

Abteilung Physiologische Chemie der Universität Ulm, Leiter: Prof. Dr. rer. nat. T. Wirth

**Einfluss einkettiger Lipidmoleküle
auf die Aktivität des binären membrangebundenen
Cytochrom P450-Enzymsystems der Leber**

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

Vorgelegt

im Jahr 2002 von

Robert Eyck Fintelmann, geboren in München

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dieter Müller-Enoch

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Hans Gruler

Tag der Promotion: 13.05.2005

Widmung:

Diese Arbeit widme ich Hubert Auque, in dessen Wohnung in Paris ich den ersten Entwurf dieser Arbeit fertig stellte und meiner Familie.

Abkürzungsverzeichnis:

AA:	Arachidonsäure
CMC:	Critical Micelle Concentration (kritische mizelläre Konzentration)
CYP:	Cytochrom P450
DLPC:	L- α -Dilauryl-sn-glycero-3-phosphocholin
LA:	Laurinsäure
LPA:	L- α -Lysophosphatidsäure, Oleoyl C 18:1 (Cis) -9
LPC:	L- α -Lysophosphatidylcholin
LPE:	L- α -Lysophosphatidylethanolamin
LPI:	L- α -Lysophosphatidylinositol
MA:	Myristinsäure
MO:	1-Monooleoyl-rac-glycerol
MPG:	2-Monopalmitoylglycerol
MSG:	1-Monostearyl-rac-glycerol
OA:	Ölsäure
PaCa:	Palmitoyl-L-Carnitin
SA:	Stearinsäure
Sph:	D-Sphingosin

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	1
<u>1.1. Fremdstoffmetabolismus</u>	1
<u>1.2. Vorkommen von Cytochrom P450</u>	1
<u>1.3. Einteilung und Nomenklatur der Cytochrom P450-Isoenzyme</u>	1
<u>1.4. Charakterisierung von CYP2B</u>	2
<u>1.5. Aktivitätsänderung von Cytochrom P450-Enzymen</u>	2
<u>1.6. CYP und Lipide</u>	3
<u>1.7. Verwendetes System</u>	3
<u>1.8. Fragestellung</u>	4
 <u>2. Material und Methoden</u>	5
<u>2.1. Material</u>	5
<u>2.2 Lösungen</u>	6
<u>2.3. Rekonstitution des CYP2B1-NADPH-Cytochrom P450-Reduktase- Systems</u>	6
2.3.1. Rekonstitution mit Phospholipiden (Vesikuläres System)	7
2.3.2. Rekonstitution ohne DLPC	7
<u>2.4. Die fluorometrische Bestimmung der 7-Ethoxycumarin-O- Deethylase-Aktivität</u>	7
<u>2.5. Auswertung der Messergebnisse</u>	8
2.5.1. Bildung des binären Komplexes	8
2.5.2. Umsatzrate eines arbeitenden Enzymkomplexes	9
2.5.3. Substratumsetzung ohne Hemmstoff	9
2.5.4. Substratumsetzung mit Hemmstoff	10
2.5.4.1. Kompetitive Hemmung	10
2.5.4.2. Nichtkompetitive Hemmung	11
 <u>3. Ergebnisse</u>	13
<u>3.1. Laurinsäure</u>	13
<u>3.2. Myristinsäure</u>	15
<u>3.3. 2-Monopalmitoylglycerol</u>	17
<u>3.4. Palmitoyl-L-Carnitin</u>	19

<u>3.5. D-Sphingosin</u>	21
<u>3.5. Stearinsäure</u>	23
<u>3.6. 1-Monostearoyl-rac-glycerol</u>	23
<u>3.7. L-α-Lysophosphatidylinositol</u>	25
<u>3.8. Ölsäure</u>	26
<u>3.9. 1-Monooleoyl-rac-glycerol</u>	28
<u>3.10. L-α-Lysophosphatidsäure</u>	30
<u>3.11. L-α-Lysophosphatidylcholin</u>	32
<u>3.12. L-α-Lysophosphatidylcholin im vesikulären System</u>	34
<u>3.13. Arachidonsäure</u>	36
<u>Zusammenfassung der Ergebnisse</u>	39
 <u>4. Diskussion</u>	 40
<u>4.1. Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen kompetitiver und nicht-kompetitiver Hemmung</u>	41
<u>4.2. Charakteristika der Lipide, die das Hemmverhalten beeinflussen</u>	42
4.2.1. Die Lipide unterscheiden sich in ihrer Länge	42
4.2.2. Die Lipide unterscheiden sich in ihrem Sättigungsgrad	42
4.2.3. Die Lipide unterscheiden sich in ihren Ladungen	43
4.2.4. Die Lipide unterscheiden sich in ihren Kopfgruppen	43
<u>4.3. Nicht-kompetitive Hemmung</u>	45
<u>4.4. Funktionsunterschiede zwischen einkettigen und zweikettigen Lipiden</u>	46
<u>4.5. In vivo, in vitro Korrelation</u>	47
 <u>5. Zusammenfassung</u>	 49
 <u>6. Literaturverzeichnis</u>	 50
 <u>7. Danksagung</u>	 56

1. Einleitung

1.1. Fremdstoffmetabolismus

Organismen sind kontinuierlich verschiedenen, dem Organismus fremden Stoffen ausgesetzt. Hierzu gehören sowohl natürliche als auch synthetisch hergestellte Substanzen wie Arzneistoffe oder Umweltgifte. Im Falle der Säugetiere und des Menschen erreichen diese Fremdstoffe den Körper über den Gastrointestinaltrakt, die Lungen oder die Haut. Aufgrund der meist bestehenden Lipophilie ist eine chemische Modifikation der Substanzen oft Voraussetzung für eine effektive Elimination aus dem Körper. Säugetiere besitzen verschiedene Enzymsysteme, welche die Biotransformation von Xenobiotika vermitteln. In Phase I der Biotransformation werden in der Regel hydrophilere Metabolite der Fremdstoffe gebildet. Diese werden direkt renal oder biliär ausgeschieden oder unterliegen weiteren Biotransformationen.

Cytochrom P450-Enzyme (ein Monooxygenasesystem) nehmen eine Schlüsselrolle im Phase I- Metabolismus von Xenobiotika wie Arzneistoffen, Prokarzinogenen und Promutagenen ein [7, 8, 12]. Darüber hinaus sind sie an der Biotransformation endogener Substanzen wie Steroiden, Gallensäuren und Vitaminen beteiligt [5, 1, 28, 10].

Des weiteren sind diese Enzyme an Signaltransduktionswegen beteiligt [4].

1.2. Vorkommen von Cytochrom P450

Die Cytochrom P450-abhängigen mischfunktionellen Monooxygenasen gibt es nicht nur bei Säugetieren. Sie sind ebenfalls in Bakterien, Pilzen, Hefen, Pflanzen, Insekten, Fischen und Vögeln anzutreffen [41].

Neben der Leber, die das Hauptorgan des Fremdstoffmetabolismus darstellt, enthalten Gehirn, Lunge, Darm, Nebenniere und Ovarien Cytochrom P450-abhängige mischfunktionelle Monooxygenasen. In den extrahepatischen Organen liegt der Cytochrom P450-Gehalt deutlich unter demjenigen der Leber [38].

1.3. Einteilung und Nomenklatur der Cytochrom P450-Isoenzyme

Die Bezeichnungen der verschiedenen Isoenzyme wurden zunächst durch den jeweiligen Autor festgelegt. Daher wurden für ein identisches Protein häufig verschiedene Bezeichnungen nebeneinander verwendet.

Nach der 1991 aktualisierten Nomenklatur [Nebert et al. 1987] wird „CYP“ als Akronym für Cytochrom P450 verwendet.

Die auf „CYP“ folgende arabische Zahl bezeichnet die Familie, der folgende Großbuchstabe die Unterfamilie und eine zweite arabische Zahl das individuelle Enzym (z.B. CYP2B1).

Die Zuordnung eines Enzyms der Cytochrom P450-Gen-Superfamilie zu einer Familie oder Unterfamilie erfolgte ausschließlich nach dem prozentualen Anteil der übereinstimmenden Sequenzen. Mitglieder einer Familie weisen in der Regel eine Sequenzübereinstimmung von mindestens 40% auf. Familien sind jeweils weiter in Unterfamilien aufgeteilt. Innerhalb derselben Unterfamilie wird eine Sequenzübereinstimmung von mindestens 55% erreicht (bei CYP2B1 und CYP2B2 von 97%). 1998 wurden 481 Isoenzyme aufgelistet, die 74 Genfamilien zugeordnet werden. Allein bei den Säugern sind 14 Genfamilien und 22 Subfamilien bekannt.

1.4. Charakterisierung von CYP2B

Die Isoenzyme dieser Subfamilie stimmen in ihren Aminosäuresequenzen weitestgehend überein und haben auch ähnliche Substratspezifitäten. CYP2B1 ist ein Vertreter dieser P450-Gruppe, die durch Phenobarbital bei Ratten induzierbar ist und kommt in Leber und Lunge von Ratten vor [44, 11, 18]. Seine Anwesenheit im Gehirn ist ebenfalls belegt [22, 34]. CYP2B1 besitzt eine breite Substratspezifität [11]. Wie alle CYP-Isoenzyme ist es nur im Komplex mit NADPH-Cytochrom P450-Reduktase aktiv.

1.5. Aktivitätsänderung von Cytochrom P450-Enzymen

Neben der Induktion kann die Inhibition von Cytochrom P450-Enzymen eine Aktivitätsänderung bewirken.

Es besteht die Vorstellung, dass bei der Hemmung einer enzymatischen Reaktion der Hemmstoff formal entweder direkt mit dem Enzym, direkt mit dem Substrat oder mit Enzym und Substrat in Wechselwirkung tritt. Die Wechselwirkung eines Inhibitors kann reversibel oder irreversibel sein.

Die drei wichtigsten Hemmtypen sind:

- a) kompetitive Hemmung: der Hemmstoff bindet direkt und reversibel am aktiven Zentrum des Enzyms und konkurriert so mit dem Substrat um dieses.
- b) nicht-kompetitive Hemmung: der Hemmstoff bindet sowohl an das freie Enzym als auch an den Enzym-Substrat-Komplex.

- c) unkompetitive Hemmung: der Hemmstoff bindet nur an einen Enzym-Substrat-Komplex und entzieht diesen dem normalen Reaktionsweg [3].

1.6. CYP und Lipide

Es wurde gezeigt, dass zweikettige Phospholipide für die optimale katalytische Aktivität von isolierten und rekonstituierten Cytochrom P450-Enzymsystemen nötig sind [27, 23, 39, 40]. Beide Enzyme, die NADPH-Cytochrom P450-Reduktase und das CYP sind mit ihren bindenden Domänen sehr stark in dem Lipidbilayer des endoplasmatischen Retikulums verankert. Durch die Begrenzung auf die zweidimensionale Membran wird die lokale Konzentration beider Enzyme erhöht. So wird das „Einander-Finden“ der Enzyme bzw. die Komplexbildung erleichtert. Nur die Bildung dieser binären Komplexe führt zu einem katalytisch aktiven System. Die Hauptauswirkung der zweikettigen Phospholipide im P450 basierten System ist die Tatsache, dass die Bildung eines aktiven P450-Reduktase Komplexes erleichtert wird.

Es ist bekannt, dass zweikettige Phospholipide keinen Einfluss auf die Zykluszeit oder Umsatzrate des katalytisch arbeitenden Enzymkomplexes haben [25, 26]. Wenn jedes CYP-Enzym mit einer Reduktase einen Komplex bildet ($[\text{red}]_0 \rightarrow \infty$) und jeder Komplex mit einem Substratmolekül besetzt ist ($[\text{S}] \rightarrow \infty$), wird die maximale Enzymaktivität unabhängig von den eingesetzten, zweikettigen Phospholipiden erreicht.

Viner et al. [1987] zeigten, dass einkettige Lipide, die durch die Wirkung von Phospholipase A₂ entstehen, die Enzymaktivität von P450 in Rattenlebermikrosomen hemmen.

1.7. Verwendetes System

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie einkettige Fettsäuren die Aktivität von membrangebundenen Enzymen beeinflussen. Das verwendete Testsystem ist das mikrosomale, gemischtfunktionale Monooxygenasesystem, das aus NADPH-Cytochrom P450-Reduktase und CYP2B1 besteht. Es wurde gezeigt [25] dass die Enzymaktivität des Testsystems von zwei Proteindomänen des binären Komplexes abhängt:

Erstere ist die membranbindende Domäne, von der die Bildung des binären Komplexes abhängt.

Letztere ist die cytosolische Domäne, von der die Zykluszeit oder Umsatzrate der katalytischen Reaktion abhängt.

1.8. Fragestellung

Folgende Fragestellungen wurden behandelt:

Wie wird die katalytische Reaktion des rekonstituierten Systems durch einkettige Lipide beeinflusst?

Worauf ist die Hemmung zurückzuführen?

Welcher Hemmtyp liegt vor und wie stark ist die Hemmung?

2. Material und Methoden

2.1. Material

Folgende, im Handel befindliche Chemikalien wurden verwendet:

Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen:

- L- α -Lysophosphatidylcholin
- L- α -Lysophosphatidylethanolamin
- L- α -Lysophosphatidsäure, Oleoyl C 18:1 (Cis) -9
- 2-Monopalmitoylglycerol
- 1-Monooleoyl-rac-glycerol
- 1-Monostearyl-rac-glycerol
- Palmitoyl-L-Carnitin
- D-Sphingosin
- Arachidonsäure
- Ölsäure
- L- α -Lysophosphatidylinositol
- Myristinsäure
- Laurinsäure
- Stearinsäure
- L- α -Dilauryl-sn-glycero-3-phosphocholin (DLPC)

Fa. Ega-Chemie, Steinheim

- 7-Ethoxycumarin (rekristallisiert)
- 7-Hydroxycumarin (rekristallisiert)

Alle anderen verwendeten Reagenzien wurden in höchst erhaltlicher Reinheit von der Firma E. Merck (Darmstadt) bezogen.

Die verwendeten Enzyme CYP2B1 und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Müller-Enoch, Abteilung für Physiologische Chemie, Universität Ulm zur Verfügung gestellt. Ihre Herstellung ist von Kucher 1986 ausführlich beschrieben [17].

Die SDS-PAGE reine CYP2B1 wies einen Gehalt von 21,7 nmol/ml auf. Der Gehalt der Reduktase betrug 18,0 nmol/ml. Die spezifische Aktivität der Reduktase betrug 24 μ mol Cytochrom c oxidiert x min⁻¹ x mg Protein⁻¹.

2.2 Lösungen

Lösungen für fluorometrische Bestimmungen der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität:

Die NADPH Lösung wurde jeden Tag frisch, MgCl_2 alle 3 Monate, K-Hepes und 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon) alle 6 Monate und 7-Ethoxycumarin alle 2 Monate hergestellt.

- Kalium-Hepes-Puffer 0,1 M pH 7,6 (MW: 276,4)
2,76 g Hepes in 89 ml H_2O bidest. auflösen, dann mit 1 M HCl auf pH 7,6 einstellen und mit H_2O bidest. auf 100 ml auffüllen
- MgCl_2 Lösung 0,1 M (MW: 213,3)
- Hemmstofflösungen: L- α -Lysophosphatidylcholin und Palmitoyl-L-Carnitin wurden in Kalium-Hepes-Puffer 0,1 M pH 7,6 durch Beschallen im Ultraschallbad in einer Konzentration von 0,4 mg/ml bzw. 0,2 mg/ml gelöst. Lysophosphatidsäure wurde in DMSO in einer Konzentration von 4 mg/ml gelöst. Alle anderen Lipide wurden in Ethanol in Konzentrationen von 0,125-3,0 mg/ml gelöst.
- Phospholipidgemisch: 4 mg Dilaurylphosphatidylcholin (DLPC) wurden mit 1 ml Kalium-Hepes-Puffer 0,1 M pH 7,6 versetzt und danach im Ultraschallbad so lange beschallt, bis die Mischung klar war.
- NADPH 10^{-2}M (MW: 832): 4,16 mg/0,5 ml
- 7-Ethoxycumarin 10^{-3}M (MW: 190)
1,9 mg/ 10ml, vortexen. Da 7-Ethoxycumarin schwer löslich ist, muss das Gemisch eine Stunde auf $\sim 70^\circ\text{C}$ gebracht werden bis die Lösung klar ist.
- 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon): aus einer Stammlösung von 10^{-3}M wurde je nach Bedarf eine Lösung von 10^{-4}M hergestellt. Die Stammlösung wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Müller-Enoch zur Verfügung gestellt.

2.3. Rekonstitution des CYP2B1-NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-Systems

Es wurde zum einen die Rekonstitution mit Phospholipiden und zum anderen ohne Phospholipide durchgeführt. Beide Methoden wurden von Müller-Enoch et al. [1984] vorgestellt.

2.3.1. Rekonstitution mit Phospholipiden (Vesikuläres System)

4 mg Dilaurylphosphatidylcholin (DLPC) wurden mit 1 ml Kalium-Hepes-Puffer 0,1M pH 7,6 gemischt und dann solange im Ultraschallbad beschallt, bis die Mischung klar war. Anschließend wurde CYP2B1 und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase im Verhältnis 1:2:210-300 (CYP2B1:Reduktase:DLPC) zugegeben, für zwei Stunden bei Raumtemperatur (ca. 21°C) stehen gelassen und dann für die Bestimmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität verwendet.

2.3.2. Rekonstitution ohne DLPC

CYP2B1 und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase wurden im Verhältnis 1:2 gemischt und für eineinhalb Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dadurch rekonstituieren sich die Enzyme und bilden den sogenannten „Preformed Complex“ (PC). Die Konzentration an CYP2B1 lag dabei immer über 5µmol. Der „Preformed Complex“ wurde anschließend für die Bestimmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität verwendet.

2.4. Die fluorometrische Bestimmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität

Die Bestimmung erfolgte in Anlehnung an die Methode von Ullrich und Weber [1972]. Dieses Verfahren beruht auf der O-Dealkylierung von 7-Ethoxycumarin durch die rekonstituierten Enzymsysteme zum fluoreszierenden 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon). Das Produkt, 7-Hydroxycumarin oder Umbelliferon, wird bei 360 nm angeregt und emittiert dann Licht bei 460 nm. Die Messungen wurden bei 37°C mit Hilfe eines Spektrophotometer Jobin-Yvon JY 3D mit gekoppeltem x/y-Schreiber (Watanabe Serrocoder SR 6254) durchgeführt. In einem Gesamtvolumen von 600 µl wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von verschiedenen Substrat- bzw. Hemmstoffkonzentrationen ermittelt.

In den 600µl waren enthalten: 7-Ethoxycumarin in Konzentrationen von 2×10^{-4} M bis 2×10^{-5} M, MgCl_2 5×10^{-2} M, Kalium-Hepes-Puffer, 0,1M, pH 7,6, in Konzentrationen von 7×10^{-2} M bis 9×10^{-2} M, CYP2B1 in Form von PC in Konzentrationen von 4×10^{-8} M bis $5,5 \times 10^{-8}$ M, sowie je nach Versuch verschiedene Hemmstoffe in Volumina von 1 bis 4µl in Konzentrationen von 0,125mg/ml bis 6 mg/ml. In dieser Reihenfolge wurden die Substanzen in eine 1 ml Quarzküvette gegeben; das Endvolumen betrug immer 590 µl. Diese Mischung wurde dann bei 37°C drei Minuten lang inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 10 µl [10^{-2} M] NADPH Lösung gestartet und nach 6 Minuten abgebrochen.

Hiernach wurde mit 10 µl Umbelliferon [10^{-4}M] zweimal geeicht. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde über 5 Minuten gemittelt und die nmol des entstandenen Umbelliferons pro Minuten pro nmol eingesetztem CYP2B1 ermittelt.

2.5. Auswertung der Messergebnisse

Die Enzymaktivität A ist definiert als gebildetes Produkt pro Zeit, $d[P]/dt$, geteilt durch die Ausgangs-P450- Konzentration, $[P450]_0$.

$$A = \frac{\frac{d[P]}{dt}}{[P450]} \quad (1)$$

Die Enzymaktivität A kann in einem Experiment bestimmt werden, wenn das gebildete Produkt pro Zeit, $d[P]/dt$, für eine bestimmte initiale P450 Konzentration, $[P450]_0$, gemessen wird.

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

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

beschrieben werden. Die Produktionsrate ist proportional zu

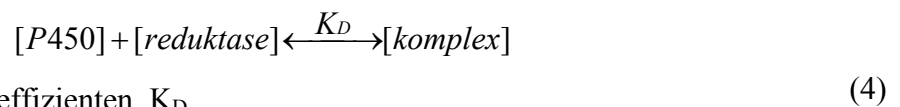
- a) der Konzentration der arbeitenden Proteinkomplexe, $[komplex]$,
- b) der Umsatzrate eines Proteinkomplexes, k_E^0 ,
- c) und der Fraktion, R, der Besetzung des katalytischen Zentrums durch die Substratmoleküle, S

Die Enzymaktivität kann also folgendermaßen beschrieben werden:

$$A = \frac{[komplex]}{P450_0} \cdot k_E^0 \cdot R(S) \quad (3)$$

2.5.1. Bildung des binären Komplexes

Die Komplexbildung des P450 Enzyms mit der Reduktase kann durch die Massenerhaltungsbeziehung ganz allgemein beschrieben werden. Hier formen die beiden Enzyme einen binären Komplex (P450:Reduktase) [27, 26]



mit dem Dissoziationskoeffizienten, K_D

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

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

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

Von den beiden möglichen Lösungen scheidet nach graphischer Darstellung der Funktion die Lösung, bei der die Wurzel addiert wird, aus. Die einzig sinnvolle Lösung ist damit diejenige, bei der die Wurzel subtrahiert wird.

