

**Veränderungen in der Genexpression  
fremdstoffmetabolisierender Enzyme und Bedeutung  
genetischer Polymorphismen unter besonderer  
Berücksichtigung von HIV-Virustatika**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Pharmazie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I  
der Humboldt Universität zu Berlin

von

Diplom-Biopharmakologin Isabella Gashaw, geb. Nowakowski  
geb. am 15.09.1972 in Katowice (Polen)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. M. Linscheid

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. J. Brockmüller  
2. Prof. Dr. rer. nat. H.-H. Borchert

Tag der mündlichen Prüfung: 01.10.2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>THEORETISCHE HINTERGRÜNDE</b>	<b>2</b>
2.1	HIV und Therapie	2
2.2	Rolle der Cytochrom-P450-Enzyme und des P-Glykoproteins im Stoffwechsel der Virustatika	6
2.3	Cytochrom-P450-Enzyme	8
2.3.1	Cytochrom P-450 1A1	9
2.3.2	Cytochrom P-450 1B1	11
2.3.3	Cytochrom P-450 3A4	12
2.4	P-Glykoprotein	16
2.5	Alprazolam: Wirkung und Stoffwechsel	18
2.6	Aufgabenstellung der Arbeit	19
<b>3</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>20</b>
3.1	Substanzen, Puffer, Lösungen und Medien	20
3.2	Oligonukleotide	21
3.3	Zelllinien	22
3.4	Verwendete Kits	22
3.5	Computerprogramme	22
3.6	Datenbanken	22
3.7	Geräte	22
3.8	Sonstiges Zubehör	23
<b>4</b>	<b>METHODEN</b>	<b>24</b>
4.1	Zellkultivierung	24
4.2	Durchführung der Studie	25
4.3	Zytotoxizitätstest	25
4.4	Methoden zur Analyse der mRNA	26
4.4.1	Extraktionsverfahren zur Gewinnung von RNA	26
4.4.1.1	Extraktion der zellulären RNA aus Zellkulturen	26
4.4.1.2	Extraktion der zellulären RNA aus Leukozyten	26
4.4.1.3	Gewinnung der zellulären RNA aus Leberproben	26
4.4.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	26
4.4.3	Reverse Transkription - Polymerase Ketten Reaktion	27
4.4.3.1	CYP1A1 RT-PCR	27
4.4.3.2	CYP1B1 RT-PCR	30
4.4.3.3	CYP3A4 RT-PCR	31

4.4.3.4	MDR1 RT-PCR .....	35
4.4.3.5	β-Mikroglobulin RT-PCR .....	35
4.4.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	36
4.4.5	Kapillarelektrophorese .....	36
4.4.6	Inter-day und intra-day Variationskoeffizient.....	36
<b>4.5</b>	<b>Sequenzierung .....</b>	<b>37</b>
<b>4.6</b>	<b>Methoden zur Analyse der DNA.....</b>	<b>37</b>
4.6.1	Isolierung der genomischen DNA.....	37
4.6.2	Analyse des <i>CYP3A4*1B</i> Genotyps.....	37
4.6.3	Analyse des <i>CYP3A4*3</i> Genotyps .....	38
4.6.4	Analyse des <i>CYP3A5*1</i> Genotyps .....	38
4.6.5	Analyse des <i>CYP2C19*2</i> Genotyps .....	38
<b>4.7</b>	<b>Bestimmung der Konzentration von Alprazolam im Plasma.....</b>	<b>38</b>
<b>4.8</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1</b>	<b>Induktion der CYP1A1 und CYP1B1 mRNA durch antiretrovirale Mittel.....</b>	<b>40</b>
<b>5.2</b>	<b>Induktion der CYP3A4 und MDR1 mRNA durch antiretrovirale Mittel .....</b>	<b>46</b>
<b>5.3</b>	<b>CYP3A4 mRNA Expression in Leukozyten unter Rifampicin Induktion: Korrelation mit der Pharmakokinetik von Alprazolam unter Berücksichtigung bekannter Polymorphismen .....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>65</b>
<b>6.1</b>	<b>RNA Analytik mittels RT-PCR.....</b>	<b>65</b>
<b>6.2</b>	<b>Untersuchungen zur Genexpression in Zellkulturen .....</b>	<b>66</b>
<b>6.3</b>	<b>CYP3A4 mRNA Bestimmung in Leukozyten und Korrelation mit der Pharmakokinetik von Alprazolam.....</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>79</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus des HIV .....	2
Abbildung 2: Strukturformeln der antiretroviralen Mittel.....	5
Abbildung 3: Prinzip der hochaktiven antiretroviralen Therapie .....	6
Abbildung 4: Aktivierung des Benzo(a)pyrens zum kanzerogenen Diol.....	9
Abbildung 5: Die regulatorischen Elemente des <i>CYP1A1</i> .....	10
Abbildung 6: Verlauf eines Regulationsweges .....	11
Abbildung 7: Die regulatorischen Elemente des <i>CYP1B1</i> Gens .....	12
Abbildung 8: Organisation der pharmakologisch bedeutsamen regulatorischen Segmente des <i>CYP3A4</i> Gens .....	14
Abbildung 9: Liganden des Pregnan-X-Rezeptors und des Konstitutiven Androstan Rezeptors.....	15
Abbildung 10: Organisation der regulatorischen Einheit des <i>MDR1</i> Gens.....	18
Abbildung 11: Biotransformation von Alprazolam.....	19
Abbildung 12: Prinzip der Herstellung des externen Standards zur Quantifizierung der <i>CYP1A1</i> und <i>CYP1B1</i> mRNA.....	28
Abbildung 13: Ergebnisse der RT-PCRs für <i>CYP1A1</i> mRNA einer Probe.....	29
Abbildung 14: Ergebnisse der RT-PCRs für <i>CYP1B1</i> einer Probe .....	31
Abbildung 15: Das Prinzip der Detektion der entstehenden PCR-Produkte mittels zwei Hybridisierungssonden .....	31
Abbildung 16: Prinzip der Herstellung des externen Standards zur Quantifizierung der <i>CYP3A4</i> mRNA.....	32
Abbildung 17: PCR des <i>CYP3A4</i> RNA Standards.....	34
Abbildung 18: <i>CYP3A4</i> PCR-Verlauf.....	35
Abbildung 19: <i>CYP1A1</i> mRNA Expression nach Inkubation mit 6 nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren .....	41
Abbildung 20: Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren und die Expression von <i>CYP1B1</i> mRNA .....	42
Abbildung 21: Effekte von Efavirenz und Nevirapin auf mRNA Expression von <i>CYP1A1</i> und <i>CYP1B1</i> .....	43
Abbildung 22: <i>CYP1A1</i> mRNA Expression unter Einwirkung von Proteaseinhibitoren.....	44
Abbildung 23: <i>CYP1B1</i> mRNA Konzentrationen nach 18-stündigen Inkubationen mit Proteaseinhibitoren .....	45
Abbildung 24: Einfluss der Passagenzahl auf die <i>CYP3A4</i> mRNA Expression .....	46
Abbildung 25: Konzentrationsabhängige Veränderungen in der mRNA Expression von <i>CYP3A4</i> und <i>MDR1</i> nach mehrtägiger Behandlung mit Rifampicin .....	47
Abbildung 26: <i>CYP3A4</i> mRNA Expression in HepG2 und COLO-320 Zellkultur unter Einwirkung der Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren.....	48
Abbildung 27: <i>MDR1</i> mRNA Expression in HepG2 und COLO-320 Zellkultur unter Einwirkung der Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren.....	49
Abbildung 28: Einfluss der Nicht-Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren auf die Expression von <i>CYP3A4</i> und <i>MDR1</i> mRNA in COLO-320 und HepG2-Zellen.....	50
Abbildung 29: <i>CYP3A4</i> mRNA Expression unter Einwirkung der Proteaseinhibitoren in der COLO-320- und HepG2-Zellkultur .....	51

Abbildung 30: Veränderungen in der MDR1 mRNA Expression nach Inkubationen mit Proteaseinhibitoren in der COLO-320 und HepG2-Zellkultur .....	52
Abbildung 31: Der maximale Induktionseffekt der untersuchten Medikamente auf die Expression von CYP3A4 und MDR1 mRNA .....	55
Abbildung 32: Sequenzvergleich eines cDNA Amplifikates aus Leukozyten mit den Vertretern der CYP3A Subfamilie .....	56
Abbildung 33: CYP3A4 PCR-Kinetik aus drei Leukozytenproben vor und nach der Induktion .....	57
Abbildung 34: Individuelle Unterschiede im CYP3A4 mRNA Gehalt und Alprazolam Clearance bei 96 gesunden Probanden vor und nach Rifampicin Behandlung.....	58
Abbildung 35: Logarithmisch transformierte Häufigkeitsverteilung der CYP3A4 mRNA Kopien in Leukozyten von 96 Probanden vor und nach Behandlung mit Rifampicin.....	59
Abbildung 36: Häufigkeitsverteilung der Werte für die Alprazolam-Clearance.....	61
Abbildung 37: Korrelation der CYP3A4 mRNA Mengen in Leukozyten mit der Alprazolam Clearance vor und nach fünftägiger Rifampicin Behandlung bei 96 Probanden.....	62
Abbildung 38: Stängel-Blatt-Diagramme zur Korrelation der Induktion von CYP3A4 mit dem Geschlecht .....	63
Abbildung 39: Der maximale Induktionseffekt der antiretroviralen Mittel auf die mRNA Expression von CYP1A1 und CYP1B1. ....	69
Abbildung 40: Die maximalen Induktionseffekte der untersuchten Substanzen auf die Expression der CYP3A4 und MDR1 mRNA in COLO-320 und HepG2-Zellkultur.....	71
Abbildung 41: Einfluss des C3435T Polymorphismus im MDR1 Gen auf die CD4+ Zellzahlen in AIDS-Patienten .....	73

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antiretrovirale Stoffklassen, Substanzen und Dosierung.....	3
Tabelle 2: Metabolismus der HIV Medikamente .....	7
Tabelle 3: Bekannte inhibierende und aktivierende Eigenschaften der antiretroviralen Mittel auf pharmakologisch relevante Proteine.....	8
Tabelle 4: Einige Substrate von CYP3A4 .....	13
Tabelle 5: Substrate des MDR1 Transporters .....	17
Tabelle 6: Verwendete Puffer.....	20
Tabelle 7: Getestete Medikamente .....	20
Tabelle 8: Weitere Forschungschemikalien.....	20
Tabelle 9: Verwendete Enzyme .....	20
Tabelle 10: Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide.....	21
Tabelle 11: Charakteristika der verwendeten Zellkulturen.....	22
Tabelle 12: Wachstumscharakteristika der Zellkulturen .....	24
Tabelle 13: Die Effekte der getesteten antiretroviralen Mittel auf die CYP1A1 und CYP1B1 mRNA Expression.....	40
Tabelle 14: Expression von CYP3A4 und MDR1 in verschiedenen humanen Zelltypen .....	46
Tabelle 15: Die getesteten Substanzen und die Expression von CYP3A4 und MDR1 mRNA in COLO-320 Zellkultur .....	54
Tabelle 16: Die getesteten Substanzen und die Expression von CYP3A4 und MDR1 mRNA in HepG2-Zellkultur .....	54
Tabelle 17: CYP3A4 mRNA in Leukozyten und Alprazolam Kinetik .....	58
Tabelle 18: Die ermittelten Parameter für die Testgüte der beiden verwendeten analytischen Verfahren.....	60
Tabelle 19: Korrelation des Geschlechts mit der CYP3A4 mRNA Expression und Alprazolam Konzentration .....	63
Tabelle 20: Verteilung der untersuchten Genotypen mit den Alprazolam Konzentrationen und CYP3A4 mRNA Gehalt .....	64
Tabelle 21: Literaturvergleich der Primer zur Detektion von CYP3A4 mRNA in Leukozyten.....	66
Tabelle 22: Einige Parameter zur Pharmakokinetik der untersuchten antiretroviralen Mittel.....	68
Tabelle 23: Inhibierende und aktivierende Eigenschaften der untersuchten antiretroviralen Mittel auf pharmakologisch aktive Proteine .....	74

## Abkürzungsverzeichnis

AhR	Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor (engl.: aryl hydrocarbon receptor)
AHR	Das Gen des Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptors
AIDS	Immunschwächesyndrom (engl.: auto immune deficiency syndrom)
ALZ	Alprazolam
ARNT	Ah-Rezeptor nukleärer Translokator
CAR	Konstitutiver Androstan Rezeptor (engl.: constitutive androstane receptor,)
C <sub>T</sub>	Zyklus des Schwellenwerts (engl.: threshold cycle)
CV	Koeffizient der Variation
CYP	Cytochrom P-450
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphate
DTT	1,4-Dithiothreitol
GR	Glukokortikoid Rezeptor
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie (engl.: Highly Active Antiretroviral Therapy)
HIV	Humanes Immundefektvirus (engl: human immunodeficiency virus)
HWZ	Halbwertszeit
kb	Kilobasenpaare
MDR1	Gen des P-gp Transporterproteins (engl: multidrug resistant protein 1)
mRNA	Boten RNA (engl: messenger RNA)
n.d.	nicht determiniert
NNRTI	Nicht-Nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
NRTI	nukleosidischer Reverse-Transkriptase-Inhibitor
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
P-gp	P-Glykoprotein
PI	Proteaseinhibitor
PXR	Pregnan-X-Rezeptor (engl: pregnane X receptor)
RIF	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription / Reverse Transkriptase (RNA abhängige DNA Polymerase)
RT-PCR	Reverse Transkription - Polymerase Ketten Reaktion
RTV	Ritonavir
SD	Standardabweichung
SQV	Saquinavir
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin

Td Tagesdosis  
UTR Nicht translatierte Region (engl: untranslated region)

## **1 Einleitung**

Zur Zeit werden etwa 17 verschiedene antiretroviral wirkende Mittel zur Bekämpfung der HIV-Infektion in mehreren Kombinationen eingesetzt. Die Vorgänge um den Metabolismus der Arzneimittel sind zum großen Teil bekannt und häufig interindividuell unterschiedlich. Die Voraussagen zur Wirkung des einzelnen Medikamentes sind schwierig. Die Effektivität der eingesetzten Pharmaka wird durch Bestimmungen des Virusspiegels im Blut in der vierten bis achten Woche der Therapie geschätzt. Diese ermöglichen auch die Erkennung der resistenten Virus-Stämme, die der Patient eventuell beherbergt. Eine Resistenz des Virus, die sich gegen ein bestimmtes Arzneimittel entwickelt hat, kann teilweise auch auf andere Medikamente übertragen werden.

Die antiretrovirale Therapie ist mit einer Vielzahl von Wechselwirkungen der Arzneimittel miteinander sowie mit Nahrungsbestandteilen assoziiert. Die Arzneimittelwechselwirkungen können ihre Ursachen in Veränderungen des Arzneimittelmetabolismus sowie -transports haben. Während der „first-pass“ Metabolismus über das Cytochrom-P-450-System die verringerte Bioverfügbarkeit der Arzneimittel begründen kann, kann die Überexpression des P-Glykoproteins eine erfolgreiche Behandlung mit beispielsweise Proteaseinhibitoren verhindern.

## 2 Theoretische Hintergründe

### 2.1 HIV und Therapie

Das HIV (humanes Immundefektvirus) gehört zur Familie der Retroviren und trägt zwei einzelsträngige RNA-Moleküle als Genom (Abbildung 1). Um an der Proteinsynthese der Wirtszelle teilnehmen zu können, enthält das Virus die Reverse Transkriptase, das namensgebende Enzym der Familie. Dieses Enzym ermöglicht das Umschreiben der im Virus vorhandenen RNA in eine komplementäre doppelsträngige DNA-Sequenz. Viren dieser Gruppe waren bereits vor über 40 Jahren als Erreger von Tumorerkrankungen in Tieren nachgewiesen worden. Man bezeichnete sie deshalb auch als Oncornaviren. Als erster humanpathogener Retrovirus wurde 1978 der Erreger der adulten T-Zell-Leukämie (das HTLV-I), entdeckt [1]. Alle bisher bekannten pathogenen Retroviren zeigen einen ausgesprochenen Zelltropismus für eine Subpopulation der T-Lymphozyten (Helfer-T-Lymphozyten, CD4-positive Zellen), und werden deshalb als HTLV-Viren (*human T-cell leukemia virus*) bezeichnet. Die HTLV-Viren werden ihrerseits in verschiedenen funktionellen Gruppen unterteilt. Während die Leukämie Erreger zu einer verstärkten Proliferation von funktionell abnormen Helfer-T-Lymphozyten führen, zerstören die HI-Viren diesen Zelltyp.

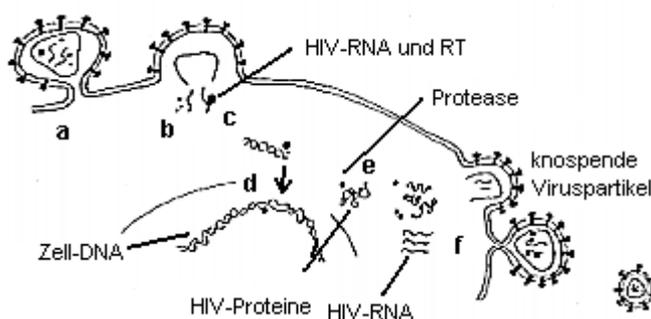


Abbildung 1: Lebenszyklus des HIV

Die einzelnen Schritte des Vermehrungszyklus können Ansatzpunkte für die antiretrovirale Therapie darstellen (kennzeichnet mit a bis f). Die Infektion der Zielzelle erfolgt, nachdem das Virus an der Oberfläche andockt und mit der Zellmembran fusioniert (a). Nach ihrer Freisetzung in die Zelle wird die HIV-RNA (b) mit Hilfe der Reversen Transkriptase (c) in die DNA umgeschrieben und kann als Provirus in die genomische DNA integriert (d) werden. Eine spätere Aktivierung des Virus resultiert in der Translation der Polyproteine, die mittels Protease (e) gespalten werden. Anschließend wird das Virus verpackt und durch Knospung (f) freigesetzt.

Beim Menschen kommen fünf der sieben Gruppen der Retroviren vor, wovon das HIV (früher zur Unterfamilie der Lentiviren gezählt) eine eigene darstellt. Das Virus unterscheidet sich durch die Komplexität seines viralen Genoms von den anderen Retroviren. Es sind zwei Serotypen beschrieben, der HIV-1 Erreger (zurückzuführen auf einige Unterarten des Schimpansen Pan troglodytes) sowie der HIV-2 (zurückzuführen auf Rauchgrau- oder Mohrenmangaben Cercopithecus torquatus atys). HIV-2 verursacht die sogenannte afrikanische AIDS und wurde 1986 in Westafrika entdeckt. Dieser Virus zeigt außerordentlich starke genetische Homologie zu einem bei Makakken (Rhesusaffen) Immundefekt verursachenden Virus, dem SIV (simian immunodeficiency virus). Diese Homologie beträgt zu SIV 75 - 80% während die HIV-1 RNA mit der HIV-2 RNA lediglich zu 40% übereinstimmt [2]. Da das HIV-2 hauptsächlich in Westafrika endemisch ist, ist noch relativ wenig über den Verlauf der HIV-2 Infektion bekannt. Es wird angenommen, dass die Inkubationszeit von HIV-2 erheblich länger ist als bei HIV-1 und die Infektiösität geringer.

Die weltweit meisten Fälle von AIDS werden durch HIV-1 ausgelöst während HIV-2 sich im wesentlichen auf Westafrika und historisch damit liierte Länder wie Frankreich und Belgien beschränkt.

Die infektiösen Partikel bestehen aus einem von der Hüllmembran umgebenen Kapsid. Die viralen Glykoproteine: Transmembranes Protein und externes Glykoprotein sind mit der Membran assoziiert und werden als ein gemeinsames Vorläuferprotein gebildet. Die Matrixproteine sind mit

der Innenseite der Hüllmembran verbunden. Das Virion bindet über seine Oberflächen-Glykoproteine an spezifische Rezeptoren (u.a. an das CD4) auf der Oberfläche der Wirtszelle (Abbildung 1). Die beiden RNA-Moleküle werden daraufhin von der viralen RNA-abhängigen DNA-Polymerase in die sogenannte provirale DNA umgeschrieben, diese wird in die chromosomale DNA der Wirtszelle integriert und mit jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Ausgehend vom integrierten DNA-Provirus erfolgt die Transkription mittels zellulärer RNA-Polymerasen. Die reifen Virionen werden abschließend aus der Zelle ausgeschleust, um neue Zellen zu infizieren. Die hauptsächlichen Zielzellen des HIV sind die CD4-Lymphozyten, deren Zerstörung für den immunsuppressiven Effekt des HIV mitverantwortlich ist. Es können aber auch andere CD4 tragende Zellen infiziert werden, z. B. Monozyten, Makrophagen und die Langerhans-Zellen der Haut. Im Anfangsstadium der Infektion kommt es zu einem transienten Anstieg der CD8-Lymphozyten (zytotoxische L.). Danach folgt eine meist jahrelange Phase der zunehmenden Immunsuppression, gekennzeichnet durch einen Abfall der CD4-Zahlen bei zunehmender Virusreplikation.

Mit der Aufklärung des Lebenszyklus des HIV sind verschiedene potentielle Ansatzpunkte für eine antiretrovirale Therapie aufgedeckt worden. Dennoch nutzt man bislang nur zwei der Schritte der Virusvermehrung. Zum einen ist es die Transkription der Virus-RNA zu DNA, für welche die Reverse Transkriptase verantwortlich ist, und zum anderen die proteolytische Verarbeitung viraler Vorläuferproteine für die Fusion zu reifen Viruspartikeln. Diesen Prozess katalysiert die virale Protease.

Tabelle 1: Antiretrovirale Stoffklassen, Substanzen und Dosierung

Substanzgruppe	Substanz	Dosis	Wichtigste Nebenwirkungen
Reverse Transkriptase Inhibitoren– Nukleosidanaloga (NRTI)	Abacavir (ABC)	2 x 300 mg	Alle NRTIs: selten Laktatazidose Hypersensitivitäts-Syndrom bei 5%
	Lamivudin (3TC)	2 x 150 mg	Kopfschmerz
	Stavudin (d4T)	2 x 40 mg	Neuropathie, Pankreatitis
	Zalcitabin (ddC)	3 x 0.75 mg	Neuropathie, orale Ulzera
	Zidovudin (AZT, ZDV)	2 x 250 mg	Cephalgie 50%, Neutropenie, Anämie,
	Didanosin (ddI)	2 x 200 mg	Pankreatitis, Neuropathie,
Proteaseinhibitoren (PI)			alle PIs: Glukoseintoleranz, Fettstoffwechselstörung und Lipodystrophiesyndrom
	Amprenavir (APV)	2 x 1200 mg	Diarrhö, Kopfschmerz, Arzneiexanthem
	Indinavir (CRX, IDV)	3 x 800 mg	Nephrolithiasis, Hyperbilirubinämie
	Lopinavir (LPV) + Ritonavir	2 x 230/57.5 bis 2 x 400/100 mg	Diarrhö, Pankreatitis
	Nelfinavir (NFV)	3 x 750 mg	Diarrhö 20%, Übelkeit, Schwindel
	Ritonavir (RTV)	2 x 600 mg	Lebertoxizität, Diarrhö, Übelkeit, Hypertriglyzeridämie
	Saquinavir (SQV)	2 x 400-600 mg 3 x 1200 mg	Lebertoxizität, Diarrhö, Übelkeit (meist mild)
Reverse Transkriptase Inhibitoren – Nichtnukleosidisch (NNRTI)			alle NNRTIs: Arzneireaktionen
	Efavirenz (EFV)	1 x 600 mg	Psychotrope NW; Arzneiexanthem
	Delavirdin (DLV)	3 x 400 mg	Arzneiexanthem bei 50%
	Nevirapin (NVP)	2 x 200 mg	Arzneiexanthem, Lebertoxizität

Als erste antiretroviral wirksame Substanz wurde 1986 der nukleosidische Inhibitor der Reversen Transkriptase Zidovudin (Abbildung 2) zur HIV-Behandlung zugelassen. Es wurde in Monotherapie angewandt und brachte aufgrund der raschen Resistenzentwicklung wenig Erfolg. Die Kombinationstherapien wurden möglich, als weitere Nukleosidanaloga zugelassen wurden. Chronologisch aufgezählt waren es Didanosin, Zalcitabin, Lamivudin und Stavudin. Heute sind 15 Arzneimittel zugelassen, die miteinander kombiniert den Patienten verabreicht werden (Tabelle 1). Sie werden in drei Klassen aufgeteilt. Es sind die Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NRTIs), die Nicht-Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs) sowie die Proteaseinhibitoren (PIs).

Die Nicht-Nukleosidischen Hemmstoffe der Reversen Transkriptase, Delavirdin, Nevirapin und Efavirenz (Abbildung 2), hemmen die Reverse Transkriptase (RT) des HIV-1 am allosterischen Zentrum des Enzyms, indem sie sich an eine Stelle des Moleküls anlagern, die mit dem katalytischen Zentrum assoziiert ist. Die Affinität zur RT ist höher als zu DNA-abhängigen DNA-Polymerasen der Säugetierzellen. Die derzeit verfügbaren NNRTIs sind nur gegen HIV-1 wirksam. Konzentrationen von Efavirenz im unteren nanomolaren Bereich waren in Zellkulturuntersuchungen ausreichend, um die Vermehrung von HIV-1 zu hemmen.

Die Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren müssen im Gegensatz zu NNRTIs nach Aufnahme in die Zelle zum Triphosphat phosphoryliert werden, und die entstehenden Triphosphate konkurrieren mit den Wirtszelltriphosphaten um die Bindung an der Reversen Transkriptase. Sie hemmen das Enzym kompetitiv im aktiven Zentrum und werden in die DNA eingebaut, was zum Kettenabbruch führt. Die Affinität der NRTIs zur RT ist höher als zu DNA-abhängigen DNA-Polymerasen der Säugetierzellen. Außer Stavudin sind alle NRTIs sowohl gegen HIV-1 als auch gegen HIV-2 einsetzbar.

Proteaseinhibitoren hemmen die virale Protease im aktiven Zentrum und verhindern somit die proteolytische Spaltung der Polyproteine in die funktionsfähigen Endprodukte. Dieser Vorgang läuft vermutlich während oder kurz nach dem Ausknospen des Virus von der Zellmembran ab, wodurch die PIs anders als die RTIs den viralen Reifungsprozess auch in bereits infizierten Zellen unterdrücken. Während effizienter Behandlung mit Proteaseinhibitoren können nur unreife, nicht infektiöse Virushüllen exprimiert werden. Die Affinität zu viraler Protease ist höher als zu humanen Enzymen wie z. B. Renin (ist ebenfalls eine Aspartatprotease), was eine ausreichend hohe Selektivität bietet. Bis auf Indinavir sind alle Proteaseinhibitoren sowohl gegen HIV-1 als auch gegen HIV-2 wirksam. Saquinavir (Abbildung 2) war der erste Proteaseinhibitor, der zur AIDS-Therapie eingesetzt wurde. Im Fall von Kaletra® handelt es sich Kombination aus Lopinavir und niedrig dosiertem Ritonavir („Boosting“), das den Cytochrom P-450-Metabolismus hemmt, was wiederum zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Lopinavir führt.

Die Wirkspiegel der einzelnen HIV-Therapeutika werden von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. So weisen die antiretroviralen Pharmaka, im besonderen die Proteaseinhibitoren, eine sehr unterschiedliche Bioverfügbarkeit auf (Tabelle 2). Um die orale Bioverfügbarkeit zu vergrößern, wird Amprenavir mit großen Mengen Vitamin E verabreicht [3]. Vitamin E erhöht die Löslichkeit durch Mizellenbildung und die Permeabilität durch Hemmung des aktiven Transports über P-Glykoprotein [4].

Wie bei der antibakteriellen Therapie stellt die Resistenzentwicklung auch bei der antiretroviralen Therapie ein großes Problem dar. Eine durch erhebliche Fehlerrate der Reversen Transkriptase bedingte hohe Mutationsneigung und eine suboptimale Virushemmung, die durch ungenügende Wirkstoffspiegel ausgelöst wird, führen beim HIV sehr häufig zu Resistenzen. Die Medikamente können Kreuzresistenzen zu Vertretern derselben Klasse aufweisen [5, 6, 7]. Therapieziel ist daher immer eine möglichst vollständige Unterdrückung der Virusvermehrung, die an der Viruslast gemessen wird. Ein Therapieversagen kann auch auf mangelnde Einhaltung der Richtlinien durch den Patienten, pharmakokinetische Einflüsse und Änderungen des intrazellulären Arzneimittelmetabolismus zurückgeführt werden.

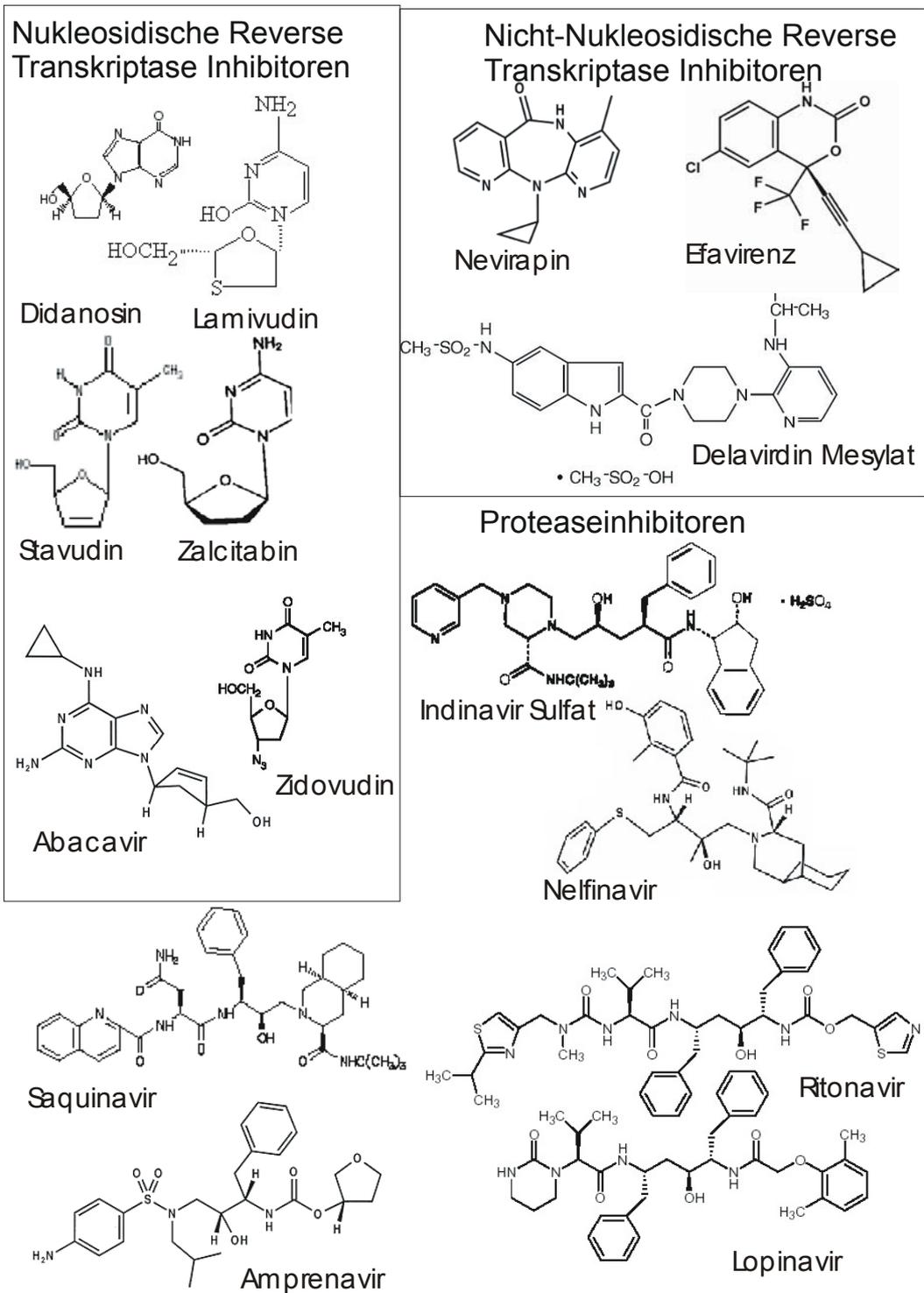


Abbildung 2: Strukturformeln der antiretroviralen Mittel

Es sind die in dieser Arbeit verwendeten Wirkstoffe dargestellt.

Weitere Substanzen befinden sich in unterschiedlichen Stadien der Entwicklung, wie Emtricitabin, Capravirin, Emivirin, T-20 (Pentafusid) und AMD3100 (Bicyclam). Hierbei handelt es sich um Korezeptor-Antagonisten, Adsorptions-(gp120-) und Fusions-(gp41-)Inhibitoren, Antisense-Oligonukleotide, Integrase- und Transkriptions-(Transaktivations-)Inhibitoren. Auch bei bereits verwendeten Angriffspunkten ist mit Neuentwicklungen zu rechnen, wie z. B. den Nukleosid-Phosphonat-Analoga Adefovir und Tenofovir disoproxil.

Die heutige Therapie stützt sich auf die Richtlinien der sogenannten hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART), deren Ziel es ist, die Viruslast auf ein Niveau unterhalb der Nachweisgrenze zu drücken und diesen Zustand lebenslang zu erhalten. Gegenwärtig liegt die Nachweisgrenze bei 20 bis 50 viralen Genomkopien pro 1 ml Plasma. Die Viruslast dient als Surrogatmarker, denn je niedriger die Viruslast desto höher die Lebenserwartung. Für eine wirksame Initialtherapie stehen eine Reihe von Optionen zur Verfügung, die in Abbildung 3 dargestellt sind.

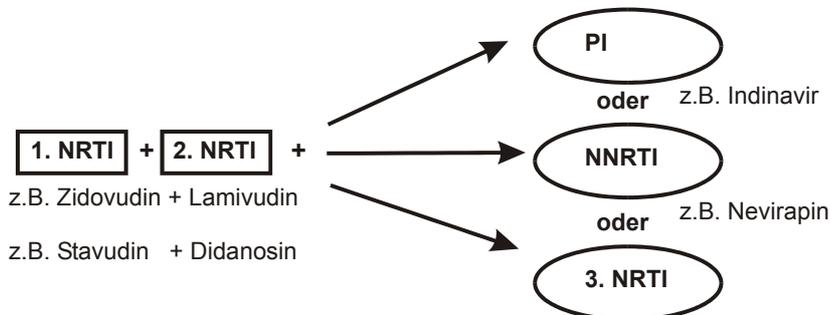


Abbildung 3: Prinzip der hochaktiven antiretroviralen Therapie

Im Rahmen der Therapie werden Nukleosidische und Nicht-Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitoren sowie Proteaseinhibitoren in verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten verwendet.

Die günstigen Kombinationseffekte, die durch den Einsatz zweier NRTIs entstehen, sind zum Teil darauf zurückzuführen, dass Resistenz-Mutationen, die durch eines der Medikamente hervorgerufen werden, durch die Zweitmutation - bedingt durch die andere Substanz - abgeschwächt oder aufgehoben werden. So führt eine Mutation am Kodon 74 des Reverse Transkriptase-Gens, die unter Behandlung mit Didanosin selektiert wird, dazu, dass die Empfindlichkeit des Virusstammes mit einer für Zidovudin typischen Mutation am Kodon 215 gegen diese Substanz wieder erhöht wird [8]. In den Therapieschemata spielt Zidovudin eine zentrale Rolle, da hier kaum eine relevante Kreuzresistenz zu anderen Substanzen bekannt ist.

Aufgrund des HIV-bedingten Defekts der zellulären Immunfunktion, der Zerstörung der T-Helfer-Zellen zeichnet sich das Endstadium der Erkrankung durch eine erhöhte Anfälligkeit gegen Mikroorganismen aus, die nur bei einer Abwehrschwäche pathogen sind sowie durch ein vermehrtes Auftreten maligner Tumoren (Kaposi-Sarkom, Non-Hodgin's Lymphom) und Störungen des Nervensystems, die auf einen Virusbefall des Gehirns zurückzuführen sind. Aus diesen Begleiterkrankungen resultiert eine zusätzliche Notwendigkeit der Mehrfachtherapie, die ein Arzneimittel-Wechselwirkungen Risiko impliziert.

## 2.2 Rolle der Cytochrom-P450-Enzyme und des P-Glykoproteins im Stoffwechsel der Virustatika

Die Superfamilie der Cytochrom-P450-Enzyme spielt eine wesentliche Rolle im Stoffwechsel der meisten Virustatika, da alle Nicht-Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren und alle Proteaseinhibitoren über dieses System in der Leber und in der Darmmukosa metabolisiert werden (Tabelle 2). Die Metabolisierung kann durch Fremdstoffe (z. B. Pharmaka, aber auch Nahrungsbestandteile wie Grapefruitsaft-Komponenten), Hormone und Metabolite moduliert werden. So führt eine Enzyminduktion zu einer erhöhten Clearance der Substrate, dies geht mit einer verkürzten Halbwertszeit und niedrigeren Plasmakonzentrationen einher. Die Inhibition des Enzymsystems hängt dagegen mit einer Verringerung der Clearance, einer Verlängerung der Halbwertszeit und höheren Plasmaspiegeln zusammen. Medikamente, die intensiv am Cytochrom-P-450-System verstoffwechselt werden, sind vielfältigen Interaktionen mit anderen Pharmaka unterworfen. Dies führt dazu, dass die Plasmakonzentrationen der verschiedenen Pharmaka intra- und interindividuell außerordentlich stark schwanken können. Zu niedrige Plasmaspiegel sind häufig mit einem Wirkverlust der betreffenden Substanz, zu hohe Konzentrationen mit einer vermehrten Toxizität assoziiert.

Tabelle 2: Metabolismus der HIV Medikamente

Substanz	Enzyme	Transport	Lit.
Abacavir	Alkohol-Dehydrogenase, UDP-Glukuronyltransferase		[9]
Didanosin	Xanthin Oxidase	CNT2	[10, 11, 12]
Lamivudin	Sulfoxidase 70% unverändert ausgeschieden		[13]
Stavudin		CPNT, ENT	[11, 14]
Zalcitabin		CNT*	[11, 15]
Zidovudin	UGT2B7	CNT*	[11, 16, 17, 18]
Delavirdin	CYP3A4 >> CYP2D6 (20%) <5% unverändert ausgeschieden		[19, 20, 21, 22]
Efavirenz	CYP3A4, CYP2B6 GST		[22, 23, 24, 25]
Nevirapin	CYP3A4 CYP2B6 CYP2D6 GST		[22, 26, 27]
Amprenavir	CYP3A4 >> CYP2D6, CYP2C9	MDR1	[3, 28, 29]
Indinavir	CYP3A4 CYP3A5	MDR1, MRP1/2	[28, 29, 30, 31, 32, 33, 34]
Lopinavir	CYP3A4/5		[35]
Nelfinavir	CYP3A4 (52 %) CYP2C19, 2D6, 2C9	MDR1, MRP2	[28, 34, 36, 37, 38]
Ritonavir	CYP3A4, CYP3A5, CYP2D6	MDR1, MRP1, MRP2	[28, 29, 32, 33, 34, 39, 40]
Saquinavir	CYP3A	MDR1, MRP2	[28, 33, 41, 42, 43]

\* Konzentrativer Na<sup>+</sup> Nucleosid-Transporter

Die Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren Abacavir, Didanosin, Lamivudin, Stavudin, Zalcitabin und Zidovudin werden in der Leber kaum metabolisiert. Die Cytochrom-P450-Enzyme scheinen im Stoffwechsel dieser Komponenten keine große Rolle zu spielen. Mehr Informationen gibt es inzwischen zum Transport der NRTIs aus dem Darm. Es ist eine Reihe von Transportern für die Aufnahme der Nukleosidanaloga aus dem Gastrointestinaltrakt zuständig [11], wie z. B. der Konzentrativen Natriumabhängigen Nucleosidtransporter CNT (*concentrative nucleoside transporter*, transportiert v.a. Pyrimidine) und ENT (*equilibrative nucleoside transporter*). Außerdem wird vermutet, dass das MRP5 (*multidrug-resistance protein 5*), ein Mitglied der Superfamilie der ATP-bindenden Kassetten, für den Transport der Nukleosidanaloga verantwortlich ist [44]. Die genaue Zuordnung der Medikamente zu den Transportern ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

Der Nicht-Nukleosidische Reverse Transkriptase Inhibitor Efavirenz (EFV) induziert das Cytochrom-P450-Enzym 3A4 (Tabelle 3) in der Leber und beschleunigt somit die eigene Metabolisierung [25]. Bei gesunden Probanden erfolgte auf eine 10-tägige Behandlung durch tägliche Mehrfachgaben von 200 bis 400 mg eine unerwartet schwache Kumulation (22 - 42 % geringer als vorgesehen) mit einer kürzeren terminalen Halbwertszeit (40 - 55 h gegenüber 52 - 76 h nach Einnahme der Einzeldosis).

Ein weiteres NNRTI, Nevirapin, zeigt Wechselwirkungen mit Nelfinavir. Wie eine Studie an AIDS-Patienten zeigte, verringert die Koadministration von Nelfinavir und Nevirapin die Plasmaspiegel von NFV um 50 % [45]. Beide Substanzen werden vorwiegend über das Cytochrom-P450 3A4 verstoffwechselt. Inzwischen ist auch bekannt, dass NVP das CYP3A4 induziert [46].

Die meisten Proteaseinhibitoren beeinflussen den Cytochrom-P450 abhängigen Stoffwechsel der Arzneimittel durch Inhibition des CYP3A4 (Tabelle 3). Im Fall von den Proteaseinhibitoren Saquinavir (SQV) und Ritonavir wird die Enzymhemmung von CYP3A4 therapeutisch genutzt. Ritonavir ist ein Inhibitor von CYP3A4 und hemmt den Stoffwechsel von SQV bei gesunden Probanden [47]. Die Kombination von SQV mit RTV resultiert in signifikanter Arzneimittel Wechselwirkung vermittelt durch Enzyminhibition, die bei den Patienten zu sehr hohen SQV-Dosen und somit zur potentiellen Toxizität führt. Ritonavir erhöht die Serumspiegel von Saquinavir um das 20-fache. Während der Kombinationstherapie von SQV mit RTV empfiehlt es sich die SQV-Dosen

drastisch zu reduzieren [48]. Eine Studie an sechs Patienten zeigte starke interindividuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik von Saquinavir nach einer Koadministration mit Nelfinavir, das die Bioverfügbarkeit von Saquinavir erhöht [49]. Die Proteaseinhibitoren weisen mit vielen Arzneimitteln Wechselwirkungen über eine Konkurrenz am CYP3A4 auf. RTV hemmt auch CYP1A2, CYP2C9 und CYP2E1. Indinavir inhibiert weniger CYP3A4 als RTV und hat keinen Einfluss auf CYP1A2, CYP2C9 oder CYP2E1 katalysierte Reaktionen [50]. Nach neueren Erkenntnissen ist Saquinavir an der Inhibition von CYP2C9 beteiligt (Aktivität gemessen in Leber Mikrosomen) [51].

Die Gruppe um R.B. Kim zeigte, dass die Proteaseinhibitoren Indinavir, Nelfinavir und Saquinavir durch das MDR1 (P-Glykoprotein) aus den Zellen transportiert werden [37]. Dadurch werden die Bioverfügbarkeit sowie die Passage durch die Bluthirnschranke, an derer Aufrechterhaltung MDR1 beteiligt ist, eingeschränkt. Die Proteaseinhibitoren können MDR1 inaktivieren, in dem sie das Protein aktiv hemmen. Was die Stärke der MDR1 Inhibition betrifft, so differieren die Aussagen. Während 1999 von Drewe et al. berichtet wurde, dass Ritonavir ein sehr potenter Inhibitor des Transportsystems ist [52], haben *in vitro* Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Huisman lediglich eine moderate Hemmung des MDR1 vermittelten Transportes durch SQV und RTV gezeigt [43]. *In vivo* Versuche an Mäusen ergaben, dass MDR1 die Bioverfügbarkeit von SQV im Gehirn und Fetus limitierte, wenn es zusammen mit hohen Dosen von RTV verabreicht wurde [43].

Tabelle 3: Bekannte inhibierende und aktivierende Eigenschaften der antiretroviralen Mittel auf pharmakologisch relevante Proteine

Substanz	Inhibitor	Induktor	Lit.
Delavirdin	CYP3A4, 2C9, 2D6, 2C19, MDR1		[21, 22, 53]
Efavirenz	CYP2C9, 2C19, 3A4, MDR1	CYP3A4	[22, 25, 53]
Nevirapin	MDR1	CYP3A4	[22, 27]
Amprenavir	CYP3A4	MDR1	[3, 28]
Indinavir	CYP3A4	CYP1A1	[54, 55]
Nelfinavir	CYP3A4, MDR1	CYP1A1, MDR1	[28, 34, 38, 55]
Ritonavir	CYP3A4, 2D6, 2C9	CYP1A1, 1A4, GST	[28, 34, 51, 54, 55]
Saquinavir	CYP3A4, 2C9, MDR1	CYP1A1, MDR1	[28, 43, 51, 54, 55]

Abgesehen von den durch die Virustatika verursachten Effekten, müssen auch die Folgen der Gabe von anderen Medikamenten beachtet werden. Da durch CYP3A4 neben den antiretroviralen Substanzen auch zahlreiche andere Fremdstoffe metabolisiert werden, sind Interaktionen mit anderen Arzneimitteln und Nahrungsbestandteilen zu erwarten (wie Phenobarbital, Phenytoin, Dexamethason, Carbamazepin, Grapefruitsaft). Durch gleichzeitige Verabreichung des Rifampicin (RIF) wurde die Plasmakonzentration von Saquinavir um 46% reduziert [56, 57]. Weil es durch die Enzyminduktion zu subtherapeutischen Konzentrationen von Saquinavir kommen kann, soll die Kombination beider Medikamente vermieden werden. Andererseits führt die gleichzeitige Gabe von Grapefruitsaft zu einem Anstieg der Saquinavir-Bioverfügbarkeit um das doppelte [58]. Auch mit Ketokonazol und ähnlichen Azol-Antimykotika kann es zu Interaktionen kommen.

### 2.3 Cytochrom-P450-Enzyme

Die Cytochrom-P450-Enzyme bilden eine Superfamilie von Hämproteinen, die eine Schlüsselrolle im oxidativen Stoffwechsel zahlreicher endogener und exogener Substanzen spielt. Die Proteine bekamen Ihren Namen von ihrem Absorptionsmaximum bei 450 nm der Kohlenstoffmonoxid gebundenen Form. Die von den Enzymen dieser Familie vermittelte Oxidation erhöht die Polarität vieler Fremdstoffe und beschleunigt somit deren Eliminierung aus dem Körper. Auf der anderen Seite können jedoch die Cytochrom-P450-Enzyme zur Toxifizierung bestimmter Substrate beitragen und/oder eventuelle Kanzerogenität hervorrufen bzw. erhöhen. Außerdem sind diese Enzyme an der Biosynthese von Steroidhormonen beteiligt, oxidieren die ungesättigten Fettsäuren zu intrazellulären Boten und verstoffwechseln fettlöslichen Vitamine [59].

Die Cytochrom-P450-Enzyme sind lokalisiert im endoplasmatischen Retikulum (mikrosomale Fraktion) oder in der mitochondrialen Fraktion der Gewebe der Säugetiere. Die Arzneimittel metabolisierenden Cytochrom-P450-Enzyme werden in großen Mengen in hepatischen

mikrosomalen Fraktionen exprimiert, geringere Mengen wurden in der Lunge, Niere und im gastrointestinalen Trakt gefunden.

Es sind inzwischen insgesamt über 300 Gene bekannt, die für Vertreter der Cytochrom-P-450-Enzymfamilie kodieren. Die heutige Nomenklatur lässt eine direkte Zuordnung der einzelnen Enzyme zu ihrer funktionellen Gruppe zu, denn sie basiert auf der Annahme, dass sich der Umfang der Sequenz- und der Funktionsidentität umgekehrt proportional zum Entwicklungsabstand von einem evolutionärem Vorläufer verringert. Bezogen auf die Sequenzidentität der Proteine gehören alle Enzyme mit mehr als 40% Homologie derselben Familie an, während mehr als 55% der Übereinstimmungen die Klassifizierung in die gleiche Subfamilie erlauben. Die Enzyme werden wie folgt bezeichnet: die erste Zahl entspricht der Familienzugehörigkeit, der Buchstabe beschreibt die Subfamilie, während die darauffolgende Zahl für das Mitglied der Familie spezifisch ist. Familien mit der Zahl bis 100 sind ausschließlich für die eukaryotischen Systeme reserviert, während die Mikroorganismen die Zahlen über 100 für die Beschreibung der CYP-Familie beanspruchen.

Die CYP1 Familie beinhaltet zwei Subfamilien, CYP1A und CYP1B. Alle Mitglieder der beiden Subfamilien, CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 sind induzierbare Enzyme, deren Expression über den Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor (AhR) Signalweg reguliert wird.

### 2.3.1 Cytochrom P-450 1A1

Das Cytochrom P-450 1A1 (CYP1A1) spielt eine wichtige Rolle im Stoffwechsel polyzyklischer Kohlenwasserstoffe zu reaktiven Epoxiden (Abbildung 4), die wiederum durch Epoxidhydrolasen in Diole überführt werden. Bei Benz(a)pyren ist nur die Aufspaltung der Epoxide an Positionen 4 und 5 bzw. 7 und 8 möglich. Bei einer Epoxidierung des Benz(a)pyren-7,8-dihydrodiols an den Positionen 9 und 10 wird die Hydrolyse durch Epoxidhydrolasen sterisch gehindert, was in einer hohen Reaktivität des Benz(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxids resultiert, welches DNA Addukte eingehen kann [60]. Solche Adduktformationen gelten als Initiatoren des Tumorgeschehens [61]. CYP1A1 verstoffwechselt neben den genannten Fremdstoffen auch die Arzneimittel Ethoxyresorufin, Warfarin, Amiodaron, Propranolol und Acetaminophen, diese sind auch Substrate des CYP1A2 [62, 63]. Gemeinsam mit CYP3A4 ist CYP1A1 an der Biosynthese der endogenen Steroide beteiligt, indem es beispielweise Progesteron hydrolysiert [64].

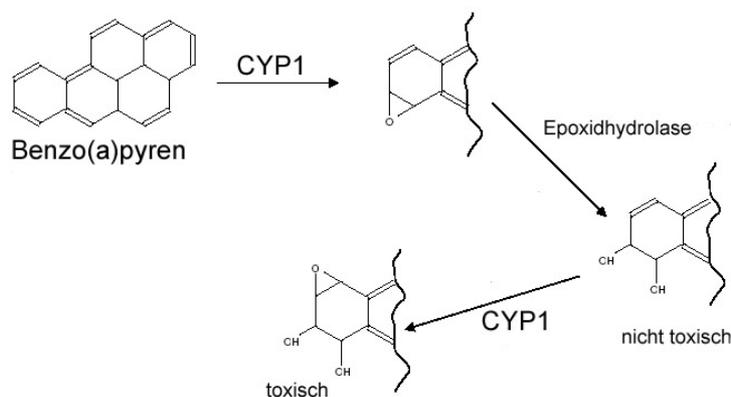


Abbildung 4: Aktivierung des Benzo(a)pyrens zum kanzerogenen Diol

Die Abbildung wurde entnommen und modifiziert aus: <http://www.le.ac.uk/pa/msc/mde1.pdf>

CYP1A1 wurde lokalisiert auf dem Chromosom 15q22, wo es zusammen mit dem CYP1A2 Gen ein 23 kb großes Cluster bildet [65]. Beide Gene liegen in gegensätzlicher Orientierung, wobei sie eine gemeinsame 5' flankierende Region benutzen. Auf dieser befinden sich Enhancer Elemente, an die Substrate binden können. Somit werden beide Gene gemeinsam reguliert. CYP1A1 mRNA weist eine Länge von 2.8 kb auf [66], während die genomische DNA 7 Exons beinhaltet. Das Protein besteht aus 512 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 58 kDa [66].

CYP1A1 wird vorwiegend in extrahepatischen Geweben exprimiert und in vereinzelt Fällen - meist erst nach Induktion - in der Leber [67, 68]. Die Expression der Cytochrom-P450-Enzyme Isoformen wird über Interaktionen der cis-aktiven Elemente an den CYP Genen mit den DNA-bindenden, trans-aktiven Faktoren reguliert. Das *CYP1A1* verfügt über mehrere Cis-Elemente mit verschiedenen Funktionen [69, 70], von denen das auf die Xenobiotika ansprechende Element (*xenobiotic responsive element*, XRE) als Enhancer fungiert. Es wurden sechs XRE Sequenzen (Abbildung 5) in breiten Bereichen der 5' flankierenden Region gefunden, die alle das CACGC Motiv enthalten [69, 71]. Das auf die Glukokortikoide ansprechende Element (*glucocorticoid-responsive element*, GRE) funktioniert im Zusammenhang mit dem XRE ebenfalls als Enhancer und wurde im ersten Intron des *CYP1A1* Gens der Ratte gefunden [72]. Eine entsprechende homologe Sequenz befindet sich auch im humanen *CYP1A1*. Der nukleare Transkriptionsfaktor Oct-1 bindet im 5' Bereich des Gens an ein negatives regulatorisches Element (NRE) und unterdrückt die Expression [73]. Das NRE wurde ca. 800 Basen vor dem Transkriptionsstart lokalisiert und besteht aus einem ATGCAAAA Oktamer. Das für die basale Transkription verantwortliche Element (*basic transcription element*, BTE) ist essentiell für die vollständige Aktivierung des *CYP1A1* [74] und wurde in der 5' UTR nachgewiesen.

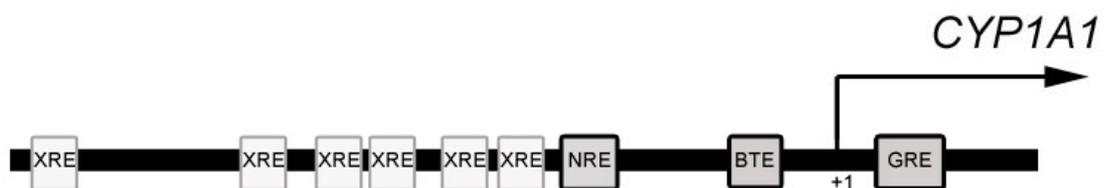


Abbildung 5: Die regulatorischen Elemente des *CYP1A1*

Es sind die Transkription des *CYP1A1* beeinflussende Elemente schematisiert. An die XRE-Segmente binden die Heterodimere aus AhR und ARNT. Der Glukokortikoidrezeptor erkennt die im ersten Intron befindliche Erkennungssequenz GRE. Weitere Erläuterungen im Text.

