

1 EINLEITUNG

Arzneimittelwechselwirkungen sind in der pharmazeutischen Praxis ein ernst zu nehmendes Problem. Nach Angaben des Niedersächsischen Ärzteblatts wurden in einer kürzlich veröffentlichten englischen Studie 6,5 % aller Krankenhausaufnahmen auf Arzneimittelwechselwirkungen zurückgeführt [1]. Besonders bei älteren multimorbiden Patienten, die oft eine Vielzahl unterschiedlicher Arzneimittel gleichzeitig einnehmen müssen, führen Interaktionen zwischen miteinander unverträglichen Arzneimitteln nicht nur zu einer Verlängerung des Krankenhausaufenthaltes und damit zu einer Erhöhung der Behandlungskosten, sondern sie steigern letztendlich auch das Mortalitätsrisiko der Patienten.

Eine zentrale Rolle im Bereich der pharmakokinetischen Arzneimittelwechselwirkungen spielt die Superfamilie der Cytochrom-P450-Enzyme. In der Phase I der Biotransformation katalysieren die Cytochrome P450 die oxidative Hydroxylierung von Arzneistoffen und anderen lipophilen Xenobiotika, damit diese dann in der Phase II des Metabolismus durch Konjugation mit einer körpereigenen Substanz in hydrophilere, leichter ausscheidbare Verbindungen überführt werden können. Sie sind dabei in der Lage, ein ungewöhnlich breites Spektrum an strukturell höchst unterschiedlichen Substraten umzusetzen. Ebenso groß ist dementsprechend auch die Zahl der Cytochrom-P450-Inhibitoren, weshalb es unter Umständen zu ernsthaften Komplikationen kommen kann, wenn mehrere Arzneistoffe gleichzeitig als Substrate oder Inhibitoren um die Bindungsstelle im selben Enzym konkurrieren. Beispielsweise werden über 50 % aller Arzneistoffe über das Isoenzym Cytochrom P450 3A4 metabolisiert, und es sind darüber hinaus zahlreiche Inhibitoren wie Azol-Antimykotika oder Makrolid-Antibiotika, aber auch Inhaltsstoffe des Grapefruitsaftes bekannt, die toxische Interaktionen verursachen können. Eine nicht ganz unbedeutende Rolle spielt auch das Isoenzym Cytochrom P450 1A2. Zwar metabolisiert dieses Isoenzym nur etwa 15 % der heute verwendeten Pharmaka, es befinden sich darunter jedoch auch solche mit einer engen therapeutischen Breite wie Clozapin oder Theophyllin. Kombiniert man zum Beispiel eines dieser Arzneimittel mit einem Fluorochinolon-Antibiotikum, das die Aktivität des Cytochroms hemmt, kann es durch erhöhte Blutspiegel der langsamer abgebauten Arzneistoffe zu schwerwiegenden Intoxikationen kommen.

Da viele Interaktionen bereits zugelassener Arzneistoffe bekannt sind, können toxische Nebenwirkungen in der Regel durch umsichtige Verschreibung des behandelnden Arztes vermieden werden. Es ist jedoch auch von Interesse, das Interaktionspotential eines Arzneimittels bereits in seiner Entwicklungsphase zu erkennen. Denn in einer Studie des „Centre for Medicines Research“ über die Gründe für das Scheitern von neuen Arzneistoffentwicklungen in der frühklinischen Phase stellte sich heraus, dass bei 16 % aller abgebrochenen Entwicklungsprojekte das Auftreten von Nebenwirkungen, zu denen ja auch die Arzneimittelwechsel-

wirkungen zählen, für das Fehlschlagen des Entwicklungsprojektes verantwortlich waren [2], [3].

Ein möglicher Weg zur Vorhersage von Biotransformationsreaktionen gerade auch in den frühen Stadien der Arzneistoffentwicklung sind theoretische Untersuchungen mit Methoden des Molecular Modelling. Struktur-Wirkungsbeziehungen lassen sich nicht nur für Targets modellieren, an denen der Arzneistoff wirken soll, sondern auch für Anti-Targets, die zu Arzneistoffinteraktionen oder anderen Nebenwirkungen führen könnten. Von einigen Cytochrom-P450-Isoenzymen existieren bereits Kristallstrukturen, die zur Vorhersage von Substrat-Präferenzen herangezogen werden können. Für Isoenzyme, deren dreidimensionale Struktur noch nicht aufgeklärt worden ist, wie beispielsweise das Cytochrom P450 1A2, bilden die Kristallstrukturen eine gute Grundlage für ein Homologiemodell, mit dessen Hilfe dann Vorhersagen durchgeführt werden können.