Der Dissoziationskoeffizient, K_D , hängt von den physikalischen und chemischen Bedingungen in der Umgebung der membranbindenden Domänen ab. Kleine Dissoziationskoeffizienten erhält man, wenn die beiden Enzyme in Lipidmembranen verankert sind. Experimente von Müller-Enoch et al. [1984] wurden mit Hilfe der Gleichung (6) interpretiert [24]: $K_D = (1.4 \pm 0.1)[P450]_0$ für Lipide, die aus Lebermikrosomen gewonnen wurden ($[P450]_0 = 33 \text{ nM}$); $K_D = (2.4 \pm 0.2)[P450]_0$ für DLPC. Große Dissoziationskoeffizienten erhält man, wenn man die beiden Enzyme in Puffer gelöst sind, der kleine Mengen von Glycerol enthält: $K_D = (4 \pm 1)[P450]_0$.

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

2.5.2. Umsatzrate eines arbeitenden Enzymkomplexes

Der arbeitende Enzymkomplex kann durch seine Umsatzrate, k_E^0 , charakterisiert werden. Diese kann unter optimalen Bedingungen bestimmt werden [27, 9]:

- a) wenn $[Red]_0 \rightarrow \infty$, da dann jedes P450-Enzym einen arbeitenden, binären Komplex bildet und
- b) wenn $[S] \rightarrow \infty$, da dann jeder arbeitende, binäre Komplex mit einem Substratmolekül beladen ist. Die Zykluszeit, τ , des zyklisch arbeitenden Enzymkomplexes ist durch die inverse katalytische Rate gegeben ($1/k_E^0$). Die katalytische Reaktionsrate, k_E^0 , für den binären Komplex, der aus Ratten P450 (CYP2B1) und Rattenreduktase gebildet ist, ist $40 \pm 2 \text{ [min]}^{-1}$. Diesen Wert erhielt

man sowohl für binäre Komplexe, die in Puffer mit kleinen Mengen Glycerol gelöst waren, als auch für binäre Komplexe, die in Membranen, die aus zweikettigen Fettsäuren bestehen, eingebettet waren [27].

2.5.3. Substratumsetzung ohne Hemmstoff

Zur Berechnung der Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion bei konstanter Enzymkonzentration und konstanter Temperatur, jedoch variabler Substratkonzentration gilt die Michaelis-Menten-Gleichung [21]

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

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

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

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

2.5.4. Substratumsetzung mit Hemmstoff

2.5.4.1. Kompetitive Hemmung

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

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

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

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

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

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

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

2.5.4.2. Nichtkompetitive Hemmung

Neben dem oben beschriebenen Experiment wurde noch ein weiteres Experiment durchgeführt, in dem die Substratkonzentration konstant gehalten wurde und die Hemmstoffkonzentration [I] variiert wurde. Zur graphischen Darstellung wurde die inverse Enzymaktivität A^{-1} gegen die Hemmstoffkonzentration [I] aufgetragen. Bei einigen Substanzen stimmte die aus Gleichung (10) vorhergesagte Kurve nicht mit den experimentell ermittelten Daten überein, so dass hier eine nicht kompetitive Hemmung angenommen wurde. Diese wurde folgendermaßen charakterisiert:

Gleichung (10) hat, wenn man Gleichung (9) und (6) in Betracht zieht, nun folgende Form:

$$A = K(I)^{(nc)} \cdot \frac{\frac{[S]}{K_s^0}}{1 + \frac{[S]}{K_s^0} + \frac{[I]}{K_I^{(c)}}} \quad (11)$$

Hierbei ist

$$K(I)^{(nc)} = \frac{k_E^0(I)}{2} \left(\left[1 + \frac{[Red]_0}{[P450]_0} + \frac{K_D(I)}{[P450]_0} \right] - \sqrt{\left[1 + \frac{[Red]_0}{[P450]_0} + \frac{K_D(I)}{[P450]_0} \right]^2 - \frac{4[Red]_0}{[P450]_0}} \right) \quad (12)$$

Da weder $K_D(I)$ noch $k_E^0(I)$ bekannt sind und in unserem Experiment auch nicht bestimmt wurden, kann die Funktion, die Ausdruck des nicht-kompetitiven Effektes ist, mit einer Taylor-Serie bis zum ersten nicht-trivialen Ausdruck angenähert werden:

$$K(I)^{(nc)} = K(0) \cdot (1 + a_1^{(nc)} \cdot [I] + \dots) \quad (13)$$

Der Wert von $K(0)$ entspricht $A_{\max}$.

Der nicht-kompetitive Effekt kann verschiedene Ursachen haben: entweder die Zykluszeit k_E^0 wird zu $k_E^0(I)$ verändert, oder/und der Dissoziationskoeffizient wird zu

$K_D(I)$ verändert. Drittens könnte das Bindungsverhalten des Substrates und das Enzym durch den Hemmstoff und damit K_s^0 verändert werden. Der nicht-kompetitive Effekt wird durch $a_1^{(nc)}$ charakterisiert. $a_1^{(nc)}$ ist abhängig von a_{Rate} und $a_{Komplex}$. Die Störung des katalytischen Zyklus wird durch a_{Rate} beschrieben. Die Zykluszeit wird wahrscheinlich vergrößert. Dadurch würde a_{Rate} negativ. Den Einfluss des zusätzlichen Moleküls auf die Komplexbildung wird durch $a_{Komplex}$ beschrieben. Die einkettigen Fettsäuren bevorzugen wahrscheinlich die Membranbindungsdomänen und dadurch würde $a_{Komplex}$ positiv. Diese Überlegungen zeigen, dass $a_1^{(nc)}$ entweder positiv (hier wird die Enzymaktivität erhöht) oder negativ sein kann (hier wird sie gehemmt).

Aus Gleichung (11) folgt:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{K(I)^{(nc)}} \left(1 + \frac{K_s^0}{[S]} + \frac{K_s^0}{[S]} \cdot \frac{[I]}{K_I^{(c)}} \right) \quad (14)$$

Die unbekannte Funktion kann durch eine lineare Funktion angenähert werden:

$$\frac{1}{A} = \frac{1}{K(0)} \cdot \frac{1 + \frac{K_s^0}{[S]} + \frac{K_s^0}{[S]} \cdot \frac{[I]}{K_I^{(c)}}}{1 + a_1^{(nc)} \cdot [I]} \quad (15)$$

Wenn man die Gleichung (15) an die experimentell ermittelten Punkte anpasst, erhält man $a_1^{(nc)}$. Dieser charakterisiert den nicht-kompetitiven Effekt.

Die Anpassung und Darstellung der experimentell ermittelten Punkte erfolgten mit dem Programm Origin 5.0. Die Abweichungen wurden ebenfalls mit Hilfe dieses Programmes ermittelt.

3. Ergebnisse

Messung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität in Abhängigkeit von verschiedenen Lipiden in unterschiedlicher Konzentration, sowie in unterschiedlicher Substratkonzentration.

3.1. Laurinsäure

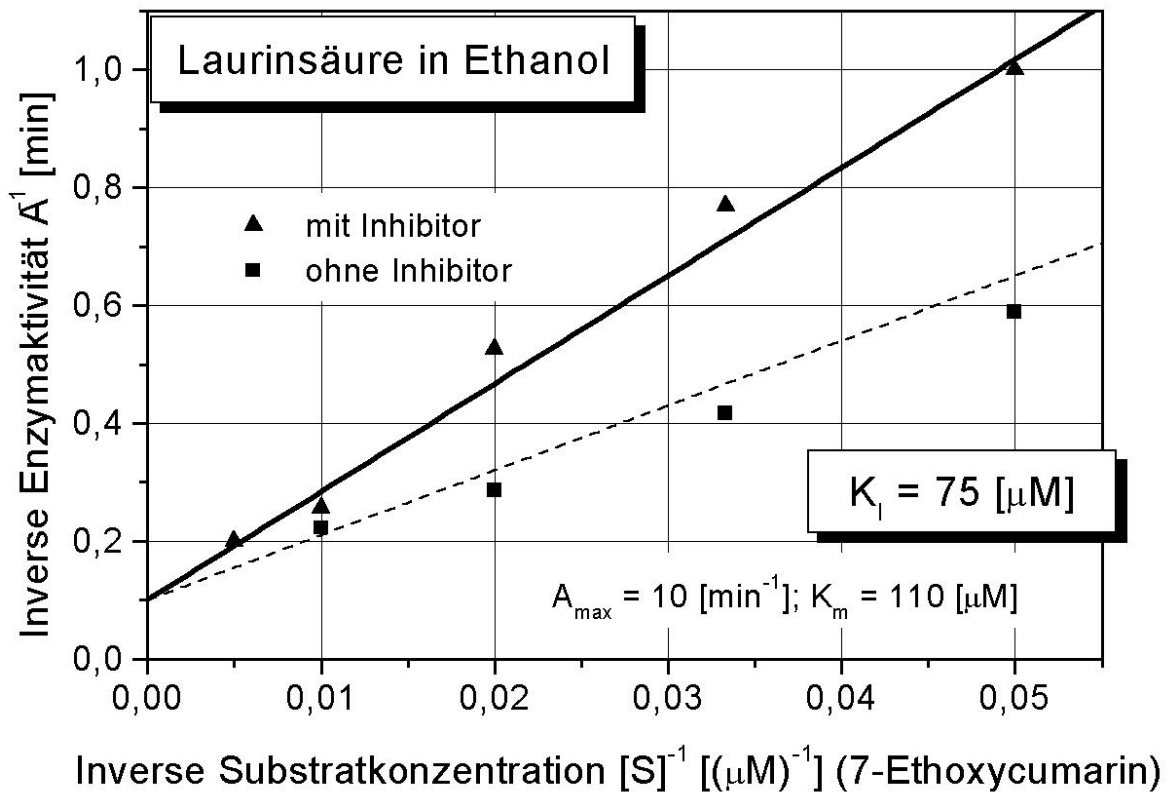


Abb1: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch Laurinsäure (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von 50 μM Laurinsäure bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt (▲). Ferner ist die Aktivität ohne Hemmstoff eingezeichnet (■). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon $\text{min}^{-1} \text{ nmol} 2\text{B1}^{-1}$.

Laurinsäure, die gesättigte C_{12} -Fettsäure, zeigt eine kompetitive Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität. Bei gleichbleibender $A_{\max}$ von $10[\text{min}^{-1}]$ (hier wurde CYP2B1 mit einer niedrigeren Umsatzrate verwendet) zeigt sich eine Verschiebung von K_s^0 .

Der aus der Geraden errechnete K_i Wert liegt bei $75\mu\text{M} \pm 6$ ($A_{\max}=10[\text{min}^{-1}] \pm 1$; $K_m=110 \pm 4,4$).

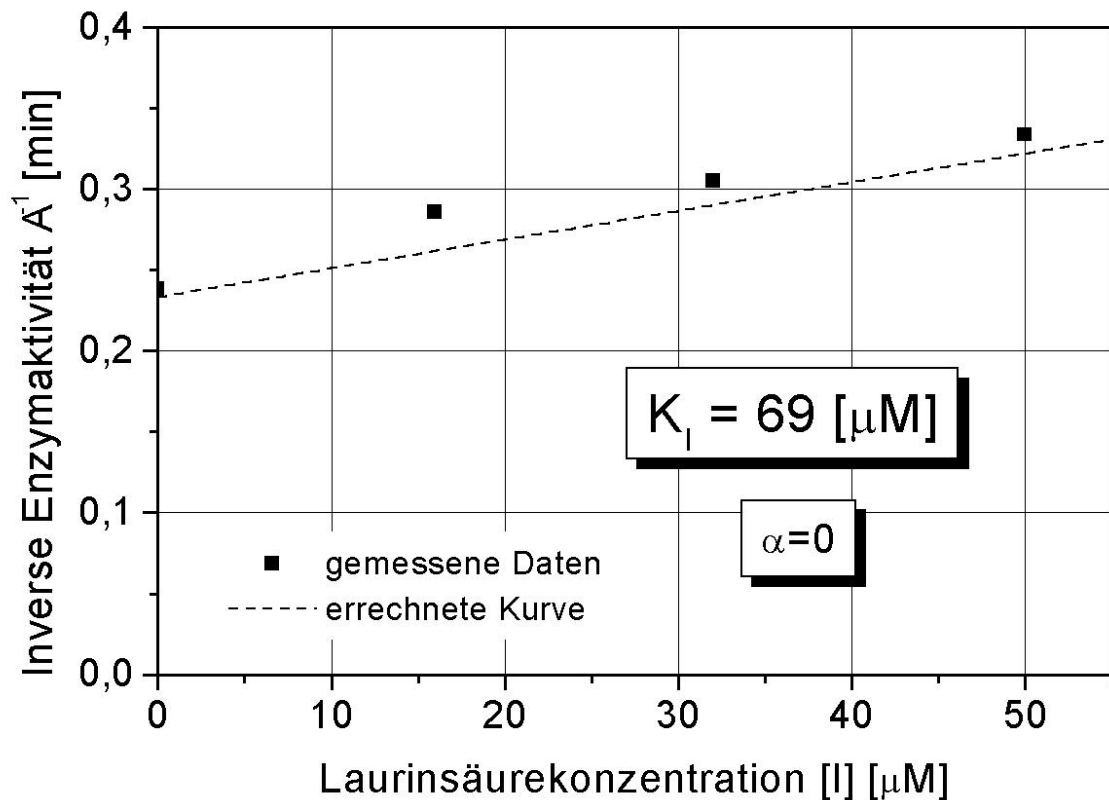


Abb. 2: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch Laurinsäure (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bei konstanter Substratkonzentration von 100 bestimmt (■). Ferner ist die aus den vorher gewonnenen Daten mit Hilfe von Gleichung (10) errechnete Kurve eingezeichnet (- -). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon min⁻¹ nmol2B1⁻¹.

Auch bei höheren Konzentrationen konnte nur eine kompetitive Hemmung beobachtet werden. ($\alpha=0$) Der zur Anpassung benutzte K_i Wert von 69 μM liegt noch im Variationsbereich (75 μM ± 6).

3.2. Myristinsäure

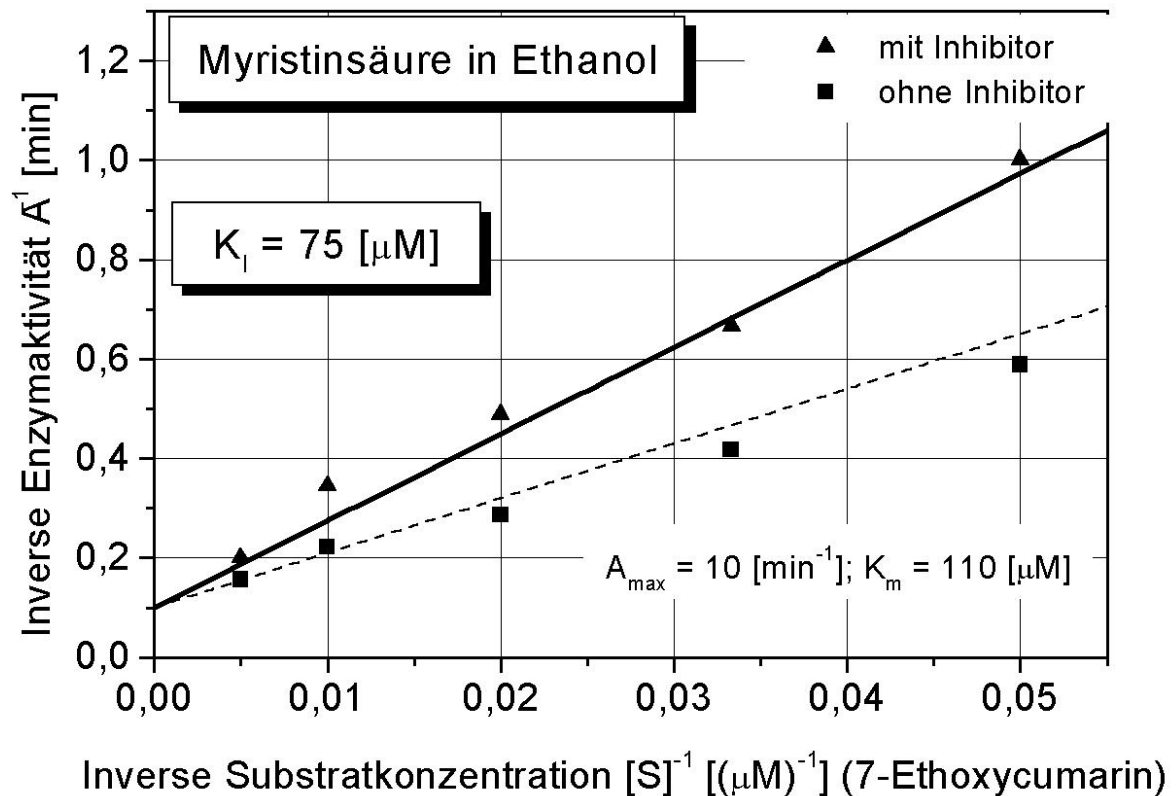


Abb 3: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch Myristinsäure (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von $44\mu\text{M}$ Myristinsäure bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt ($\blacktriangle$). Ferner ist die Aktivität ohne Hemmstoff eingezeichnet ($\blacksquare$). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Umbelliferon min}^{-1}\text{nmol2B1}^{-1}$.

Myristinsäure, eine C_{14} -Fettsäure, zeigt eine kompetitive Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität. Bei gleichbleibender A_{max} von $10[\text{min}^{-1}]$ (hier wurde CYP2B1 mit einer niedrigeren, spezifischen Aktivität verwendet) zeigt sich eine Verschiebung von K_S^0 . Der aus der Geraden errechnete K_I Wert liegt bei $75\mu\text{M} \pm 6$ ($A_{\text{max}}=10[\text{min}^{-1}] \pm 1$; $K_m=110 \pm 4,4$).

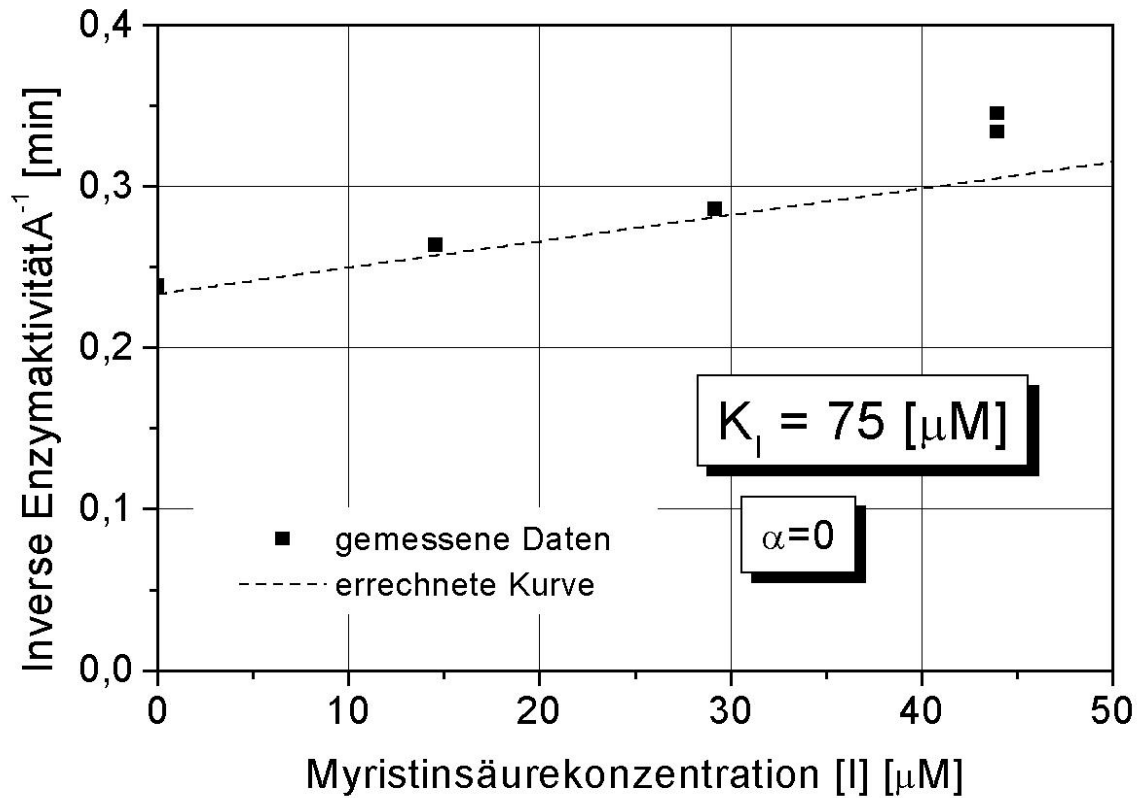


Abb. 4: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch Myristinsäure (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bei konstanter Substratkonzentration von 100 bestimmt (■). Ferner ist die aus den vorher gewonnenen Daten mit Hilfe von Gleichung (10) errechnete Kurve eingezeichnet (- -). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon min⁻¹ nmol2B1⁻¹.

