Protein in Rattenlebermikrosomen erkennt. Der Antikörper zeigt weder Kreuzreaktionen mit aufgereinigten humanen CYP-Enzymen noch mit humanen Lebermikrosomen.

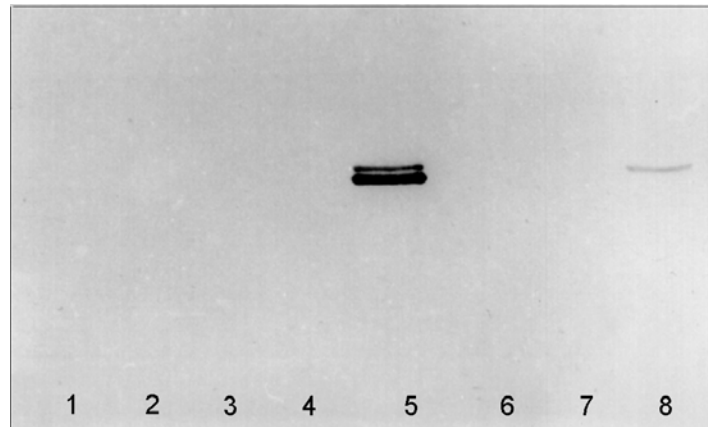


Abb. 15: Western Blot zur Spezifität des Anti-CYP1A2/89 Antikörpers. Aufgereinigte humane CYP-Enzyme und Mikrosomen aus menschlicher und Rattenleber wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf PVDF-Membran mit Anti-CYP1A2/89 Antikörper (Verdünnung: 1:2000) inkubiert. Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten 2. Ak und NBT/BCIP als Substrat.

Spur 1: 10 µg Rattenlebermikrosomen, Spur 8: 10 µg humane Lebermikrosomen

Spur 2: CYP2C10, Spur 3: CYP1A1, Spur 4: CYP2E1, Spur 5: CYP1A2, Spur 6: CYP3A4, Spur 7: CYP2D6. Je 0,1 µg Protein.

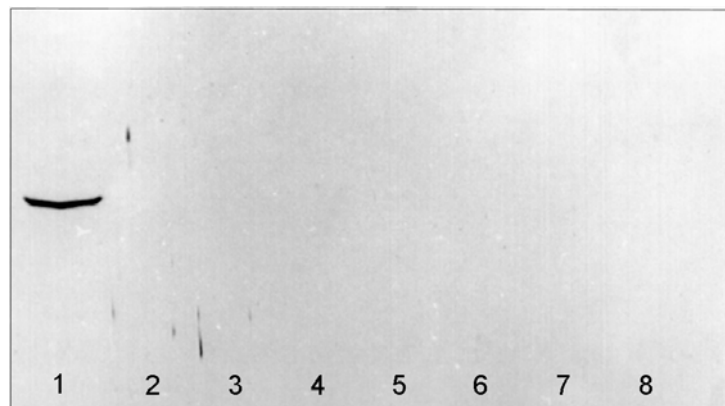


Abb. 16: Western Blot zur Spezifität des Anti-CYP1A2/104 Antikörpers (CYP1A2, Ratte). Aufgereinigte humane CYP-Enzyme und Mikrosomen aus menschlicher und Rattenleber wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf PVDF-Membran mit Anti-CYP1A2/104 Antikörper (Verdünnung: 1:2000) inkubiert. Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten 2. Ak und NBT/BCIP als Substrat.

Spur 1: 10 µg Rattenlebermikrosomen, Spur 8: 10 µg humane Lebermikrosomen

Spur 2: CYP2C10, Spur 3: CYP1A1, Spur 4: CYP2E1, Spur 5: CYP1A2, Spur 6: CYP3A4, Spur 7: CYP2D6. Je 0,1 µg Protein.

3.6.4 CYP2E1

Die Spezifität des Anti-Peptid-Antikörpers für CYP2E1/835 (Epitopbereich D, LNENKFKYSDYFK, 415-428) wird im Western Blot untersucht. Der Antikörper erkennt aufgereinigtes CYP2E1 aus Mensch und Ratte.

Der in Abbildung 17 dargestellte Western-Blot zeigt, dass der Antikörper spezifisch aufgereinigtes CYP2E1 aus Mensch und Ratte erkennt. Die Primärsequenzen beider CYP sind in diesem Bereich 100% identisch. Kreuzreaktionen mit aufgereinigtem CYP1A2, CYP2B1 (Ratte), CYP2C10, CYP2D6 bzw. CYP3A4 treten nicht auf.

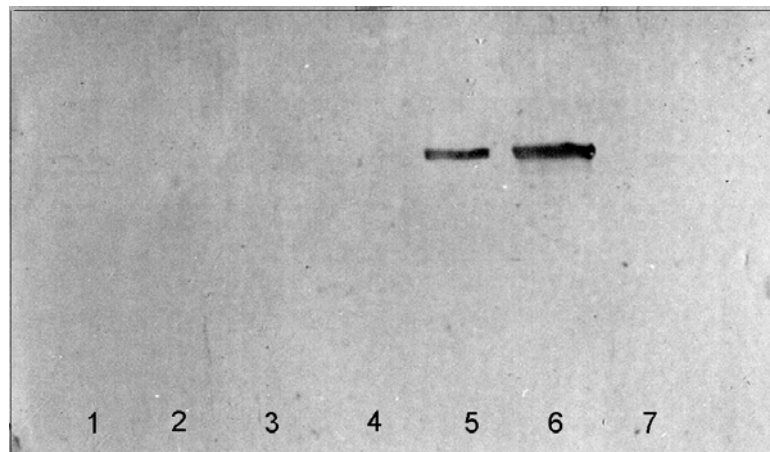


Abb. 17: Western Blot zur Spezifität des Anti-CYP2E1/835 Antikörpers. Aufgereinigte CYP-Enzyme (Mensch und Ratte) wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf PVDF-Membran mit Anti-CYP2E1/835 Antikörper (Verdünnung: 1:2000) inkubiert. Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten 2. Ak und NBT/BCIP als Substrat.

Spur 1: CYP1A2, Spur 2: CYP2B1 (Ratte), Spur 3: CYP2C10, Spur 4: CYP 2D6, Spur 5: CYP2E1, Spur 6: CYP2E1 (Ratte), Spur 7: CYP3A4. Je 0,1 µg Protein.

3.6.5 CYP2D6

Die Spezifität des Anti-Peptid-Antikörpers für CYP2D6/83 (Epitopbereich A, GVFLARYGPAW, 415-428) wird im Western Blot untersucht.

Der Western Blot wird mit aufgereinigten CYP durchgeführt (CYP1A1, CYP1A2, CYP2C8, CYP2C10, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 und CYP3A5). Wie aus der Abbildung 18 zu entnehmen ist, erkennt Anti-CYP2D6/83 aufgereinigtes CYP2D6 im Western Blot.

Kreuzreaktivitäten mit anderen CYP-Enzymen treten nach längerer Anfärbung der Blotmembranen in geringem Maße in Erscheinung.

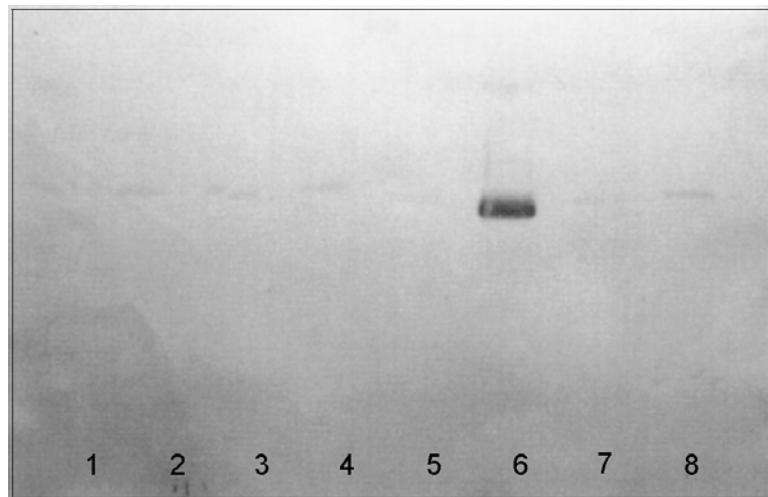


Abb.18: Western Blot zur Spezifität des Anti-CYP2D6/83 Antikörpers. Aufgereinigte humane CYP-Enzyme wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf PVDF-Membran mit Anti-CYP2D6/83 Antikörper (Verdünnung: 1:500) inkubiert. Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten 2. Ak und NBT/BCIP als Substrat.

Spur 1: CYP1A1, Spur 2: CYP2C8, Spur 3: CYP1A2, Spur 4: CYP 2C10, Spur 5: CYP3A4, Spur 6: CYP2D6, Spur 7: CYP3A5, Spur 8: CYP2E1. Je 0,1 µg Protein.

3.7 Detektion von CYP-Expressionsmustern mittels Western Blot

Die Ergebnisse zur Spezifität der Anti-Peptid-Antikörper unter 3.6 ergeben, dass Antikörper mit hoher Spezifität erzeugt wurden, mit deren Hilfe individuelle CYP-Enzyme im Immunoblot erkannt werden. Kreuzreaktionen mit anderen CYP-Enzymen treten dabei nicht auf. Die sich hieraus ergebende Anwendung mittels der Anti-Peptid-Antikörper ein "Expressionsmuster-Profilung" der einzelnen CYP-Enzyme durchzuführen, ist im Folgenden dargestellt.

3.7.1 CYP3A4

Die Expression von CYP3A4 kann mit Anti-CYP3A4/8 in humanen Leberproben (HL) von sechs Individuen im Western Blot nachgewiesen werden. Wie aus Abbildung 19 hervorgeht, weisen die einzelnen Proben individuelle Unterschiede in der Menge des exprimierten CYP3A4 auf. Am stärksten wird CYP3A4 in Leber 9 (HL 9) und Leber 2 (HL 2) exprimiert. Eine geringere Expression von CYP3A4 kann in Leber 1 (HL 1), Leber 6 (HL 6) und Leber 8 (HL 8) nachgewiesen werden.

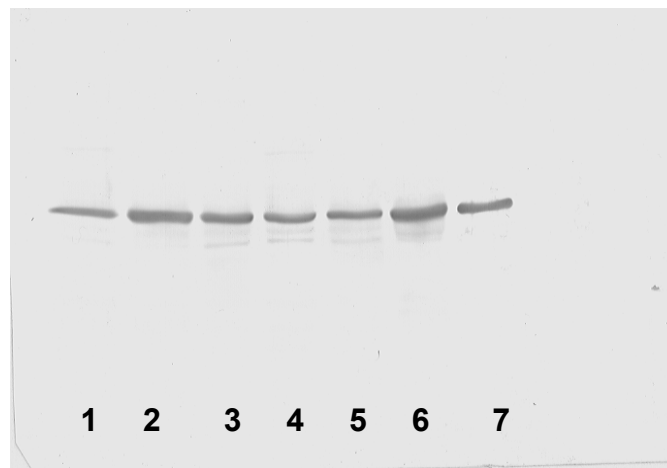


Abb. 19: Expression von CYP3A4 in der Leber des Menschen. Western Blot von Mikrosomen aus sechs humanen Leberproben (HL) zum Nachweis von CYP3A4 mit Anti-CYP3A4/8 (Verdünnung: 1:1000). Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten 2. Ak und NBT/BCIP als Substrat.

Spur 1: HL 1, Spur 2: HL 2, Spur 3: HL 4, Spur 4: HL 6, Spur 5: HL 8, Spur 6: HL 9. Je 10 µg Protein.
Spur 7: CYP3A4. 0,1 µg Protein.

3.7.2 CYP3A2

In der Rattenleber wird CYP3A2 konstitutiv exprimiert. CYP3A2 kann in der Rattenleber mit Anti-CYP3A2/51 nachgewiesen werden. Es werden Lebermikrosomen unbehandelter Tiere sowie Lebermikrosomen von mit unterschiedlichen Induktoren vorbehandelten Tieren untersucht. Wie aus der Abbildung 20 hervorgeht, kann mittels Anti-CYP3A2/51 gezeigt werden, dass Dexamethason- (CYP3A-Induktor) und Phenobarbital-(CYP2B- und CYP3A-Induktor) Vorbehandlung eine starke Induktion von CYP3A2 im Vergleich zu den Kontrolltieren in der Leber zur Folge hat. Vorbehandlung mit Methylcholanthren- (CYP1A2-Induktor) führt zu keiner Induktion von CYP3A2.