Die Cytochrom-P450-Enzyme der CYP1-Familie unterliegen einer Induktion der Transkription über den Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor (AhR), an den die Induktoren binden [75]. Der Rezeptor stellt ein regulatorisches Protein im Cytoplasma dar und gehört der PER-ARNT-SIM (PAS) Familie der Transkriptionsfaktoren an. Über diesen Signalweg werden mehrere Gruppen von Enzymen gemeinsam induziert; neben den CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 werden auch die Glutathiontransferase der alpha-Familie, eine UDP-Glucuronosyltransferase der 1-Familie, die NAD(P)-Menadion-Oxido-Reduktase, eine Aldehyddehydrogenase und die N-Myristoyltransferase 2 in ihrer Synthese verstärkt [75, 76, 77, 78]. Als Induktoren fungieren die planaren polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe wie das 3-Methylcholantren, Benz(a)anthracen, Benzo(a)pyren sowie zahlreiche polychlorierte oder polybromierte Biphenyle, Dibenzofurane und polychlorierte Dibenzo-p-dioxine, wobei das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) extrem potent ist [79]. Im Zellinneren (s. Abbildung 6) werden die Fremdstoff-Moleküle an den Ah-Rezeptor gebunden, der wiederum an das Hitzeschock Protein Hsp90 gebunden ist. Daraufhin dissoziiert das Hsp90 vom AhR ab und der Ligand-Rezeptor-Komplex bindet an den ARNT (Ah-Rezeptor nukleärer Translokator), woraufhin ein Transport in aktivierter Form in den Zellkern stattfindet, wo der Komplex schließlich an die entsprechenden Enhancer-Elemente der DNA andockt. Durch die AhR aktivierte Gen-Batterie wird die Transkription der oben genannten Enzyme induziert. Das Ausmaß der Induktion des jeweiligen Fremdstoffes wird zusätzlich durch die Existenz von Kontrollgenen in der Nähe der exprimierenden Zonen beeinflusst, die bewirken, dass nicht jeder Induktor gleichermaßen jedes Enzym der Ah-Gen-Batterie induziert. Außerdem ist der AhR an zellspezifischer Modulation von Wachstum und Differenzierung beteiligt, indem er in entsprechende Signalkaskaden der Apoptose eingebunden ist [80]. Die zugrundeliegenden Mechanismen werden noch untersucht. Die Enzyminduktion tritt bereits nach einmaliger, jedoch wesentlich stärker nach längerfristiger Aufnahme der Fremdstoffe auf. Durch persistente Liganden

wie Dioxine kommt es wahrscheinlich zur Entgleisung dieser Homöostasefunktionen und zu toxischen Wirkungen, wie der Beschleunigung der Kanzerogenese durch Tumorpromotion. Bei Rauchern wurden signifikant höhere Mengen an CYP1A1 und CYP1B1 mRNA detektiert als bei Nichtrauchern [81].

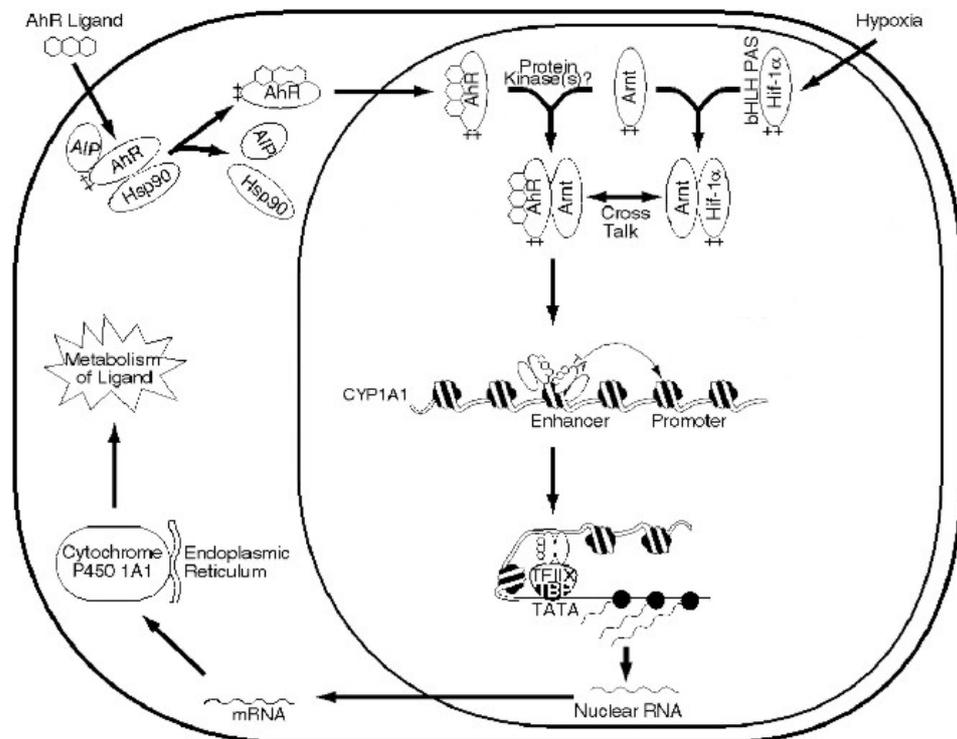


Abbildung 6: Verlauf eines Regulationsweges

Gezeigt ist die AhR-vermittelte Regulation des CYP1A1 nach Whitlock et al. [75].

Die CYP1A Gene können auch posttranskriptionell reguliert werden. Es wurde an Rattenlebern gezeigt, dass Pyridin die Konzentration der CYP1A1/2 mRNA durch deren Stabilisierung erhöht [82]. Generell scheint die CYP1A1 mRNA weniger stabil zu sein, wie an der HepG2 Zelllinie gezeigt wurde [83]. Es wurde nachgewiesen, dass der poly(A)-Schwanz am 3'-Terminus der mRNA im Vergleich zu mRNAs anderer Cytochrom-P450-Enzyme sehr schnell deadenyliert wird. Während die CYP2E1 mRNA eine Halbwertszeit von mehr als 24 Stunden aufwies, lag die Hälfte der CYP1A1 mRNA bereits nach 2.4 Stunden im degradierten Zustand vor.

### 2.3.2 Cytochrom P-450 1B1

Die Cytochrom P-450 1B1 (CYP1B1) mRNA wurde in Lymphozyten, Lungen, Uterus und Leber detektiert [84, 85]. Der Expressionsstatus von CYP1B1 in adulten Leber ist sehr niedrig und lediglich drei von sechs fetalen Lebern exprimierten CYP1B1 [86]. Es zeigt eine erhöhte Expression in vielen humanen Tumoren und scheint eine wichtige Rolle in Tumorentwicklung und Progression zu spielen, da es als potentiell Target für Arzneimittel gegen Krebs, indem es gehemmt wird, sowie als Biomarker für Tumoren fungieren kann [87, 88]. Das Enzym ist verantwortlich für die Metabolisierung von 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen (DMBA) in die Dihydrodiol Epoxide [87]. Außerdem ist es wie alle Vertreter der CYP1-Familie am Stoffwechsel von Koffein und Theophyllin beteiligt [89].

CYP1B1 weist in Hinsicht auf die Sequenz der Nukleinsäuren und Aminosäuren etwa 40% Homologie zu den anderen Vertretern der CYP1 Subfamilie auf. Das CYP1B1 Gen ist 12 kb groß und besteht aus drei Exons und zwei Introns. Es ist auf Chromosom 2p22-21 lokalisiert [90]. Die mRNA beträgt 5.2 kb, der Leserahmen beginnt im Gegensatz zu allen anderen Cytochrom-P450-Enzyme erst im Exon 2. Insgesamt ist diese mRNA die längste aller humaner P-450 mit der

einfachsten Genstruktur [85].

Die Induzierbarkeit des Enzyms wurde noch vor der eindeutigen Identifizierung des verantwortlichen Gens erkannt. Das *CYP1B1* enthält neun XRE Motive in der 5'-UTR und mindestens drei von Ihnen vermitteln die Dioxin-induzierte Transkription des Gens [90]. Das XRE an Position -833 ist essentiell für die konstitutive Expression des *CYP1B1* Gens [91]. Vier regulatorische Elemente sind für die maximale Promotoraktivität notwendig [92]. Es sind die beiden in Gegenrichtung orientierten Sp1-Elemente (-84 bis -89 und -68 bis -73), eine sogenannte TATA-ähnliche Box (-34 to -29), und ein initiatorisches Motiv (-5 to +3). In Abbildung 7 sind die wichtigsten regulatorischen Elemente des Gens schematisiert.



Abbildung 7: Die regulatorischen Elemente des *CYP1B1* Gens

In der 5' flankierenden Region sind 9 XRE-Segmente vorhanden, an die die Heterodimere aus AhR und ARNT binden. INI stellt die initiatorische Einheit dar. Weitere Details sind dem Text zu entnehmen.

Das Gen wird gemeinsam mit den *CYP1A1* und *CYP1A2* Genen über den AhR reguliert. Der Regulationsweg ist in Abbildung 6 dargestellt.

### 2.3.3 Cytochrom P-450 3A4

*CYP3A* ist beteiligt am Metabolismus von über 50% der therapeutisch eingesetzten Medikamente [93, 94, 95]. Meistens ist das *CYP3A4* in eine Kaskade von Enzymen eingebunden, die am Stoffwechsel desselben Medikaments (Tabelle 4) beteiligt sind. Es kann durch die eigenen Substrate in seiner Aktivität beeinflusst werden. Während die Inhibition des Enzyms meist durch sterische Einwirkungen des Substrats (v.a. reversibel, kompetitiv) am Protein verursacht wird, erfolgt die Induktion der Aktivität vorwiegend auf der transkriptionellen Ebene der Proteinbiosynthese. Als primärer Katalysator der Steroid-6 $\beta$ -Hydroxylierung spielt das *CYP3A4* außerdem eine wichtige Rolle in der Steroidhormon-Homöostase [64].

Die humane Cytochrom P-450 3A Subfamilie wurde in Form eines etwa 231 kb großen Clusters auf dem Chromosom 7 am q21.1 lokalisiert und enthält vier funktionelle Mitglieder: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7* sowie das erst vor kurzem beschriebene *CYP3A43* [96, 97, 98]. Während die ersten drei Gene in derselben Richtung gelesen werden, ist die Sequenz von *CYP3A43* in gegensätzlicher Richtung auf dem Chromosom orientiert.

Alle vier Vertreter der *CYP3A* Subfamilie sind in ihren Aminosäuresequenzen sehr homolog. Auch die Basenhomologie der DNA ist vor allem bei *CYP3A4*, *CYP3A5* und *CYP3A7* sehr stark. Die Expressionsmuster der einzelnen Vertreter unterscheiden sich jedoch voneinander. *CYP3A4* ist die am häufigstem vorkommende Isoform dieser Subfamilie in der adulten Leber und stellt insgesamt etwa 30% der Gesamtheit der hepatischen Cytochrom-P450-Enzyme dar [94, 99]. Am fetalen Stoffwechsel scheint dieses Enzym nicht beteiligt zu sein. Es wurden relativ hohe Mengen an *CYP3A4* Protein im Intestinaltrakt gefunden, wo es 70% des Gesamtgehalts der Cytochrom-P450-Enzyme darstellt, und in der Niere [94, 100]. Verschiedene Gruppen haben die Expression von *CYP3A4* mRNA in Leukozyten untersucht und die Berichte darüber waren zum Teil gegensätzlich [101, 102, 103, 104]. *CYP3A5* wird polymorph exprimiert und konnte in 20 bis 30% der adulten Lebern nachgewiesen werden [105, 106] und wird als die hauptsächliche *CYP3A* Isoform in der Lunge und im Darm diskutiert [107, 108]. Wie vor kurzem nachgewiesen wurde, exprimieren lediglich 5 bis 10% der Kaukasier ein funktionstüchtiges *CYP3A5* Enzym [106]. Das *CYP3A7* wurde fast ausschließlich in fetalen Hepatozyten detektiert und spielt in der Biotransformation

adulter Organismen kaum eine Rolle [109]. CYP3A4 wird vor allem in der Leber, Niere und den Hoden exprimiert. Es wurde jedoch auch in anderen Geweben in niedrigen Mengen detektiert [97].

Tabelle 4: Einige Substrate von CYP3A4

Wirkstoffgruppe	Substrate	Inhibitoren	Induktoren	Andere beteiligte Enzyme
Barbiturate Benzodiazepine	Phenobarbital Alprazolam Diazepam		Phenobarbital	CYP2D6 CYP3A5 CYP3A5, 2C8, 2B6, 2C19, UDPGT CYP3A5, 3A7
	Midazolam Triazolam	Midazolam		
Immunsuppressiva	Ciclosporin Tacrolimus	Ciclosporin		
Glukokortikoide	Dexamethason	Dexamethason	Dexamethason	
Antituberkulotika Kalziumantagonisten	Rifampicin Diltiazem Nifedipin Verapamil	Diltiazem Verapamil	Rifampicin	CYP2E1  CYP3A5, 3A7 CYP2C8, 2C9, 1A2
Statine	Cerivastatin Lovastatin Simvastatin	Simvastatin		
Makrolide	Clarithromycin Erythromycin	Clarithromycin Erythromycin		
Taxane	Docetaxel Paclitaxel	Docetaxel Paclitaxel	Paclitaxel	CYP2C8 CYP2C8
Antimykotika Proteaseinhibitoren	Ritonavir Indinavir Saquinavir Nelfinavir Amprenavir Lopinavir	Ketokonazol Ritonavir Indinavir Saquinavir Nelfinavir Amprenavir		FMO CYP2D6 CYP2D6  CYP2C19
NNRTI	Delavirdin	Delavirdin		CYP2D6
	Nevirapin Zidovudin		Efavirenz Nevirapin	CYP2B6
Protonenpumpen- hemmer Xanthine	Omeprazol Lansoprazol Koffein Theophyllin	Omeprazol Lansoprazol	Omeprazol Lansoprazol	CYP2C19 CYP2C19 1A1, 1A2 1A1, 1A2, 2E1

Quellen: [63, 95], <http://medicine.iupui.edu/flockhart>, <http://www.hiv-druginteractions.org/index.htm>, <http://www.anaesthetist.com/physiol/basics/metabol/cyp/a.htm>

Die bis zu 100fachen interindividuellen Unterschiede in der katalytischen Aktivität von CYP3A4 können durch genetische Polymorphismen oder Enzyminduktion verursacht werden [110]. In letzter Zeit mehren sich Berichte über neue Mutationen [111, 112, 113]. Die meisten der bekannten Polymorphismen haben keine Auswirkungen auf die Expression bzw. Aktivität von CYP3A4. Die ein Enhancer-Element betreffende Mutation in der 5' flankierenden Region - Allel *CYP3A4\*1B* – wird in Zusammenhang mit gehäuftem Auftreten von Prostata Tumoren gebracht, es wurde jedoch keine funktionelle Signifikanz gezeigt [114, 115]. Eine Untersuchung von 28 Mutationen im CYP3A4 Gen bei phänotypisierten Probanden fand keine Korrelation zu geringer hepatischer CYP3A4 Expression bzw. Enzymaktivität *in vivo* [116].

Das Gen wird über verschiedene Hormone transkriptionell reguliert, einschließlich der Glukokortikoide, Wachstumshormone und Triiodothyronin sowie über Arzneimittel wie Phenobarbital, Clotrimazol, Mifepriston (RU486) und Rifampicin (Tabelle 4). Der Signalweg der

Induktion ähnelt vom Prinzip dem der AhR vermittelten Aktivierung (Abbildung 6). Rifampicin ist bekannt als einer der stärksten Induktoren der CYP3A4 Expression sowohl *in vivo* als auch in kultivierten Hepatozyten [117, 118, 119, 120]. Die bis zu vierfache Induktion der CYP3A4 Expression durch Rifampicin oder andere Xenobiotika ist die Ursache vieler bekannter Arzneimittelwechselwirkungen und ist von beträchtlicher Bedeutung für Patienten, die einer Kombinationstherapie unterliegen, wie zum Beispiel bei HIV/AIDS.

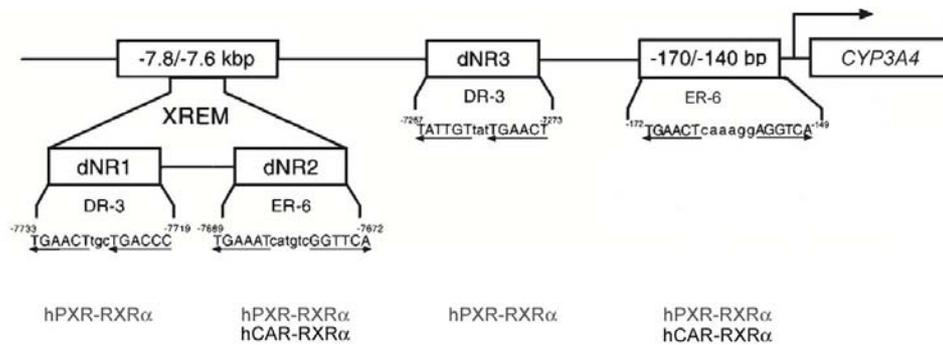


Abbildung 8: Organisation der pharmakologisch bedeutsamen regulatorischen Segmente des CYP3A4 Gens

XREMs stellen Elemente dar, die auf die Xenobiotika ansprechen, DR-3 sind Sequenzen mit direkten Wiederholungen, unterbrochen durch 3 Basen, während ER-6 die umgekehrten Wiederholungen, unterbrochen durch 6 Basen, darstellen. Die Abbildung wurde entnommen und ergänzt aus Sueyoshi und Negishi [121].

Der proximale Promotor des CYP3A4 Gens (Basen -172 bis -149) enthält zwei Kopien der AG(G/T)TCA Hexamere, der Erkennungssequenz für die Familie des Pregnan-X-Rezeptors der Transkriptionsfaktoren [122]. Ein distaler CYP3A4 Enhancer, der ca. -7.8 kbp vom Transkriptionsstart entfernt liegt, enthält drei Erkennungselemente (dNR1, dNR2, dNR3), die das hPXR-RXR- $\alpha$  Heterodimer binden können, zusätzlich zu zwei cis-aktiven Elementen (FP1 und FP2) stromaufwärts der letzten PXR-bindenden Regionen, die essentiell für volle Transaktivierung durch Rifampicin sind [123]. Die Organisation der regulatorischen Einheit des CYP3A4 Gens ist in Abbildung 8 dargestellt.

Der Pregnan-X-Rezeptor (PXR, auch NR112, SXR oder PAR genannt) besteht aus einer Ligand bindenden Domäne mit lipophilem Charakter und einer DNA bindenden Domäne. Der Rezeptor wird über endogene und exogene Liganden aktiviert (Abbildung 7). Weitere Liganden des Rezeptors sind: natürlich vorkommende Steroide wie Pregnenolon und Progesteron, synthetisches Glukokortikoid, Taxol, Hyperforin, Phenobarbital [124, 125, 126]. Kürzlich wurde das Spektrum der PXR-Liganden um die Litcholsäure erweitert, die zu den Gallensäuren gehört, als hepatotoxisch gilt und über die CYP3A Enzyme hydroxyliert wird. Somit trägt die PXR vermittelte Induktion des Enzyms zu einer schnelleren Entgiftung des Körpers bei [127, 128].

Wie in Untersuchungen mit CYP3A4 Reporter-Gen-Konstrukten gezeigt wurde, ist das Heterodimer aus PXR und RXR (Retinoid-X-Rezeptor) essentiell für die transkriptionelle Aktivierung durch Pregnane [129]. In Abwesenheit der Steroide liegt der zelluläre Rezeptor als Monomer vor und ist assoziiert mit einem Hitzeschockprotein-Komplex. Erst die dimerisierte Ligand-Rezeptor Einheit kann in den Zellkern befördert werden. Daraufhin wird mit dem Retinoid-X-Rezeptor ein hPXR-RXR $\alpha$  Heterodimer gebildet, das wiederum mit Transkriptionsfaktoren vor dem CYP3A4 interagiert, wodurch eine Induktion der Genexpression ausgelöst wird. Die Aktivierung des PXR Rezeptors ist speziesabhängig, was auch die unterschiedliche Induzierbarkeit des Menschen und der Maus erklärt [129]. 1996 wurde beschrieben, dass die CYP3A4 Expression mit der vom *MDR1* Gen, welches für das P-Glykoprotein kodiert, koordiniert sein muss [130]. Neuere Erkenntnisse belegen, dass PXR für die Verstärkung der transkriptionellen Aktivierung beider Gene zuständig ist [125]. Das PXR Gen ist selbst induzierbar, seine Induktoren sind die von CYP3A4 (Tabelle 4). Für

Dexamethason, Clofibrat und Isoniazid wurde eine deutliche Aktivierung der PXR-Expression in Ratten beschrieben [131].

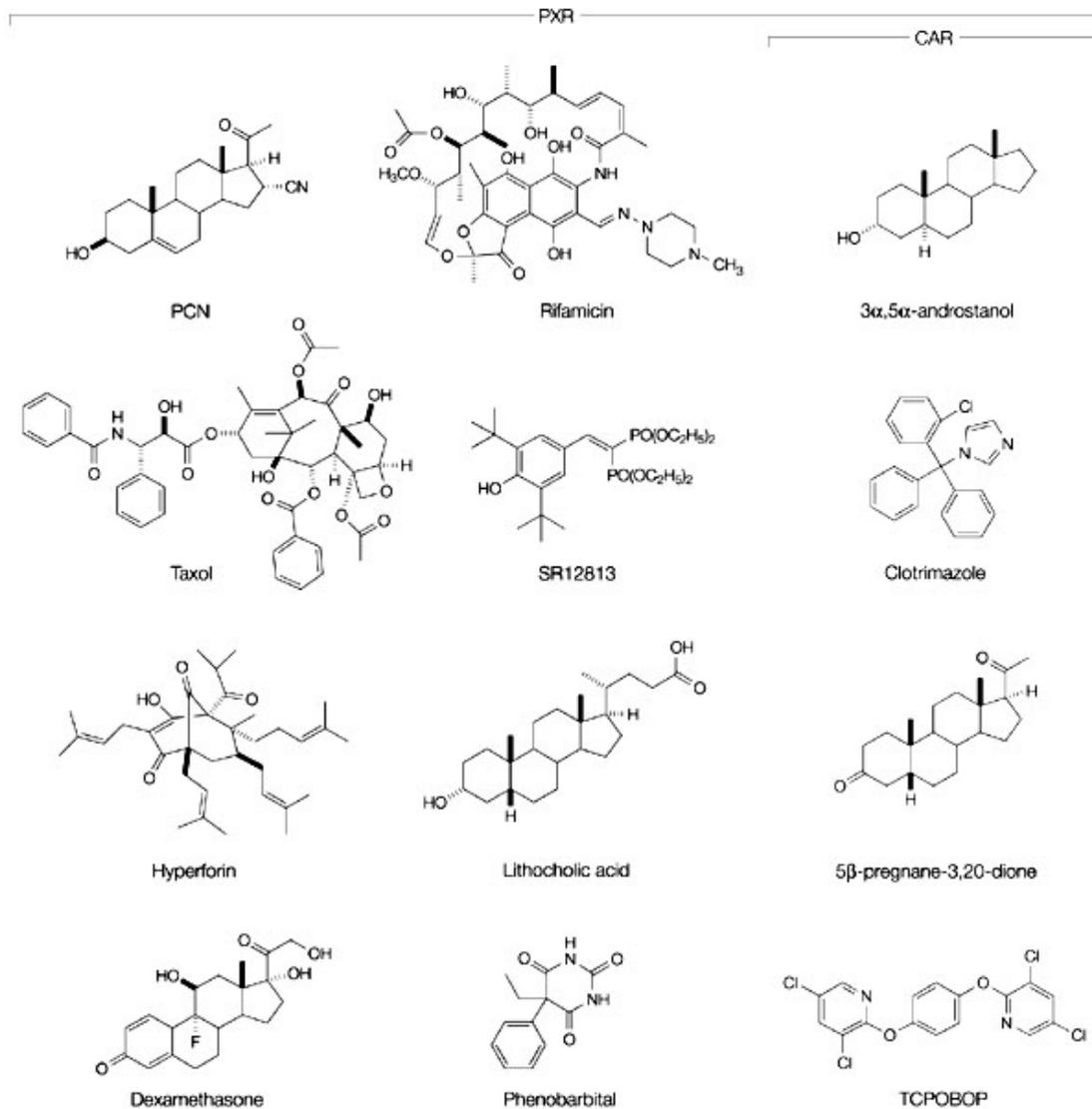


Abbildung 9: Liganden des Pregnan-X-Rezeptors und des Konstitutiven Androstan Rezeptors  
Entnommen aus Willson et al. [126].

Neben dem PXR spielt bei der CYP3A4 Aktivierung auch der Glukokortikoid-Rezeptors (GR, auch NR3C1) eine Rolle. Dexamethason ist ein bekannter Ligand des Rezeptors und bindet an das Heterodimer aus GR und hsp90. Anschließend dissoziiert das Hitzeschockprotein ab und der Ligand-Rezeptor-Komplex wird in den Nukleus transportiert, wo der Rezeptor die Transkription passender Gene auslösen kann. Klassische Gene, die eine GRE Sequenz besitzen, sind die Tyrosin-Aminotransferase oder das Säuger Tumor Virus MMTV [132]. Im Fall von CYP3A4, ist der GR nicht obligatorisch für die Regulation des Gens [133].

Der konstitutive Androstan Rezeptor (CAR, NR1\_13) spielt ebenfalls eine Rolle in der transkriptionellen Aktivierung der CYP3A Gene. Eigentlich kontrolliert dieser Rezeptor die Expression der Alkohol-Dehydrogenase-3 Gene, wo er in Abwesenheit von Liganden transkriptionell aktiv ist. Die Bindung der Liganden (z. B. Androstenol) führt zur Suppression der Transkription [134]. Er liegt in angereicherter Form in der Leber vor, ist strukturell verwandt mit

dem PXR und bildet im Fall der CYP3A4 Regulation ein Heterodimer mit dem RXR [135, 136]. CAR wird, ähnlich wie GR, erst nach der Bindung des Liganden in den Nukleus transportiert [137]. Über diesen Signalweg wurde eine bis zu 13fache Induktion beobachtet. Die CAR-RXR Heterodimere binden an die ER6 Elemente im CYP3A4 Promotor. Die Induktion der CAR mRNA durch Glukokortikoide wie Dexamethason kann die transkriptionelle Aktivierung von CYP3A4 unterstützen [135]. Es kann von funktionellen Überkreuzungen aller drei Mechanismen (GR-, PXR- und CAR- vermittelte Induktion) der Initiation der Transkription ausgegangen werden.

Über den PXR-Signalweg werden neben CYP3A4 und MDR1 weitere Gene reguliert: CYP3A5, CYP3A7, CYP2C8 und CYP2B [123, 125, 138]. Die Expression des konjugierenden Enzym des Phase II Metabolismus Dehydroepiandrosteron-Sulfotransferase wird ebenfalls über den PXR-Signalweg reguliert [139].

Die CYP3A Gene können auch posttranskriptionell reguliert werden. Zanger und Mitarbeiter zeigten 1997, dass das häufig verwendete Lösungsmittel Dimethylsulfoxid die Proteinmenge der CYP3A und CYP2E1 Enzyme erhöht, was auf einen posttranskriptionellen Mechanismus zurückgeführt werden konnte [140]. Dieselbe Arbeitsgruppe bewies ein Jahr später, dass das DMSO die Degradation der betroffenen Proteine hemmt und deren Aktivität fördert [141]. Eine weitere posttranskriptionelle Regulation wurde für die Aktivierung durch die Makrolidantibiotika Triacetyloleandomycin, Clotrimazol und Erythromycin beschrieben, die entweder über mRNA- oder Protein-Stabilisierung erfolgen könnte [142, 143].

## 2.4 P-Glykoprotein

Die Superfamilie der ATP-bindenden Transporter, zu der das P-Glykoprotein (MDR1) gehört, enthält membranständige Proteine, die eine Vielzahl der Substrate über extra- und intrazellulären Membranen befördern. Die Mitglieder werden nach ihrer Sequenzhomologie in der Nukleotid-bindenden Domäne und den phylogenetischen Analysen in verschiedene Subfamilien unterteilt: ABCA bis ABCG. Die ABCA-Subfamilie (*ABC1*) besteht aus 12 Transportern, die wiederum aufgrund der Homologien in intronischen Bereichen in zwei weitere Subgruppen unterteilt werden. Diese Proteine werden in allen Eukaryoten mit Ausnahme der Hefen synthetisiert. Die beiden größten Vertreter der ABC-Familie, *ABCA1* und *ABCA4* wurden intensiv untersucht und sind für den Cholesterol- bzw. Vitamin A-Transport zuständig. Die *ABCB*-Subfamilie ist für die Säuger charakteristisch und enthält 4 sogenannte volle Transporter sowie 7 Halb-Transporter, welche über Heterodimerbildung mit einem anderen Mitglied der Familie (z.B. *ABC2* und *ABC3*) ihre Funktionalität erhalten. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte *ABCB1* (*PGY1*, im folgenden *MDR1* genannt) ist ein vollständiger Transporter, wurde am Genlokus q21.1 des Chromosom 7 kartiert und besteht aus 28 Exons mit einer 4.5-kb-mRNA [144]. Das Protein ist 170 kDa groß und besteht aus zwei Hälften, wovon jede eine hydrophobe transmembranäre Region besitzt sowie eine Domäne, die ein Nukleotid binden kann. Beide Hälften bestehen aus der gleichen Anzahl an Exons und man nimmt an, dass das gesamte Gen aus einer Fusion zwei verwandter Gene entstanden ist, die jedoch für selbständig funktionierender Proteine kodierten [144]. Seine Funktion liegt im Export der Substanzen mit überwiegend lipophilen, neutralen bis kationischen Eigenschaften vom Inneren der Zelle und von den Membranen nach Außen durch den sogenannten flip-flop Mechanismus [145]. Etwa 30% aller Arzneimittel werden über *MDR1* transportiert. Das System wird für das Therapieversagen während und nach der Krebsbehandlung durch Chemotherapie verantwortlich gemacht, wobei die Überexpression des Gens in Tumorzellen einen wichtigen Faktor darstellt [146]. Diese sogenannte Multidrug-Resistenz ist verantwortlich für etwa 50% der Therapieversager der Chemotherapie.

Die physiologische Funktion des *MDR1* in der Abwesenheit der Therapeutika oder Toxine ist noch nicht vollständig geklärt. Studien an *MDR1A* knock out Mäusen haben gezeigt, dass die Tiere normale Lebensfähigkeit, Fertilität sowie biochemische und immunologische Parameter aufweisen [147]. Neuere Erkenntnisse zeigen auch eine Beteiligung von *MDR1* an der Apoptose, dem programmierten Zelltod [148]. Außerdem wird angenommen, dass im Falle eines genetisch bedingten Defekt am *ABCA1* Genprodukt, welches zum Fettstoffwechsel wesentlich beiträgt, unter anderem das *MDR1* Gen aktiviert wird und den Transport von Cholesterol und Phospholipiden übernimmt [149]. Das *MDR1* zeichnet sich durch eine sehr breite Substratspezifität aus (Tabelle 5). Viele der CYP3A4 Substrate bzw. ihrer Metabolite werden durch das *MDR1* aus der Zelle herausbefördert, wie es am Beispiel von Indinavir gezeigt wurde [150]. Im Gastrointestinaltrakt bewirken P-Glykoproteine eine Absorptionshemmung durch Zurückpumpen von Pharmaka in das Darmlumen. In der Leber führt *MDR1* zu einer verstärkten Elimination in die Galle, außerdem wird die renale Elimination gefördert. *MDR1* wirkt im Bereich der Blut-Hirn-Schranke einer

intrazerebralen Penetration von Substanzen entgegen [151]. Es kann induziert oder inhibiert (z. B. durch Ciclosporin A, Verapamil, Chinidin, Saquinavir, Ritonavir) werden.

Tabelle 5: Substrate des MDR1 Transporters

Wirkstoffgruppe	Substrate	Lit.
Steroid-Hormone	β-Östradiol Hydrocortison Prednisolon	[152, 153]
Antiöstrogene	Tamoxifen Clomifen	[152]
Neuropeptide	Neurokinin Substanz P Endomorphin 1 und 2	[154]
Zytostatika	Taxol	[155]
Kalziumantagonisten	Verapamil Mibefradil	[156, 157]
Azol-Fungostatika	Ketokonazol Intrakonazol	[158, 159]
Makrolid-Antibiotika	Erythromycin	[160]
Immunsuppressiva	Ciclosporin Tacrolimus	[161, 162]
Antiepileptika	Phenobarbital Lamotrigin	[163]
Antiarrhythmika	Digoxin Amiodaron	[164]
HIV-Proteaseinhibitoren	Indinavir Ritonavir Saquinavir	[33]

Das P-Glykoprotein ist ubiquitär vorhanden mit vorwiegender Expression in der Darmschleimhaut [165], aber auch in den meisten Zellpopulationen des peripheren Blutes. T- und B-Lymphozyten sowie Monozyten/Makrophagen exprimieren MDR1 [166, 167, 168, 169]; es sind die Zellen, die als Targets für HIV-1 Infektionen dienen. Eine in den einzelnen Subpopulationen variierende MDR1 Expression könnte die Resistenz einiger Patienten gegenüber den Proteasehemmern erklären. Untersuchungen an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen von 16 AIDS Patienten haben gezeigt, dass die MDR1 Expression im Verlauf der Erkrankung zunimmt, gleichzeitig aber die Funktionalität abnimmt [170].

Das *MDR1* Gen wird wie das CYP3A4 durch verschiedene Xenobiotika über den PXR-Signalweg reguliert. Im Promotorbereich des Gens sind mehrere Transkriptionsfaktoren (Abbildung 10) zu finden, die zum einen für die basale Expression verantwortlich sind und zum anderen die Genexpression sowohl positiv als auch negativ regulieren können. So befindet sich zwischen -82 und -73 b eine zur Y-box der Histokompatibilität Komplexe der Klasse II (MHCII Gene) homologe Sequenz, die für eine vollständige Funktionalität des MDR1 notwendig ist [171]. Bei - 8 kb wurde ein regulatorisches Cluster gefunden, das Elemente beinhaltet, die eine Induktion via PXR ermöglichen. Aus diesem Bereich ist vor allem ein DR4 Motiv für eine RIF bedingte Induktion erforderlich, da dort der PXR bindet [172]. Wie durch *in vitro* Untersuchungen gezeigt wurde, interagiert das MEF1 Protein (*MDR1-promoter enhancing factor 1*) mit dem 5'-GTCAATCC Element des MDR1 Promotors und verstärkt die Expression des Gens [173]. Dieser Aspekt scheint in der Tumorgenese eine Rolle zu spielen.

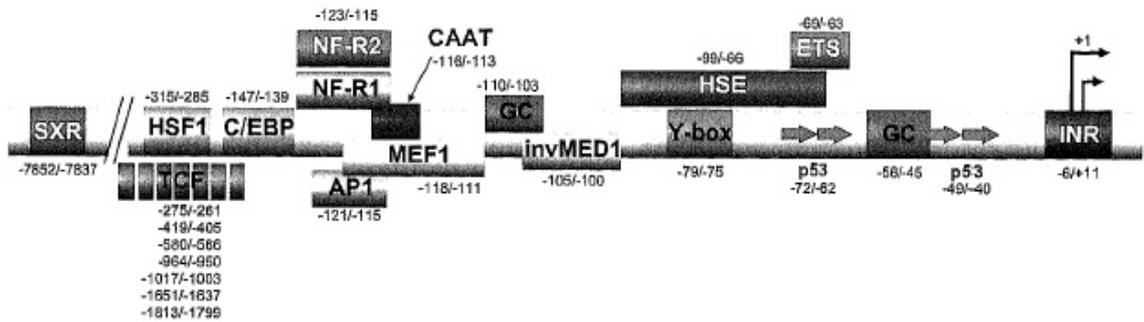


Abbildung 10: Organisation der regulatorischen Einheit des MDR1 Gens

Es sind die Erkennungssegmente für Transkriptionsfaktoren in der nicht translatierten Region am 5' Terminus des Gens dargestellt. Für die Pharmakologie ist vor allem das SXR-Element von Bedeutung, hier bindet das Heterodimer aus hPXR und RXR $\alpha$ . Die Abbildung wurde entnommen aus Labialle et. al. [174]

Das *MDR1* wird polymorph exprimiert, was einen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit vieler Arzneistoffe haben kann [165, 175, 176, 177, 178, 179]. Zur Zeit sind 15 verschiedene *MDR1* Allele bekannt, die z.T. ethnisch verschieden exprimiert werden [178, 179]. Die meisten der bis jetzt bekannten Mutationen liegen in Intronen oder sind stumm, d.h. ohne Aminosäureaustausch als Folge. Drei bekannte Mutationen verändern die Proteinsequenz [175]. Eine stumme Mutation im Exon 26 (C3435T) konnte mit einer verminderten Transportfunktion in Verbindung gebracht werden [177]. Dieselbe Mutation wird hinsichtlich eines veränderten Ansprechens auf die Virustatika diskutiert [180]. Hierbei scheint das T-Allel mit einem erhöhten Anstieg an CD4 Zellen zusammenzuhängen, was für die homozygoten Träger des mutierten Allels einen Vorteil in der HIV-Therapie bringt. Ausgerechnet dieser Polymorphismus tritt häufiger bei den Kaukasiern (T/T: 71 - 74%) denn in der Afrikanischen Population auf (T/T: 27 - 39%) [177, 178].

## 2.5 Alprazolam: Wirkung und Stoffwechsel

Alprazolam (8-Chlor-1-methyl-6-phenyl-4H-1,2,4-triazolol[4,3-a][1,4]benzodiazepin, ALZ) ist ein Benzodiazepinderivat, das seine Verwendung vorwiegend als Tranquilizer findet.

Die Benzodiazepine bilden die zur Zeit wichtigste Gruppe innerhalb der Tranquilizer. Die meisten Substanzen leiten sich von Diazepam (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>CIN<sub>2</sub>O) bzw. dessen Metaboliten ab, wobei der intakte Siebenring für die Entfaltung der Wirkung notwendig ist. Außerdem ist die Lactam-Struktur von Bedeutung. Bei Alprazolam (C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>CIN<sub>4</sub>) wurde ein zusätzlicher Ring eingeführt, der sich in einer veränderten Pharmakokinetik widerspiegelt.

Alprazolam wird über das Cytochrom P-450 3A zu dem Hauptmetabolit  $\alpha$ -Hydroxy-Alprazolam und dem 4-Hydroxy-Alprazolam (Abbildung 11) oxidiert [181, 182, 183]. Neuere, auf *in vitro* Versuchen mit rekombinanten CYP Isoenzymen basierende Erkenntnisse deuten auf eine Beteiligung des CYP3A5 Enzyms bei der Verstoffwechslung zu  $\alpha$ - bzw. 4-Hydroxy-Alprazolam hin. Zudem wurde *in vivo* festgestellt, dass die intrinsische Clearance für die  $\alpha$ -Hydroxylierung von Alprazolam dreifach höher für CYP3A5 als für CYP3A4 ist [184]. Beide Metabolite weisen eine geringere Affinität zu den Benzodiazepin Rezeptoren als die Muttersubstanz auf. Die Metabolite werden nach der Oxidierung glukuronidiert, so dass die Plasmaspiegel der unkonjugierten Form weniger als 10% des Alprazolam betragen [181]. Zur Zeit sind keine anderen Cytochrom-P450-Enzyme bekannt, die am Stoffwechsel von Alprazolam beteiligt sein könnten [185, 186].

Es wurde eine strenge Korrelation zwischen den kinetischen Parametern von Alprazolam, nämlich der Fläche unter der Kurve und den Plasmaspiegeln 6, 8, 10 und 24h nach der Einnahme gezeigt. Dieses ermöglicht eine Bestimmung der CYP3A Aktivität *in vivo* über Messung der Alprazolam-Blutkonzentrationen 10h nach oraler Einnahme von 1 mg [187].

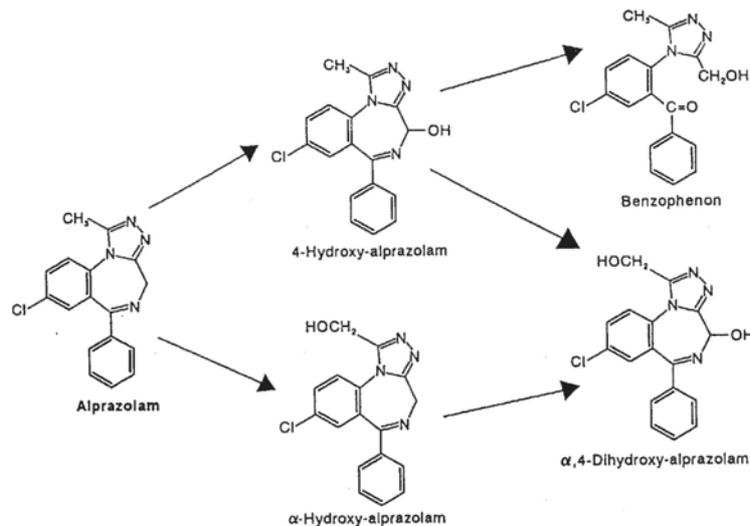


Abbildung 11: Biotransformation von Alprazolam

Es sind die Muttersubstanz sowie die Metabolite dargestellt [188].

Die typischen Inhibitoren des CYP3A4, wie Ketokonazol oder Itrakonazol, haben einen hemmenden Einfluss auf die Pharmakokinetik von Alprazolam [189]. Entsprechend können die CYP3A4 Induktoren den Alprazolam-Metabolismus beschleunigen und die Plasmaspiegel des Medikamentes reduzieren [190]. Auf diese Weise können die induktiven Effekte von Rifampicin auf die CYP3A Aktivität untersucht werden und mit der Induktion der mRNA Expression verglichen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde Alprazolam als Testsubstanz für die *in vivo* Messung der Aktivität von CYP3A mittels HPLC herangezogen.

## 2.6 Aufgabenstellung der Arbeit

Eine Klärung der induktiven Vorgänge, die durch die antiretrovirale Therapie ausgelöst werden, könnte zur vereinfachten Voraussage bzw. Verhinderung der Resistenzentwicklung sowie der Nebenwirkungen beitragen. Außerdem ist es sinnvoll zu erläutern, welche Systeme inwiefern durch ein und dasselbe Arzneimittel induziert werden können. In dieser Arbeit werden zwei Wege der Regulation untersucht: zum einen die Regulation der Transkription der Vertreter der Familie CYP1 über den aromatischen Kohlenwasserstoff-Rezeptor und zum anderen die Aktivierung der CYP3A Gene und des MDR1 Transporters über den Pregnan-X-Rezeptor.

Ob die Wirkung von antiretroviralen Mitteln durch Enzym- bzw. MDR1-Induktion oder durch genetischen Polymorphismus im einzelnen klinisch relevant behindert wird, ist noch unklar. Eine eventuelle Auswirkung der Induktion der Virustatika auf den Therapieerfolg von anderen (Begleit-)Erkrankungen soll diskutiert werden.

Neben den Untersuchungen zum induktiven Potential der Virustatika sollen die molekularen Mechanismen der interindividuellen Variabilität im Arzneistoffwechsel von CYP3A4 geprüft werden. Hierzu wurde eine Studie mit 100 gesunden Probanden durchgeführt. Die Teilnehmer bekamen Rifampicin verabreicht, um die Synthese von CYP3A4 steigern. Als gute Testprobe für HPLC-Untersuchungen zur Aktivitätsbestimmung der CYP3A Enzyme hat sich Alprazolam erwiesen [187] und wurde den Probanden sowohl vor als auch nach der fünftägigen Rifampicin-Induktion verabreicht. Die mRNA Konzentrationen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes sollen mit den pharmakokinetischen Parametern von Alprazolam verglichen werden. Außerdem sollen bekannte CYP3A4 Mutationen durch die Korrelation mit der Enzymaktivität sowie der Enzymexpression auf ihre Funktionalität überprüft werden.

Die Zielstellungen der Arbeit sind die Untersuchungen zur Enzym- und MDR1-Induktion durch HIV-Virustatika und zur Expression von CYP3A Isoenzymen in Lymphozyten sowie die Korrelation mit der Enzymaktivität und bekannten Genotypen. Unter dem methodischen Aspekt, sollen verschiedene RT-PCR Verfahren entwickelt und angewandt werden.

### 3 Material

#### 3.1 Substanzen, Puffer, Lösungen und Medien

Tabelle 6: Verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung	Quelle
TBE	100 mM TrisHCl; 100 mM Borsäure; 2 mM EDTA; pH 8.3 mit NaOH eingestellt	s.u.
310 Genetic Analyzer Puffer	Enthält EDTA	Applied Biosystems
PBS Dulbecco's	Phosphatpuffer	Invitrogen

Tabelle 7: Getestete Medikamente

Substanz	Quelle
Abacavir, Amprenavir, Zidovudin	Glaxo Wellcome
Alprazolam, Delavirdin	Pharmacia & Upjohn
Didanosin, Stavudin	Bristol-Myers Squibb
Efavirenz	DuPont Pharmaceuticals
Indinavir	Merck
Kaletra (Lopinavir, Ritonavir), Ritonavir	Abbot Laboratories
Nelfinavir	Agouron Pharmaceuticals
Nevirapin	Boehringer Ingelheim
Rifampicin	Fatol
Saquinavir, Zalcitabin	Roche

Tabelle 8: Weitere Forschungschemikalien

Substanz	Quelle
2-Propanol, Chloroform, Diethylpyrocarbonat (DEPC), Dimethylsulfoxid (DMSO), Ethanol, Ethidiumbromid-Lösung, Phenol, EDTA (Ethylendiamintetraacetat Dinatriumsalz)	Merck
Borsäure	Calbiochem
NuSieve-Agarosepulver; GelStar, Nukleinsäure Farbstoff	Biozym Diagnostik
ROX-konjugierte Längenstandards: GeneScan-350 und -500, POP 4 (Performance Optimized Polymer 4)	Applied Biosystems
Qualex Gold™ Agarose	Hybaid
TRizol® Reagenz, RNase AWAY	Invitrogen
Minimales Essentielles Medium mit D-Glutamin (DMEM), Trypsin/EDTA, RPMI 1640 Zellkulturmedium, Fötales Rinderserum, Penicillin/Streptomycin, Trypsin/EDTA-Lösung (0,5% / 0,2%)	Biochrom
Glykogen, RNase frei	Roche
100bp und 1kb DNA Marker	MBI Fermentas
dNTP-Na-Salz Lösung	Rapidozym

Tabelle 9: Verwendete Enzyme

Enzyme	Quelle
BseNI, EcoRI, SmaI	MBI Fermentas
BstNI, Msi L	New England Biolabs
M-MuMLV Reverse Transkriptase, Platinum Taq DNA-Polymerase, Taq-DNA Polymerase	Invitrogen
Recombinanter RNasin® Ribonuclease Inhibitor, RQ1 DNase, T4-DNA-Ligase, T7-RNA-Polymerase	Promega

### 3.2 Oligonukleotide

Tabelle 10: Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide

Primer	Position	Sequenz	Genbank
RT1	1521	5' – CAGGAAGAGAAAGAC	NM_000499
1A1-1	1474 bzw. 6787	5' – Fluorescein-GATACACTTCCGCTTGCCCATGC	NM_000499 bzw. X02612
1A1-2	1310 bzw. 6431	5' – Fluorescein- GAAAGGCTTTTACATCCCCAAGG	NM_000499 bzw. X02612
1A1-F1	6494	5' – <b>TATGAATTC</b> TCTGAACTTACTGG	X02612
1A1-F2	6666	5' – <b>TATGAATTC</b> CCCTCTGGTTACAGG	X02612
1A1-ISRT	6787	5' – <b>CAGGAAGAGAAAGAC</b> GATACACTTCCGCTTGC CCATGC	X02612
1A1-IST7	6431	5' – <b>AGAGCGTAATACGACTCACTATAGGGTATCT</b> <b>GCAGAGAAAGGCTTTTACATCCCCAAGG</b>	X02612
1B1-1	1312 bzw. 4745	5' – CGGCTGGATTTGGAGAACGTACC	NM_000104 bzw. U56438
1B1-2	1490 bzw. 7955	5' – ATAGGGCAGGTTGGGCTGGTCAC	NM_000104 bzw. U56438
1B1-F1	4873	5' – <b>TATGAATTC</b> GAGGAGAAAAGACCTG	U56438
1B1-F2	7882	5' – <b>TATGAATTC</b> GTGCAGACTCGAGTGC	U56438
1B1-ISRT	7955	5' – <b>GCCTTCCTTTATGAA</b> ATAGGGCAGGTTGGGC TGGTCAC	U56438
1B1-IST7	4745	5' – <b>AGAGCGTAATACGACTCACTATAGGGTATCT</b> <b>GCAGACGGCTGGATTTGGAGAACGTACC</b>	U56438
1B1-RT1	1519	5' – GCCTTCCTTTATGAA	NM_000104
dT(15)		5' – TTTTTTTTTTTTTT	
CYP3 FLU	1404	5' – AGTTTCATGTTACGAGAGCAAACCTC Fluorescein	X12387
CYP3 LCR	1380	5' – LC Red640-TGCCAATGCAGTTTCTGGGTCCA Ph	X12387
CYP3A4F	1375	5' – CCTTACATATACACACCCTTTGGAAG	X12387
CYP3A4R	1522	5' – GGTTGAAGAAGTCCCTCCTAAGCT	X12387
Std RTPr	1522	5' – <b>TTTTTTTTTTTTTTTT</b> TGGTTGAAGAAGTCCTCCTA AGCT	X12387
Std T7Pr	1378	5' – <b>AGAGCGTAATACGACTCACTATAGGGTATCT</b> <b>GCAGACCTTACATATACACACCCTTTGGAAG</b>	X12387
dmdr	3166	5' – GAGCATACATATGTTCAAACCTC	NM_000927
umdr	3021	5' – CCATCATTGCAATAGCAGG	NM_000927
MDR1 FLU	3103	5' – TGGGAAGATCGCTACTGAAGCAAT Fluorescein	NM_000927
MDR1 LCR	3133	5' – LC Red640-AACTTCCGAACCGTTGTTTCTTTGA Ph	NM_000927
Mdr1Std RTPr	3166	5' – <b>TTTTTTTTTTTTTTTT</b> TGAGCATACATATGTTCAAAC TTC	NM_000927
Mdr1Std T7Pr	3021	5' – <b>AGAGCGTAATACGACTCACTATAGGGTATCT</b> <b>GCAGACCATCATTGCAATAGCAGG</b>	NM_000927
β2MGas	350	5' – CATGTCTCGATCCCACTTAAC	NM_004048
β2MGse	113	5' – CCAGCAGAGAATGGAAAGTC	NM_004048
β2M-705	140	5' – LC Red705- ATGAAACCCAGACACATAGCAATTCAG Ph	NM_004048
β2M-FL	170	5' – TTCTTCAGTAAGTCAACTTCAATGTCGGA X	NM_004048
3A4*1B_F	705	5' – AGGACAGCCATAGAGACAAGGCCA	AF181105
3A4*1B_R	863	5' – AATCACACACACACCACTCACGGAC	AF181105
3A4*3_F	23184	5' – CGTGGAACCAGATTCAGC	AF280107
3A4*3_R	23452	5' – GGCCCAGAGAACAATTAGTA	AF280107
3A5*3_F	260144	5' – TAAAGAGCTCTTTTGTCTTCCA	NG_000004.2
3A5*3_R	260404	5' – GGAGTTGACCTTCATACGTT	NG_000004.2
mep-f	19041	5' – AATTACAACCAGAGCTTGGC	NT_030059
mep-r	19187	5' – TATCACTTTCATAAAAGCAAG	NT_030059

Kursiv und fett hervorgehoben sind die zusätzlich eingefügten Sequenzen  
Ph Phosphorylierung

LC Red640 und LC Red705 Fluoreszenz-Marker, Emission der Absorption bei 640 bzw. 705 nm

Alle benutzten Primer wurden mit Hilfe der „Oligo“-Software ausgesucht, auf die Spezifität mit dem „BLAST“-Programm geprüft und durch die Firma TibMolbiol synthetisiert. Design und Synthese der Hybridisierungssonden für den LightCycler erfolgten bei TibMolbiol. In Tabelle 10 sind die verwendeten Primer mit der Positionsangabe in der entsprechenden Sequenz (cDNA bzw. genomische DNA) aus der EMBL-Genbank aufgelistet

### 3.3 Zelllinien

Die Tabelle 11 veranschaulicht die Charakteristika der benutzten Zelllinien humanen Ursprungs. Bei allen Zelltypen handelt es sich um adhärenz wachsende Monolayer. Alle Zellen wurden über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, bezogen.

Tabelle 11: Charakteristika der verwendeten Zellkulturen

Zelllinie	Gewebe	Morphologie	Ursprung
HeLa	Adenokarzinom, Zervix	Epithelial	1951, 31jährige Schwarze
HepG2	Hepatozelluläres Karzinom, Leber	Epithelial	1975, 15jähriger Kaukasier
Caco-2	Kolorektales Karzinom, Darm	Epithelial	1974, Kaukasier
COLO-320	Kolorektales Adenokarzinom, Darm	Epithelial	1977, 55jähriger Kaukasier

### 3.4 Verwendete Kits

BCA Protein Verfahren Kit	Pierce Chemicals Co.
BigDye Terminator cycle sequencing kit	Applied Biosystems
SNAP™ Total RNA Extraction Kit	Invitrogen

### 3.5 Computerprogramme

310 Data Collection Software	Applied Biosystems
BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/</a>
Chromas	<a href="http://technelysium.com.au/chromas.html">http://technelysium.com.au/chromas.html</a>
DNASIS für Windows 2.1	Hitachi
GeneDoc	<a href="http://psc.edu/biomed/genedoc">http://psc.edu/biomed/genedoc</a>
Genescan Analysis Software	Applied Biosystems
LightCycler Analysis Software 3.1	Roche
LightCycler Run Software 3.5	Roche
Magellan	Tecan
Oligo 6.50, Primer Analysis Software	Molecular Biology Insights
Sequencing Analysis Software 3.1	Applied Biosystems
SPSS für Windows 10.0	SPSS

### 3.6 Datenbanken

Aniretrovirale Mittel und Interaktionen	<a href="http://www.hiv-druginteractions.org/">http://www.hiv-druginteractions.org/</a>
ATP-bindende Proteine	<a href="http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm">http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm</a>
CYP Arzneimittel- Interaktionen	<a href="http://medicine.iupui.edu/flockhart/">http://medicine.iupui.edu/flockhart/</a>
CYP3A4 Allele	<a href="http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp3a4.htm">http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp3a4.htm</a>
REBASE™, Restriktionsenzym-Datenbank	<a href="http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html">http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html</a>

### 3.7 Geräte

ABI310 Prism Sequenziergerät	Applied Biosystems
Biophotometer	Eppendorf
EagleEye Photoimager	Stratagene
Elektrophoresammern	BioRad und Pharmacia
Elektrophoresenetzgerät	Renner
Gewebe-Homogenisierer Potter	Braun
LightCycler™	Roche
Megafuge 1,0R	Heraeus
Mikroskope	Leitz
Mikrowellengerät	Siemens

SLT ELISA Reader  
Sterilwerkbank Laminair und Brutschrank  
Thermocycler PE9700  
Tischzentrifuge, 5415C

Tecan  
Heraeus  
Applied Biosystems  
Eppendorf

### **3.8 Sonstiges Zubehör**

Kapillaren für ABI310, 47 cm x 50 µm  
Sterile, gefilterte Pipetenspitzen  
Kapillaren für LightCycler  
Ultrafree<sup>®</sup>-Säulen  
UV-Küvetten  
Vacutainer<sup>®</sup> cpt System  
Kulturflaschen und Zellkulturplatten  
Einfrierröhrchen, 1.8 ml  
Übliches Verbrauchsmaterial (Eppendorfgefäße, PCR-Platten, Pipetenspitzen...)

Applied Biosystems  
Biozym und Greiner  
Roche  
Millipore Corporation  
Eppendorf  
Becton Dickinson, Heidelberg  
BD Falcon  
Greiner

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultivierung

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei etwa  $-170\text{ °C}$  gelagert und nach Bedarf unter der Sicherheitswerkbank aufgetaut. Es wurden etwa  $1 \times 10^7$  Zellen pro 260 ml Kulturflasche kultiviert, indem sie in 15 ml Medium (s. Tabelle 12) aufgenommen wurden. Dem Medium wurde Kälberserum zugesetzt, das Wachstumsfaktoren enthält, sowie die Antibiotika Penicillin und Streptomycin. Alle benötigten Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch auf  $37\text{ °C}$  vorgewärmt. Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre bei konstant  $37\text{ °C}$  und  $5\%$   $\text{CO}_2$  im Brutschrank kultiviert. Kurz vor dem Erreichen der Konfluenz, d.h. wenn fast die gesamte Oberfläche mit den Zellen bedeckt war, wurden die Zellen subkultiviert, indem sie zunächst mit PBS mehrmals gewaschen, um anschließend mit einer Trypsin-EDTA Lösung vom Flaschenboden gelöst zu werden.