Auch bei höheren Konzentrationen konnte nur eine kompetitive Hemmung beobachtet werden ($\alpha=0$). Der K_i Wert von $75\mu\text{M} \pm 6$ ist identisch mit dem vorher ermittelten.

3.3. 2-Monopalmitoylglycerol

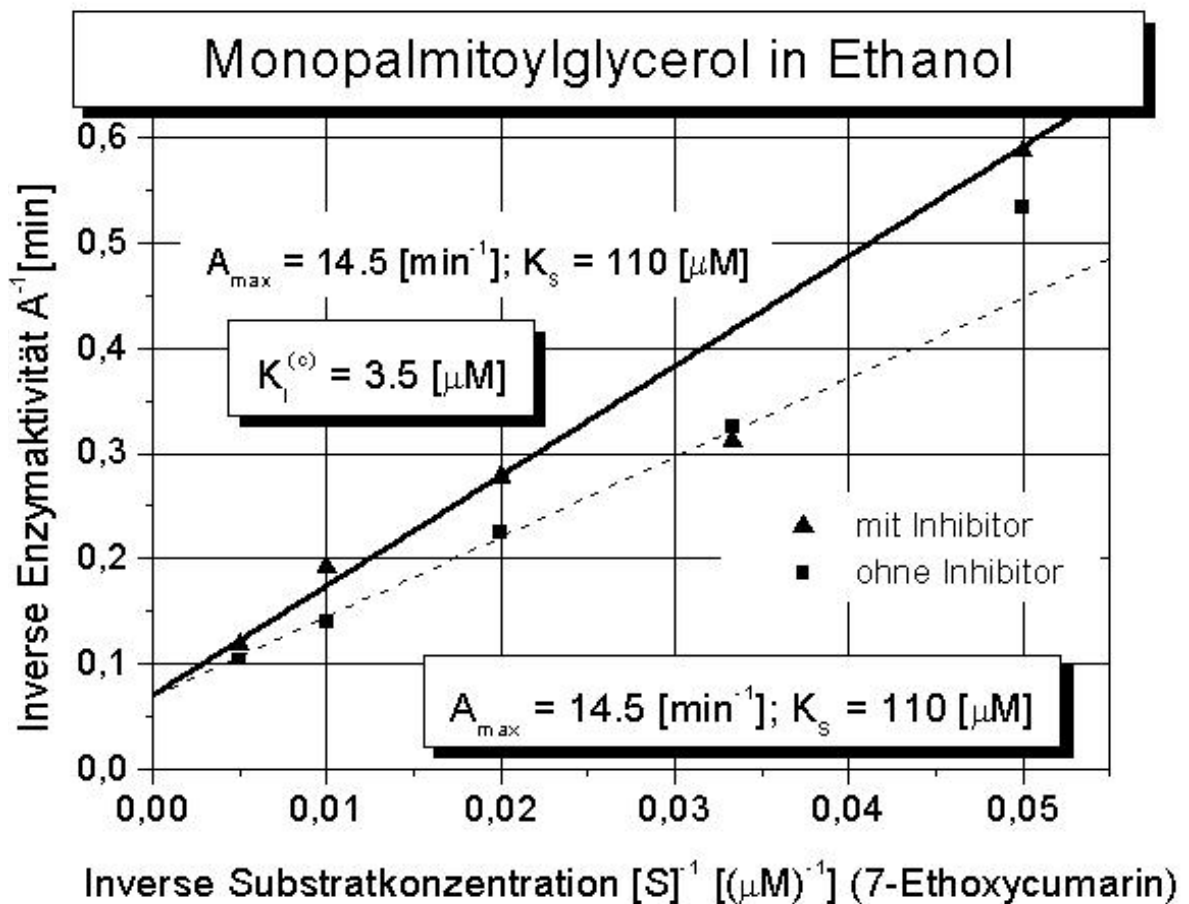


Abb 5: Hemmung der 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylase-Aktivität durch 2-Monopalmitoylglycerol (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycoumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von $1,32 \mu\text{M}$ 2-Monopalmitoylglycerol bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt (▲). Ferner ist die Aktivität ohne Hemmstoff eingezeichnet (■). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Umbelliferon min}^{-1} \text{ nmol 2B1}^{-1}$.

2-Monopalmitoylglycerol, eine C_{16} -Fettsäure mit einer Glycerolkopfgruppe, (Strukturformel siehe Abb. 26) zeigt eine kompetitive Hemmung der 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylase-Aktivität. Bei gleichbleibender $A_{\max}$ von $14,5 [\text{min}^{-1}]$ zeigt sich eine Verschiebung von K_s^0 .

Der aus der Geraden errechnete K_i Wert liegt bei $3,5 \mu\text{M} \pm 0,28$ ($A_{\max} = 14,5 [\text{min}^{-1}] \pm 1,5$; $K_m = 110 \pm 4,4$).

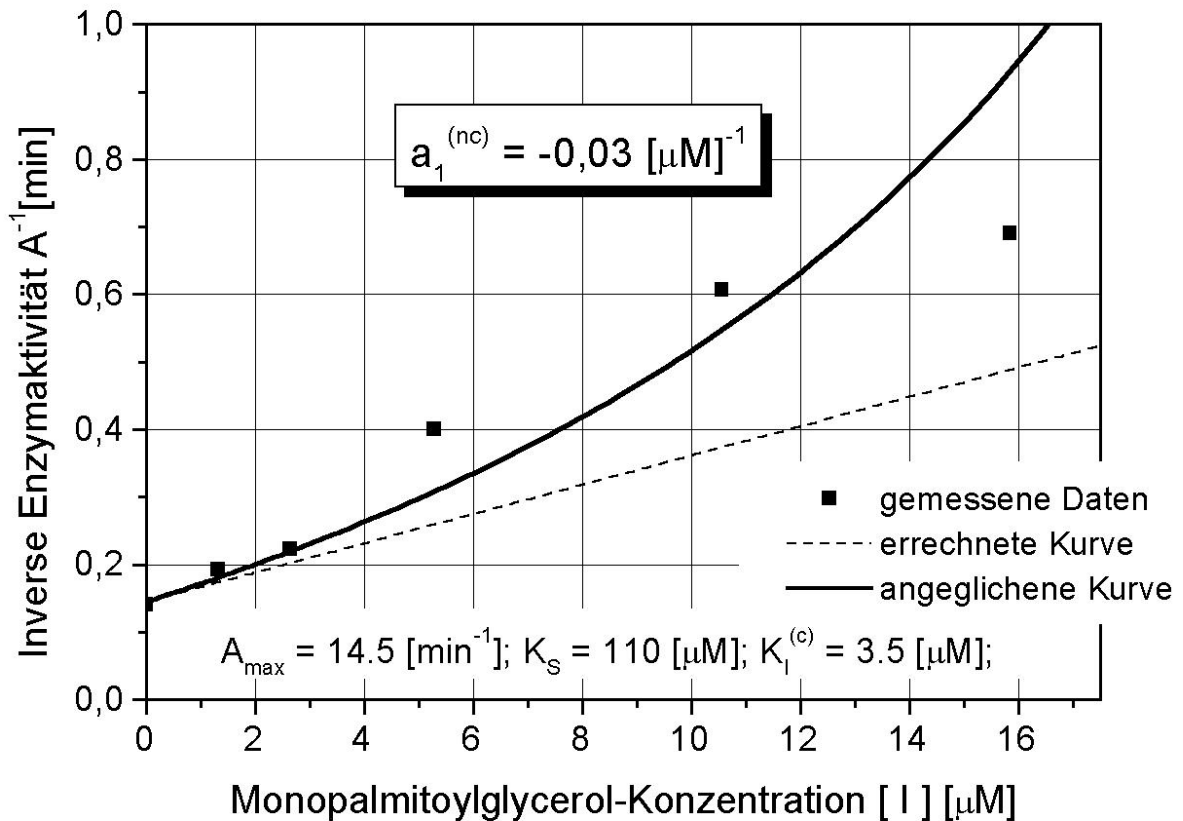


Abb. 6: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch 2-Monopalmitoylglycerol (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bei konstanter Substratkonzentration von 100 bestimmt (■). Ferner ist die aus den vorher gewonnenen Daten mit Hilfe von Gleichung (10) errechnete Kurve eingezeichnet (- -). Die an die experimentellen Daten angegliche Kurve ist eingezeichnet. Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon $\text{min}^{-1} \text{nmol} 2\text{B1}^{-1}$.

Bei höheren Konzentrationen an 2-Monopalmitoylglycerol konnte eine nicht-kompetitive Hemmung beobachtet werden. Diese ist durch $\alpha = -0,03 [\mu\text{M}]^{-1} \pm 0,0036$ charakterisiert.

3.4. Palmitoyl-L-Carnitin

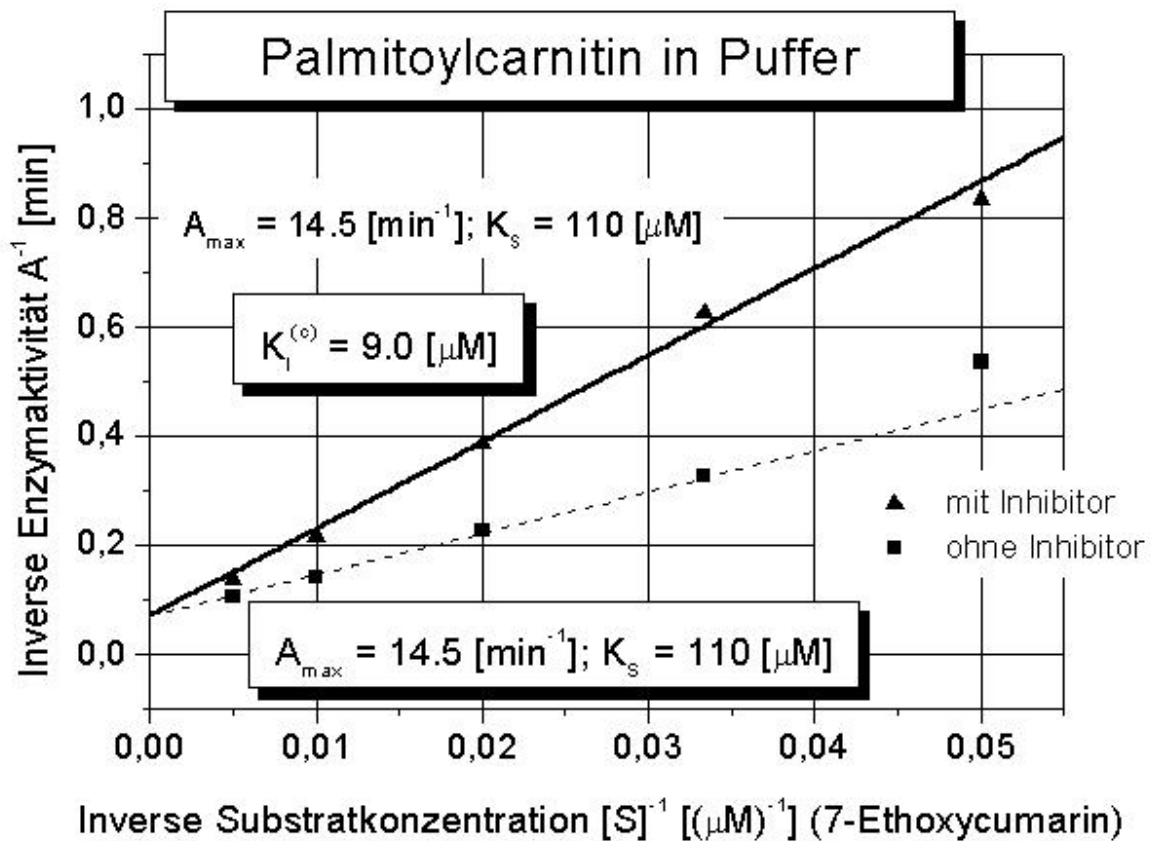


Abb 7: Hemmung der 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylase-Aktivität durch Palmitoyl-L-Carnitin (in Puffer gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycoumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von $9,9 \mu\text{M}$ Palmitoyl-L-Carnitin bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt (▲). Ferner ist die Aktivität ohne Hemmstoff eingezeichnet (■). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Umbelliferon min}^{-1} \text{ nmol 2B1}^{-1}$.

Palmitoyl-L-Carnitin, eine C_{16} -Fettsäure mit einer Carnitinkopfgruppe, (Strukturformel siehe Abb. 26) zeigt eine kompetitive Hemmung der 7-Ethoxycoumarin-O-Deethylase-Aktivität. Bei gleichbleibender $A_{\max}$ von $14,5 [\text{min}^{-1}]$ zeigt sich eine Verschiebung von K_s^0 . Der aus der Geraden errechnete K_i Wert liegt bei $9 \mu\text{M} \pm 0,72$ ($A_{\max} = 14,5 [\text{min}^{-1}] \pm 1,5$; $K_m = 110 \pm 4,4$).

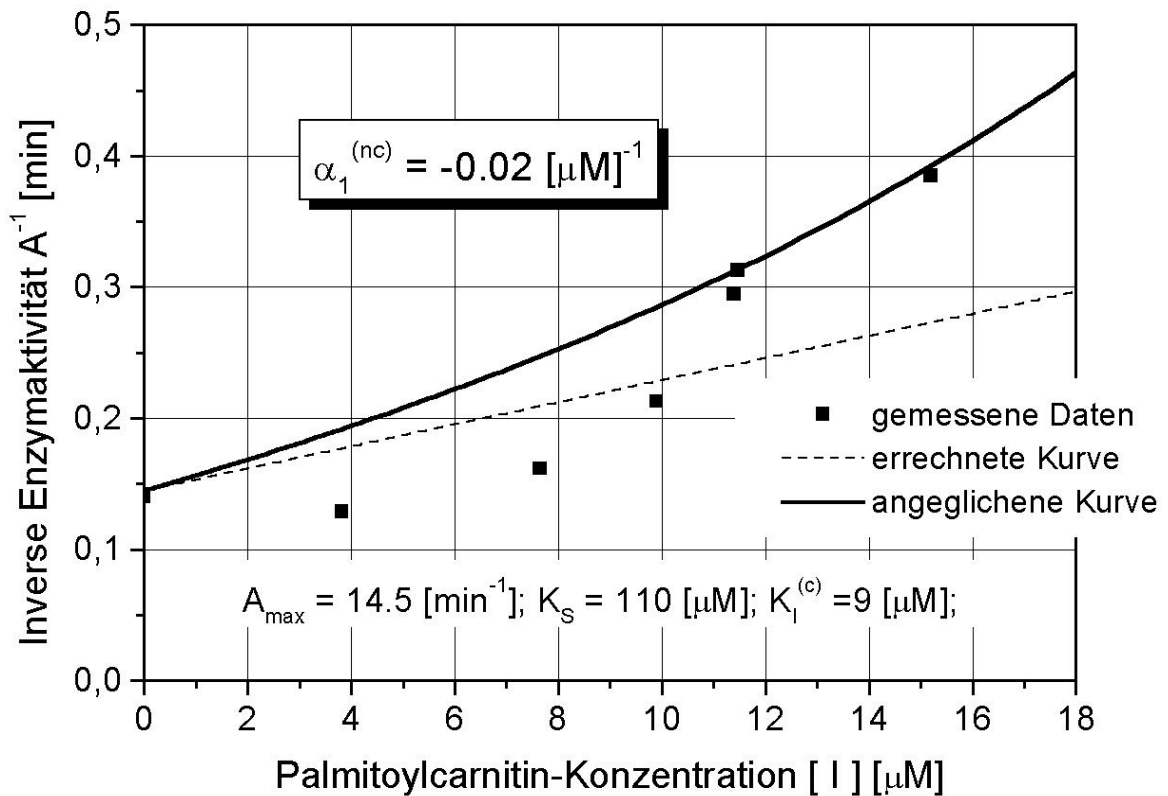


Abb. 8: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch Palmitoyl-L-Carnitin (in Puffer gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bei konstanter Substratkonzentration von 100 bestimmt (■). Ferner ist die aus den vorher gewonnenen Daten mit Hilfe von Gleichung (10) errechnete Kurve eingezeichnet (- -). Die an die experimentellen Daten angegliche Kurve ist eingezeichnet. Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Umbelliferon min}^{-1} \text{ nmol} 2\text{B1}^{-1}$.

Bei höheren Konzentrationen an Palmitoyl-L-Carnitin konnte eine nicht-kompetitive Hemmung beobachtet werden. Diese ist durch $\alpha = -0,02[\mu\text{M}]^{-1} \pm 0,0024$ charakterisiert.

3.5. D-Sphingosin

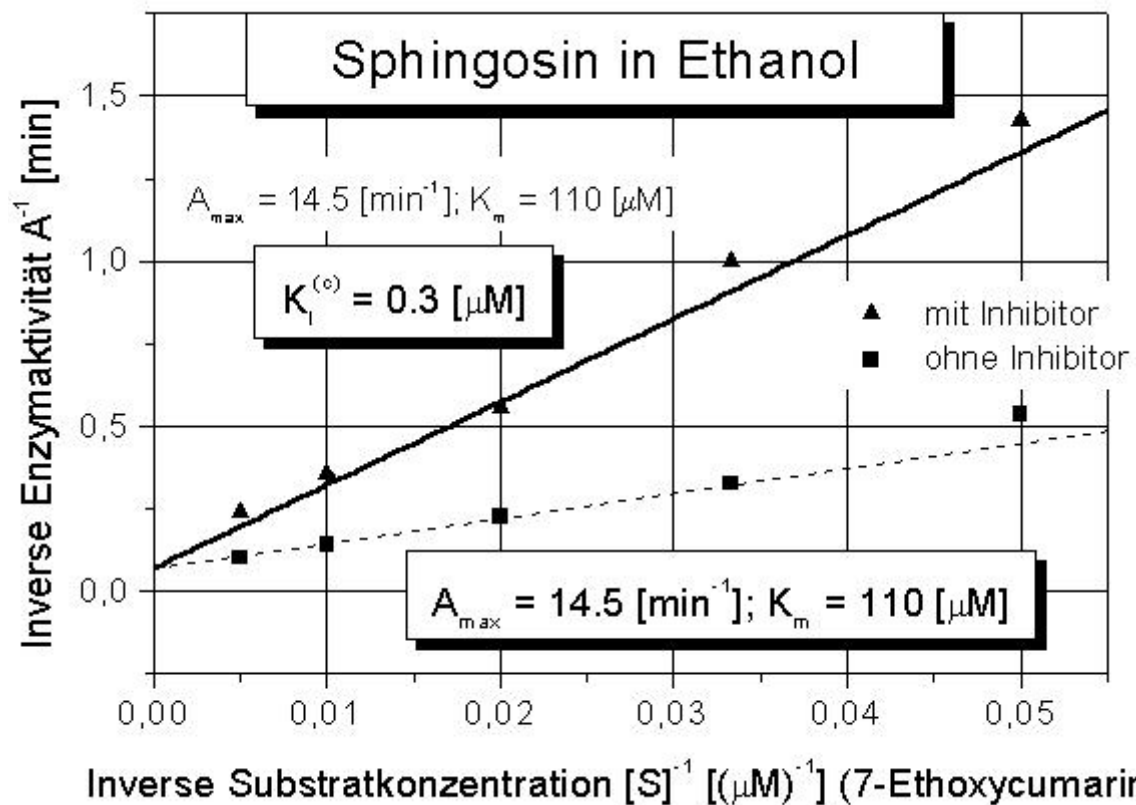


Abb 9: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch D-Sphingosin (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von 100 μM D-Sphingosin bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt (▲). Ferner ist die Aktivität ohne Hemmstoff eingezeichnet (■). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Umbelliferon min}^{-1} \text{ nmol}^{-1} \text{ 2B1}^{-1}$.

D-Sphingosin, ein Aminoalkohol mit C_{16} -Seitenkette, (Strukturformel siehe Abb.26) zeigt eine kompetitive Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität. Bei gleichbleibender A_{max} von $14,5 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ zeigt sich eine Verschiebung von K_s^0 .

Der aus der Geraden errechnete K_i Wert liegt bei $0,3 \mu\text{M} \pm 0,024$ ($A_{max} = 14,5 \text{ [min}^{-1}\text{]} \pm 1,5$; $K_M = 110 \pm 4,4$).