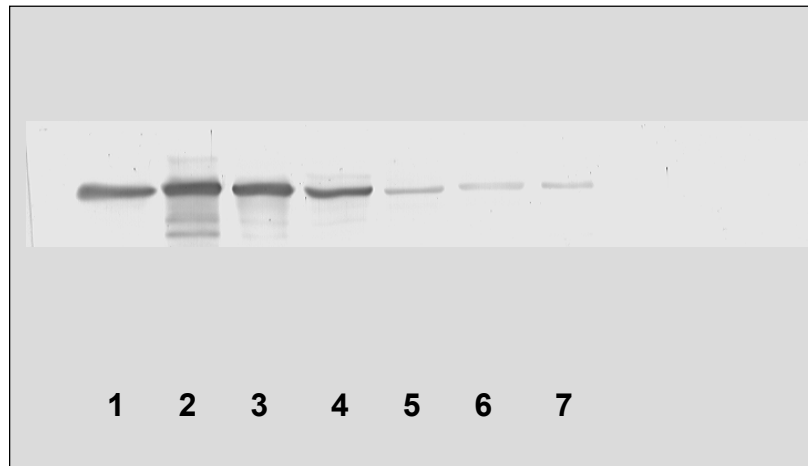


Abb. 20: Expression von CYP3A2 in der Leber unbehandelter und induzierter Ratten. Western Blot von Mikrosomen aus Leber zum Nachweis von CYP3A2 mit Anti-CYP3A2/51 (Verdünnung: 1:2000). Kontrollratten (KN), Induktoren: Dexamethason (DX), Phenobarbital (PB), Methylcholanthren (MC). Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten 2. Ak und NBT/BCIP als Substrat.

Spur 1: KN, Spur 2: DX, Spur 3: PB, Spur 4: MC, Spur 5: humane Leber (HL 9), Spur 6: humane Leber (HL 2). Je 10 µg Protein.

Spur 7: CYP3A4. 0,1 µg Protein.

3.7.3 CYP1A2

CYP1A2 wird in der menschlichen Leber konstitutiv exprimiert. Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese Induktor-unabhängige CYP1A2 Expression von leberspezifischen Transkriptionsfaktoren reguliert wird (Gonzalez, 1996). Darüber hinaus ist eine Induktion von CYP1A2 z.B. durch polycyclische, aromatische Kohlenwasserstoffe oder Medikamente wie Omeprazol (Diaz, 1990) beschrieben.

Die Expression von CYP1A2 wird in sechs humanen Leberproben (HL) mit Anti-CYP1A2/89 und Anti-CYP1A2/97 untersucht. Der in Abbildung 21 dargestellte Western Blot zeigt, daß von beiden Antikörpern dieselben signifikanten individuellen Unterschiede in der Menge des exprimierten CYP1A2 detektiert werden. Am stärksten wird CYP1A2 in Leber 2 (HL 2) exprimiert, wohingegen Leber 4 (HL 4) und Leber 6 (HL 6) nur geringe Expression von CYP1A2 zeigen.

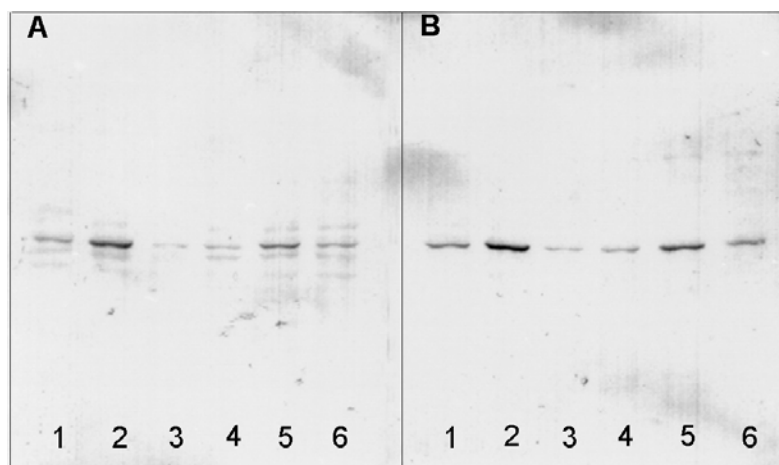


Abb. 21: Expression von CYP1A2 in der Leber des Menschen. Western Blot von Mikrosomen aus sechs humanen Leberproben (HL) zum Nachweis von CYP1A2 mit Anti-CYP1A2/89 (Verdünnung: 1:1000) (A) und Anti-CYP1A2/97 (Verdünnung: 1:1000) (B). Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten 2. Ak und NBT/BCIP als Substrat.

Spur 1: HL 1, Spur 2: HL 2, Spur 3: HL 4, Spur 4: HL 6, Spur 5: HL 8, Spur 6: HL 9. Je 10 µg Protein.

In der Rattenleber wird CYP1A2 ebenfalls konstitutiv exprimiert. Es werden Lebermikrosomen unbehandelter Tiere sowie Lebermikrosomen von mit unterschiedlichen Induktoren vorbehandelter Tiere untersucht. Wie aus der Abbildung 22 hervorgeht, kann mittels Anti-CYP1A2/104 gezeigt werden, dass Methylcholanthren-Vorbehandlung (CYP1A2-Induktor) eine starke Induktion von CYP1A2 im Vergleich zu den Kontrolltieren in der Leber zur Folge hat. Wohingegen Dexamethason- (CYP3A-Induktor) bzw. Phenobarbital-(CYP2B- und CYP3A-Induktor) Vorbehandlung eher zu einer Verminderung der CYP1A2 Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren führt. Anti-CYP1A2/104 zeigt keine Reaktion mit aufgereinigtem humanem CYP1A2 bzw. CYP3A4 sowie humanen Lebermikrosomen (HL 8).

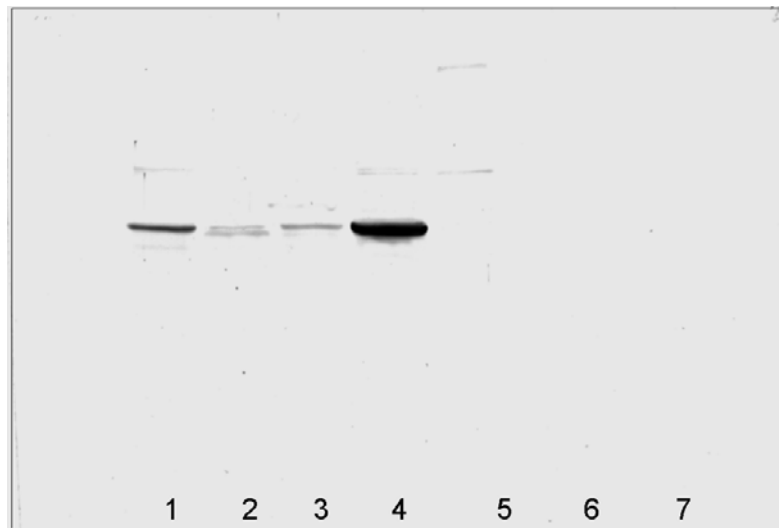


Abb. 22: Expression von CYP1A2 in der Leber unbehandelter und induzierter Ratten. Western Blot von Mikrosomen aus Leber zum Nachweis von CYP1A2 mit Anti-CYP1A2/104 (Verdünnung: 1:2000). Kontrollratten (KN), Induktoren: Dexamethason (DX), Phenobarbital (PB), Methylcholanthren (MC). Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten 2. Ak und NBT/BCIP als Substrat.

Spur 1: KN, Spur 2: DX, Spur 3: PB, Spur 4: MC, Spur 5: humane Leber (HL 8). Je 10 µg Protein.

Spur 6: CYP1A2, Spur 7: CYP3A4. Je 0,1 µg Protein.

3.7.4 CYP2E1

Die Expression von CYP2E1 kann mit Anti-CYP2E1/835 in humanen Leberproben (HL) von sechs Individuen im Western Blot nachgewiesen werden. Wie aus Abbildung 23 hervorgeht, weisen die einzelnen Proben individuelle Unterschiede in der Menge des exprimierten CYP2E1 auf. Am stärksten wird CYP2E1 in Leber 9 (HL 9) exprimiert. Die Bindung des Antikörpers ist auch in Mikrosomen sehr spezifisch für CYP2E1, da keine Kreuzreaktionen mit anderen mikrosomalen Proteinen auftreten.

In Enterozytenmikrosomen aus humanem Darm und in humanen Nierenmikrosomen kann hingegen keine Expression von CYP2E1 mit Anti-CYP2E1/835 nachgewiesen werden.

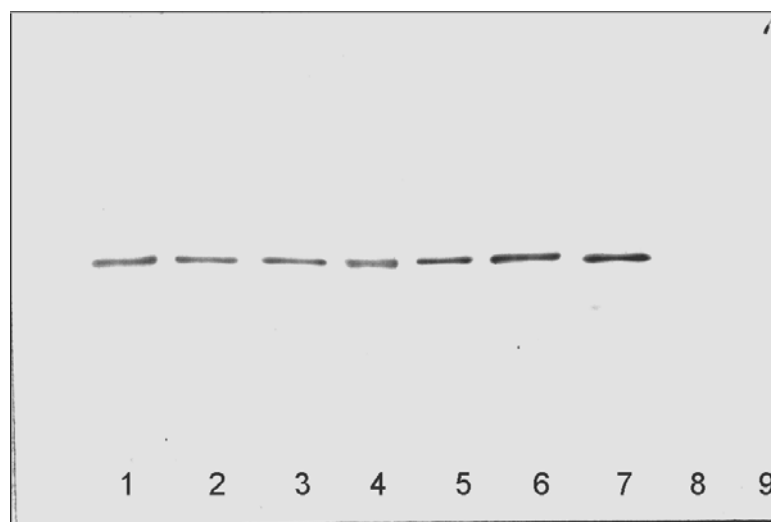


Abb. 23: Expression von CYP2E1 in Leber, Darm und Niere des Menschen. Western Blot von Mikrosomen aus sechs humanen Leberproben (HL) zum Nachweis von CYP2E1 mit Anti-CYP2E1/835 (Verdünnung: 1:2000. Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten 2. Ak und NBT/BCIP als Substrat.

Spur 1: HL 1, Spur 2: HL 2, Spur 3: HL 4, Spur 4: HL 6, Spur 5: HL8, Spur 6: HL 9. Je 10 µg Protein. Spur 7: CYP2E1. 0,1 µg Protein. Spur 8: Nierenmikrosomen. 35 µg Protein. Spur 9: Enterozytenmikrosomen. 23 µg Protein.

CYP2E1 kann in der Rattenleber mit Anti-CYP2E1/835 nachgewiesen werden. Dabei kann gezeigt werden, daß die Expression von CYP2E1 in der Rattenleber durch Vorbehandlung der Ratten mit spezifischen Induktoren reprimiert wird. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollratten zeigen Ratten, die mit Methylcholanthren (Induktor für CYP1A), Phenobarbital (Induktor für CYP2B und CYP3A) oder Dexamethason (Induktor für CYP3A) behandelt wurden eine deutliche geringere Expression von CYP2E1 (Abbildung 24). Im Gegensatz zur humanen Niere, die kein CYP2E1 exprimiert (Abbildung 23), werden in der Rattenniere geringe Mengen an CYP2E1 mit Anti-CYP2E1/835 detektiert.

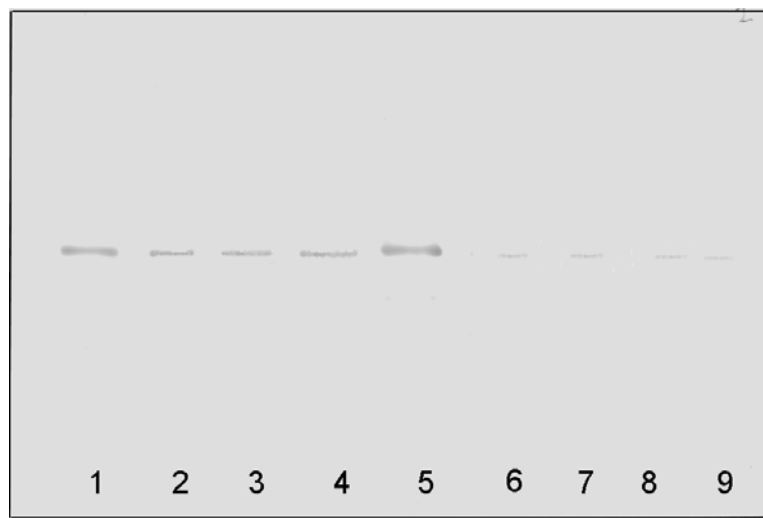


Abb. 24: Expression von CYP2E1 in Leber und Niere unbehandelter und induzierter Ratten. Western Blot von Mikrosomen aus Leber und Niere zum Nachweis von CYP2E1 mit Anti-CYP2E2/835 (Verdünnung: 1:2000). Kontrollratten (KN), Induktoren: Dexamethason (DX), Phenobarbital (PB), Methylcholanthren (MC). Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten 2. Ak und NBT/BCIP als Substrat.