1.1 Cytochrome P450

Die Cytochrome P450 (EC 1.14.14.1)¹ stellen eine ubiquitär vorkommende Superfamilie von Monooxygenasen dar. Sie besitzen die Fähigkeit, molekularen Sauerstoff in ihrem aktiven Zentrum zu binden und zu aktivieren. Dabei katalysieren sie dessen Spaltung, bei der ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen und das andere unter Protonenaufnahme zu Wasser reduziert wird. Alle Isoenzyme dieser Superfamilie sind Hämoproteine mit einem Häm (Eisen-Protoporphyrin IX), das als prosthetische Gruppe das katalytische Zentrum der Cytochrome bildet. Das Zentralatom Eisen ist über den Thiolschwefel eines Cysteins kovalent an das Apoenzym gebunden, das aus etwa 400-500 Aminosäuren besteht. Durch die Eisen-Thiolat-Bindung werden die Redox-Eigenschaften von Eisen und Schwefel in einzigartiger Weise genutzt, um molekularen Sauerstoff für chemische Reaktionen zu aktivieren [4]. Ihren Namen erhielten die Cytochrome P450 durch das charakteristische Absorptionsmaximum bei 450 nm, das durch die Bindung von Kohlenmonoxid (CO) an das Häm zustande kommt. „Cytochrom“ kann man mit „Zellfarbstoff“ übersetzen, „P“ steht für „Pigment“ und „450“ für die Absorptionswellenlänge des CO-Komplexes. Garfinkel und Klingenberg beobachteten 1958 unabhängig voneinander dieses Phänomen und gelten damit als die Entdecker der Cytochrome P450 [5], [6].

¹ E.C.: Enzymklassifikationssystem (*Enzyme Commission numbers*); kategorisiert wird durch dieses System die Reaktion, die das Enzym katalysiert

1.1.1 Nomenklatur

Während in den Anfängen der Cytochrom-Forschung neu entdeckte Isoenzyme in der Regel mit einem individuellen Namen bezeichnet wurden, der häufig auf Substratspezifitäten oder physikochemische Eigenschaften der Cytochrome verwies, so hat sich in den letzten Jahren eine systematische Einteilung der Cytochrome in Familien, Unterfamilien und individuelle Isoenzyme entsprechend ihrer Sequenzidentitäten durchgesetzt [7]. Auf die generelle Abkürzung CYP (Cytochrom P450) folgt zunächst die Angabe der Familie als arabische Ziffer (CYP1, 2, 3, ...). Zu einer Familie gehören Isoenzyme mit einer Sequenzidentität > 40 %. Isoenzyme mit einer Sequenzidentität > 55 % bilden eine gemeinsame Unterfamilie, die mit einem lateinischen Buchstaben bezeichnet wird (CYP1A, 1B, 1C, ...). Individuelle Isoenzyme sollten sich in ihrer Sequenzidentität um mehr als 3 % voneinander unterscheiden. Sie werden wiederum durch arabische Ziffern gekennzeichnet (CYP1A1, 1A2, ...).