Tabelle 12: Wachstumscharakteristika der Zellkulturen

Zelllinie	Verdopplungszeit	Medium	Serum
HeLa	48 h	DME Medium mit Glutamin	10 % Kälberserum
HepG2	50 h	RPMI 1640 Medium	10 bzw. 5 % Kälberserum
Caco-2	80 h	DME Medium mit Glutamin	20 % Kälberserum
COLO-320	38 h	RPMI 1640 Medium	10 bzw. 5 % Kälberserum

Die Testlösungen wurden in Verdünnungsreihen in Methanol angesetzt. Für die Inkubationsversuche wurden Zellkulturplatten mit 6 Kavitäten verwendet. Je  $100\text{ }\mu\text{l}$  der Testlösung wurden auf die Kavitäten pipettiert und ca. 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis das Lösungsmittel vollständig verdampft war. In der Zwischenzeit wurden die Zellen geerntet und in 2.5 ml PBS pro Flasche aufgenommen. Die Zellen wurden vereint und leicht gemischt. Je  $0.5\text{ ml}$  Zellen wurden auf die Substanzen verteilt und auf ein Gesamtvolumen von 2 ml mit Medium vermischt. Ausgehend von der Konfluenz waren stets etwa 1 Million Zellen pro Kavität vorhanden.

Die Zellen wurden 20 Stunden im Brutschrank bei  $37\text{ °C}$  inkubiert, wobei die Platten nach einer Stunde nochmals geschwenkt wurden, um eine vollständige Lösung der Testsubstanzen im Medium zu gewährleisten. Ein Kontrollansatz aus Medium und Testlösung wurde mitgeführt und die Löslichkeit der Substanzen im Versuchsansatz spektralphotometrisch geprüft.

Die Medikamente wurden als Reinsubstanzen verwendet (s. 3.1), mit Ausnahme von Kaletra und Efavirenz (Sustiva), die nur in Form von Weichkapseln zur Verfügung standen. Folgende Arzneimittel wurden in den angegebenen Konzentrationen benutzt:

Substanz	Konzentration [ $\mu\text{g}/\text{Kavität}$ ]		Tagesdosis [ $\mu\text{g}$ ]
	minimale	maximale	
Rifampicin	40	400	60
Abacavir	40	400	60
Didanosin	12.5	125	20
Lamivudin	0.25	250	15
Stavudin	0.25	250	8
Zalcitabin	0.25	250	0.23
Zidovudin	0.25	400	50
Delavirdin	80	800	120
Efavirenz	8	80	60
Nevirapin	40	400	40
Amprenavir	80	800	240
Indinavir	80	1600	240
Kaletra	10	100	240
Nelfinavir	0.8	1600	225
Ritonavir	20	1600	120
Saquinavir	0.8	450	360

Die errechneten Tagesdosen bezogen sich auf das Verteilungsvolumen in der Zellkultur (2.5 ml) und wurden von bekannten Tagesdosen heruntergerechnet, ausgehend von einem

durchschnittlichen Verteilungsvolumen des Menschen von 20 Liter (Anteil der extrazellulären Flüssigkeit im Körper).

Bei den Inkubationsversuchen der Zellkulturen über 40 und 72 Stunden wurden die Substanzen auf separaten Platten in den entsprechenden Konzentration vorbereitet, mit Medium gemischt und auf die zuvor mit PBS gewaschenen adhären Zellen gegeben.

Nach der Inkubationszeit wurde in einem Festphasenverfahren aus den Zellen Gesamt-RNA gewonnen.

## 4.2 Durchführung der Studie

In die Studie zur Untersuchung der CYP3A Aktivität wurden 102 gesunde Probanden (67 männlich, 35 weiblich) eingeschlossen<sup>1</sup>. Alle Teilnehmer waren Nichtraucher im Durchschnittsalter von 28 Jahren ( $\pm 7$ ) und mit einem mittleren Gewicht von 77 kg ( $\pm 11$  kg). Bei den Frauen war die Einnahme oraler Kontrazeptiva ausgeschlossen und die Teilnehmerinnen begannen mit der Studie am zweiten und dritten Tag des monatlichen Regelzyklus. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Charité geprüft und genehmigt.

Am Abend des ersten Tages (22:30 Uhr) erhielten die Probanden 1 mg Alprazolam (Tafil®) oral verabreicht und 10 Stunden später wurden Vollblutproben sowohl für die Untersuchung der kinetischen Parameter als auch für die mRNA Messungen entnommen (je 8 ml). Die letzte Mahlzeit des Tages konnte bis spätestens 90 min vor Verabreichen des Alprazolam eingenommen werden. Vom zweiten Tag an bekamen die Probanden 5 Tage lang 450 mg Rifampicin (Eremfat®) täglich oral verabreicht (am Tag 2 um 18:30, Tage 3 bis 6 um 8:30). Am sechsten Tag wurde eine zweite Dosis ALZ (1 mg) um 22:30 gegeben. 10 Stunden später wurde wieder Vollblut entnommen.

Für die mRNA Messungen wurde das Vollblut mit dem Vacutainer cpt System entnommen. Direkt im Anschluss wurden die Leukozyten nach Anweisungen des Herstellers in mehreren Zentrifugationsschritten isoliert und bis zur RNA-Präparation bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

## 4.3 Zytotoxizitätstest

Zur Überprüfung des zytotoxischen Potentials der verwendeten Substanzen wurde der Laktat-Dehydrogenase-Verfahren (LDH) angewandt. Dieser Test greift die Membranintegrität der Zellen nach Behandlung mit Arzneimitteln auf und basiert auf der Bestimmung der LDH-Aktivität im Kulturüberstand. Das im Zytoplasma lokalisierte Enzym gelang im Fall einer Beschädigung der Zellmembran in den Kulturüberstand, wo es kolorimetrisch detektiert wurde. Dabei war die Menge an freigesetztem LDH proportional zu der Zahl der beschädigten oder lysierten Zellen.

Die LDH-Aktivität wird über die enzymatische Umsetzung von Laktat zu Pyruvat erfasst. Das dabei entstehende NADH  $\text{H}^+$  wird zur Reduktion eines Tetrazoliumsals zu Formazan genutzt. Diese Reaktion wird in einem Lesegerät bei 490 nm gegen Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen.

Die Zellen wurden wie unter 4.1 beschrieben in Mikrotiterplatte ausgesät, die Inkubation mit den Arzneimitteln erfolgte in DMEM mit 1% FKS, um den hohen LDH-Hintergrund des Serums zu minimieren. Je 50  $\mu\text{l}$  der zellfreien Überstände wurden in eine frische Mikrotiterplatte überführt, mit 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsgemisch versetzt und zur Farbentwicklung 30 min lichtgeschützt inkubiert. Die Indikatorreaktion wurde durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  HCl 1 N pro Kavität gestoppt und gemessen. Hintergrundkontrolle bildete das Medium. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen, während die maximale Menge an LDH im Überstand durch die Lyse von Zellen mit 1% Triton gemessen wurde. Um einen Einfluss der Testsubstanzen auf die LDH-Aktivität auszuschließen, wurden diese direkt im Medium verdünnt und getestet.

Berechnung (alle Werte abzüglich Hintergrund):

$$\text{Anzahl toter Zellen in \%} = \frac{\text{Probe} - \text{Kontrolle}}{\text{Maximalwert} - \text{Kontrolle}} \times 100$$

---

<sup>1</sup> Die Studie wurde unter der Leitung von Frau Dr. Julia Kirchheiner durchgeführt.

Einen weiteren Hinweis für die Zytotoxizität der Substanzen stellte die erreichte RNA-Ausbeute dar. Da man immer vergleichbare Zellzahl in die Inkubationsversuche eingesetzt hat, sollte die RNA-Ausbeute in einem annähernd gleichwertigem Verhältnis stehen.

#### **4.4 Methoden zur Analyse der mRNA**

In der vorliegenden Arbeit wurden die mRNA-Konzentrationen von CYP1A1, CYP1B1, CYP3A4 und MDR1 mittels der Reversen Transkription Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) bestimmt. Hierfür mussten zunächst die Verfahren etabliert werden. Bei den Genen für CYP1A1 und CYP1B1 wurde eine RT-PCR in zwei Schritten in PCR-Maschinen durchgeführt, während die anschließende Detektion in einer Kapillarelektrophorese am ABI Prism™ 310 Gerät erfolgte. Für die CYP3A4 und MDR1 mRNA wurde eine Echtzeit RT-PCR, ebenfalls in zwei Schritten, am LightCycler™ etabliert. Im folgenden wird auch auf die Extraktionsmethodik der Gesamt RNA näher eingegangen. Da verschiedene Zellsysteme benutzt wurden, wurden unterschiedliche Methoden zur RNA Isolation angewandt.

##### **4.4.1 Extraktionsverfahren zur Gewinnung von RNA**

Vor den Arbeiten mit RNA wurden die Arbeitsflächen mit RNase AWAY gereinigt. Für alle Lösungen wurde RNase freies Wasser benutzt, das zuvor mit Diethylpyrocarbonat angesetzt wurde. Alle Präparationen erfolgten mit sterilen, gefilterten, RNase freien Pipettenspitzen, um eventuellen Kontaminationen vorzubeugen.

###### *4.4.1.1 Extraktion der zellulären RNA aus Zellkulturen*

Die zelluläre RNA wurde in einem Festphasenverfahren mittels des SNAP™ Total RNA Extraktion Kit gewonnen. Die Arbeitsschritte wurden entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt, wobei der Prozedur ein DNase-Verdau angeschlossen wurde, um eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA zu beseitigen. Die gewonnene RNA wurde photometrisch auf ihre Reinheit und Konzentration überprüft und bei -80 °C eingefroren.

Es wurden Stichproben der RNA Proben entnommen und 5 µl in einem 1 %-Agarosegel elektrophoretisch getrennt, wodurch die 18S und 28S rRNA-Banden sichtbar wurden. Bei eventuellen Verunreinigungen mit genomischer DNA müsste diese im hochmolekularen Bereich sichtbar sein während Proteine an den Taschen des Gels zu finden wären. Degradierte RNA würde man am Muster erkennen, da die beiden rRNA-Banden sich durch eine Degradierung zu einem Schmier vereinen würden.

###### *4.4.1.2 Extraktion der zellulären RNA aus Leukozyten*

Die Leukozyten wurden aus 8 ml Frischblut extrahiert, das zuvor in das Vacutainer® cpt System entnommen wurde. In mehreren Zentrifugationsschritten wurden die Leukozyten von Erythrozyten separiert und mit PBS Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

Die zelluläre RNA wurde mit Hilfe der vorgefertigten Lösung TRIzol™ LS nach Anleitung des Herstellers gewonnen. Hierbei handelt es sich um eine Modifizierung des klassischen Phenol-Chloroform Verfahrens zur RNA Extraktion nach Chomczynski und Sacchi [191]. Die Prozedur wurde modifiziert durch Zugabe von 10 ng des RNase freien Glykogens vor der Homogenisierung der Leukozyten. Die RNA Lösung wurde einer 15-minütigen Inkubation mit jeweils 10 U RNase freien RQ1 DNase bei 37 °C unterzogen. Nach der Extraktion wurde die RNA-Ausbeute und Reinheit im Photometer ermittelt. Schließlich wurden die Proben bei -80 °C eingefroren.

###### *4.4.1.3 Gewinnung der zellulären RNA aus Leberproben*

Für die Etablierung der RT-PCR Methode zur Quantifizierung von CYP3A4 mRNA in Leukozyten wurden humane Leberfragmente als Positivkontrolle für starke Expression herangezogen. Drei humane Leberproben wurden vom Institute for the Advancement of Medicine (Exton, PA, USA) bezogen. Die kleinen Leberfragmente wurden durch Homogenisieren zerstückelt. Anschließend wurde das gewonnene Homogenat zur RNA-Isolierung mittels TRIzol™ genutzt.

##### **4.4.2 Bestimmung der RNA-Konzentration**

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration wurden je 50 µl der Proben-RNA entnommen und in der UVette gegen RNase freies Wasser als Leerwert gemessen. Die gemessene RNA

konnte wiederverwendet werden.

Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde über die optische Dichte wie folgt bestimmt:

$$[RNA] = A_{260} \times 40 \quad [ng / \mu l]$$

Die Zahl 40 stellt einen RNA-spezifischen Faktor dar, der einer Lösung mit optischer Dichte von 1 entspricht, die ungefähr 40 ng/ $\mu$ l RNA enthält.

Der Quotient aus der optischen Dichte bei 260 und 280 nm ist ein Maß für die Verunreinigung durch Proteine. Der Wert sollte größer als 1.5 sein, so dass nur RNA gleichmäßiger Reinheit in den Versuchen eingesetzt wird. Alle Proben wurden auf 25 ng/ $\mu$ l eingestellt, portioniert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 4.4.3 Reverse Transkription - Polymerase Ketten Reaktion

Die Regulation der Genexpression kann über Bestimmung der mRNA Konzentrationen überprüft werden. Zur Zeit werden vorwiegend fünf folgende Methoden genutzt: Northern Blotting [192], *in situ* Hybridisierung [193], RNase protection Verfahren [194], cDNA Arrays [195] und Reverse Transkription - Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) [196]. Die Analysen mittels Northern Blotting geben Informationen über mRNA Größe, alternatives Spleißen und die Integrität der RNA Proben. Die RNase protection Verfahren werden benutzt, um die Transkriptionsinitiation und Termination sowie Intron/Exon Banden zu kartieren. Die Technik der *in situ* Hybridisierung ist sehr komplex, allerdings erlaubt sie als einzige die Bestimmung der Lokalisierung der Transkripte in bestimmten Zellen eines Gewebes. Die sensitivste all dieser Methoden ist die RT-PCR, die eine Bestimmung geringster Mengen von Transkripten ermöglicht und Vergleiche in verschiedenen Populationen von Proben zulässt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mengen der mRNA mittels der quantitativen RT-PCR untersucht. Es wurden zwei verschiedene Möglichkeiten der Quantifizierung über die PCR genutzt: die kompetitive RT-PCR sowie die Echtzeit RT-PCR.

##### 4.4.3.1 CYP1A1 RT-PCR

Bei der quantitativen RT-PCR zur Bestimmung der CYP1A1 mRNA Menge handelt es sich um ein auf kompetitiver Verdrängung basierendes Verfahren, in dem die Proben-RNA gemeinsam mit einer definierten Menge sequenzgleicher Standardmoleküle vervielfältigt wird. Die Primer zur Amplifizierung der cDNA wurden so gewählt, dass sie das Intron 6 umspannen, um eine eventuelle Kontamination mit genomischer DNA aus der Auswertung ausschließen zu können. Die Primer 1A1-1 und 1A1-2 (Tabelle 10) ergaben ein Fragment von 177 bp. Die Standardmoleküle waren 17 Basen länger als die CYP1A1 mRNA und somit in der Elektrophorese gut zu unterscheiden (Abbildung 10).

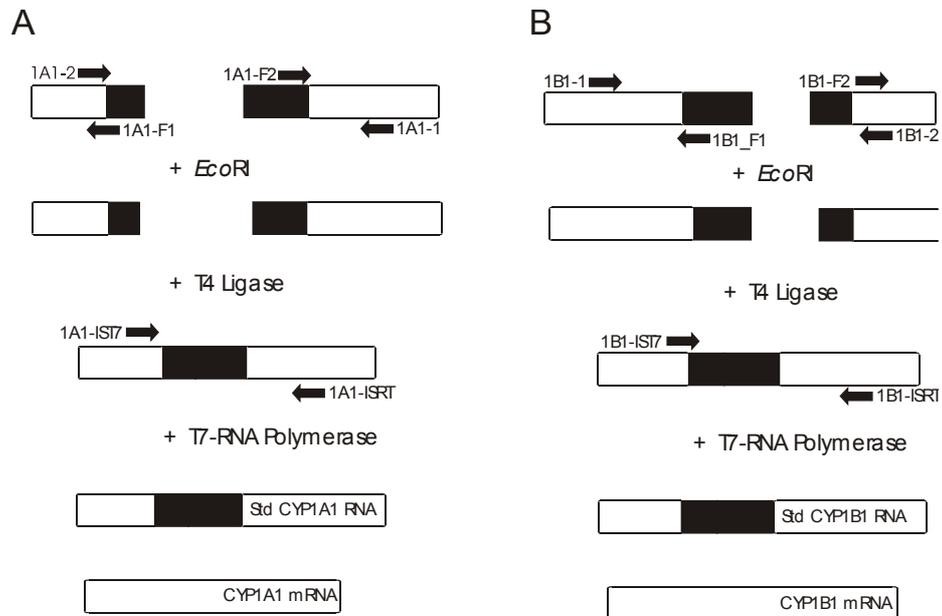


Abbildung 12: Prinzip der Herstellung des externen Standards zur Quantifizierung der CYP1A1 und CYP1B1 mRNA

A: Konstruktion des RNA-Standards für die Quantifizierung der CYP1A1 mRNA

B: Maßnahmen der Herstellung des CYP1B1 RNA-Standards

Die Hauptschritte beinhalten eine Amplifikation zwei Segmente aus der genomischen DNA, eine Restriktionsspaltung der Fragmente als Vorbereitung für die anschließende Ligation und schließlich eine *in vitro* Transkription in die RNA. Die Standardkonstrukte waren um 17 bzw. 32 Basen länger als die entsprechenden mRNA-Fragmente.

Anschließend wurden die Fragmente mit Hilfe der T4-DNA Ligase nach Anleitung des Herstellers verbunden. 3  $\mu$ l des Ligationsansatzes wurden für eine weitere Reaktion verwendet. Das PCR-Gemisch wurde aus folgenden Komponenten in einem Volumen von 30  $\mu$ l zusammengesetzt:

Substanz	Volumen [ $\mu$ l]
10 x Puffer	3
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	1
dNTPs [je 2 mM]	2
Primer 1A1-IST7 [10 $\mu$ M]	4.5
Primer 1A1-ISRT [10 $\mu$ M]	3.5
Taq-Polymerase [5 U/ $\mu$ l]	0.25
Wasser	12.75

Die Reaktionsbedingungen entsprachen denen einer herkömmlichen 35-Zyklen PCR mit Anlagerung der Primer bei 50 °C. Nach der Kontrollelektrophorese der Amplifikate (Bande bei 256 bp) fand eine Aufreinigung der Fragmente in Filtereinheiten statt. Die DNA wurde in 20  $\mu$ l Wasser aufgenommen und im folgenden Schritt der *in vitro* Transkription mittels T7 RNA-Polymerase in die RNA unterzogen. Anschließend wurde die RNA im Phenol-Chloroform Verfahren aufgereinigt, photometrisch gemessen und zu den benötigten Konzentrationen verdünnt.

Die RT-PCR Reaktion fand in zwei Schritten statt. Für die Reverse Transkription (RT) der mRNA wurde die MuMLV Reverse Transkriptase benutzt. Die Reversen Transkriptionen für CYP1A1 und CYP1B1 erfolgten genspezifisch, d.h. es wurde ein sequenzspezifischer Primer benutzt. Zunächst wurden für jede Probe vier RT Ansätze mit verschiedener Konzentration der Standard-RNA angefertigt. Diese wurden auf 100 ng der vorgegebenen Probe gegeben und in einer PCR-Maschine für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Pro Ansatz wurden folgende Komponenten pipettiert:

Substanz	Volumen [ $\mu$ l]
5 x 1. Strang Puffer	4
DTT [0.1 M]	2
dNTPs [je 10 mM]	1
Primer 1A1 RT [10 $\mu$ M]	2
RNase Inhibitor [40 U/ $\mu$ l]	0.2
MuMLV Reverse Transkriptase [200 U/ $\mu$ l]	0.4
sRNA 001	1
Wasser	5.4

Direkt nach der Transkription wurde allen Proben das PCR-Gemisch zugegeben. Dieser bestand aus folgenden Komponenten:

Substanz	Volumen [ $\mu$ l]
10xPuffer	2
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	0.6
dNTPs [je 2 mM]	1
Primer 1A1-1 [10 $\mu$ M]	0.6
Primer 1A1-2 [10 $\mu$ M]	0.6
Taq-Polymerase [5 U/ $\mu$ l]	0.2
Wasser	15

Vorausgegangene Untersuchungen haben ergeben, dass die auf diese Weise zusammengesetzte PCR nach 27 Zyklen noch in der exponentiellen Anstiegsphase ist, so dass dieser Zeitpunkt als geeignet für die quantitative Auswertung der Produkte gewählt wurde. Die Reaktion umfasste einen Denaturierungsschritt bei 94 °C für 2 min, 27 Amplifikationszyklen bestehend aus je 20 s bei 94 °C und 65 °C sowie 40 s bei 72 °C. Nach einer abschließenden 4 min-Elongation erfolgte die Kühlung. Zur Detektion in der Kapillarelektrophorese wurden 4  $\mu$ l der Produkte entnommen. In Abbildung 13 sind die Resultate aus vier PCRs mit unterschiedlichen Standardkonzentrationen und einer RNA-Probe demonstriert. Aus den Signalstärken wurden die Flächen unter den Kurven ausgerechnet und entsprachen der DNA-Konzentration.

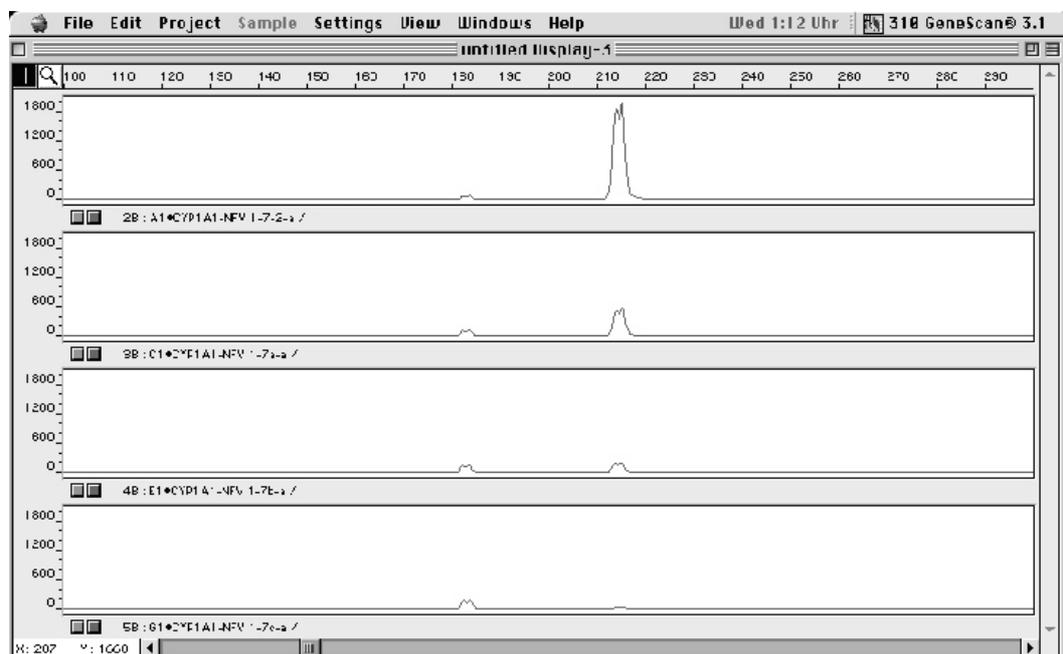


Abbildung 13: Ergebnisse der RT-PCRs für CYP1A1 mRNA einer Probe

Pro RNA-Probe wurden vier RT-PCR Ansätze mit vier verschiedenen RNA-Standardkonzentrationen angefertigt. Auf der Abszisse ist die Größe der Moleküle dargestellt, während die Ordinate die Signalstärke anzeigt (Bildschirmabzug). Die Probe enthielt 85 Kopien mRNA/ng CYP1A1 RNA.

#### 4.4.3.2 CYP1B1 RT-PCR

Die Quantifizierung der CYP1B1 mRNA erfolgte in zwei Schritten und die PCR-Produkte wurden in einer Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Das Prinzip der Quantifizierung der CYP1B1 mRNA gleicht dem zur Bestimmung von CYP1A1 mRNA. Der Standard wurde in 1:10 Stufen verdünnt und den Reaktionsansätzen zugegeben. Das amplifizierte CYP1B1 Segment betrug 201 bp, der kompetitive RNA Standard 233 b (Abbildung 10).

Zunächst wurden in separaten PCRs zwei Fragmente (144 und 87 bp) aus genomischer DNA hergestellt, wobei die Primer 1B1-F1 und 1B1-F2 *EcoRI*-Erkennungsstellen trugen. Nach elektrophoretischer Überprüfung und Aufreinigung (s.o.) wurden beide Produkte mit je 20 U *EcoRI* verdaut. Die gereinigten Amplifikate wurden vereinigt und in einem 20 µl Ansatz mit 1 U T4-Ligase versetzt. In einer weiteren PCR (Primer: 1B1-IST7 und 1B1-ISRT, Anlagerung bei 50 °C) wurden 3 µl des Produktes vervielfältigt. Nach elektrophoretischer Überprüfung wurden die Fragmente aufgereinigt und einer *in vitro* Transkription unterzogen. Die aufgereinigte RNA wurde photometrisch gemessen und die Molekülanzahl ermittelt.

Für die Reverse Transkription wurden 50 ng Proben-RNA genutzt und das Gemisch setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Substanz	Volumen [µl]
5x 1. Strang Puffer	4
DTT [0.1 M]	2
dNTPs [je 10 mM]	1
Primer 1B1 RT [10 µM]	2
RNase Inhibitor [40 U/µl]	0.2
MuMLV Reverse Transkriptase [200 U/µl]	0.4
sRNA	1
Wasser	7.4

Die Ansätze wurden eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde allen Proben das PCR-Gemisch mit folgenden Komponenten zugegeben:

Substanz	Volumen [µl]
10xPuffer	2
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	0.4
dNTPs [je 2 mM]	1
Primer 1B1-1 [10 µM]	0.6
Primer 1B1-2 [10 µM]	0.6
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0.2
Wasser	15.2

Die Anlagerungstemperatur betrug 60 °C und die PCR-Kinetik wurde nach 25 Zyklen beendet. Abschließend wurden 2 µl der Produkte unter den gleichen Bedingungen wie im Fall der CYP1A1 mRNA Detektion elektrophoretisch aufgetrennt. Ein typisches Elektropherogramm zur Quantifizierung der CYP1B1 mRNA ist in Abbildung 14 illustriert.

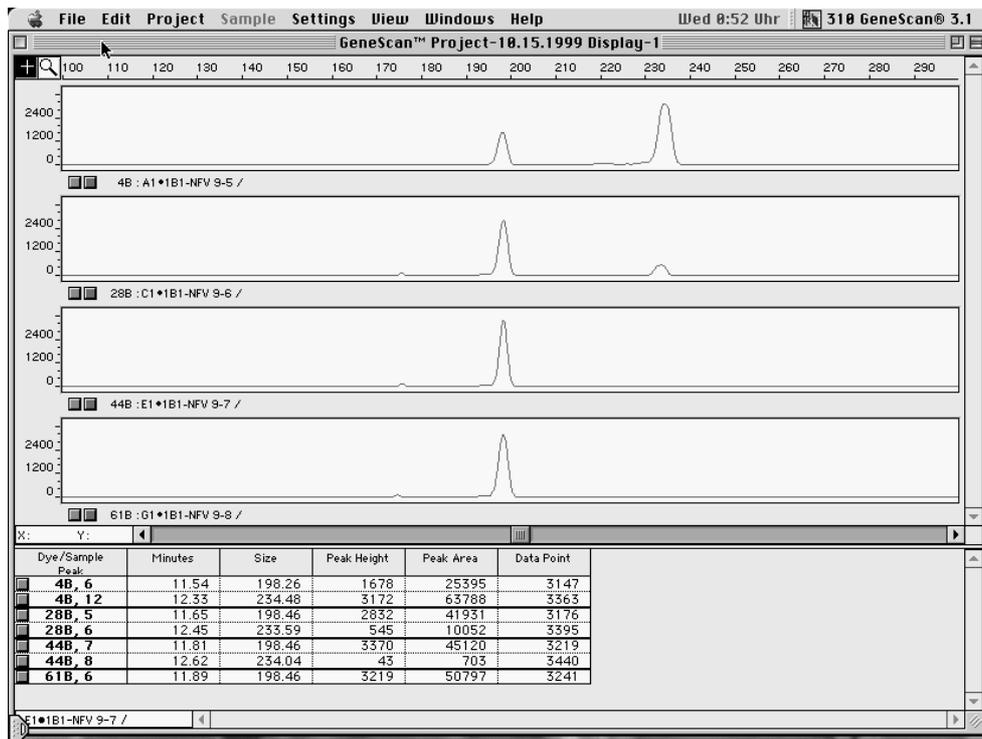


Abbildung 14: Ergebnisse der RT-PCRs für CYP1B1 einer Probe

Pro RNA-Probe wurden vier RT-PCR Ansätze mit vier verschiedenen RNA-Standard Konzentrationen angefertigt. Auf der Abszisse ist die Größe der Moleküle dargestellt (mRNA bei 198 bp, Standard bei 234 bp; Abweichungen von tatsächlicher Größe sind bedingt durch die Elektrophorese), während die Ordinate die Signalstärke anzeigt (Bildschirmabzug). Die Probe enthielt  $1.3 \times 10^4$  Moleküle CYP1B1 mRNA/ng RNA.

#### 4.4.3.3 CYP3A4 RT-PCR

Für die Erfassung der Menge der CYP3A4 mRNA wurde ein Echtzeit-RT-PCR Verfahren am LightCycler System entwickelt [197]. Die Quantifizierung erfolgte über einen externen Standard, der in der Sequenz mit der gemessenen CYP3A4 mRNA identisch war und der in einer Verdünnungsreihe aus bekannten Konzentrationen bei jeder PCR im LightCycler in separaten Kapillaren mitgeführt wurde, nachdem er im selben Ansatz in die cDNA transkribiert wurde.

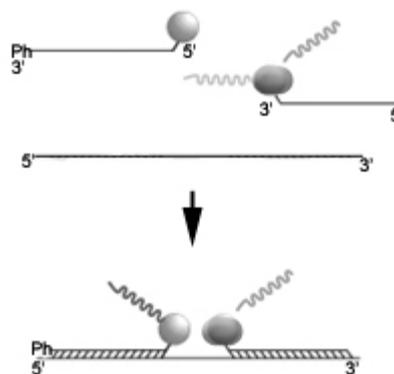


Abbildung 15: Das Prinzip der Detektion der entstehenden PCR-Produkte mittels zwei Hybridisierungssonden

Die PCR fand in einer Glaskapillare statt, die entstehenden DNA-Fragmente werden mit Hilfe einer Fluoreszenzmarkierung detektiert. Für diese Methode verwendet man sogenannte Hybridisierungssonden. Hierbei handelte es sich um zwei Oligonukleotide, die streng komplementär zur gewünschten Matrize in 3'-Richtung lagen. Das Prinzip der Signalübertragung ist in Abbildung 15 demonstriert. Während eine Sonde am 5'-Ende mit einem LC Red (640 bzw. 705 nm) Farbstoff markiert war, trug die zweite Sonde am 3'-Ende ein Fluorescein. Um der Extension an der LC Red-Probe vorzubeugen, war dieses Oligonukleotid am 3'-Ende phosphoryliert. Beide Sonden lagerten sich benachbart zueinander an die während der PCR amplifizierte cDNA an und die Resonanz Energie wurde vom Donor Fluorophor (in diesem Fall das 3'-Fluorescein) zum Akzeptor (5'-LC Red) transferiert [198, 199]. Die Messung erfolgte während der Anlagerung der Primer und der Sonden an die Matrize. Auf diese Weise kann man am Monitor den Verlauf der PCR verfolgen.

Der erste Schritt der Reversen Transkription wurde in einer herkömmlichen PCR-Maschine durchgeführt. Die gesamte mRNA der Zelle wurde mit Hilfe des dT15 Primers in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die CYP3A4 cDNA im LightCycler amplifiziert. Für die Berechnung der Molekülanzahl wurde in gesonderten Kapillaren eine CYP3A4 Standardreihe vervielfältigt. Aus den bekannten RNA-Konzentrationen ließ sich die Anzahl der Moleküle berechnen. Das synthetisierte CYP3A4 RNA Fragment betrug 218 b, was einer Molekülmasse von 71.9 kDa entspricht.

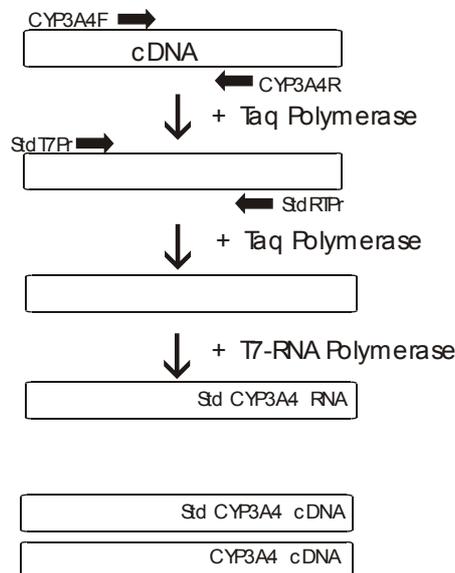


Abbildung 16: Prinzip der Herstellung des externen Standards zur Quantifizierung der CYP3A4 mRNA

Für die Herstellung des Standards (Abbildung 16) wurde zunächst eine konventionelle RT-PCR mit den zuvor für die CYP3A4 Messung optimierten Bedingungen (s.u.) durchgeführt. Anschließend wurde die cDNA über Filtereinheiten entsprechend den Anweisungen des Herstellers gereinigt und in 20 µl Wasser aufgenommen. 4 µl des gereinigten Produktes wurden folgendem Reaktionsgemisch zugegeben:

Substanz	Volumen [µl]
10 x Puffer	3
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	1
dNTPs [je 2 mM]	2
Primer T7Pr [10 µM]	4.5
Primer RTPr [10 µM]	3.5
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0.25
Wasser	12.75

Die Proben wurden unter folgenden Konditionen amplifiziert: 2 min bei 94 °C, 40 Zyklen von 40 s bei 94 °C, 55 °C und 72 °C und anschließenden 4 min bei 72 °C. Nach einer Kontrolle der PCR im

Agarosegel wurden die PCR Produkte erneut über Filtereinheiten gereinigt. Für die 90-min-*in-vitro*-Transkription bei 37 °C wurde die T7 RNA Polymerase entsprechend dem Protokoll des Herstellers benutzt. Die anschließende Behandlung mit RNase freien RQ1-DNase befreite die Proben von evtl. noch vorhandenen DNA. In einer Phenol-Chloroform Extraktion wurde die RNA gereinigt, im Photometer die Konzentration und Reinheit gemessen und die Spezifität des Fragmentes wurde durch DNA-Sequenzanalyse getestet.

Die Bedingungen für die Reverse Transkription waren für CYP3A4, MDR1 und  $\beta$ -Mikroglobulin gleich und der Reaktionsmix enthielt folgende Komponenten:

Substanz	Volumen [ $\mu$ l]
5x 1. Strang Puffer	4
DTT [0.1 M]	2
dNTPs [je 10 mM]	1
BSA [1mg/ml]	0.5
Primer Oligo dT(15) [10 $\mu$ M]	2
RNase Inhibitor [40 U/ $\mu$ l]	0.2
MuMLV Reverse Transkriptase [200 U/ $\mu$ l]	0.4
Wasser	5.9

Die Ansätze wurden wie folgt inkubiert: 10min bei 26 °C, 60 min bei 42 °C, 2 min bei 95 °C, Kühlung auf 4 °C. Direkt im Anschluss wurde die Reaktion am LightCycler mit folgenden Komponenten durchgeführt, wobei 40 ng der cDNA (8  $\mu$ l) vervielfältigt wurden:

Substanz	Volumen [ $\mu$ l]
10xPuffer	0.7
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	0.9
dNTPs [je 2 mM]	0.7
DMSO [100 %]	0.7
BSA [1 mg/ml]	0.6
Primer CYP3A4F [10 $\mu$ M]	0.5
Primer CYP3A4R [10 $\mu$ M]	0.5
Sonde CYP3AFlu [10 $\mu$ M]	0.25
Sonde CYP3ALCred [10 $\mu$ M]	0.25
Platinum Taq Polymerase [5 U/ $\mu$ l]	0.33
Wasser	1.57

Folgende Reaktionsbedingungen stellten sich als optimal heraus: 40 s bei 95 °C, anschließend 45 Zyklen bestehend aus 0 s bei 95 °C sowie je 10 s bei 55 °C und 72 °C. Eine abschließende Elongation war wegen der Detektion in Echtzeit nicht notwendig.

Die Abbildung 17 zeigt Zunahme der Amplifikatmenge im Verlauf der PCR einer Verdünnungsreihe der CYP3A4 RNA Standards. Die lineare Regression der Daten wird aus den logarithmierten Werten für die Konzentration (hier wurde das Gewicht in Femtogramm als Maßstab gewählt) und der Zyklenanzahl des Schwellenwertes ermittelt. Die Werte auf der linken Seite der Standardkurve beschreiben die in der Regressionsgeraden enthaltenen Daten. Diese beruhen auf mathematischen Berechnungen und stehen im Verhältnis zur Reaktion selbst. Die Steigung (slope) wird durch folgende Gleichung mathematisch beschrieben:  $-1/\log E$ , wobei E die Reaktionseffizienz widerspiegelt. Für die Effizienz ist ein Akzeptanzbereich beschrieben. Dieser beträgt das 1.5- bis 2.2-fache der Amplifikation pro Lauf. Wenn das PCR-Produkt in jedem Zyklus verdoppelt wird, beträgt die Effizienz genau 2, was einer Steigung der Standardkurve von  $-3.3$  entspricht. Im Fall von CYP3A4 in Leukozyten wird mit sehr geringen Mengen an Ausgangsmaterial gearbeitet, so dass die mathematischen Beschreibungen der Standardkurve von den für große Mengen an Nukleinsäuren errechneten theoretischen Idealwerten ein wenig abweichen.

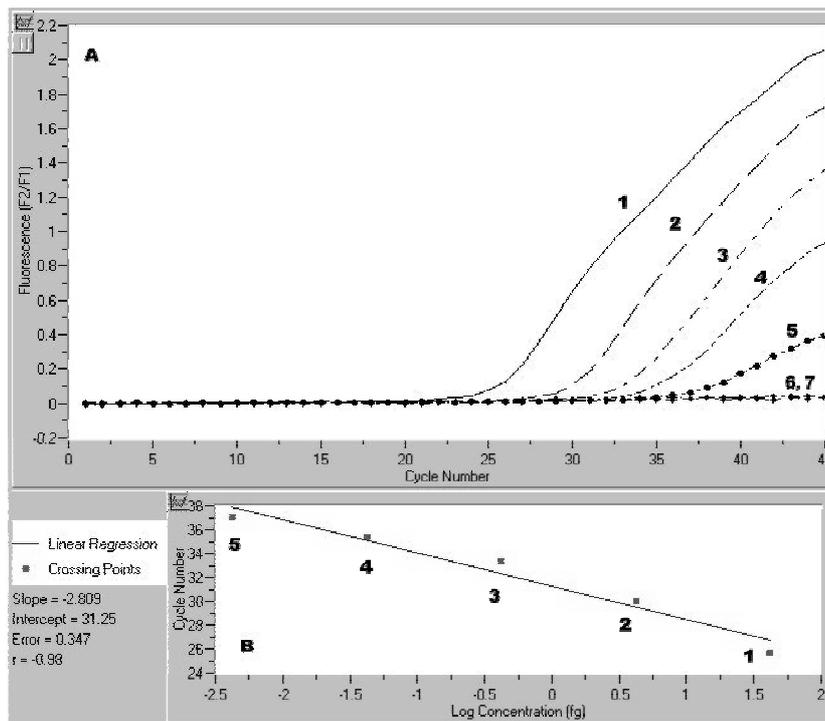


Abbildung 17: PCR des CYP3A4 RNA Standards

A. Der Verlauf der PCR einer 10fachen Verdünnungsreihe des CYP3A4 Standards. 1-5 beschreiben die mRNA Konzentration von  $3.5 \times 10^5$  bis  $3.5 \times 10^1$  Kopien während 6 und 7 die Negativkontrollen für RT bzw. PCR darstellen. B. Standardkurve für die CYP3A4 mRNA, abgeleitet aus den in Abbildung A dargestellten Daten. Es ist der Logarithmus der Konzentration gegen den sog. threshold cycle ( $C_T$ ) jedes Experimentes eingezeichnet. Der  $C_T$  definiert die Zyklusnummer, bei der die Menge des Amplifikats einen Schwellenwert über der Basislinie erreichte. Das Verhältnis zwischen den RNA-Kopien und weist eine Linearität auf ( $r = -0.98$ , Bildschirmabzug).

In Abbildung 18 ist die Amplifikation der CYP3A4 mRNA aus fünf Leukozyten-Proben und drei Leber-Proben über 45 Zyklen veranschaulicht. Die Leberproben wurden als Positivkontrolle für hohe CYP3A4 mRNA Konzentrationen gewählt, um die Realisierbarkeit des Verfahrens bei geringen und hohen Kopienzahlen zu demonstrieren. Die hier dargestellten Leberproben enthielten im Durchschnitt  $3 \times 10^5$  CYP3A4 mRNA Moleküle pro 1 ng Gesamt RNA (Einzelwerte:  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$ ).

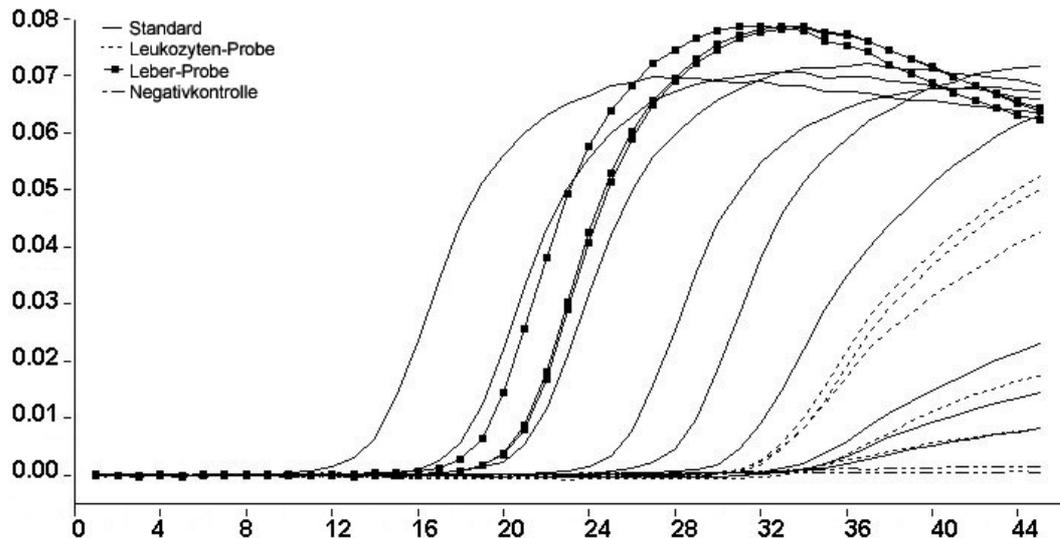


Abbildung 18: CYP3A4 PCR-Verlauf

Verlauf einer PCR mit CYP3A4 mRNA aus Leukozyten-Proben und Leber-Proben. Die Verdünnungsreihe des Standards hatte Konzentrationen von  $3.5 \times 10^8$  bis  $3.5 \times 10^1$  Kopien pro Ansatz (Bildschirmabzug).

#### 4.4.3.4 MDR1 RT-PCR

Die Ermittlung der Molekülzahl der MDR1 mRNA erfolgte ebenfalls als Echtzeit RT-PCR am LightCycler. Die Sequenzen der Primer wurden der Arbeit von Schneider et. al. entnommen und lagen im Exon 21 bzw. 22 des Gens, was ein Produkt von 168 bp ergab [200]. Der externe Standard wurde nach gleichem Prinzip erstellt wie bei der CYP3A4 Messung, entsprach in seiner Sequenz dem MDR1 cDNA Fragment und wurde stets in sechs Verdünnungsstufen mitgeführt.

Für die PCR am LightCycler wurden folgende Komponenten gemischt:

Substanz	Volumen [ $\mu$ l]
10 x Puffer	1.6
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	0.7
dNTPs [je 2 mM]	0.7
DMSO [100%]	0.7
BSA [1 mg/ml]	0.6
Primer umdr1 [10 $\mu$ M]	0.4
Primer dmdr1 [10 $\mu$ M]	0.4
Sonde mdr1Flu [10 $\mu$ M]	0.2
Sonde mdr1LCred [10 $\mu$ M]	0.2
Taq Polymerase [5 U/ $\mu$ l]	0.2
Wasser	2.3

Die Reaktionsbedingungen im LightCycler glichen den für die CYP3A4 Messungen.

#### 4.4.3.5 $\beta$ -Mikroglobulin RT-PCR

In den meisten Fällen war eine absolute Quantifizierung über einen synthetisch hergestellten Standard völlig ausreichend. Um jedoch auch unspezifische Effekte der Substanzen herauszufiltern, wurde bei ausgewählten Proben parallel zu CYP3A4 bzw. MDR1 auch das sogenannte house keeping Gen,  $\beta$ -Mikroglobulin, gemessen. Dieses Gen gilt als konstitutiv konstant reguliert und soll in allen Individuen in äquivalenten Mengen exprimiert werden. Für diese mRNA wurde ebenfalls ein externer Standard konstruiert nach dem unter 4.3.3.3 beschriebenen Prinzip, so dass auch hier die absolute Kopienzahl der mRNA gemessen werden konnte.

Üblicherweise wurde ein RT-Ansatz zu einem Teil für die CYP3A4 bzw. MDR1 Messung gebraucht, während aus dem anderen die  $\beta$ -Mikroglobulin Fragmente vervielfältigt wurden.

Der PCR-Ansatz und die Reaktionsbedingungen entsprachen den zur Bestimmung der MDR1 mRNA.

#### 4.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der amplifizierten Fragmente wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Je nach Fragmentgröße wurden 1 bis 3 % Gele hergestellt. Zu Anfang der Arbeiten erfolgte die Färbung der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid, später mit dem Nukleinsäurefarbstoff GelStar.

#### 4.4.5 Kapillarelektrophorese

Die Größe und Menge der zuvor in der Polymerase Kettenreaktion amplifizierten CYP1A1 und CYP1B1 cDNA-Fragmente wurden mittels Kapillarelektrophorese detektiert.

Im Gegensatz zur Flachbett-Gelelektrophorese wird die Kapillarelektrophorese in Kapillaren aus amorphem Quarz mit einem Innendurchmesser von 75  $\mu\text{m}$  durchgeführt. Als Trennmedium wird ein Polymer (das POP4) eingesetzt, um den Stromtransport zu gewährleisten und den pH-Wert in der Kapillare konstant zu halten. Die Trennungen finden bei einer elektrischen Feldstärke von mehreren hundert V/cm statt, der Strom durch die Kapillaren ist auf Grund des kleinen Innendurchmessers aber gering (im Bereich von 100  $\mu\text{A}$ ). Die durch die hohe Spannung erzeugte Wärme kann wegen des geringen Durchmessers der Kapillare und damit einem günstigen Oberflächen-Volumen-Verhältnis effektiv abgeführt werden. Die Detektion der Analyte erfolgte mit Hilfe der Fluoreszenzmessung am Detektionsfenster.

Entsprechend der Auftrennung in einem herkömmlichen Agarosegel wandern die positiv geladenen DNA-Fragmente von der Kathode zur Anode. Beide Elektroden sind in Puffertanks eingetaucht, zwischen denen die Glaskapillare eingespannt ist. Die Proben befinden sich in einem automatischen Probengeber und werden computergesteuert in die Kapillare befördert. Es wird eine Spannung angelegt, so dass die DNA proportional zur Größe je nach der Ladekapazität der Kapillare, die wiederum aus der Kapillardichte und der Injektionszeit resultiert, in die Kapillare aufgenommen wird. Die Kapillare wird in den Puffer eingetaucht und die Elektrophorese begonnen. Nach 30 cm Laufstrecke erreichen zunächst die kürzeren, später die längeren DNA-Polymere das Detektionsfenster, an dem die Fluoreszenz der entsprechend markierten Fragmente gemessen wird. Am Bildschirm kann der Ablauf verfolgt werden. Die Größe und Stärke der Signale sind proportional zur Konzentration der DNA-Fragmente. Für die Auswertung wurde die AUC (Fläche unter der Kurve) genutzt.

Für die Detektion mittels Kapillarelektrophorese wurden fluoreszenzmarkierte Primer für die PCR verwandt. Als Farbstoff wurde Fluorescein (FAM) gewählt. Nach der Amplifikation wurde ein Detektionsmix erstellt, der einen ROX gefärbten Größenstandard (ROX500) enthielt. 2 bzw. 4  $\mu\text{l}$  des Amplifikates wurden dem Mix aus HPLC Reinstwasser und Standard zugesetzt und in den Probengeber gestellt.

#### 4.4.6 Inter-day und intra-day Variationskoeffizient

Für die Etablierung des jeweiligen Verfahrens war die Ermittlung des Variationskoeffizienten notwendig.

Für die Bestimmung des inter-day Variationskoeffizienten (CV) der CYP1A1 und CYP1B1 RT-PCRs wurde je eine Proben-RNA aus der Zellkultur an verschiedenen Tagen bestimmt. Der Koeffizient der Variation (CV) für das Verfahren zur Bestimmung der CYP1A1 mRNA betrug 26 % (n = 9) für eine Probe mit 21 Kopien CYP1A1 mRNA/ng Gesamt-RNA; der entsprechende intra-day Koeffizient lag bei 24 % (n = 8) für eine Probe mit 28 Kopien CYP1A1. Für die CYP1B1 RT-PCR betrug der inter-day CV 24 % (n = 5) für Messungen einer Probe mit  $3.4 \times 10^4$  Kopien CYP1B1 mRNA/1ng Gesamt-RNA; der intra-day CV lag bei 22 % (n = 9) für eine Probe mit  $2.9 \times 10^4$  Kopien.

Im Fall der CYP3A4 RT-PCR von geringen Kopienzahlen aus Lymphozyten wurden CVs für die gesamte Prozedur (ausgehend von der RNA Isolierung) wie folgt bestimmt. Zunächst wurden einem Probanden 80 ml Vollblut in 8-ml Vacutainer<sup>®</sup>cpt System entnommen und während der Präparation der Leukozyten in gleiche Mengen portioniert. Für die Evaluierung des inter-day assay Koeffizienten wurden sowohl Isolierung der RNA als auch die Messung der CYP3A4 mRNA an

verschiedenen Tagen durchgeführt, während für den intra-assay alle Schritte am selben Tag stattfanden. Der Variationskoeffizient betrug 29 % (n = 10) für die inter-day Bestimmung mit gemessenen 53 Kopien der CYP3A4 mRNA pro 1 ng der Gesamt RNA. Der entsprechende intra-day Koeffizient betrug 24 % (n = 10) für eine Probe mit 33 Kopien der CYP3A4 mRNA/ng RNA.

#### 4.5 Sequenzierung

Die Spezifität der entwickelten RT-PCRs wurde mittels Sequenzierung überprüft.

Als Methode wurde das Prinzip der Sequenzierung nach Sanger [201] gewählt. Mit Hilfe einer modifizierten DNA-Polymerase und eines Oligonukleotid-Primers wurden unter Zugabe von dNTPs und mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Didesoxynukleotiden Kopien des zu sequenzierenden Stranges synthetisiert. Aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am 3'-Ende führte der Einbau eines Didesoxyribonukleotid-5'-triphosphats zum Kettenabbruch. Die so entstandenen unterschiedlich großen Fragmente wurden in einer Kapillarelektrophorese getrennt und die Fluoreszenz jedes der nukleotidspezifisch eingebauten Fluoreszenzfarbstoffe wurden spezifisch detektiert und aufgezeichnet.

Die Sequenzierreaktion wurde mit einem BigDye™-Terminator-Reaktionsset, in dem sich das Enzym mit den markierten Nukleotiden befand, entsprechend der Anweisungen des Herstellers in einem Volumen von 10 µl angesetzt und erfolgte in einer PCR-Maschine mit folgendem Temperaturprofil: 25 Zyklen mit je 10 s bei 96 °C, 15 s bei 50 °C, 4 min bei 60 °C. Die Amplifikate wurden in einem Säulenverfahren aufgereinigt und in einer Vakuumentrifuge getrocknet. Anschließend wurden die Proben im destillierten Wasser aufgenommen und in den Probengeber auf einen 48-Proben-Halter gestellt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms „Sequencing Analysis“. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den bekannten Originalsequenzen im Programm „GeneDoc“ verglichen und im Programm „BLAST“ überprüft.

#### 4.6 Methoden zur Analyse der DNA

Die Probanden der Studie zur Bestimmung der CYP3A Aktivität wurden hinsichtlich einiger Polymorphismen genotypisiert<sup>2</sup>. Es wurden die häufigsten CYP3A4 Mutationen, CYP3A4\*1B und CYP3A4\*3 untersucht. Außerdem wurde das Vorkommen der CYP3A5\*1 Variante untersucht, da dieses Allel für die Expression des vollständigen CYP3A5 Protein notwendig ist [106]. Durch die Prüfung auf das CYP2C19\*2 Allel sollte eine eventuelle Beteiligung des CYP2C19 Enzyms am Stoffwechsel von Alprazolam geklärt werden.

Die Analysen erfolgten mittels PCR-RFLP Verfahren (PCR – Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus), deren Prinzip auf einer sequenzspezifischen Spaltung der zuvor vervielfältigten DNA-Fragmente mit einer Endonuklease beruht.

##### 4.6.1 Isolierung der genomischen DNA

Die DNA wurde aus 8 ml Vollblut im Phenol-Chloroform Verfahren extrahiert. Die Reinheit und Ausbeute wurden photometrisch überprüft und die DNA wurde auf 30 ng/µl eingestellt.

##### 4.6.2 Analyse des CYP3A4\*1B Genotyps

Da für die vorliegende Punktmutation keine Endonuklease mit passender Erkennungssequenz bekannt war, wurde der Vorwärtsprimer (3A4\*1B\_F) in die Nähe der Mutation gelegt und seine Sequenz so modifiziert, dass im Fall des Basenaustausches zu G eine Schnittstelle entstand. Da das Allel sehr selten ist, wurde eine Kontrollschnittstelle im Rückwärtsprimer (3A4\*1B\_R) eingefügt. Die Vervielfältigung der DNA erfolgte aus 60 ng unter PCR-Standardbedingungen (3 mM MgCl<sub>2</sub>) mit Zugabe von 1.5 % DMSO und einer Anlagerung der Primer bei 63 °C. Die 182 bp großen Amplifikate wurden mit BstNI (CC^WGG, wobei W = A oder T) nach Anleitung des Herstellers verdaut und elektrophoretisch detektiert. Die Produkte der Träger des Wildtyp-Allels CYP3A4\*1A wiesen im Agarosegel Banden bei 23 bp und 59 bp auf, während die Träger des CYP3A4\*1B Allels durch Banden von 23 bp und 136 bp charakterisiert wurden.

---

<sup>2</sup> Die Verfahren zur Genotypisierung von CYP3A4 und CYP3A5 wurden von Herrn Mark Goldammer entwickelt.