Spur 1-4: Lebermikrosomen. Spur 1: KN: 1, Spur 2: DX: 2, Spur 3: PB: 3, Spur 4: MC. Je 10 µg Protein.

Spur 5: CYP2E1. 0,1 µg Protein.

Spur 6-9: Nieremikrosomen. Spur 6: KN, Spur 7: DX, Spur 8: PB, Spur 9: MC. Je 10 µg Protein.

3.7.5 CYP2D6

Die Expression von CYP2D6 kann mit Anti-CYP2D6/83 in humanen Leberproben (HL) von sechs Individuen im Western Blot nachgewiesen werden. Wie aus Abbildung 25 A hervorgeht, weisen die einzelnen Proben individuelle Unterschiede in der Menge des exprimierten CYP2D6 auf. Am stärksten wird CYP2D6 in Leber 2 (HL 2) und Leber 8 (HL 8) exprimiert. Leber 9 (HL 9) hingegen zeigt keine Expression von CYP2D6. Das mit Anti-CYP2D6/83 dargestellte CYP2D6-Expressionsmuster wird durch einen humanen Autoantikörper gegen CYP2D6 (LKM 1, Abteilung Prof. Manns, MHH) bestätigt (Abbildung 25 B).

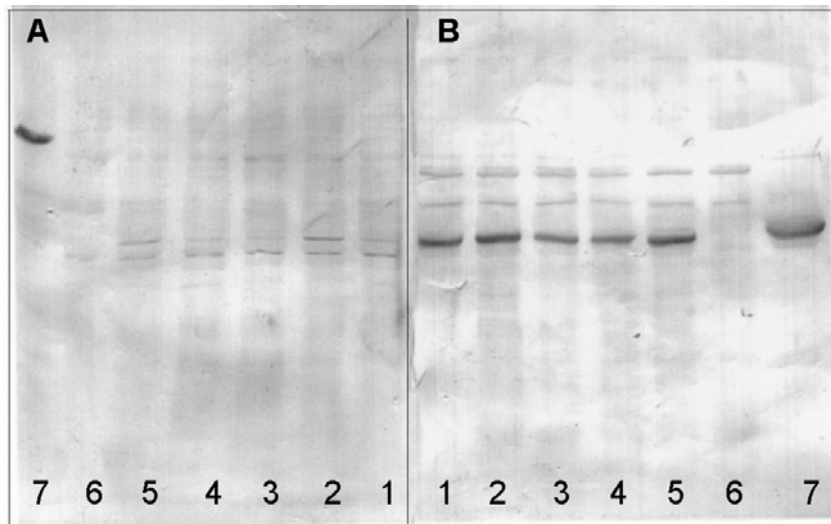


Abb. 25: Expression von CYP2D6 in der Leber des Menschen. Western Blot von Mikrosomen aus sechs humanen Leberproben (HL) zum Nachweis von CYP2D6 mit Anti-CYP2D6/83 (Verdünnung: 1:500) (A) und einem humanen Autoantikörper (LKM 1) gegen CYP2D6 (Verdünnung: 1:2000) (B). Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten 2. Ak und NBT/BCIP als Substrat.

Spur 1: HL 1, Spur 2: HL 2, Spur 3: HL 4, Spur 4: HL 6, Spur 5: HL8, Spur 6: HL 9. Spur 7: Lebermikrosomen von Phenobarbital-induzierten Ratten. Je 10 µg Protein.

3.8 Semiquantitative Bestimmung von CYP3A4 im Western Blot und ELISA

Die Expression von CYP3A4 kann mit Anti-CYP3A4/8 in humanen Leberproben (HL) von sechs Individuen im Western Blot und ELISA semiquantitativ nachgewiesen werden. Wie aus Abbildung 26 hervorgeht, weisen die einzelnen Proben sowohl im Western Blot als auch im ELISA die gleichen individuellen Unterschiede in der Menge des exprimierten CYP3A4 auf. Am stärksten wird CYP3A4 in Leber 9 (HL 9) und Leber 2 (HL 2) exprimiert. Eine geringere Expression von CYP3A4 kann in Leber 1 (HL 1), Leber 6 (HL 6) und Leber 8 (HL 8) nachgewiesen werden.

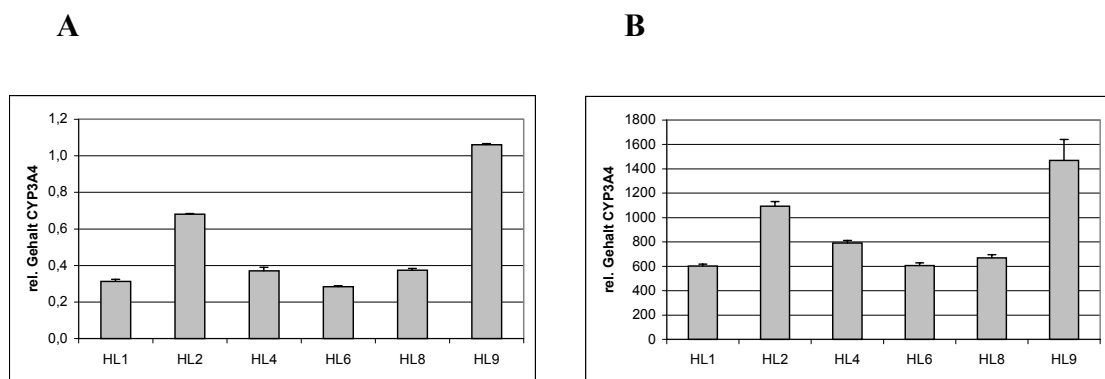


Abb. 26: Relativer Gehalt von CYP3A4 in der Leber des Menschen. ELISA-Bestimmung (n = 3) (A) und densitometrische Auswertung nach Western Blot (n = 3) (B) von sechs humanen Leberproben (HL1, HL2, HL4, HL6, HL8 und HL9).

3.9 Kreuzreaktivität der Anti-Peptid-Antikörper mit CYP-Enzymen vom Schwein

CYP-Enzyme des Schweins sind bisher wenig charakterisiert. Es liegen kaum Daten zu den Primärsequenzen der CYP-Enzyme vor (Nelson, 1996). Enzymaktivitätsmessungen für CYP3A- und CYP2E1-Substrate mit Schweinelebermikrosomen zeigen, dass homologe Enzyme in der Schweineleber vorhanden sind. Mit Hilfe der Anti-Peptid-Antikörper kann gezeigt werden, dass die in der Schweineleber vorkommenden CYP3A und CYP2E1-Enzyme von einigen Antikörpern erkannt werden.

Die in Abbildung 27 A und B dargestellten Western Blots zeigen, dass von den Anti-CYP3A-Antikörpern die Antiseren 51 (Abb. 27 A) und 825 (Abb. 27 B) mit einem immunologisch ähnlichen Protein in Schweinelebermikrosomen reagieren, das auf derselben Höhe wie CYP3A4 liegt. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die von den Antikörpern erkannten Epitope (DEEWKRYRALL - Anti-CYP3A2/51, KLQEEIDAVLPNKA - Anti-CYP3A4/825) im CYP3A des Schweins eine ähnliche Primärstruktur aufweisen. Ausschließlich Anti-CYP3A4/825 kreuzreagiert mit CYP3A6 des Kaninchens (Abb. 27 B)

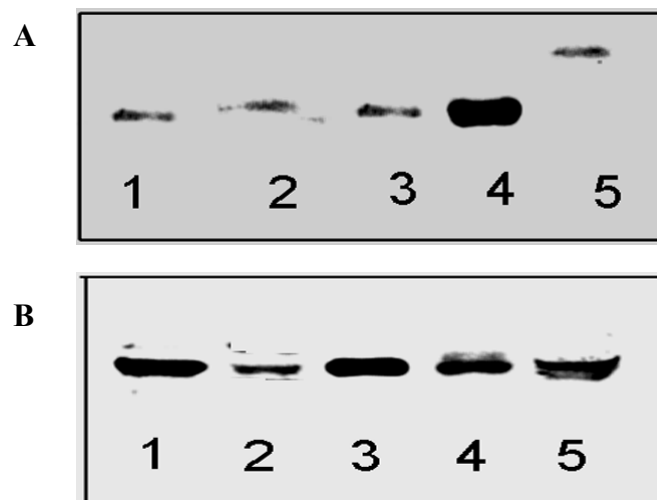


Abb. 27: Detektion von CYP3A homologen Proteinen in der Schweineleber. Western Blot von Lebermikrosomen aus Mensch (HM), Schwein (SM), Ratte (RM) und Kaninchen (KM) mit Anti-CYP3A2/51 (A) und Anti-CYP3A4/825 (B), Verdünnung: 1:1000. Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten 2.Ak und NBT/BCIP als Substrat.

Spur 1: HM, Spur 2: SM, Spur 4: RM, Spur 5: KM. Je 10 µg Protein

Spur 3: CYP3A4. 0,1 µg Protein.

Der in Abbildung 28 dargestellte Western Blot zeigt, dass mit Anti-CYP2E1/825 in Schweinelebermikrosomen eine Proteinbande, die auf gleicher Höhe wie CYP2E1 liegt, detektiert wird. Das erkannte Epitop (LNENGKFKYSDYFK) kommt sowohl im CYP2E1 des Menschen als auch der Ratte vor. Im CYP2E1 des Kaninchens liegt an Position 418 E (LNEEGKFKYSDYFK) anstatt N. Die Primärsequenz beim Schwein ist nicht bekannt. Aufgrund der Kreuzreaktion des Antikörpers ist allerdings zu vermuten, daß diese im CYP2E1 des Schweins sehr ähnlich ist (Abbildung 28).

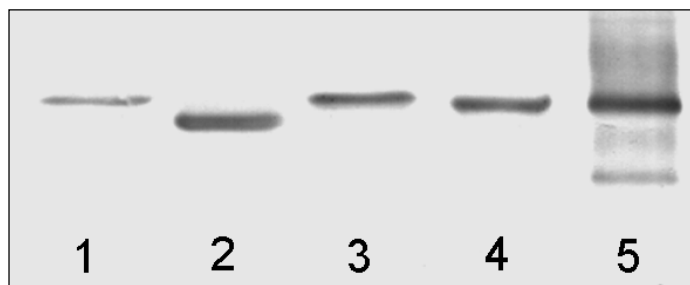


Abb. 28: Detektion von CYP2E1 homologen Proteinen in der Schweinenleber. Western Blot von Lebermikrosomen aus Mensch (HM), Schwein (SM), Ratte (RM) und Kaninchen (KM) mit Anti-CYP2E1, Verdünnung: 1:1000. Der Nachweis erfolgte über einen AP-konjugierten 2.Ak und NBT/BCIP als Substrat.

Spur 1: SM, Spur 2: KM, Spur 3: HM, Spur 4: RM. Je 10 µg Protein

Spur 3: CYP2E1. 0,1 µg Protein.

3.10 Immunhistochemischer Nachweis von CYP Enzymen

3.10.1 Lokalisation von CYP3A4 in der humanen Leber

In der menschlichen Leber ist der Anteil des exprimierten CYP3A4 im Vergleich zum Gesamt-Cytochrom P450 Gehalt am größten. Die gegen unterschiedliche Epitope des CYP3A4 erzeugten Anti-Peptid-Antikörper wurden auf deren Eignung zum immunhistochemischen Nachweis von CYP3A4 in der Leber untersucht und miteinander verglichen. Kryoschnitte humaner Leberproben wurden mit Anti-CYP3A4- Antikörpern (8, 51, 825, 830) inkubiert. Die Antikörper erzeugten in der Leber vergleichbare spezifische zonale Färbemuster (Abbildung 29 A-D). Die Anfärbung im perivenösen Bereich (zentrilobulär) zeigte, dass CYP3A4 hauptsächlich in diesem Bereich lokalisiert ist.