1.1.2 Evolutionäre Entwicklung

Man nimmt an, dass es in Archaeobakterien bereits seit 3,5 Milliarden Jahren Eisen-Schwefel-Enzyme gibt, die Redoxreaktionen katalysieren können [8]. Die Entwicklung der Superfamilie der Cytochrome P450 aus einem gemeinsamen Vorläufergen begann vermutlich vor etwa 1,4 Milliarden Jahren eng zusammenhängend mit dem Anstieg des Sauerstoffgehalts in der Atmosphäre und verlief dann weitgehend parallel zur Evolution der Lebensformen auf der Erde, was sich heute in der ubiquitären Verbreitung dieser Enzymfamilie widerspiegelt (Abbildung 1.1) [9]. Wahrscheinlich entstanden die Cytochrome P450 entweder aus der Notwendigkeit heraus, den verfügbaren Sauerstoff für die Erschließung von Kohlenstoffquellen mittels Oxidationsreaktionen zu nutzen, oder um den für einige Organismen toxischen molekularen Sauerstoff durch Reduktion zu Wasser zu entgiften. Im weiteren Verlauf der Entwicklung spielten die P450-Enzyme zunächst in erster Linie bei der Biosynthese und dem Metabolismus von Steroiden und anderen endogenen Substanzen eine wichtige Rolle. Erst mit der zunehmenden Besiedelung des Landes durch die Tiere erfolgte eine Abspaltung von überwiegend Xenobiotika metabolisierenden Cytochromfamilien, vermutlich zur Entgiftung von Pflanzentoxinen, die von zahlreichen Pflanzen als Fraßschutz synthetisiert wurden [10]. Es fand eine immer weitere Differenzierung in Unterfamilien mit unterschiedlichen Substratspezifitäten statt, sodass eine breite Spanne von Substanzklassen abgedeckt werden konnte. Auch die Familien CYP1 und CYP2, deren Aufspaltung in spezialisierte Unterarten in diesen Zeitraum fällt, haben vermutlich eine ganze Reihe verschiedener Pflanzentoxine entgiftet. Die Tatsache, dass CYP1A1 in vielen Fischarten gefunden wird, CYP1A2 aber nicht, ist ein Indiz dafür, dass eine Auftrennung der Familie 1 in ihre Unterfamilien erst deutlich nach der Besiedelung

des Landes stattgefunden hat. Dabei ist die Entstehung von CYP1A2 vermutlich auf die Notwendigkeit zurückzuführen heterozyklische Amine zu metabolisieren. Der Anstieg des CYP1A2-Spiegels im Verlauf der Evolution des Menschen ließe sich dann mit dem Verzehr von gekochtem Fleisch erklären, bei dessen Zubereitung heterozyklische Amine entstehen [11].

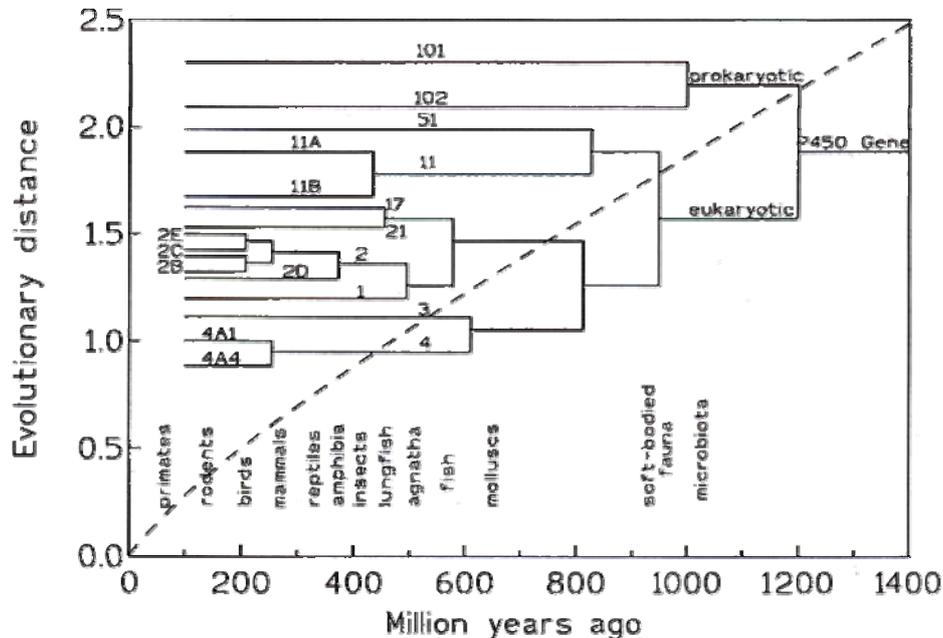


Abbildung 1.1: Vereinfachte Darstellung des phylogenetischen Baumes der Cytochrome P450, der ihre Entwicklung wiedergibt [11]

