

4557-1374

Aktivierung von *N*-hydroxylierten Prodrugs durch mitochondriale Enzyme



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Stephanie Deters

Kiel 2002

1 EINFÜHRUNG	1
1.1 BIOTRANSFORMATION DER XENOBIOTIKA	1
1.1.1 BEDEUTUNG DER BIOTRANSFORMATION	1
1.1.2 BIOTRANSFORMATIONSSTUDIEN	3
1.1.3 BETEILIGTE ENZYME	4
1.1.4 BIOTRANSFORMATION IN MITOCHONDRIEN	5
1.1.4.1 Allgemeines und Funktionen im Organismus	5
1.1.4.2 Fremdstoffmetabolismus in Mitochondrien	7
1.2 BIOTRANSFORMATION STICKSTOFFHALTIGER FUNKTIONELLER GRUPPEN	11
1.3 CYTOCHROM P450 ENZYSYSTEM	14
1.3.1 GRUNDLAGEN UND BEDEUTUNG	14
1.3.2 CYTOCHROM P450 ISOENZYME IN HUMANEN MITOCHONDRIEN	17
1.3.3 MECHANISMUS DER P450-KATALYSIERTEN MONOOXYGENIERUNG	19
1.4 BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN	21
1.4.1 UNTERSUCHTE SUBSTRATE UND PRODRUG-PRINZIP	21
1.4.2 THEMA UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	25
2 GEWINNUNG DER ENZYMQUELLEN	27
2.1 EINLEITUNG	27
2.2 METHODEN	28
2.2.1 MATERIALIEN UND GERÄTE	28
2.2.2 GEWINNUNG VON SCHWEINELEBERMITOCHONDRIEN DURCH ULTRAZENTRIFUGATION	28
2.2.3 GEWINNUNG VON SCHWEINELEBERMIKROSOMEN UND CYTOSOL DURCH ULTRAZENTRIFUGATION	30
2.2.4 GEWINNUNG VON SCHWEINENIERENMITOCHONDRIEN DURCH ULTRAZENTRIFUGATION	30
2.2.5 GEWINNUNG VON SCHWEINENIERENMIKROSOMEN DURCH ULTRAZENTRIFUGATION	31
2.2.6 GEWINNUNG VON HUMANEN LEBERMITOCHONDRIEN DURCH ULTRAZENTRIFUGATION	31
2.2.7 GEWINNUNG VON HUMANEN LEBERMIKROSOMEN DURCH ULTRAZENTRIFUGATION	33
2.2.8 GEWINNUNG VON HUMANEN NIERENMITOCHONDRIEN DURCH ULTRAZENTRIFUGATION	33
2.2.9 GEWINNUNG VON HUMANEN NIERENMIKROSOMEN DURCH ULTRAZENTRIFUGATION	34
2.2.10 GEWINNUNG VON RATTENLEBERMITOCHONDRIEN DURCH ULTRAZENTRIFUGATION (DEXAMETHASON-VORBEHANDLUNG DER RATTEN)	34

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.11	GEWINNUNG VON RATTENLEBERMIKROSOMEN DURCH ULTRAZENTRIFUGATION (DEXAMETHASON-VORBEHANDLUNG DER RATTEN)	35
2.2.12	GEWINNUNG SUBMITOCHONDRIALER PARTIKEL - „STRIPPED MITOCHONDRIA“	35
2.3	ANALYTISCHE METHODEN ZUR CHARAKTERISIERUNG DER MITOCHONDRIENFRAKTIONEN	36
2.3.1	PROTEINBESTIMMUNG	36
2.3.2	NADH CYTOCHROM B5 REDUKTASE-AKTIVITÄTSBESTIMMUNG	37
2.3.3	NADPH CYTOCHROM P450 REDUKTASE-AKTIVITÄTSBESTIMMUNG	38
2.3.4	SUCCINAT CYTOCHROM C REDUKTASE-AKTIVITÄTSBESTIMMUNG	39
2.3.5	CYTOCHROM B5-GEHALTSBESTIMMUNG	40
2.3.6	CYTOCHROM P450-GEHALTSBESTIMMUNG	41
2.3.7	SPEZIELLE MARKERAKTIVITÄTEN DER MITOCHONDRIENMEMBRANEN	42
2.3.7.1	Innere Mitochondrienmembran-Succinat Cytochrom c Reduktase	42
2.3.7.2	Äußere Mitochondrienmembran - Rotenon-unempfindliche Cytochrom c Reduktase	42
2.3.8	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	43
2.3.8.1	Materialien	43
2.3.8.2	Geräte	43
2.3.8.3	Lösungen	44
2.3.8.4	Zusammensetzung der Gele	44
2.3.8.5	Elektrophorese	45
2.3.8.6	Färbung	45
2.4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	46
2.4.1	CHARAKTERISIERUNG DER MITOCHONDRIALEN FRAKTIONEN	46
2.4.1.1	Proteinbestimmung	46
2.4.1.2	Bestimmung der Reinheit der gewonnenen Fraktionen durch Markeraktivitäten	47
2.4.1.2.1	Succinat Cytochrome c Reduktase-Aktivität	47
2.4.1.2.2	NADPH Cytochrom P450 Reduktase-Aktivität	49
2.4.1.3	Bestimmung des Gehaltes an Cytochrom P450, Cytochrom b5 und der Aktivität der NADH Cytochrom b5 Reduktase in den verschiedenen Enzympräparationen	51
2.4.2	RATTENLEBERMITOCHONDRIEN UND -MIKROSOMEN (DEXAMETHASON-VORBEHANDLUNG)	57
2.4.3	CHARAKTERISIERUNG DER SUBMITOCHONDRIALEN PARTIKEL - DIGITONINFRAKTIONIERUNG	59
2.4.3.1	Proteingehalt	60