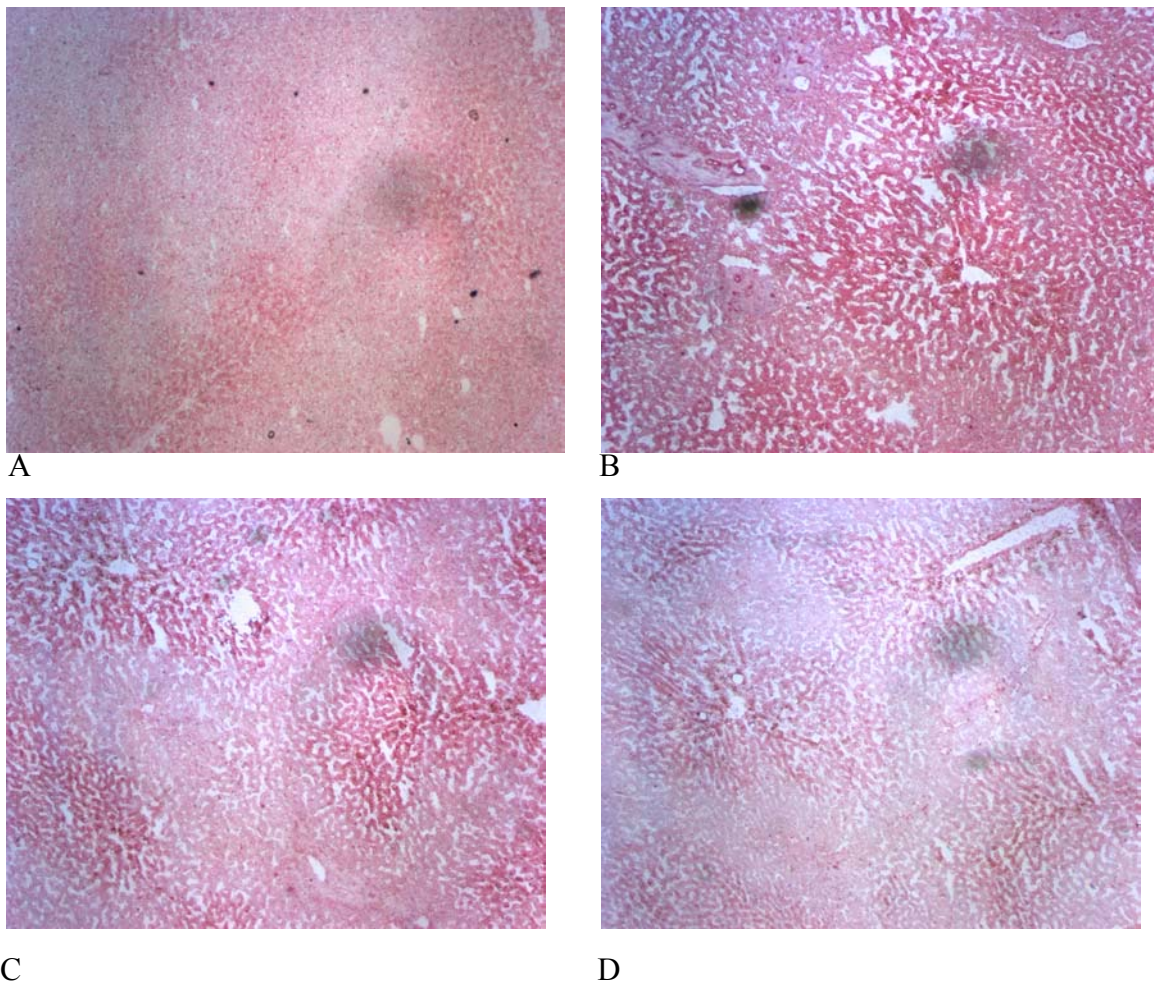


Abb. 29: Immunhistochemischer Nachweis von CYP3A4 in der Leber des Menschen mit Anti-CYP3A4 Antikörpern gegen vier unterschiedliche Epitope. A: Antiserum 8 (1:200), B: Antiserum 51 (1:200), C: Antiserum 825 (1:200), D: Antiserum 830 (1:400). Gefrierschnitt. AP-Färbung. Vergrößerung: 50x

3.10.2 Lokalisation von CYP3A4 im humanen Darm

CYP3A4 wurde im oberen menschlichen Dünndarm vor allem in den Spitzen der Mikrovilli nachgewiesen. In den Krypten und tiefer gelegenen Schichten der Lamina mucosa wurde kein CYP3A4 detektiert (Abbildung 30).

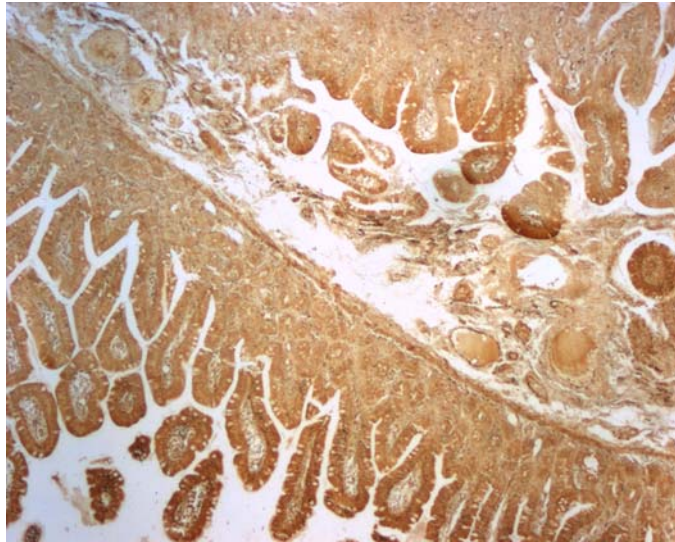
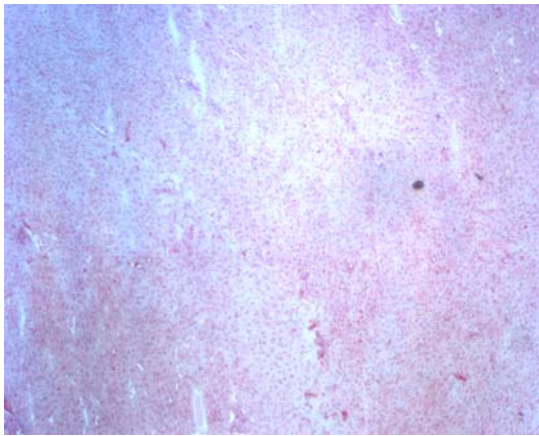


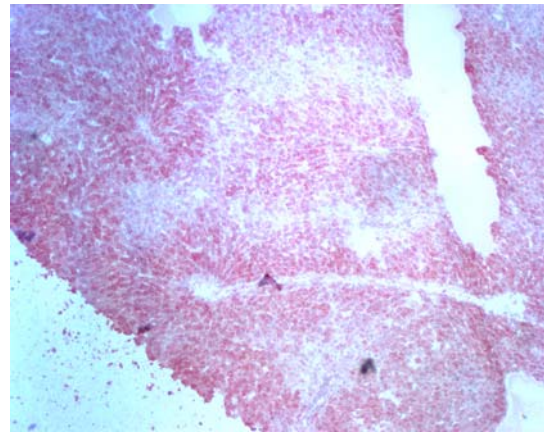
Abb. 30: Immunhistochemischer Nachweis von CYP3A4 im oberen Dünndarm des Menschen mit Anti-CYP3A4 Antiserum 8, Verdünnung 1 : 200. Paraffinschnitt. Peroxidase-Färbung. Vergrößerung: 50x.

3.10.3 Lokalisation von CYP3A2 in der Rattenleber

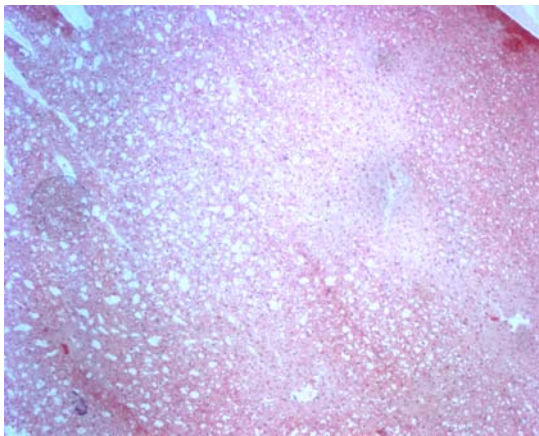
Der gegen CYP3A2 gerichtete Anti-Peptid-Antikörper 51 wurde zum immunhistochemischen Nachweis von CYP3A2 in der Rattenleber untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass CYP3A2 in den Hepatozyten des peivenösen Bereichs (zentrilobulär) lokalisiert ist (Abbildung 31 B). Das entsprechende Nullserum zeigte keine spezifische Anfärbung im Schnitt (Abbildung 31 A). In Dexamethason (CYP3A Induktor) vorbehandelten Ratten wurde CYP3A2 in der Leber stark induziert und im gesamten Leberparenchym lokalisiert (Abbildung 31 D). Die Kontrolle mit Nullserum zeigte keine spezifische Anfärbung (Abbildung 31 C).



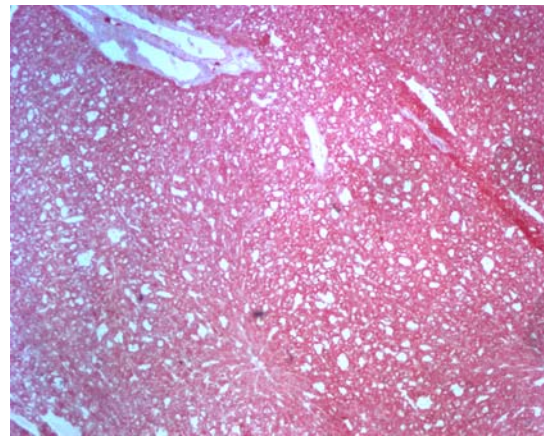
A



B



C



D

Abb. 31: Immunhistochemischer Nachweis von CYP3A2 in der Rattenleber mit Anti-CYP3A2 Antiserum 51 bzw. Nullserum. Verdünnungen: 1:50. Gefrierschnitt. AP-Färbung. Nachweis von CYP3A2 von unbehandelten Ratten (B) und von Dexamethason vorbehandelten Ratten (D). Nullserum Kontrollen bei unbehandelten (A) und behandelten (C) Ratten. Vergrößerung: 50x.

3.11 Quantifizierung von Cytochrom P450 in Mikrosomen

Die Quantifizierung des Cytochrom P450 Gehalts in Lebermikrosomen des Menschen und der Ratte wurde nach 2.2.10.1 durchgeführt. In Tabelle 5 sind die Gehalte an Cytochrom P450 dargestellt. Der CYP Gehalt in den verschiedenen humanen Mikrosomen lag zwischen 0,25 nmol P450/ mg Protein für die Leberprobe 4 (HL 4) und 0,96 nmol P450/ mg Protein für die Leberprobe 9 (HL9).

Der Gesamt-Cytochrom P450-Gehalt in der Rattenleber war abhängig von der jeweiligen Vorbehandlung der Ratten mit Induktoren (siehe 2.2.6). Der CYP Gehalt von Kontrollratten lag bei 0,3 nmol P450/ mg Protein. Der CYP Gehalt von Dexamethason-induzierten Tieren lag bei 1,35 nmol P450/ mg Protein, von Phenobarbital-induzierten Tieren bei 3,38 nmol P450/ mg Protein und von Methylcholanthren-induzierten Ratten bei 1,24 nmol P450/ mg Protein.

	nmol P450/ mg Protein
HL 1	0,4
HL 2	0,9
HL 4	0,25
HL 6	0,3
HL 8	0,65
HL 9	0,96
RL Kontrolle	0,3
RL Dexamethason	1,35
RL Phenobarbital	3,38
RL Methylcholanthren	1,24

Tab. 5: Der Cytochrom P450 Gehalt in humanen Lebermikrosomen und Rattenlebermikrosomen.

3.12 Quantifizierung von CYP1A1, 1A2, 2C10, 2E1, und 3A4 in E.coli

Die Quantifizierung der heterolog exprimierten CYP-Enzyme wurde nach 2.2.10.2. durchgeführt. Für die Bestimmungen wurden Membranfraktionen der Bakterien isoliert (siehe 2.2.5.2) In Tabelle 6 sind die Gehalte an CYP1A1, CYP1A2, CYP2C10, CYP2E1 und CYP3A4 dargestellt. Abbildung 32 zeigt das Absorptionsspektrum von exprimiertem CYP3A4.

	nmol CYP/mg Protein	nmol CYP/ml	nmol CYP/l Kultur
CYP1A1	0,036	0,38	1,9
CYP1A2	0,82	14,51	72,5
CYP2C10	0,034	0,51	2,5
CYP2E1	0,082	1,23	6,1
CYP3A4	0,33	5,48	27,4

Tab. 6: Der Cytochrom P450 Gehalt heterolog exprimierter CYP-Enzyme in E.coli.