#### 4.6.3 Analyse des CYP3A4\*3 Genotyps

Die PCR zur Bestimmung des Allels erfolgte mit Primern 3A4\*3\_F und 3A4\*3\_R (Anlagerung bei 64 °C; 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>). Die Produkte von 289 bp Länge wurden mit der Restriktionsendonuklease *MspI* nach Angaben des Herstellers versetzt und die Resultate im Agarosegel ausgewertet. Das Wildtyp-Allel wurde in folgende Fragmente geschnitten: 21 bp, 89 bp, 179 bp während die Amplifikate der Träger des CYP3A4\*3 Allels eine Schnittstelle weniger besaßen und nach der Inkubation mit der Endonuklease in 110 bp und 179 bp große Fragmente gespalten waren.

#### 4.6.4 Analyse des CYP3A5\*1 Genotyps

Die DNA wurde mit Hilfe der Primer 3A5\*3\_F und 3A5\*3\_R (Anlagerung bei 59 °C, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>) vervielfältigt und die Amplifikate (279 bp) mit *BseNI* gespalten. Es wurden nur die Amplifikate der Träger des Basenaustausches im Intron 3 geschnitten, wobei Fragmente 25 bp und 254 bp entstanden.

#### 4.6.5 Analyse des CYP2C19\*2 Genotyps

Die Mutation wurde mittels PCR-RFLP bestimmt, wobei für die PCR die Primer mep f und mep r mit einer Anlagerungstemperatur bei 58 °C benutzt wurden. Die nachfolgende DNA-Spaltung wurde mit dem Enzym *SmaI* nach Anleitung des Hersteller durchgeführt. Das amplifizierte 169-bp-Fragment wurde bei den Wildtyp-Trägern einmal geschnitten, was im Agarosegel ein Bandenmuster von 49 bp und 120 bp ergab.

### 4.7 Bestimmung der Konzentration von Alprazolam im Plasma

Die Konzentration von Alprazolam wurde mittels HPLC entsprechend der nach Schmider et. al [187] beschriebenen Methode im Plasma bestimmt<sup>3</sup>. Die ALZ Clearance (Cl<sub>oral</sub>) verhält sich indirekt proportional zu den 10-h-Plasma-Konzentrationen und wurde aus diesem Wert berechnet.

### 4.8 Statistische Auswertung

Die Daten wurden in Excel-Tabellen gespeichert und zum Teil auch mit diesem Programm ausgewertet. Statistische Prozeduren wurden mit Hilfe des Programms „SPSS“ (Vers. 10) durchgeführt. Neben der explorativen Datenanalyse und den Korrelationsberechnungen nach Spearman wurden der nicht-parametrische Test nach Wilcoxon sowie der Mann-Whitney-Test für nicht-parametrische und unabhängige Vergleiche von zwei Gruppen durchgeführt. Außerdem wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test zur „Varianzanalyse“ für Rangdaten angewandt, um die induktiven Effekte der Testsubstanzen zu zeigen. Die statistische Signifikanz wurde bei p ≤ 0.05 festgesetzt.

Für die Expressionsuntersuchungen in der Zellkultur wurden die Standardfehler der Mittelwerte (SEMs) ermittelt. Diese werden durch den Quotienten aus der Standardabweichung und der Wurzel der Anzahl der Messungen (SD/√n) definiert.

Die analytische Varianz ist durch den Quadrat der Standardabweichung (SD<sup>2</sup>) definiert und wurde für die Dreifachmessungen der CYP3A4 mRNA im Blut bestimmt.

Für die Untersuchungen aus der Alprazolamstudie wurde die Güte der Tests in einem Diskriminanzverfahren mit maximaler Korrektklassifikationswahrscheinlichkeit unter Normalverteilungsannahme überprüft. Der optimale Trennwert (cutoff value) wurde anhand folgender Formel bestimmt [202]:

$$y = \frac{(X2^2 - X1^2)}{2 \times (X2 - X1)},$$

wobei X1 dem Mittelwert der Messungen unter Kontrollbedingungen entsprach und X2 dem Mittelwert der induzierten Proben. Diese Formel konnte verwendet werden, da angenommen wurde, dass für beide Fälle (Kontrolle/Induktion) gleiche Wahrscheinlichkeit galt. Für dieselben

---

<sup>3</sup> Die HPLC Messungen wurden im Analytiklabor unter Leitung von Herr Dr. Steffen Bauer durchgeführt.

Proben wurden auch die diagnostische Spezifität und Sensitivität bestimmt.

Die diagnostische Sensitivität wurde an der grafischen Darstellung mit zu Hilfenahme des Trennwertes ermittelt und stellte den Anteil derjenigen Proben in % dar, die unter Kontrollbedingungen kleiner als der Trennwert waren und somit richtig positiv im Sinne von nicht-induziert.

Die diagnostische Spezifität wird ebenfalls in % dargestellt und entspricht dem Anteil der Proben, die nach der Induktion größer als der ermittelte Trennwert waren und somit richtig negativ im Vergleich zu nicht-induziert, d.h. induziert.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Induktion der CYP1A1 und CYP1B1 mRNA durch antiretrovirale Mittel

Die durch die Aktivierung des Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor ausgelöste Initiation der Transkription wurde am Beispiel der beiden Gene CYP1A1 und CYP1B1 *in vitro* untersucht. Hierfür wurde eine Zellkultur mit verschiedenen Konzentrationen der antiretroviralen Mittel inkubiert und die mRNA der beiden Enzyme quantitativ bestimmt.

Die humane Zelllinie HeLa des urikalen Adenokarzinoms wächst adhärent und wurde in früheren Untersuchungen als geeignetes *in vitro* System zur Expressionsuntersuchung bestimmt [55]. Die hier verwendeten HeLa-Zellen wiesen eine Verdopplungszeit von ca. 24 Stunden auf. Nach 18 Stunden Inkubation mit Arzneimitteln zeigten die Zellen keine morphologischen Veränderungen unter dem inversen Phasenkontrast-Mikroskop. In der vorliegenden Arbeit wurde an der HeLa-Zelllinie der Einfluss der Virustatika auf die Expression der mRNA von CYP1A1 und CYP1B1 untersucht. Hierfür wurden zwei quantitative kompetitive RT-PCR Verfahren verwendet.

Vor den Inkubationen mit Arzneimitteln wurden zwischen 13 und 52 Molekülen CYP1A1 mRNA/ng Gesamt-RNA mit einem Mittelwert von 23 (SD:  $\pm 11$ ) gemessen. Die Basalexpression von CYP1B1 mRNA lag in einem Bereich von  $1.2 \times 10^3$  bis  $1.1 \times 10^4$  Molekülen/ng RNA mit einem Mittelwert von  $3.3 \times 10^3$  ( $\pm 2.3 \times 10^3$ ).

Tabelle 13: Die Effekte der getesteten antiretroviralen Mittel auf die CYP1A1 und CYP1B1 mRNA Expression

Substanz	Getestete Konzentration [ $\mu$ M]	Td [ $\mu$ mol]	Ausmaß der Induktion bei Td		Konzentration bei max. Induktion		Maximale Induktion	
			CYP1A1	CYP1B1	CYP1A1	CYP1B1	CYP1A1	CYP1B1
Abacavir	23.9 – 238.5	44.7	1.0	1.0	23.9	23.9	1.2	1.1
Didanosin	21.2 – 211.7	42.3	0.9	1.0	211.7	211.7	1.0	1.2
Lamivudin	0.4 – 436.2	32.7	1.0	1.0	261.7	261.7	2.0	5.4*
Stavudin	0.4 – 446.0	17.8	0.7	1.0	0	446.0	1.0	1.1
Zalcitabin	0.3 – 250.0	0.3	1.0	5.1	250.0	25.0	2.8*	6.0*
Zidovudin	0.4 – 374.2	93.6	1.3	1.8	3.7	374.2	1.6	2.6*
Efavirenz	10.2 – 101.6	19.1	1.1	1.2	40.6	40.6	1.2	1.3
Nevirapin	75.2 – 300.8	75.2	1.5	3.6	300.8	225.6	2.1	4.5*
Amprenavir	63.3 – 632.9	237.3	1.3	1.0	632.9	632.9	1.4	1.5
Indinavir	52.1 – 521.3	195.5	2.3	1.8	521.3	521.3	2.6*	2.8*
Kaletra <sup>1</sup>	25.4 – 254.5	63.6	1.7	1.7	101.8	101.8	1.9	2.1*
Nelfinavir	0.5 – 964.0	169.5	2.8	2.9	482.0	482.0	4.1*	3.4*
Ritonavir	44.4 – 443.8	83.2	2.1	5.3	88.8	177.5	2.1*	7.2*
Saquinavir <sup>2</sup>	0.5 – 477.1	268.3	n.d.	n.d.	47.7	47.7	4.2*	9.9*

Angaben des Faktors der Induktion bei der Tagesdosis (Td) wurden aus den Kurvenverläufen geschätzt, wobei Kontrollwerte ohne Testsubstanz gleich 1.0 gesetzt wurden und die übrigen Werte darauf bezogen.

<sup>1</sup> Bei Kaletra beziehen sich die Konzentrationsangaben auf die Mischung Lopinavir/Ritonavir (4:1)

<sup>2</sup> Saquinavir war bei 477.1  $\mu$ M zytotoxisch, die letzte ausgewertete Konzentration lag bei 47.7  $\mu$ M

\* Signifikanter Anstieg nach dem Kruskal-Wallis-Test mit  $p < 0.05$

Die Zellen wurden mit 14 antiretroviralen Mitteln in verschiedenen Konzentrationen inkubiert (Tabelle 13). Lamivudin wurde in acht verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, Nelfinavir mit sechs und alle anderen Substanzen mit vier verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen. Für alle Substanzen wurde eine Tagesdosis geschätzt, die nach der Berücksichtigung des möglichen Verteilungsvolumens auf die Gegebenheiten in der Zellkultur berechnet wurden. In den meisten Fällen lag die niedrigste eingesetzte Konzentration weit unterhalb der therapeutischen Plasmaspiegel während die höchste Konzentration entweder durch die Löslichkeit oder eventuelle Toxizität limitiert wurde. Saquinavir war bei der Konzentration von 477.1  $\mu$ M zytotoxisch, die letzte

auswertbare Konzentration betrug 47.7  $\mu\text{M}$  und lag unterhalb der Tagesdosis. Zellen, die mit Kaletra und Nelfinavir inkubiert wurden, wiesen bei den höchsten Konzentrationen geringere RNA-Ausbeuten auf (15.9 bzw. 25.0 % der Ausbeute von RNA unter Kontrollbedingungen), was auf beginnende zytotoxische Effekte hindeutet. Alle RNA-Proben wurden vor dem Einsatz auf eine konstante Konzentration normiert. Einige Medikamente, wie z. B. Lamivudin, Kaletra, Ritonavir und Efavirenz, verursachten bei höheren Konzentrationen eine Abnahme der mRNA Menge, was zum Teil ebenfalls auf toxische Effekte zurückgeführt werden kann (Abbildung 19 - Abbildung 23). Inkubationen mit Lamivudin führten sowohl bei CYP1A1 als auch bei CYP1B1 zunächst zu einem Anstieg der mRNA Mengen, ab der 261.7- $\mu\text{M}$ -Konzentration nahm die gemessene Konzentration ab.

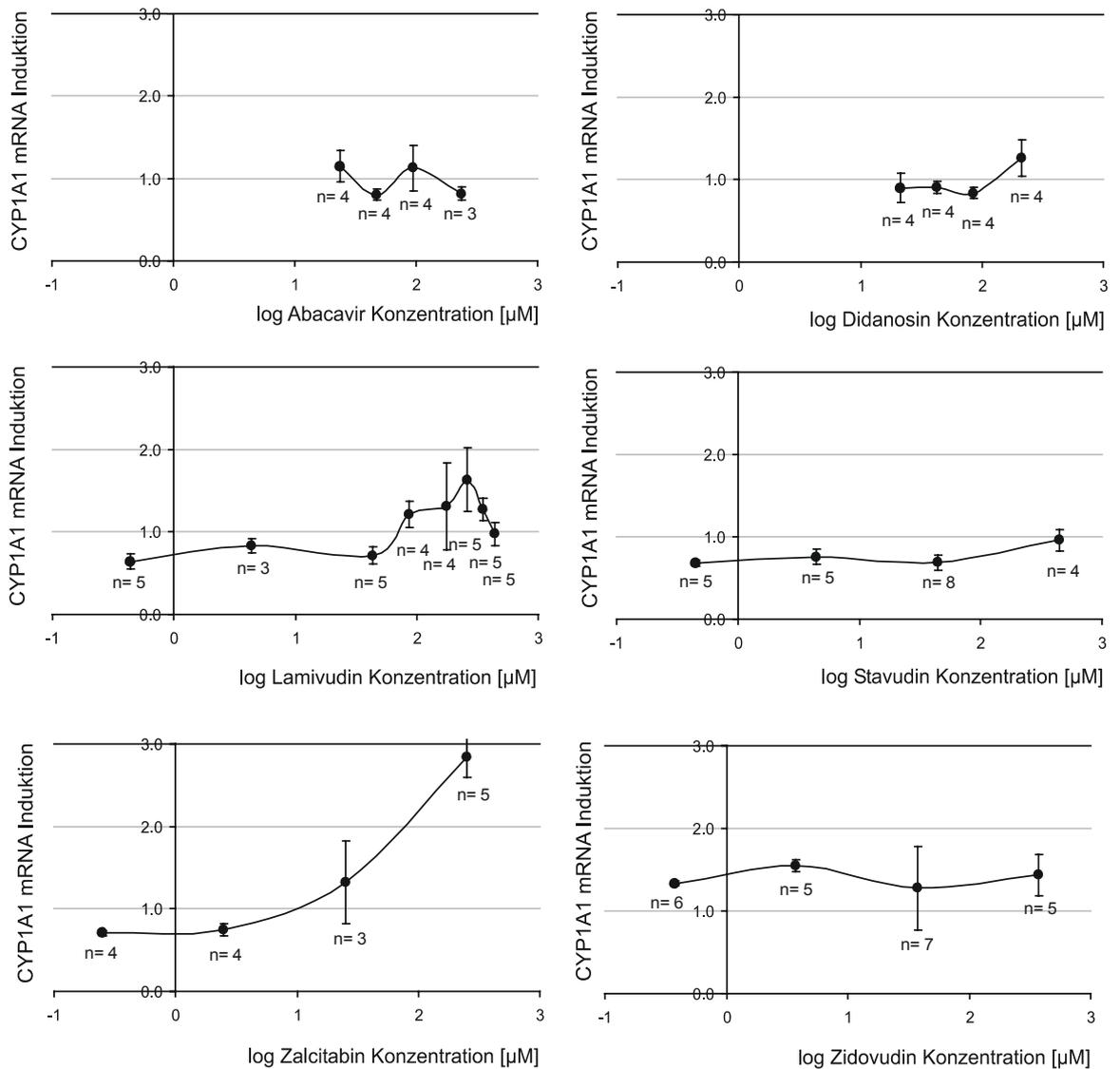


Abbildung 19: CYP1A1 mRNA Expression nach Inkubation mit 6 nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren

Es sind Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Die Werte der Konzentrationen auf der x-Achse wurden logarithmiert. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht.

In Abbildung 19 sowie Abbildung 20 sind die konzentrationsabhängigen Effekte der Inkubationen

mit Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren gezeigt. In dieser Gruppe war Zalcitabin die einzige Substanz, welche die Expression von CYP1A1 und CYP1B1 mRNA um den Faktor 2.8 ( $p = 0.010$ ; Kruskal-Wallis-Test) bzw. 6.0 ( $p = 0.024$ ) statistisch signifikant erhöhte (Tabelle 13). Bei der therapeutisch eingesetzten Konzentration von 0.3  $\mu\text{M}$  Zalcitabin war nur die CYP1B1 mRNA um den Faktor von 5.1 erhöht. Die Inkubation der HeLa-Zellen mit Stavudin, Didanosin, Abacavir, Zidovudin und Lamivudin brachte keinen statistisch signifikanten Anstieg der CYP1A1 mRNA Konzentrationen. Die CYP1B1 mRNA Expression stieg während der Inkubationen mit Lamivudin und Zidovudin um den Faktor 5.4 ( $p = 0.048$ ) bzw. 2.6 ( $p = 0.010$ ) statistisch signifikant an. Lamivudin wies bei der Tagesdosis keinen induzierenden Effekt auf während Zidovudin auch bei der therapeutisch eingesetzten Dosis von 93.6  $\mu\text{M}$  ein moderater Induktor ist (Faktor 1.8).

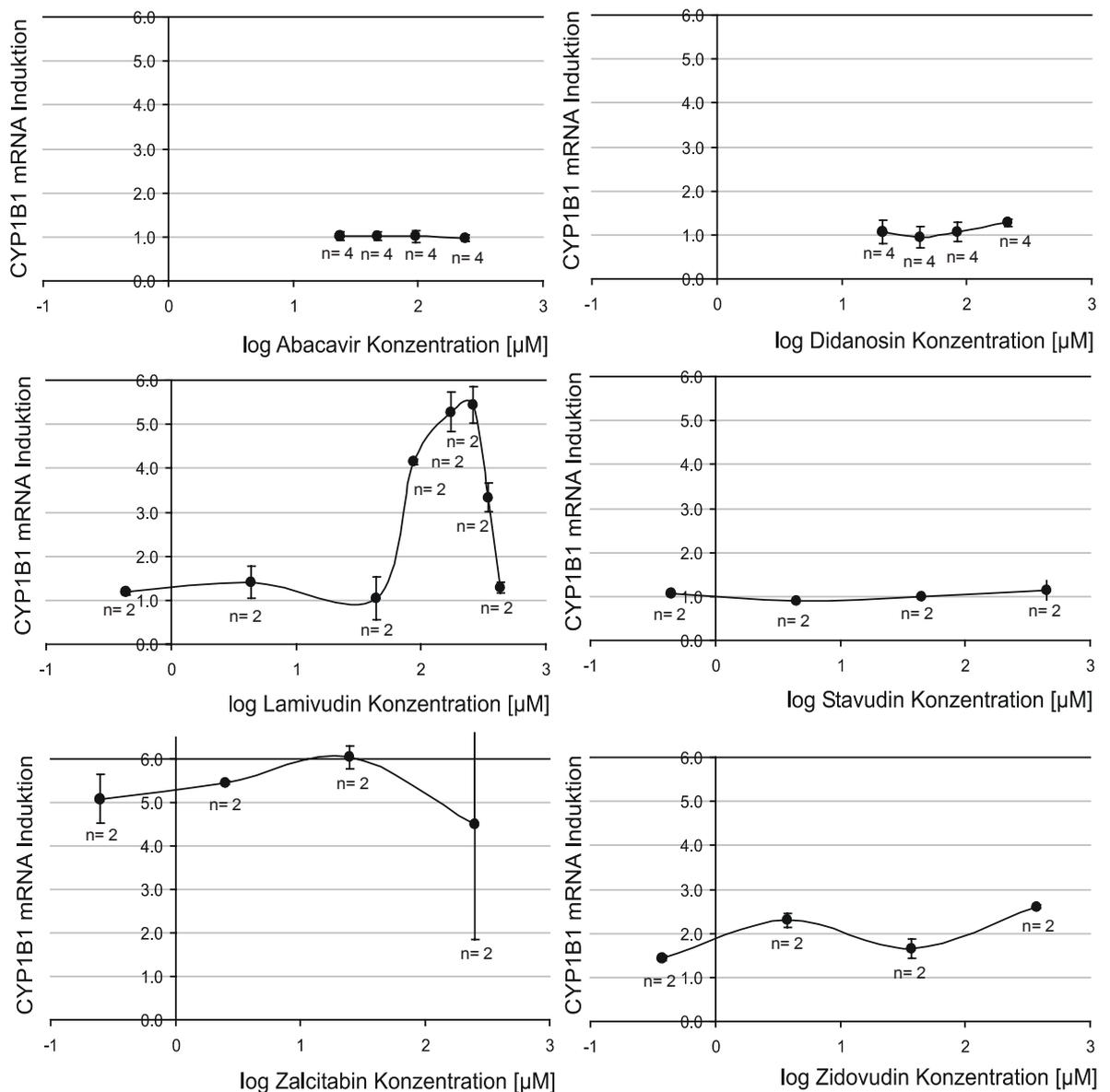


Abbildung 20: Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren und die Expression von CYP1B1 mRNA

Es sind Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Die Werte der Konzentrationen auf der x-Achse wurden logarithmiert. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht.

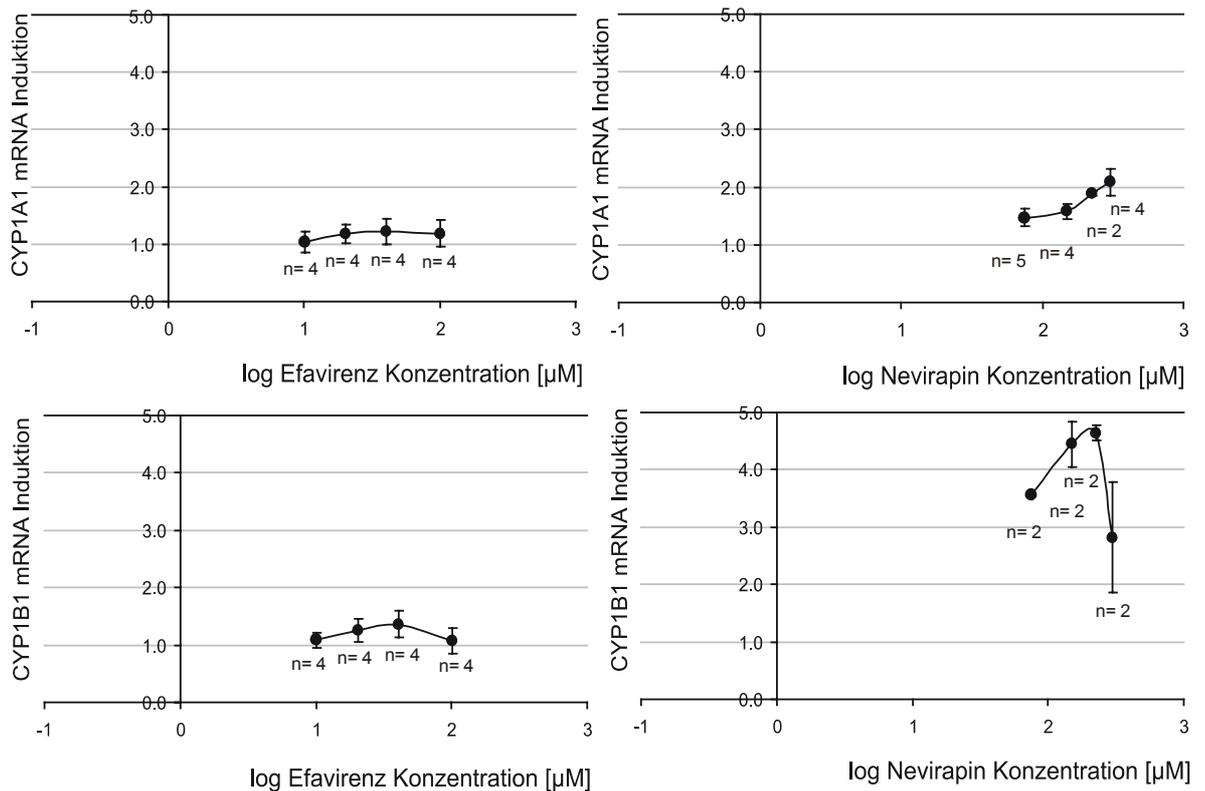


Abbildung 21: Effekte von Efavirenz und Nevirapin auf mRNA Expression von CYP1A1 und CYP1B1

Es sind Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Die Werte der Konzentrationen auf der x-Achse wurden logarithmiert. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht.

Nevirapin und Efavirenz, Nicht-Nukleosidische Inhibitoren der Reversen Transkriptase, wiesen unterschiedliche Induktionseffekte auf (Abbildung 21). Während Inkubationen mit verschiedenen Konzentrationen von Efavirenz keinen signifikanten Anstieg der CYP1A1 und CYP1B1 mRNA verursachte (mit p-Werten von 0.953 bzw. 0.757), erhöhte sich die Menge der CYP1B1 mRNA nach Inkubationen mit Nevirapin von 2717 ( $\pm$  25) auf 12254 ( $\pm$  1) Moleküle/ng RNA bei einer Konzentration von 225.6  $\mu$ M mit einem maximalen Induktionseffekt von 4.5 ( $p$  = 0.022). Nach Inkubation mit 300.8  $\mu$ M Nevirapin stieg die Konzentration der CYP1B1 mRNA weniger stark an, nämlich auf 7673 Kopien/ng RNA ( $\pm$  3703). Die Konzentration der CYP1A1 mRNA nahm während Inkubation mit 300.8  $\mu$ M Nevirapin von 15 ( $\pm$  8.4) auf 32 ( $\pm$  7.1) Moleküle/ng RNA zu, was einem Faktor von 2.1 entspricht (der Anstieg war nach dem Kruskal-Wallis-Test für alle Gruppen statistisch nicht signifikant;  $p$  = 0.064). Nach einem Vergleich der Kontrollgruppe mit Resultaten aus der 300.8- $\mu$ M Gruppe zeichnete sich eine induktive Tendenz ab ( $p$  = 0.05). Bei der errechneten Tagesdosis war lediglich CYP1B1 mRNA mit einem Faktor von 3.6 induziert.

Von den sechs getesteten Proteaseinhibitoren hatten die neueren Wirkstoffe Amprenavir und Kaletra keinen bzw. relativ schwachen Einfluss auf die mRNA Expression von CYP1A1 und CYP1B1 (Abbildung 22 und Abbildung 23). CYP1B1 mRNA Konzentration stieg von 2967 ( $\pm$  479) Moleküle/ng RNA auf 5798 ( $\pm$  297) Moleküle während der Inkubation mit 101.8  $\mu$ M Kaletra, was einem Faktor von 2.1 ( $p$  = 0.003) entspricht. Bei einer Tagesdosis von 63.6  $\mu$ M wurde eine schwache Induktion mit einem Faktor von 1.7 für CYP1A1 und CYP1B1 geschätzt. Inkubationen mit Indinavir verursachten einen 2.6-fachen Anstieg der CYP1A1 mRNA und 2.8-fachen der CYP1B1 mRNA ( $p$  = 0.001 bzw. 0.029). Nelfinavir, Ritonavir and Saquinavir waren sehr starke Induktoren der mRNA Expression von CYP1A1 und CYP1B1 (Tabelle 9). Es reichten bereits sehr niedrige Konzentrationen von Saquinavir (0.5  $\mu$ M) um einen Induktionseffekt auf die beiden CYP1-Gene auszulösen. Die Menge, die über 500-fach niedriger als die geschätzte Tagesdosis lag, induzierte die Expression der CYP1A1 mRNA in den HeLa-Zellen um den Faktor 2.4 und die

CYP1B1 mRNA sogar um das 9.4-fache.

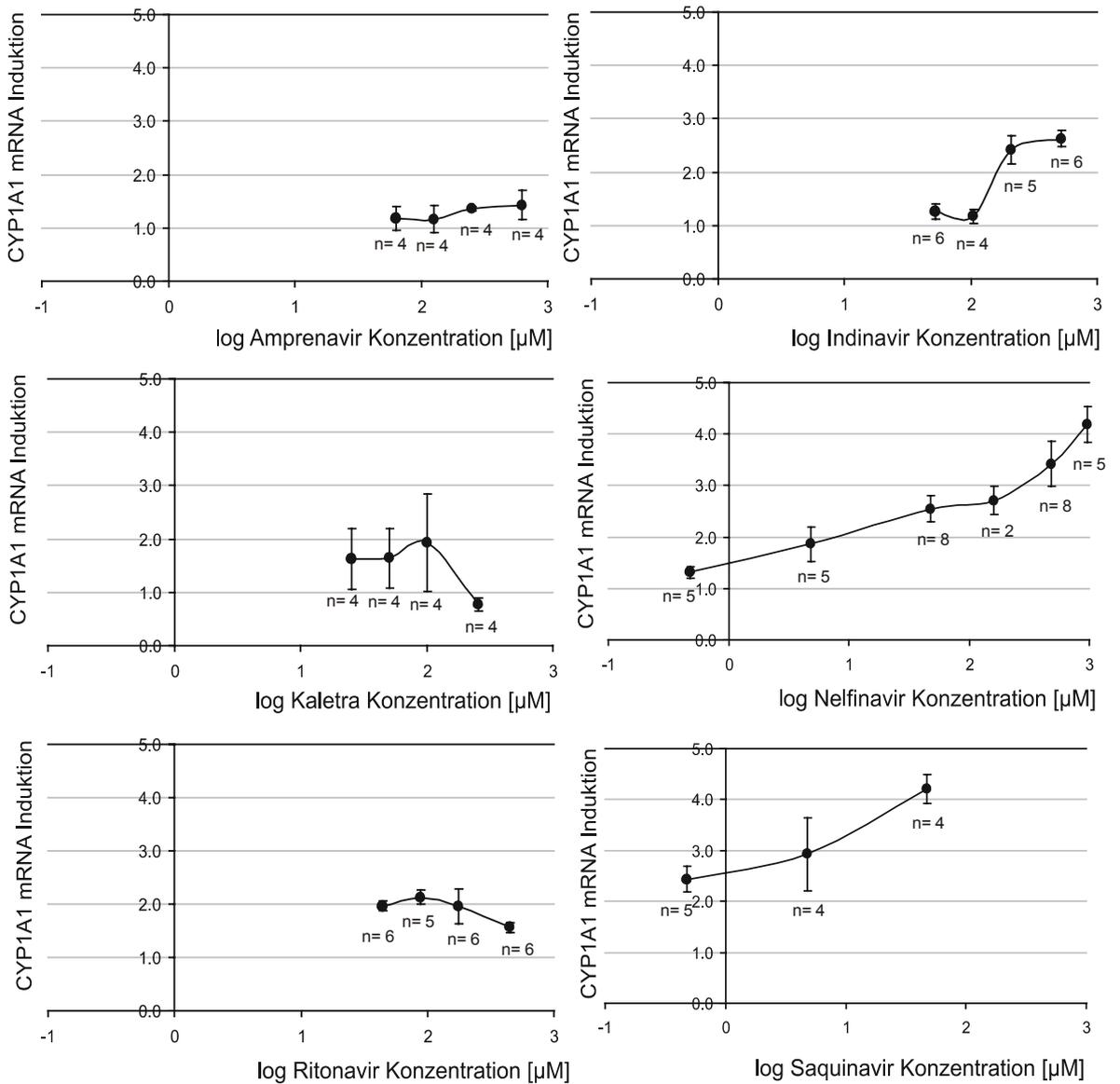


Abbildung 22: CYP1A1 mRNA Expression unter Einwirkung von Proteaseinhibitoren

Es sind Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Die Werte der Konzentrationen auf der x-Achse wurden logarithmiert. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht.

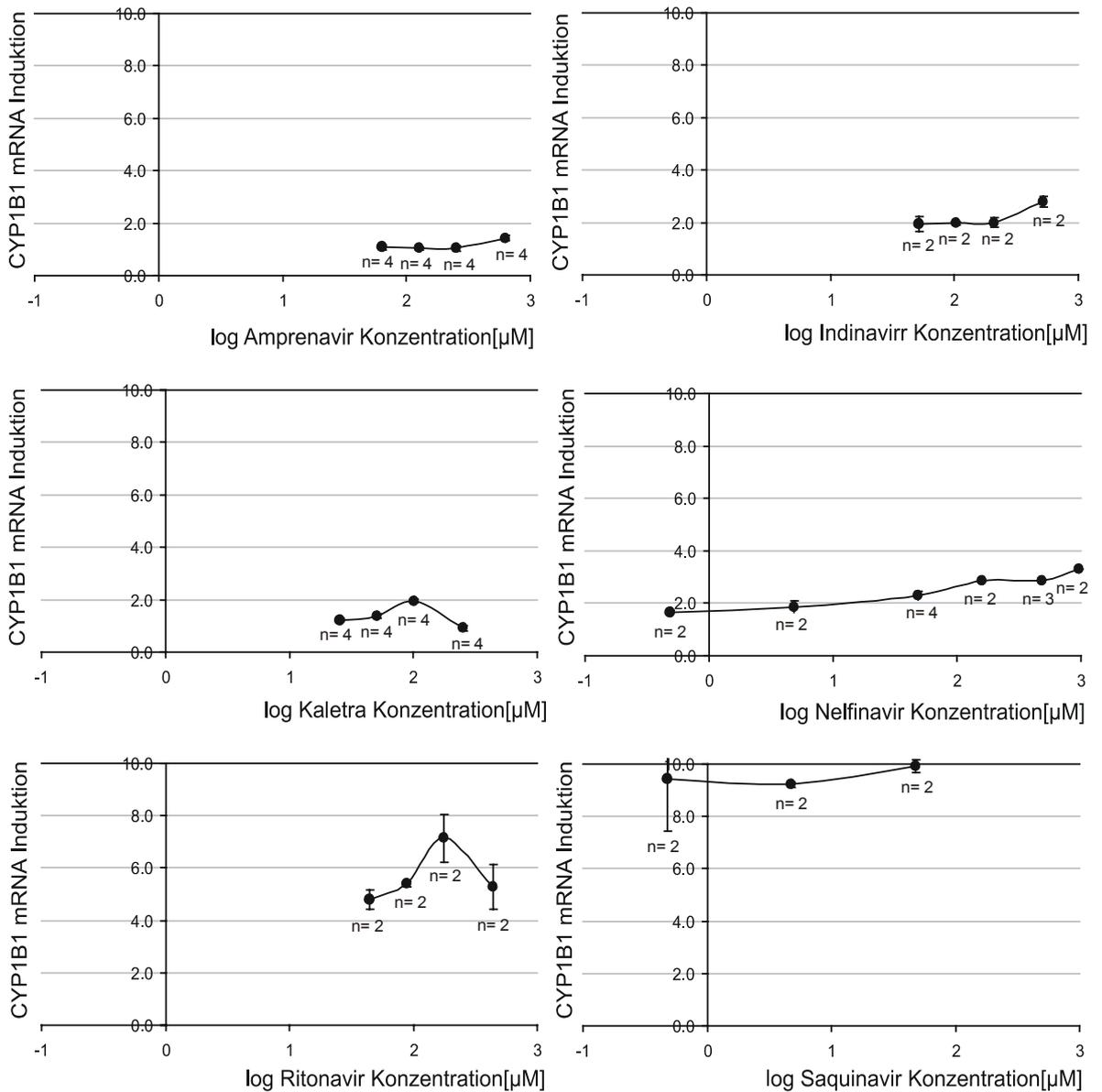


Abbildung 23: CYP1B1 mRNA Konzentrationen nach 18-stündigen Inkubationen mit Proteaseinhibitoren

Es sind Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Die Werte der Konzentrationen auf der x-Achse wurden logarithmiert. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht.

Generell lässt sich zusammenfassen, dass die antiretroviralen Substanzen über ein induktives Potential auf die AhR vermittelte Initiation der Transkription haben, wobei die älteren Proteaseinhibitoren besonders hervorzuheben sind. Daneben wirken Nevirapin sowie Zalcitabin aktivierend. Die Expression der CYP1B1 mRNA wurde durch die Medikamente stärker beeinflusst als die Synthese der CYP1A1 mRNA.

## 5.2 Induktion der CYP3A4 und MDR1 mRNA durch antiretrovirale Mittel

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die antiretroviralen Mittel die PXR-vermittelte Steigerung der Transkription auslösen und somit den eigenen Stoffwechsel und den der anderen Medikamente beschleunigen können. Der Pregnan-X-Rezeptor aktiviert unter anderem die Expression des Enzyms CYP3A4 und des Transporters MDR1.

Die basale Expression von CYP3A4 und MDR1 mRNA wurde in verschiedenen humanen Zelltypen bestimmt (Tabelle 14). Entsprechend den physiologischen Bedingungen wurde CYP3A4 mRNA am stärksten im Lebergewebe exprimiert, während die MDR1 mRNA in hohen Mengen in Zellen dermalen Ursprungs bestimmt wurde. In den Caco-2 Zellen konnte keine CYP3A4 mRNA detektiert werden. Die Synthese der CYP3A4 mRNA erwies sich in den HeLa-Zellen und einigen HepG2 Chargen (Daten nicht dargestellt) als minimal. Die MDR1 mRNA wurde in allen getesteten Zellsystemen exprimiert. Für die Inkubationen mit den Arzneimitteln wurden die Zelllinien COLO-320 sowie eine bisher unpassagierte HepG2 Charge gewählt.

Tabelle 14: Expression von CYP3A4 und MDR1 in verschiedenen humanen Zelltypen

Zelltyp	Moleküle CYP3A4 mRNA/ng RNA	Moleküle MDR1 mRNA/ng RNA
Caco-2, Kolonkarzinom	0 (n=2)	1340 (n=2)
COLO-320, Kolonkarzinom	25.4 (n=6)	19400 (n=6)
HeLa, Zervixkarzinom	3.1 (n=3)	32.0 (n=3)
HepG2, Hepatokarzinom	122.0 (n=6)	54.7 (n=6)
Lymphozyten	26.1 (n=7)	83.9 (n=5)
Lebergewebe (Operationspräparat)	300000 (n=3)	27.2 (n=2)

Die basale Expression der CYP3A4 mRNA nahm mit steigender Passagierzahl der HepG2-Zellen stetig ab (Abbildung 24). Nach sechs Passagen wurden durchschnittlich 290 Kopien der CYP3A4 mRNA/ng RNA gemessen. Nach der 10. Passage waren es 3.3 Kopien/ng RNA und ab Passage 11 pendelte sich die Menge der CYP3A4 mRNA auf etwa 2 Kopien/ng RNA ein. Dieser Effekt betraf nicht die Expression von  $\beta$ -Mikroglobulin oder MDR1 mRNA.

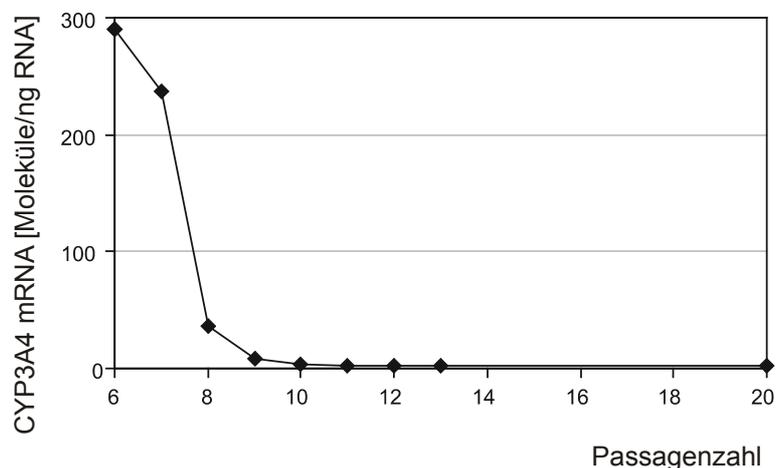


Abbildung 24: Einfluss der Passagenzahl auf die CYP3A4 mRNA Expression

Es sind die Mittelwerte der Einzelmessungen (n = 3) dargestellt.

Um die Zelllinien auf ihre Eignung als *in vitro* System zur Untersuchung der CYP3A4- und MDR1-Induktion zu überprüfen, wurden COLO-320 und HepG2-Zellen mit vier verschiedenen Rifampicin Konzentrationen in Doppelbestimmung inkubiert (Abbildung 25).

In den COLO-320 Zellen war die CYP3A4 mRNA nach 20 Stunden Inkubation mit 19.4  $\mu$ M

Rifampicin mit einem Faktor von 2.2 ( $p = 0.035$  für den Unterschied aller Gruppen nach Kruskal-Wallis) maximal induziert. Die CYP3A4 mRNA Expression nahm nach 40 und 72 Stunden im Vergleich zu Ausgangskonzentration der mRNA vor Induktion sehr stark ab (Abbildung 25), sie sank nach 72h konzentrationsabhängig von 164 auf 24 (SD:  $\pm 3$ ) Moleküle/ng RNA. Die Abnahme der mRNA Konzentration war statistisch signifikant (Kruskal-Wallis-Test für alle fünf Gruppen:  $p = 0.032$ ). Eine Induktion der CYP3A4 mRNA war nicht mehr zu beobachten. Kontrollansätze mit  $\beta$ -Mikroglobulin zeigten, dass auch diese mRNA bedingt durch Langzeitbehandlung mit höheren Wirkstoffkonzentration leicht abnahm. Die MDR1 mRNA Expression stieg nach 20h unter der höchsten Konzentration von  $194.4 \mu\text{M}$  von  $2.7 \times 10^4$  ( $\pm 1.3 \times 10^3$ ) auf  $4.4 \times 10^4$  ( $\pm 6.3 \times 10^3$ ) Moleküle/ng RNA um den Faktor 1.6 statistisch signifikant an ( $p = 0.031$ ). In der COLO Zelllinie bewirkte eine 40 und 72-stündige Inkubation mit Rifampicin nur sehr geringe Veränderungen in der Expression der MDR1 mRNA, allerdings keine Abnahme der Expression.

In den HEPG2 Zellen nahm die CYP3A4 mRNA Konzentration (Abbildung 25) nach Inkubationen mit  $38.9 \mu\text{M}$  Rifampicin maximal um den Faktor 2.6 ( $p = 0.038$ ) zu. Die Expression der MDR1 mRNA wurde durch  $194.4 \mu\text{M}$  Rifampicin 1.5-fach ( $p = 0.035$ ) erhöht. In den HepG2-Zellen wurde die MDR1 mRNA nach Behandlung mit  $194.4 \mu\text{M}$  Rifampicin auch am 2. und 3. Tag um den Faktor 1.3 bzw. 1.5 erhöht. In Folge dieser Ergebnisse wurden die Zelllinien COLO-320 sowie HepG2 20 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der antiretroviralen Mittel inkubiert.

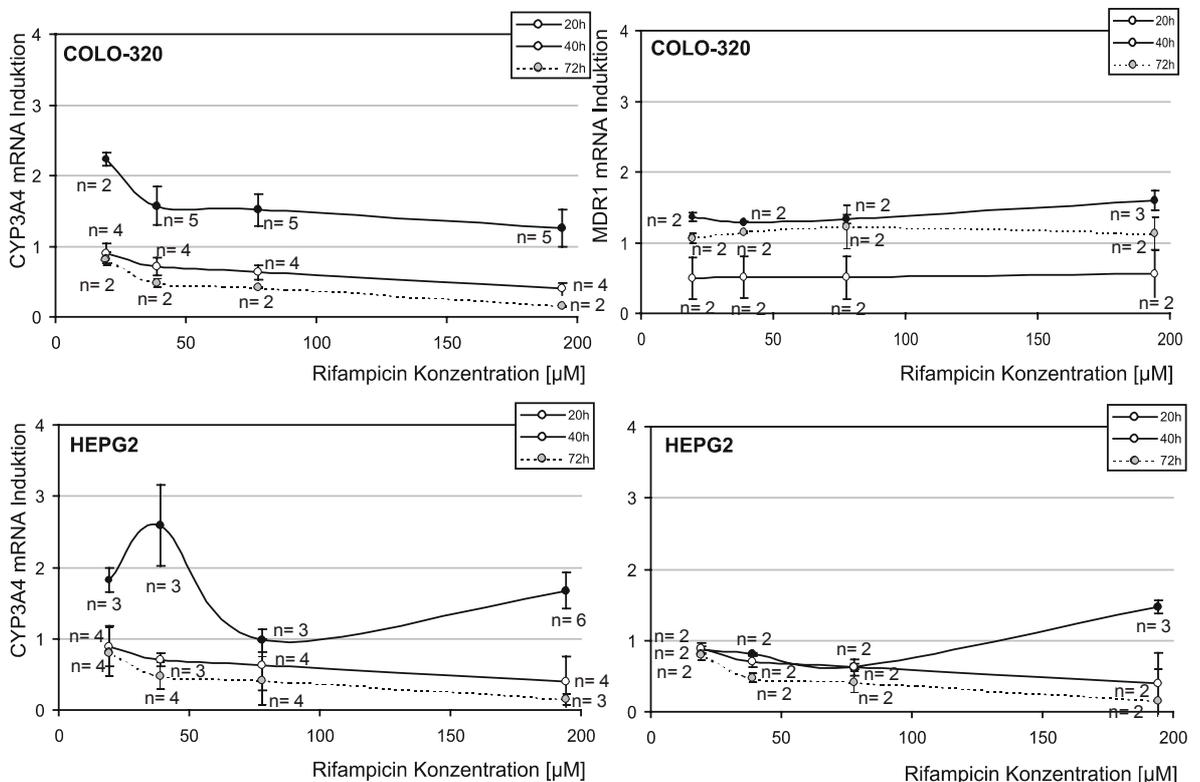


Abbildung 25: Konzentrationsabhängige Veränderungen in der mRNA Expression von CYP3A4 und MDR1 nach mehrtägiger Behandlung mit Rifampicin

Es sind Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht.

Die Entwicklung der CYP3A4 mRNA Expression unter Einwirkung der Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren ist in Abbildung 26 dargestellt. Aus dem Verläufen wird sichtbar, dass die Expression zwar einigen Schwankungen unterliegt, dass jedoch nur Zalcitabin in beiden Zellsystemen die Synthese der CYP3A4 mRNA induziert hatte. In den COLO-Zellen stieg die CYP3A4 mRNA Konzentration von  $41$  ( $\pm 21$ ) auf  $58$  ( $\pm 24$ ) Moleküle mRNA/ng RNA unter

Einwirkung von 1.9  $\mu\text{M}$  Zalcitabin um das 1.4-fache ( $p = 0.822$ ) an. Der Effekt war in der HepG2-Zellkultur etwas stärker ausgeprägt (Faktor: 2.0), jedoch beim Vergleich aller Gruppen auch nicht signifikant ( $p = 0.642$ ). Zalcitabin erhöhte die CYP3A4 mRNA Konzentration bei der errechneten Tagesdosis von 0.3  $\mu\text{M}$  um den Faktor von 2.0 in den HepG2-Zellen. Inkubationen mit den anderen NRTIs, Abacavir, Stavudin, Didanosin, Lamivudin und Zidovudin, brachten ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der CYP3A4 mRNA Expression. Die Expression der MDR1 mRNA wurde von keinem der Nucleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren signifikant verändert (Abbildung 27) und unterlag lediglich leichten Schwankungen, die in den COLO-Zellen stärker ausgeprägt waren als in den HepG2-Zellen.

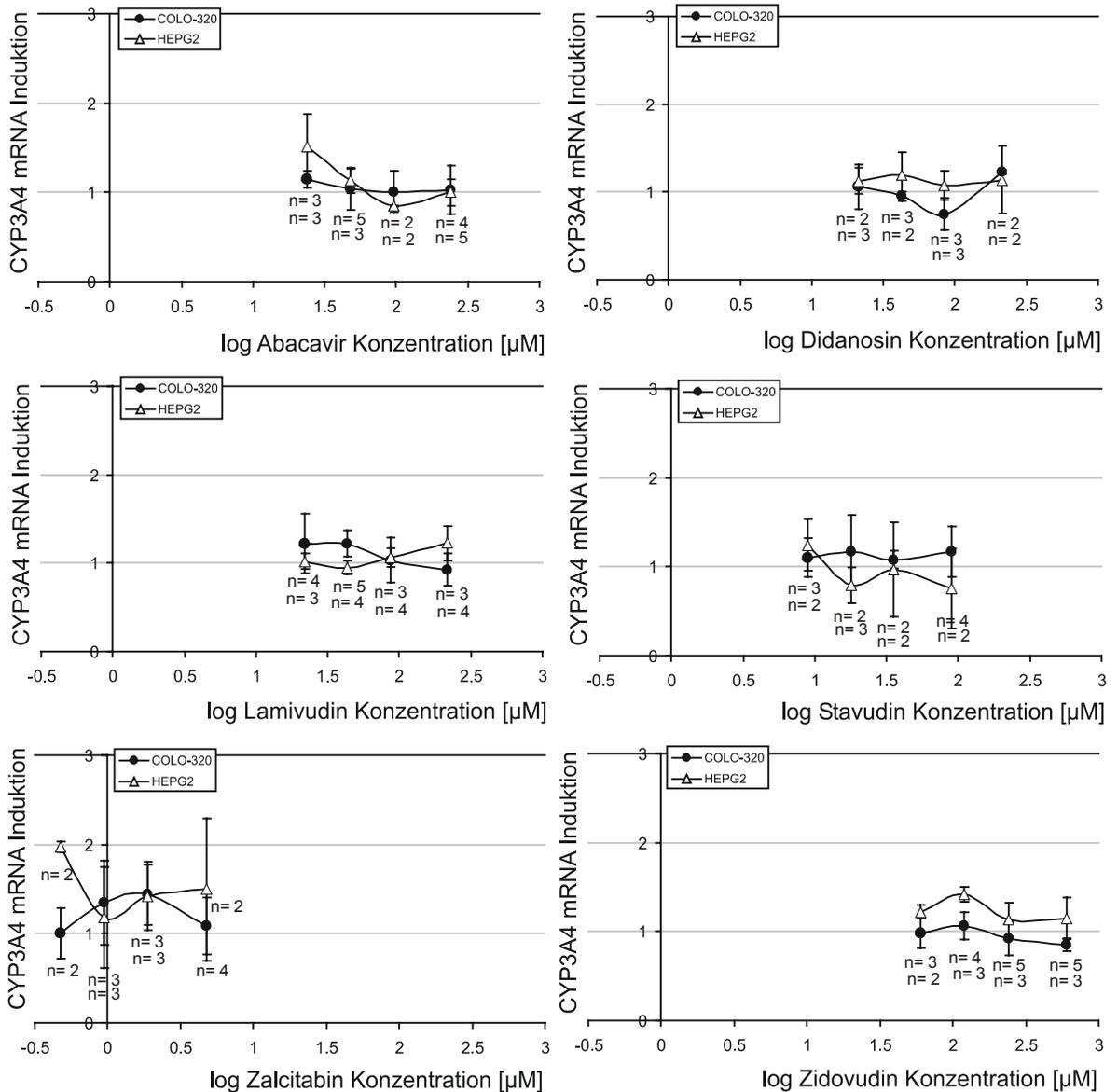


Abbildung 26: CYP3A4 mRNA Expression in HepG2 und COLO-320 Zellkultur unter Einwirkung der Nucleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren.

Es sind die Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Die Werte der Konzentrationen wurden logarithmiert. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht. Die geringen Konzentrationen von Zalcitabin waren durch die niedrige Tagesdosis bedingt.

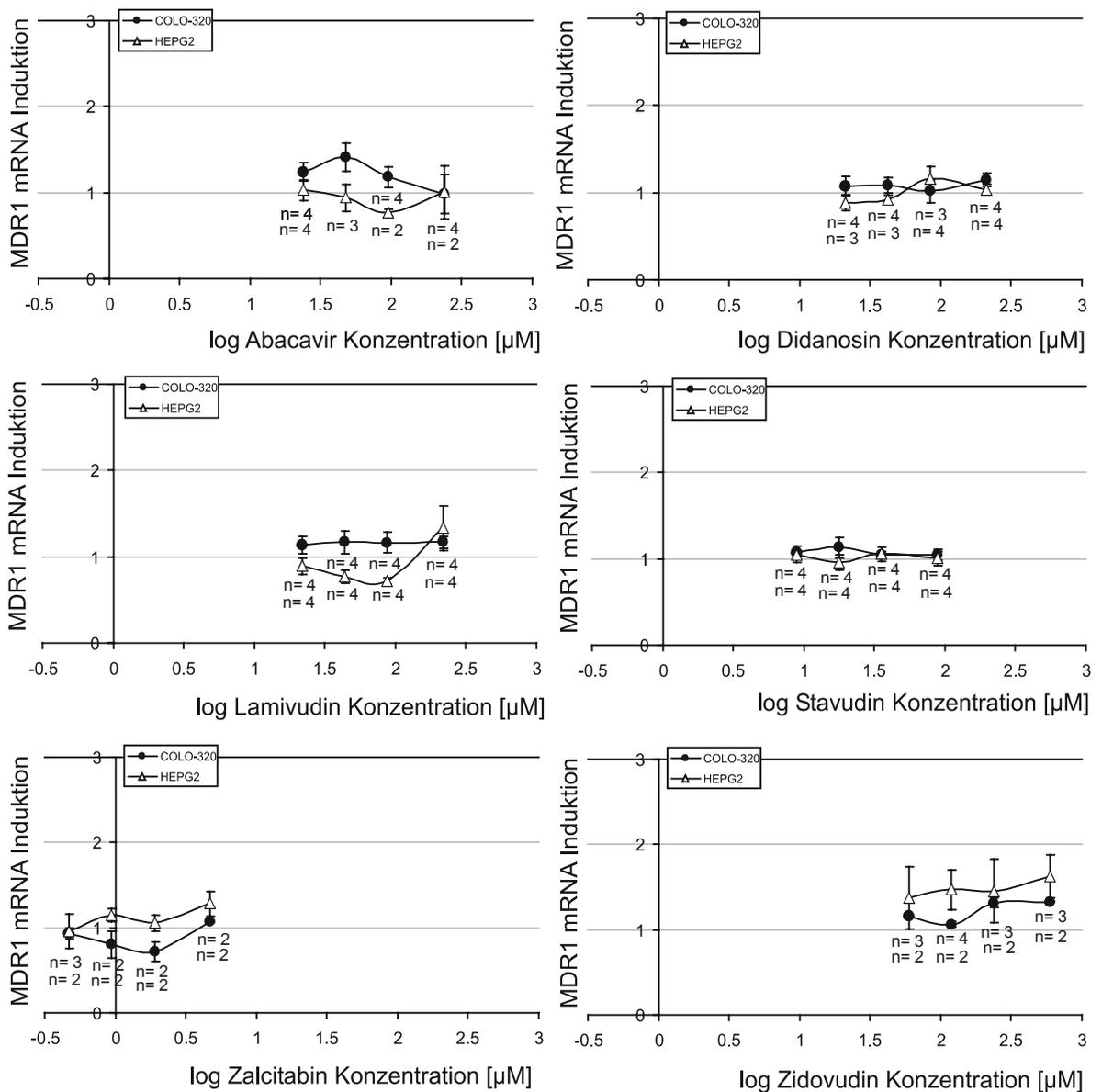


Abbildung 27: MDR1 mRNA Expression in HepG2 und COLO-320 Zellkultur unter Einwirkung der Nucleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren.

Es sind die Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Die Werte der Konzentrationen wurden logarithmiert. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht. Die geringen Konzentrationen von Zalcitabin waren durch die niedrige Tagesdosis bedingt.

In der COLO Zelllinie zeigten die untersuchten Nicht-Nucleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren keine signifikanten induktiven Effekte (Abbildung 28) auf die Expression der MDR1 mRNA auf. Die CYP3A4 mRNA Konzentrationen in den COLO-Zellen stiegen nach Inkubationen mit 20.3  $\mu\text{M}$  Efavirenz signifikant um den 1.7 ( $p = 0.040$ ) Faktor an. Bei höheren Konzentrationen blieb die Expression nahezu konstant bei durchschnittlich 19 CYP3A4 mRNA Moleküle/ng RNA; unbehandelte Zellen exprimierten 11 ( $\pm 2$ ) Moleküle/ng RNA. Die Zellen dermalen Ursprungs zeigten eine 1.9-fache Erhöhung der CYP3A4 mRNA Konzentration nach Inkubationen mit Delavirdin, die statistisch nicht signifikant (Vergleich aller Gruppen;  $p = 0.148$ ) war.