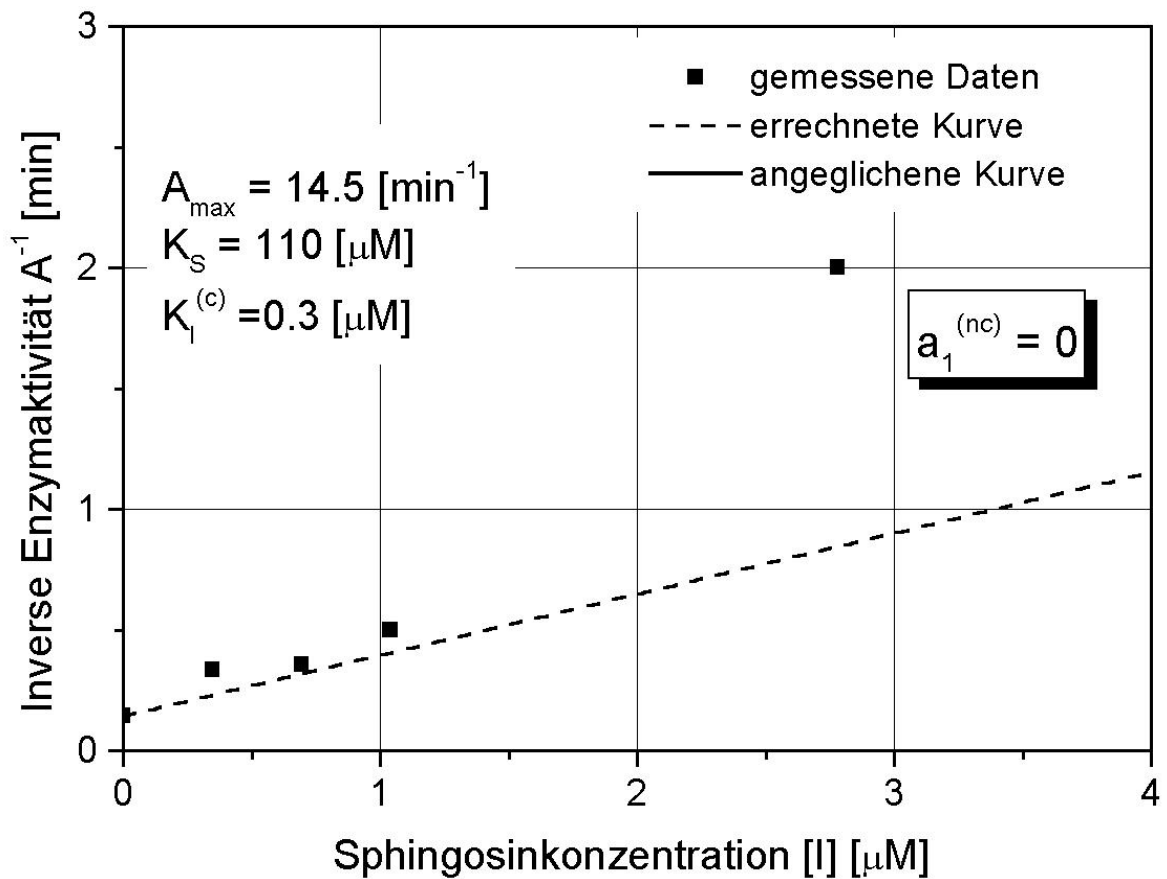


Abb. 10: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch D-Sphingosin (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bei konstanter Substratkonzentration von 100 bestimmt (■). Ferner ist die aus den vorher gewonnenen Daten mit Hilfe von Gleichung (10) errechnete Kurve eingezeichnet (- -). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon $\text{min}^{-1} \text{nmol} 2\text{B1}^{-1}$.

Bei höheren Konzentrationen an D-Sphingosin konnte keine nicht-kompetitive Hemmung beobachtet werden ($\alpha=0$).

3.5. Stearinsäure

Die Inhibitormenge dieser C₁₈-Fettsäure (Strukturformel siehe Abb. 26) wurde bis auf 2 µl StA in einer Konzentration von 6 mg/ml (d.h. Gesamtkonzentration: 11 µM) gesteigert. Höhere Konzentrationen waren auf Grund des Lösungsverhaltens nicht möglich. Höhere Ethanolkonzentrationen hätten das Ergebnis ebenfalls verfälscht. Bis zu dieser StA Konzentration konnte keine Inhibition festgestellt werden.

3.6. 1-Monostearoyl-rac-glycerol

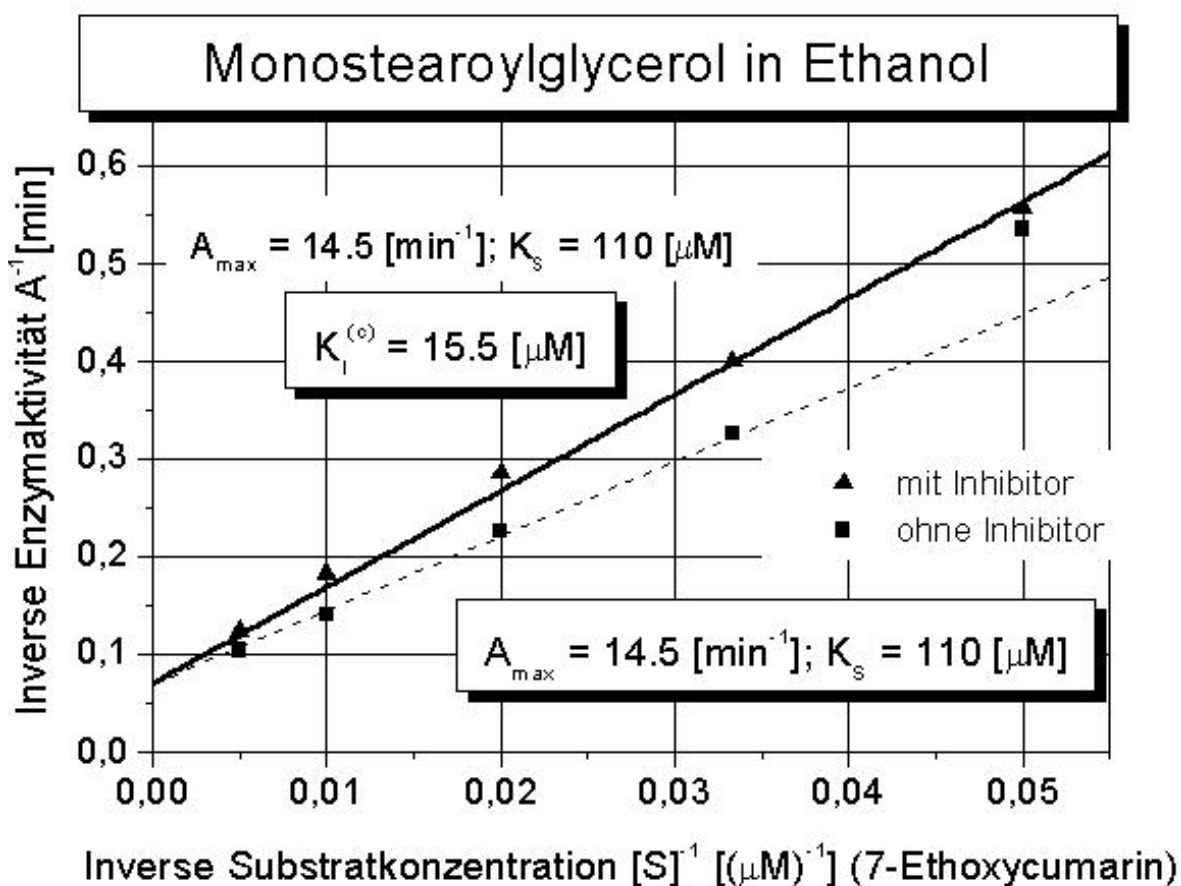


Abb 11: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch 1-Monostearoyl-rac-glycerol (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von 4,46 µM 1-Monostearoyl-rac-glycerol bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt (▲). Ferner ist die Aktivität ohne Hemmstoff eingezeichnet (■). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon min⁻¹ nmol2B1⁻¹.

1-Monostearoyl-rac-glycerol, ein C₁₈-Fettsäure mit Glycerolkopfgruppe, (Strukturformel siehe Abb. 26) zeigt eine kompetitive Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität. Bei gleichbleibender A_{max} von 14,5 [min⁻¹] zeigt sich eine Verschiebung von K_s⁰. Der aus der Geraden errechnete K_i Wert liegt bei 15,5 µM ± 1,24 (A_{max} = 14,5 [min⁻¹] ± 1,5; K_m = 110 ± 4,4).

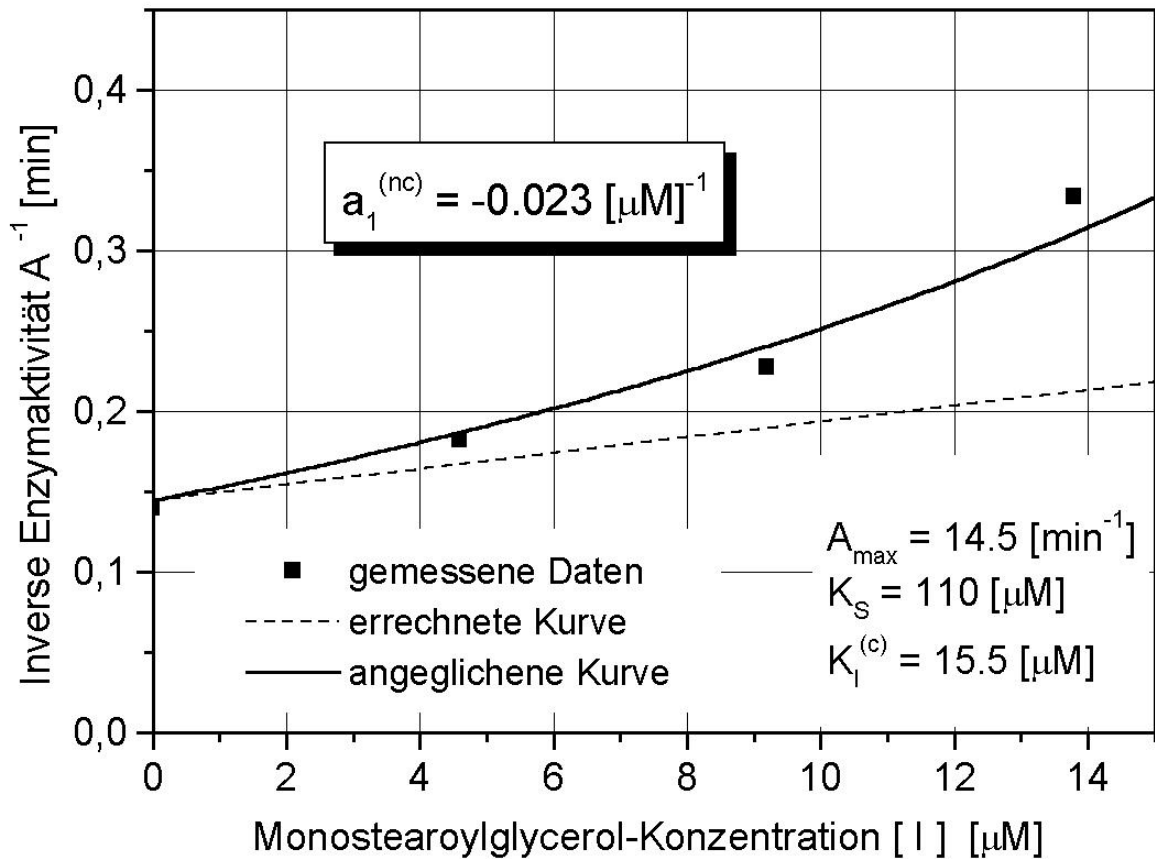


Abb. 12: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch 1-Monostearoyl-rac-glycerol (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bei konstanter Substratkonzentration von 100 bestimmt (■). Ferner ist die aus den vorher gewonnenen Daten mit Hilfe von Gleichung (10) errechnete Kurve eingezeichnet (- -). Die an die experimentellen Daten angeglichene Kurve ist eingezeichnet. Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon $\text{min}^{-1} \text{nmol} 2\text{B1}^{-1}$.

Bei höheren Konzentrationen an 1-Monostearoyl-rac-glycerol konnte eine nicht-kompetitive Hemmung beobachtet werden. Diese ist durch $\alpha = -0,023 [\mu\text{M}]^{-1} \pm 0,0028$ charakterisiert.

3.7. L- α -Lysophosphatidylinositol

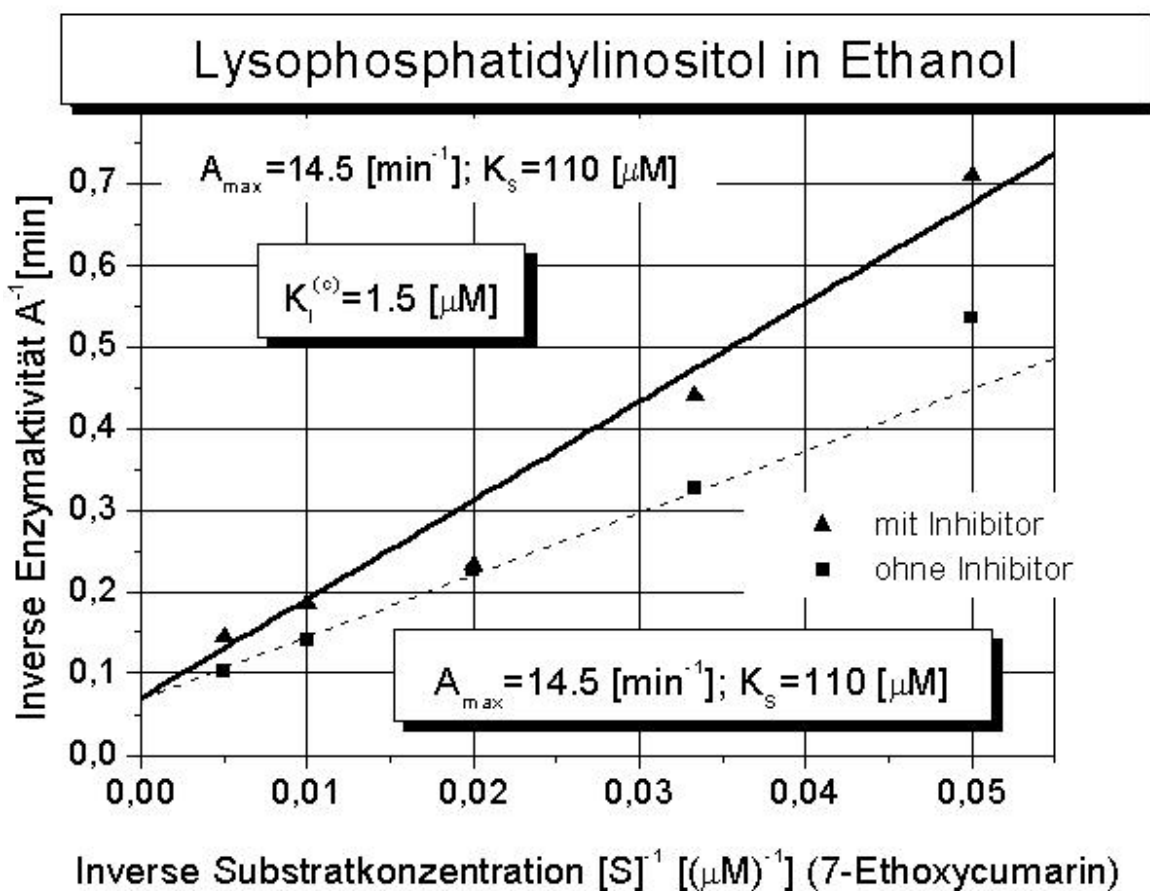


Abb 13: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch L- α -Lysophosphatidylinositol (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von $0,89\mu\text{M}$ L- α -Lysophosphatidylinositol bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt ($\blacktriangle$). Ferner ist die Aktivität ohne Hemmstoff eingezeichnet ($\blacksquare$). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Umbelliferon min}^{-1} \text{nmol}2\text{B1}^{-1}$.

L- α -Lysophosphatidylinositol, ein Phospholipid mit C_{18} -Seitenkette, (Strukturformel siehe Abb. 26) zeigt eine kompetitive Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität.

Bei gleichbleibender A_{max} von $14,5[\text{min}^{-1}]$ zeigt sich eine Verschiebung von K_s^0 .

Der aus der Geraden errechnete K_i Wert liegt bei $1,5\mu\text{M} \pm 0,12$ ($A_{\text{max}}=14,5[\text{min}^{-1}] \pm 1,5$; $K_m=110 \pm 4,4$). Aufgrund von Löslichkeitsproblemen konnten keine höheren Konzentrationen eingesetzt werden.

3.8. Ölsäure

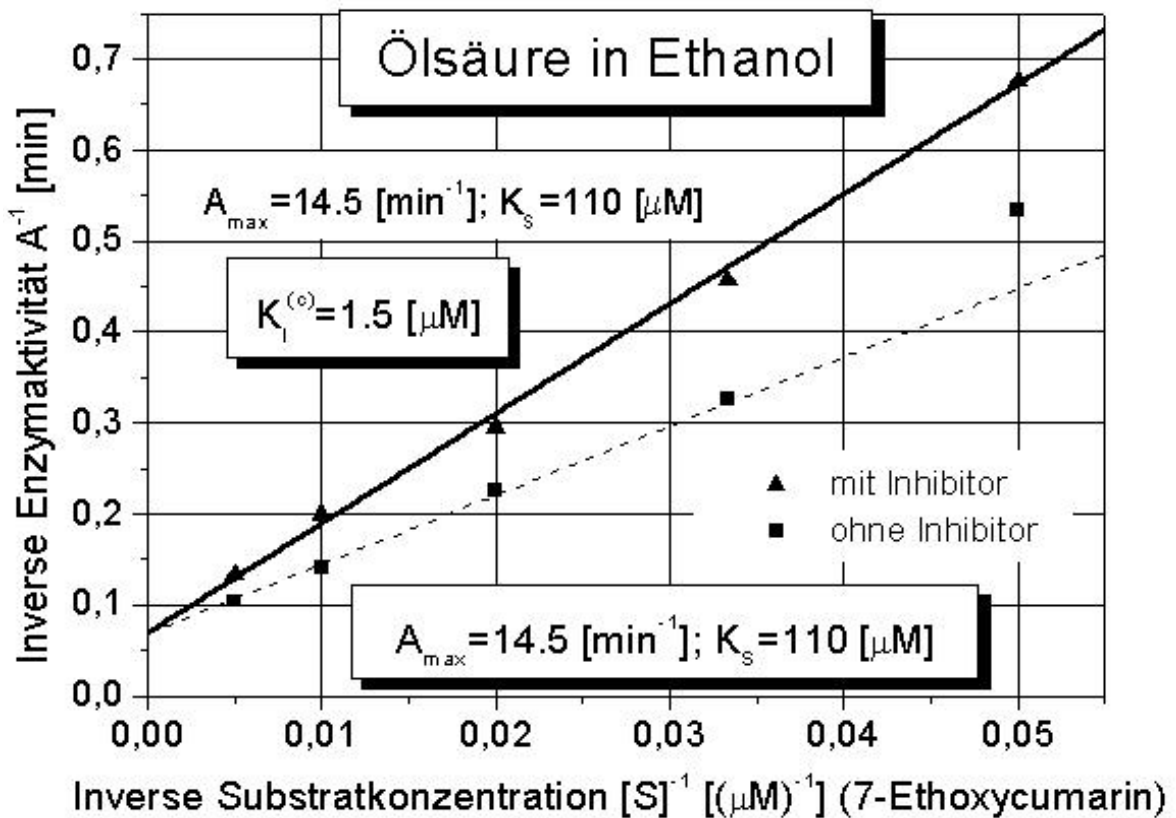


Abb 14: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch Ölsäure (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von $0,886 \mu\text{M}$ Ölsäure bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt (▲). Ferner ist die Aktivität ohne Hemmstoff eingezeichnet (■). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Umbelliferon min}^{-1} \text{ nmol 2B1}^{-1}$.

Ölsäure, die C_{18} -Fettsäure mit einer Doppelbindung, (Strukturformel siehe Abb. 26) zeigt eine kompetitive Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität. Bei gleichbleibender $A_{\max}$ von $14,5 [\text{min}^{-1}]$ zeigt sich eine Verschiebung von K_s^0 .

Der aus der Geraden errechnete K_i Wert liegt bei $1,5 \mu\text{M} \pm 0,12$ ($A_{\max} = 14,5 [\text{min}^{-1}] \pm 1,5$; $K_m = 110 \pm 4,4$).