Der P450-Gehalt der exprimierten CYP-Enzyme in den verschiedenen Membranpräparationen lag zwischen 34 pmol CYP2C10/mg Protein und 820 pmol CYP1A2/mg Protein. Die einzelnen CYP-Enzyme wurden damit in einer Größenordnung exprimiert, die für die Untersuchung der Anti-Peptid-Antikörper ausreichend war.

Die Abbildung 32 zeigt, dass das exprimierte CYP3A4 ein für Cytochrom P450 charakteristisches Absorptionsmaximum bei 450 nm besitzt.

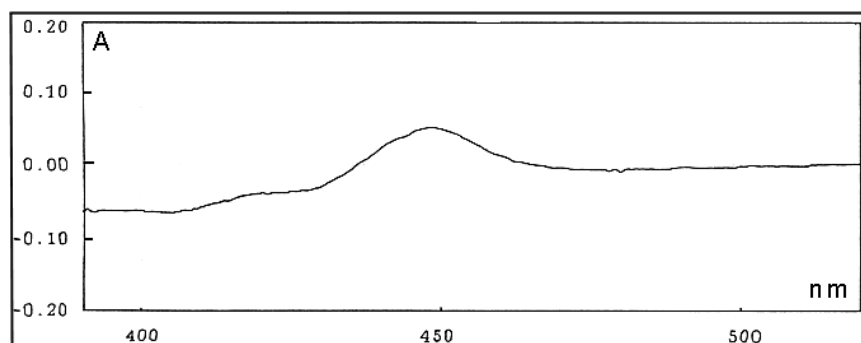


Abb. 32: Spektrum des CO-Komplexes des CYP3A4 in E.coli-Membranen zur Bestimmung des CYP3A4 Gehalts. Die Membranpräparation wurde 1:10 in Spektralpuffer verdünnt. Der Proteingehalt betrug 1,6 mg/ml. Der CYP3A4 Gehalt betrug 0,33 nmol/mg Protein.

3.13 Cytochrom P450-Enzymaktivitäten

Bedeutsam für das Ausmaß einer Beteiligung spezifischer CYP Enzyme an Stoffwechselfvorgängen ist ihre enzymatische Aktivität. Humane Leberproben wurden anhand ihrer CYP Aktivitäten untersucht. In Tabelle 7 sind die Enzymaktivitäten von sechs verschiedenen humanen Leberproben dargestellt. Angegeben sind die Enzymaktivitäten der Nifedipin-Oxidase, der Phenacetin-O-Deethylase, der Chlorzoxazon-6-Hydroxylase und der Bufuralol-1'-Hydroxylase. Die enzymatischen Aktivitäten (nmol Produkt/ min/ mg mikrosomales Protein) lagen für die Nifedipin-Oxidase zwischen 0,361 (HL 4) und 1,438 (HL9), der Chlorzoxazon-6-Hydroxylase zwischen 0,994 (HL 6) und 2,765 (HL 1), der Phenacetin-O-Deethylase zwischen 0,519 (HL8) und 1,43 (HL 1) so wie der Bufuralol-1'-Hydroxylase zwischen 0,67 (HL 6) und 0,244 (HL1).

CYP Enzymaktivitäten (nmol/ min/ mg mikrosomales Protein)

	Nifedipin-Oxidase	Chlorzoxazon-6-Hydroxylase	Phenacetin-O-Deethylase	Bufuralol-1'-Hydroxylase
HL 1	0,479	2,765	1,43	0,244
HL 2	1,112	1,487	1,098	0,126
HL 4	0,361	1,067	0,667	0,079
HL 6	0,573	0,994	0,813	0,067
HL 8	0,638	1,325	0,519	0,095
HL 9	1,438	1,725	1,044	0,082

Tab. 7: CYP Enzymaktivitäten sechs humaner Leberproben (HL). Die Umsatzraten sind Durchschnittswerte aus drei Messungen.

3.14 Induktion des Ciclosporin Metabolismus

Die Metabolisierungsraten von Ciclosporin mit Lebermikrosomen von Ratten, die mit Induktoren verschiedener CYP Enzyme vorbehandelt wurden, sollen Aufschluß über die Beteiligung der induzierten CYP Enzyme bei der Bildung der Metaboliten liefern. Ciclosporin wird hauptsächlich über CYP3A verstoffwechselt. Durch Vorbehandlung mit Dexamethason, einem spezifischen CYP3A-Induktor, zeigen die Rattenlebermikrosomen im Vergleich zu Lebermikrosomen aus nicht vorbehandelten Ratten eine verstärkte Bildung des Hauptmetaboliten AM1 inklusive einer verstärkten Bildung weiterer Metabolite (Abbildung 33). Die Induktion mit 3-Methylcholanthren (CYP1A Induktor) hat keinen Einfluß auf die Metabolisierungsrate von Ciclosporin. Vorbehandlung mit Phenobarbital (CYP 2B, CYP2C und CYP3A Induktor) führt ebenfalls zu einer verstärkten Bildung des Hauptmetaboliten AM 1, ohne jedoch zu einer verstärkten Bildung anderer Metabolite zu führen. Die AM 1-Bildungsrate liegt bei Dexamethason-induzierten Ratten um den Faktor 12,6 höher und bei Phenobarbital-induzierten Ratten um den Faktor 6,7 höher als bei nicht induzierten Ratten.

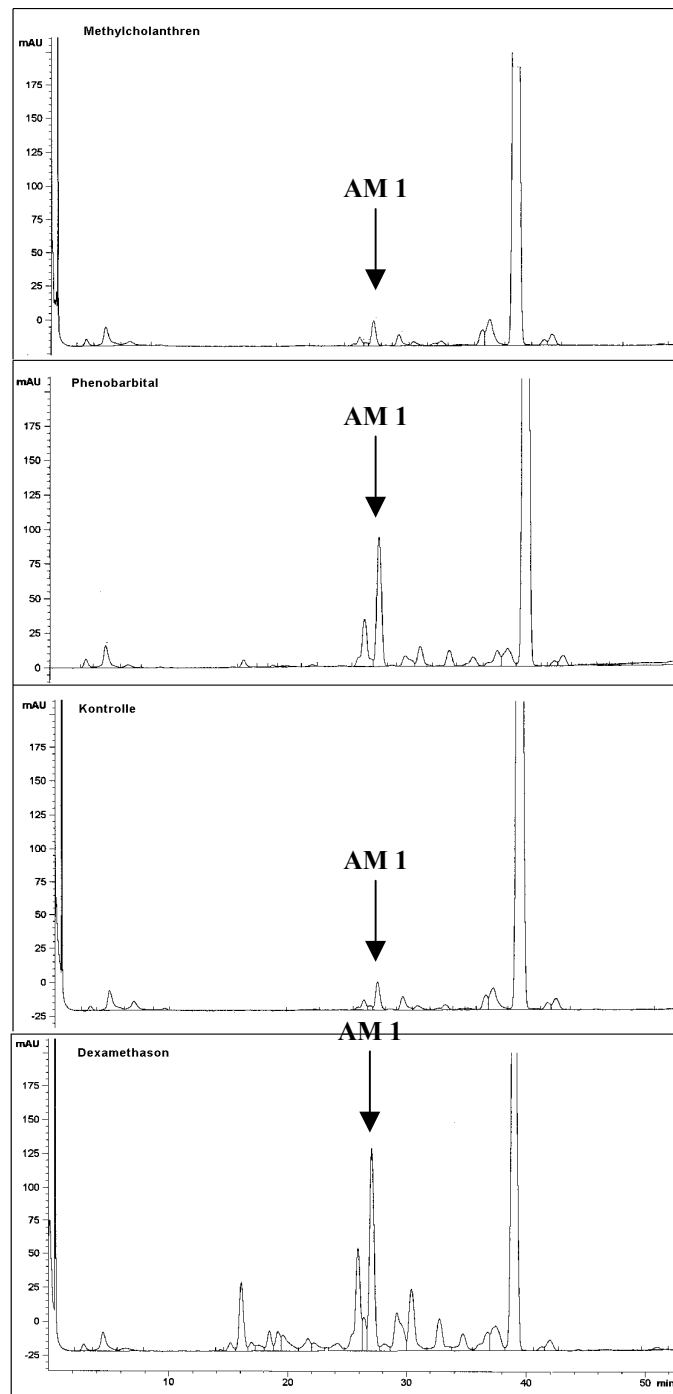


Abb. 33: Chromatogramme der Metabolisierung von Cyclosporin durch Lebermikrosomen unterschiedlich vorbehandelter Ratten. In der Abbildung sind jeweils repräsentative Chromatogramme typischer Inkubationen ($n = 4$) von $10 \mu\text{mol/l}$ Cyclosporin mit $1,0 \text{ mg}$ Rattenmikrosomen gezeigt. Die Pfeile zeigen den Hauptmetaboliten AM 1 von Cyclosporin.

3.15 Immunitationsversuche

Die Frage, ob CYP3A4-Antikörper (8, 51, 825, und 830) bzw. CYP3A2-Antikörper (51 und 833) CYP3A-Enzymaktivitäten zu hemmen vermochten, wird sowohl durch eine Immunitation der Nifedipin-Oxidase als auch an der Metabolisierung von Ciclosporin mit Lebermikrosomen des Menschen und der Ratte untersucht. Hierbei zeigt sich, dass sowohl die Antikörper gegen CYP3A4 (8, 51, 825, und 830) als auch diejenigen gegen CYP3A2 (51 und 833) die enzymatische Aktivität der Nifedipin-Oxidase (CYP3A) und die Metabolisierung des Ciclosporins nicht hemmen können.

Nach Vorinkubation von 15 mg Gesamt-IgG-Mix (51/833)/nmol P450 mit Rattenlebermikrosomen oder 15 mg Gesamt-IgG-Mix (8/51/825/830)/nmol P450 mit humanen Lebermikrosomen wird bei der anschließenden Inkubation mit Nifedipin beim 51/833-Ansatz eine Aktivität (nmol/min/nmol P450) von 95%, und beim 8/51/825/830-Ansatz eine Aktivität von 105% im Vergleich zu den Kontrollen (100%, ohne IgG) gemessen. (Durchführung wie unter 2.2.14.9 bzw. 2.2.14.8 angegeben).

Nach Vorinkubation von 15 mg Gesamt-IgG-Mix (51/833)/nmol P450 mit Rattenlebermikrosomen oder 15 mg Gesamt-IgG-Mix (8/51/825/830)/nmol P450 mit humanen Lebermikrosomen und anschließender Inkubation mit Ciclosporin beträgt die Umsatzrate (pmol/min/nmol P450) für den Ciclosporin AM 1 Metaboliten beim ersten Ansatz 92% und beim zweiten Ansatz 110% von der Umsatzrate der Kontrollen (100%, ohne IgG). (Durchführung wie unter 2.2.14.9 bzw. 2.2.14.1 angegeben).

4. Diskussion

Die Cytochrom P450 Enzymfamilie umfaßt eine Vielzahl von Isoenzymen. Aufgrund ihrer Membranbindung entziehen sich besonders die CYP eukariotischer Zellen der Untersuchung mit herkömmlichen Methoden wie der Röntgenstrukturanalyse, die bei den löslichen CYP von Prokaryonten ohne Schwierigkeit angewendet werden kann. Inzwischen ist es gelungen, ursprünglich membrangebundene Cytochrom P450 Enzyme in Lösung zu bringen, zu kristallisieren und mittels Röntgenstrukturanalyse darzustellen (Cosme, 2000). Bisher war es jedoch nicht möglich, CYP in ihrer ungelösten, membrangebundenen Form zu analysieren.

Zu Beginn dieser Arbeit war nur die Tertiärstruktur des löslichen CYP101 (P450CAM) aus *Pseudomonas putida* bekannt (Poulos, 1987).