1.1.3 Verbreitung

Bereits bei der Darstellung der evolutionären Entwicklung der P450-Superfamilie (Abschnitt 1.1.2 und Abbildung 1.1) wurde ihre ubiquitäre Verbreitung angesprochen. Tatsächlich findet man P450-Isoenzyme in Organen und Geweben nahezu jeder Klasse von Lebewesen, angefangen bei den Archaeobakterien über Pilze, Pflanzen, Insekten, Amphibien, Reptilien, Fische und Vögel bis hin zu den Säugetieren und dem Menschen. Im Jahr 2004 waren insgesamt 3043 verschiedene CYP-Gene (inklusive Pseudogene²) bekannt, die sich 368 Familien, bzw. 814 Unterfamilien zuordnen ließen. Davon stammten 1277 Gensequenzen aus dem Tierreich und 207 von den eukaryotischen³ Pilzen und Einzellern. Des Weiteren gehörten 1098 pflanzliche und 461 bakterielle Sequenzen dazu. Im Vergleich dazu sind vom

² Genkopien, die kein funktionelles Protein in voller Länge codieren. Sie spielen eine Rolle bei der Regulierung der Genaktivität.

³ Lebewesen, die einen echten Zellkern und ein Cytoskelett besitzen

Menschen mittlerweile 60 unterschiedliche Cytochrome bekannt. Dass die Forschung auf diesem Gebiet noch nicht abgeschlossen ist, erkennt man daran, dass alleine in der Reispflanze (*Oryza sativa*) kürzlich 450 neue verschiedene CYP-Gene entdeckt wurden. Eine Übersicht über alle bekannten Sequenzen gibt die ständig aktualisierte „Cytochrome P450 Homepage“ von D.R. Nelson [12].

Die Cytochrome aller eukaryotischen Lebewesen sind membranständige Enzyme. Sie sind über einen Membrananker an die Membran des endoplasmatischen Retikulums gebunden und ragen als kugelförmiges Protein ins Cytosol. Einige P450-Isoenzyme, unter anderem das CYP1A1, werden auch in den Mitochondrien gefunden, wo sie ebenfalls membrangebunden vorliegen.

Bei den Säugetieren enthält die Leber den größten Anteil an P450-Isoenzymen. Geringere Mengen einzelner Cytochrome P450 findet man darüber hinaus aber auch in fast jedem anderen Organ oder Gewebe wie den Nieren, der Lunge, den Geschlechtsorganen, der Nebennierenrinde, dem Gehirn, der Nasenschleimhaut, der Plazenta, dem Pankreas, der Milz, dem Gastrointestinaltrakt oder der Haut [13] (vgl. auch Tabelle 1.1).

1.1.4 Funktionen

Häufig hängt der Wirkort der einzelnen CYP-Isoenzyme eng mit ihrer jeweiligen Funktion zusammen. Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 erwähnt, sind eine ganze Reihe von Säugetiercytochromen in die Biosynthese von Steroidhormonen eingebunden. Sie kommen daher überwiegend in der Nebennierenrinde vor, wo die Steroidbiosynthese stattfindet. Schon der erste Biosyntheseschritt, die oxidative Abspaltung der Seitenkette des Cholesterols, wird durch ein Cytochrom (CYP11A1) katalysiert. Weitere an der Synthese von Corticosteroiden, Androgenen, Estrogenen und Gestagenen beteiligte Isoenzyme sind CYP11B1, CYP17A1, CYP19A1 und CYP29A1, bei denen man teilweise von ihrem Namen auf die von ihnen katalysierte Reaktion schließen kann (CYP11B1 z.B. katalysiert die 11 β -Hydroxylierung des Progesterons). Weitere Beispiele für spezifische cytochromkatalysierte Reaktionen körpereigener Substanzen sind der Abbau von Cholesterol zu Gallensäure (CYP7, CYP27) sowie die Hydroxylierung von Fettsäuren, Prostaglandinen, Leukotrienen (CYP4) und Vitamin D₃ (CYP27).