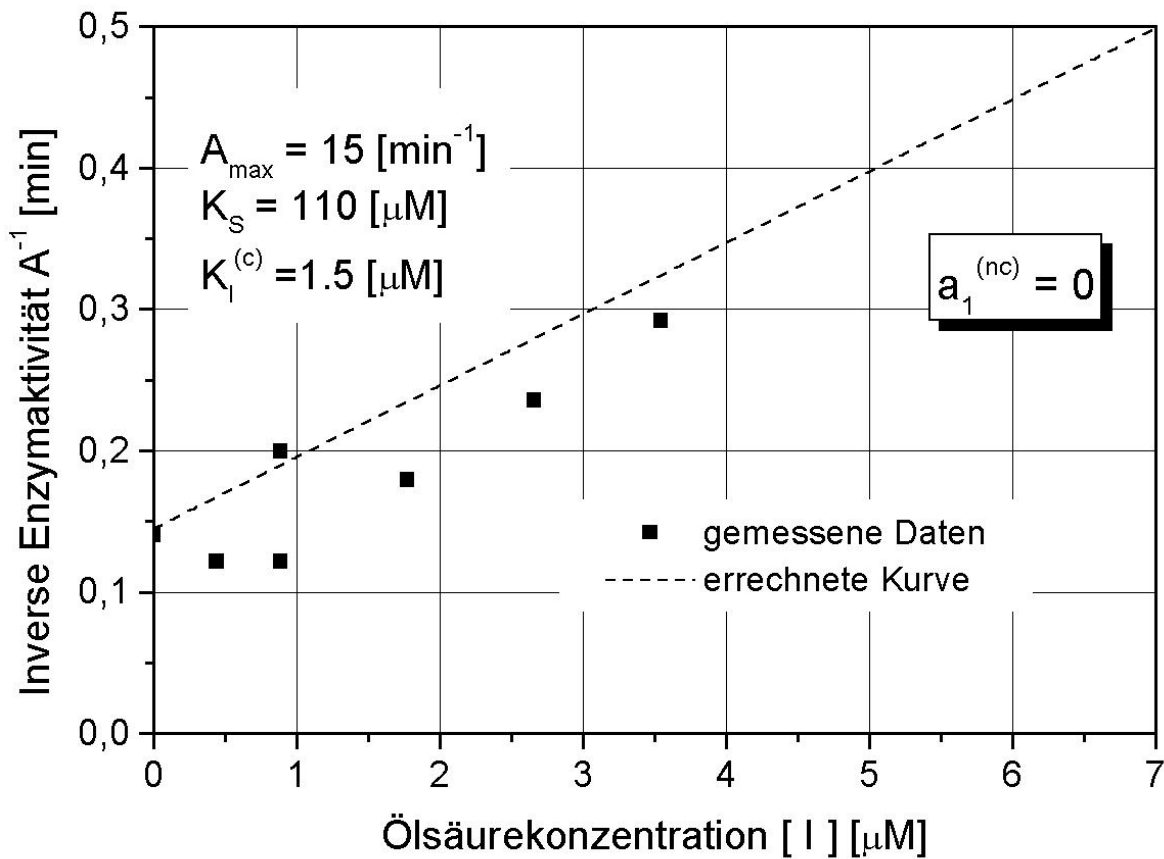


Abb. 12: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch Ölsäure (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bei konstanter Substratkonzentration von 100 bestimmt (■). Ferner ist die aus den vorher gewonnenen Daten mit Hilfe von Gleichung (10) errechnete Kurve eingezeichnet (- -). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Umbelliferon min}^{-1} \text{ nmol 2B1}^{-1}$.

Auch bei höheren Inhibitorkonzentrationen konnte eine kompetitive Hemmung festgestellt werden ($\alpha=0$).

3.9. 1-Monooleoyl-rac-glycerol

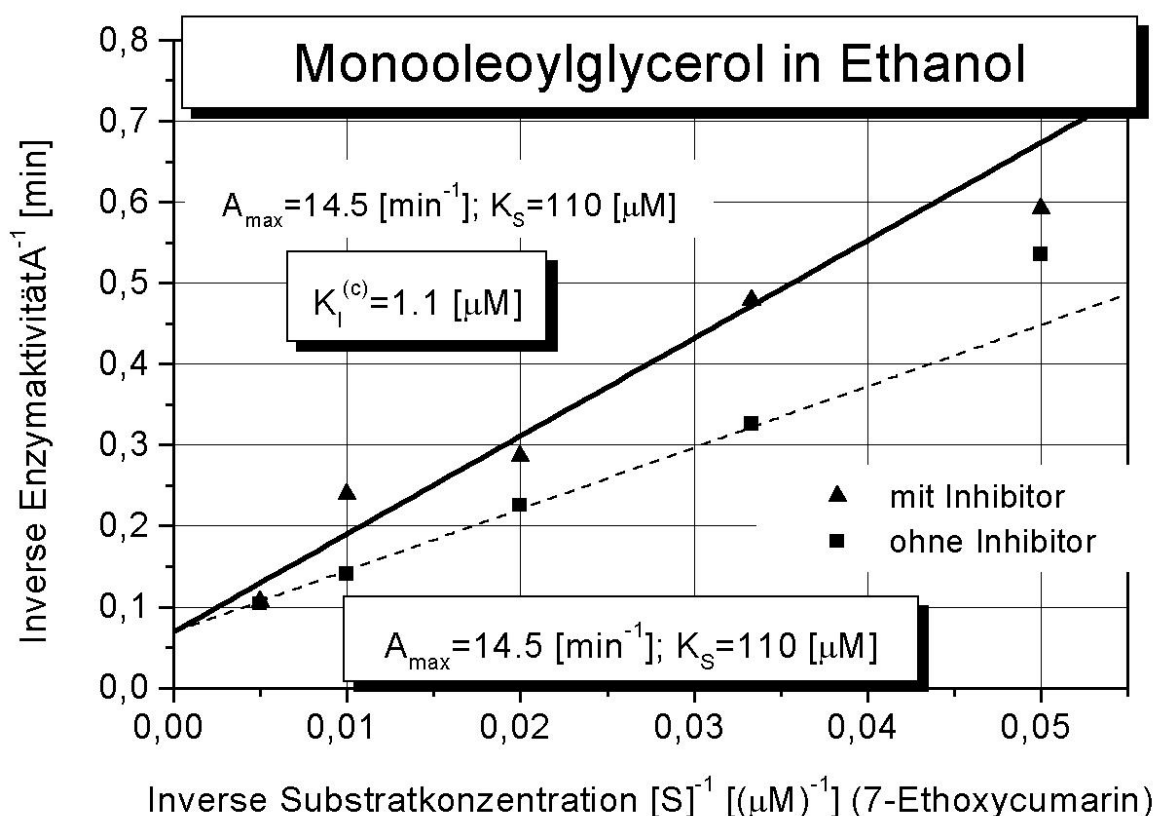


Abb 16: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch 1-Monooleoyl-rac-glycerol (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von $0,58 \mu\text{M}$ 1-Monooleoyl-rac-glycerol bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt (▲). Ferner ist die Aktivität ohne Hemmstoff eingezeichnet (■). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Umbelliferon min}^{-1} \text{ nmol 2B1}^{-1}$.

1-Monooleoyl-rac-glycerol (MO), Ölsäure (C_{18}) mit einer Glycerolkopfgruppe, (Strukturformel siehe Abb. 26) zeigt eine kompetitive Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität. Bei gleichbleibender $A_{\max}$ von $14,5 [\text{min}^{-1}]$ zeigt sich eine Verschiebung von K_S^0 .

Der aus der Geraden errechnete K_I Wert liegt bei $1,1 \mu\text{M} \pm 0,088$ ($A_{\max} = 14,5 [\text{min}^{-1}] \pm 1,5$; $K_m = 110 \pm 4,4$).

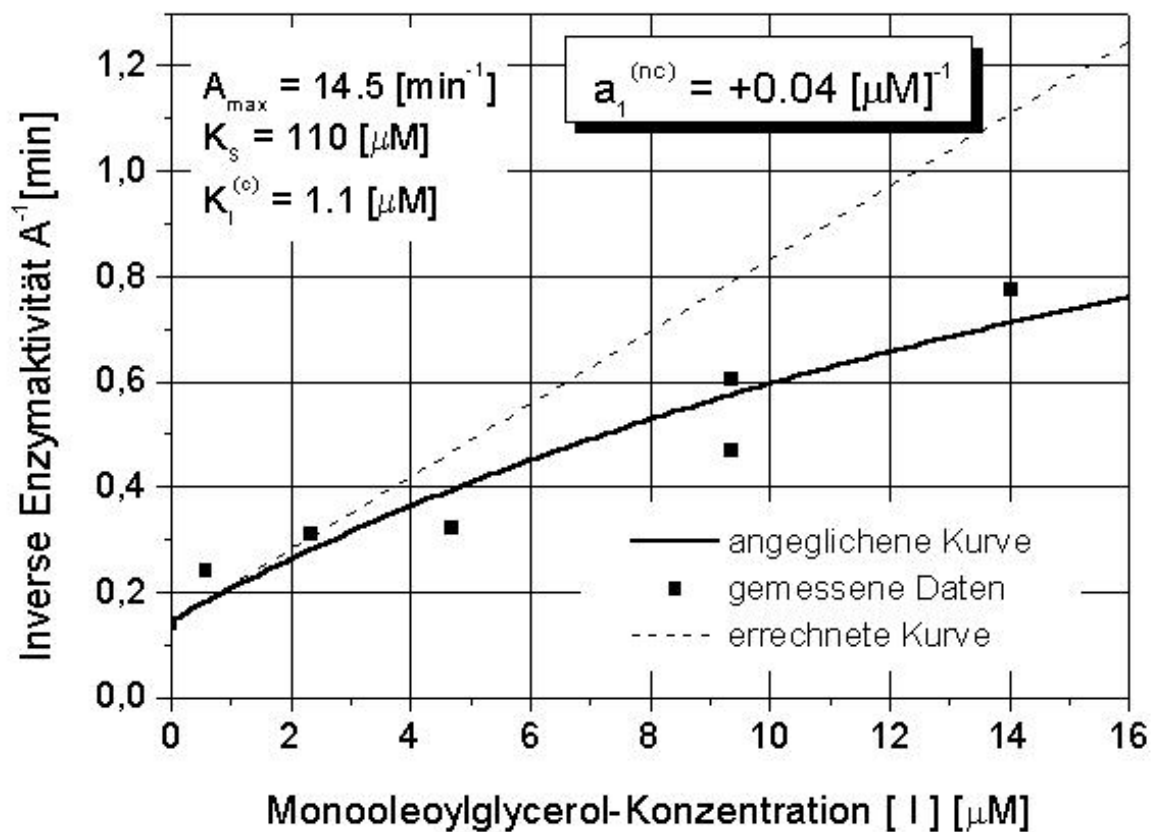


Abb. 17: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch 1-Monooleoyl-rac-glycerol (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bei konstanter Substratkonzentration von 100 bestimmt (■). Ferner ist die aus den vorher gewonnenen Daten mit Hilfe von Gleichung (10) errechnete Curve eingezeichnet (- -). Die an die experimentellen Daten angegliche Curve ist eingezeichnet. Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon $\text{min}^{-1} \text{ nmol} 2\text{B1}^{-1}$.

Bei höheren Konzentrationen an 1-Monooleoyl-rac-glycerol konnte eine nicht-kompetitive Hemmung beobachtet werden. Diese ist durch $\alpha = +0,04[\mu\text{M}]^{-1} \pm 0,0048$ charakterisiert.

3.10. L- α -Lysophosphatidsäure

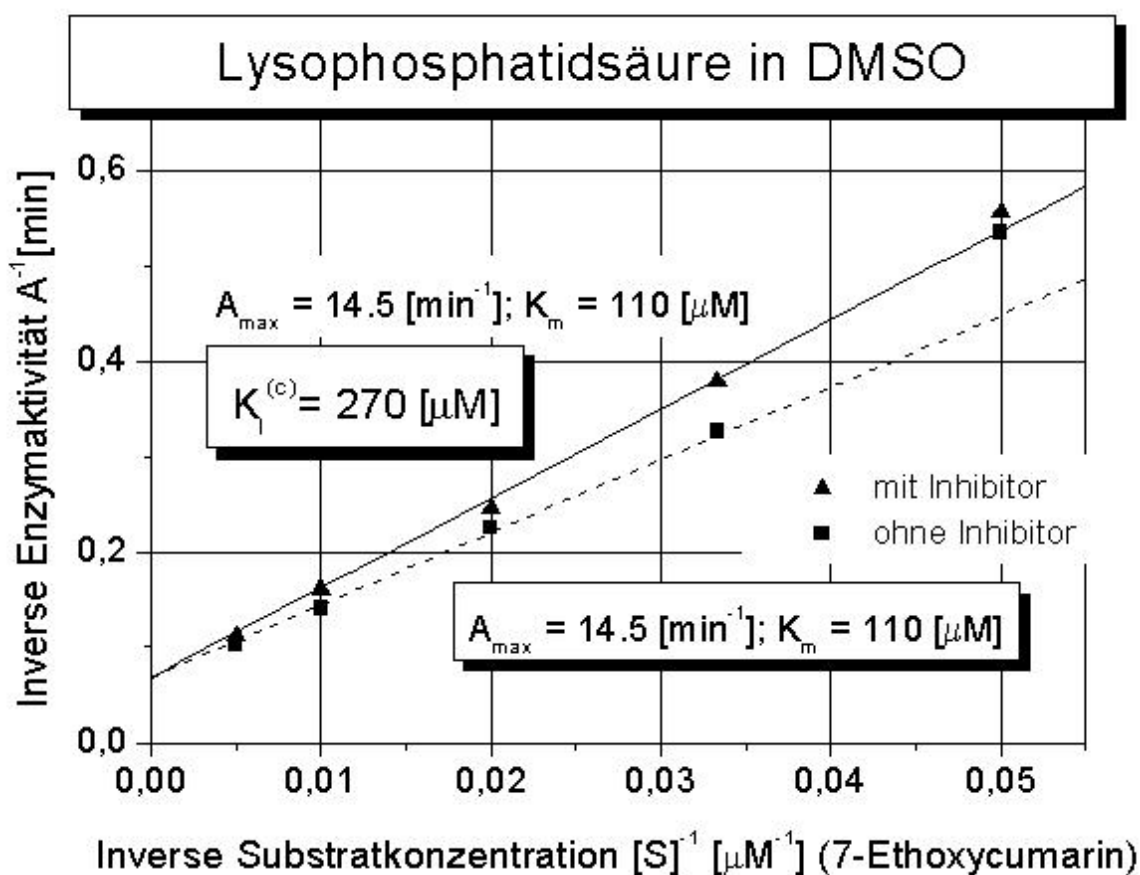


Abb 18: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch L- α -Lysophosphatidsäure (in DMSO gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von $63 \mu\text{M}$ L- α -Lysophosphatidsäure bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt (▲). Ferner ist die Aktivität ohne Hemmstoff eingezeichnet (■). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Umbelliferon min}^{-1} \text{ nmol} 2\text{B1}^{-1}$.

L- α -Lysophosphatidsäure, ein Phospholipid mit einer C_{18} -Seitenkette (eine Doppelbindung), (Strukturformel siehe Abb. 26) zeigt eine kompetitive Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität. Bei gleichbleibender $A_{\max}$ von $14,5 \text{ [min}^{-1}\text{]}$ zeigt sich eine Verschiebung von K_S^0 .

Der aus der Geraden errechnete K_I Wert liegt bei $270 \mu\text{M} \pm 21,6$ ($A_{\max} = 14,5 \text{ [min}^{-1}\text{]} \pm 1,5$; $K_m = 110 \pm 4,4$).

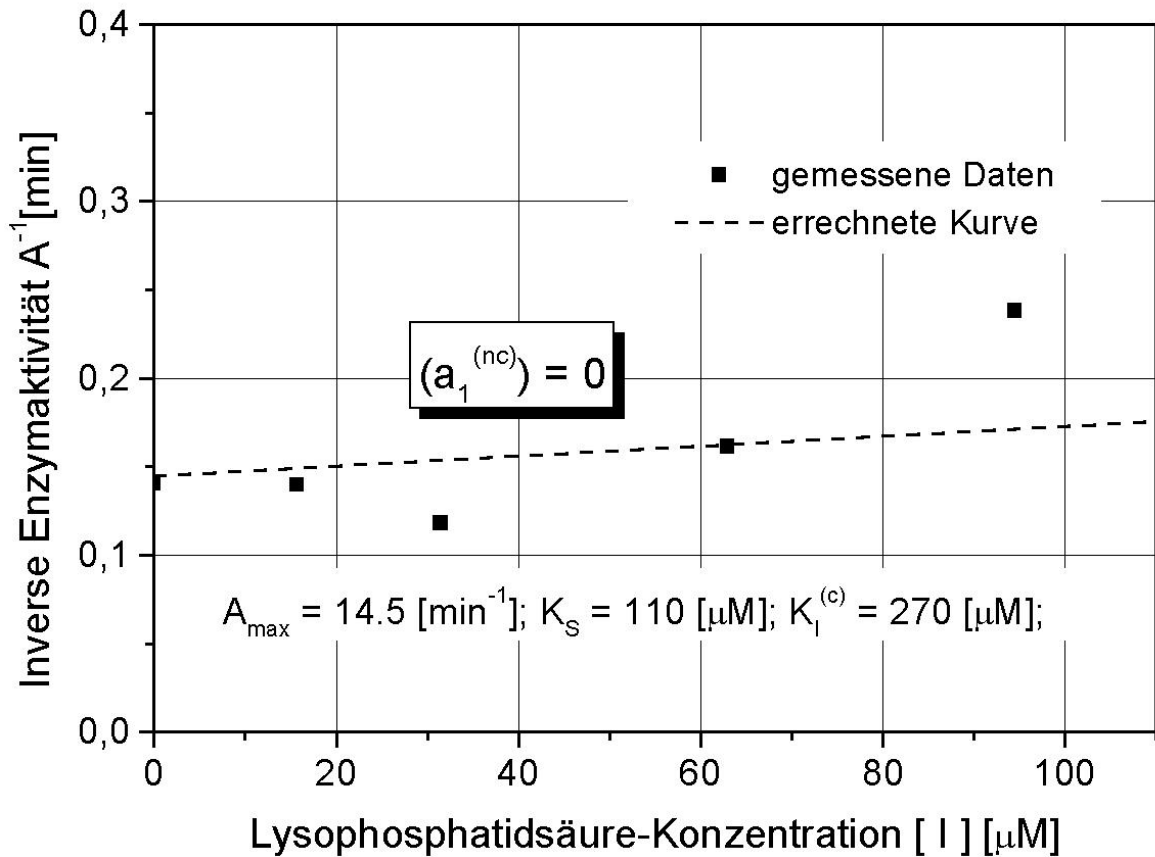


Abb. 19: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch L- α -Lysophosphatidsäure (in DMSO gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bei konstanter Substratkonzentration von 100 bestimmt (■). Ferner ist die aus den vorher gewonnenen Daten mit Hilfe von Gleichung (10) errechnete Kurve eingezeichnet (- -). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon $\text{min}^{-1} \text{nmol} 2\text{B1}^{-1}$.

Bei höheren Konzentrationen an L- α -Lysophosphatidsäure konnte keine nicht-kompetitive Hemmung beobachtet werden ($\alpha=0$).

3.11. L- α -Lysophosphatidylcholin

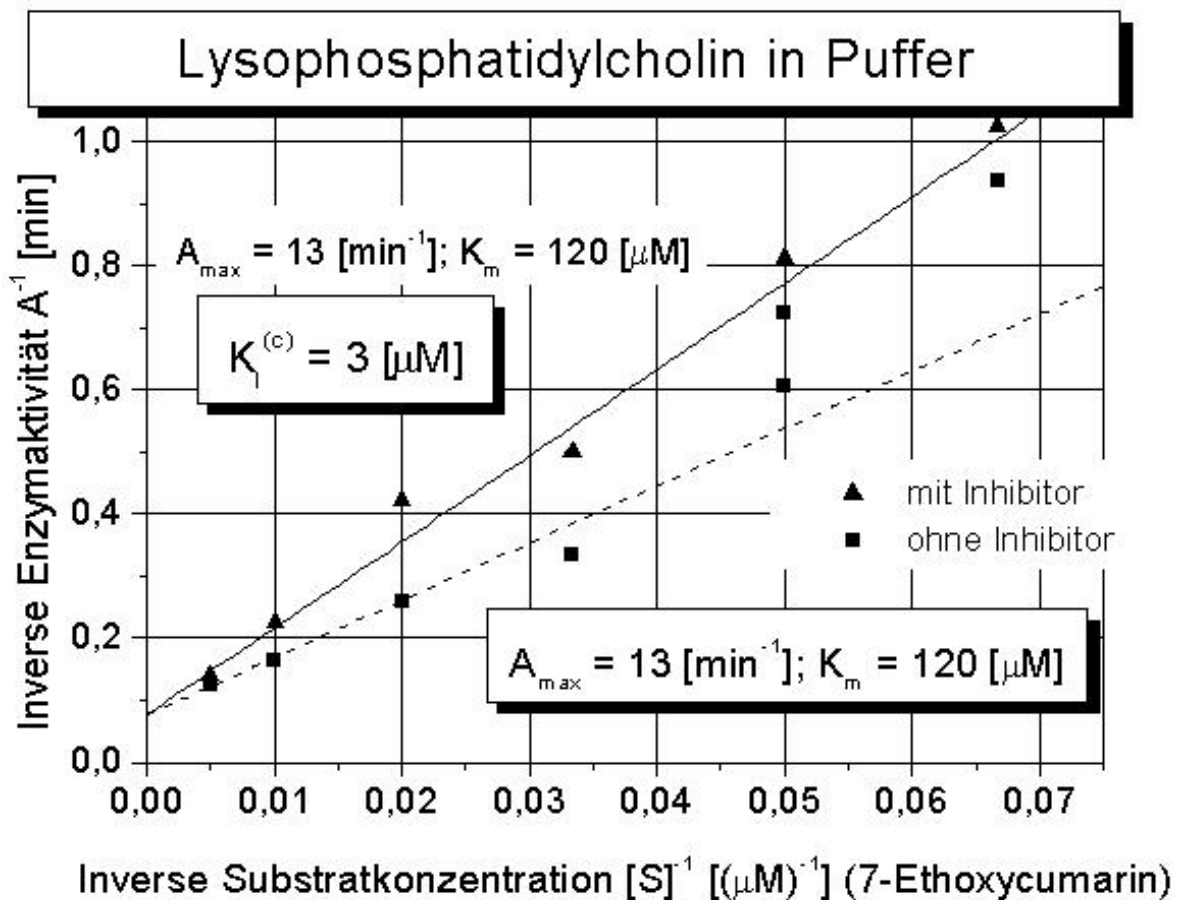


Abb 20: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch L- α -Lysophosphatidylcholin (in Puffer gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von 1,52 μM L- α -Lysophosphatidylcholin bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt ($\blacktriangle$). Ferner ist die Aktivität ohne Hemmstoff eingezeichnet ($\blacksquare$). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon $\text{min}^{-1} \text{nmol} 2\text{B1}^{-1}$.