Anhand von Aminosäuresequenzvergleichen zwischen dem bakteriellen P450-Enzym und den membrangebundenen eukaryontischen P450-Enzymen wurde postuliert, daß trotz erheblicher Unterschiede in den Primärsequenzen der einzelnen P450-Enzyme, Sekundärstrukturen und Tertiärstrukturen stärker konserviert sein müßten (Nelson, 1989). Dies war die Grundlage zur Voraussage eines dreidimensionalen Modells für CYP3A4/2. Zur Herstellung von sequenzspezifischen Anti-Peptid-Antikörpern wurden Aminosäurebereiche gewählt, die im Modell als oberflächenexponiert angezeigt wurden. Hierauf aufbauend wurden im Rahmen dieser Arbeit homologe Aminosäuresequenzbereiche der P450-Enzyme CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9/10, CYP2D6 und CYP2E1 ausgewählt und auch gegen diese Anti-Peptid-Antikörper erzeugt.

Im weiteren Arbeitsverlauf wurden die Tertiärstrukturen der löslichen bakteriellen P450-Enzyme CYP102 (P450BM3) aus *Bacillus megaterium* (Ravichandran, 1993), CYP108 (P450terp) aus *Pseudomonas sp.* (Hasemann, 1994) und CYP107A (P450eryF) aus *Saccharopolyspora erythraea* (Cupp-Vickery, 1994) ermittelt. Aus dem Vergleich der Kristallstrukturen aller Enzyme ergab sich, daß sie tatsächlich sehr ähnliche Tertiärstrukturen aufweisen und es einen Kernbereich stark konservierter Sekundärstrukturelemente zwischen den einzelnen P450-Proteinen gibt (Hasemann, 1995, Peterson, 1995).

Eine Reihe von Arbeitsgruppen hat Computermodelle entwickelt, mit deren Hilfe die Tertiärstruktur verschiedenster Cytochrom P450 Enzyme dargestellt werden kann. So publizierte Lewis (Lewis, 1995) ein Computermodell für CYP2A1, CYP2A4, CYP2A5 and

CYP2A6, das auf der Basis der Tertiärstruktur von CYP102 aufgebaut war, um die Interaktion zwischen einzelnen Aminosäuren dieser Cytochrom P450 Enzyme mit ihren Substraten zu untersuchen. Mit Hilfe dieses Ansatzes hat Lewis im weiteren Verlauf zusätzliche Modelle für einzelne Cytochrom P450 Enzyme entwickeln können. So publizierte er 1996 ein Modell für CYP3A4 (Lewis, 1996) und 1997 ein Modell für CYP2B4 (Lewis, 1997). Ein Jahr später zeigte er die für die Steroidsynthese verantwortlichen CYP11, CYP17, CYP19 und CYP21 (Lewis, 1998). Auch in den folgenden Jahren gelang ihm die Darstellung weiterer CYPs, die er in Beziehung setzte zu experimentell ermittelten Daten wie z. B. Ergebnissen aus der site-directed Mutagenese. Bei dieser Methode werden einzelne Aminosäuren gegeneinander ausgetauscht. Die Folgen der daraus resultierenden Änderung der Aminosäuresequenz halfen bei der Identifizierung funktionell wichtiger Aminosäuren im Protein.

Bei der Gewinnung von Antikörpern wurde in dieser Arbeit mit der Herstellung von "Multiple Antigenic Peptides" (MAPs) eine Methode verwendet, die den Vorteil hat, dass die Herstellung spezifischer Antikörper möglich ist, ohne dass das Protein durch viele chromatographische Schritte aufgereinigt werden muß. Im MAP-Ansatz wird ein großes Carrier-Protein, an welches das Peptid normalerweise gekoppelt werden muß, um eine Immunantwort auszulösen, durch eine oligomere Lysinmatrix ersetzt. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass der Großteil der gebildeten Antikörper allein gegen das eingesetzte Peptid gerichtet ist. Im vorliegenden Fall wurde eine oktamere Lysinmatrix verwendet. Durch diese Anordnung erhält man eine hohe Dichte des gewählten Peptids in mehrfacher Kopie auf der Oberfläche des MAP.

Zur Immunisierung gegen antigene Peptide in der Form der "Multiple Antigenic Peptides" (MAP) wurde das Peptid gleichzeitig mehrfach an ein Lysingerüst synthetisiert. Dabei entstand ein Molekül, das aufgrund seines großen Molekulargewichtes direkt, ohne Kopplung an ein Trägerprotein, injiziert werden konnte. Während bei den an Träger gekoppelten Antigenen der größte Teil der Antikörper gegen das Trägerprotein gerichtet ist, werden bei der MAP-Immunisierung nur Antikörper gegen die spezifischen Peptide erwartet (Posnett, 1989). Eine Veränderung der Epitope, die nach Träger-Kopplung eintreten kann, wird vermieden.

Die Orientierung des Peptids (N- oder C-terminales Aminosäureende) an die Lysinmatrix trägt entscheidend dazu bei, dass die gegen das Peptid gebildeten Antikörper auch die Sequenz innerhalb des Proteins erkennen (Tam, 1994). Die in dieser Arbeit zur Immunisierung ausgewählten Peptide aus den Bereichen A bis D befinden sich alle in Regionen innerhalb der Cytochrom P450 Proteinsequenzen. Aus diesem Grunde wurden die Peptide so synthetisiert, dass die C-terminale Aminosäure zuerst ans Lysingerüst gekoppelt wurde, und der distale N-Terminus des Peptids als flexibles, freies Ende vorlag. Ziel dieser Orientierung war es, die Bildung von Sekundärstrukturen, die im nativen Protein auftreten, im Bereich des flexiblen N-Terminus zu ermöglichen.

Bisherige Versuche, die dreidimensionale Struktur membranständiger Cytochrom P450 Enzyme mittels Röntgenstrukturanalyse aufzuklären, scheiterten an der Schwierigkeit, sie in kristalliner Form zu isolieren. Bislang sind die Aminosäuresequenzen (Primärstruktur) von ca. 1000 CYP-Enzymen bekannt (Lewis, 2002). Nach Vergleich der Primärstruktur von CYP101 mit membrangebundenen Cytochrom P450 Enzymen (Alignment) wurde postuliert, daß ihre Tertiärstruktur der von CYP101 ähnelt (Nelson, 1989, Edwards, 1991, Edwards, 1989). Dies war für diese Arbeit die Grundlage zur Voraussage eines dreidimensionalen Modells. Dazu diente die vergleichende Untersuchung von Gotoh und Fujii-Kuriyama (1989) von 47 membrangebundenen CYP-Enzyme mit der Sequenz von CYP101.

Die Grundlage zur Voraussage eines dreidimensionalen Modells von CYP3A4/2 basierte auf der Röntgenstrukturanalyse des nicht membrangebundenen bakteriellen CYP101 aus *Pseudomonas putida*. Hierbei wurde auf einem Modell aufgebaut, das von Krüger (1992) zur fluoreszenzspektroskopischen Untersuchung der Membrantopologie von CYP2B4 entwickelt wurde.

Der in dieser Arbeit vorgenommene Sequenzvergleich zeigt die Übereinstimmung der Sequenzen, welche in CYP101 die Helices A-L bilden, mit entsprechenden Sequenzen des CYP3A2 bzw. CYP3A4. Diese wiesen nach der Computermodellierung dieselbe Sekundärstruktur auf wie CYP101. Eine solche Übereinstimmung der das Grundgerüst tragenden Helices weist auf eine ähnliche dreidimensionale Anordnung dieser Helices in der Tertiärstruktur von CYP3A4 bzw. CYP3A2 mit CYP101 hin. Daraus ergab sich, daß CYP3A4 bzw. CYP3A2 die Form eines trigonalen Prismas ähnlich der des CYP101 haben muß.

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte ein solches Modell trotz einer gewissen Unsicherheit seiner Voraussage wertvolle Informationen zur Membrantopologie des CYP3A2/4 geben. Insbesondere zum Vorliegen von Aminosäuresequenzbereichen, die auf der Oberfläche des Modells lokalisiert sind und dort spezifische funktionelle Aufgaben erfüllen, konnten Voraussagen getroffen werden. Darüberhinaus kann ein solches Modell dazu beitragen, Oberflächenregionen zu identifizieren, die charakteristisch für ein bestimmtes CYP-Enzym sind und es immunologisch von anderen CYP-Enzymen unterscheidbar machen. Mit Hilfe solcher epitopspezifischer Antikörper können ganz spezifische Regionen eines Proteins gezielt untersucht und deren funktionelle Bedeutung erforscht werden. Weiterhin können Untersuchungen zur Expression dieses spezifischen CYP-Enzyms in unterschiedlichen Organen dazu beitragen, das Expressionsmuster dieses Enzyms sowie seine Induktion oder Repression durch bestimmte Substanzen zu erfassen (Wang, 1997).

Ausgehend von der Lage der Hämgruppe im Protein wird eine distale (zur Membran hin orientierte, unterhalb der Hämebene liegende) und eine proximale Seite (zur cytoplasmatischen Seite hin orientiert, über der Hämebene) der CYP-Enzyme unterschieden. Die distale Seite spielt für die Interaktion mit der Membran des endoplasmatischen Retikulums sowie die Erkennung und Bindung von Substraten eine entscheidende Rolle. Durch einen Kanal, der hauptsächlich von den Helices F und G gebildet wird, erhalten die Substrate Zugang in das innere aktive Zentrum des Enzyms in der unmittelbaren Nähe der Hämgruppe (Poulos 1995, Ravichandran 1993).

Die proximale Seite spielt eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit den einzelnen Reduktionspartnerproteinen (NADPH-Cytochrom P450-Reduktase, Cytochrom b5, Ferredoxin), welche die für die katalytische Aktivität notwendigen Elektronen übertragen. Geladene Aminosäuren auf den Oberflächen der Proteine, vor allem Lysin auf den CYP-Enzymen, sind an der Protein-Protein-Wechselwirkung direkt beteiligt (Lehnerer, 2000).

Um CYP3A-homologe Sequenzbereiche in CYP1A2, CYP2C8, CYP2C10, CYP2D6 und CYP2E1 zur Herstellung von Anti-Peptid-Antikörpern zu identifizieren, wurde in den hier vorliegenden Versuchen das Alignment von Gotoh und Fujii-Kuriyama zugrunde gelegt und die Sequenzen der oben genannten CYP mit dem CYP3A-Modell verglichen. Die Sequenzen aus den Bereichen A und D in CYP3A enthalten entweder konservierte Motive, wie das für den Amino-Terminus der C-Helix charakteristische Trp-X-X-X-Arg- (WxxxR) Motiv

(Bereich A), oder folgen unmittelbar hochkonservierten Motiven, wie dem Pro-Glu-Arg-Phe-(PERF) Motiv (Bereich D), welches den Mäander bildet (Hasemann, 1995). Aufgrund dieser hohen Sequenzhomologie, die auf eine ähnliche Tertiärstruktur hindeutet, wurden im Weiteren diese Sequenzen zur Herstellung von Anti-Peptid-Antikörpern ausgewählt.

Die Gewinnung der spezifischen Antikörper gegen Cytochrom P450 Enzyme der Isoenzyme CYP1A2, CYP2D6, CYP2E1 und CYP3A4 bzw. CYP3A2 des Menschen und der Ratte war daher eine wichtige Voraussetzung für die biochemischen Untersuchungen zur Funktion der Cytochrom P450-Enzyme.

Die immunisierten Kaninchen produzierten, bis auf wenige Ausnahmen, Antikörper gegen das injizierte MAP. Zwar zeigten die Antikörpertiter der Tiere deutliche individuelle Unterschiede, trotzdem waren diese Antikörper ausnahmslos in der Lage, ihr spezifisches Antigen, in diesem Fall das jeweilige MAP, zu erkennen.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden einige der oben beschriebenen Antikörper ausgewählt, um sie nun gegen ihre spezifischen, aufgereinigten bzw. heterolog in E.coli exprimierten CYP zu testen. Dabei zeigte sich, dass die Antikörper nicht nur in der Lage waren, ihre spezifischen MAPs, sondern auch ihre spezifischen Cytochrom P450 Enzyme zu binden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass keine Kreuzreaktionen mit anderen Cytochrom P450 Enzymen stattfanden und somit davon ausgegangen werden kann, dass die hergestellten Antikörper sowohl spezifisch als auch hochselektiv sind.