Delavirdin induzierte die CYP3A4 mRNA in den HepG2-Zellen (Abbildung 28) um das 2.2-fache signifikant ( $p = 0.037$ ). Die Konzentration der MDR1 mRNA stieg unter Einwirkung von Delavirdin in der HepG2-Zellkultur konzentrationsabhängig an und erreichte den gemessenen maximalen Effekt

mit dem Faktor 3.4 unter 579  $\mu\text{M}$ . Betrachtet man die Effekte bei der Tagesdosis, lag der Induktionseffekt in den HepG2-Zellen (Tabelle 16) für die CYP3A4 mRNA bei 2.1 und für die MDR1 mRNA bei 1.6. Die MDR1 mRNA Expression sank in den COLO-Zellen unter dem Einfluss von Delavirdin konzentrationsabhängig bis auf das 0.3-fache ab. In den HepG2-Zellen induzierte Efavirenz die CYP3A4 mRNA Expression maximal um den Faktor 3.2 ( $p = 0.029$ ) nach Inkubationen mit 101.6  $\mu\text{M}$  - die mRNA Menge stieg von der basalen Expression bei durchschnittlich 231 ( $\pm 54$ ) Moleküle mRNA/ng RNA auf 705 ( $\pm 118$ ) an. Auf die MDR1 mRNA Expression hatte Efavirenz keine aktivierende Wirkung. Inkubationen mit Nevirapin ergaben keine signifikanten Expressionsveränderungen von CYP3A4 oder MDR1.

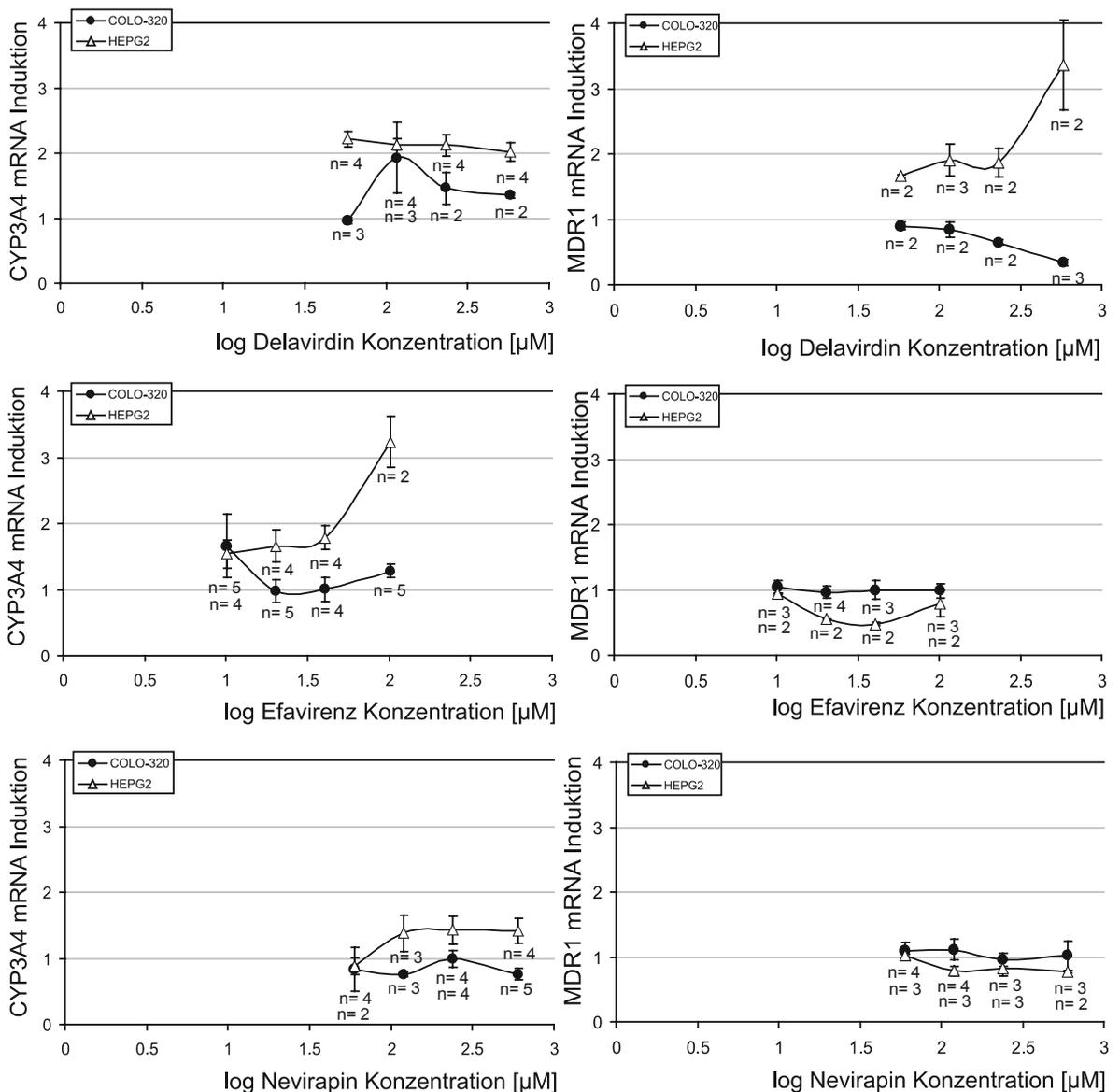


Abbildung 28: Einfluss der Nicht-Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren auf die Expression von CYP3A4 und MDR1 mRNA in COLO-320 und HepG2-Zellen.

Es sind die Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Die Werte der Konzentrationen wurden logarithmiert. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht.

Beide Zelltypen wurden mit sechs Proteaseinhibitoren inkubiert. Das Ansprechen der Zellen auf die Stoffe war unterschiedlich und wird im folgenden für jede Substanz einzeln geschildert.

Amprenavir hatte einen induktiven Effekt auf die Expression der CYP3A4 mRNA (Abbildung 29) in beiden Zelltypen. In den COLO-Zellen stieg die mRNA Konzentration von durchschnittlich  $32 (\pm 10)$  Moleküle/ng RNA auf  $66 (\pm 23)$  nach Inkubationen mit  $632.9 \mu\text{M}$  Amprenavir mit einem Faktor von 2.0 ( $p = 0.038$ ) signifikant an. In den HepG2-Zellen betrug der Induktionsfaktor 3.3 ( $p = 0.024$ ) nach Inkubationen mit  $126.6 \mu\text{M}$  Amprenavir. Bei höheren Konzentrationen war der Effekt schwächer ausgeprägt mit 1.8 bzw. 1.4-fachem Anstieg der CYP3A4 mRNA Konzentration. Bei der errechneten Tagesdosis lag der Faktor der Induktion bei 1.8 in den COLO-Zellen bzw. bei 1.9 in den HepG2-Zellen. Die Konzentration der MDR1 mRNA (Abbildung 30) stieg in den COLO-Zellen konzentrationsabhängig von  $4.2 \times 10^4 (\pm 5.1 \times 10^3)$  Moleküle/ng RNA auf  $5.9 \times 10^4 (\pm 2.7 \times 10^3)$  Moleküle um den Faktor 1.4 signifikant an ( $p = 0.04$ ), der maximale Effekt wurde unter  $253 \mu\text{M}$  Amprenavir erreicht. Bei der höchsten Konzentration von  $632.9 \mu\text{M}$  hat die MDR1 mRNA Menge nahezu den Ausgangswert erreicht und lag bei  $4.8 \times 10^4 (\pm 1.2 \times 10^4)$ . Die Veränderungen der MDR1 Expression in der Hepatoma Zellkultur waren moderat und ohne einen signifikanten Anstieg (mit Faktor: 1.3; Vergleich aller Gruppen:  $p = 0.078$ ).

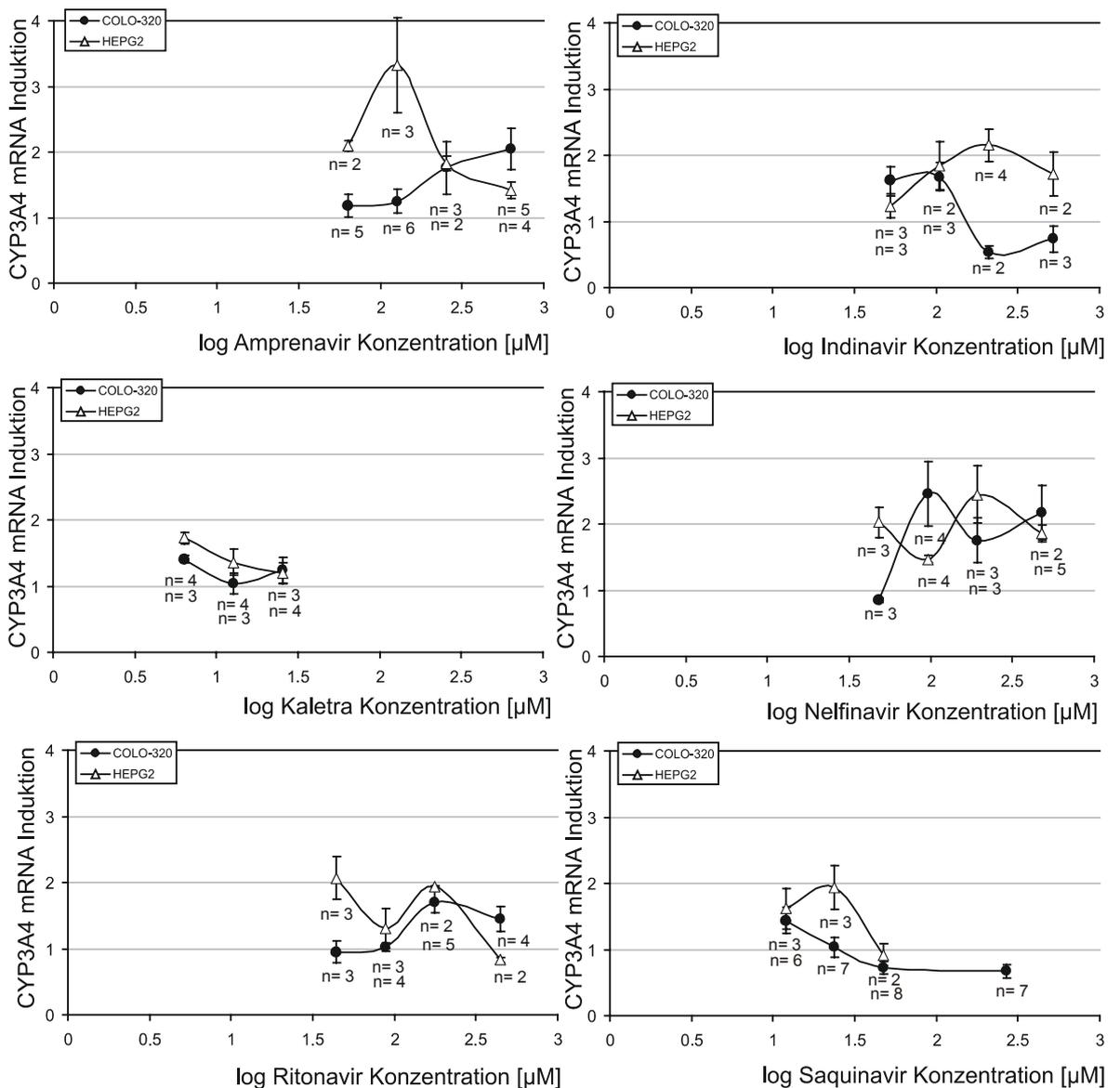


Abbildung 29: CYP3A4 mRNA Expression unter Einwirkung der Proteaseinhibitoren in der COLO-320- und HepG2-Zellkultur

Es sind die Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Die Werte der Konzentrationen wurden logarithmiert. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA Moleküle der Kontrollansätze aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht.

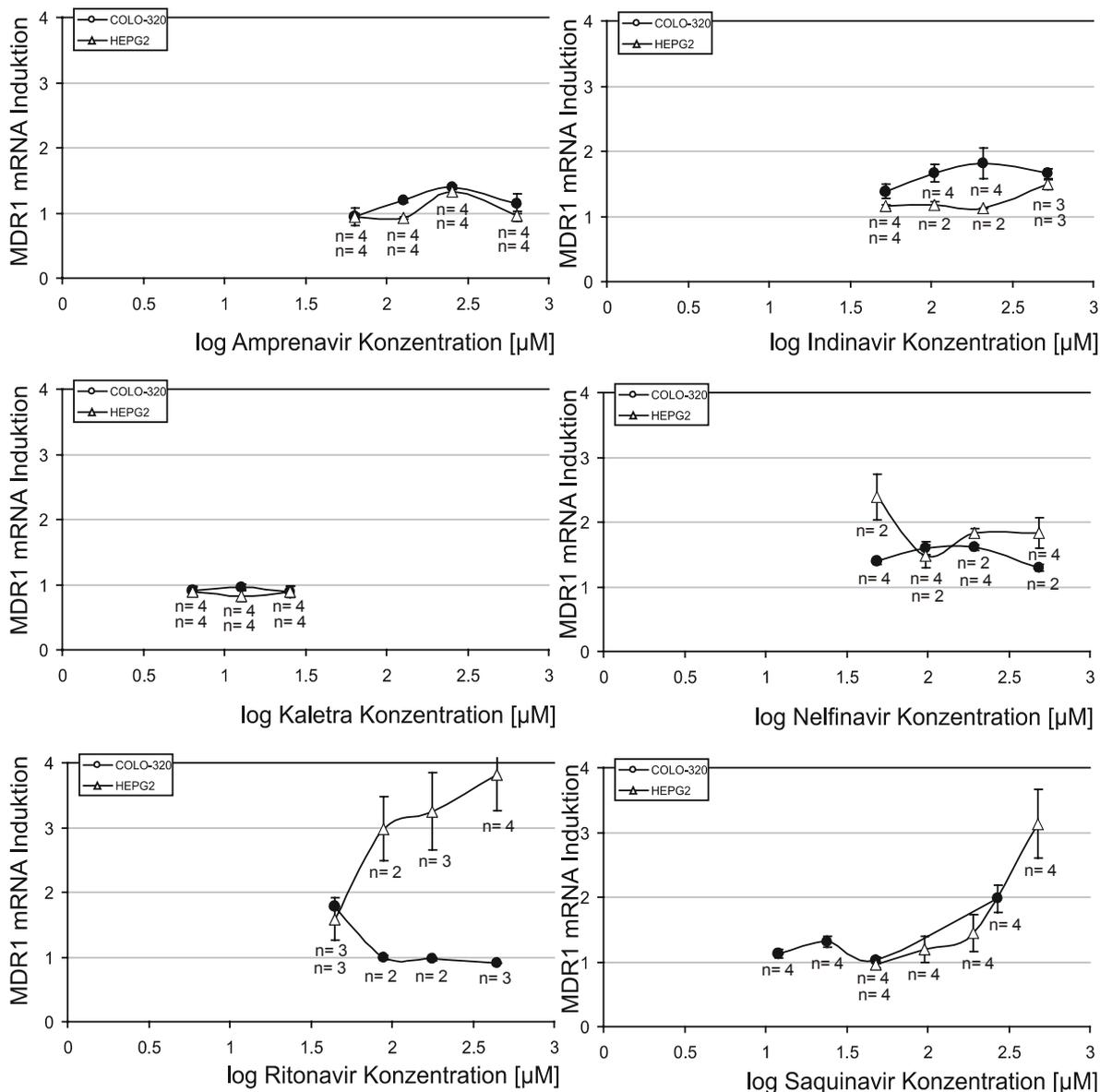


Abbildung 30: Veränderungen in der MDR1 mRNA Expression nach Inkubationen mit Proteaseinhibitoren in der COLO-320 und HepG2-Zellkultur

Es sind die Mittelwerte der Einzelmessungen mit den Standardfehlern der Mittelwerte dargestellt. Die Werte der Konzentrationen wurden logarithmiert. Auf der y-Achse sind die Quotienten aus mRNA Molekülen mit jeweiliger Induktorkonzentration zum Mittelwert der mRNA Moleküle ohne Testsubstanz aufgetragen, was dem Faktor der Induktion entspricht.

Indinavir wies in den Versuchen in beiden Zelltypen und für beide Gene induktives Potential auf und erhöhte die CYP3A4 mRNA Konzentration nach Inkubationen mit 104.3 µM um das 1.7-fache ( $p = 0.045$ ) in den COLO-Zellen und nach den Inkubationen mit 208.5 µM um das 2.2-fache in den HepG2-Zellen ( $p = 0.034$ ). In den COLO-Zellen war die Expression der MDR1 mRNA nach Inkubationen mit 208.5 µM Indinavir 1.8-fach stärker ( $p = 0.043$ ) als in den Kontrollansätzen. In den HepG2-Zellen wurde die maximale Induktion nach 521.3 µM erreicht und betrug das 1.5-fache der Ausgangsmenge ( $p = 0.037$ ), wobei hier kein Induktionseffekt bei der Tagesdosis von 195.5 µM zu verzeichnen war.

Die Inkubationen mit dem Inhalt der Kaletra-Kapseln resultierten nur in den HepG2-Zellen in einer signifikanten Zunahme der CYP3A4 mRNA Konzentration um das 1.7-fache ( $p = 0.044$ ) von 32

( $\pm 9$ ) Molekülen mRNA/ng RNA auf 55 ( $\pm 6$ ) bei 6.4  $\mu\text{M}$ . Bei Konzentrationen von 12.7  $\mu\text{M}$  bzw. 25.4  $\mu\text{M}$  war der Induktionseffekt schwächer ausgeprägt und lag bei einem Faktor von 1.4 bzw. 1.2. Die höheren Konzentrationen wiesen im Zytotoxizitätstest zytotoxisches Potential von  $\geq 20\%$  in den HepG2-Zellen bzw.  $> 80\%$  in den COLO-Zellen auf. Die Inkubationen mit 25.4  $\mu\text{M}$  Substanz wiesen in den HepG2-Zellen einen Zytotoxizitätswert von 17.1 % auf.

Inkubationen mit Nelfinavir erhöhten die Konzentrationen von CYP3A4 und MDR1 mRNA in beiden untersuchten Zellsystemen. In der COLO-Zellkultur lag die maximale Induktion der CYP3A4 mRNA Konzentration (Abbildung 29) bei einem Faktor von 2.5 ( $p = 0.029$ ) bzw. 2.4 ( $p = 0.026$ ) in den HepG2-Zellen. Bei der Tagesdosis von 169.5  $\mu\text{M}$  wäre ein Induktionseffekt von 2.0 bzw. 2.1 zu erwarten. Nelfinavir induzierte die Expression der MDR1 mRNA (Abbildung 30) maximal um den Faktor 1.6 ( $p = 0.005$ ) und 2.4 ( $p = 0.033$ ) in den COLO bzw. HepG2-Zellen. Die Effekte waren auch bei der Tagesdosis sichtbar (Faktor 1.6 bzw. 1.7).

Die CYP3A4 mRNA wurde durch Ritonavir in beiden Zelllinien induziert - mit einem Faktor von 1.7 ( $p = 0.024$ ) in den COLO- und 2.1 ( $p = 0.043$ ) in den HepG2-Zellen. Bei der Tagesdosis war die CYP3A4 mRNA nur in den HepG2-Zellen erhöht, mit einem geschätzten Induktionseffekt von 1.5. Die MDR1 mRNA wurde durch Inkubationen mit Ritonavir um das 1.8-fache ( $p = 0.031$ ) und 3.8-fache ( $p = 0.026$ ) in den COLO bzw. HepG2-Zellen induziert. Hier stieg die Konzentration der MDR1 mRNA kontinuierlich von 103 ( $\pm 13$ ) auf 392 ( $\pm 115$ ) Moleküle mRNA/ng RNA an, bei der Tagesdosis lag der Induktionsfaktor bei 2.8.

Die Inkubationen der HepG2-Zellen mit Saquinavir wurden zweimal durchgeführt. Da die erste Testreihe mit häufig passagierten HepG2-Zellen stattfand, konnte dort keine reproduzierbare CYP3A4 mRNA Messung mehr vorgenommen werden. Somit wurden CYP3A4 und MDR1 in zwei unterschiedlichen HepG2-Zellpopulationen durchgeführt. Saquinavir erhöhte die CYP3A4 mRNA Konzentration signifikant um das 1.4-fache ( $p = 0.028$ ) in den COLO-Zellen und etwas stärker in der Hepatoma Zelllinie, nämlich um das 1.9-fache ( $p = 0.032$ ) nach Inkubationen mit 23.9  $\mu\text{M}$ . Bei der höheren Konzentration von 47.7  $\mu\text{M}$  nahm die CYP3A4 mRNA Menge wieder ab. Nach Inkubationen mit der Tagesdosis von 268.3  $\mu\text{M}$  waren die HepG2-Zellen tot und vom Gefäßboden gelöst. Saquinavir war auch ein potenter Induktor der MDR1 mRNA Synthese in beiden Zelltypen. Der maximale Effekt wurde jeweils bei der höchsten Konzentration erreicht. In der COLO-Zellkultur stieg die MDR1 mRNA Konzentration nach Inkubationen mit 268.3  $\mu\text{M}$  auf das doppelte an ( $p = 0.010$ ), in den HepG2-Zellen nach 477.0  $\mu\text{M}$  um das 3.1-fache ( $p = 0.035$ ). Der Effekt war auch bei der Tagesdosis von 268.3  $\mu\text{M}$  deutlich bei einem geschätzten Induktionsfaktor von 2.0 bzw. 1.8.

In den beiden nachfolgenden Tabellen sind alle getesteten Substanzen mit ihren Konzentrationen sowie den Induktionseffekten auf die CYP3A4 und die MDR1 mRNA aufgeführt. In der Tabelle 15 sind die Ergebnisse aus den Untersuchungen an der COLO-320-Zellkultur zusammengefasst, während Tabelle 16 die Daten aus der HepG2-Zellkultur enthält.

Tabelle 15: Die getesteten Substanzen und die Expression von CYP3A4 und MDR1 mRNA in COLO-320 Zellkultur

Substanz	Getestete Konzentration [µM]	Td [µmol]	Ausmaß der Induktion an Td		Konzentration bei max. Induktion [µM]		Max. Induktion CYP3A4 MDR1	
			CYP3A4	MDR1	CYP3A4	MDR1		
Rifampicin	19.4 – 194.4	36.5	2.1	1.3	19.4	194.4	2.2*	1.6*
Abacavir	23.9 – 238.5	44.7	1.0	1.4	23.9	47.7	1.1	1.4
Didanosin	21.2 – 211.7	42.3	1.0	1.1	211.7	42.3	1.2	1.1
Lamivudin	21.8 – 218.1	32.7	1.2	1.2	43.6	43.6	1.2	1.2
Stavudin	8.9 – 89.2	17.8	1.2	1.1	89.2	35.7	1.2	1.1
Zalcitabin	0.5 – 4.7	0.3	1.0	1.0	1.9	4.7	1.4	1.1
Zidovudin	59.9 – 598.7	93.6	1.0	1.1	119.7	598.7	1.1	1.3
Delavirdin	57.9 – 579.0	108.6	1.7	0.8	115.8	0	1.9	1.0
Efavirenz	10.2 – 101.6	19.1	1.7	1.0	101.6	10.2	1.7*	1.0
Nevirapin	60.2 – 601.5	75.2	0.8	1.1	0	120.3	1.0	1.1
Amprenavir	63.3 – 632.9	237.3	1.8	1.4	632.9	253.1	2.0*	1.4*
Indinavir	52.1 – 521.3	195.5	0.7	1.8	104.3	208.5	1.7*	1.8*
Kaletra <sup>1</sup>	6.4 – 25.4	63.6	n.d.	n.d.	6.4	0	1.4	1.0
Nelfinavir	48.2 – 482.0	169.5	2.0	1.6	96.4	192.8	2.5*	1.6*
Ritonavir	44.4 – 443.8	83.2	1.0	11	177.5	44.4	1.7*	1.8*
Saquinavir	11.9 – 268.3	268.3	0.7	2.0	11.9	268.3	1.4*	2.0*

<sup>1</sup> Bei Kaletra beziehen sich die Konzentrationsangaben auf die Mischung Lopinavir/Ritonavir (4:1). Konzentrationen höher als die Tagesdosis waren für die Zellen zytotoxisch (n.d. = nicht detektiert).

\* Signifikanter Anstieg nach dem Kruskal-Wallis-Test mit  $p < 0.05$

Tabelle 16: Die getesteten Substanzen und die Expression von CYP3A4 und MDR1 mRNA in HepG2-Zellkultur

Substanz	Getestete Konzentration [µM]	Td [µM]	Ausmaß der Induktion an Td		Konzentration bei max. Induktion [µM]		Max. Induktion CYP3A4 MDR1	
			CYP3A4	MDR1	CYP3A4	MDR1		
Rifampicin	19.4 – 194.4	36.5	2.5	1.3	38.9	194.4	2.6*	1.6*
Abacavir	23.9 – 238.5	44.7	1.1	1.0	23.9	23.9	1.5	1.0
Didanosin	21.2 – 211.7	42.3	1.2	0.9	42.3	84.7	1.2	1.2
Lamivudin	21.8 – 218.1	32.7	1.0	0.9	218.1	218.1	1.2	1.3
Stavudin	8.9 – 89.2	17.8	0.8	0.9	8.9	89.2	1.2	1.0
Zalcitabin	0.5 – 4.73	0.3	2.0	1.0	0.5	4.7	2.0	1.3
Zidovudin	59.9 – 598.7	93.6	1.3	1.5	119.7	598.7	1.4	1.6
Delavirdin	57.9 – 579.0	108.6	2.1	1.8	57.9	579.0	2.2*	3.4*
Efavirenz	10.2 – 101.6	19.1	1.5	0.8	101.6	0	3.2*	1.0
Nevirapin	60.2 – 601.5	75.2	1.0	1.0	240.6	60.2	1.4	1.0
Amprenavir	63.3 – 632.9	237.3	1.9	1.3	126.6	253.1	3.3*	1.3
Indinavir	52.1 – 521.3	195.5	2.1	1.1	208.5	521.3	2.1*	1.5*
Kaletra <sup>1</sup>	6.4 – 25.4	63.6	n.d.	n.d.	6.4	0	1.7*	1.0
Nelfinavir	48.2 – 482.0	169.5	2.1	1.2	192.8	482.0	2.4*	1.8*
Ritonavir	44.4 – 443.8	83.2	1.5	2.8	44.4	443.8	2.1*	3.8*
Saquinavir	11.9 – 477.0	268.3	n.d.	1.8	23.9	477.0	1.9*	3.1*

<sup>1</sup> Bei Kaletra beziehen sich die Konzentrationsangaben auf die Mischung Lopinavir/Ritonavir (4:1). Konzentrationen höher als die Tagesdosis waren für die Zellen zytotoxisch (n.d. = nicht detektiert).

\* Signifikanter Anstieg nach dem Kruskal-Wallis-Test mit  $p < 0.05$

Im nächsten Schritt wurden die Effekte von Rifampicin auf die Expression von CYP3A4 bzw. MDR1 mRNA gleich 1 gesetzt und alle anderen Substanzen in Bezug zu dieser Größe ausgewertet (Abbildung 31). Es zeigte sich ein sehr heterogenes Muster an Effekten. Es waren vor allem die Proteaseinhibitoren, die in den induktiven Effekten Rifampicin glichen oder stärker waren.

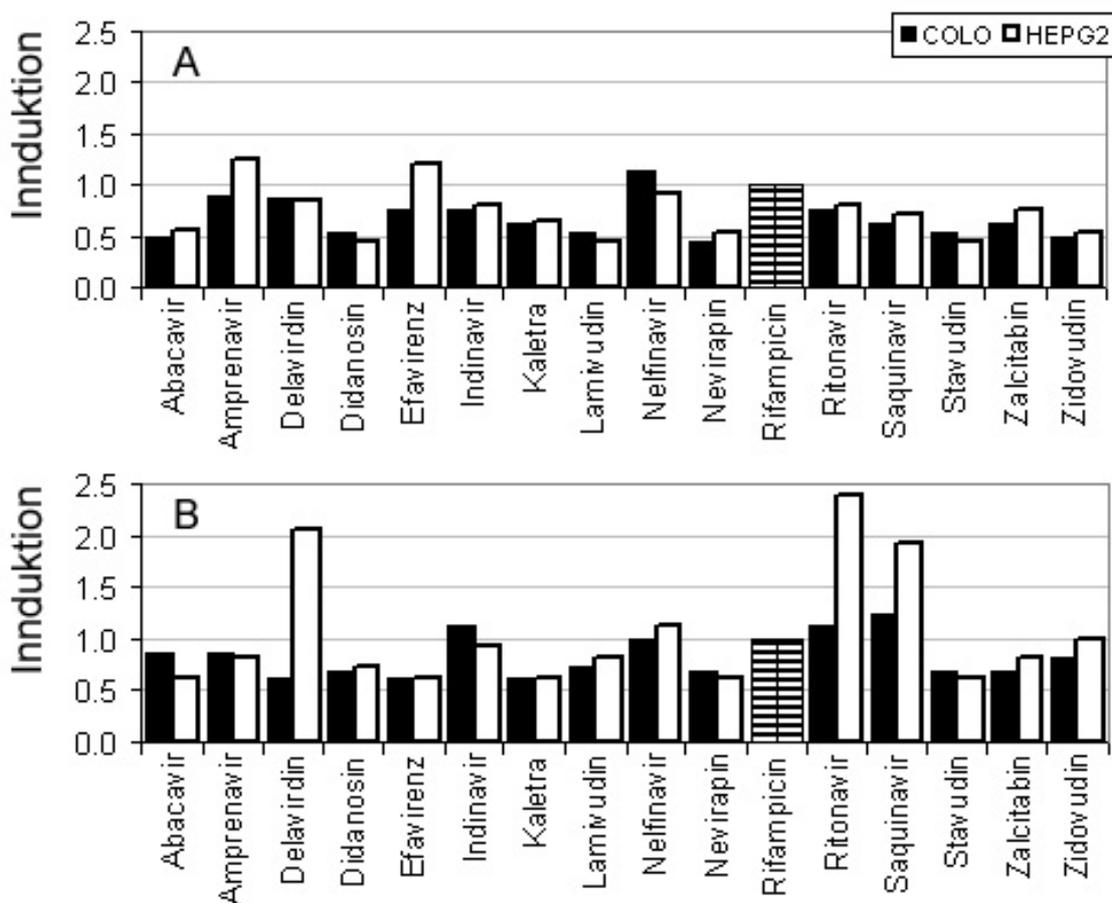


Abbildung 31: Der maximale Induktionseffekt der untersuchten Medikamente auf die Expression von CYP3A4 und MDR1 mRNA

A: Das Ausmaß der CYP3A4 mRNA Induktion

B: Die Veränderungen in der Expression der MDR1 mRNA

Der Effekt von Rifampicin wurde gleich 1 gesetzt und galt als Bezugsgröße für die anderen Substanzen.

Die untersuchten Gene für CYP3A4 und MDR1 waren in der COLO-320 Zelllinie um ca. 30% weniger stark induzierbar als dies unter gleichen Bedingungen in den HepG2-Zellen gezeigt werden konnte. Zum anderen reagierten die COLO-Zellen empfindlicher auf höhere, toxische Dosen der Medikamente als die HepG2 Kulturen. In den COLO-Zellen wurden CYP3A4 und MDR1 mRNA durch fünf antiretrovirale Mittel signifikant induziert; Amprenavir, Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir und Saquinavir. In den HepG2-Zellen war das Spektrum der induzierenden Substanzen breiter, wobei Kaletra, Amprenavir und Efavirenz nur die Konzentration von CYP3A4 mRNA statistisch signifikant erhöhten.

### 5.3 CYP3A4 mRNA Expression in Leukozyten unter Rifampicin Induktion: Korrelation mit der Pharmakokinetik von Alprazolam unter Berücksichtigung bekannter Polymorphismen

Es wurde eine RT-PCR zur Bestimmung der CYP3A4 mRNA Konzentration im peripheren Blut entwickelt und validiert.

Die CYP3A4 RT-PCR erwies sich als spezifisch für die CYP3A4 mRNA und sensitiv für geringe Ausgangskonzentrationen. Die gewählten Primer CYP3A4F und CYP3A4R waren nur für die CYP3A4 mRNA spezifisch. Sie wurden so ausgesucht, dass sie sich am entscheidenden 3' Ende von der Sequenz der stark homologen Gene CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A43 unterschieden. Das Ergebnis der Amplifizierung wurde mittels Sequenzierung überprüft; das cDNA Fragment enthielt reine CYP3A4 Sequenz. In Abbildung 32 ist das Ergebnis der Sequenzierung einer RNA-Probe aus den Leukozyten im direkten Vergleich zu den Sequenzen der CYP3A Vertreter dargestellt.

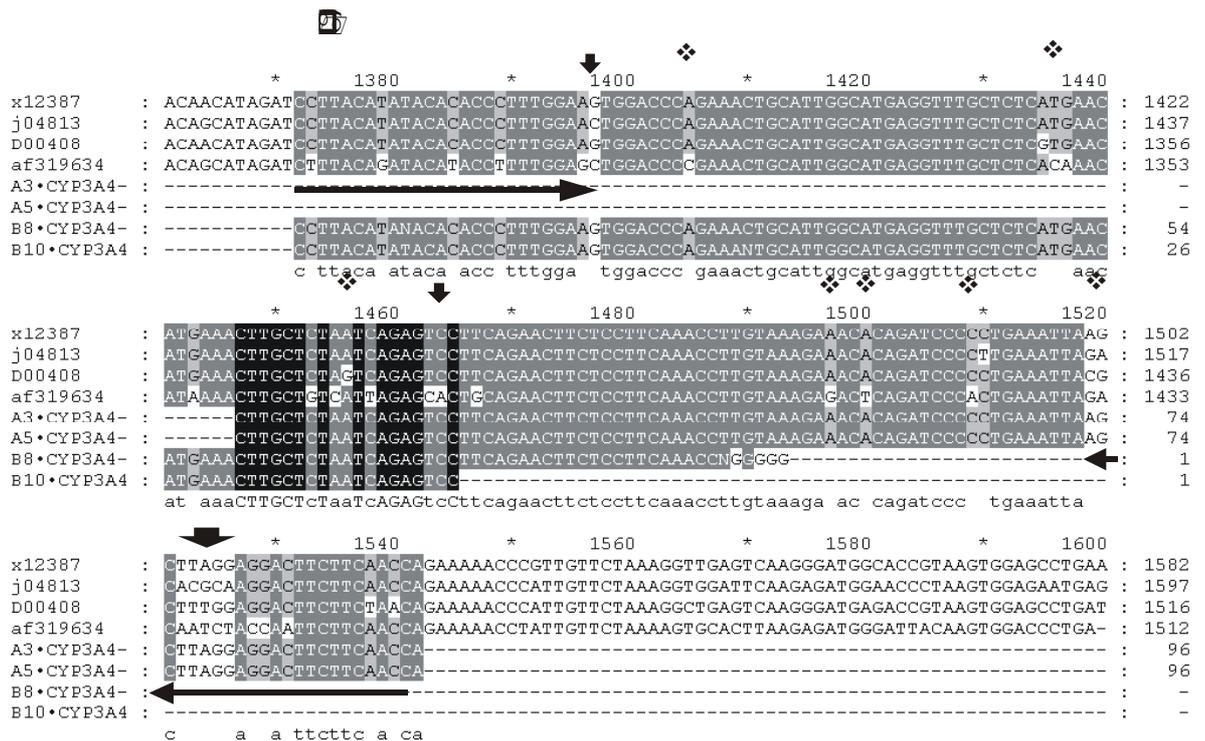


Abbildung 32: Sequenzvergleich eines cDNA Amplifikates aus Leukozyten mit den Vertretern der CYP3A Subfamilie

Es ist ein Vergleich der Sequenzierungsergebnisse der RT-PCR-Produkte aus zwei Leukozytenproben (A001 sowie A002) mit den Vertretern der CYP3A-Subfamilie dargestellt: CYP3A4 (X12387), CYP3A5 (J04813), CYP3A7 (D00408) und CYP3A43 (af319634). Die Sequenzen A3·CYP3A4 und A5·CYP3A4 stammen aus einer Sequenzierreaktion mit dem Primer CYP3A4F, während die Proben B8·CYP3A4 und B10·CYP3A4 das Resultat der Sequenzierung mit dem Primer CYP3A4R darstellen. Die Pfeile oberhalb der Basenabfolgen weisen auf die entscheidenden Unterschiede zwischen den CYP3A-Formen hin, während die horizontalen Pfeile die eingesetzten Primer symbolisieren. In den cDNA-Proben aus Leukozyten ist an drei Stellen der Buchstabe „N“ statt des gewohnten ACGT-Codes vorzufinden, welcher darauf hinweist, dass das Programm an diesen Stellen keine sichere Basenzuordnung vornehmen konnte.

Es wurden Transkripte von 35 Kopien (4.2 atg) bis  $3.5 \times 10^5$  Kopien (4.2 fg) detektiert. Die Standardkurve weist auf eine gute Korrelation zwischen Kopien der CYP3A4 mRNA und  $C_T$  hin ( $r = -0.98$ ). Unter 35 Kopien mRNA pro Ansatz war die Quantifizierung aufgrund des fehlenden exponentiellen Verlaufs der Reaktion unzuverlässig.

In einer Studie an 102 gesunden Probanden wurden die molekularen Grundlagen der

interindividuell stark variierenden CYP3A4 Expression untersucht. Es wurden kinetische Parameter erhoben, um die Aktivität des Enzyms zu bestimmen (s. 4.7). Bestimmung der CYP3A4 mRNA sollte Aufschluss über die Induzierbarkeit der mRNA im Blut geben. Beide Parameter wurden mit den Ergebnissen der Genotypisierungen der bekannten Polymorphismen der beteiligten Gene verglichen.

Sechs Leukozytenproben lieferten aus technischen Gründen ungenügende RNA Mengen, so dass nur 96 RNA-Proben ausgewertet werden konnten. Die folgenden Daten beziehen sich auf die 96 Probanden, von denen 61 männlich und 35 weiblich waren. Die Teilnehmer waren zwischen 19 und 64 Jahren alt, wobei der Median 26 Jahre betrug. Das Gewicht belief sich im Median auf 70.5 kg mit einem Bereich von 50 bis 100 kg.

Die RT-PCR Reaktionen aller Proben wurden in Dreifachmessungen durchgeführt. Der Median der analytischen Varianz lag bei 129.90 ( $SD^2$ ), wenn die Messungen einer Probe an verschiedenen Tagen erfolgten. Die Darstellung einer CYP3A4 PCR-Kinetik mit Proben vor und nach der Induktion zeigt Abbildung 33. Die CYP3A4 mRNA weist nach der Rifampicin-Induktion einen höheren  $C_T$ -Wert auf, denn sie hebt sich schneller aus dem Hintergrund hervor als die mRNA Proben, die am zweiten Tag der Studie gesammelt wurden.

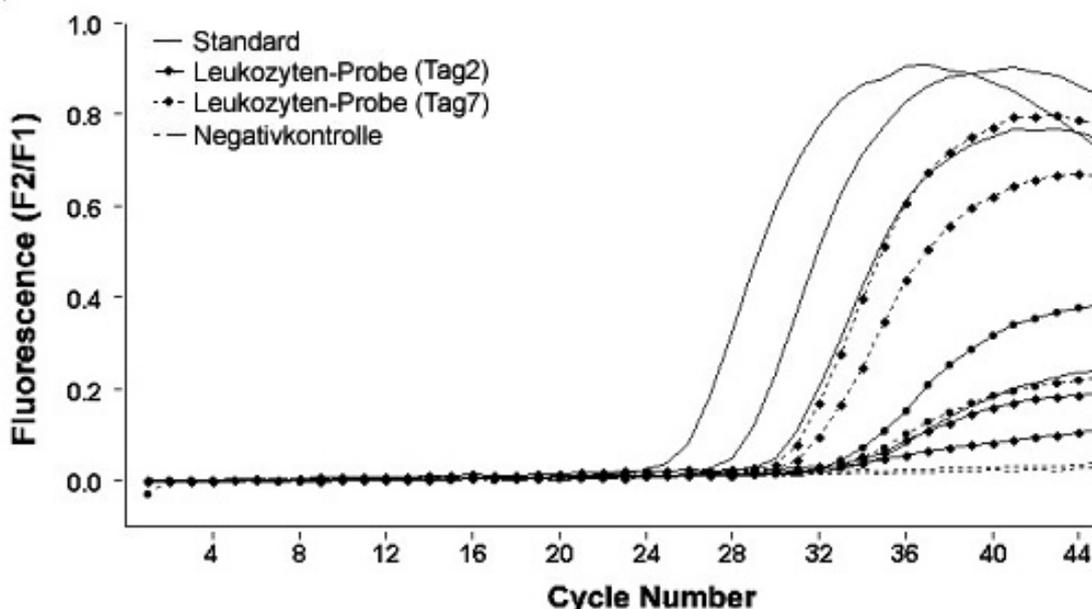


Abbildung 33: CYP3A4 PCR-Kinetik aus drei Leukozytenproben vor und nach der Induktion

Es sind die Verdünnungsreihe der Standard-RNA, von  $3.5 \times 10^5$  bis  $3.5 \times 10^2$  Kopien; sowie die Proben vor und nach 5-tägiger RIF Behandlung dargestellt.

Die CYP3A4 mRNA konnte in allen untersuchten Leukozyten-Proben detektiert werden. Unter Kontrollbedingungen (Tag 2) wurden zwischen 10 und 128 Moleküle/ng Gesamt-RNA (Median=28) gemessen (Tabelle 17). Nach fünf Tagen Induktionsperiode erhöhte sich der Median an detektierter CYP3A4 mRNA signifikant auf 50 Moleküle/ng RNA ( $p < 0.0001$ ; Tag 7).

Zehn Stunden nach Einnahme von 1 mg Alprazolam wurden die Konzentrationen des Medikamentes im Plasma mittels HPLC bestimmt. Sie betragen im Median 8.1  $\mu\text{g/l}$  zu Beginn der Studie (Tag 2) bzw. 1.7  $\mu\text{g/l}$  nach der Rifampicin-Behandlung (Tag 7), was einer Induktion mit dem Faktor 5.0 (Median) entspricht (Tabelle 17). Die metabolische Clearance von Alprazolam wurde nach der durch Schmider et. al. [182] ermittelten Formel berechnet und die Werte steigerten sich von einem Median von 3.2 l/h unter Kontrollbedingungen auf 16.1 l/h nach fünftägiger Behandlung mit Rifampicin. Nach der zweiwöchigen Auswaschphase ist die Alprazolam Clearance stark gesunken und erreichte fast die Ausgangswerte. Hier betrug der Median 3.5 l/h.

Tabelle 17: CYP3A4 mRNA in Leukozyten und Alprazolam Kinetik

Die Messungen wurden bei 96 gesunden Probanden unter Kontrollbedingungen (Tag 2), nach 5-tägiger RIF Behandlung (450 mg, Tag 7) sowie nach der Auswaschphase (Tag 22) durchgeführt.

	Proben	Mittelwert	SD	Median	Perzentile		Bereich	
					25‰	75‰	Min.	Max.
CYP3A4 mRNA [Moleküle/ng RNA]	Tag 2	32	19.6	28	21	37	10	128
	Tag 7	61	53.1	50*	40	66	9	484
ALZ 10-h Konzentration im Plasma [µg/l]	Tag 2	8.4	1.9	8.1	7.1	9.5	4.5	14.6
	Tag 7	1.8	0.8	1.7*	1.3	2.2	0.4	4.1
	Tag 22	7.8	1.9	7.6*	6.5	8.8	3.9	12.6
Errechnete ALZ Clearance [l/h]	Tag 2	3.3	0.8	3.2	2.8	3.8	1.8	5.8
	Tag 7	18.4	10.9	16.1*	12.2	20.8	6.4	83.3
	Tag 22	3.6	0.9	3.5*	3.0	4.1	2.1	6.8

\* statistisch signifikanter Unterschied zu Tag 2 bzw. Tag 7 nach Mann-Whitney-Test

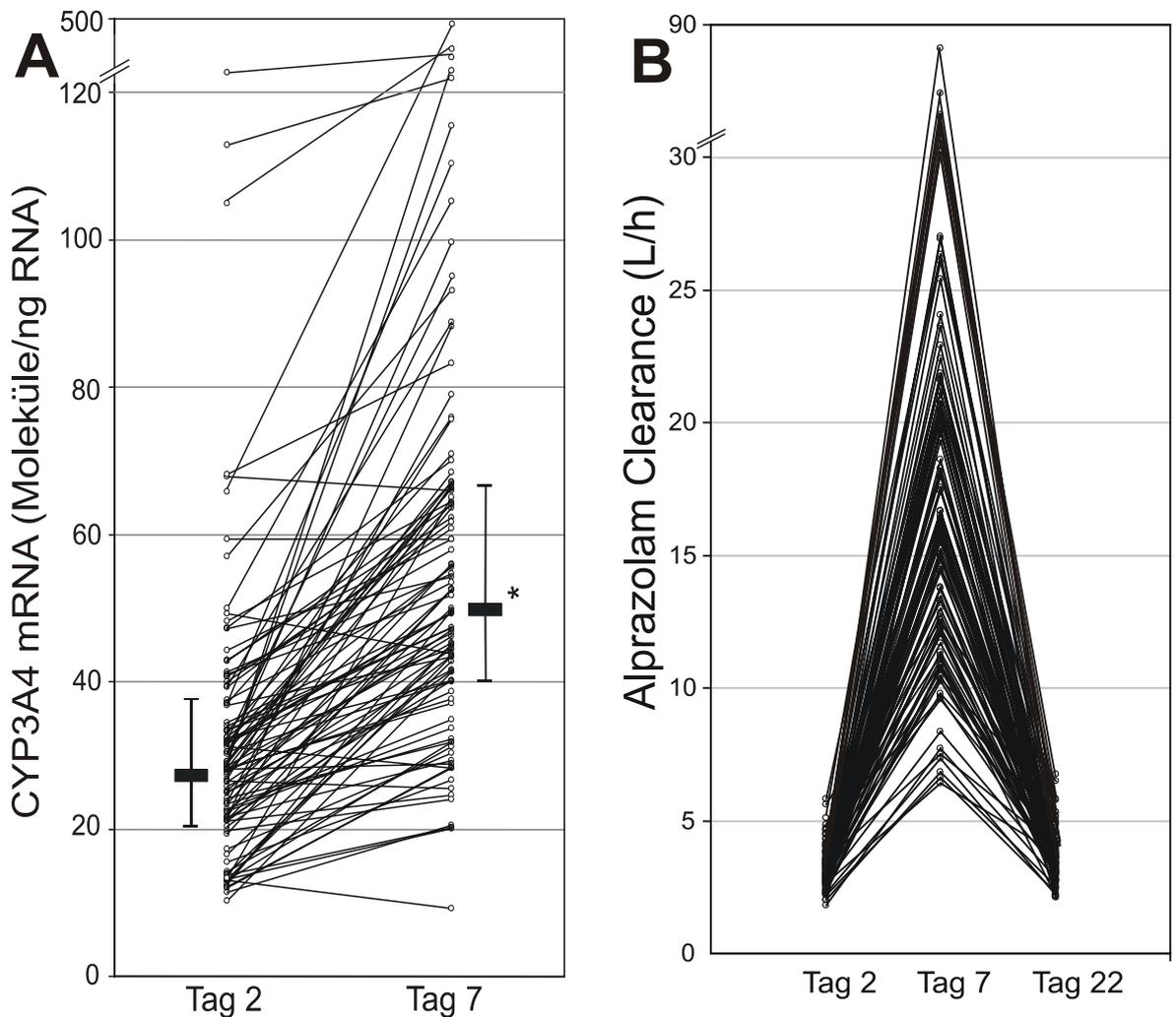


Abbildung 34: Individuelle Unterschiede im CYP3A4 mRNA Gehalt und Alprazolam Clearance bei 96 gesunden Probanden vor und nach Rifampicin Behandlung

Die Balken stellen den Median mit den 25 und 75 Perzentile (\*p < 0.000, Wilcoxon-Test).

Nach der fünftägigen Behandlung mit 450 mg Rifampicin wiesen die meisten Probanden höhere CYP3A4 mRNA Konzentrationen in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes auf (Abbildung 34). Der Faktor der Induktion variierte zwischen 0.7 und 7.3 mit einem Median von 2.0. Im Bezug auf das Ausmaß der Induktion konnten zwei extreme Gruppen gefunden werden. Sieben Probanden wiesen keine Induktion der CYP3A4 mRNA Spiegel auf. Am Anfang der Studie konnten bei ihnen durchschnittlich 39 CYP3A4 mRNA Moleküle pro 1 ng zellulärer RNA detektiert werden (Median = 31) mit Einzelwerten zwischen 16 und 68 mRNA Molekülen/ng Gesamt-RNA, während nach fünf Tagen Induktion die gemittelten Kopienzahlen 37 (Median = 29) betragen. Auf der anderen Seite zeigten sieben Probanden CYP3A4 mRNA Konzentrationen, die um einen Faktor von 4.0 bis 7.3 durch Rifampicin induziert wurden. Hier lag der Median bei 4.0. 82 Probanden wiesen eine moderate Induktion der CYP3A4 mRNA durch Rifampicin auf. Hier bewegte sich die Anzahl der mRNA Kopien pro 1 ng zellulärer RNA zwischen 11 und 128 zu Beginn der Studie, und der Median lag bei 28 Kopien/ng RNA. Nach der RIF Behandlung stieg die Molekülzahl auf 57 an, der Median war bei 50. Der Faktor der Induktion betrug im Median 2.0.

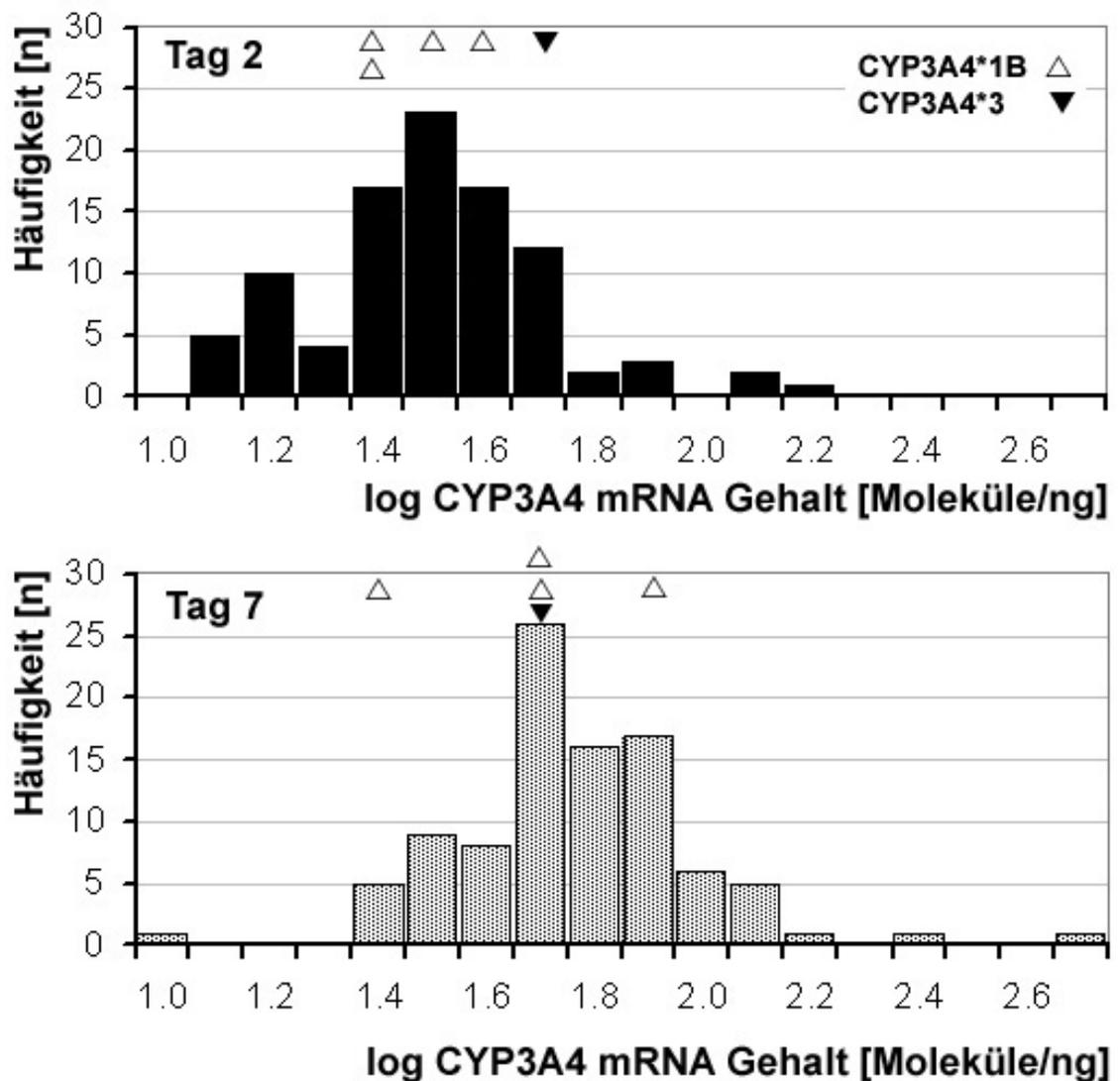


Abbildung 35: Logarithmisch transformierte Häufigkeitsverteilung der CYP3A4 mRNA Kopien in Leukozyten von 96 Probanden vor und nach Behandlung mit Rifampicin

Die Häufigkeitsverteilung der beiden untersuchten CYP3A4 Genotypen mit Hilfe der kleinen Symbole eingetragen.

Die Histogramme in Abbildung 35 legen den Schluss nahe, dass die logarithmisch transformierten

Werte der CYP3A4 mRNA Moleküle sich nicht wesentlich von einer Normalverteilung unterscheiden. Es konnte keine Korrelation zwischen den mRNA Mengen vom Beginn der Studie und dem Ausmaß der Induktion gemessen werden. Die nicht induzierte Gruppe zeigte zum Teil überlappende Werte der mRNA Mengen mit den Werten nach Induktion.

Für die mRNA Messungen unter Kontrollbedingungen und nach Rifampicin Behandlung wurde ein optimierter Trennwert (*cutoff value*) von 46.68 Molekülen/ng RNA (log: 1.67) mit der in 4.7 vorgestellten Formel errechnet. Der Anteil der Werte, die am Tag 2 kleiner waren als der Trennwert, stellten in % die diagnostische Spezifität dar. Die diagnostische Sensitivität erklärt sich durch den prozentuellen Anteil der Werte nach Induktion, die größer als der Trennwert waren. Die diagnostische Spezifität und Sensitivität der CYP3A4 mRNA Messung sind in Tabelle 18 aufgetragen. Diese Parameter stellen Indikatoren für die Güte des analytischen Verfahrens dar.

Tabelle 18: Die ermittelten Parameter für die Testgüte der beiden verwendeten analytischen Verfahren.

Messung	Optimierter Trennwert	Diagnostische Spezifität	Diagnostische Sensitivität
CYP3A4 mRNA	46.68 Moleküle/ng RNA	86.5 %	58.3 %
Alprazolam Clearance	10.86 l/h	100 %	84.4 %

Die Histogramme in Abbildung 36 zeigen die Häufigkeitsverteilung der logarithmisch transformierten Alprazolam Clearance-Werte. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass sich die Häufigkeitsverteilung der Werte nicht wesentlich von einer Normalverteilung unterscheidet. Außerdem ist erkennbar, dass die Kontroll-Werte mit den Werten nach Rifampicin Behandlung nicht überlappen. Für die Alprazolam Clearance unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Rifampicin wurde ein optimierter Trennwert von 10.86 l/h (log: 1.04) berechnet. Ausgehend von dem Trennwert wurden die Parameter für die diagnostische Spezifität und Sensitivität des Tests (Tabelle 18) zur Detektion der CYP3A4 Induktion berechnet.