L- α -Lysophosphatidylcholin, ein Phospholipid mit einer C_{18} -Seitenkette (eine Doppelbindung), (Strukturformel siehe Abb. 26) zeigt eine kompetitive Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität. Bei gleichbleibender A_{max} von $13[\text{min}^{-1}]$ zeigt sich eine Verschiebung von K_S^0 .

Der aus der Geraden errechnete K_I Wert liegt bei $3\mu\text{M} \pm 0,24$ ($A_{\text{max}}=13[\text{min}^{-1}] \pm 1,3$; $K_m=120 \pm 4,8$).

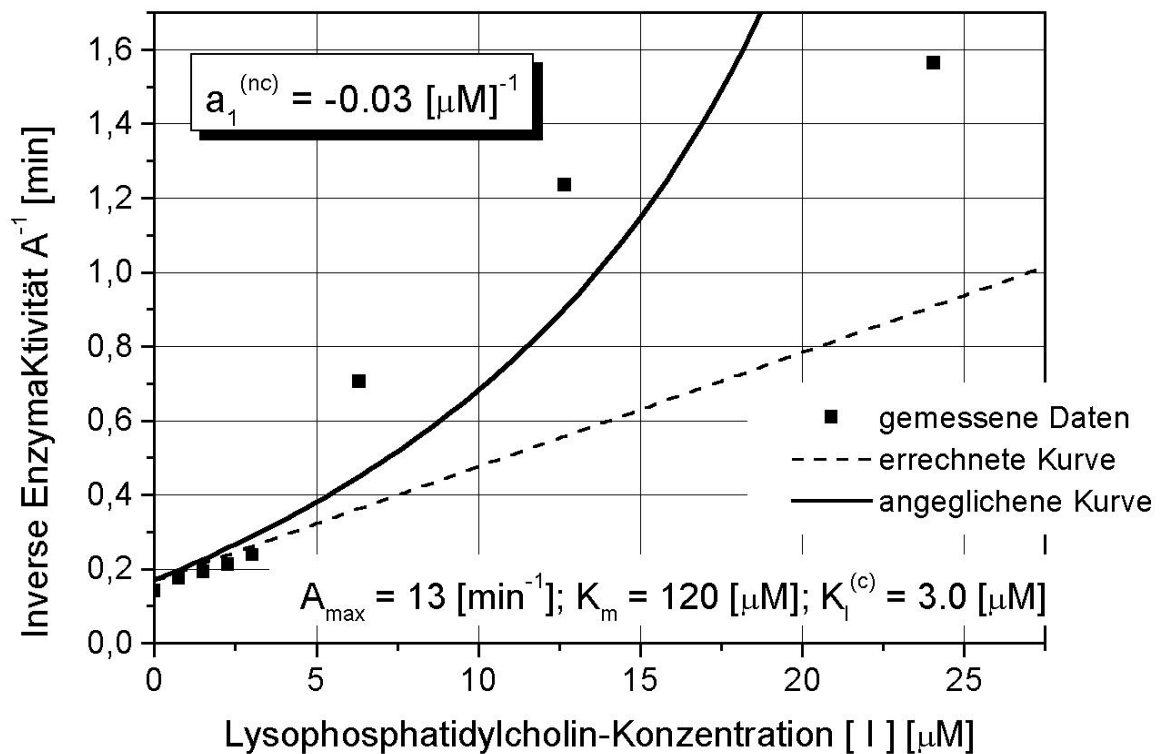


Abb. 21: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch L- α -Lysophosphatidylcholin (in Puffer gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bei konstanter Substratkonzentration von 100 bestimmt (■). Ferner ist die aus den vorher gewonnenen Daten mit Hilfe von Gleichung (10) errechnete Kurve eingezeichnet (- -). Die an die experimentellen Daten angegliche Kurve ist eingezeichnet. Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon $\text{min}^{-1} \text{nmol} 2\text{B1}^{-1}$.

Bei höheren Konzentrationen an L- α -Lysophosphatidylcholin konnte eine nicht-kompetitive Hemmung beobachtet werden. Diese ist durch $\alpha = -0,03 [\mu\text{M}]^{-1} \pm 0,0036$ charakterisiert.

3.12. L- α -Lysophosphatidylcholin im vesikulären System

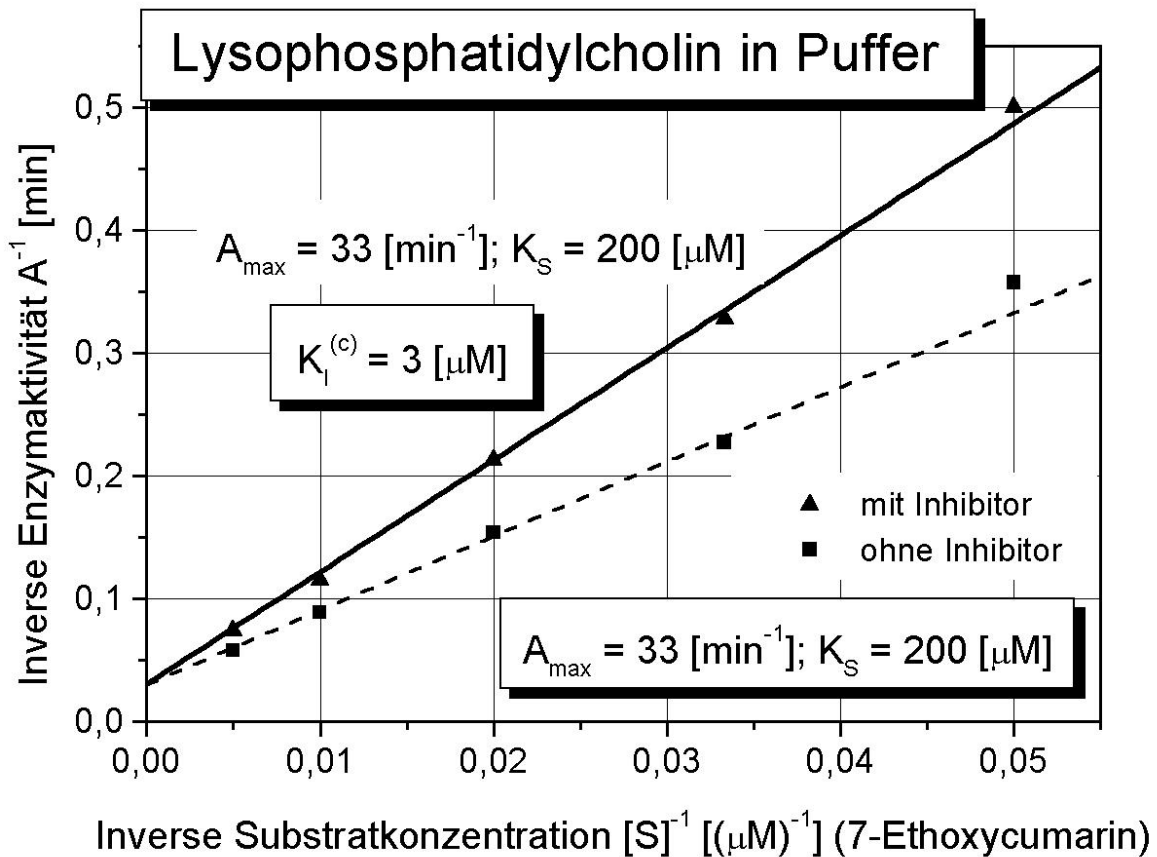


Abb 22: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch L- α -Lysophosphatidylcholin (in Puffer gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten, vesikulären CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von $1,97\mu\text{M}$ L- α -Lysophosphatidylcholin bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt ($\blacktriangle$). Ferner ist die Aktivität ohne Hemmstoff eingezeichnet ($\blacksquare$). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Umbelliferon min}^{-1} \text{ nmol}^{-1} \text{ CYP2B1}^{-1}$.

Auch in dem mit DLPC, d.h. vesikulär, rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System konnte eine kompetitive Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität beobachtet werden. Bei gleichbleibender $A_{\max}$ von $33[\text{min}^{-1}]$ zeigt sich eine Verschiebung von K_S^0 .

Der aus der Geraden errechnete K_I Wert liegt, ebenso wie bei dem System ohne Lipide, bei $3\mu\text{M} \pm 0,24$ ($A_{\max}=33[\text{min}^{-1}] \pm 3,3$; $K_m=200 \pm 8,8$).

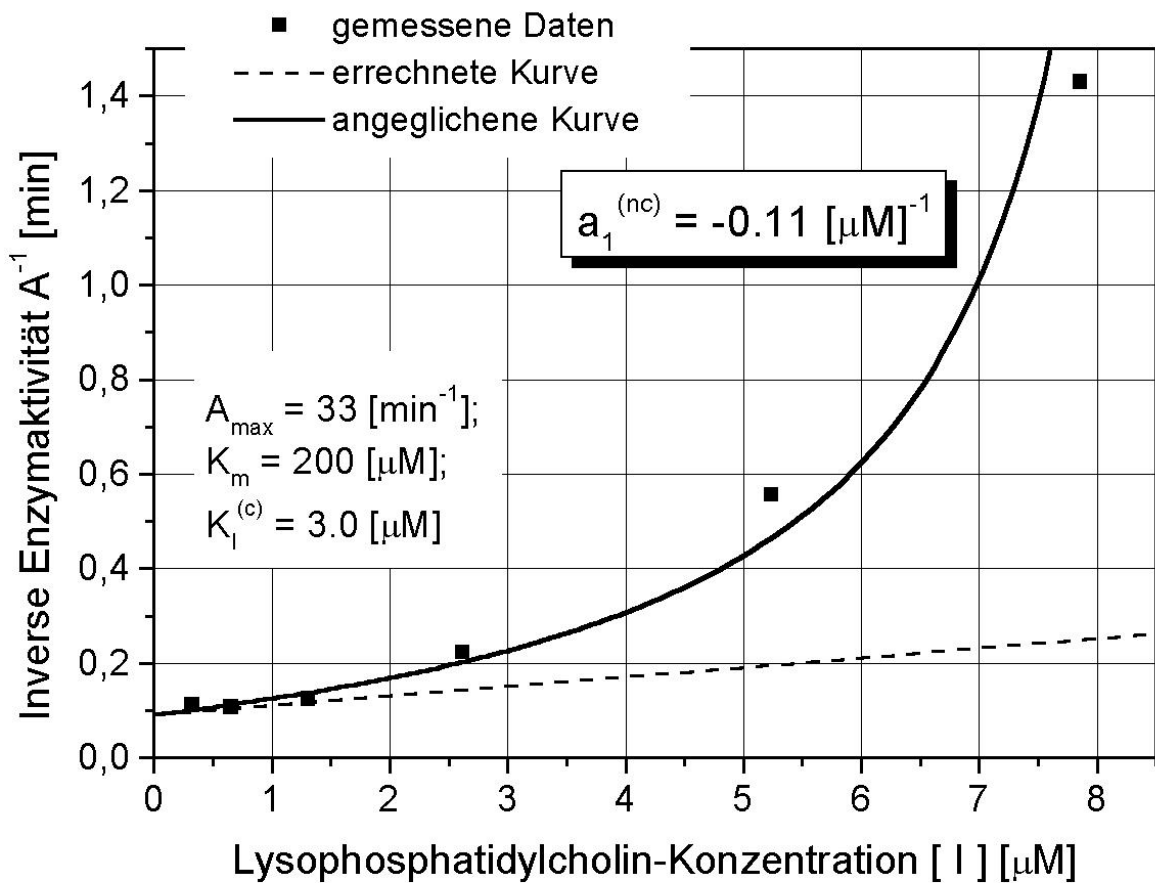


Abb. 23: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch L- α -Lysophosphatidylcholin (in Puffer gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten, vesikulären CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bei konstanter Substratkonzentration von 100 bestimmt (■). Ferner ist die aus den vorher gewonnenen Daten mit Hilfe von Gleichung (10) errechnete Kurve eingezeichnet (- -). Die an die experimentellen Daten angegliche Kurve ist eingezeichnet. Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon $\text{min}^{-1} \text{nmol} 2\text{B1}^{-1}$.

Bei höheren Konzentrationen an L- α -Lysophosphatidylcholin konnte eine nicht-kompetitive Hemmung beobachtet werden. Diese ist durch $\alpha = -0,11[\mu\text{M}]^{-1} \pm 0,0132$ charakterisiert.

3.13. Arachidonsäure

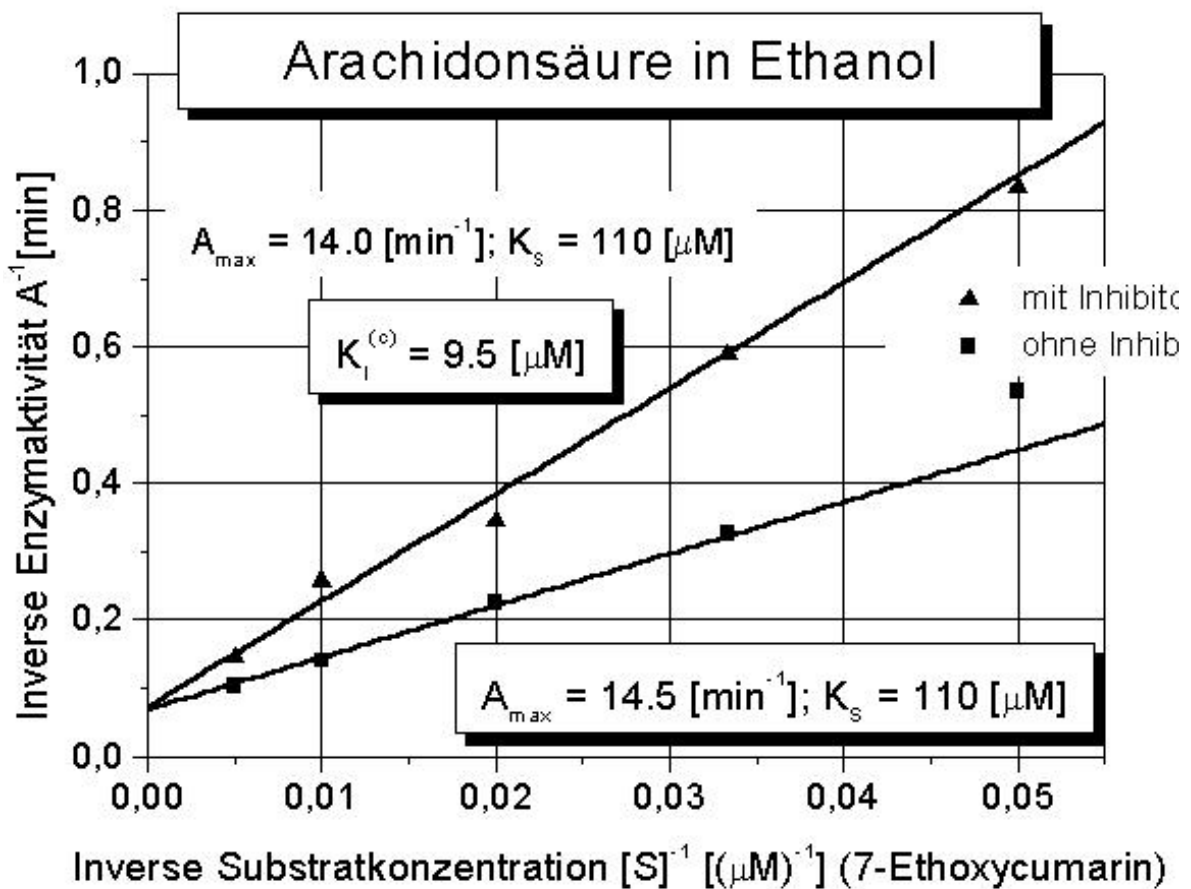


Abb 24: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch Arachidonsäure (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von $9,3 \mu\text{M}$ Arachidonsäure bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt (▲). Ferner ist die Aktivität ohne Hemmstoff eingezeichnet (■). Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: $\text{nmol gebildetes Umbelliferon min}^{-1} \text{ nmol}^{-1} \text{ CYP2B1}^{-1}$.

Arachidonsäure, C_{20} Fettsäure mit 4 Doppelbindungen, zeigt eine kompetitive Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität. Bei gleichbleibender $A_{\max}$ von $14,5 [\text{min}^{-1}]$ zeigt sich eine Verschiebung von K_s^0 .

Der aus der Geraden errechnete K_i Wert liegt bei $9,5 \mu\text{M} \pm 0,76$ ($A_{\max} = 14,5 [\text{min}^{-1}] \pm 1,5$; $K_m = 110 \pm 4,4$).

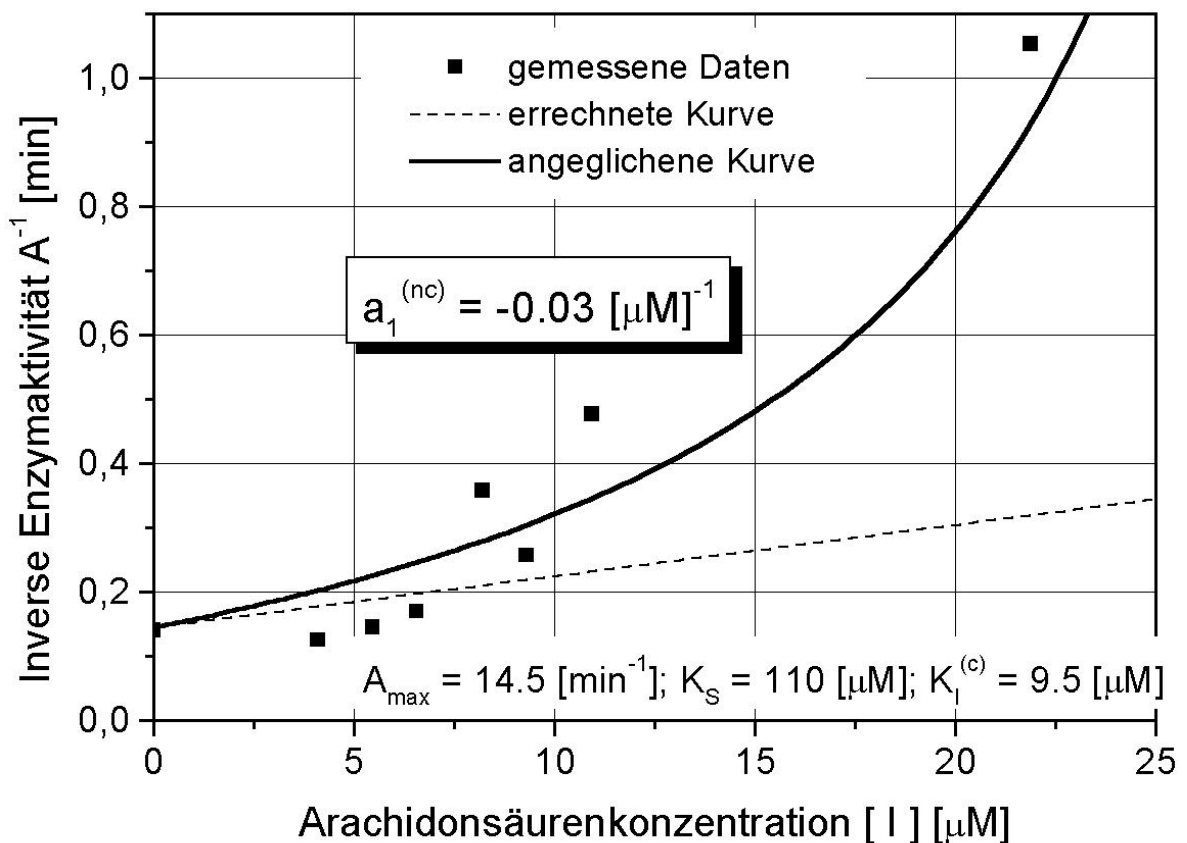


Abb. 25: Hemmung der 7-Ethoxycumarin-O-Deethylase-Aktivität durch Arachidonsäure (in Ethanol gelöst).

Die Deethylierung von 7-Ethoxycumarin zu Umbelliferon wurde im rekonstituierten CYP2B1:NADPH-Cytochrom P450-Reduktase-System unter Zugabe von verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bei konstanter Substratkonzentration von 100 bestimmt (■). Ferner ist die aus den vorher gewonnenen Daten mit Hilfe von Gleichung (10) errechnete Kurve eingezeichnet (- -). Die an die experimentellen Daten angegliche Kurve ist eingezeichnet. Es wurde jeweils nur eine Messung durchgeführt.

Die Enzymaktivität ist gegeben durch: nmol gebildetes Umbelliferon min⁻¹ nmol2B1⁻¹.