Anschließend an die oben gezeigten Untersuchungen sollten die Antikörper nun auf ihre Eignung hin getestet werden, an Gewebe verschiedener Spezies zu binden und so die Verteilung einzelner Cytochrom P450 Enzyme in unterschiedlichen Organen nachzuweisen. Dazu wurden zunächst Mikrosomen aus der Leber von Mensch und Ratte eingesetzt, da in diesen der CYP-Gehalt im Vergleich zu anderen Organen bekanntermaßen am höchsten ist und daher zu erwarten war, dass auf diese Weise eine mögliche Bindung der Antikörper am ehesten gezeigt werden konnte. Trotz des in den Mikrosomen vorliegenden heterologen Gemisches unterschiedlichster CYP sowie anderer Proteine waren die untersuchten Antikörper in der Lage, ihr jeweiliges Cytochrom P450 Enzym wiederum hochspezifisch und selektiv zu binden. Außerdem fanden wiederum so gut wie keine Kreuzreaktionen mit anderen mikrosomalen Proteinen statt. Auch für eine semiquantitative Bestimmung einzelner Cytochrom P450 Enzyme in Mikrosomen aus menschlicher Leber ließen sich die entsprechenden Antikörper einsetzen. Ebenfalls ließ sich der unterschiedliche Einfluß

verschiedener Induktoren auf den Gehalt an Cytochrom P450 Enzymen in der Leber der Ratte nachweisen.

Zusätzlich wurden Mikrosomen aus der Schweineleber untersucht. Hier zeigten sich allerdings Kreuzreaktionen der Antikörper gegen CYP3A29 und CYP2E1. Inzwischen konnten jedoch die Sequenzen dieser zwei Cytochrom P450 Enzyme ermittelt werden (Nissen, 1996). Aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie ist eine Kreuzreaktion verständlich.

Im Weiteren wurden die Antikörper nun in histologischen Präparaten des Menschen und der Ratte eingesetzt. In der menschlichen Leber konnte auf diese Weise eine zonale Verteilung von CYP3A4, in der Rattenleber eine ebenfalls zonale Verteilung von CYP3A2 in nicht-behandelten sowie eine homogene Verteilung in Dexamethason-induzierten Tieren gezeigt werden. In Gewebeschnitten von menschlichem Dünndarm war eine Anhäufung von CYP3A4 in den Spitzen der Mikrovilli der Mucosa nachweisbar.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die in dieser Arbeit verwendete Methode, basierend auf einem theoretischen Modell Antikörper zu entwickeln, welche ihr jeweiliges Cytochrom P450 Enzym spezifisch und hochselektiv zu erkennen vermögen, sich als geeignet erwies, unterschiedliche CYP in diversen Mikrosomen und Geweben verschiedener Spezies nachzuweisen.

Die Antikörper waren jedoch nicht in der Lage, die enzymatische Aktivität der Cytochrom P450 3A Enzyme zu inhibieren. Dies unterscheidet sich von den Untersuchungsergebnissen von Adams (1997), dessen Arbeitsgruppe auf der Grundlage ähnlicher Computermodelle Anti-Peptid-Antikörper gegen CYP1A2 der Ratte herstellte. Diese Antikörper inhibierten die spezifischen Enzymaktivitäten, was bestätigte, dass eine funktionell wichtige, an der cytoplasmatischen Oberfläche gelegene Region des Proteins ausgesucht wurde. Adams et al. (1997) wählten für ihre Peptide die Region 290-296. Die Arbeitsgruppe um Wang (Wang 1997) erzeugte auf der Grundlage eines Computermodells ebenfalls inhibitorische Anti-Peptid-Antikörper gegen CYP3A4. Sie wählten für ihre Peptide die Region 253-273 aus, die unmittelbar vor dem Epitopbereich B (278-288) des in dieser Arbeit vorgestellten Modells liegt. Dabei stellte sich heraus, dass von den drei immunisierten Kaninchen zwar alle Tiere hohe Antikörpertiter gegen CYP3A4 produzierten, aber nur von einem Tier inhibitorische Antikörper produziert wurden. Dieses Ergebnis ist aufgrund der hohen Antikörpertiter gegen CYP3A4 überraschend. Parallel wurde auch von Cribb (Cribb, 1995) gezeigt, dass Antikörper

aus Kaninchen, die mit einem Peptid immunisiert wurden, das aus der Region 254-273 von CYP2D6 stammte, eine beträchtliche Varianz bezüglich ihrer Fähigkeit, die CYP2D6-Enzymaktivität zu hemmen, zeigten.

Die spezifischen Reaktionen der Antikörper aus der hier vorliegenden Arbeit mit den Peptiden, wie auch die mit den in mikrosomalen Fraktionen befindlichen nativen Proteinen, bestätigten die aufgrund des Computermodells vorausgesagte cytoplasmatische Lokalisation der Peptide im nativen Protein.

Im Laufe der Untersuchungen an Mikrosomen im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Frage, warum die Antikörper nicht inhibitorisch auf die Enzymaktivität des CYP3A4 bzw. CYP3A2 wirkten. Die Bindung eines spezifischen Antikörpers an ein P450 Enzym könnte theoretisch in der Lage sein, die Bindung des Enzyms mit der für die Elektronenübertragung nötigen Reduktase zu blockieren. Dieses war offensichtlich nicht Fall, denn eine Enzymaktivität konnte auch nach Antikörperbindung gemessen werden. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass die Stärke der Bindung der Reduktase an das jeweilige Cytochrom P450 Enzym größer ist als die Bindung von Enzym und Antikörper oder der Antikörper an Stellen bindet, die räumlich von den Bindungsstellen der Reduktase zu weit entfernt ist, um diese zu beeinflussen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Reduktase-Bindungsstelle sich aus Bereichen der C- sowie der L-Helix zusammensetzt (Omata, 2000). Der C-Helix Bereich wurde in der hier vorliegenden Arbeit mit dem Epitopbereich A genau getroffen, wohingegen der Epitopbereich D sich unmittelbar vor der L-Helix, im sogenannten Mäander-Bereich, befindet.

Eine mögliche Anwendung des in dieser Arbeit vorgestellten Prinzips der Entwicklung von Antikörpern auf der Basis eines Computermodells ergibt sich aus der bereits erwähnten offensichtlichen Spezifität und hohen Selektivität dieser Antikörper. Zur Erkennung von Induktionen und Inhibitionen der Cytochrom P450 Enzyme besonders im Rahmen von Untersuchungen zum Medikamentenstoffwechsel werden spezifische Antikörper bereits eingesetzt (Wang, 1997), doch mußte bisher immer mit Kreuzreaktionen der eingesetzten Antikörper gerechnet werden, welche zu undeutlichen oder verfälschten Ergebnissen führen konnten. Beispielsweise im Vorfeld von Organtransplantationen könnte der CYP3A4-Gehalt im Spenderorgan bestimmt werden, um die Dosisfindung für das nach der Operation eingesetzte Immunsuppressivum zu erleichtern. Ist der Gehalt an CYP3A4 im Spenderorgan gering, kann es beispielsweise leicht zu Überdosierungen kommen (Lemoine, 1993, Lemoine

1994). Für eine solche, wie auch für andere ähnliche Anwendungen wäre die Entwicklung spezieller Western Blots oder ELISAs denkbar. Auch für das sogenannte Cytochrom P450 Expressionsprofiling, einer Methode zur Ermittlung des individuellen CYP-Expressionsmusters in Lebergewebe, wäre eine Nutzung computermodellbasierter Antikörper möglich.

5. Literatur

(1991) Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Nomenclature of electron-transfer proteins. Recommendations 1989. *Eur J Biochem* 200: 599-611.

Adams DA, Edwards RJ, Davies DS, Boobis AR (1997) Specific inhibition of human CYP1A2 using a targeted antibody. *Biochem Pharmacol* 54: 189-197.

Amarneh B, Corbin CJ, Peterson JA, Simpson ER, Graham-Lorence S (1993) Functional domains of human aromatase cytochrome P450 characterized by linear alignment and site-directed mutagenesis. *Mol Endocrinol* 7: 1617-1624.

Atherton E, Sheppard RC (1988) *Solid phase peptide synthesis: A practical approach*. IRL PRESS: Oxford.

Azeva TN, Gilep AA, Lepesheva GI, Strushkevich NV, Usanov SA (2001) Site-directed mutagenesis of cytochrome P450_{sc}. II. Effect of replacement of the Arg425 and Arg426 residues on the structural and functional properties of the cytochrome P450_{sc}. *Biochemistry (Mosc)* 66: 564-575.

Barnes HJ, Arlotto MP, Waterman MR (1991) Expression and enzymatic activity of recombinant cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5597-5601.

Belkina NV, Lisurek M, Ivanov AS, Bernhardt R (2001) Modelling of three-dimensional structures of cytochromes P450 11B1 and 11B2. *J Inorg Biochem* 87: 197-207.

Blake MS, Johnston KH, Russell-Jones GJ, Gotschlich EC (1984) A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal Biochem* 136: 175-179.

Boobis AR, Edwards RJ, Adams DA, Davies DS (1996) Dissecting the function of cytochrome P450. *Br J Clin Pharmacol* 42: 81-89.

Catty, D. and Raykundalia, C. (1988) Production and quality control of polyclonal antibodies. 19-79. Oxford, IRL Press. *Antibodies A practical approach*.

Chen S, Zhou D (1994) Functional domains of aromatase cytochrome P450 inferred from comparative analyses of amino acid sequences and substantiated by site-directed mutagenesis experiments. *J Biol Chem* 269: 1564.

Conley A, Hinshelwood M (2001) Mammalian aromatases. *Reproduction* 121: 685-695.

Cosme J, Johnson EF (2000) Engineering microsomal cytochrome P450 2C5 to be a soluble, monomeric enzyme. Mutations that alter aggregation, phospholipid dependence of catalysis, and membrane binding. *J Biol Chem* 275: 2545-2553.

Cribb A, Nuss C, Wang R (1995) Antipeptide antibodies against overlapping sequences differentially inhibit human CYP2D6. *Drug Metab Dispos* 23: 671-675.

Cupp-Vickery JR, Li H, Poulos TL (1994) Preliminary crystallographic analysis of an enzyme involved in erythromycin biosynthesis: cytochrome P450eryF. *Proteins* 20: 197-201.

Dai R, Pincus MR, Friedman FK (1998) Molecular modeling of cytochrome P450 2B1: mode of membrane insertion and substrate specificity. *J Protein Chem* 17: 121-129.

de Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS, van den Anker JN (1999) Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition. *Clin Pharmacokinet* 37: 485-505.

Degtyarenko KN, Archakov AI (1993) Molecular evolution of P450 superfamily and P450-containing monooxygenase systems. *FEBS Lett* 332: 1-8.

Desmyter A, Decanniere K, Muyldermans S, Wyns L (2001) Antigen specificity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody. *J Biol Chem* 276: 26285-26290.

Diaz D, Fabre I, Daujat M, Saint AB, Bories P, Michel H, Maurel P (1990) Omeprazole is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450. *Gastroenterology* 99: 737-747.

Dibbern HW (1978) *UV- und IR-Spektren wichtiger pharmazeutischer Wirkstoffe*. Aulendorf.

Distlerath LM, Reilly PE, Martin MV, Davis GG, Wilkinson GR, Guengerich FP (1985) Purification and characterization of the human liver cytochromes P-450 involved in debrisoquine 4-hydroxylation and phenacetin O-deethylation, two prototypes for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem* 260: 9057-9067.

Edwards RJ, Murray BP, Boobis AR, Davies DS (1989) Identification and location of alpha-helices in mammalian cytochromes P450. *Biochemistry* 28: 3762-3770.

Edwards RJ, Murray BP, Singleton AM, Boobis AR (1991) Orientation of cytochromes P450 in the endoplasmic reticulum. *Biochemistry* 30: 71-76.

Eisen EI (1986) Induction of hepatic P450 isoenzymes. In *Cytochrome P450, Structure, Mechanism and Biochemistry*, Ortiz de Montellano PR (ed) pp 315-344. Plenum Press: New York

Estabrook RW, Werringloer J (1978) The measurement of difference spectra: application to the cytochromes of microsomes. *Methods Enzymol* 52: 212-220.

Gershoni JM, Palade GE (1983) Protein blotting: principles and applications. *Anal Biochem* 131: 1-15.

Gillam EM, Baba T, Kim BR, Ohmori S, Guengerich FP (1993) Expression of modified human cytochrome P450 3A4 in *Escherichia coli* and purification and reconstitution of the enzyme. *Arch Biochem Biophys* 305: 123-131.

Gillam EM, Guo Z, Guengerich FP (1994) Expression of modified human cytochrome P450 2E1 in *Escherichia coli*, purification, and spectral and catalytic properties. *Arch Biochem Biophys* 312: 59-66.

Gonzalez FJ, Lee YH (1996) Constitutive expression of hepatic cytochrome P450 genes. *FASEB J* 10: 1112-1117.