Auch die Säugetiercytochrome der Familien 1-3 sind in der Lage, Steroidhormone an verschiedenen Positionen zu hydroxylieren. Diese Reaktionen haben jedoch nichts mit den oben aufgeführten Biosynthesereaktionen zu tun und sind in der Regel von untergeordneter Bedeutung. Die Hauptfunktion dieser Cytochrome besteht in der Umsetzung von exogenen Substanzen. Dabei sind sie wie bereits eingangs erwähnt vor allem an der Phase I der Biotransformation von über 90 % aller Arzneistoffe beteiligt, wo sie über 60 verschiedene Reaktionen katalysieren [11]. Im Gegensatz zu

eng eingegrenzten regio- und stereospezifischen Biosynthesereaktionen katalysieren die Xenobiotika metabolisierenden Cytochrome eine große Anzahl weitaus unspezifischerer Reaktionen und weisen dabei eine deutlich höhere Substratvariabilität auf. Diese relative Vielseitigkeit einzelner Cytochrome einerseits und das Zusammenspiel verschiedener Isoenzyme mit unterschiedlichen Substratspezifitäten andererseits bewirken, dass das P450-Enzymsystem einen hocheffizienten Mechanismus für den Metabolismus körperfremder Stoffe darstellt. Einen Überblick über die humanen Cytochrome der Familien 1-3, die für den Metabolismus von Xenobiotika von Bedeutung sind, ihre Wirkorte und Substratspezifitäten gibt Tabelle 1.1.

Tabelle 1.1: Humane Cytochrome der Familien 1-3, die für den Metabolismus von Xenobiotica maßgeblich sind (nach [14]). Abkürzungen: GIT – Gastrointestinaltrakt, PAH – polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (*polycyclic aromatic hydrocarbons*).

CYP	Vorkommen	Typische Substrate
1A1	Lunge, Leber, Gehirn, GIT, Lymphozyten, Herz	PAH, z.B. Benzo[a]pyren
1A2	Leber	aromatische Amine, PAH, Coffein
1B1	steroidbildende Gewebe, Tumorgewebe, Haut, Gehirn, Herz, Lunge, Leber, Niere, GIT, Milz	17 β -Estradiol, PAH
2A6	Leber	Cumarine, Steroide
2B6	Leber, Herz	Nicotin
2C8	Leber, Nieren	Retinoide, Paclitaxel
2C9/10	Leber	Tolbutamid, Diclofenac
2C19	Leber, Herz	(S)-Mephenytoin, Omeprazol, Diazepam
2D6	Leber, Gehirn, Herz	β -Blocker, trizyklische Antidepressiva
2E1	Leber, Lunge, Gehirn, Endothel, Herz, Knochenmark	Ethanol, Nitrosamine, Paracetamol
2F1	Lunge	Cumarine
3A4/5	Leber, GIT, Nieren, Lunge, Gehirn, Endothel, Plazenta, Lymphozyten	Ca-Kanalblocker, Ciclosporin, Paracetamol, Paclitaxel, Steroide
3A7	fötale Leber, Plazenta	s. CYP3A4/5

Viele der hier aufgeführten Isoenzyme kommen wiederum hauptsächlich in der Leber vor und sind dort in unterschiedlichem Ausmaß an Metabolisierungsreaktionen beteiligt. Die größte Bedeutung hat CYP3A4, das etwa 30 % der Lebercytochrome ausmacht und am Metabolismus von über 50 % aller Arzneistoffe beteiligt ist, die von Cytochromen umgesetzt werden. Ebenfalls stark vertreten ist die Unterfamilie CYP2C, der 20 % der Cytochrome in der Leber angehören. Eine wichtige Rolle für den Arzneistoffmetabolismus spielt auch CYP2D6, das etwa 30 % der von Cytochromen umgesetzten Arzneistoffe metabolisiert [14]. Hier ist wiederum der Zusammenhang zwischen Wirkort und Funktion interessant, da dieses Isoenzym neben der Leber auch im Herzen gefunden wird und die Substanzklasse der β -Blocker zu seinen Substraten gehört. Schließlich zählt auch CYP1A2 zu den

wichtigen arzneistoffmetabolisierenden Isoenzymen, wobei es aber darüber hinaus auch eine bedeutende Rolle bei der Metabolisierung anderer körperfremder Chemikalien spielt.