Bei höheren Konzentrationen an Arachidonsäure konnte eine nicht-kompetitive Hemmung beobachtet werden. Diese ist durch $\alpha = -0,03[\mu\text{M}]^{-1} \pm 0,0036$ charakterisiert.

Strukturformeln:

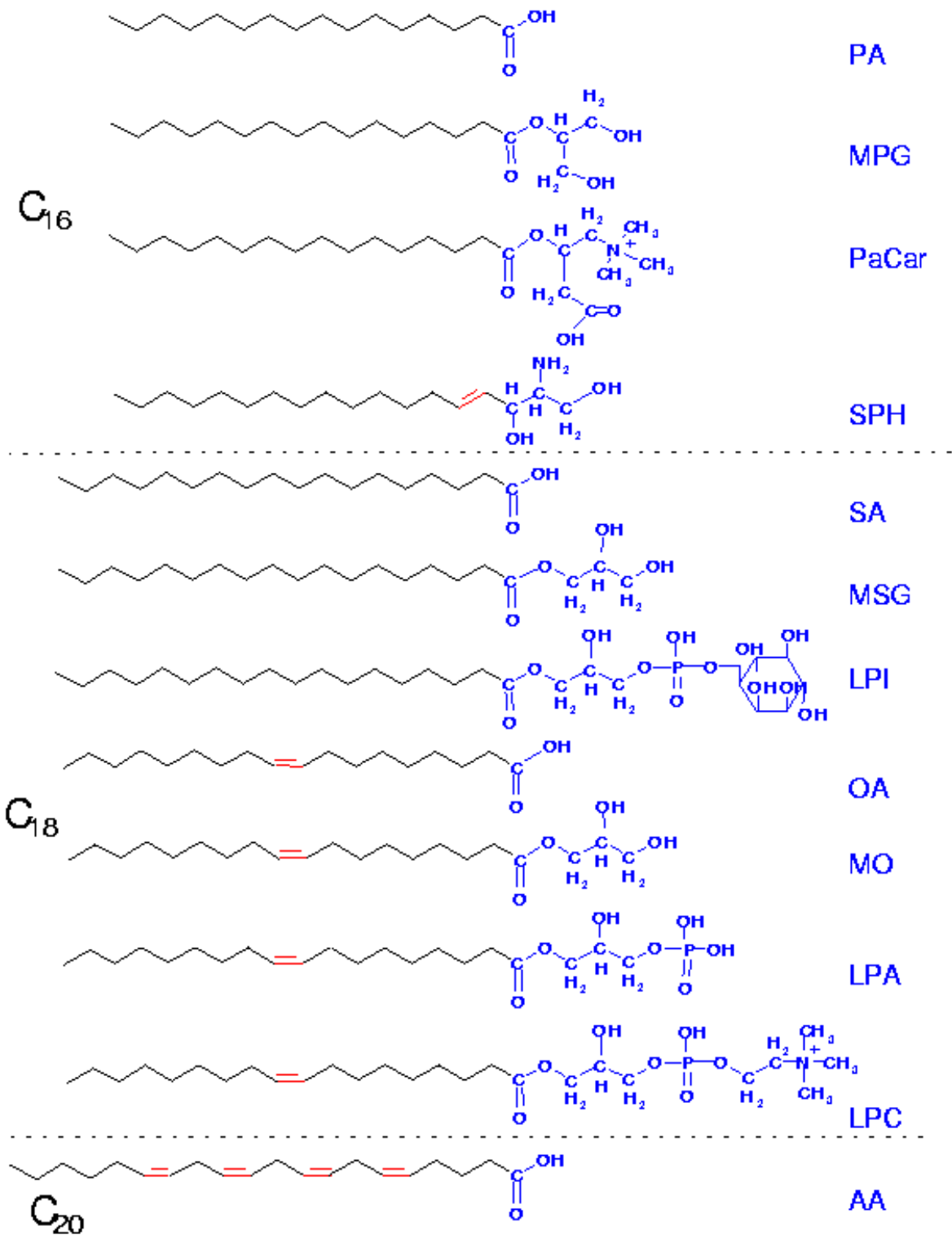


Abb. 26: Strukturformeln der verwendeten Lipide

Tab. 1: Zusammenfassung der Ergebnisse:

Einkettige Fettsäure	$A_{Max} [min]^{-1}$	$K_S [\mu M]$	$K_I^{(c)} [\mu M]$	$a_I^{(nc)} [\mu M]^{-1}$
Laurinsäure (LA)	10±1*	110±4,4	75±6	0
Myristinsäure (MA)	10±1*	110±4,4	75±6	0
2-Monopalmitoylglycerol (MPG)	14,5±1,5	110±4,4	3,5±0,28	-0,03±0,0036
Palmitoyl-L-Carnitin (PaCa)	14,5±1,5	110±4,4	9±0,72	-0,02±0,0024
D-Sphingosin (Sph)	14,5±1,5	110±4,4	0,3±0,024	0
Stearinsäure (SA)	14,5±1,5	110±4,4	>100	0
1-Monostearoyl-rac-glycerol (MSG)	14,5±1,5	110±4,4	15,5±1,24	- 0,023±0,0028
L- α -Lysophosphatidylinositol (LPI)	14,5±1,5	110±4,4	1,5±0,12	-
Ölsäure (OA)	14,5±1,5	110±4,4	1,5±0,12	0
1-Monooleoyl-rac-glycerol (MO)	14,5±1,5	110±4,4	1,1±0,088	+0,04±0,0048
L- α -Lysophosphatidsäure (LPA) in DMSO	14,5±1,5	110±4,4	(270)	0
L- α -Lysophosphatidylcholin (LPC) in Puffer	13±1,3	120±4,8	3,0±0,24	-0,03±0,0036
L- α -Lysophosphatidylcholin (LPC) in DLPC-Vesikeln**	33±3,3	200±8,8	3,0±0,24	-0,11±0,0132
Arachidonsäure (AA)	14,5±1,5	110±4,4	9,5±0,76	-0,03±0,0036

* hier wurde CYP2B1 mit einer niedrigeren Umsatzrate benutzt

** L- α -dilauryl-sn-glycero-3-phosphocholin (DLPC)

A_{Max} : Maximale Aktivität; K_S : Michaelis-Menten-Konstante; $K_I^{(c)}$: Dissoziationskonstante der Fettsäure; $a_I^{(nc)}$: nicht-kompetitiver Effekt (ist $a_I^{(nc)}$ positiv, wird die Enzymaktivität erhöht, ist $a_I^{(nc)}$ negativ wird die Enzymaktivität gehemmt)

4. Diskussion

Zweikettige Lipide werden hauptsächlich als Bauelemente für den Aufbau stabiler Biomembranen benutzt und weniger als Substrate für Enzyme. Es gibt Ausnahmen (s.u.): Zu nennen wäre die Wirkung membrangebundener Phospholipasen die die Produktion von einkettigen Lipiden aus zweikettigen Phospholipiden katalysieren. Im Gegensatz dazu werden einkettige Lipide vor allem zur Signaltransduktion und als Energiequellen benutzt und weniger, um daraus Bilayerstrukturen aufzubauen. Die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen sind, im Gegensatz zu vielen bekannten Inhibitoren von CYP2B1, keine Xenobiotika; sie kommen im physiologischen Intermediärstoffwechsel vor. Sie könnten also im Sinne einer Rückkoppelung bzw. Regulation wirksam werden.

Die Wasserlöslichkeit von einkettigen und zweikettigen Lipiden ist zwar generell sehr niedrig, unterscheidet sich aber dennoch: Einkettige Lipide haben höhere CMC (Critical Micellar Concentration)-Werte [14, 19, 36] und können deshalb als Signaltransduktionsmoleküle im Zytosol der Zelle eingesetzt werden. Im Gegensatz dazu sind zweikettige Lipide mit ihrer geringeren Wasserlöslichkeit dazu geeignet, stabile Bilayermembranen zu formen.

Zweikettige Lipide führen, wie schon weiter oben ausgeführt, zu einer Erhöhung der spezifischen Aktivität von CYP2B1 indem sie den K_D -Wert des CYP2B1:Reduktaase-Komplexes erniedrigen. Bei mit Phenobarbital behandelten Mäusen wird vor allem CYP2B1 induziert [11]. Viner et al. [1987] zeigten, dass bei diesen Tieren die 7-Ethoxycumarin-O-Deethylaseaktivität durch Phospholipase A_2 -Produkte gehemmt wird. In ihrer Arbeit unterschieden sie zwischen Fettsäuren (z.B. Ölsäure) und Lysolecithinen. Sie verwendeten, im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit, Lebermikrosomen von mit Phenobarbital induzierten und nicht induzierten Ratten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass einkettige Lipide, im Gegensatz zu zweikettigen Lipiden, nicht zu einer Erhöhung der Aktivität, sondern im Gegenteil zu einer Minderung derselben führen.

Phospholipase A_2 setzt aus Phospholipiden wie z.B. Lecithin, Lysophospholipide und freie Fettsäuren frei; dabei katalysiert sie die Hydrolyse von Esterbindungen am C_2 -Atom des Glycerins. Solche Lysophospholipide wurden in dieser Arbeit verwendet (siehe Abbildung 26). Die von Viner et al. [1987] beobachtete Wirkung kann unter anderem auf eine Veränderung der Membranstruktur durch Phospholipase A_2 zurückgeführt werden. In der hier vorliegenden Arbeit kann jedoch der Einfluss auf Membranen ausgeschlossen werden, da das hier verwendete System ohne Membranen arbeitet.

Zannikos et al [1993] zeigten, dass die Aktivität von CYP2B1 bei übergewichtigen Ratten im Vergleich zu normalgewichtigen Tieren vermindert ist, nicht jedoch seine Induktion. Sie vermuteten, dass dies mit einer Veränderung der Lipidzusammensetzung des endoplasmatischen Retikulums zusammenhängen könnte.

In dem in dieser Arbeit verwendeten rekonstituierten System wurde der Einfluss von einkettigen Lipiden auf die Aktivität von CYP2B1 untersucht. Damit der direkte Einfluss der Substanzen auf das CYP2B1:Cytochrom P450-Reduktase System besser untersucht werden kann, wurde kein vesikuläres System verwendet. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind also nicht auf eine Wechselwirkung zwischen zweikettigen Phospholipiden und den eingesetzten Substanzen zurückzuführen.

Einkettige Lipide können sich in biologische Membranen einlagern und so deren Fluidität und physikalische Eigenschaften verändern [13, 6], was zwei Auswirkungen haben kann:

- a) Auswirkungen auf die Aktivität der einzelnen Enzyme (In diesem Fall würde der Einfluss, da zwei Enzyme vorliegen, sich besonders stark auswirken).
- b) Auswirkungen auf die Komplexbildung (Da CYP2B1 nur im Komplex mit NADPH-Cytochrom P450-Reduktase aktiv ist und dieser Komplex in die Membran eingelagert ist).

4.1. Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen kompetitiver und nicht-kompetitiver Hemmung

Die meisten hier verwendeten einkettigen Lipide zeigen, wenn eine kompetitive Inhibition vorliegt, eine stärkere Affinität zum aktiven Zentrum als das Substrat 7-Ethoxycumarin: der gemessene Dissoziationskoeffizient des Substrates, K_S , ist größer als der gemessene Dissoziationskoeffizient der einkettigen Lipide, $K_I^{(c)}$. Eine Ausnahme ist Stearinsäure, die bei den in diesem System erreichten Konzentrationen keine Hemmung zeigte. (Eine Hemmung wird wahrscheinlich erst ab einer Konzentration von $K_I^{(c)} > 100 \mu\text{M}$ erreicht). Eine andere Ausnahme ist Lysophosphatidsäure, die auf Grund ihres Lösungsverhaltens in Dimethylsulfoxid gelöst werden musste. Der große Wert von $K_I^{(c)}$ könnte auf das Lösungsmittel, das sehr stark detergent ist und somit das Substrat im Puffer gelöst hält, zurückzuführen sein.

Anzumerken ist zudem, dass die Dissoziationskonstante des Substrates in Abwesenheit von Inhibitoren gemessen wurde und so nicht erhoben werden konnte, ob die Hemmstoffe einen Einfluss auf K_S haben.

Einige einkettige Lipide zeigten nur eine kompetitive Hemmung und keine nicht-kompetitive. Andere wiederum, wie Monopalmitoylglycerol, Palmitoylcarnitin, Monostearoylglycerol, Lysophosphatidylcholin und Arachidonsäure zeigten neben der kompetitiven auch eine nicht-kompetitive Hemmung. Der Konzentrationsbereich, in dem kompetitive Hemmung auftrat und der Konzentrationsbereich der nicht-kompetitiven Hemmung liegen weit auseinander. Die kompetitive Hemmung ist bei niedrigen Konzentrationen zu beobachten (charakterisiert durch $K_I^{(c)}$, $c \approx 1-10 \mu\text{M}$), die nicht-kompetitive Hemmung dagegen bei hohen Konzentrationen (charakterisiert durch den Kehrwert von a_1 , $c \approx 40 \mu\text{M}$).

Die nicht-kompetitive Hemmung könnte dadurch erklärt werden, dass einkettige Lipide, wie bereits Viner et al [1987] vermuteten, die Komplexbildung des binären Proteinkomplexes beeinflussen.

4.2. Charakteristika der Lipide, die das Hemmverhalten beeinflussen

Die in dieser Arbeit verwendeten Lipide unterscheiden sich in verschiedenen Punkten, die sich wiederum auf das Hemmverhalten auswirken.

4.2.1. Die Lipide unterscheiden sich in ihrer Länge

Bei den Lipiden Laurinsäure, Myristinsäure und Stearinsäure lässt sich eine deutliche Zunahme des $K_I^{(c)}$ -Wertes beobachten: er steigt mit Zunahme der Kettenlänge dieser gesättigten Fettsäuren an. ($K_I^{(c)}$ 75->100 μM)

Laurinsäure ist ein bekanntes Substrat von CYP2B1 [37]. Ob Myristinsäure, bzw. Stearinsäure auch durch CYP2B1 umgesetzt werden, ist bisher noch nicht geklärt.

Einkettige Fettsäuren und eine Kornöldiät verstärken die Expression von CYP2B1 [44], was als Ausgleich für die hemmende Wirkung dieser Stoffe angesehen werden kann. Durch die verstärkte Expression von CYP2B1 kann die Gesamtaktivität des Enzyms selbst bei vorliegender Hemmung durch die Lipide konstant gehalten werden. Einkettige, gesättigte Fettsäuren hemmen nicht nur CYP2B1, sondern auch andere Enzyme, wie z.B. die Carbonylreduktase des Herzens [15]. Imamura et al. stellten auch fest, dass die Stärke der Hemmung dieses Enzyms von der Kettenlänge abhängt. Sie nimmt zuerst mit steigender Kettenlänge zu bis hin zu Myristinsäure, eine weitere Verlängerung bedingt jedoch eine Abnahme der Hemmstärke. Diese Ergebnisse decken sich mit den hier vorgestellten.

4.2.2. Die Lipide unterscheiden sich in ihrem Sättigungsgrad

Ölsäure (OA), eine einfach ungesättigte C₁₈-Fettsäure hat im Gegensatz zur gesättigten C₁₈- Fettsäure Stearinsäure (SA) einen viel niedrigeren $K_I^{(c)}$ Wert: Ölsäure: 1,5µM; Stearinsäure: >100µM. Doppelbindungen scheinen also die Hemmstärke positiv zu beeinflussen. Auch bei der Arachidonsäure, einer mehrfach ungesättigten, 20 C-Atome umfassenden Fettsäure mit einem $K_I^{(c)}$ Wert von 9,5µM bestätigt sich diese Annahme, da bei einer C₂₀-Fettsäure noch größere $K_I^{(c)}$ Werte zu erwarten wären als bei der C₁₈-Fettsäure, Stearinsäure.

Arachidonsäure ist ein bekanntes Substrat von CYP2B1 [32] und von anderen CYP-Isoenzymen. Die Reaktionsprodukte spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion [4].

Von Ölsäure ist nur bekannt, dass sie im Zusammenhang mit Medikamentenbeimischungen intestinales CYP3A inhibieren kann [24]. In jener Arbeit wurden allerdings hemmende Effekte (IC₅₀) erst bei viel höheren Konzentrationen (2mM) festgestellt. Da in der zitierten Arbeit der Hemmtyp nicht untersucht wurde, kann diesbezüglich kein Vergleich angestellt werden. Betont sei jedoch, dass die in dieser Arbeit festgestellten Hemmkonzentrationen im mikromolaren Bereich liegen.

4.2.3. Die Lipide unterscheiden sich in ihren Ladungen

Beim Vergleich der $K_I^{(c)}$ Werte von Lysophosphatidylinositol und Lysophosphatidylcholin, zwei annähernd gleich langen Lipiden (Lysophosphatidylinositol: 31 Bindungslängen, Lysophosphatidylcholin: 30 Bindungslängen) mit den $K_I^{(c)}$ Werten von 1,5µM und 3,0µM, fällt auf, dass die Ladungen der Kopfgruppen (Lysophosphatidylinositol: negativ; Lysophosphatidylcholin: positiv und negativ) keinen großen Einfluss auf die Inhibitorstärke ausüben. Der Einfluss der Lipidseitenkette ist viel stärker: Palmitoylcarnitin und Lysophosphatidylcholin, unterscheiden sich nicht in ihrer Ladung (beides sind Zwitterionen), wohl aber in ihren Lipidseitenketten (C₁₆ bzw. C₁₈). Der Unterschied der $K_I^{(c)}$ Werte (9,0µM bzw. 3µM) ist hier viel größer.

4.2.4. Die Lipide unterscheiden sich in ihren Kopfgruppen

Bei den C₁₆ Lipiden gilt: je größer die hydrophile Kopfgruppe, desto größer $K_I^{(c)}$: Sphingosin: $K_I^{(c)} = 0,3µM$, Monopalmitoylglycerol: $K_I^{(c)} = 3,5µM$, Palmitoylcarnitin: $K_I^{(c)} = 9µM$

Eine weitere, bekannte Funktion der Sphingolipide ist die Beteiligung an der Regulation der CYP Expression, [20] zwar nicht an der Regulation von CYP2B1 aber an der anderer Isoformen. Hier kann wieder ein Wechselspiel zwischen der von mir beobachteten Inhibition und der Beteiligung an der Regulation angenommen werden. Es ist zu vermuten, dass Sphingosin auch andere Isoformen von CYP hemmt, was aber in zukünftigen Experimenten noch nachzuweisen ist.

Palmitoylcarnitin beeinflusst die Aktivität eines weiteren membrangebundenen Enzymsystems: die sarkolemmale $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ [33], die durch Palmitoylcarnitin gehemmt wird. Die Autoren jenes Artikels gehen davon aus, dass sich Palmitoylcarnitin und Lysophosphatidylcholin in die Membran einlagern und dadurch ihre hemmende Wirkung entfalten. Ihrer Ansicht nach liegt die Hemmung einzig an der Störung der Membranstruktur. In der hier vorliegenden Arbeit kann von einem solchen Hemmmechanismus nicht ausgegangen werden.

Auch bei gesättigten C_{18} -Lipiden kann eine Korrelation zwischen der Größe der hydrophilen Kopfgruppe und des $K_I^{(c)}$ beobachtet werden: Stearinsäure: $K_I^{(c)} > 100 \mu\text{M}$; Monostearylglycerol: $K_I^{(c)} = 15,5 \mu\text{M}$; Lysophosphatidylinositol: $K_I^{(c)} = 1,5 \mu\text{M}$. Bei diesen Lipiden gilt jedoch der umgekehrte Zusammenhang: je größer die Kopfgruppe, desto kleiner $K_I^{(c)}$.

Bei den ungesättigten C_{18} -Lipiden besteht kein erkennbarer Zusammenhang mehr: Ölsäure: $K_I^{(c)} = 1,5 \mu\text{M}$; Monooleylglycerol: $K_I^{(c)} = 1,1 \mu\text{M}$; Lysophosphatsäure: $K_I^{(c)} = 270 \mu\text{M}$; Lysophosphatidylcholin: $K_I^{(c)} = 3 \mu\text{M}$

Bei LPA ist wieder darauf hinzuweisen, dass diese Hemmsubstanz in Dimethylsulfoxid gelöst wurde und der hohe $K_I^{(c)}$ Wert auf das Lösungsmittel zurückgeführt werden könnte. Für Lysophosphatidylcholin gilt diese Erklärung jedoch nicht, da diese Substanz ohne Schwierigkeiten in Puffer gelöst werden kann. Im Zusammenhang mit den Lysophospholipiden sei noch erwähnt, dass neben den Unterschieden im Hemmverhalten auch noch Unterschiede in der Löslichkeit vorliegen. Lysophosphatidylcholin ließ sich in Puffer, Lysophosphatidylinositol in Ethanol, Lysophosphatsäure nur mehr in Dimethylsulfoxid und Lysophosphatidylethanolamin überhaupt nicht mehr in den benötigten Konzentrationen lösen. Jedoch besteht kein direkter Zusammenhang zwischen Löslichkeit und Hemmverhalten.

Es ist bekannt, dass Lysophosphatidylcholin noch an einer Vielzahl anderer Hemmungen beteiligt ist. So hemmt Lysophosphatidylcholin ein weiteres membrangebundenes Enzymsystem: die sarkolemmale Na^+/K^+ -ATPase [33].