Gotoh O, Fujii-Kuriyama Y (1989) Evolution, structure and gene regulation of cytochrome P450. Ruckpaul K, Rein H (eds) pp 195-243. Akademie-Verlag: Berlin.

Guengerich FP (1982) Microsomal enzymes involved in toxicology. Analysis and separation. In *Principles and methods of toxicology*, Hayes AW (ed) pp 609-637. Raven Press: New York.

Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T, Waxman DJ (1986) Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem* 261: 5051-5060.

Guengerich FP, Humphreys WG, Yun CH, Hammons GJ, Kadlubar FF, Seto Y, Okazaki O, Martin MV (1995) Mechanisms of cytochrome P450 1A2-mediated formation of N-hydroxy arylamines and heterocyclic amines and their reaction with guanyl residues. *Princess Takamatsu Symp* 23: 78-84.

Guengerich FP (1995) Human cytochrome P450 enzymes. In *Cytochrome P450 Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Ortiz de Montellano PR (ed) pp 473-536. Plenum Press: London.

Guengerich FP (2002) Update information on human P450s. *Drug Metab Rev* 34: 7-15.

Guo Z, Gillam EM, Ohmori S, Tukey RH, Guengerich FP (1994) Expression of modified human cytochrome P450 1A1 in *Escherichia coli*: effects of 5' substitution, stabilization, purification, spectral characterization, and catalytic properties. *Arch Biochem Biophys* 312: 436-446.

Haefelfinger P (1980) Determination of bufuralol and its major metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 221: 327-335.

Hasemann CA, Ravichandran KG, Peterson JA, Deisenhofer J (1994) Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* 236: 1169-1185.

Hasemann CA, Kurumbail RG, Boddupalli SS, Peterson JA, Deisenhofer J (1995) Structure and function of cytochromes P450: a comparative analysis of three crystal structures. *Structure* 3: 41-62.

Hjelm H, Sjö Dahl J, Sjöquist J (1975) Immunologically active and structurally similar fragments of protein A from *Staphylococcus aureus*. *Eur J Biochem* 57: 395-403.

Klingenberg M (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 75: 376-386.

Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.

Koymans LM, Vermeulen NP, Baarslag A, Donne-Op den Kelder GM (1993) A preliminary 3D model for cytochrome P450 2D6 constructed by homology model building. *J Comput Aided Mol Des* 7: 281-289.

Krueger, V. Fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen der Membrantopologie von Cytochrom P450. 1992. Göttingen.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lehnerer M, Schulze J, Achterhold K, Lewis DF, Hlavica P (2000) Identification of key residues in rabbit liver microsomal cytochrome P450 2B4: importance in interactions with NADPH-cytochrome P450 reductase. *J Biochem (Tokyo)* 127: 163-169.

Lemoine A, Azoulay D, Gries JM, Dennison A, Castaing D, Fredj G, Debuire B, Guengerich FP, Beaune P, Bismuth H (1993) Relationship between graft cytochrome P-450 3A content and early morbidity after liver transplantation. *Transplantation* 56: 1410-1414.

Lemoine A, Azoulay D, Kiffel L, Gries JM, Bismuth H, Debuire B, Beaune P (1994) Relationship between hepatic cytochrome P-450 3A and acute cyclosporine toxicity in liver transplantation. *Therapie* 49: 279-282.

Lewis DF, Lake BG (1995) Molecular modelling of members of the P4502A subfamily: application to studies of enzyme specificity. *Xenobiotica* 25: 585-598.

Lewis DF, Eddershaw PJ, Goldfarb PS, Tarbit MH (1996) Molecular modelling of CYP3A4 from an alignment with CYP102: identification of key interactions between putative active site residues and CYP3A-specific chemicals. *Xenobiotica* 26: 1067-1086.

Lewis DF, Lake BG (1997) Molecular modelling of mammalian CYP2B isoforms and their interaction with substrates, inhibitors and redox partners. *Xenobiotica* 27: 443-478.

Lewis DF, Lee-Robichaud P (1998) Molecular modelling of steroidogenic cytochromes P450 from families CYP11, CYP17, CYP19 and CYP21 based on the CYP102 crystal structure. *J Steroid Biochem Mol Biol* 66: 217-233.

Lewis DF, Modi S, Dickins M (2002) Structure-activity relationship for human cytochrome P450 substrates and inhibitors. *Drug Metab Rev* 34: 69-82.

Maniatis T, Fritsch E, Sambrook EF (1982) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- McLean GW, Owsianka AM, Subak-Sharpe JH, Marsden HS (1991) Generation of anti-peptide and anti-protein sera. Effect of peptide presentation on immunogenicity. *J Immunol Methods* 137: 149-157.
- Merrifield RB (1963) Solid phase peptide synthesis. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 85: 2149-2154.
- Nelson DR, Strobel HW (1989) Secondary structure prediction of 52 membrane-bound cytochromes P450 shows a strong structural similarity to P450cam. *Biochemistry* 28: 656-660.
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, . (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol* 12: 1-51.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1-42.
- Nelson DR (1999) Cytochrome P450 and the individuality of species. *Arch Biochem Biophys* 369: 1-10.
- Nissen PH, Wintero AK, Fredholm M (1998) Mapping of porcine genes belonging to two different cytochrome P450 subfamilies. *Anim Genet* 29: 7-11.
- Oinonen T, Lindros KO (1995) Hormonal regulation of the zoned expression of cytochrome P-450 3A in rat liver. *Biochem J* 309 (Pt 1): 55-61.
- Omata Y, Dai R, Smith SV, Robinson RC, Friedman FK (2000) Synthetic peptide mimics of a predicted topographical interaction surface: the cytochrome P450 2B1 recognition domain for NADPH-cytochrome P450 reductase. *J Protein Chem* 19: 23-32.
- Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239: 2370-2378.

Peter R, Bocker R, Beaune PH, Iwasaki M, Guengerich FP, Yang CS (1990) Hydroxylation of chlorzoxazone as a specific probe for human liver cytochrome P-450IIE1. *Chem Res Toxicol* 3: 566-573.

Peters JH (1985) *Monoklonale Antikörper*. Springer Verlag: Berlin.

Peterson JA, Graham-Lorence SE (1995) Bacterial P450s: structural similarities and functional differences. In *Cytochrome P-450, Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Ortiz de Montellano PR (ed) pp 151-180. Plenum Press: New York.

Pinkus LM (1981) Separation and use of enterocytes. *Methods Enzymol* 77: 154-162.

Porteous JW, Furneaux HM, Pearson CK, Lake CM, Morrison A (1979) Poly(adenosine diphosphate ribose) synthetase activity in nuclei of dividing and of non-dividing but differentiating intestinal epithelial cells. *Biochem J* 180: 455-461.

Posnett DN, McGrath H, Tam JP (1988) A novel method for producing anti-peptide antibodies. Production of site-specific antibodies to the T cell antigen receptor beta-chain. *J Biol Chem* 263: 1719-1725.

Posnett DN, Tam JP (1989) Multiple antigenic peptide method for producing antipeptide site-specific antibodies. *Methods Enzymol* 178: 739-746.

Poulos TL, Finzel BC, Howard AJ (1987) High-resolution crystal structure of cytochrome P450cam. *J Mol Biol* 195: 687-700.

Poulos TL (1995) Cytochrome P450. *Curr Opin Struct Biol* 5: 767-774.

Ravichandran KG, Boddupalli SS, Hasermann CA, Peterson JA, Deisenhofer J (1993) Crystal structure of hemoprotein domain of P450BM-3, a prototype for microsomal P450's. *Science* 261: 731-736.

Rendic S (2002) Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* 34: 83-448.

Sandhu P, Baba T, Guengerich FP (1993) Expression of modified cytochrome P450 2C10 (2C9) in *Escherichia coli*, purification, and reconstitution of catalytic activity. *Arch Biochem Biophys* 306: 443-450.

Sandhu P, Guo Z, Baba T, Martin MV, Tukey RH, Guengerich FP (1994) Expression of modified human cytochrome P450 1A2 in *Escherichia coli*: stabilization, purification, spectral characterization, and catalytic activities of the enzyme. *Arch Biochem Biophys* 309: 168-177.

Sarasquete C, Segner H (2000) Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies. *Sci Total Environ* 247: 313-332.

Sattler M, Guengerich FP, Yun CH, Christians U, Sewing KF (1992) Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. *Drug Metab Dispos* 20: 753-761.

Schulz-Utermoehl T, Mountfield RJ, Bywater RP, Madsen K, Jorgensen PN, Hansen KT (2000) Structure-function analysis of human CYP3A4 using a specific proinhibitory antipeptide antibody. *Drug Metab Dispos* 28: 718-725.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.

Soucek P, Gut I (1992) Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica* 22: 83-103.

Steinbuch M, Audran R (1969) The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Arch Biochem Biophys* 134: 279-284.

Strohmeyer, S. Metabolisierung von Ciclosporin und seiner Metabolite durch Lebermikrosomen und Hepatozyten. 1989. Hannover.

Tam JP (1988) Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5409-5413.

Tam JP (1994) Immunization with peptide-carrier complexes: traditional and multiple-antigen peptide systems. Wisdom GB (ed) pp 83-115. Oxford University Press: New York.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354.

Wang H, Napoli KL, Strobel HW (2000) Cytochrome P450 3A9 catalyzes the metabolism of progesterone and other steroid hormones. *Mol Cell Biochem* 213: 127-135.

Wang RW, Lu AY (1997) Inhibitory anti-peptide antibody against human CYP3A4. *Drug Metab Dispos* 25: 762-767.

Watkins PB, Wrighton SA, Maurel P, Schuetz EG, Mendez-Picon G, Parker GA, Guzelian PS (1985) Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6310-6314.

Waxman DJ, Azaroff L (1992) Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem J* 281 (Pt 3): 577-592.

Weiser MM (1973) Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. I. An indicator of cellular differentiation. *J Biol Chem* 248: 2536-2541.

Williams PA, Cosme J, Sridhar V, Johnson EF, McRee DE (2000) Microsomal cytochrome P450 2C5: comparison to microbial P450s and unique features. *J Inorg Biochem* 81: 183-190.

Wolff, T., Distlerath, L. M., Worthington, M. T, Groopman, J. D., Hammons, G. J., Kadlubar, F. F., Prough, R. A., Martin, M. V., and Guengerich, F. P. (1985) Substrate specificity of human liver cytochrome P450 debrisoquine 4-hydroxylase probed using immunochemical inhibition and chemical modeling. *Cancer Res.* 45, 2116-2122.

Wrighton SA, Schuetz EG, Watkins PB, Maurel P, Barwick J, Bailey BS, Hartle HT, Young B, Guzelian P (1985) Demonstration in multiple species of inducible hepatic cytochromes P-450 and their mRNAs related to the glucocorticoid-inducible cytochrome P-450 of the rat. *Mol Pharmacol* 28: 312-321.

Wrighton SA, Schuetz EG, Thummel KE, Shen DD, Korzekwa KR, Watkins PB (2000) The human CYP3A subfamily: practical considerations. *Drug Metab Rev* 32: 339-361.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Müller danke ich für das Referat meiner Arbeit auf dem gemeinsamen Weg.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. V. Kaever für die Betreuung und das Korreferat meiner Dissertation.

Meinen Kollegen am Institut für Pharmakologie sei an dieser Stelle aufs herzlichste gedankt für ihr nie endendes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Diese Arbeit ist Tamara gewidmet, durch deren Unterstützung alles anders wurde.

Lebenslauf

Name: Hermann Esselmann
geboren am: 20. 12. 1961, Bremen

Ausbildung:

1968 - 1972 Grundschule Oyten

1972 - 1980 Gymnasium Achim (12. Klasse)

1980 - 1981 University High Evening School, Melbourne, Australien

1981 - 1982 Gymnasium Achim; Abschluß: allgemeine Hochschulreife

1983 - 1984 Zivildienst beim DRK Lilienthal; Bremen

1984 - 1991 Biologiestudium an der Georg-August-Universität Göttingen
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Biochemie, Organische Chemie

Diplomarbeit bei Prof. Söling, Klinische Biochemie, Universität Göttingen mit dem Thema: Zur Regulation von Enzymen des Phospholipidstoffwechsels während der Signalübertragung in exokrinen Zellen

12.03.1991 Hochschulabschluss: Diplom-Biologe

1991 - 1992 Angestellter beim Arbeitsamt Göttingen

seit 01.09.1992- Promotion bei Prof. Sewing, Institut für Pharmakologie, MHH

1998 - Universität Göttingen, Psychiatrie; AG Molekulare Neurobiologie, Alzheimer-Forschung