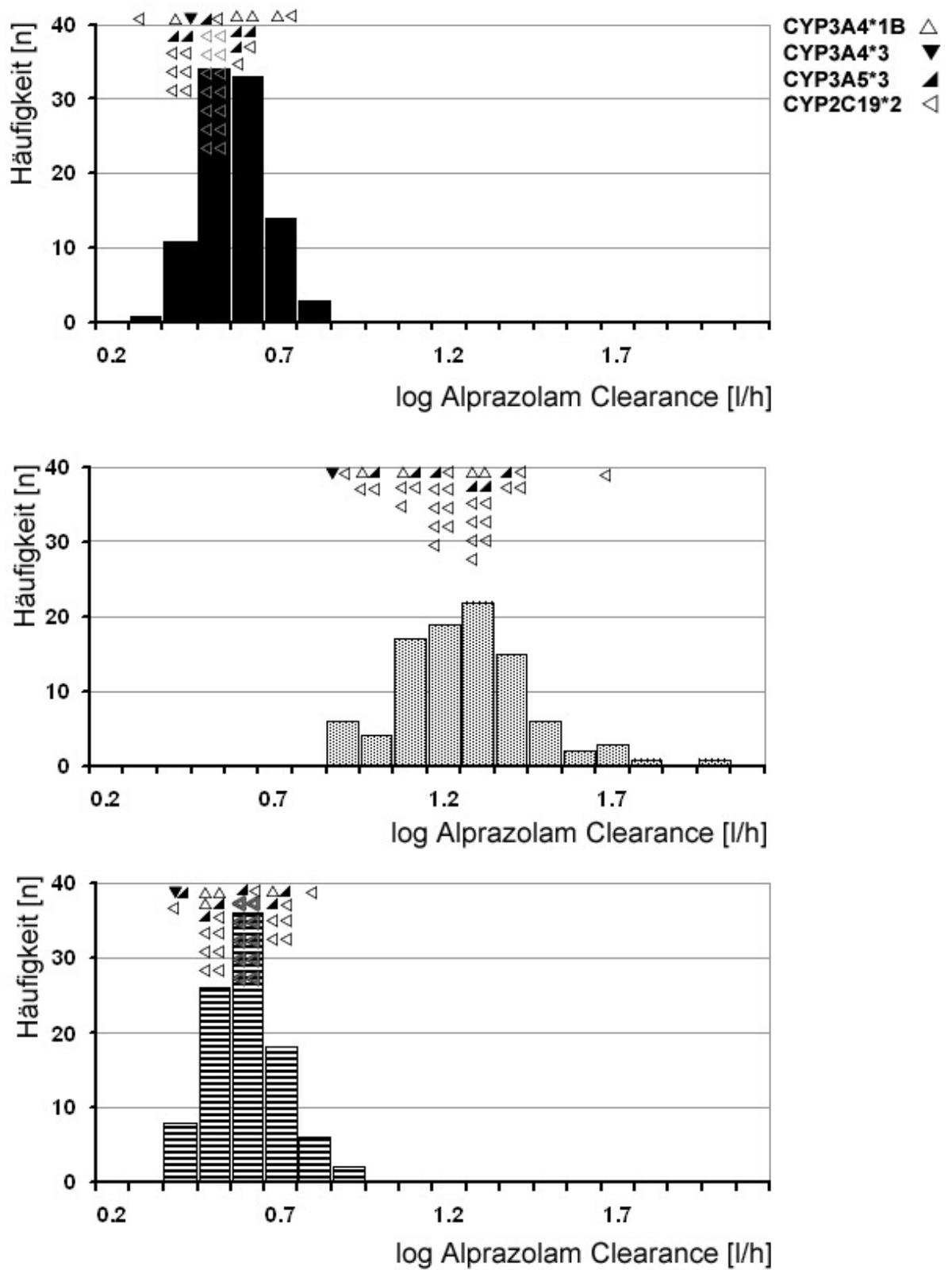


Abbildung 36: Häufigkeitsverteilung der Werte für die Alprazolam-Clearance

Es ist auch die Häufigkeitsverteilung der untersuchten Genotypen von *CYP3A4*, *CYP3A5* und *CYP2C19* aufgetragen.

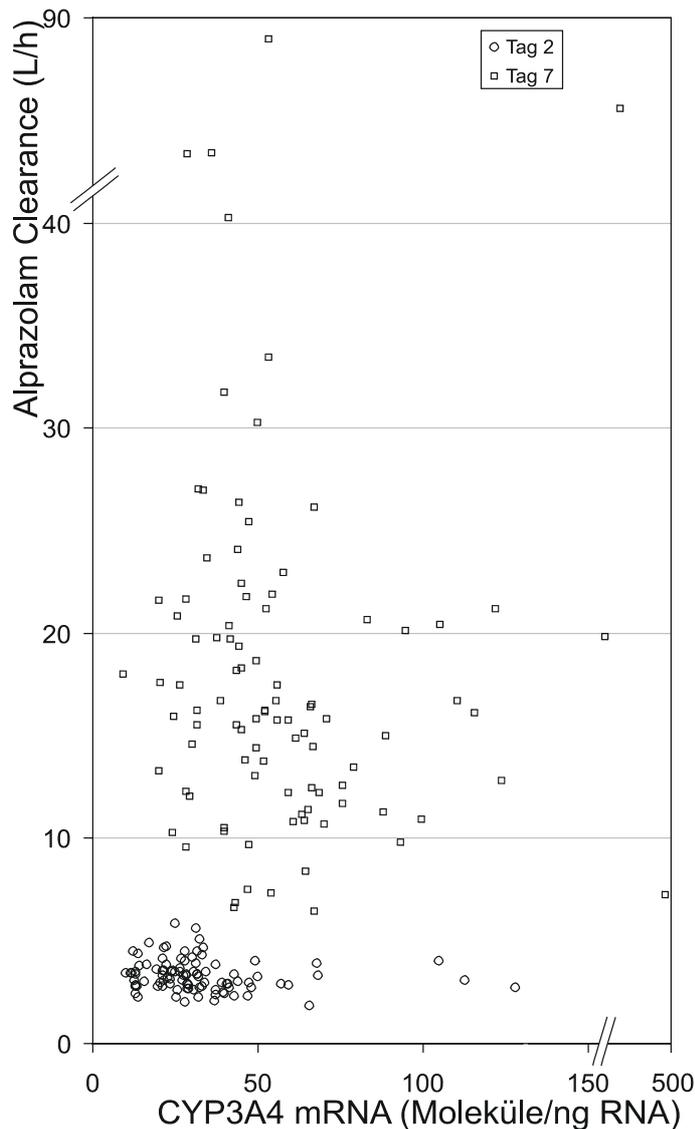


Abbildung 37: Korrelation der CYP3A4 mRNA Mengen in Leukozyten mit der Alprazolam Clearance vor und nach fünftägiger Rifampicin Behandlung bei 96 Probanden

(Spearman's Korrelationskoeffizient für Tag 2:  $r = -0.224$ ;  $p = 0.028$ ;  $r^2 = 0.050$ ; Tag 7:  $r = -0.189$ ;  $p = 0.033$ ;  $r^2 = 0.036$ )

Die Messungen auf der mRNA Ebene unter Kontrollbedingungen korrelierten nicht mit den Messungen der Alprazolam-Clearance (Abbildung 37). Stattdessen ist eine minimale inverse Korrelation sichtbar. Eine Adjustierung der Werte der Alprazolam-Konzentration auf das Körpergewicht brachte keine Verbesserung der Signifikanz. Nach Behandlung mit Rifampicin war ebenfalls keine Korrelation der beiden Messreihen sichtbar (Abbildung 37). Der Faktor der Zunahme der CYP3A4 mRNA korrelierte nicht mit errechneten Clearance von Alprazolam bei 96 gesunden Probanden nach der fünftägigen Behandlung mit Rifampicin (Korrelationskoeffizient nach Spearman  $r = -0.155$ ,  $p = 0.066$ , n.s.; Bestimmtheitsmaß  $r^2 = 0.024$ ).

Des Weiteren wurde ein möglicher Einfluss des Geschlechts auf die Expression von CYP3A4 mRNA in der peripheren Blutbahn, die Aktivität des Enzyms sowie die Induzierbarkeit untersucht. In Tabelle 19 sind die Ergebnisse der Korrelationsversuche nach Spearman aufgelistet und belegen, dass es keinen Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der Expression/Aktivität von CYP3A4 gibt. In den Stängel-Blatt-Diagrammen in Abbildung 38 ist die Korrelation des Ausmaßes der Induktion der CYP3A4 Expression und des Alprazolamstoffwechsels mit dem

Geschlecht verdeutlicht.

Tabelle 19: Korrelation des Geschlechts mit der CYP3A4 mRNA Expression und Alprazolam Konzentration

	Median		Korrelation mit Geschlecht
	Männlich (n = 61)	Weiblich (n = 35)	
Alprazolam Konzentration Tag2 [µg/l]	8.09	8.58	r = -0.027, p = 0.797
Alprazolam Konzentration Tag7 [µg/l]	1.65	1.68	r = -0.031 p = 0.765
Induktion der Aktivität	5.49	4.73	r = 0.014 p = 0.892
mRNA Konzentration Tag2 [Moleküle/ng RNA]	28.01	28.86	r = 0.096 p = 0.354
mRNA Konzentration Tag7 [Moleküle/ng RNA]	54.21	49.46	r = 0.135 p = 0.189
Induktion der Expression	1.79	1.56	r = 0.043 p = 0.681

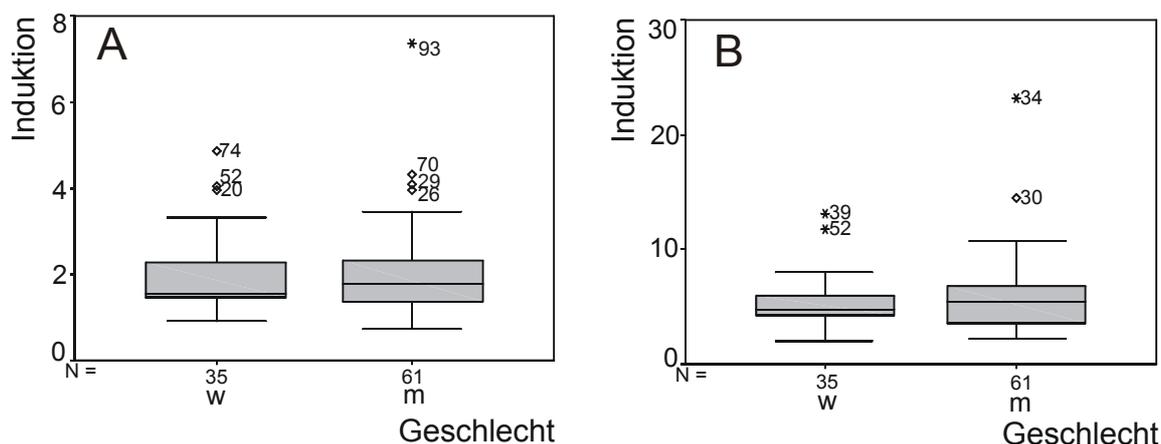


Abbildung 38: Stängel-Blatt-Diagramme zur Korrelation der Induktion von CYP3A4 mit dem Geschlecht

A: Korrelation des Faktors der CYP3A4 mRNA Induktion mit dem Geschlecht.

B: Korrelation des Faktors der Induktion der Alprazolam-Elimination (gemessen durch Alprazolam Konzentration) mit dem Geschlecht.

Um pharmakogenetische Einflüsse auf den Stoffwechsel von Alprazolam und die CYP3A4 mRNA Konzentration in den Leukozyten zu überprüfen, wurden die in den letzten Jahren als relevant beschriebenen erblichen Polymorphismen in den Genen CYP3A4 und CYP3A5 untersucht. Das *CYP3A4\*1B* Allel wurde von Rebbeck et al [115] beschrieben und stellt eine Promotorvariante (-392 A>G) dar. In der kaukasischen Population wurde das Allel mit einer Frequenz von 3.6 % gefunden [187]. Das *CYP3A4\*1B* Allel [107, 110] lag in 4 Individuen heterozygot vor (s. Tabelle 8). Es gab keine Unterschiede in der Pharmakokinetik von Alprazolam oder CYP3A4 mRNA Gehalt im Vergleich zu den Trägern des *CYP3A4\*1A* Wildtyp-Allels. Um den möglichen Einfluss auf die Induzierbarkeit zu bewerten, wurde das Verhältnis der Alprazolam Konzentrationen ohne Rifampicin zu den Werten nach Induktion bestimmt. Der Median betrug 4.8 in den Trägern des Wildtyp-Promotor-Allels und 3.7 in den 4 Probanden, die das *CYP3A4\*1B* Allel trugen, der Unterschied war statistisch nicht signifikant, was durch die Häufigkeitsverteilung der Allele in

Abbildung 36 verdeutlicht wurde.

Tabelle 20: Verteilung der untersuchten Genotypen mit den Alprazolam Konzentrationen und CYP3A4 mRNA Gehalt

Genotyp	n	Alprazolam 10 h Konzentration [µg/l] Median (Bereich)	CYP3A4 mRNA [Moleküle/ng RNA]
Vor Rifampicin Induktion			
Alle	96	8.1 (4.5-14.6)	28.3 (10.2-128.0)
CYP3A4*1B	4	6.8 (5.7-9.7)	30.1 (26.6-41.3)
CYP3A4*3	1	6.6	49.3
CYP3A5*1	6	8.0 (6.1-11.7)	30.0 (25.2-47.4)
CYP2C19*1/*1	70	7.9 (4.5-13.2)	28.2 (10.2-112.8)
CYP2C19*1/*2	22	9.0 (5.9-14.6)*	28.7 (13.0-128)
CYP2C19*2/*2	3	8.8 (6.8-8.8)	44.2 (15.5-67.9)
Nach Rifampicin Induktion			
Alle	96	1.7 (0.4-4.1)	50.0 (9.2-483.6)
CYP3A4*1B	4	1.8 (1.2-2.7)	51.0 (25.6-75.7)
CYP3A4*3	1	1.12	43.9
CYP3A5*1	6	1.5 (1.0-2.5)	60.8 (25.6-75.7)
CYP2C19*1/*1	70	1.7 (0.3-4.1)	51.2 (9.2-218.4)
CYP2C19*1/*2	22	1.5 (0.6-3.4)	48.4 (24.1-483.6)
CYP2C19*2/*2	3	1.6 (1.5-2.2)	59.4 (26.7-66.0)

\* statistisch signifikant nach Vergleich mit CYP2C19\*1/\*1 (p=0.038)

Das Allel *CYP3A4\*3* wurde von Sata et al. [199] beschrieben und verursacht einen Aminosäureaustausch (Met445Thr). Es handelt sich hierbei um eine Punktmutation im Exon 12 (1334 T>C). Das Allel *CYP3A4\*3* wurde in einer einzigen Probe heterozygot vorgefunden. Die Alprazolam Konzentration dieses Probanden lag über dem 85. Perzentile (P79: 11.6 µg/l), während der CYP3A4 mRNA Gehalt nach Behandlung mit Rifampicin abnahm (Tabelle 20).

Die *CYP3A5\*1*-Variante des CYP3A5 Gens wurde ebenfalls untersucht und in 6 Probanden in heterozygoter Form gefunden (Tabelle 20). Inzwischen ist bekannt, dass nur die Träger mindestens eines *CYP3A5\*1* Allels ein intaktes CYP3A5 Protein exprimieren [200]. Die Allelhäufigkeit liegt bei rund 5 % in der kaukasischen Population [102]. Der Median der 10-h Konzentration von Alprazolam in Probanden mit einem aktiven CYP3A5 Allel unterschied sich nicht von den anderen Individuen (8.0 µg/l gegen 8.1 µg/l).

Das *CYP2C19\*2* Allel wurde von De Morais et al. beschrieben [201] und stellt eine Punktmutation im Exon 5 dar (681 G>T), die in einer Verlagerung der Spleißstelle resultiert. Durch die Verschiebung des Leserahmens entsteht ein verfrühtes Stop-Codon, was ein verkürztes Protein ohne Häm-Bindungsstelle zu Folge hat. Sollte eine Beteiligung von CYP2C19 am Alprazolam-Stoffwechsel vorliegen, wäre dies an erhöhten Alprazolam-Konzentrationen bei Trägern der Mutation zu erkennen. Diese häufigste und funktionell defekte Mutation des CYP2C19 zeigte eine Häufigkeitsverteilung von 3.1 % homozygoter Träger (Genotyp *CYP2C19\*2\*2*), 22.9 % Heterozygoter (*CYP2C19\*1\*2*) sowie 72.9 % Träger des Wildtyp-Allels *CYP2C19\*1\*1*, was mit den für die Kaukasier bereits beschriebenen Daten übereinstimmt [202, 203]. Die Konzentrationen von Alprazolam in heterozygoten Trägern lag zwischen 10 und 20 % höher als in homozygoten Trägern des Wildtyp-Allels am Tag 1 und 22 (p = 0.038). Die Mediane der 3 Langsammetabolisierer unterschieden sich nicht signifikant von den anderen Teilnehmern (Tabelle 20). Die unterschiedlichen CYP2C19 Genotypen hatten keinen Einfluss auf das Ausmaß der Rifampicin Induktion.

## 6 Diskussion

Die Messungen der CYP-P-450-Aktivität sind entscheidend für die Einschätzung der Wirkungsdauer und Bioverfügbarkeit der Pharmaka sowie zur Verhinderung der Nebenwirkungen. In den letzten Jahren sind verschiedene *in vitro* Techniken entwickelt worden, um die Aktivität der Cytochrom-P450-Enzyme zu bestimmen [203]. Es werden humane oder tierische Lebern, Hefen, Bakterien oder Insekten für die Untersuchungen herangezogen. Die Bestimmung der Metabolite oder der durch die HPLC ermittelten Abnahme der Testsubstanz lässt Rückschlüsse auf die Enzymaktivität ziehen. Zum anderen können Untersuchungen auf der mRNA Ebene durchgeführt werden. Diese liefern Aussagen über den Expressionsstatus der untersuchten Gene, der meist mit der Aktivität des Genproduktes direkt korreliert.

### 6.1 RNA Analytik mittels RT-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere PCR-basierende Verfahren zur Bestimmung des Expressionsstatus einiger Gene, die am Metabolismus bzw. Transport der Arzneistoffe maßgeblich beteiligt sind, entwickelt.

Eine Besondere Herausforderung stellte die Etablierung einer quantitativen RT-PCR Methode zur Bestimmung der CYP3A4 mRNA Konzentration in mononukleären Zellen der peripheren Blutbahn dar. Nach zahlreichen erfolglosen Versuchen mit unterschiedlichen Primerpaaren und verschiedenen Detektionsverfahren (Flachbett-Elektrophorese, Polyakrylamidgel-Elektrophorese, Kapillarelektrophorese mit Fluoreszenzdetektion) wurde das Verfahren der PCR in Echtzeit herangezogen und stellte die optimale Lösung dar.

Die Technologie der RT-PCR in Echtzeit ermöglicht korrektes und sensitives Quantifizieren auch sehr geringer Anzahlen mRNA Kopien. Es wurde von einer Sensitivitätsgrenze von 10 Kopien cDNA berichtet [204, 205, 206]. Bei geringer Ausgangsmenge an gesuchter mRNA können bereits geringe Abweichungen von den gewählten Reaktionsbedingungen, ob während der RNA Extraktion oder der Reversen Transkription zu starken Differenzen und Verfälschungen in den Ergebnissen der PCR führen, da sie während des letzten Schrittes millionenfach amplifiziert werden. Die hergestellte externe Standard-RNA kann als Kontrolle der beiden RT-PCR Schritte genutzt werden, da sie parallel zu der nativen RNA transkribiert und später vervielfältigt wird. Aufgrund der Sequenz- und Primeridentität waren die Reaktionsbedingungen für Standard und CYP3A4 mRNA gleich.

Außerdem ergibt sich für die quantitative RT-PCR in Echtzeit ein weiterer entscheidender Vorteil, denn während man bei der herkömmlichen PCR mit anschließender Detektion mittels Elektrophorese für jede Reaktion zunächst ermitteln muss, wann die Amplifikation im exponentiellen Bereich verläuft und bei welchem Zyklus sie diesen verlässt, erübrigt sich diese Frage in dem Echtzeit-Verfahren. Für eine verlässliche Ergebnissammlung ist es notwendig, die im exponentiellen Abschnitt der Reaktion vorzunehmen, wenn sich das Produkt in jedem Zyklus verdoppelt. Um die Konzentration der eingesetzten Matrize bestimmen zu können, bietet die Echtzeit-Technologie die Möglichkeit diese mit den Fluoreszenzsignalen, die während der PCR entstehen zu korrelieren. Die LightCycler Software stellt hierzu zwei Prinzipien zur Verfügung. Zum einen kann man den Schwellenwert der Fluoreszenz definieren, also den Zyklus, in dem die Signale die Basislinie verlassen. Da die Sensitivität der Echtzeit-Geräte bei etwa 100 Kopien liegt, nimmt diese Methode an, dass alle Proben dieselbe, relativ hohe DNA Konzentration haben und verlangt eine manuelle Definition der exponentiellen Phase der Vervielfältigung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der zweiten Ableitung gewählt. Hier wird die Form der Kurve ausgewertet, genauer der Scheitelpunkt an dem die Kurve den Hintergrund verlässt.

Die Wahl der geeigneten Primer stellte den kritischen Punkt des Verfahrens dar. Da inzwischen vier Mitglieder der Subfamilie mit großer Sequenzhomologie bekannt sind: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A43 [93, 96, 97], mussten Primer gefunden werden, die zum einen spezifisch für die zu untersuchte mRNA waren und sich zum anderen sehr effizient in der PCR verhielten. Zu diesem Zweck wurden mehrere Möglichkeiten untersucht und die besten Ergebnisse zeigten die beiden gewählten Oligonukleotide. Da die Primer das Intron 12 des CYP3A4 Gens umspannen, konnte eine Unterscheidung zwischen cDNA und genomischer DNA gesichert werden.

Mehrere Autoren haben bereits versucht, CYP3A4 mRNA in Leukozyten nachzuweisen und kamen zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen (Tabelle 21). Die Arbeitsgruppen um Janardan und Hukkanen [101, 108] konnten mit herkömmlichen Methoden in konventionellen PCR-Maschinen

und Detektion in Agarosegelen keine CYP3A4 mRNA in Leukozyten nachweisen, während Nakamoto und seine Kollegen [103] über ein relatives Quantifizieren zur  $\beta$ -Aktin mRNA CYP3A4 detektiert haben. Allerdings befanden sich beide Primer im selben Exon, wodurch mögliche Kontaminationen mit genomischer DNA von der mRNA nicht zu unterscheiden wären. Minimale Mengen an CYP3A4 wurden von Krovat et al. beschrieben [104], die eine quantitative kompetitive RT-PCR in konventionellen PCR-Maschinen gewählt haben. Die gemessenen Mengen befanden sich am Detektionslimit des Verfahrens. Vor kurzem wurde ein Bericht veröffentlicht, in dem erwähnt wurde, dass keine CYP3A4 mRNA detektiert werden konnte, obwohl ein Echtzeit-PCR-Gerät benutzt wurde [97]. In dem Fall könnte man die Hypothese aufstellen, dass es an der Degradierung der mRNA im 5' Bereich liegen könnte, denn die gewählten Primer flankierten ein Fragment eben in dieser Region. Generell beginnt der kontrollierte Abbau der mRNA vermittelt durch Sequenzelemente in der nicht-translatierten Region (UTR) am 5'- bzw. am 3'-Ende [207]. Theoretisch wäre es möglich, dass die Primer, die für den 5'-Bereich spezifisch sind kein Produkt bzw. sehr wenig liefern können, weil dort die mRNA bereits degradiert ist.

Tabelle 21: Literaturvergleich der Primer zur Detektion von CYP3A4 mRNA in Leukozyten.

RT Primer	Position der Primer in EMBL X12387		Genom . DNA Exon	Methode	Quantifizierung	mRNA Menge		Lit.
	→	←				Leukozyten	Leber	
dT(12-18)	1354	1706	12-13	Konventionell (45 Zyklen)	keine	0	ja	[101, 208]
dT(12-18)	1258	1562	11-13	Konventionell	Relativ zu $\beta$ -Aktin	0	ja	[108, 209]
dT(12-18)	867	995	9-10	Konventionell	Kompetitiv zu Standard RNA	8 - 13	$4.79 \times 10^3$ [Kopien/ng]	[104, 210]
Random 9mers	1173	1279	11	Konventionell	Relativ, kompetitiv zu $\beta$ -Aktin	Ja	nicht	[103]
Keine Angaben	749	855	8-9	ABI7700	Relativ, kompetitiv zum house-keeping Gen	0	11-15**	[97]
dT(15)	1375	1522	12-13	LightCycler	Absolute	38	$3 \times 10^5$	[197]

Wenn man annimmt, dass eine humane Zelle im Durchschnitt 10 bis 30pg Gesamt-RNA enthält, was einer mRNA Molekülzahl von 0.2 bis  $1 \times 10^6$  entspricht, würde der Gehalt von 0.5 Kopien CYP3A4 mRNA pro Zelle abgeschätzt. Diese spekulativen Annahmen bedeuten wiederum, dass lediglich jedes zweite Leukozyt CYP3A4 mRNA exprimiert. Die Gruppe um Krovat fand bereits geringe Mengen an CYP3A4 mRNA in Leukozyten [104], was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Diese minimale Präsenz könnte man über die Zelldifferenzierung erklären. Es konnte gezeigt werden, dass das CYP3A Protein in B Lymphozyten exprimiert wird und nicht in T Lymphozyten [102].

Methoden zum Quantifizieren von CYP3A4 sind von wachsender Bedeutung, denn viele Arzneimittelwechselwirkungen können auf die Induktion der CYP3A4 Transkription zurückgeführt werden [93, 94, 99]. CYP3A4 ist am Stoffwechsel der Mehrzahl der Medikamenten beteiligt [95] und kann von einer großen Anzahl an Substanzen induziert werden, wie zum Beispiel den Barbituraten, Glukokortikoiden oder Rifampicin. Die Interaktionen betreffen somit vor allem Patienten, die sich einer Mehrfachtherapie unterziehen müssen und eben diese könnten von der Bestimmung des Expressionsstatus des Enzyms profitieren. Konventionelle *in vivo* Messungen der CYP3A4 Aktivität benötigen den Einsatz einer zusätzlich verabreichten Testsubstanz, über deren Metabolite die Aktivität des verstoffwechselnden Systems geprüft werden kann. In standardisierten HPLC Verfahren haben sich Alprazolam und Midazolam als Testsubstanzen bewährt [187, 211].

## 6.2 Untersuchungen zur Genexpression in Zellkulturen

Da die primären Hepatozyten des Menschen nur schwer zugänglich sind und nicht vermehrt werden können, weicht man in der Praxis gerne auf die immortalisierten Zellkultursysteme aus. In dem Fall muss jedoch der Eignungsgrad der gewählten Zelllinie geprüft werden. Die Zellkulturen

stellen ein künstliches Modellsystem zu Expressionsuntersuchungen dar, die Ergebnisse können nicht direkt auf biochemische Verhältnisse im Organismus übertragen werden, was auch an den Unterschieden in den Expressionsmustern zwischen den einzelnen Zelllinien zu sehen ist.

In der Arbeit von Krovat et al. wurden verschiedene humane Zelllinien in Hinsicht auf ihre Induzierbarkeit untersucht [104]. Es wurde demonstriert, dass beispielweise das CYP3A4 in der HepG2 Zelllinie in größeren Mengen vorhanden ist, während die Zelllinien HeLa, HL60 und THP kaum CYP3A4 mRNA exprimierten. Die CYP1A2 mRNA konnte nur in HepG2-Zellen nachgewiesen werden, während die CYP1A1 mRNA in mehreren Zelllinien exprimiert wurde. Die Gruppe um Engman hat verschiedene Zelltypen intestinalen Ursprungs untersucht [212]. Auch hier wurde die MDR1 mRNA in allen untersuchten Zellen in großen Mengen gefunden, während die CYP3A4 und CYP3A5 mRNAs entweder sehr schwach oder gar nicht exprimiert wurden. Erst eine Vorbehandlung mit dem Induktor Vitamin D3 führte zu starker CYP3A4 Expression. Die Zelllinie HepG2 wurde bereits mehrfach zu Expressionsuntersuchungen herangezogen [120, 213, 214, 215, 216, 217, 218]. Die HeLa-Zellen wurden bereit als geeignetes *in vitro* System für Untersuchungen zur Induktion der CYP1A1 Expression durch Medikamente charakterisiert [55] und deshalb auch in den hier vorgestellten Experimenten genutzt.

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Zelllinien auf ihre Eignung für die Induktionstests mit der CYP3A4 und MDR1 mRNA untersucht (Tabelle 14). Obwohl die Zellkultur ein *in vitro* System maligner Zellen darstellt, konnte man an der Höhe der mRNA Konzentrationen von CYP3A4 und MDR1 gut die ursprüngliche Herkunft des Gewebes erkennen. Es ist bekannt, dass CYP3A4 hauptsächlich in der Leber exprimiert wird [219] während MDR1 in hohen Mengen im Darmgewebe gefunden wurde [176, 220]. Die vorliegenden Ergebnisse belegen die starke Expression von MDR1 in Zellen dermalen Ursprungs und zeigen, dass CYP3A4 zum einen vor allem im Lebergewebe exprimiert wird und zum anderen, dass die Zellkulturen die CYP3A4 mRNA Menge im Vergleich zu nativen Geweben stark reduzieren. Untersuchungen an primären Hepatozyten haben gezeigt, dass CYP3A4 das Cytochrom-P450 darstellt, welches am schnellsten in der Zellkultur in seiner Expression degradiert wird [221]. Andere Versuche mit primären Hepatozyten zeigten, dass nach fünftägiger Kultivierung die CYP3A4 mRNA Konzentration um das 80 bis 300-fache abnahm [222]. Im Vergleich zu CYP3A4 wurde die MDR1 mRNA in allen untersuchten Zellkulturen in größeren Mengen wiedergefunden.

Die HepG2-Zellen synthetisierten in den ersten Passagen noch relativ hohe Mengen an CYP3A4 mRNA, die Konzentrationen reduzierten sich drastisch mit zunehmender Passagenzahl. Es wurde auch von anderen Cytochrom-P450-Enzymen berichtet, die in Zellen mit hohen Passagenzahlen herunterreguliert waren. Das CYP1B1 Enzym wurde in einer Zellkultur muriner Fibroblasten nach der 7. Passage parallel zur langsameren Proliferation nicht mehr exprimiert, obwohl die jungen Zellen starke CYP1B1 Expression aufwiesen [223]. Untersuchungen an humanen Fibroblasten demonstrierten, dass die Expression einiger Moleküle der intrazellulären Signaltransduktion mit zunehmender Passagenzahl reduziert wurde [224]. Die primären Zellen der epidermalen Keratinozyten der Ratte verlieren die Induzierbarkeit des CYP1A1 Enzyms nach ungefähr 15 Passagen, was durch Wechselwirkungen von mindestens zwei spezifischen Transkriptionsfaktoren erklärt wird [225]. Ein Vergleich von jungen endothelialen Zellen (Passage 3) mit alten demonstrierte, dass die mRNA Synthese zweier Untereinheiten der mitochondrialen Cytochrom-C-Oxidase nach Passage 45 um 46 und 37% reduziert war [226]. Die Regulation der CYP3A4 Expression scheint in den HepG2-Zellen nach ca. 11 Passagen auf ein Minimum reduziert zu sein.

Das Lösungsmittel spielt bei den Inkubationsversuchen eine entscheidende Rolle. Ein Vielfach eingesetztes Lösungsmittel, das Dimethylsulfoxid weist zum einen zytotoxische Effekte auf und zum anderen verursacht es selbst eine leichte Induktion der Gene [227]. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Substanzen in Methanol gelöst und die Lösung auf die Zellkulturplatten vorgelegt. Die Zellen und das Medium wurden erst nach dem Verdampfen des Lösungsmittels zugegeben, weil Methanol toxisch ist. Durch die Wahl des Methanols konnten alle Substanzen im gleichen Lösungsmittel verdünnt werden, was einen Vergleich der Messungen vereinfacht.

Die Testsubstanzen wurden in sehr unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Für jede Substanz wurden meistens vier verschiedene Konzentrationen gewählt, wobei versucht wurde auch Konzentrationen aus dem therapeutischen Bereich zu wählen, um sich den Vorgänge *in vivo* zu nähern. Die antiretrovirale Mittel werden in der Therapie in unterschiedlich starken Tagesdosen eingesetzt, entsprechend variierten die getesteten Konzentrationen. Ein extremes Beispiel stellt Zalcitabin dar, das eine Tagesdosis von 2.25 mg hat. Im Vergleich, Abacavir, das auch zu den nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren gehört, wird in einer täglichen

Dosis von 600 mg verabreicht. Um die Tagesdosen auf das Modellsystem Zellkultur übertragen zu können, muss das Verteilungsvolumen berücksichtigt werden. Der Mensch hat durchschnittlich etwa 20 l extrazelluläre Flüssigkeit, die Zellen waren in 2 ml inkubiert, also wurden die Mengen entsprechend umgerechnet. Es wurde nicht das apparente Verteilungsvolumen jeder Substanz (Tabelle 22) herangezogen, da dieses mit systemischen Begebenheiten zusammenhängt (es ergibt sich aus der Gesamtmenge des injizierten Arzneistoffes dividiert durch die Konzentration im Gesamtplasma), die in der Zellkultur nicht nachgestellt werden können. Durch die Testreihen aus vier verschiedenen Konzentrationen sollte sichergestellt werden, dass ein eventuell vorhandenes Induktionspotential erfasst werden kann.

Die intrazellulären Konzentrationen *in vivo* können sich von den *in vitro* gemessenen aufgrund von ungleichen Verhältnissen in der Bioverfügbarkeit unterscheiden. In den hier verwendeten Verfahren wurden Serum-Konzentrationen von 5 bzw. 10% genutzt. Die meisten der antiretroviralen Mittel gehen mit Plasmaproteinen (Albumin,  $\alpha$ 1-Glykoproteine) hydrophobe Wechselwirkungen in einem sehr starken Ausmaß (Tabelle 22) ein. Delavirdin, Efavirenz sowie die Proteaseinhibitoren mit Ausnahme von Indinavir binden mit mehr als 90 % an die Plasmaproteine. Diese Effekte können in einem *in vitro* System nicht berücksichtigt werden. Saquinavir hat eine Bioverfügbarkeit von 4 %, die zum einen durch eine unvollständige Resorption und zum anderen durch hohen first-pass Metabolismus bedingt ist. Beide pharmakokinetischen Eigenschaften treffen auf Bedingungen in Zellkultur nicht zu, was wiederum die zytotoxischen Effekte des Medikamentes bei der Tagesdosis erklärt. Hier ist auch anzunehmen, dass die beobachteten Induktionseffekte *in vivo* unbedeutend sind. Zum anderen können die intrazellulären Konzentrationen der Medikamente *in vivo* beträchtlich höher ausfallen aufgrund der intrazellulären Akkumulation der zumeist lipophilen Komponenten.

Tabelle 22: Einige Parameter zur Pharmakokinetik der untersuchten antiretroviralen Mittel

Substanz	HWZ [h]	Bioverfügbarkeit [%]	P <sub>b</sub> [%]	V <sub>d</sub> [l/kg]
Abacavir	1.5	83	49	0.8
Didanosin	1.5	42	<5	1.08
Lamivudin	5 – 7	80 – 85	<36	1.3
Stavudin	1.3 – 1.4	86	< 5	0.66
Zalcitabin	2	> 80	<4	0.53
Zidovudin	1.1	60 – 70	34 – 38	1.6
Delavirdin	6	Nicht ermittelt	98	0.7
Efavirenz	45	Nicht ermittelt	> 99	2.4
Nevirapin	25 – 30	~ 93	~ 60	1.21
Amprenavir	7 – 10	Nicht ermittelt	90	6.1
Indinavir	2	~65	60	0.4 – 1.74
Lopinavir	5 – 6	Nicht ermittelt	98 – 99	Nicht ermittelt
Nelfinavir	3 – 5	70 – 80	≥98	2 – 7
Ritonavir	3 – 5	Nicht ermittelt	97	0.3 – 0.6
Saquinavir	7 – 12	4	97 – 98	9.9

HWZ: Halbwertszeit, bezieht sich auf die Mehrfachdosis

P<sub>b</sub>: Bindung an die Plasmaproteine

V<sub>d</sub>: apparentes Verteilungsvolumen

Quelle: <http://www.hiv-druginteractions.org/>

Die AhR vermittelte Induktion wurde in 14 antiretroviralen Mitteln untersucht. Wie in Abbildung 39 zusammengefasst, lassen sich die getesteten Substanzen in bezug auf ihre Effekte grob in drei Gruppen unterteilen: von Nicht-Induktoren, wie Stavudin, Didanosin, Abacavir und Efavirenz, über schwach effiziente Induktoren, z. B. Amprenavir und Zidovudin, zu den stark potenten Induktoren, wie Indinavir, Zalcitabin, Nelfinavir and Saquinavir. Darüber hinaus ist die unterschiedliche Ansprechbarkeit der beiden untersuchten mRNAs auf die Inkubationen mit den Medikamenten

hervorzuheben. In manchen Fällen, wie z.B. nach Inkubationen mit Abacavir, Amprenavir, Kaletra und Indinavir, stimmten die Veränderungen in der Expression der CYP1A1 mRNA mit denen von CYP1B1 mRNA überein. In den übrigen Testreihen (Abbildung 39) entstanden Diskrepanzen zwischen CYP1A1 und CYP1B1 in der Induzierbarkeit. Die statistisch signifikante Induktion der CYP1B1 mRNA fiel in acht Fällen stärker aus als die der CYP1A1 mRNA. Generell lässt sich aus den dargelegten Resultaten schließen, dass die AhR regulierte Gen-Batterie einer Induktion durch die älteren Proteaseinhibitoren und Zalcitabin unterliegt, das Ausmaß muss jedoch genspezifisch individuell geprüft werden.

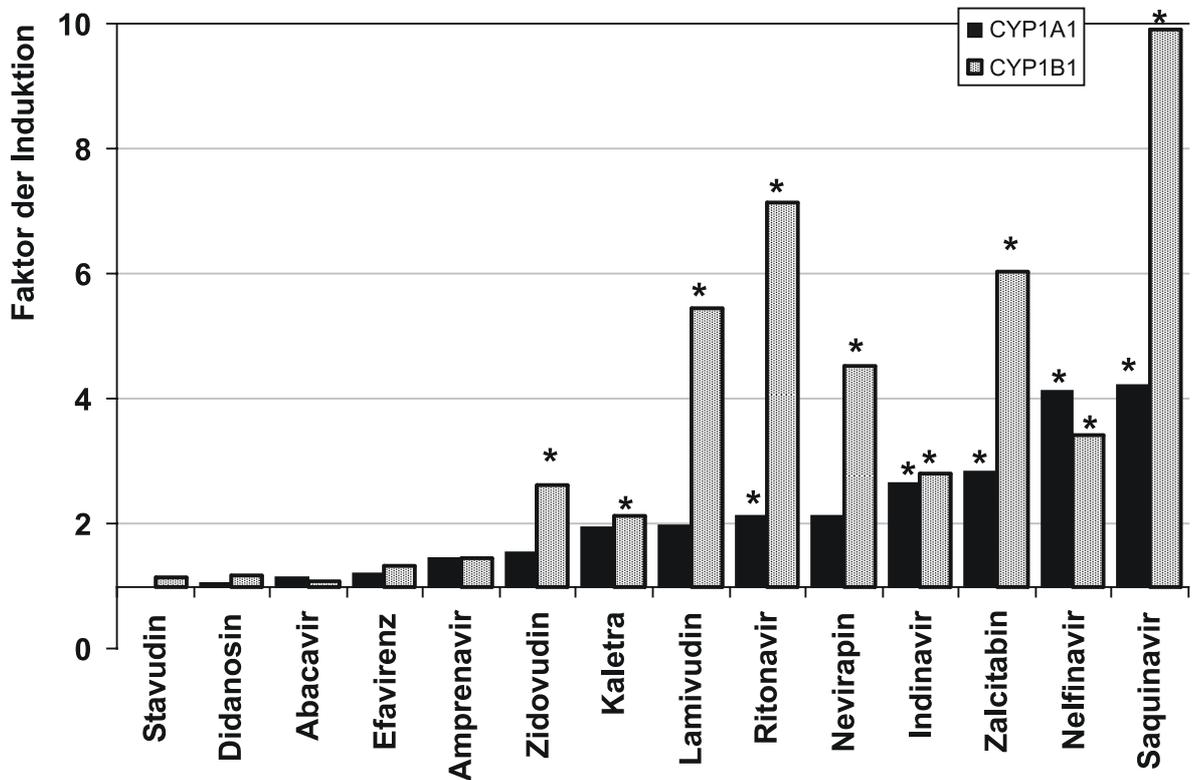


Abbildung 39: Der maximale Induktionseffekt der antiretroviralen Mittel auf die mRNA Expression von CYP1A1 und CYP1B1.

Die statistisch signifikanten Veränderungen in der Expression sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet.

Die Daten in Abbildung 39 zeigen, dass die AhR vermittelte Induktion von CYP1A1 nicht direkt auf die anderen AhR-regulierten Gene, wie das CYP1B1, übertragen werden kann. Neben dem Aryl-Kohlenwasserstoff-Rezeptor sind offensichtlich noch andere Signale in die Expression der beiden Gene eingebunden. Diese Ergebnisse unterstützen frühere Aussagen, nach denen beide Gene über verschiedene Regulationsmuster verfügen [86, 228, 229, 230, 231]. In einer vom Chorion-Karzinom abgeleiteter Zelllinie wurde eine bis zu 9000-fache Induktion der CYP1A1 mRNA nach Behandlung mit Dioxin gemessen, während die CYP1B1 mRNA Expression unverändert blieb [86]. In Epithelzellen der Brust sowie Tumorzelllinien wurde beobachtet, dass die Induzierbarkeit von CYP1A1 sich auf Zellen mit Epithel-Morphologie beschränkte während die CYP1B1 Induzierbarkeit auch in Zellen des Mesenchyms festgestellt wurde [228]. TCDD induzierte CYP1A1 und CYP1B1 mRNAs in der A549 Adenokarzinoma Zellkultur 56-fach bzw. 2.5-fach. Genistein und Staurosporin hemmten die TCDD-bedingte Induktion von CYP1A1, aber nicht die von CYP1B1 [230]. Im Gegensatz zum Cyp1a1 der Maus, werden Cyp1b1 mRNA und Protein in Zellen glatter Gefäßmuskulatur unter konstitutiven Bedingungen sowie nach Induktion exprimiert, unabhängig vom AhR-Phänotyp und Entwicklungsstadium [231]. Die Autoren machen unterschiedliche Faktoren für die veränderte Regulation von CYP1A1 und CYP1B1 verantwortlich. Der Verlust der Expression des Östrogen-Rezeptors wurde mit einer schwächeren Dioxin bedingten Induktion der

CYP1A1 Expression assoziiert, während die basale Expression von CYP1B1 und seine Induzierbarkeit verstärkt waren [229]. Kerzee und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass der AhR Phänotyp und das Mitose-Stadium für die unterschiedlichen Expressionsmuster von muriner Cyp1a1 und Cyp1b1 mRNA verantwortlich sind [231]. In den vorgestellten Versuchen war die Induktion des CYP1B1 Gens durchschnittlich stärker ausgeprägt als die von CYP1A1. Dies könnte auch in der extrem kurzen Halbwertszeit der CYP1A1 mRNA von 2.4 h begründet liegen [83], durch die eine kürzere Induktionswirkung verursacht sein kann als bei länger stabilen mRNAs der anderen Cytochrom-P450-Enzyme, wie des CYP2E1 von mehr als 24 h.

Da Kaletra eine Mischung aus Lopinavir und Ritonavir ist (eine Kapsel beinhaltet 133 mg Lopinavir, ca. 33 mg Ritonavir sowie einige Resorptions-unterstützende Mittel), ist auch diese Substanz bei den Induktionseffekten zu berücksichtigen. In der klinischen Praxis wird die pharmakologische Wirkung des Präparates nur auf Lopinavir zurückgeführt, da die Ritonavir-Moleküle das CYP3A4 Enzym inhibieren [232]. Diese „Aufgabenteilung“ lässt sich nicht auf die Bedingungen in der Zellkultur übertragen, denn die Aktivität der Enzyme wurde nicht untersucht. Kaletra wies sich als ein eher schwacher Induktor der beiden untersuchten Gene aus, woraus man schließen kann, dass die beobachteten Effekte auf den Anteil von Ritonavir zurückzuführen sein könnten.

Es ist bisher unbekannt, inwiefern CYP1A1 und CYP1B1 in den Stoffwechsel der antiretroviralen Medikamente involviert sind. Da CYP1A1 und CYP1A2 am 5' Terminus über ein gemeinsames regulatives Segment verfügen [65], kann man annehmen, dass sich die Resultate der CYP1A1 mRNA Messungen der Induktionsversuche auf die Expression der CYP1A2 mRNA übertragen lassen. Dieses Enzym spielt in der Leber mit einem relativen Cytochrom-Gehalt von 12 % eine größere Rolle als CYP1A1, das lediglich 1 % der hepatischen Cytochrom-P450-Enzyme bildet. CYP1A2 nimmt am Stoffwechsel einer Vielzahl von Xenobiotika teil, unter anderem Koffein, Clozapin, Imipramin, Verapamil, Theophyllin und Phenacetin [233]. Überträgt man die Induktion von CYP1A1 auf das CYP1A2, so gewinnt die Koadministration der Psychopharmaka Amitriptilin, Clomipramin, Clozapin und Imipramin an Bedeutung, denn die Elimination dieser Wirkstoffe wäre durch die Induktion beschleunigt [234]. Die meisten der Medikamente sind auch Substrate anderer Cytochrom-P450-Enzyme [233]. Hinzu kommt, dass einige der antiretroviralen Mittel, wie Abacavir, Amprenavir, Efavirenz, Indinavir, Nevirapin und Zidovudin, im Phase II Metabolismus über die UDP-Enzyme glukuronidiert werden [9, 16, 24, 26]. Die UGT Gene können durch den AhR-Signalweg aktiviert werden, was wiederum in einer beschleunigten Elimination der betroffenen Wirkstoffe resultieren würde.

Die Induktion von CYP1A1 und CYP1B1 wird vor allem mit erhöhtem Krebsrisiko, verursacht durch Adduktbildung an der DNA, in Zusammenhang gebracht [61, 235]. Die durch die antiretrovirale Medikamente verursachte Induktion kann durch Zigarettenrauchen verstärkt werden, was auch das Krebsrisiko zusätzlich erhöht. Es wurde berichtet, dass erfolgreiche AIDS Therapie nach den HAART Richtlinien die Lebenserwartung der Patienten verbessert, gleichzeitig aber mit erhöhtem Risiko von Non-Hodkin's Lymphoma und anderen mit HIV assoziierten Tumoren zu rechnen ist [236]. CYP1A1 und CYP1B1 werden vor allem in extrahepatischen Geweben exprimiert [68, 84] und die durch die Arzneimittel bedingte Induktion in diesen Geweben könnte die Entwicklung der mit HIV assoziierten Tumoren als zusätzlicher Faktor verursachen.

Die Induzierbarkeit der CYP1A1 mRNA hängt auch von den jeweiligen Genotypen ab. Untersuchungen an rekombinanten CYP1A1 Enzymen haben ergeben, dass die drei Varianten *CYP1A1\*1*, *\*2* und *\*4* unterschiedliche enzymatische Aktivität in der Produktion des Diol-Metaboliten aus dem Benzo(a)pyren und dem mutagenen Diol-Epoxid-2 aus Benzo(a)pyren-7,8-dihydrodiol aufweisen [237], wobei das Allel *CYP1A1\*4* die stärkste enzymatische Aktivität in der Produktion der Diole hatte. Neben den Polymorphismen im *CYP1A1* können funktionelle Veränderungen aller beteiligten Gene der AhR-Gen-Batterie für die Induktion entscheidend sein. Es ist bereits seit längerem bekannt, dass *AHR* polymorph auftritt [238]. Es wurde von zwei Mutationen im *AHR* berichtet, die in einem Ungleichgewicht aneinander gekoppelt sind. Es handelt sich hierbei um den Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin am Kodon 570 (V570I) sowie von Prolin zu Serin am Kodon 571 (P571S). Die Kombination beider Allele tritt relativ selten auf und scheint vor allem die Afrikanische Population zu betreffen [239]. Interessant ist die Tatsache, dass im Fall dieses Genotypen eine Induktion von CYP1A1 nicht mehr stattfindet, was wiederum Konsequenzen für die kanzerogenen Effekte der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe hat. Auch andere auf diesem Weg regulierte Gene werden polymorph exprimiert und dadurch in ihrer Funktionalität beeinträchtigt. Hierzu gehören *CYP1B1*, *CYP1A2*, *GSTs* und die schon erwähnten UGT-Gene [240, 241]. Da hier die Untersuchungen an einem immortalisierten

Zellkultursystem durchgeführt wurden, konnten die Polymorphismen nicht berücksichtigt werden.

Der Einfluss der antiretroviralen Mittel auf die PXR vermittelte Regulation der Expression von CYP3A4 und MDR1 wurde in den HepG2 und COLO-320 Zellen untersucht. Das Ausmaß der Induktion von CYP3A4 und MDR1 war in beiden untersuchten Zelltypen divergent. Die maximalen Effekte sind in Abbildung 40 zusammengefasst.

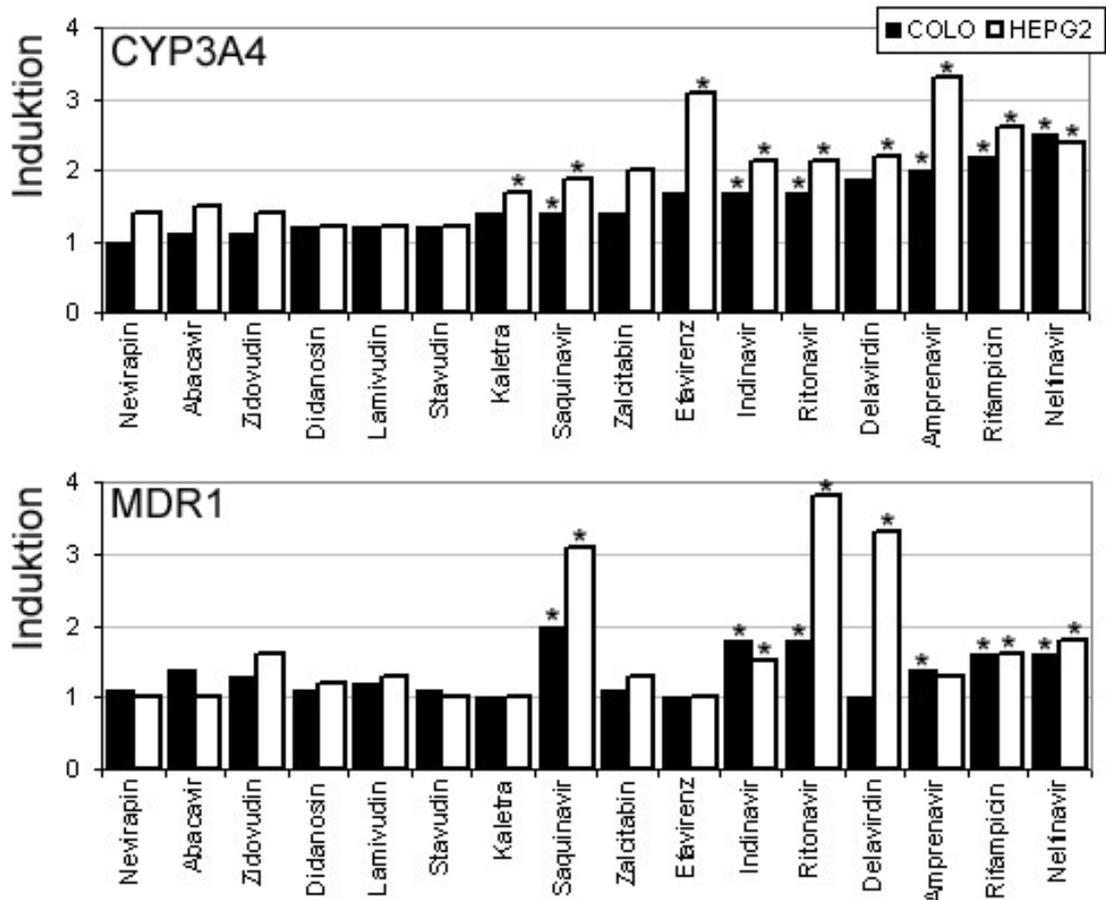


Abbildung 40: Die maximalen Induktionseffekte der untersuchten Substanzen auf die Expression der CYP3A4 und MDR1 mRNA in COLO-320 und HepG2-Zellkultur

\* statistisch signifikante Veränderungen im Vergleich zu un behandelter Probe

A: Induktion der CYP3A4 mRNA

B: Veränderungen in der Expression der MDR1 mRNA

Rifampicin, ein bekannter Induktor dieses Signalweges, diente als Referenzsubstanz. Die CYP3A4 mRNA in den HEPG2 Zellen wurde am stärksten induziert, um das 2.6-fache der Ausgangsmenge nach Inkubationen mit 38.9  $\mu$ M. Bei höheren Konzentrationen sank der Effekt. Die Arbeitsgruppe um Sumida hat in den HepG2-Zellen eine CYP3A4 mRNA Induktion bedingt durch Rifampicin vom Faktor 8.4 gemessen [120]. Allerdings wurden die Versuche mit 50  $\mu$ mol/l Rifampicin durchgeführt, was dem 1.5-fachen der Tagesdosis entspricht. Die abweichenden Ergebnisse sind durch die Tatsache zu erklären, dass die Versuchsansätze der Arbeitsgruppe sich von den hier vorgestellten stark unterschieden. So wurde zum Beispiel serumfreies Medium für die Inkubationsversuche benutzt, was einen höheren Faktor der Induktion bedingen könnte. Mit Reporter-Gen-Konstrukten wurde die Expression des CYP3A4 maximal 3-fach induziert, als eine Promotorsequenz mit -13000

bis +53 b gewählt wurde [123]. Entsprechende Konstrukte vom *hPXR* Gen zeigten sogar eine 50-fache Verstärkung der Expression, was die Bandbreite der möglichen Effekte abhängig von gewählten Bedingungen verdeutlicht.