Auch die anderen verwendeten Lysophospholipide hemmen nicht nur CYP2B1 sondern auch die schon erwähnte Na^+/K^+ -ATPase [31].

Betrachtet man die einkettigen Lipide mit derselben Kopfgruppe, aber mit verschiedenen Resten, so erkennt man dasselbe Hemmmuster wie bei den Fettsäuren ohne große hydrophile Kopfgruppe: Monopalmitoylglycerol: $K_I^{(c)} = 9 \mu\text{M}$; Monostearoylglycerol: $K_I^{(c)} = 15,5 \mu\text{M}$; Monooleoylglycerol: $1,1 \mu\text{M}$. Mit steigender Kettenlänge nimmt $K_I^{(c)}$ zu. Je mehr Doppelbindungen ein Lipid enthält, desto niedriger $K_I^{(c)}$.

Außer den Lysophospholipiden hemmen auch die einkettigen, durch Triacylglycerinlipase gebildeten Lipide membrangebundene Enzymsysteme: so die Adenylat-Cyclase im Mäusecerebellum [29]. Daraus wird ersichtlich, dass die verwendeten Lipide an verschiedenen anderen Regulationsmechanismen beteiligt sein können.

4.3. Nicht-kompetitive Hemmung

Die nicht-kompetitive Hemmung konnte nur deshalb von der kompetitiven Hemmung unterschieden werden, weil die Konzentrationsbereiche, in denen die verschiedenen Hemmtypen festgestellt wurden, weit auseinander lagen.

Die nicht-kompetitive Hemmung der hier betrachteten enzymatischen Reaktion kann auf folgende Punkte zurückzuführen sein:

- a) die Zykluszeit wird durch den Inhibitor verändert
- b) die Komplexbildung von CYP2B1 mit NADPH-Cytochrom P450-Reduktase hängt vom Inhibitor ab
- c) die Bindung des Substrates S an das Enzym wird durch den zugefügten Hemmstoff (Lipid) beeinflusst.

Ad a) Wenn die Zykluszeit des arbeitenden Enzymkomplexes verändert werden würde, so würde a_{Rate} erniedrigt. Dadurch würde auch $a_1^{(nc)}$ verringert. Bindet das Lipid nahe der Membranbindungsdomäne an den Komplex, würde dadurch a_{Komplex} und damit $a_1^{(nc)}$ verändert werden. Um die Frage nach dem Ursprung der Hemmung endgültig zu klären, wären weitere Experimente ähnlich denen von Müller-Enoch et al. [1984] nötig: Bei

konstanter Hemmstoffkonzentration müsste die Reduktasekonzentration variiert werden, so dass die Auswirkung auf die Zykluszeit bestimmt werden könnte.

Ad b) Mit den hier durchgeführten Experimenten lässt sich die Frage, worauf die hemmende Wirkung zurückzuführen ist, nicht zufriedenstellend beantworten. Lediglich im Falle von Monooleoylglycerol kann angenommen werden, dass Monooleoylglycerol wohl in der Nähe der membranbindenden Domäne bindet, da $a_I^{(nc)} + 0,04 \mu\text{M}^{-1}$ beträgt. Das positive Vorzeichen weist darauf hin, dass die Aktivität verstärkt wird, wohl durch eine Erleichterung der Komplexbildung.

Monooleoylglycerol, das CYP2B1 nicht-kompetitiv hemmt, unterscheidet sich interessanterweise nur durch eine Doppelbindung von Monostearylglycerol. Ein gravierender Unterschied zeigt sich auch in der kompetitiven Hemmung: hier liegt $K_I^{(c)}$ bei Monooleoylglycerol viel niedriger ($1,1 \mu\text{M}$) als bei Monostearylglycerol ($15,5 \mu\text{M}$). Leider kann der genaue Wirkmechanismus nicht erklärt werden, da die Struktur von CYP2B1 immer noch nicht endgültig aufgeklärt ist.

Die meisten einkettigen Lipide mit kleiner hydrophiler Kopfgruppe weisen keine nicht-kompetitive Hemmung auf ($a_I^{(nc)} = 0$). Eine wichtige Ausnahme ist Arachidonsäure ($a_I^{(nc)} = -0,03 \mu\text{M}^{-1}$). Es ist weder eine Ähnlichkeit in der Strukturformel zu anderen nicht-kompetitiv hemmenden Lipiden, noch ein gravierender Unterschied zu den nur kompetitiv hemmenden ersichtlich (siehe Abb. 26).

Andere Lipide mit größerer hydrophiler Kopfgruppe weisen eine nicht-kompetitive Hemmung auf. Bei allen, mit Ausnahme von Monooleoylglycerol, ist $a_I^{(nc)}$ negativ. Der Hemmmechanismus kann jedoch nur für Lysophosphatidylcholin etwas erhellt werden, weil nur dieses im vesikulären System getestet wurde:

Wie schon ausgeführt, erleichtert das vesikuläre System die Komplexierung. Da im Falle von Lysophosphatidylcholin der nicht-kompetitive Effekt der Hemmung im vesikulären System deutlicher als im nicht vesikulären ausgeprägt ist, kann eine Störung der Komplexbildung in beiden Systemen vermutet werden. Ist die Komplexierung nun Angriffspunkt der Hemmung, wird diese Art der Hemmung in einem System, in dem die Komplexierung erleichtert wird, ausgeprägter sein. Dies ist hier der Fall.

Ad c) Auch dieser Punkt kann nicht mit den vorliegenden Ergebnissen geklärt werden, da die Substratbindung ohne Inhibitor gemessen wurde. Zur Aufklärung wären weitere Experimente nötig.

4.4. Funktionsunterschiede zwischen einkettigen und zweikettigen Lipiden

Die meisten stabilen Membranen werden mit Hilfe zweikettiger Lipide aufgebaut. Einkettige Lipide sind jedoch ebenfalls zur Bildung von Bilayermembranen befähigt. Worin unterscheiden sich diese beiden Substanzgruppen?

Um eine Antwort auf diese Frage zu finden, beginnen wir mit den hier vorgestellten Ergebnissen:

Der Effekt zweikettiger Lipide auf das verwendete System ist die verstärkte Bildung des katalytisch aktiven, binären Enzymkomplexes. Einkettige Lipide fungieren zum einen als kompetitive Hemmstoffe am aktiven Zentrum des membrangebundenen Monooxygenasesystems, zum anderen wahrscheinlich auch als nicht-kompetitive Hemmstoffe an den zytosolischen und membranbindenden Domänen. Die Auswirkungen der einkettigen Lipide sind nicht auf dieses System beschränkt:

- a) Die GTPase wird bedeutend von einkettigen Lipiden wie Arachidonsäure, Linolsäure, Ölsäure und Lysophosphatidylcholin gehemmt [16].
- b) Arachidonsäure, ein einkettiges Lipid, reguliert die muskarinergen K^+ -Kanäle [35].

Es ist bekannt, dass einkettige Lipide und ihre Abkömmlinge zur Regulation benutzt werden:

- a) Die Phospholipase A_2 hydrolysiert zweikettige Phospholipide zu einkettigen Lysophospholipiden und freien Fettsäuren.
- b) Arachidonsäure ist das Substrat für Cyclooxygenase und Lipoxygenase, die daraus regulatorisch wirksame Moleküle wie Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxan bilden.
- c) Auch einkettige Lipide, die durch Triacylglycerinlipase entstehen, sind an Regulationsmechanismen beteiligt [29].

Interessanterweise greifen diese Lipide jedoch nicht nur hemmend in die Zellaktivität ein, sondern auch aktivierend [46].

4.5. In vivo, in vitro Korrelation

Es ist schon seit langem bekannt, dass die Lipidzusammensetzung der Membran Einfluss auf viele Zellfunktionen hat. So werden unter anderem Transportprozesse, Phagozytose, Endozytose und Zellwachstum von der Lipidzusammensetzung der Membran positiv und negativ beeinflusst [2]. In dem zitierten Review wird allerdings nur der Einfluss von Fettsäuren, Phospholipiden, Cholesterol und Sphingolipiden untersucht, nicht jedoch die Auswirkung von Lysophospholipiden und Monoacylglycerolen wie in dieser Arbeit

erstmalig gezeigt werden konnte. Da sämtliche Untersuchungen mit einem definierten Cytochrom P450:Reduktase-System durchgeführt wurden, sind klare Ergebnisse über kompetitive und nichtkompetitive Hemmungen dieses Systems mit einkettigen Lipiden erbracht worden. Diese Befunde lassen sich nicht mit Mikrosomenfraktionen, mit Zellen oder Lebergewebsschnitten (wie in anderen Arbeiten verwendet) erheben, da hier eine Vielzahl von Enzymen und Proteinen das Verhalten einkettiger Lipide beeinflussen kann.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einkettiger Lipide auf die 7-Ethoxycumarin O-Deethylaseaktivität des binären, rekonstituierten Proteinkomplexes von isoliertem Cytochrom P450 2B1 und NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Enzymaktivität dieses binären Komplexes durch die Veränderung

- a) der Komplexbildung beider Proteine
- b) der katalytischen Zykluszeit des arbeitenden binären Proteinkomplexes
- c) und des Anteils der Substratmoleküle im aktiven Zentrum des Enzyms (kompetitive Hemmung)

beeinflusst werden kann. Für alle einkettigen Lipide wurde eine kompetitive Hemmung gemessen. Die folgenden Dissoziationskoeffizienten des Substrates und der eingesetzten Lipide wurden gemessen:

110 μ M 7-Ethoxycumarin (Substrat), 1,1 μ M MO (1-Monooleoyl-rac-glycerol), 0,3 μ M Sph (Sphingosin), 1,5 μ M OA (Ölsäure), 3,0 μ M LPC (L- α -Lysophosphatidylcholin), 15,5 μ M MSG (1-Monostearoyl-rac-glycerol), 9,5 μ M AA (Arachidonsäure), 9,0 μ M PaCa (Palmitoyl-L-Carnitin), 3,5 μ M MPG (2-Monopalmitoylglycerol), 1,5 μ M LPI (L- α -Lysophosphatidylinositol), 75 μ M LA (Laurinsäure), 75 μ M MA (Myristinsäure), >100 μ M SA (Stearinsäure). Keine nicht-kompetitive Hemmung wurde bei den einkettigen Lipiden LA, MA, Sph, SA und OA festgestellt. Nicht-kompetitive Effekte wurden für MPG (-0,03 μ M⁻¹), PaCa (-0,02 μ M⁻¹), MSG (-0,023 μ M⁻¹), LPC (-0,03 μ M⁻¹), AA (-0,03 μ M⁻¹) und MO (+0,04 μ M⁻¹) gemessen. Das negative Zeichen zeigt an, dass die Aktivität des arbeitenden Enzymkomplexes vermindert wird. Das positive Zeichen verweist auf eine Aktivitätssteigerung, die wahrscheinlich auf eine Erleichterung der Komplexbildung zurückzuführen ist.

Die hier erhaltenen Ergebnisse können Hinweise auf die Situation und Beeinflussung von CYP2B1 in vivo geben.

6. Literaturverzeichnis:

- 1: Aoyama T, Korzekwa K, Nagata K, Gilette J, Gelboin HV, Gonzales FJ: Estradiol metabolism by complementary deoxyribonucleic acid – expressed human cytochrome P450s, *Endocrinology* 126: 3101-3106 (1990)
- 2: Arthur A, Yorek S, Yorek MA: Membrane lipid composition and cellular function, *J Lipid Res* 26: 1015-1035
- 3: Bisswanger H: *Enzymkintetik* . Wiley-VCH, Weinheim, S. 87-99 (2000)
- 4: Capdevila JH, Falck JR: The CYP P450 arachidonic acid monooxygenases: from cell signaling to blood pressure regulation, *Biochem Biophys Res Commun* 285(3): 571-576 (2001)
- 5: Estabrook RW, Cooper DY, Rosenthal O: The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21 – hydroxylase system of the adrenal cortex, *Biochem Z* 338: 741-755 (1963)
- 6: Fuller N, Rand RP: The influence of lysolipids on the spontaneous curvature and bending elasticity of phospholipid membranes, *Biophys J* 81(1):243-54 (2001)
- 7: Gonzales, FJ: The molecular biology of cytochrome P450s, *Pharmacol Rev* 40: 243-288 (1989)
- 8: Gonzales FJ, Aoyama T, Gelboin HV: Activation of promutagens by human cDNA-expressed cytochrome P450s, *Mutat Environm* B: 77-89 (1990)
- 9: Gruler H, Müller-Enoch D: Slaving the cytochrome P450 dependent monooxygenase system by periodically applied light pulses, *Eur Biophys J* 19: 217-219 (1991)
- 10: Guengerich FP: Cytochrome P450 enzymes, *Am Scientist* 81: 440-447 (1993)

- 11: Guengerich FP, Dannan GA, Wright ST, Martin MV, Kaminsky LS: Purification and Characterization of Liver Microsomal Cytochromes P-450: Electrophoretic, Spectral, Catalytic, and Immunochemical Properties and Inducibility of Eight Isozymes Isolated from Rats Treated with Phenobarbital or β -Naphthoflavone, *Biochemistry* 21: 6019-6030 (1982)
- 12: Guengerich FP, Shimada T: Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes, *Chem Res Toxicol* 4: 391-407 (1991)
- 13: Guerre-Millo M, Guesnet P, Guichard C, Durand G, Lavau M: Alteration in membrane lipid order and composition in metabolically hyperactive fatty rat adipocytes, *Lipids* 29(3):205-9 (1994)
- 14: Hamori E, Michaels A M: Determination of Critical Micelle Concentration of aqueous Lysolecithin solutions, *Biochim Biophys Acta* 231(3):496-504 (1971)
- 15: Imamura Y, Migita T, Anraku M, Otagiri M: Inhibition of rabbit heart carbonyl reductase by fatty acids, *Biol Pharm Bull* 22(7): 731-733 (1999)
- 16: Kowluru A, Metz SA: Regulation of guanine-nucleotide binding proteins in islet subcellular fractions by phospholipase-derived lipid mediators of insulin secretion, *Biochim Biophys Acta* 1222(3): 360-368 (1994)
- 17: Kucher K: Isolierung und Charakterisierung von Enzymen des mikrosomalen Cytochrom P-450 abhängigen Monooxygenasesystems aus der Leber Phenobarbital und β -Naphthoflavon behandelte Ratten. Med Dissertation, Universität Ulm 1986
- 18: Lag M, Becher R, Samuelsen JT, Wiger R, Refsnes M, Huitfeldt HS, Schwarze PE: Expression of CYP2B1 in freshly isolated and proliferating cultures of epithelial rat lung cells, *Exp Lung Res* 22(6): 627-649 (1996)
- 19: Marsh D, King MD: Prediction of the critical micelle concentrations of mono- and diacyl phospholipids, *Chem Phys Lipids* 42(4):271-7 (1986)

- 20: Merril AH Jr, Nikolova-Karakashian M, Schmelz EM, Morgan ET, Stewart J: Regulation of cytochrome P450 expression by sphingolipids, *Chem Phys Lipids* 102(1-2):131-139 (1999)
- 21: Michaelis L, Menten ML: Die Kinetik der Invertinwirkung, *Biochem Z* 49: 333-369 (1913)
- 22: Miksys S, Hoffmann E, Tyndale RF: Regional and cellular induction of nicotine-metabolizing CYP2B1 in rat brain by chronic nicotine treatment, *Biochem Pharmacol* 59(12): 1501-1511 (2000)
- 23: Miwa GT, Lu AYH: The association of cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase in phospholipid membranes, *Arch Biochem Biophys* 234: 161-166 (1984)
- 24: Mountfield RJ, Senepin S, Schleimer M, Walter I, Bittner B: Potential inhibitory effects of formulation ingredients on intestinal cytochrome P450, *Int J Pharm* 211(1-2):89-92 (2000)
- 25: Müller-Enoch D, Gruler H: Complexation of Membrane-Bound Enzyme Systems, *Z Naturforsch* 55c: 747-752 (2000)
- 26: Müller-Enoch D: Localization of cytochrome P450 in membranes: Reconstituted systems. In: Schenkman JB, Greim H (Hrsg), *Handbook of Exp Pharm*, Band 105, Cytochrome P450, Springer, Berlin Heidelberg New York, S. 71-83 (1993)
- 27: Müller-Enoch D, Churchill P, Fleischer S, Guengerich FP: Interaction of liver microsomal cytochrome P450 and NADPH-cytochrome P450 reductase in the presence and absence of lipid, *J Biol Chem* 259: 8174-8182 (1984)
- 28: Murray M, Reidy GF: Selectivity in the inhibition of mammalian cytochrome P-450 by chemical agents, *Pharmacol Rev* 42: 85-101 (1990)

- 29: Nakamura J, Okamura N, Usuki S: Inhibition of adenylylcyclase activity in mouse cerebellum membranes upon hydrolysis of triacylglycerols by triacylglycerol lipase, but not phospholipids by phospholipase A₂, Arch Biochem Biophys 393(1):123-31 (2001)

- 30: Nebert DW, Nelson DR, Coon MJ, Estabrook RW, Feyereisen R, Fuji-Kuriyama Y, Gonzales FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Loper SC, Sato R, Waterman MR, Waxman DJ: The P-450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping and recommended Nomenclature, DNA and Cell Biology 10:1-14 (1991)

- 31: Nishikawa T, Tomori Y, Yamashita S, Shimizu S: Inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity by phospholipase A₂ and several lysophospholipids: possible role of phospholipase A₂ in noradrenaline release from cerebral cortical synaptosomes, J Pharm Pharmacol 41(7):450-458 (1989)

- 32: Oliw EH, Guengerich FP, Oates JA: Oxygenation of arachidonic acid by hepatic monooxygenases: isolation and metabolism of four epoxide intermediates, J Biol Chem 257: 3771-3781 (1982)

- 33: Pitts BJ, Okhuysen CH: Effects of palmitoyl carnitine and LPC on cardiac sarcolemmal Na⁺-K⁺-ATPase; Am J Physiol 247(5 Pt 2):H840-H846 (1984)

- 34: Rosenbrock H, Hagemeyer CE, Ditter M, Knoth R, Volk B: Expression and localization of the CYP2B subfamily predominantly in neurones of rat brain, J Neurochem 76(2): 332-340 (2001)

- 35: Scherer RW, Breitwieser GE: Arachidonic acid metabolites alter G protein-mediated signal transduction in heart. Effects on muscarinic K⁺ channels, J Gen Physiol 96: 735-755 (1990)

- 36: Smith R, Tanford C: The critical micelle concentration of L- α -dipalmitoylphosphatidylcholine in water and water-methanol solutions, J Mol Biol 67(1):75-83 (1972)

- 37: Tamburini PP, Mason HA, Bains SK, Makowski RJ, Morris B, Gibson GG: Multiple forms of cytochrome P-450: purification, characterisation, and comparison of a novel clofibrate-induced isozyme with other major forms of cytochrome P-450, *Eur J Biochem* 139: 235-246 (1984)
- 38: Testa B, Jenner P: Biochemical indices of extrahepatic metabolism. In: Testa B, Jenner P (Hrsg) *Drug metabolism – chemical and biochemical aspects*, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, S. 424-427 (1976)
- 39: Taniguchi H, Imai Y, Iyanagi T, Sato R: Interaction between NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450 in the membrane of phosphatidylcholine vesicles, *Biochim Biophys Acta* 550: 341-356 (1979)
- 40: Taniguchi H, Pyerin W: Phospholipid bilayer membranes play decisive roles in the cytochrome P450-dependent monooxygenase system, *J Cancer Res Clin Oncol* 114: 335-340 (1988)
- 41: Ullrich V: Cytochrome P450 and biological hydroxylation reactions, *Topics in Current Chemistry* 83: 67-104 (1978)
- 42: Ullrich V, Weber P: The O-dealkylation of 7-ethoxycoumarin by liver microsomes. A direct fluorometric test, *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* 353: 1171-1177 (1972)
- 43: Viner RI, Novikov KN, Kozlov YP, Kagan VE: Inhibition of the Dealkylating Activity of Isoforms of Cytochrome P450 in Rat Liver Microsomes by Products of the Hydrolysis of Phospholipids by Phospholipase A₂, *Biokhimiya* 52: 459-468 (1987)
- 44: Yoo JS, Smith TJ, Ning SM, Lee MJ, Thomas PE, Yang CS: Modulation of the levels of cytochromes P450 in rat liver and lung by dietary lipid, *Biochem Pharmacol* 2343(12): 2535-2542 (1992)
- 45: Zannikos PN, Bandyopadhyay AM, Robertson LW, Blouin RA: Effect of nutritional obesity on the induction of CYP2B enzymes following phenobarbital treatment, *Drug Metab Dispos* 21(5): 782-787 (1993)

46: Zawalich WS, Zawalich KC: Influence of monooleoylglycerol on islet cell phosphoinositide hydrolysis and insulin secretion, Mol Cell Endocrinol 68(2-3):129-136 (1990)

7. Danksagung:

Herrn Prof. Dr. rer. nat. D. Müller-Enoch danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die unermüdlich und geduldige Unterstützung, die ich immer bei ihm fand, ganz herzlich.

Allen Mitgliedern der Abteilung Physiologische Chemie danke ich für die nette Atmosphäre in der ich mich immer sehr wohl gefühlt habe.

Meinen Freunden danke ich für viele Dinge.