Die Proteaseinhibitoren erwiesen sich in beiden Zelltypen als potente Induktoren sowohl von CYP3A4 als auch von MDR1 mRNA. In der Hepatoma Zelllinie induzierten alle sechs untersuchten Proteaseinhibitoren die Expression der CYP3A4 mRNA in folgender Reihenfolge: Amprenavir > Nelfinavir > Ritonavir > Saquinavir > Indinavir > Kaletra. Erstaunlicherweise zeigt sich hier Amprenavir als der stärkste Induktor. Auf die Expression von MDR1 mRNA wirkt diese Substanz wesentlich schwächer und erreicht Effekte von 1.4 in den COLO bzw. 1.3 (nicht signifikant) in den HEPG2 Zellen. Diese Ergebnisse bestätigen im Jahr 2000 veröffentlichte *in vitro* Experimente, die die Proteaseinhibitoren Ritonavir, Amprenavir, Nelfinavir, Saquinavir und Indinavir (die Reihenfolge entspricht dem Ausmaß der Effekte) als Induktoren des MDR1 charakterisiert haben [28]. Die Unterschiede in der Stärke der Induktion sind durch die Wahl des Systems zu erklären. In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass verschiedene Zellkulturen unterschiedlich auf die Medikamente ansprechen. Untersuchungen an Ratten haben eine Zunahme der MDR1 und CYP3A Protein Menge nach Behandlungen mit Amprenavir gezeigt [242]. Die Versuche wurden mit 139 und 450 mg/kg/Tag Substanz durchgeführt und die Effekte mittels Western blot im Darm und Lebergewebe beobachtet. Die Dosen entsprechen etwa 270 bzw. 900 µg Substanz, die in den hier vorgestellten Experimenten verwendet wurden. Die COLO-Zellen stammen aus dem Darm und die HepG2 aus der Leber. Die Gruppe um Huang notierte nach einer 14-tägiger Behandlung mit 450 mg/kg/Tag einen Anstieg des intestinalen MDR1 und des CYP3A in der Leber um 59 bzw. 151 %. Diese Effekte würden dem 1.4 bzw. 3.3-fachen maximalen Anstieg der entsprechenden mRNA Menge annähernd nahe kommen. Allerdings liegen die Konzentrationen, bei denen dieses Ergebnis beobachtet wurde deutlich unter den von Huang et al. [242] verwendeten. Dies lässt sich durch den Unterschied der *in-vitro* zu *in-vivo* Bedingungen erklären. Die 90 %-ige Bindung des Amprenavir (Tabelle 2) an die Plasmaproteine würde neben anderen Faktoren erklären, warum man höhere Dosen benötigt, um diese Effekte bei systemischer Anwendung zu erreichen. Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte auch das induktive Potential von Nelfinavir auf die Proteinmenge von CYP3A und MDR1 der Ratte. Die intestinale MDR1 sowie hepatische CYP3A Proteinmenge nahm nach 14-tägiger Behandlung der Ratten mit 175 mg/kg/Tag (entspricht etwa 350 µg in den hier vorgestellten Versuchen) um 83 bzw. 85 % zu [242]. Die *in vitro* Untersuchungen aus dieser Arbeit ergaben eine 1.6 bzw. 2.4-fache Induktion, und unterstützen die Aussage, dass die Zunahme der Proteinmenge auf einer erhöhten Transkriptionsrate der beiden Gene beruht. Es wurde auch berichtet, dass Ritonavir sowohl das P-Glykoprotein als auch das MRP1 Protein und deren Aktivität in Zellkultur induziert [243]. Die Untersuchungen wurden mittels Western blots durchgeführt und zeigten erhöhte Proteinmengen nach Behandlung mit dem Medikament. Die Induktion war konzentrationsabhängig und betrug im Fall von MDR1 das 6-fache der nativen Proteinmenge [243]. In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die erhöhte Proteinmenge auf eine Zunahme der MDR1 mRNA zurückzuführen ist. In den HepG2-Zellen war Ritonavir mehr als zweifach stärkerer Induktor der Synthese der MDR1 mRNA als Rifampicin (Faktor 3.8 vs. 1.6). In der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass Kaletra (Lopinavir:Ritonavir, 4:1) die Expression von CYP3A4 in der Hepatoma Zelllinie signifikant um den Faktor 1.7 erhöht. Die Expression des untersuchten Transporters wurde nicht beeinflusst.

Da die Proteasehemmer sowohl über das MDR1 als auch über das MRP1 aus der Zelle transportiert werden [29, 244] resultiert eine Erhöhung der Aktivität der beiden Proteine in einer beschleunigten Elimination der Proteasehemmer aus den CD4<sup>+</sup> T-Zellen [245].

Dexamethason, ein anderer typischer Induktor der durch PXR regulierten Transkription, induziert die Expression der Gene sowohl über den PXR als auch den GR, während Rifampicin bedingte Aktivierung eher über den PXR erfolgt [246]. Da die Proteaseinhibitoren Effekte ähnlich denen des Rifampicin auslösen, ist anzunehmen, dass auch diese Substanzen eine der möglichen Aktivierungen (PXR, GR CAR) favorisieren.

*In vitro* Untersuchungen an den Caco-2 Zellen haben eine 3.5-fache Induktion des MDR1 nach Inkubationen mit Nicht-Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren dokumentiert [22]. Die hier vorgestellten mRNA Messungen in den COLO-320 und HEPG2 Zellen wiesen keine induktiven Effekte von Nevirapin auf. Diese Divergenz könnte durch eine posttranskriptionell oder posttranslationell bedingte Zunahme der Aktivität des Proteins erklärt werden.

Inkubationen mit Efavirenz resultierten in einer verstärkten Synthese der CYP3A4 mRNA sowohl in den HepG2 als auch COLO-320 Zellen mit einem Faktor von 3.2 bzw. 1.7, während die

Konzentrationen der MDR1 mRNA unverändert blieben. Diese Ergebnisse unterstützen einen kürzlich erschienenen Bericht aus *in vivo* Untersuchungen, nach denen Efavirenz das hepatische CYP3A4 induzierte nicht aber das intestinale CYP3A4 und P-Glykoprotein [25]. COLO-320 Zellen sind intestinalen Ursprungs, zeigten *in vitro* jedoch eine vergleichbare Induktion in der Hepatoma Zellkultur. Bei der Induktion durch Efavirenz sind nach neuen Ergebnissen klinische Folgen zu erwarten, denn die durch Nelfinavir oder Indinavir ausgelöste Inhibition von CYP3A4 durch die Induktion ausgeglichen wurde [247]. Efavirenz hat *in vivo* eine Halbwertszeit von zwei bis drei Tagen (Tabelle 22), was Konsequenzen in der Dauer der Induktion hat, zum Beispiel wenn Substanzen mit kurzer HWZ verabreicht werden und plötzlich gegensätzliche Effekte auftreten. Störmer et al. berichten auch von 1.75 und 2.35-fachen Induktion bedingt durch Efavirenz bzw. Delavirdin [22]. Die beschriebene Induktion des MDR1 durch Efavirenz steht im Widerspruch zu den *in vivo* Ergebnissen und den hier vorgestellten Daten. Dagegen bedingten Inkubationen mit Delavirdin durchaus eine signifikante Erhöhung der Expressionsrate von CYP3A4 mRNA (2.2-fach) und eine relativ starke Induktion der MDR1 mRNA (3.3-fach) in der HepG2-Zellkultur .

Eine induktionsbedingte Überexpression des P-Glykoproteins kann in einer schnelleren Elimination der zu transportierenden Medikamente resultieren und die Entwicklung der Virusresistenz begünstigen. In Versuchen mit Nagern wurde bereits veranschaulicht, dass MDR1 die Bioverfügbarkeit der Proteaseinhibitoren beeinträchtigen kann. So zeigten die *mdr1* defizienten Mäuse 2 bis 5-fach höhere Plasmakonzentrationen von Indinavir, Nelfinavir und Saquinavir [37]. Wie in anderen Experimenten an einer CD4<sup>+</sup> Tumor-Zelllinie gezeigt wurde, nahm die Virusproduktion durch eine Überexpression des MDR1-Transporters ab, was an einer verminderten Fusion der viralen Membran mit der Plasmamembran und den nachfolgenden Schritten lag [248]. Einige Zellen, die hohe Mengen an MDR1 exprimieren, sind resistent gegenüber dem HIV. Insgesamt scheint jedoch die Induktion des Systems für den Krankheitsverlauf eher ungünstig zu sein und sollte vermieden werden. Durch das Abwägen und Kombinieren von induzierenden und hemmenden Substanzen lässt sich die Therapie optimieren.

Eine Hemmung von MDR1 führt zu einer höheren intrazellulären Konzentration der betroffenen Pharmaka, was möglicherweise in der Zukunft therapeutisch genutzt werden kann. Tierversuche mit radioaktiv markierten Proteaseinhibitoren zeigten, dass das Verabreichen eines MDR1 Inhibitors vor der Behandlung mit den PIs, die Penetrationskapazität der antiretroviralen Mittel ins Gehirn erhöhte [249].

Der MDR1 Polymorphismus wurde bereits mit unterschiedlichem Ansprechen auf die HIV-Therapie in Verbindung gebracht. Die stumme Mutation im Exon 26 (C3435T) stellt offensichtlich einen Vorteil für die antiretrovirale Therapie dar, denn die homozygoten Träger des mutierten Allels können eine höhere Zahl CD4<sup>+</sup> Zellen aufweisen als die homozygoten Träger des Wildtyp-Allels [180]. Ein Zusammenhang der Mutation mit Induzierbarkeit des Systems wäre zu untersuchen.

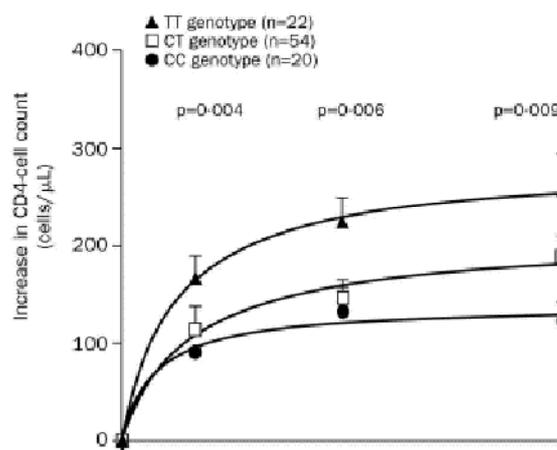


Abbildung 41: Einfluss des C3435T Polymorphismus im MDR1 Gen auf die CD4<sup>+</sup> Zellzahlen in AIDS-Patienten

Die Abbildung wurde der Arbeit von Fellay et al. entnommen [180].

Auf die Aktivierung der *MDR1* Expression durch Fremdstoffe wurde bereits eingegangen. Das Gen unterliegt jedoch einer Vielzahl an Regulationsmechanismen [250]. Das Gen kann durch verschiedene Stresssignale heraufreguliert werden, wobei der Promotor durch die Transkriptionsfaktoren fos und jun trans-aktiviert wird. Die Proteinkinase C spielt offenbar ebenfalls eine Rolle an der Regulation der *MDR1* Genexpression. Hinzu kommen die epigenetischen Faktoren, wie Beeinflussung der Deacetylierung der Histone und DNA Methylierung. Diese zusätzlichen Faktoren konnten in den in vitro Untersuchungen nicht berücksichtigt werden.

Zwischen CYP3A4 und MDR wurden Differenzen in der Ansprechbarkeit auf die Induktoren festgestellt. Es lässt sich dadurch erklären, dass beide Gene durch denselben Signalweg induziert werden. Wie Schuetz et al. zeigten, fiel die Induktion von CYP3A4 durch Rifampicin schwächer aus in Zellen, in denen das MDR1 in Folge einer Medikamentenselektion oder Transfektion mit MDR1 cDNA überexprimiert wurde, als in der unbehandelten Zelllinie. Entsprechend sprach das CYP3A Protein der *mdr1a* (-/-) Mäuse stärker auf Rifampicin an als bei den *mdr1a* (+/+) Mäusen [251]. Sowohl die basale Expression als auch die enzymatische Aktivität von CYP3A waren höher in Mäusen, denen das eine oder beide MDR Allele gefehlt haben als in den Tieren mit dem intakten Gen [252].

Die Enzyminduktion ist ein Vorgang, der in Stimulation der Proteinbiosynthese resultiert und wird erst nach fünf bis zehn Tagen voll wirksam. Nach Absetzen des Induktors dauert die Stimulation entsprechend der Halbwertszeit desselben sowie der Proteine noch mehrere Tage an. In Folge der Enzyminduktion erhöht sich die Metabolisierungsrate der Arzneimittel, was zu einer schnelleren Ausscheidung der Pharmaka führt, die über das stimulierte System verstoffwechselt werden. Für die Therapie kann dieser Effekt gravierende Folgen haben, wobei insbesondere die Krankheiten betroffen sind, in denen man auf eine Mehrfachtherapie angewiesen ist. So muss eine induktionsbedingte Erhöhung der metabolischen Clearance gegebenenfalls durch eine Dosiserhöhung des betroffenen Arzneistoffes ausgeglichen werden. Im besonderen Fall von AIDS muss zusätzlich zur Arzneimittelinteraktionen beachtet werden, dass eine erhöhte Abnahme der Plasmakonzentration des Wirkstoffes in einer schnellen Resistenzentwicklung des Virus resultieren kann.

Die MDR1 mRNA war in der COLO-320 Zelllinie weniger stark induzierbar als dies unter gleichen Bedingungen in den HepG2-Zellen gezeigt wurde. Zum anderen reagierten die COLO-Zellen empfindlicher auf höhere, toxische Dosen der Medikamente als die HepG2 Kulturen. Obwohl die Zellen ein immortalisiertes System aufweisen, scheinen die COLO-320 Zellen dem Expressionsmuster der Darmzellen zu folgen, während die in der Leber induzierten Gene die Induktion in den HepG2-Zellen steigerten.

Tabelle 23: Inhibierende und aktivierende Eigenschaften der untersuchten antiretroviralen Mittel auf pharmakologisch aktive Proteine

Substanz	Inhibitor	Induktor
Abacavir		
Didanosin		
Lamivudin		CYP1B1
Stavudin		
Zalcitabin		CYP1A1, 1B1
Zidovudin		CYP1B1
Delavirdin	CYP3A4, 2C9, 2D6, 2C19, MDR1	CYP3A4, MDR1
Efavirenz	CYP2C9, 2C19, 3A4, MDR1	CYP3A4
Nevirapin	MDR1	CYP3A4
Amprenavir	CYP3A4	CYP3A4, MDR1
Indinavir	CYP3A4	CYP1A1, 1B1, 3A4, MDR1
Kaletra		CYP1B1, 3A4
Nelfinavir	CYP3A4, MDR1	CYP1A1, 1B1, 3A4, MDR1
Ritonavir	CYP3A4, 2D6, 2C9	CYP1A1, 1A4, 1B1, 3A4, GST, MDR1
Saquinavir	CYP3A4, 2C9, MDR1	CYP1A1, 1B1, 3A4, MDR1

Vergleicht man die Induktion von allen untersuchten mRNAs, lassen sich einige Parallelen ziehen. Die Proteaseinhibitoren wirkten in allen vier Genen induzierend, wobei die neueren Substanzen,

Amprenavir und Kaletra, bei der AhR vermittelten Induktion keine Rolle spielten. Zalcitabin gehörte zu den stärksten Induktoren von CYP1A1 und CYP1B1 mRNA, hatte keinen signifikanten Einfluss auf die PXR regulierte Expression. In der Tabelle 23 sind die inhibitorischen und aktivierenden Effekte von allen untersuchten antiretroviralen Substanzen ergänzt um die Ergebnisse zusammengefasst.

Die vorgestellten *in vitro* Untersuchungen stellen ein Model dar, das die Tendenzen des induktiven Verhaltens zeigt. Die Beeinflussung der Expression der Gene *in vivo* und deren Auswirkungen müssen in weiteren Versuchen überprüft werden und die klinische Relevanz unter Einbeziehung der inhibitorischen Effekte, individueller Koadministrationen sowie genetischer Ausstattung abgewogen werden.

### **6.3 CYP3A4 mRNA Bestimmung in Leukozyten und Korrelation mit der Pharmakokinetik von Alprazolam**

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig Expressionsuntersuchungen zu CYP3A4 im peripheren Leukozyten an einer großen Anzahl Probanden durchgeführt und in Bezug zu pharmakokinetischen sowie genetischen Parametern gesetzt. Die vorgestellten Untersuchungen zeigen, dass die in den Leukozyten in geringen Mengen vorhandene CYP3A4 mRNA durch bekannte Induktoren wie Rifampicin induziert werden kann. In den 96 getesteten Individuen konnten zwei extreme Gruppen in Bezug auf ihre Induzierbarkeit bestimmt werden. Bei sieben Probanden konnte keine Induktion der CYP3A4 mRNA in Leukozyten nach Rifampicin Behandlung festgestellt werden, während die Enzymaktivität von CYP3A erhöht war. Bei sieben Personen war die CYP3A4 mRNA um mehr als das vierfache induziert. Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Sempoux [102] an humanen Neutrophilen und Lymphozyten von acht Probanden haben eine Expression des CYP3A Proteins gezeigt, ohne dass dieses durch eine Behandlung mit 600 mg Rifampicin über 6 Tage induziert war. Japanische Forscher haben in einer anderen Studie mit acht Teilnehmern mittels quantitativen RT-PCR demonstriert, dass die CYP3A4 mRNA in Leukozyten nach einer dreiwöchigen Behandlung mit 600 mg Rifampicin täglich induzierbar war [103]. Das Verhältnis der CYP3A4 mRNA zur  $\beta$ -Aktin mRNA war interindividuell stark unterschiedlich und die Induktion schwankte in den wenigen Probanden um das 1.2 bis 4.5-fache (Zahlen tendenziell aus der Abbildung entnommen, da keine exakten Angaben im Text).

Verschiedene Gruppen zeigten an humanen Hepatozyten, dass die dort enthaltene CYP3A4 mRNA und/oder das CYP3A Protein durch Rifampicin induzierbar ist, wobei unterschiedliche Dosierungen, Zeiten der Inkubation mit der Substanz sowie Messtechniken gewählt wurden [119, 222, 253, 254]. Der beschriebene Faktor der Induktion bewegte sich zwischen 3 und 6. Berichte aus kultivierten Zelllinien, wie z. B. der Hepatoma Zelllinie HepG2, weisen auf Induktion der CYP3A mRNA mit einem Faktor von 2.7 bzw. 5.0 nach dem Verabreichen von 1 und 50  $\mu\text{mol/l}$  Rifampicin hin [255]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in der vorgestellten Arbeit ermittelten Werte der CYP3A4 mRNA Induktion in den Leukozyten unterhalb der zitierten liegen, was für eine schwächere CYP3A4 mRNA Induktion in den Blutzellen im Vergleich zur Leber, dem Hauptmetabolisierungsorgan, sprechen würde.

Für die Ermittlung der CYP3A Aktivität wurde Alprazolam als Testsubstanz eingesetzt. Die Wahl der Testsubstanz ist für die Verlässigkeit der Ergebnisse von entscheidender Bedeutung. Einige der früher populär eingesetzten Substanzen zur Bestimmung der CYP3A Aktivität haben sich als nicht geeignet erwiesen, da sie auch von anderen Cytochrom-P450-Enzymen verstoffwechselt werden, oder durch das MDR1 transportiert werden. Für Alprazolam sind außer CYP3A4 und CYP3A5 keine anderen Cytochrom-P450-Enzyme bekannt, die an der Metabolisierung der Substanz beteiligt sind [183, 184, 185, 186]. Ein Transport durch MDR1 konnte zwar bisher nicht ausgeschlossen werden (es liegen keine Untersuchungen vor), da aber die strukturell verwandte Substanz Midazolam nachgewiesener Maßen nicht über dieses System transportiert wird [256], kann man ähnliches für Alprazolam annehmen. Die kinetischen Parameter für Alprazolam wie AUC und Plasma Spiegel 6, 8, 10 und 24 Stunden nach der oraler Einnahme von 1 mg des Arzneimittels korrelieren streng miteinander, so dass die CYP3A Aktivität über die Bestimmung des 10h-Wertes verlässlich gemessen werden kann [187].

CYP3A4 ist am Stoffwechsel von Östrogenen und Androgenen beteiligt. Es ist unter anderem an der metabolischen Aktivierung von Östron zum potentiell kanzerogenen  $16\alpha$ -Östron beteiligt [257]. Hunt et al. berichteten, dass das CYP3A Enzym eine 24 % stärkere Aktivität in Lebergewebe von Frauen hat [258]. Die Versuche wurden *in vitro* an 43 Gewebeproben durchgeführt. Die hier vorgestellten Daten aus 96 Patienten zur CYP3A4 mRNA Expression sowie Alprazolam

Pharmakokinetik korrelierten nicht mit dem Geschlecht. Die Diskrepanz lässt sich durch die Probenanzahl sowie interindividuelle Unterschiede erklären. Zum anderen zeigte eine Phänotypisierung von CYP3A4 und CYP2D6 mittels Bestimmung der Metabolite von Dextromethorphan im Urin keine Unterschiede in der Aktivität der beiden Enzyme bei 10 Männern und 23 Frauen [259]. Es ist demnach anzunehmen, dass es keine geschlechtsspezifische Expression und Aktivität von CYP3A4 gibt.

Das Ausmaß der Induktion der CYP3A4 mRNA in Leukozyten korrelierte nicht mit den kinetischen Parametern für Alprazolam-Konzentration und Clearance, welche einen Induktionsfaktor von 5.5 aufwiesen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Ausmaß der Zunahme der Clearance von Alprazolam nicht aus den Veränderungen in dem CYP3A4 mRNA Gehalt in Leukozyten vorausgesagt werden kann. Dies kann auf verschiedene Ursachen und Mechanismen zurückgeführt werden. Es ist denkbar, dass die Regulation dieser speziellen mRNA im Blut anders verläuft als in der Leber, wo die Metabolisierung der Fremdstoffe stattfindet. Einige der für die transkriptionelle Aktivierung notwendigen Faktoren sind vorwiegend in der Leber lokalisiert. Es wurde berichtet, dass der Pregnan-X-Rezeptor der Ratte hauptsächlich in der Leber und dem Gastrointestinaltrakt exprimiert wird [131] und es gibt kaum Hinweise auf den Expressionsstatus des PXR in den Blutzellen. Kürzlich wurden die Aussagen zur gewebespezifischen Expression von PXR durch die Aussage ergänzt, dass der Rezeptor viel stärker im menschlichen Darm exprimiert wird als in einigen anderen Organen wie Niere oder Prostata [219]. Eine schwache Syntheserate des Rezeptors in den Leukozyten könnte für die zum Teil geringen Induktionsfaktoren der CYP3A4 mRNA von  $\leq 2$  verantwortlich sein.

Rifampicin induziert mehrere Gene, die alle über den PXR reguliert werden. Kürzlich wurde von der Induktion einiger korrespondierender mRNAs in Leukozyten berichtet [260]. In der Arbeit von Asghar et al. wurde eine durch 7-tägige Einwirkung von Rifampicin (600 mg täglich) veränderte Expression der mRNAs von MDR1, CYP2E1, CYP3A5, CYP3A7, CYP4A11 und CYP4B1 beschrieben während die CYP3A4 mRNA sowohl vor als auch nach Behandlung mit Rifampicin nicht detektiert werden konnte.

Vor kurzem wurde das Phänomen des Trans-Spleißens der CYP3A Moleküle in der Leber beschrieben [261]. Das erste Exon des CYP3A43 Gens kann mit den Exons 2 bis 13 des CYP3A4 oder CYP3A5 gespleißt werden. Da die gewählten Primer eher in der 3' Region positioniert waren, kann nicht geklärt werden, ob diese schimärische mRNA auch detektiert wurde oder nicht. Allerdings bildet die CYP3A43/CYP3A4 intergenetische Kombination lediglich 0.15% der CYP3A43 mRNA in der Leber. Demnach wäre der in den Messungen evtl. verursachter Fehler durch Beimischungen dieser Version sehr gering.

Sowohl in der CYP3A4 mRNA Expression als auch in der CYP3A Aktivität konnte eine relativ hohe Variabilität festgestellt werden. Diese könnte durch die genetischen Polymorphismen erklärt werden. Es wurden inzwischen einige funktionelle Polymorphismen beschrieben, die eine veränderte katalytische Aktivität des Enzyms verursachen [112, 262]. Drei Mutationen wurden im Promotorbereich des Gens gefunden: *CYP3A4\*1B*, *CYP3A4\*1C*, *CYP3A4\*1D* [114, 263]. Das Allel *CYP3A4\*1B* ist in der kaukasischen Population relativ selten und tritt nur mit einer Häufigkeit von ca. 4% auf, im Vergleich dazu tragen 65% der Individuen afrikanischer Abstammung dieses Allel [262]. Die Rifampicin bedingte Induktion gemessen durch die Alprazolam-Konzentration unterschied sich nicht in den 4 heterozygoten Trägern des Allels *CYP3A4\*1B* von den homozygoten Trägern des Wildtyp-Allels *CYP3A4\*1A* (Tabelle 20). Demnach hat diese Variante keinen Einfluss auf die Aktivität des CYP3A Enzyms. In der Literatur ist die Auswirkung dieser Mutation umstritten. Während einige Autoren von einer Abnahme der Enzymaktivität *in vivo* berichten [114, 264, 265], wurde *in vitro* gar eine Zunahme der Aktivität beschrieben [266, 267]. Manche Wissenschaftler haben keinen Einfluss des Allels *CYP3A4\*1B* auf die CYP3A Aktivität messen können [111, 263, 268], was mit den hier vorgestellten Ergebnissen übereinstimmt.

Der Basenaustausch im Exon 12 (1334 T>C) des CYP3A4 wird als Allel *CYP3A4\*3* bezeichnet [262] und resultiert im Wechsel der Aminosäure am Kodon 445 von Methionin zu Threonin, was die Hämbindende Region des CYP3A4 Proteins verändert [262]. Die Häufigkeit des Allels liegt bei 1.1% in der kaukasischen Population [269]. Von den 96 untersuchten Probanden war nur ein heterozygoter Träger dieser Variante und gehörte zur Gruppe mit höchsten Alprazolam Konzentrationen im Plasma, was auf eine schwächere Funktionalität des Enzyms verursacht durch diese Mutation hindeutet.

Die am häufigsten vorkommende Mutation in der kaukasischen Population liegt im Intron 10 des

CYP3A4 Gens und wurde bei ca. 17% gefunden [112]. Dieses Allel verändert die Enzymaktivität nachgewiesenermaßen nicht. Die CYP3A Enzymaktivität kann unter Umständen auch auf veränderte CYP3A5 Aktivität zurückgeführt werden, da dieses Isoenzym die  $\alpha$ -Hydroxylierung von Alprazolam katalysiert [184]. Das Protein wurde in verschiedenen Studien bei 10–74% der Lebern von Kauasiern detektiert [105, 270, 271, 272]. Neuere Erkenntnisse weisen darauf hin, dass das *CYP3A5\*1* Allel mit Häufigkeitsverteilung von rund 5% in der kaukasischen Population [106] für die Funktionalität des Enzyms notwendig ist, da das durch Träger des am häufigsten vertretenen Allels *CYP3A5\*3* exprimierte kürzere Protein keine Aktivität besitzt. In der vorgestellten Studie wurden 6 heterozygote Träger der Variante *CYP3A5\*1* gefunden, die keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Pharmakokinetik von Alprazolam aufwiesen (1.3% Unterschied in dem Median der Alprazolam Konzentration).

Während andere Autoren berichteten, CYP2C19 sei nicht in den Stoffwechsel von Alprazolam involviert [186], kann man aus den vorgestellten Ergebnissen auf einen geringfügigen Einfluss des Allels *CYP2C19\*2* auf die Pharmakokinetik von Alprazolam und somit eine Beteiligung des CYP2C19 Enzyms schließen.

Um die Variabilität der Aktivität vollständig klären zu können, werden weitere Untersuchungen notwendig sein.

## 7 Zusammenfassung

In Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mehrere quantitative Verfahren zur Bestimmung der mRNA Expression der Gene CYP1A1, CYP1B1, CYP3A4 und MDR1 in verschiedenen Zelltypen entwickelt und angewandt.

Die Untersuchungen an humanen immortalisierten Zelllinien haben eine durch antiretrovirale Medikamente bedingte Induktion der Expression von CYP1A1, CYP1B1, CYP3A4 und MDR1 dokumentiert. Die Bestimmungen der durch Aryl Kohlenwasserstoff Rezeptor regulierten Expression erfolgten in der HeLa Zellkultur während die durch den Pregnan-X-Rezeptor aktivierte Initiation der Transkription in den HepG2-Zellen hepatischen Ursprungs sowie COLO-320-Zellen dermalen Ursprungs charakterisiert wurde. Die basale Expression der CYP3A4 mRNA nahm mit steigender Passagierzahl der HepG2-Zellen stetig ab und erreichte bei etwa 2 Kopien CYP3A4 mRNA/ng RNA das Minimum. Inkubationen der Zellen mit Rifampicin resultierten in einer statistisch signifikant erhöhten Expression der CYP3A4 und MDR1 mRNA in beiden Zellsystemen, was die Eignung der Zelllinien COLO-320 und HEPG2 für Induktionsversuche bestätigt.

Die untersuchten Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (Abacavir, Didanosin, Lamivudin, Stavudin, Zalcitabin, Zidovudin) zeigten nur vereinzelt eine Induktion der Expression untersuchter Gene. Konzentrationen von CYP3A4 und MDR1 mRNA blieben nach Inkubationen mit den NRTIs in beiden Zellkulturen ohne signifikante Veränderungen. Inkubationen der HeLa-Zellen mit Lamivudin bzw. Zidovudin wirkten nur auf die CYP1B1 mRNA Expression um den Faktor 5.4 aktivierend. Zalcitabin verursachte eine signifikante Erhöhung der mRNA Konzentrationen von CYP1A1 und CYP1B1. um das 2.8 bzw. 6.0-fache.

Aus der Gruppe der untersuchten Nicht-Nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren induzierte Efavirenz CYP3A4 mRNA und Nevirapin die CYP1B1 mRNA. Inkubationen mit Delavirdin resultierten in einer Zunahme der CYP3A4 und MDR1 mRNA Konzentration.

Alle untersuchten Gene unterlagen einer Induktion durch den die älteren Proteaseinhibitoren – Indinavir, Nelfinavir, Ritonavir und Saquinavir. Die neueren Proteaseinhibitoren Amprenavir und Kaletra verursachten keine oder eine verhältnismäßig schwache Induktion. Der Inhalt der Kaletra-Kapseln induzierte die CYP1B1 und CYP3A4 mRNA Konzentrationen. Darüber hinaus induzierte Amprenavir CYP3A4 und MDR1.

Die MDR1 mRNA war in der COLO-320 Zelllinie weniger stark induzierbar als dies unter gleichen Bedingungen in den HepG2-Zellen gezeigt wurde. Zum anderen reagierten die COLO-Zellen empfindlicher auf höhere, für die Zellen toxische Dosen der Medikamente als die HepG2 Kulturen.

Insgesamt war das Ausmaß der Induktion bei CYP1A1 und CYP1B1 stärker als bei CYP3A4 und MDR1, was zum einen an dem Regulationsweg liegen kann, zum anderen auch durch das Testsystem oder die gewählten Zellkulturlinien bedingt sein kann.

Die Veränderungen in der Expression der AhR regulierten Enzyme könnten klinische Folgen für AIDS-Patienten haben, bestehend aus erhöhtem Krebsrisiko und stärkerer Elimination von Antipsychotika. Die Aktivierung der PXR induzierten Genbatterie kann in Abhängigkeit von der Komedikation die Elimination der antiretroviralen Mittel beschleunigen und eine Resistenzentwicklung des Virus begünstigen. Die Induktion von MDR1 erschwert zudem das Passieren der Blut-Hirn-Schranke, was ebenfalls klinische Konsequenzen haben könnte.

Mittels eines RT-PCR Verfahrens in Echtzeit konnte erstmals an einer größeren Anzahl Probanden (n = 96) gezeigt werden, dass die CYP3A4 mRNA in peripheren Leukozyten exprimiert und durch Rifampicin induziert wird. Die Expression sowie das Ausmaß der Induktion der CYP3A4 mRNA in Leukozyten korrelierten nicht mit den gemessenen pharmakokinetischen Parametern für die CYP3A Testsubstanz Alprazolam, was darauf hindeutet, dass die Bestimmung der mRNA im Blut kein geeigneter Parameter für die Aktivität des Enzyms in der Leber darstellt. Zudem hatte keine der untersuchten Varianten von CYP3A4 und CYP3A5 einen Einfluss auf den Stoffwechsel von Alprazolam. Die Allele CYP3A4\*1B, CYP3A4\*3 und CYP3A5\*1 sind sehr selten aufgetreten und haben höchstwahrscheinlich keine funktionelle Bedeutung für die Aktivität vom CYP3A Enzym.

## 8 Literaturverzeichnis

- [1] Poiesz, B. J.; Ruscetti, F. W.; Gazdar, A. F.; Bunn, P. A.; Minna, J. D. und Gallo, R. C. (1980): Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 77), Nr. 12, Seite 7415-9.
- [2] Kornfeld, H.; Riedel, N.; Viglianti, G. A.; Hirsch, V. und Mullins, J. I. (1987): Cloning of HTLV-4 and its relation to simian and human immunodeficiency viruses, *Nature* (Band 326), Nr. 6113, Seite 610-3.
- [3] Fung, H. B.; Kirschenbaum, H. L. und Hameed, R. (2000): Amprenavir: a new human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor, *Clin Ther* (Band 22), Nr. 5, Seite 549-72.
- [4] Yu, L.; Bridgers, A.; Polli, J.; Vickers, A.; Long, S.; Roy, A.; Winnike, R. und Coffin, M. (1999): Vitamin E-TPGS increases absorption flux of an HIV protease inhibitor by enhancing its solubility and permeability, *Pharm Res* (Band 16), Nr. 12, Seite 1812-7.
- [5] Miller, V. (2001): International perspectives on antiretroviral resistance. Resistance to protease inhibitors, *J Acquir Immune Defic Syndr* (Band 26), Nr. Suppl 1, Seite S34-50.
- [6] Deeks, S. G. (2001): International perspectives on antiretroviral resistance. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance, *J Acquir Immune Defic Syndr* (Band 26), Nr. Suppl 1, Seite S25-33.
- [7] Loveday, C. (2001): International perspectives on antiretroviral resistance. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance, *J Acquir Immune Defic Syndr* (Band 26), Nr. Suppl 1, Seite S10-24.
- [8] Mayers, D.; Bethel, J.; Wainberg, M. A.; Weislow, O. und Schnittman, S. (1998): Human immunodeficiency virus proviral DNA from peripheral blood and lymph nodes demonstrates concordant resistance mutations to zidovudine (codon 215) and didanosine (codon 74). Division of AIDS Treatment Research Initiative 003 Study Group, *J Infect Dis* (Band 177), Nr. 6, Seite 1730-3.
- [9] McDowell, J. A.; Chittick, G. E.; Ravitch, J. R.; Polk, R. E.; Kerkering, T. M. und Stein, D. S. (1999): Pharmacokinetics of [(14)C]abacavir, a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase inhibitor, administered in a single oral dose to HIV-1-infected adults: a mass balance study, *Antimicrob Agents Chemother* (Band 43), Nr. 12, Seite 2855-61.
- [10] Back, D. J.; Ormsher, S.; Tjia, J. F. und Macleod, R. (1992): Metabolism of 2',3'-dideoxyinosine (ddI) in human blood, *Br J Clin Pharmacol* (Band 33), Nr. 3, Seite 319-22.
- [11] Balimane, P. V. und Sinko, P. J. (1999): Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues, *Adv Drug Deliv Rev* (Band 39), Nr. 1-3, Seite 183-209.
- [12] Li, J. Y.; Boado, R. J. und Pardridge, W. M. (2001): Differential kinetics of transport of 2',3'-dideoxyinosine and adenosine via concentrative Na<sup>+</sup> nucleoside transporter CNT2 cloned from rat blood-brain barrier, *J Pharmacol Exp Ther* (Band 299), Nr. 2, Seite 735-40.
- [13] Johnson, M. A.; Moore, K. H.; Yuen, G. J.; Bye, A. und Pakes, G. E. (1999): Clinical pharmacokinetics of lamivudine, *Clin Pharmacokinet* (Band 36), Nr. 1, Seite 41-66.
- [14] Cretton, E. M.; Zhou, Z.; Kidd, L. B.; McClure, H. M.; Kaul, S.; Hitchcock, M. J. und Sommadossi, J. P. (1993): In vitro and in vivo disposition and metabolism of 3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidine, *Antimicrob Agents Chemother* (Band 37), Nr. 9, Seite 1816-25.
- [15] Devineni, D. und Gallo, J. M. (1995): Zalcitabine. Clinical pharmacokinetics and efficacy, *Clin Pharmacokinet* (Band 28), Nr. 5, Seite 351-60.
- [16] Wang, L. H.; Chittick, G. E. und McDowell, J. A. (1999): Single-dose pharmacokinetics and safety of abacavir (1592U89), zidovudine, and lamivudine administered alone and in combination in adults with human immunodeficiency virus infection, *Antimicrob Agents Chemother* (Band 43), Nr. 7, Seite 1708-15.
- [17] Trapnell, C. B.; Klecker, R. W.; Jamis-Dow, C. und Collins, J. M. (1998): Glucuronidation of

3'-azido-3'-deoxythymidine (zidovudine) by human liver microsomes: relevance to clinical pharmacokinetic interactions with atovaquone, fluconazole, methadone, and valproic acid, *Antimicrob Agents Chemother* (Band 42), Nr. 7, Seite 1592-6.

- [18] Barbier, O.; Turgeon, D.; Girard, C.; Green, M. D.; Tephly, T. R.; Hum, D. W. und Belanger, A. (2000): 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) is glucuronidated by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7), *Drug Metab Dispos* (Band 28), Nr. 5, Seite 497-502.
- [19] Scott, L. J. und Perry, C. M. (2000): Delavirdine: a review of its use in HIV infection, *Drugs* (Band 60), Nr. 6, Seite 1411-44.
- [20] Tran, J. Q.; Gerber, J. G. und Kerr, B. M. (2001): Delavirdine: clinical pharmacokinetics and drug interactions, *Clin Pharmacokinet* (Band 40), Nr. 3, Seite 207-26.
- [21] Voorman, R. L.; Payne, N. A.; Wienkers, L. C.; Hauer, M. J. und Sanders, P. E. (2001): Interaction of delavirdine with human liver microsomal cytochrome P450: inhibition of CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6, *Drug Metab Dispos* (Band 29), Nr. 1, Seite 41-7.
- [22] Störmer, E.; von Moltke, L. L.; Perloff, M. D. und Greenblatt, D. J. (2002): Differential modulation of P-glycoprotein expression and activity by non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors in cell culture, *Pharm Res* (Band 19), Nr. 7, Seite 1038-45.
- [23] Adkins, J. C. und Noble, S. (1998): Efavirenz, *Drugs* (Band 56), Nr. 6, Seite 1055-64.
- [24] Mutlib, A. E.; Chen, H.; Nemeth, G. A.; Markwalder, J. A.; Seitz, S. P.; Gan, L. S. und Christ, D. D. (1999): Identification and characterization of efavirenz metabolites by liquid chromatography/mass spectrometry and high field NMR: species differences in the metabolism of efavirenz, *Drug Metab Dispos* (Band 27), Nr. 11, Seite 1319-33.
- [25] Mouly, S.; Lown, K. S.; Kornhauser, D.; Joseph, J. L.; Fiske, W. D.; Benedek, I. H. und Watkins, P. B. (2002): Hepatic but not intestinal CYP3A4 displays dose-dependent induction by efavirenz in humans, *Clin Pharmacol Ther* (Band 72), Nr. 1, Seite 1-9.
- [26] Riska, P.; Lamson, M.; MacGregor, T.; Sabo, J.; Hattox, S.; Pav, J. und Keirns, J. (1999): Disposition and biotransformation of the antiretroviral drug nevirapine in humans, *Drug Metab Dispos* (Band 27), Nr. 8, Seite 895-901.
- [27] Erickson, D. A.; Mather, G.; Trager, W. F.; Levy, R. H. und Keirns, J. J. (1999): Characterization of the in vitro biotransformation of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor nevirapine by human hepatic cytochromes P-450, *Drug Metab Dispos* (Band 27), Nr. 12, Seite 1488-95.
- [28] Perloff, M. D.; von Moltke, L. L.; Fahey, J. M.; Daily, J. P. und Greenblatt, D. J. (2000): Induction of P-glycoprotein expression by HIV protease inhibitors in cell culture, *Aids* (Band 14), Nr. 9, Seite 1287-9.
- [29] van der Sandt, I. C.; Vos, C. M.; Nabulsi, L.; Blom-Roosemalen, M. C.; Voorwinden, H. H.; de Boer, A. G. und Breimer, D. D. (2001): Assessment of active transport of HIV protease inhibitors in various cell lines and the in vitro blood-brain barrier, *Aids* (Band 15), Nr. 4, Seite 483-91.
- [30] Balani, S. K.; Arison, B. H.; Mathai, L.; Kauffman, L. R.; Miller, R. R.; Stearns, R. A.; Chen, I. W. und Lin, J. H. (1995): Metabolites of L-735,524, a potent HIV-1 protease inhibitor, in human urine, *Drug Metab Dispos* (Band 23), Nr. 2, Seite 266-70.
- [31] Chiba, M.; Hensleigh, M. und Lin, J. H. (1997): Hepatic and intestinal metabolism of indinavir, an HIV protease inhibitor, in rat and human microsomes. Major role of CYP3A, *Biochem Pharmacol* (Band 53), Nr. 8, Seite 1187-95.
- [32] Koudriakova, T.; Iatsimirskaia, E.; Utkin, I.; Gangl, E.; Vouros, P.; Storozhuk, E.; Orza, D.; Marinina, J. und Gerber, N. (1998): Metabolism of the human immunodeficiency virus protease inhibitors indinavir and ritonavir by human intestinal microsomes and expressed cytochrome P4503A4/3A5: mechanism-based inactivation of cytochrome P4503A by ritonavir, *Drug Metab Dispos* (Band 26), Nr. 6, Seite 552-61.
- [33] Lee, C. G.; Gottesman, M. M.; Cardarelli, C. O.; Ramachandra, M.; Jeang, K. T.; Ambudkar,

- S. V.; Pastan, I. und Dey, S. (1998): HIV-1 protease inhibitors are substrates for the MDR1 multidrug transporter, *Biochemistry* (Band 37), Nr. 11, Seite 3594-601.
- [34] Huisman, M. T.; Smit, J. W.; Crommentuyn, K. M.; Zelcer, N.; Wiltshire, H. R.; Beijnen, J. H. und Schinkel, A. H. (2002): Multidrug resistance protein 2 (MRP2) transports HIV protease inhibitors, and transport can be enhanced by other drugs, *Aids* (Band 16), Nr. 17, Seite 2295-301.
- [35] Hurst, M. und Faulds, D. (2000): Lopinavir, *Drugs* (Band 60), Nr. 6, Seite 1371-9; discussion 1380-1.
- [36] Perry, C. M. und Benfield, P. (1997): Nelfinavir, *Drugs* (Band 54), Nr. 1, Seite 81-7; discussion 88.
- [37] Kim, R. B.; Fromm, M. F.; Wandel, C.; Leake, B.; Wood, A. J.; Roden, D. M. und Wilkinson, G. R. (1998): The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors, *J Clin Invest* (Band 101), Nr. 2, Seite 289-94.
- [38] Shiraki, N.; Hamada, A.; Yasuda, K.; Fujii, J.; Arimori, K. und Nakano, M. (2000): Inhibitory effect of human immunodeficiency virus protease inhibitors on multidrug resistance transporter P-glycoproteins, *Biol Pharm Bull* (Band 23), Nr. 12, Seite 1528-31.
- [39] Kumar, G. N.; Rodrigues, A. D.; Buko, A. M.; Denissen, J. F. und 96185105 (1996): Cytochrome P450-mediated metabolism of the HIV-1 protease inhibitor ritonavir (ABT-538) in human liver microsomes, *J Pharmacol Exp Ther* (Band 277), Nr. 1, Seite 423-31.
- [40] Hsu, A.; Granneman, G. R. und Bertz, R. J. (1998): Ritonavir. Clinical pharmacokinetics and interactions with other anti-HIV agents, *Clin Pharmacokinet* (Band 35), Nr. 4, Seite 275-91.
- [41] Fitzsimmons, M. E. und Collins, J. M. (1997): Selective biotransformation of the human immunodeficiency virus protease inhibitor saquinavir by human small-intestinal cytochrome P4503A4: potential contribution to high first-pass metabolism, *Drug Metab Dispos* (Band 25), Nr. 2, Seite 256-66.
- [42] Kim, A. E.; Dintaman, J. M.; Waddell, D. S. und Silverman, J. A. (1998): Saquinavir, an HIV protease inhibitor, is transported by P-glycoprotein, *J Pharmacol Exp Ther* (Band 286), Nr. 3, Seite 1439-45.
- [43] Huisman, M. T.; Smit, J. W.; Wiltshire, H. R.; Hoetelmans, R. M.; Beijnen, J. H. und Schinkel, A. H. (2001): P-glycoprotein limits oral availability, brain, and fetal penetration of saquinavir even with high doses of ritonavir, *Mol Pharmacol* (Band 59), Nr. 4, Seite 806-13.
- [44] Wijnholds, J.; Mol, C. A.; van Deemter, L.; de Haas, M.; Scheffer, G. L.; Baas, F.; Beijnen, J. H.; Scheper, R. J.; Hatse, S.; De Clercq, E.; Balzarini, J. und Borst, P. (2000): Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 97), Nr. 13, Seite 7476-81.
- [45] Merry, C.; Barry, M. G.; Mulcahy, F.; Ryan, M.; Tjia, J. F.; Halifax, K. L.; Breckenridge, A. M. und Back, D. J. (1998): The pharmacokinetics of combination therapy with nelfinavir plus nevirapine, *Aids* (Band 12), Nr. 10, Seite 1163-7.
- [46] Fichtenbaum, C. J. und Gerber, J. G. (2002): Interactions Between Antiretroviral Drugs and Drugs Used for the Therapy of the Metabolic Complications Encountered During HIV Infection, *Clin Pharmacokinet* (Band 41), Nr. 14, Seite 1195-211.
- [47] Merry, C.; Barry, M. G.; Mulcahy, F.; Ryan, M.; Heavey, J.; Tjia, J. F.; Gibbons, S. E.; Breckenridge, A. M. und Back, D. J. (1997): Saquinavir pharmacokinetics alone and in combination with ritonavir in HIV-infected patients, *Aids* (Band 11), Nr. 4, Seite F29-33.
- [48] Paredes, R.; Puig, T.; Arno, A.; Negrodo, E.; Balague, M.; Bonjoch, A.; Jou, A.; Tuldra, A.; Tural, C.; Sirera, G.; Veny, A.; Romeu, J.; Ruiz, L. und Clotet, B. (1999): High-dose saquinavir plus ritonavir: long-term efficacy in HIV-positive protease inhibitor-experienced patients and predictors of virologic response, *J Acquir Immune Defic Syndr* (Band 22), Nr. 2, Seite 132-8.
- [49] Merry, C.; Barry, M. G.; Mulcahy, F.; Halifax, K. L. und Back, D. J. (1997): Saquinavir

- pharmacokinetics alone and in combination with nelfinavir in HIV-infected patients, *Aids* (Band 11), Nr. 15, Seite F117-20.
- [50] Eagling, V. A.; Back, D. J. und Barry, M. G. (1997): Differential inhibition of cytochrome P450 isoforms by the protease inhibitors, ritonavir, saquinavir and indinavir, *Br J Clin Pharmacol* (Band 44), Nr. 2, Seite 190-4.
- [51] Eagling, V. A.; Tjia, J. F. und Back, D. J. (1998): Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes, *Br J Clin Pharmacol* (Band 45), Nr. 2, Seite 107-14.
- [52] Drewe, J.; Gutmann, H.; Fricker, G.; Torok, M.; Beglinger, C. und Huwyler, J. (1999): HIV protease inhibitor ritonavir: A more potent inhibitor of P-glycoprotein than the cyclosporine analog SDZ PSC 833, *Biochemical Pharmacology* (Band 57), Nr. 10, Seite 1147-1152.
- [53] von Moltke, L. L.; Greenblatt, D. J.; Granda, B. W.; Giancarlo, G. M.; Duan, S. X.; Daily, J. P.; Harmatz, J. S. und Shader, R. I. (2001): Inhibition of human cytochrome P450 isoforms by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors, *J Clin Pharmacol* (Band 41), Nr. 1, Seite 85-91.
- [54] Inaba, T.; Fischer, N. E.; Riddick, D. S.; Stewart, D. J. und Hidaka, T. (1997): HIV protease inhibitors, saquinavir, indinavir and ritonavir: inhibition of CYP3A4-mediated metabolism of testosterone and benzoxazinorifamycin, KRM-1648, in human liver microsomes, *Toxicol Lett* (Band 93), Nr. 2-3, Seite 215-9.
- [55] Frötschl, R.; Chichmanov, L.; Kleeberg, U.; Hildebrandt, A. G.; Roots, I. und Brockmöller, J. (1998): Prediction of aryl hydrocarbon receptor-mediated enzyme induction of drugs and chemicals by mRNA quantification, *Chem Res Toxicol* (Band 11), Nr. 12, Seite 1447-52.
- [56] Vella, S. (1995): Clinical experience with saquinavir, *Aids* (Band 9 Suppl 2), Seite S21-S25.
- [57] Grub, S.; Bryson, H.; Goggin, T.; Ludin, E. und Jorga, K. (2001): The interaction of saquinavir (soft gelatin capsule) with ketoconazole, erythromycin and rifampicin: comparison of the effect in healthy volunteers and in HIV-infected patients, *Eur J Clin Pharmacol* (Band 57), Nr. 2, Seite 115-21.
- [58] Kupferschmidt, H. H.; Fattinger, K. E.; Ha, H. R.; Follath, F. und Krahenbuhl, S. (1998): Grapefruit juice enhances the bioavailability of the HIV protease inhibitor saquinavir in man, *Br J Clin Pharmacol* (Band 45), Nr. 4, Seite 355-9.
- [59] Hasler, JA.; Estabrook, R.; Murray, M.; Pikuleva, I.; Waterman, M.; Capdevila, J.; Holla, V.; Helvig, C.; Falck, JR.; Farrell, G.; Kaminsky, LS.; Spivack, SD.; Bioitier, E. und Beaune, P. (1999): Human cytochromes P450, *Mol Aspects Med* (Band 20), Nr. 1-2, Seite 5-12, 13-137.
- [60] Alexandrov, K.; Rojas, M.; Kadlubar, F. F.; Lang, N. P. und Bartsch, H. (1996): Evidence of anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct formation in human colon mucosa, *Carcinogenesis* (Band 17), Nr. 9, Seite 2081-3.
- [61] Vogelstein, B. und Kinzler, K. W. (1993): The multistep nature of cancer, *Trends Genet* (Band 9), Nr. 4, Seite 138-41.
- [62] Tassaneeyakul, W.; Birkett, D. J.; Veronese, M. E.; McManus, M. E.; Tukey, R. H.; Quattrochi, L. C.; Gelboin, H. V. und Miners, J. O. (1993): Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P450 1A1 and 1A2, *J Pharmacol Exp Ther* (Band 265), Nr. 1, Seite 401-7.
- [63] Ohyama, K.; Nakajima, M.; Nakamura, S.; Shimada, N.; Yamazaki, H. und Yokoi, T. (2000): A significant role of human cytochrome P450 2C8 in amiodarone N-deethylation: an approach to predict the contribution with relative activity factor, *Drug Metab Dispos* (Band 28), Nr. 11, Seite 1303-10.
- [64] Niwa, T.; Yabusaki, Y.; Honma, K.; Matsuo, N.; Tatsuta, K.; Ishibashi, F. und Katagiri, M. (1998): Contribution of human hepatic cytochrome P450 isoforms to regioselective hydroxylation of steroid hormones, *Xenobiotica* (Band 28), Nr. 6, Seite 539-47.
- [65] Corchero, J.; Pimprale, S.; Kimura, S. und Gonzalez, F. J. (2001): Organization of the

CYP1A cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation, *Pharmacogenetics* (Band 11), Nr. 1, Seite 1-6.

- [66] Jaiswal, A. K.; Gonzalez, F. J. und Nebert, D. W. (1985): Human dioxin-inducible cytochrome P1-450: complementary DNA and amino acid sequence, *Science* (Band 228), Nr. 4695, Seite 80-3.
- [67] Schweikl, H.; Taylor, J. A.; Kitareewan, S.; Linko, P.; Nagorney, D. und Goldstein, J. A. (1993): Expression of CYP1A1 and CYP1A2 genes in human liver, *Pharmacogenetics* (Band 3), Nr. 5, Seite 239-49.
- [68] Ding, X. und Kaminsky, L. S. (2002): Human Extrahepatic Cytochromes P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tracts, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (Band 6), Seite 6.
- [69] Fujii-Kuriyama, Y.; Imataka, H.; Sogawa, K.; Yasumoto, K. und Kikuchi, Y. (1992): Regulation of CYP1A1 expression, *Faseb J* (Band 6), Nr. 2, Seite 706-10.
- [70] Kanamura, S. und Watanabe, J. (2000): Cell biology of cytochrome P-450 in the liver, *Int Rev Cytol* (Band 198), Seite 109-52.
- [71] Denison, M. S.; Fisher, J. M. und Whitlock, J. P., Jr. (1989): Protein-DNA interactions at recognition sites for the dioxin-Ah receptor complex, *J Biol Chem* (Band 264), Nr. 28, Seite 16478-82.
- [72] Mathis, J. M.; Houser, W. H.; Bresnick, E.; Cidlowski, J. A.; Hines, R. N.; Prough, R. A. und Simpson, E. R. (1989): Glucocorticoid regulation of the rat cytochrome P450c (P450IA1) gene: receptor binding within intron I, *Arch Biochem Biophys* (Band 269), Nr. 1, Seite 93-105.
- [73] Bhat, R.; Weaver, J. A.; Sterling, K. M. und Bresnick, E. (1996): Nuclear transcription factor Oct-1 binds to the 5'-upstream region of CYP1A1 and negatively regulates its expression, *Int J Biochem Cell Biol* (Band 28), Nr. 2, Seite 217-27.
- [74] Yanagida, A.; Sogawa, K.; Yasumoto, K. I. und Fujii-Kuriyama, Y. (1990): A novel cis-acting DNA element required for a high level of inducible expression of the rat P-450c gene, *Mol Cell Biol* (Band 10), Nr. 4, Seite 1470-5.
- [75] Whitlock, J. P., Jr. (1999): Induction of cytochrome P4501A1, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (Band 39), Seite 103-25.
- [76] Vasiliou, V.; Shertzer, H. G.; Liu, R. M.; Sainsbury, M. und Nebert, D. W. (1995): Response of [Ah] battery genes to compounds that protect against menadione toxicity, *Biochem Pharmacol* (Band 50), Nr. 11, Seite 1885-91.
- [77] Schrenk, D. (1998): Impact of dioxin-type induction of drug-metabolizing enzymes on the metabolism of endo- and xenobiotics, *Biochem Pharmacol* (Band 55), Nr. 8, Seite 1155-62.
- [78] Kolluri, S. K.; Balduf, C.; Hofmann, M. und Gottlicher, M. (2001): Novel target genes of the Ah (dioxin) receptor: transcriptional induction of N-myristoyltransferase 2, *Cancer Res* (Band 61), Nr. 23, Seite 8534-9.
- [79] Whitlock, J. P., Jr.; Chichester, C. H.; Bedgood, R. M.; Okino, S. T.; Ko, H. P.; Ma, Q.; Dong, L.; Li, H. und Clarke-Katzenberg, R. (1997): Induction of drug-metabolizing enzymes by dioxin, *Drug Metab Rev* (Band 29), Nr. 4, Seite 1107-27.
- [80] Nebert, D. W.; Puga, A. und Vasiliou, V. (1993): Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction, *Ann N Y Acad Sci* (Band 685), Seite 624-40.
- [81] Willey, J. C.; Coy, E. L.; Frampton, M. W.; Torres, A.; Apostolakos, M. J.; Hoehn, G.; Schuermann, W. H.; Thilly, W. G.; Olson, D. E.; Hammersley, J. R.; Crespi, C. L. und Utell, M. J. (1997): Quantitative RT-PCR measurement of cytochromes p450 1A1, 1B1, and 2B7, microsomal epoxide hydrolase, and NADPH oxidoreductase expression in lung cells of smokers and nonsmokers, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 17), Nr. 1, Seite 114-24.

- [82] Kim, S.G. ; Reddy, S.L. ; States, J.C. und Novak, R.F. (1991): Pyridine effects on expression and molecular regulation of the cytochrome P450IA gene subfamily., *Mol Pharmacol* (Band 40), Nr. 1, Seite 52-7.
- [83] Lekas, P.; Tin, K. L.; Lee, C. und Prokipcak, R. D. (2000): The human cytochrome P450 1A1 mRNA is rapidly degraded in HepG2 cells, *Arch Biochem Biophys* (Band 384), Nr. 2, Seite 311-8.
- [84] Baron, J. M.; Zwadlo-Klarwasser, G.; Jugert, F.; Hamann, W.; Rubben, A.; Mukhtar, H. und Merk, H. F. (1998): Cytochrome P450 1B1: a major P450 isoenzyme in human blood monocytes and macrophage subsets, *Biochem Pharmacol* (Band 56), Nr. 9, Seite 1105-10.
- [85] Murray, G. I.; Melvin, W. T.; Greenlee, W. F. und Burke, M. D. (2001): Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (Band 41), Seite 297-316.
- [86] Hakkola, J.; Pasanen, M.; Pelkonen, O.; Hukkanen, J.; Evisalmi, S.; Anttila, S.; Rane, A.; Mantyla, M.; Purkunen, R.; Saarikoski, S.; Tooming, M. und Raunio, H. (1997): Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells, *Carcinogenesis* (Band 18), Nr. 2, Seite 391-7.
- [87] Heidel, S. M.; MacWilliams, P. S.; Baird, W. M.; Dashwood, W. M.; Buters, J. T.; Gonzalez, F. J.; Larsen, M. C.; Czuprynski, C. J. und Jefcoate, C. R. (2000): Cytochrome P4501B1 mediates induction of bone marrow cytotoxicity and preleukemia cells in mice treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Cancer Res* (Band 60), Nr. 13, Seite 3454-60.
- [88] Trombino, A. F.; Near, R. I.; Matulka, R. A.; Yang, S.; Hafer, L. J.; Toselli, P. A.; Kim, D. W.; Rogers, A. E.; Sonenshein, G. E. und Sherr, D. H. (2000): Expression of the aryl hydrocarbon receptor/transcription factor (AhR) and AhR-regulated CYP1 gene transcripts in a rat model of mammary tumorigenesis, *Breast Cancer Res Treat* (Band 63), Nr. 2, Seite 117-31.
- [89] Shimada, T.; Gillam, E. M.; Sutter, T. R.; Strickland, P. T.; Guengerich, F. P. und Yamazaki, H. (1997): Oxidation of xenobiotics by recombinant human cytochrome P450 1B1, *Drug Metab Dispos* (Band 25), Nr. 5, Seite 617-22.
- [90] Tang, Y. M.; Wo, Y. Y.; Stewart, J.; Hawkins, A. L.; Griffin, C. A.; Sutter, T. R. und Greenlee, W. F. (1996): Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene, *J Biol Chem* (Band 271), Nr. 45, Seite 28324-30.
- [91] Shehin, S. E.; Stephenson, R. O. und Greenlee, W. F. (2000): Transcriptional regulation of the human CYP1B1 gene. Evidence for involvement of an aryl hydrocarbon receptor response element in constitutive expression, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 10, Seite 6770-6.
- [92] Wo, Y. Y.; Stewart, J. und Greenlee, W. F. (1997): Functional analysis of the promoter for the human CYP1B1 gene, *J Biol Chem* (Band 272), Nr. 42, Seite 26702-7.
- [93] Guengerich, F. P. (1999): Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (Band 39), Seite 1-17.
- [94] Wrighton, S. A. und Stevens, J. C. (1992): The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism, *Crit Rev Toxicol* (Band 22), Nr. 1, Seite 1-21.
- [95] Rendic, S. und Di Carlo, F. J. (1997): Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors, *Drug Metab Rev* (Band 29), Nr. 1-2, Seite 413-580.
- [96] Gellner, K.; Eiselt, R.; Hustert, E.; Arnold, H.; Koch, I.; Haberl, M.; Deglmann, C. J.; Burk, O.; Buntfuss, D.; Escher, S.; Bishop, C.; Koebe, H. G.; Brinkmann, U.; Klenk, H. P.; Kleine, K.; Meyer, U. A. und Wojnowski, L. (2001): Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene, *Pharmacogenetics* (Band 11), Nr. 2, Seite 111-21.
- [97] Westlind, A.; Malmebo, S.; Johansson, I.; Otter, C.; Andersson, T. B.; Ingelman-Sundberg, M. und Oscarson, M. (2001): Cloning and tissue distribution of a novel human cytochrome

- p450 of the CYP3A subfamily, CYP3A43, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 281), Nr. 5, Seite 1349-55.
- [98] Domanski, T. L.; Finta, C.; Halpert, J. R. und Zaphiropoulos, P. G. (2001): cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450, *Mol Pharmacol* (Band 59), Nr. 2, Seite 386-92.
- [99] Thummel, K. E. und Wilkinson, G. R. (1998): In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (Band 38), Seite 389-430.
- [100] Zhang, Q. Y.; Dunbar, D.; Ostrowska, A.; Zeisloft, S.; Yang, J. und Kaminsky, L. S. (1999): Characterization of human small intestinal cytochromes P-450, *Drug Metab Dispos* (Band 27), Nr. 7, Seite 804-9.
- [101] Janardan, S. K.; Lown, K. S.; Schmiedlin-Ren, P.; Thummel, K. E. und Watkins, P. B. (1996): Selective expression of CYP3A5 and not CYP3A4 in human blood, *Pharmacogenetics* (Band 6), Nr. 5, Seite 379-85.
- [102] Sempoux, C.; Starkel, P.; Stevens, M.; Van Den Berge, V. und Horsmans, Y. (1999): Cytochrome P450 3A proteins are expressed in B lymphocytes but not in T lymphocytes, *Pharmacogenetics* (Band 9), Nr. 2, Seite 263-5.
- [103] Nakamoto, T.; Hase, I.; Imaoka, S.; Hiroi, T.; Oda, Y.; Asada, A. und Funae, Y. (2000): Quantitative RT-PCR for CYP3A4 mRNA in human peripheral lymphocytes: induction of CYP3A4 in lymphocytes and in liver by rifampicin, *Pharmacogenetics* (Band 10), Seite 571-5.
- [104] Krovat, B. C.; Tracy, J. H. und Omiecinski, C. J. (2000): Fingerprinting of cytochrome P450 and microsomal epoxide hydrolase gene expression in human blood cells, *Toxicol Sci* (Band 55), Nr. 2, Seite 352-60.
- [105] Wrighton, S. A.; Brian, W. R.; Sari, M. A.; Iwasaki, M.; Guengerich, F. P.; Raucy, J. L.; Molowa, D. T. und Vandenbranden, M. (1990): Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III<sub>A5</sub> (HLp3), *Mol Pharmacol* (Band 38), Nr. 2, Seite 207-13.
- [106] Hustert, E.; Haberl, M.; Burk, O.; Wolbold, R.; He, Y. Q.; Klein, K.; Nuessler, A. C.; Neuhaus, P.; Klattig, J.; Eiselt, R.; Koch, I.; Zibat, A.; Brockmüller, J.; Halpert, J. R.; Zanger, U. M. und Wojnowski, L. (2001): The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism, *Pharmacogenetics* (Band 11), Nr. 9, Seite 773-9.
- [107] Gervot, L.; Carriere, V.; Costet, P.; Cugnenc, PH.; Berger, A.; Beaune, PH; und de Waziers, I. (1996): CYP3A5 is the major cytochrome P450 3A expressed in human colon and colonic cell lines, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2, Seite 381-388.
- [108] Hukkanen, J.; Hakkola, J.; Anttila, S.; Piipari, R.; Karjalainen, A.; Pelkonen, O. und Raunio, H. (1997): Detection of mRNA encoding xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in human bronchoalveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes, *Mol Carcinog* (Band 20), Nr. 2, Seite 224-30.
- [109] Schuetz, J. D.; Beach, D. L. und Guzelian, P. S. (1994): Selective expression of cytochrome P450 CYP3A mRNAs in embryonic and adult human liver, *Pharmacogenetics* (Band 4), Nr. 1, Seite 11-20.
- [110] Shimada, T.; Yamazaki, H.; Mimura, M.; Inui, Y. und Guengerich, F. P. (1994): Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians, *J Pharmacol Exp Ther* (Band 270), Nr. 1, Seite 414-23.
- [111] Westlind, A.; Lofberg, L.; Tindberg, N.; Andersson, T. B. und Ingelman-Sundberg, M. (1999): Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 259), Nr. 1, Seite 201-5.
- [112] Eiselt, R.; Domanski, T. L.; Zibat, A.; Mueller, R.; Presecan-Siedel, E.; Hustert, E.; Zanger, U. M.; Brockmoller, J.; Klenk, H. P.; Meyer, U. A.; Khan, K. K.; He, Y. A.; Halpert, J. R. und

- Wojnowski, L. (2001): Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants, *Pharmacogenetics* (Band 11), Nr. 5, Seite 447-58.
- [113] Hsieh, K. P.; Lin, Y. Y.; Cheng, C. L.; Lai, M. L.; Lin, M. S.; Siest, J. P. und Huang, J. D. (2001): Novel mutations of CYP3A4 in Chinese, *Drug Metab Dispos* (Band 29), Nr. 3, Seite 268-73.
- [114] Rebbeck, T. R.; Jaffe, J. M.; Walker, A. H.; Wein, A. J. und Malkowicz, S. B. (1998): Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4 [published erratum appears in *J Natl Cancer Inst* 1999 Jun 16;91(12):1082], *J Natl Cancer Inst* (Band 90), Nr. 16, Seite 1225-9.
- [115] Spurdle, A. B.; Goodwin, B.; Hodgson, E.; Hopper, J. L.; Chen, X.; Purdie, D. M.; McCredie, M. R.; Giles, G. G.; Chenevix-Trench, G. und Liddle, C. (2002): The CYP3A4\*1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer, *Pharmacogenetics* (Band 12), Nr. 5, Seite 355-366.
- [116] Lamba, J. K.; Lin, Y. S.; Thummel, K.; Daly, A.; Watkins, P. B.; Strom, S.; Zhang, J. und Schuetz, E. G. (2002): Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations, *Pharmacogenetics* (Band 12), Nr. 2, Seite 121-132.
- [117] Zilly, W.; Breimer, D. D. und Richter, E. (1975): Induction of drug metabolism in man after rifampicin treatment measured by increased hexobarbital and tolbutamide clearance, *Eur J Clin Pharmacol* (Band 9), Nr. 2-3, Seite 219-27.
- [118] Miguet, J. P.; Mavier, P.; Soussy, C. J. und Dhumeaux, D. (1977): Induction of hepatic microsomal enzymes after brief administration of rifampicin in man, *Gastroenterology* (Band 72), Nr. 5 Pt 1, Seite 924-6.
- [119] Kostrubsky, V. E.; Lewis, L. D.; Strom, S. C.; Wood, S. G.; Schuetz, E. G.; Schuetz, J. D.; Sinclair, P. R.; Wrighton, S. A. und Sinclair, J. F. (1998): Induction of cytochrome P4503A by taxol in primary cultures of human hepatocytes, *Arch Biochem Biophys* (Band 355), Nr. 2, Seite 131-6.
- [120] Sumida, A.; Fukuen, S.; Yamamoto, I.; Matsuda, H.; Naohara, M. und Azuma, J. (2000): Quantitative analysis of constitutive and inducible CYPs mRNA expression in the HepG2 cell line using reverse transcription-competitive PCR, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 267), Nr. 3, Seite 756-60.
- [121] Sueyoshi, T. und Negishi, M. (2001): Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (Band 41), Seite 123-43.
- [122] Mangelsdorf, D. J. und Evans, R. M. (1995): The RXR heterodimers and orphan receptors, *Cell* (Band 83), Nr. 6, Seite 841-50.
- [123] Goodwin, B.; Hodgson, E. und Liddle, C. (1999): The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module, *Mol Pharmacol* (Band 56), Nr. 6, Seite 1329-39.
- [124] Kliewer, S. A.; Moore, J. T.; Wade, L.; Staudinger, J. L.; Watson, M. A.; Jones, S. A.; McKee, D. D.; Oliver, B. B.; Willson, T. M.; Zetterstrom, R. H.; Perlmann, T. und Lehmann, J. M. (1998): An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway, *Cell* (Band 92), Nr. 1, Seite 73-82.
- [125] Synold, T. W.; Dussault, I. und Forman, B. M. (2001): The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux, *Nat Med* (Band 7), Nr. 5, Seite 584-90.
- [126] Willson, T. M. und Kliewer, S. A. (2002): PXR, CAR and drug metabolism, *Nat Rev Drug Discov* (Band 1), Nr. 4, Seite 259-66.
- [127] Staudinger, J. L.; Goodwin, B.; Jones, S. A.; Hawkins-Brown, D.; MacKenzie, K. I.; LaTour, A.; Liu, Y.; Klaassen, C. D.; Brown, K. K.; Reinhard, J.; Willson, T. M.; Koller, B. H. und Kliewer, S. A. (2001): The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 6, Seite 3369-74.
- [128] Xie, W.; Radominska-Pandya, A.; Shi, Y.; Simon, C. M.; Nelson, M. C.; Ong, E. S.; Waxman,

- D. J. und Evans, R. M. (2001): An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 6, Seite 3375-80.
- [129] Lehmann, J. M.; McKee, D. D.; Watson, M. A.; Willson, T. M.; Moore, J. T. und Kliewer, S. A. (1998): The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions, *J Clin Invest* (Band 102), Nr. 5, Seite 1016-23.
- [130] Schuetz, E. G.; Beck, W. T. und Schuetz, J. D. (1996): Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells, *Mol Pharmacol* (Band 49), Nr. 2, Seite 311-8.
- [131] Zhang, H.; LeCulyse, E.; Liu, L.; Hu, M.; Matoney, L.; Zhu, W. und Yan, B. (1999): Rat pregnane X receptor: molecular cloning, tissue distribution, and xenobiotic regulation, *Arch Biochem Biophys* (Band 368), Nr. 1, Seite 14-22.
- [132] Gibson, G. G.; Plant, N. J.; Swales, K. E.; Ayrton, A. und El-Sankary, W. (2002): Receptor-dependent transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man, *Xenobiotica* (Band 32), Nr. 3, Seite 165-206.
- [133] Schuetz, E. G.; Schmid, W.; Schutz, G.; Brimer, C.; Yasuda, K.; Kamataki, T.; Bornheim, L.; Myles, K. und Cole, T. J. (2000): The glucocorticoid receptor is essential for induction of cytochrome P-4502B by steroids but not for drug or steroid induction of CYP3A or P-450 reductase in mouse liver, *Drug Metab Dispos* (Band 28), Nr. 3, Seite 268-78.
- [134] Forman, B. M.; Tzamelis, I.; Choi, H. S.; Chen, J.; Simha, D.; Seol, W.; Evans, R. M. und Moore, D. D. (1998): Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta, *Nature* (Band 395), Nr. 6702, Seite 612-5.
- [135] Pascussi, J. M.; Gerbal-Chaloin, S.; Fabre, J. M.; Maurel, P. und Vilarem, M. J. (2000): Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: consequences on cytochrome P450 gene regulation, *Mol Pharmacol* (Band 58), Nr. 6, Seite 1441-50.
- [136] Tzamelis, I. und Moore, D. D. (2001): Role reversal: new insights from new ligands for the xenobiotic receptor CAR, *Trends Endocrinol Metab* (Band 12), Nr. 1, Seite 7-10.
- [137] Kawamoto, T.; Sueyoshi, T.; Zelko, I.; Moore, R.; Washburn, K. und Negishi, M. (1999): Phenobarbital-responsive nuclear translocation of the receptor CAR in induction of the CYP2B gene, *Mol Cell Biol* (Band 19), Nr. 9, Seite 6318-22.
- [138] Xie, W.; Barwick, J. L.; Simon, C. M.; Pierce, A. M.; Safe, S.; Blumberg, B.; Guzelian, P. S. und Evans, R. M. (2000): Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR, *Genes Dev* (Band 14), Nr. 23, Seite 3014-23.
- [139] Sonoda, J.; Xie, W.; Rosenfeld, J. M.; Barwick, J. L.; Guzelian, P. S. und Evans, R. M. (2002): Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X receptor (PXR), *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 99), Nr. 21, Seite 13801-6.
- [140] Zangar, R. C.; Hernandez, M. und Novak, R. F. (1997): Posttranscriptional elevation of cytochrome P450 3A expression, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 231), Nr. 1, Seite 203-5.
- [141] Zangar, R. C. und Novak, R. F. (1998): Posttranslational elevation of cytochrome P450 3A levels and activity by dimethyl sulfoxide, *Arch Biochem Biophys* (Band 353), Nr. 1, Seite 1-9.
- [142] Watkins, P. B.; Wrighton, S. A.; Schuetz, E. G.; Maurel, P. und Guzelian, P. S. (1986): Macrolide antibiotics inhibit the degradation of the glucocorticoid-responsive cytochrome P-450p in rat hepatocytes in vivo and in primary monolayer culture, *J Biol Chem* (Band 261), Nr. 14, Seite 6264-71.
- [143] Hostetler, K. A.; Wrighton, S. A.; Molowa, D. T.; Thomas, P. E.; Levin, W. und Guzelian, P. S. (1989): Coinduction of multiple hepatic cytochrome P-450 proteins and their mRNAs in rats treated with imidazole antimycotic agents, *Mol Pharmacol* (Band 35), Nr. 3, Seite 279-

- [144] Chen, C. J.; Clark, D.; Ueda, K.; Pastan, I.; Gottesman, M. M. und Roninson, I. B. (1990): Genomic organization of the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins, *J Biol Chem* (Band 265), Nr. 1, Seite 506-14.
- [145] Borst, P. und Schinkel, A. H. (1997): Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins, *Trends Genet* (Band 13), Nr. 6, Seite 217-22.
- [146] Pastan, I. und Gottesman, M. (1987): Multiple-drug resistance in human cancer, *N Engl J Med* (Band 316), Nr. 22, Seite 1388-93.
- [147] Schinkel, A. H. (1997): The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins, *Semin-Cancer-Biol* (Band 8), Nr. 3, Seite 161-70.
- [148] Johnstone, R. W.; Ruefli, A. A.; Tainton, K. M. und Smyth, M. J. (2000): A role for P-glycoprotein in regulating cell death, *Leuk Lymphoma* (Band 38), Nr. 1-2, Seite 1-11.
- [149] Schmitz, G. und Langmann, T. (2001): Structure, function and regulation of the ABC1 gene product, *Curr Opin Lipidol* (Band 12), Nr. 2, Seite 129-40.
- [150] Hochman, J. H.; Chiba, M.; Nishime, J.; Yamazaki, M. und Lin, J. H. (2000): Influence of P-glycoprotein on the transport and metabolism of indinavir in Caco-2 cells expressing cytochrome P-450 3A4, *Pharmacol Exp Ther* (Band 292), Nr. 1, Seite 310-8.
- [151] Schinkel, A. H.; Wagenaar, E.; Mol, C. A. und van Deemter, L. (1996): P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs, *J Clin Invest* (Band 97), Nr. 11, Seite 2517-24.
- [152] Rao, U. S.; Fine, R. L. und Scarborough, G. A. (1994): Antiestrogens and steroid hormones: substrates of the human P-glycoprotein, *Biochem Pharmacol* (Band 48), Nr. 2, Seite 287-92.
- [153] Oka, A.; Oda, M.; Saitoh, H.; Nakayama, A.; Takada, M. und Aungst, B. J. (2002): Secretory transport of methylprednisolone possibly mediated by P-glycoprotein in Caco-2 cells, *Biol Pharm Bull* (Band 25), Nr. 3, Seite 393-6.
- [154] Oude Elferink, R. P. und Zadina, J. (2001): MDR1 P-glycoprotein transports endogenous opioid peptides, *Peptides* (Band 22), Nr. 12, Seite 2015-20.
- [155] Fellner, S.; Bauer, B.; Miller, D. S.; Schaffrik, M.; Fankhanel, M.; Spruss, T.; Bernhardt, G.; Graeff, C.; Farber, L.; Gschaidmeier, H.; Buschauer, A. und Fricker, G. (2002): Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo, *J Clin Invest* (Band 110), Nr. 9, Seite 1309-18.
- [156] Yusa, K. und Tsuruo, T. (1989): Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil to P-glycoprotein on specific sites and transport of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells, *Cancer Res* (Band 49), Nr. 18, Seite 5002-6.
- [157] Wandel, C.; Kim, R. B.; Guengerich, F. P. und Wood, A. J. (2000): Mibefradil is a P-glycoprotein substrate and a potent inhibitor of both P-glycoprotein and CYP3A in vitro, *Drug Metab Dispos* (Band 28), Nr. 8, Seite 895-8.
- [158] Sanglard, D.; Kuchler, K.; Ischer, F.; Pagani, J. L.; Monod, M. und Bille, J. (1995): Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters, *Antimicrob Agents Chemother* (Band 39), Nr. 11, Seite 2378-86.
- [159] Miyama, T.; Takanaga, H.; Matsuo, H.; Yamano, K.; Yamamoto, K.; Iga, T.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Ishizuka, H.; Kawahara, Y. und Sawada, Y. (1998): P-glycoprotein-mediated transport of itraconazole across the blood-brain barrier, *Antimicrob Agents Chemother* (Band 42), Nr. 7, Seite 1738-44.
- [160] Schuetz, E. G.; Yasuda, K.; Arimori, K. und Schuetz, J. D. (1998): Human MDR1 and mouse *mdr1a* P-glycoprotein alter the cellular retention and disposition of erythromycin, but not of retinoic acid or benzo(a)pyrene, *Arch Biochem Biophys* (Band 350), Nr. 2, Seite 340-7.

- [161] Takeguchi, N.; Ichimura, K.; Koike, M.; Matsui, W.; Kashiwagura, T. und Kawahara, K. (1993): Inhibition of the multidrug efflux pump in isolated hepatocyte couplets by immunosuppressants FK506 and cyclosporine, *Transplantation* (Band 55), Nr. 3, Seite 646-50.
- [162] Lown, K. S.; Mayo, R. R.; Leichtman, A. B.; Hsiao, H. L.; Turgeon, D. K.; Schmiedlin-Ren, P.; Brown, M. B.; Guo, W.; Rossi, S. J.; Benet, L. Z. und Watkins, P. B. (1997): Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine, *Clin Pharmacol Ther* (Band 62), Nr. 3, Seite 248-60.
- [163] Potschka, H.; Fedrowitz, M. und Loscher, W. (2002): P-Glycoprotein-mediated efflux of phenobarbital, lamotrigine, and felbamate at the blood-brain barrier: evidence from microdialysis experiments in rats, *Neurosci Lett* (Band 327), Nr. 3, Seite 173-6.
- [164] Stephens, R. H.; O'Neill, C. A.; Warhurst, A.; Carlson, G. L.; Rowland, M. und Warhurst, G. (2001): Kinetic profiling of P-glycoprotein-mediated drug efflux in rat and human intestinal epithelia, *J Pharmacol Exp Ther* (Band 296), Nr. 2, Seite 584-91.
- [165] Ambudkar, S. V.; Dey, S.; Hrycyna, C. A.; Ramachandra, M.; Pastan, I. und Gottesman, M. M. (1999): Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (Band 39), Seite 361-98.
- [166] Drach, D.; Zhao, S.; Drach, J.; Mahadevia, R.; Gatringer, C.; Huber, H. und Andreeff, M. (1992): Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype, *Blood* (Band 80), Nr. 11, Seite 2729-34.
- [167] Chaudhary, P. M.; Mechetner, E. B. und Roninson, I. B. (1992): Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes, *Blood* (Band 80), Nr. 11, Seite 2735-9.
- [168] Kaczorowski, S.; Ochocka, M.; Kaczorowska, M.; Aleksandrowicz, R.; Matysiak, M. und Karwacki, M. (1995): Is P-glycoprotein a sufficient marker for multidrug resistance in vivo? Immunohistochemical staining for P-glycoprotein in children and adult leukemia: correlation with clinical outcome, *Leuk Lymphoma* (Band 20), Nr. 1-2, Seite 143-52.
- [169] Klimecki, W. T.; Futscher, B. W.; Grogan, T. M. und Dalton, W. S. (1994): P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers, *Blood* (Band 83), Nr. 9, Seite 2451-8.
- [170] Andreana, A.; Aggarwal, S.; Gollapudi, S.; Wien, D.; Tsuruo, T. und Gupta, S. (1996): Abnormal expression of a 170-kilodalton P-glycoprotein encoded by MDR1 gene, a metabolically active efflux pump, in CD4+ and CD8+ T cells from patients with human immunodeficiency virus type 1 infection, *AIDS Res Hum Retroviruses* (Band 12), Nr. 15, Seite 1457-62.
- [171] Goldsmith, M. E.; Madden, M. J.; Morrow, C. S. und Cowan, K. H. (1993): A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (mdr1) gene, *J Biol Chem* (Band 268), Nr. 8, Seite 5856-60.
- [172] Geick, A.; Eichelbaum, M. und Burk, O. (2001): Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin, *J Biol Chem* (Band 276), Nr. 18, Seite 14581-7.
- [173] Ogretmen, B. und Safa, A. R. (2000): Identification and characterization of the MDR1 promoter-enhancing factor 1 (MEF1) in the multidrug resistant HL60/VCR human acute myeloid leukemia cell line, *Biochemistry* (Band 39), Nr. 1, Seite 194-204.
- [174] Labialle, S.; Gayet, L.; Marthinet, E.; Rigal, D. und Baggetto, L. G. (2002): Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views, *Biochem Pharmacol* (Band 64), Nr. 5-6, Seite 943-8.
- [175] Hoffmeyer, S.; Burk, O.; von Richter, O.; Arnold, H. P.; Brockmüller, J.; Johne, A.; Cascorbi, I.; Gerloff, T.; Roots, I.; Eichelbaum, M. und Brinkmann, U. (2000): Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 97), Nr. 7, Seite 3473-8.

- [176] Brinkmann, U.; Roots, I. und Eichelbaum, M. (2001): Pharmacogenetics of the human drug-transporter gene MDR1: impact of polymorphisms on pharmacotherapy, *Drug Discov Today* (Band 6), Nr. 16, Seite 835-839.
- [177] Cascorbi, I.; Gerloff, T.; Johne, A.; Meisel, C.; Hoffmeyer, S.; Schwab, M.; Schaeffeler, E.; Eichelbaum, M.; Brinkmann, U. und Roots, I. (2001): Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects, *Clin Pharmacol Ther* (Band 69), Nr. 3, Seite 169-74.
- [178] Kim, R. B.; Leake, B. F.; Choo, E. F.; Dresser, G. K.; Kubba, S. V.; Schwarz, U. I.; Taylor, A.; Xie, H. G.; McKinsey, J.; Zhou, S.; Lan, L. B.; Schuetz, J. D.; Schuetz, E. G. und Wilkinson, G. R. (2001): Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans, *Clin Pharmacol Ther* (Band 70), Nr. 2, Seite 189-99.
- [179] Schaeffeler, E.; Eichelbaum, M.; Brinkmann, U.; Penger, A.; Asante-Poku, S.; Zanger, U. M. und Schwab, M. (2001): Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people, *Lancet* (Band 358), Nr. 9279, Seite 383-4.
- [180] Fellay, J.; Marzolini, C.; Meaden, E. R.; Back, D. J.; Buclin, T.; Chave, J. P.; Decosterd, L. A.; Furrer, H.; Opravil, M.; Pantaleo, G.; Retelska, D.; Ruiz, L.; Schinkel, A. H.; Vernazza, P.; Eap, C. B. und Telenti, A. (2002): Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study, *Lancet* (Band 359), Nr. 9300, Seite 30-6.
- [181] Greenblatt, D. J.; von Moltke, L. L.; Harmatz, J. S.; Ciraulo, D. A. und Shader, R. I. (1993): Alprazolam pharmacokinetics, metabolism, and plasma levels: clinical implications, *J Clin Psychiatry* (Band 54), Nr. Suppl, Seite 4-11.
- [182] Yasui, N.; Otani, K.; Kaneko, S.; Ohkubo, T.; Osanai, T.; Sugawara, K.; Chiba, K. und Ishizaki, T. (1996): A kinetic and dynamic study of oral alprazolam with and without erythromycin in humans: in vivo evidence for the involvement of CYP3A4 in alprazolam metabolism, *Clin Pharmacol Ther* (Band 59), Nr. 5, Seite 514-9.
- [183] Gorski, J. C.; Jones, D. R.; Hamman, M. A.; Wrighton, S. A. und Hall, S. D. (1999): Biotransformation of alprazolam by members of the human cytochrome P4503A subfamily, *Xenobiotica* (Band 29), Nr. 9, Seite 931-44.
- [184] Hirota, N.; Ito, K.; Iwatsubo, T.; Green, C. E.; Tyson, C. A.; Shimada, N.; Suzuki, H. und Sugiyama, Y. (2001): In vitro/in vivo scaling of alprazolam metabolism by CYP3A4 and CYP3A5 in humans, *Biopharm Drug Dispos* (Band 22), Nr. 2, Seite 53-71.
- [185] Bertilsson, L.; Aberg-Wistedt, A.; Liden, A.; Otani, K. und Spina, E. (1988): Alprazolam does not inhibit the metabolism of nortriptyline in depressed patients or inhibit the metabolism of desipramine in human liver microsomes, *Ther Drug Monit* (Band 10), Nr. 2, Seite 231-3.
- [186] Otani, K.; Yasui, N.; Kaneko, S.; Ohkubo, T.; Osanai, T.; Sugawara, K.; Hayashi, K.; Chiba, K. und Ishizaki, T. (1997): Effects of genetically determined S-mephenytoin 4-hydroxylation status and cigarette smoking on the single-dose pharmacokinetics of oral alprazolam, *Neuropsychopharmacology* (Band 16), Nr. 1, Seite 8-14.
- [187] Schmider, J.; Brockmüller, J.; Arold, G.; Bauer, S. und Roots, I. (1999): Simultaneous assessment of CYP3A4 and CYP1A2 activity in vivo with alprazolam and caffeine, *Pharmacogenetics* (Band 9), Nr. 6, Seite 725-34.
- [188] Greenblatt, D. J. und Wright, C. E. (1993): Clinical pharmacokinetics of alprazolam. Therapeutic implications, *Clin Pharmacokinet* (Band 24), Nr. 6, Seite 453-71.
- [189] Yasui, N.; Kondo, T.; Otani, K.; Furukori, H.; Kaneko, S.; Ohkubo, T.; Nagasaki, T. und Sugawara, K. (1998): Effect of itraconazole on the single oral dose pharmacokinetics and pharmacodynamics of alprazolam, *Psychopharmacology (Berl)* (Band 139), Nr. 3, Seite 269-73.
- [190] Furukori, H.; Otani, K.; Yasui, N.; Kondo, T.; Kaneko, S.; Shimoyama, R.; Ohkubo, T.; Nagasaki, T. und Sugawara, K. (1998): Effect of carbamazepine on the single oral dose pharmacokinetics of alprazolam, *Neuropsychopharmacology* (Band 18), Nr. 5, Seite 364-9.

- [191] Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem* (Band 162), Nr. 1, Seite 156-9.
- [192] Parker, R. M. und Barnes, N. M. (1999): mRNA: detection by in situ and northern hybridization, *Methods Mol Biol* (Band 106), Seite 247-83.
- [193] Herrington, C. S. (1998): Demystified ... in situ hybridisation, *Mol Pathol* (Band 51), Nr. 1, Seite 8-13.
- [194] Ma, Y. J.; Dissen, G. A.; Rage, F. und Ojeda, S. R. (1996): RNase Protection Assay, *Methods* (Band 10), Nr. 3, Seite 273-8.
- [195] Drmanac, R. und Drmanac, S. (1999): cDNA screening by array hybridization, *Methods Enzymol* (Band 303), Seite 165-78.
- [196] Bustin, S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *J Mol Endocrinol* (Band 25), Nr. 2, Seite 169-93.
- [197] Nowakowski-Gashaw, I.; Mrozikiewicz, P. M.; Roots, I. und Brockmüller, J. (2002): Rapid quantification of CYP3A4 expression in human leukocytes by real-time reverse transcription-PCR, *Clin Chem* (Band 48), Nr. 2, Seite 366-70.
- [198] de Silva, S.; Petterson, B.; Aquino de Muro, M. und Priest, F. G. (1998): A DNA probe for the detection and identification of *Bacillus sporothermodurans* using the 16S-23S rDNA spacer region and phylogenetic analysis of some field isolates of *Bacillus* which form highly heat resistant spores, *Syst Appl Microbiol* (Band 21), Nr. 3, Seite 398-407.
- [199] Kreuzer, K. A.; Lass, U.; Bohn, A.; Landt, O. und Schmidt, C. A. (1999): LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts, *Cancer Res* (Band 59), Nr. 13, Seite 3171-4.
- [200] Schneider, J.; Gonzalez-Roces, S.; Pollan, M.; Lucas, R.; Tejerina, A.; Martin, M. und Alba, A. (2001): Expression of LRP and MDR1 in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy, *Breast Cancer Res* (Band 3), Nr. 3, Seite 183-91.
- [201] Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 74), Nr. 12, Seite 5463-7.
- [202] Läuter, H. und Pincus, R. (1989): *Mathematisch-statistische Datenanalyse*, Akademie-Verlag Berlin, Berlin.
- [203] Glue, P. und Clement, R. P. (1999): Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism--basic concepts and methods of assessment, *Cell Mol Neurobiol* (Band 19), Nr. 3, Seite 309-23.
- [204] Mensink, E.; van de Locht, A.; Schattenberg, A.; Linders, E.; Schaap, N.; Geurts van Kessel, A. und De Witte, T. (1998): Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR, *Br J Haematol* (Band 102), Nr. 3, Seite 768-74.
- [205] Kreuzer, K. A.; Bohn, A.; Lupberger, J.; Solassol, J.; le Coutre, P. und Schmidt, C. A. (2001): Simultaneous absolute quantification of target and control templates by real-time fluorescence reverse transcription-PCR using 4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzoic acid as a dark quencher dye, *Clin Chem* (Band 47), Nr. 3, Seite 486-90.
- [206] Takahashi, M.; Funato, T.; Ishii, K. K.; Kaku, M. und Sasaki, T. (2001): Measurement of tumor necrosis factor-alpha messenger RNA in synovial fibroblasts by real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, *J Lab Clin Med* (Band 137), Nr. 2, Seite 101-6.
- [207] Brennan, C. M. und Steitz, J. A. (2001): HuR and mRNA stability, *Cell Mol Life Sci* (Band 58), Nr. 2, Seite 266-77.
- [208] Kolars, J. C.; Lown, K. S.; Schmiedlin-Ren, P.; Ghosh, M.; Fang, C.; Wrighton, S. A.; Merion, R. M. und Watkins, P. B. (1994): CYP3A gene expression in human gut epithelium,

Pharmacogenetics (Band 4), Nr. 5, Seite 247-59.

- [209] Hakkola, J.; Raunio, H.; Purkunen, R.; Pelkonen, O.; Saarikoski, S.; Cresteil, T. und Pasanen, M. (1996): Detection of cytochrome P450 gene expression in human placenta in first trimester of pregnancy, *Biochem Pharmacol* (Band 52), Nr. 2, Seite 379-83.
- [210] Andersen, M. R.; Farin, F. M. und Omiecinski, C. J. (1998): Quantification of multiple human cytochrome P450 mRNA molecules using competitive reverse transcriptase-PCR, *DNA Cell Biol* (Band 17), Nr. 3, Seite 231-8.
- [211] Streetman, D. S.; Kashuba, A. D.; Bertino, J. S., Jr.; Kulawy, R.; Rocci, M. L., Jr. und Nafziger, A. N. (2001): Use of midazolam urinary metabolic ratios for cytochrome P450 3A (CYP3A) phenotyping, *Pharmacogenetics* (Band 11), Nr. 4, Seite 349-55.
- [212] Engman, H. A.; Lennernas, H.; Taipalensuu, J.; Otter, C.; Leidvik, B. und Artursson, P. (2001): CYP3A4, CYP3A5, and MDR1 in human small and large intestinal cell lines suitable for drug transport studies, *J Pharm Sci* (Band 90), Nr. 11, Seite 1736-51.
- [213] Fukuda, Y.; Ishida, N.; Noguchi, T.; Kappas, A. und Sassa, S. (1992): Interleukin-6 down regulates the expression of transcripts encoding cytochrome P450 IA1, IA2 and IIIA3 in human hepatoma cells, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 184), Nr. 2, Seite 960-5.
- [214] Schuetz, E. G.; Schuetz, J. D.; Strom, S. C.; Thompson, M. T.; Fisher, R. A.; Molowa, D. T.; Li, D. und Guzelian, P. S. (1993): Regulation of human liver cytochromes P-450 in family 3A in primary and continuous culture of human hepatocytes, *Hepatology* (Band 18), Nr. 5, Seite 1254-62.
- [215] Nakama, A.; Kuroda, K. und Yamada, A. (1995): Induction of cytochrome P450-dependent monooxygenase in serum-free cultured Hep G2 cells, *Biochem Pharmacol* (Band 50), Nr. 9, Seite 1407-12.
- [216] Ogg, M. S.; Gray, T. J. und Gibson, G. G. (1997): Development of an in vitro reporter gene assay to assess xenobiotic induction of the human CYP3A4 gene, *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* (Band 22), Nr. 4, Seite 311-3.
- [217] Seree, E.; Villard, P. H.; Hever, A.; Guigal, N.; Puyou, F.; Charvet, B.; Point Scomma, H.; Lechevalier, E.; Lacarelle, B. und Barra, Y. (1998): Modulation of MDR1 and CYP3A expression by dexamethasone: evidence for an inverse regulation in adrenals, *Biochem-Biophys-Res-Commun* (Band 252), Nr. 2, Seite 392-5.
- [218] Iwanari, M.; Nakajima, M.; Kizu, R.; Hayakawa, K. und Yokoi, T. (2002): Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoform-, and cell-specific differences, *Arch Toxicol* (Band 76), Nr. 5-6, Seite 287-98.
- [219] Koch, I.; Weil, R.; Wolbold, R.; Brockmüller, J.; Hustert, E.; Burk, O.; Nuessler, A.; Neuhaus, P.; Eichelbaum, M.; Zanger, U. und Wojnowski, L. (2002): Interindividual Variability and Tissue-Specificity in the Expression of Cytochrome P450 3A mRNA., *Drug Metab Dispos* (Band 30), Nr. 10, Seite 1108-14.
- [220] Brady, J. M.; Cherrington, N. J.; Hartley, D. P.; Buist, S. C.; Li, N. und Klaassen, C. D. (2002): Tissue distribution and chemical induction of multiple drug resistance genes in rats, *Drug Metab Dispos* (Band 30), Nr. 7, Seite 838-44.
- [221] George, J.; Goodwin, B.; Liddle, C.; Tapner, M. und Farrell, G. C. (1997): Time-dependent expression of cytochrome P450 genes in primary cultures of well-differentiated human hepatocytes, *J Lab Clin Med* (Band 129), Nr. 6, Seite 638-48.
- [222] Bowen, W. P.; Carey, J. E.; Miah, A.; McMurray, H. F.; Munday, P. W.; James, R. S.; Coleman, R. A. und Brown, A. M. (2000): Measurement of cytochrome P450 gene induction in human hepatocytes using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction, *Drug Metab Dispos* (Band 28), Nr. 7, Seite 781-8.
- [223] Alexander, D. L.; Eltom, S. E. und Jefcoate, C. R. (1997): Ah receptor regulation of CYP1B1 expression in primary mouse embryo-derived cells, *Cancer Res* (Band 57), Nr. 20, Seite 4498-506.

- [224] Matuoka, K. und Takenawa, T. (1998): Downregulated expression of the signaling molecules Nck, c-Crk, Grb2/Ash, PI 3-kinase p110 alpha and WRN during fibroblast aging in vitro, *Biochim Biophys Acta* (Band 1401), Nr. 2, Seite 211-5.
- [225] Nagy, S. R. und Denison, M. S. (2002): Specificity of nuclear protein binding to a CYP1A1 negative regulatory element, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 296), Nr. 4, Seite 799-805.
- [226] Zhang, J.; Block, E. und Patel, J. (2002): Down-regulation of mitochondrial cytochrome c oxidase in senescent porcine pulmonary artery endothelial cells, *Mech Ageing Dev* (Band 123), Nr. 10, Seite 1363.
- [227] LeCluyse, E.; Madan, A.; Hamilton, G.; Carroll, K.; DeHaan, R. und Parkinson, A. (2000): Expression and regulation of cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes, *J Biochem Mol Toxicol* (Band 14), Nr. 4, Seite 177-88.
- [228] Spink, D. C.; Spink, B. C.; Cao, J. Q.; DePasquale, J. A.; Pentecost, B. T.; Fasco, M. J.; Li, Y. und Sutter, T. R. (1998): Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells, *Carcinogenesis* (Band 19), Nr. 2, Seite 291-8.
- [229] Angus, W. G.; Larsen, M. C. und Jefcoate, C. R. (1999): Expression of CYP1A1 and CYP1B1 depends on cell-specific factors in human breast cancer cell lines: role of estrogen receptor status, *Carcinogenesis* (Band 20), Nr. 6, Seite 947-55.
- [230] Hukkanen, J.; Lassila, A.; Paivarinta, K.; Valanne, S.; Sarpo, S.; Hakkola, J.; Pelkonen, O. und Raunio, H. (2000): Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 22), Nr. 3, Seite 360-6.
- [231] Kerzee, J. K. und Ramos, K. S. (2001): Constitutive and inducible expression of Cyp1a1 and Cyp1b1 in vascular smooth muscle cells: role of the Ahr bHLH/PAS transcription factor, *Circ Res* (Band 89), Nr. 7, Seite 573-82.
- [232] Mangum, E. M. und Graham, K. K. (2001): Lopinavir-Ritonavir: a new protease inhibitor, *Pharmacotherapy* (Band 21), Nr. 11, Seite 1352-63.
- [233] Anzenbacher, P. und Anzenbacherova, E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics, *Cell Mol Life Sci* (Band 58), Nr. 5-6, Seite 737-47.
- [234] Desai, H. D.; Seabolt, J. und Jann, M. W. (2001): Smoking in patients receiving psychotropic medications: a pharmacokinetic perspective, *CNS Drugs* (Band 15), Nr. 6, Seite 469-94.
- [235] Shimada, T.; Inoue, K.; Suzuki, Y.; Kawai, T.; Azuma, E.; Nakajima, T.; Shindo, M.; Kurose, K.; Sugie, A.; Yamagishi, Y.; Fujii-Kuriyama, Y. und Hashimoto, M. (2002): Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice, *Carcinogenesis* (Band 23), Nr. 7, Seite 1199-207.
- [236] Wolff, A. J. und O'Donnell, A. E. (2001): Pulmonary manifestations of HIV infection in the era of highly active antiretroviral therapy, *Chest* (Band 120), Nr. 6, Seite 1888-93.
- [237] Schwarz, D.; Kisselev, P.; Cascorbi, I.; Schunck, W. H. und Roots, I. (2001): Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants, *Carcinogenesis* (Band 22), Nr. 3, Seite 453-9.
- [238] Nebert, D. W.; Petersen, D. D. und Puga, A. (1991): Human AH locus polymorphism and cancer: inducibility of CYP1A1 and other genes by combustion products and dioxin, *Pharmacogenetics* (Band 1), Nr. 2, Seite 68-78.
- [239] Wong, Judy M. Y. ; Okey, Allan B. und Harper, Patricia A. (2001): Human Aryl Hydrocarbon Receptor Polymorphisms That Result in Loss of CYP1A1 Induction, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 288), Nr. 4, Seite 990-996.
- [240] Daly, A. K.; Cholerton, S.; Gregory, W. und Idle, J. R. (1993): Metabolic polymorphisms, *Pharmacol Ther* (Band 57), Nr. 2-3, Seite 129-60.

- [241] Shimada, T.; Watanabe, J.; Inoue, K.; Guengerich, F. P. und Gillam, E. M. (2001): Specificity of 17beta-oestradiol and benzo[a]pyrene oxidation by polymorphic human cytochrome P4501B1 variants substituted at residues 48, 119 and 432, *Xenobiotica* (Band 31), Nr. 3, Seite 163-76.
- [242] Huang, L.; Wring, S. A.; Woolley, J. L.; Brouwer, K. R.; Serabjit-Singh, C. und Polli, J. W. (2001): Induction of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A by HIV protease inhibitors, *Drug Metab Dispos* (Band 29), Nr. 5, Seite 754-60.
- [243] Perloff, M. D.; Von Moltke, L. L.; Marchand, J. E. und Greenblatt, D. J. (2001): Ritonavir induces P-glycoprotein expression, multidrug resistance-associated protein (MRP1) expression, and drug transporter-mediated activity in a human intestinal cell line, *J Pharm Sci* (Band 90), Nr. 11, Seite 1829-37.
- [244] Srinivas, R. V.; Middlemas, D.; Flynn, P. und Fridland, A. (1998): Human immunodeficiency virus protease inhibitors serve as substrates for multidrug transporter proteins MDR1 and MRP1 but retain antiviral efficacy in cell lines expressing these transporters [see comments], *Antimicrob Agents Chemother* (Band 42), Nr. 12, Seite 3157-62.
- [245] Jones, K.; Bray, P. G.; Khoo, S. H.; Davey, R. A.; Meaden, E. R.; Ward, S. A. und Back, D. J. (2001): P-Glycoprotein and transporter MRP1 reduce HIV protease inhibitor uptake in CD4 cells: potential for accelerated viral drug resistance?, *Aids* (Band 15), Nr. 11, Seite 1353-8.
- [246] El-Sankary, W.; Plant, N. J.; Gibson, G. G. und Moore, D. J. (2000): Regulation of the CYP3A4 gene by hydrocortisone and xenobiotics: role of the glucocorticoid and pregnane X receptors, *Drug Metab Dispos* (Band 28), Nr. 5, Seite 493-6.
- [247] Pfister, M.; Labbe, L.; Lu, J. F.; Hammer, S. M.; Mellors, J.; Bennett, K. K.; Rosenkranz, S. und Sheiner, L. B. (2002): Effect of coadministration of nelfinavir, indinavir, and saquinavir on the pharmacokinetics of amprenavir, *Clin Pharmacol Ther* (Band 72), Nr. 2, Seite 133-41.
- [248] Lee, C. G.; Ramachandra, M.; Jeang, K. T.; Martin, M. A.; Pastan, I. und Gottesman, M. M. (2000): Effect of ABC transporters on HIV-1 infection: inhibition of virus production by the MDR1 transporter, *Faseb J* (Band 14), Nr. 3, Seite 516-22.
- [249] Choo, E. F.; Leake, B.; Wandel, C.; Imamura, H.; Wood, A. J.; Wilkinson, G. R. und Kim, R. B. (2000): Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes, *Drug Metab Dispos* (Band 28), Nr. 6, Seite 655-60.
- [250] Kantharidis, P.; El-Osta, S.; Silva, M.; Lee, G.; Hu, X. F. und Zalcborg, J. (2000): Regulation of MDR1 gene expression: emerging concepts, *Drug Resist Updat* (Band 3), Nr. 2, Seite 99-108.
- [251] Schuetz, E. G.; Schinkel, A. H.; Relling, M. V. und Schuetz, J. D. (1996): P-glycoprotein: a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P4503A in mice and humans, *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* (Band 93), Nr. 9, Seite 4001-5.
- [252] Schuetz, E. G.; Umbenhauer, D. R.; Yasuda, K.; Brimer, C.; Nguyen, L.; Relling, M. V.; Schuetz, J. D. und Schinkel, A. H. (2000): Altered expression of hepatic cytochromes P-450 in mice deficient in one or more *mdr1* genes, *Mol Pharmacol* (Band 57), Nr. 1, Seite 188-97.
- [253] Greuet, J.; Pichard, L.; Bonfils, C.; Domergue, J. und Maurel, P. (1996): The fetal specific gene CYP3A7 is inducible by rifampicin in adult human hepatocytes in primary culture, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 225), Nr. 2, Seite 689-94.
- [254] Runge, D.; Kohler, C.; Kostrubsky, V. E.; Jager, D.; Lehmann, T.; Runge, D. M.; May, U.; Stolz, D. B.; Strom, S. C.; Fleig, W. E. und Michalopoulos, G. K. (2000): Induction of cytochrome P450 (CYP)1A1, CYP1A2, and CYP3A4 but not of CYP2C9, CYP2C19, multidrug resistance (MDR-1) and multidrug resistance associated protein (MRP-1) by prototypical inducers in human hepatocytes, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 273), Nr. 1, Seite 333-41.
- [255] Sumida, A.; Yamamoto, I.; Zhou, Q.; Morisaki, T. und Azuma, J. (1999): Evaluation of induction of CYP3A mRNA using the HepG2 cell line and reverse transcription-PCR, *Biol*

Pharm Bull (Band 22), Nr. 1, Seite 61-5.

- [256] Katoh, M.; Nakajima, M.; Yamazaki, H. und Yokoi, T. (2001): Inhibitory effects of CYP3A4 substrates and their metabolites on P-glycoprotein-mediated transport, *Eur J Pharm Sci* (Band 12), Nr. 4, Seite 505-13.
- [257] Huang, Z.; Guengerich, F. P. und Kaminsky, L. S. (1998): 16 $\alpha$ -hydroxylation of estrone by human cytochrome P450A4/5, *Carcinogenesis* (Band 19), Nr. 5, Seite 867-72.
- [258] Hunt, C. M.; Westerkam, W. R. und Stave, G. M. (1992): Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A, *Biochem Pharmacol* (Band 44), Nr. 2, Seite 275-83.
- [259] McCune, J. S.; Lindley, C.; Decker, J. L.; Williamson, K. M.; Meadowcroft, A. M.; Graff, D.; Sawyer, W. T.; Blough, D. K. und Pieper, J. A. (2001): Lack of gender differences and large intrasubject variability in cytochrome P450 activity measured by phenotyping with dextromethorphan, *J Clin Pharmacol* (Band 41), Nr. 7, Seite 723-31.
- [260] Asghar, A.; Gorski, J. C.; Haehner-Daniels, B. und Hall, S. D. (2002): Induction of multidrug resistance-1 and cytochrome P450 mRNAs in human mononuclear cells by rifampin, *Drug Metab Dispos* (Band 30), Nr. 1, Seite 20-6.
- [261] Finta, C. und Zaphiropoulos, P. G. (2001): Intergenic mRNA molecules resulting from trans-splicing, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 8, Seite 5882-90.
- [262] Sata, F.; Sapone, A.; Elizondo, G.; Stocker, P.; Miller, V. P.; Zheng, W.; Raunio, H.; Crespi, C. L. und Gonzalez, F. J. (2000): CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity, *Clin Pharmacol Ther* (Band 67), Nr. 1, Seite 48-56.
- [263] Kuehl, P.; Zhang, J.; Lin, Y.; Lamba, J.; Assem, M.; Schuetz, J.; Watkins, P. B.; Daly, A.; Wrighton, S. A.; Hall, S. D.; Maurel, P.; Relling, M.; Brimer, C.; Yasuda, K.; Venkataramanan, R.; Strom, S.; Thummel, K.; Boguski, M. S. und Schuetz, E. (2001): Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression, *Nat Genet* (Band 27), Nr. 4, Seite 383-91.
- [264] Felix, C. A.; Walker, A. H.; Lange, B. J.; Williams, T. M.; Winick, N. J.; Cheung, N. K.; Lovett, B. D.; Nowell, P. C.; Blair, I. A. und Rebbeck, T. R. (1998): Association of CYP3A4 genotype with treatment-related leukemia, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 22, Seite 13176-81.
- [265] Wandel, C.; Witte, J. S.; Hall, J. M.; Stein, C. M.; Wood, A. J. und Wilkinson, G. R. (2000): CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4\*1B5'-promoter region polymorphism, *Clin Pharmacol Ther* (Band 68), Nr. 1, Seite 82-91.
- [266] Amirimani, B.; Walker, A. H.; Weber, B. L. und Rebbeck, T. R. (1999): RESPONSE: re: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4, *J Natl Cancer Inst* (Band 91), Nr. 18, Seite 1588-90.
- [267] Rebbeck, T. R. (2000): More about: modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4, *J Natl Cancer Inst* (Band 92), Nr. 1, Seite 76.
- [268] Ando, Y.; Tateishi, T.; Sekido, Y.; Yamamoto, T.; Satoh, T.; Hasegawa, Y.; Kobayashi, S.; Katsumata, Y.; Shimokata, K. und Saito, H. (1999): Re: Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4, *J Natl Cancer Inst* (Band 91), Nr. 18, Seite 1587-90.
- [269] van Schaik, R. H.; de Wildt, S. N.; Brosens, R.; van Fessem, M.; van den Anker, J. N. und Lindemans, J. (2001): The CYP3A4\*3 allele: is it really rare?, *Clin Chem* (Band 47), Nr. 6, Seite 1104-6.
- [270] Aoyama, T.; Yamano, S.; Waxman, D. J.; Lapenson, D. P.; Meyer, U. A.; Fischer, V.; Tyndale, R.; Inaba, T.; Kalow, W.; Gelboin, H. V. und et al. (1989): Cytochrome P-450 hPCN3, a novel cytochrome P-450 IIIA gene product that is differentially expressed in adult human liver. cDNA and deduced amino acid sequence and distinct specificities of cDNA-expressed hPCN1 and hPCN3 for the metabolism of steroid hormones and cyclosporine, *J*

Biol Chem (Band 264), Nr. 18, Seite 10388-95.

- [271] Wrighton, S. A.; Ring, B. J.; Watkins, P. B. und VandenBranden, M. (1989): Identification of a polymorphically expressed member of the human cytochrome P-450III family, Mol Pharmacol (Band 36), Nr. 1, Seite 97-105.
- [272] Jounaidi, Y.; Hyrailles, V.; Gervot, L. und Maurel, P. (1996): Detection of CYP3A5 allelic variant: a candidate for the polymorphic expression of the protein?, Biochem Biophys Res Commun (Band 221), Nr. 2, Seite 466-70.

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ivar Roots möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für die Unterstützung meiner Arbeit und besonders auch für die Möglichkeit, die Arbeit nach dem Weggang von Herrn Prof. Dr. J. Brockmöller fortzusetzen, danken. Herzlichen Dank auch für die vielen produktiven Diskussionen während der Entstehungsphase der Publikationen.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Brockmöller danke ich für die herzliche Aufnahme am Institut für Klinische Pharmakologie, die konstruktiven Kritiken und Ratschläge vor allem in den ersten Monaten sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit, die trotz der Entfernung funktionierte!

Herrn Prof. Dr. Hans-Hubert Borchert danke ich für seine Bereitschaft, meine Arbeit als Gutachter am Institut für Pharmazie zu vertreten.

Für die Einweisung in die Arbeiten mit Zellkulturen und die Tipps zum Bauen von RNA-Konstrukten möchte ich mich bei Dr. Roland Frötschl ganz herzlich bedanken.

Christine Gericke und Ina Lieker danke ich für die hervorragende Mitarbeit an den HepG2s und den COLOs und der Vielzahl an RT-PCRs.

Ein großes Dankeschön gilt Dr. Julia Kirchheiner, Dr. Steffen Bauer und Mark Goldammer für die gute Zusammenarbeit im Rahmen der Alprazolam-Studie.

Dr. Przemyslaw M. Mrozkiewicz danke ich für die Unterstützung, Motivation und den Spaß am Polnisch für Wissenschaftler.

Elena Gaikovitch danke ich für das Zuschicken der Aufsätze und der vergessenen Unterlagen!

Natürlich auch ein Dankeschön an die vielen hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeiter des Institutes für Klinische Pharmakologie der Charité Berlin für das sehr freundliche und angenehme Arbeitsklima.

Meinen Freundinnen Maren Henneken und Elke Witt danke ich für die vielen konstruktiven Diskussionen, das Motivieren sowie für das Korrekturlesen.

Abschließend noch tausend Dank an meine Familie für das Verständnis, die Aufmunterungen und die immerwährende Unterstützung!

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Essen, im April 2003