2.4.3.2	Markeraktivitäten für mitochondriale Membranen	60
2.4.3.2.1	Succinat Cytochrom c Reduktase - Markerenzym der inneren Mitochondrienmembran	60
2.4.3.2.2	Rotenon-unempfindliche Cytochrom c Reduktase - Markerenzym der äußeren Mitochondrienmembran	62
2.4.3.3	Metabolische Aktivität der Mitochondrienkompartimente	63
2.4.4	KONTROLLE DER REINHETT DER GEWONNENEN FRAKTIONEN DURCH SDS-PAGE	66
2.5	ZUSAMMENFASSUNG	68
3	AKTIVIERUNG VON <i>N</i>-HYDROXYLIERTEN PRODRUGS DURCH MITOCHONDRIALE	
ENZYME		70
3.1	EINLEITUNG	70
3.1.1	BIOTRANSFORMATIONSSTUDIEN MIT MITOCHONDRIEN	70
3.1.2	THERAPEUTISCHE BEDEUTUNG DER UNTERSUCHTEN <i>N</i> -HYDROXYLIERTEN VERBINDUNGEN	71
3.1.3	BISHERIGE UNTERSUCHUNGEN	74
3.1.4	ZIELSETZUNG	75
3.2	<i>N</i>-REDUKTION VON BENZAMIDOXIM DURCH MITOCHONDRIALE ENZYME	76
3.2.1	METHODEN	76
3.2.1.1	Sythese von Benzamidoxim	76
3.2.1.2	Materialien und Geräte	76
3.2.1.3	HPLC	77
3.2.1.4	Gewinnung der Enzympräparationen	78
3.2.1.5	Inkubationsbedingungen	78
3.2.1.5.1	Schweineleber- und Schweinenierenmitochondrien	78
3.2.1.5.2	Humane Leber- und Nierenmitochondrien	79
3.2.1.5.3	Rattenlebermitochondrien (<i>Dexamethason</i> vorbehandelte und unbehandelte Tiere)	79
3.2.1.5.4	Membranpräparationen von Schweinelebermitochondrien nach <i>Digitonin</i> -Fraktionierung	79
3.2.1.6	Untersuchung der Stabilität der mitochondrialen Benzamidoximreduktase-Aktivität	80
3.2.2	ERGEBNISSE	80
3.2.2.1	Umsetzungsraten der einzelnen mitochondrialen Präparationen	80

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.2.2	Kinetik und optimale Bedingungen der <i>N</i> -Reduktion von Benzamidoxim	83
3.2.2.2.1	Zeitabhängigkeit	83
3.2.2.2.2	Proteinabhängigkeit	84
3.2.2.2.3	Bestimmung des pH-Optimums	86
3.2.2.2.4	Cosubstratabhängigkeit der Reduktion	88
3.2.2.2.5	Abhängigkeit der Reduktion von Benzamidoxim zu Benzamidin von der Substratkonzentration	88
3.2.2.3	<i>N</i> -Reduktion von Benzamidoxim durch Mitochondrien verschiedener Spezies unter optimalen Bedingungen	90
3.2.2.4	<i>N</i> -Reduktion von Benzamidoxim durch Lebermitochondrien: Mitochondrienchargen im Vergleich	93
3.2.3	BENZAMIDOXIMEREDUKTASE-AKTIVITÄT RATTENLEBERMITOCHONDRIEN UND -MIKROSOMEN (DEXAMETHASON-VORBEHANDLUNG)	96
3.2.4	BESTIMMUNG DER LOKALISATION DER MITOCHONDRIALEN BENZAMIDOXIMREDUKTASE-AKTIVITÄT	99
3.2.5	LAGER- UND EINFRIERSTABILITÄT STABILITÄT DER MITOCHONDRIALEN BENZAMIDOXIMREDUKTASE-AKTIVITÄT	100
3.3	<i>N</i>-REDUKTION VON GUANOXABENZ DURCH MITOCHONDRIALE ENZYME	102
3.3.1	METHODEN	102
3.3.1.1	Materialien und Geräte	102
3.3.1.2	HPLC	102
3.3.1.3	Gewinnung der Enzympräparationen	103
3.3.1.4	Inkubationsbedingungen	104
3.3.1.4.1	Schweineleber- und Schweinenierenmitochondrien	104
3.3.1.4.2	Humane Leber- und Nierenmitochondrien	104
3.3.2	ERGEBNISSE	105
3.3.2.1	Umsetzungsraten der einzelnen mitochondrialen Präparationen	105
3.3.2.2	Kinetik und optimale Bedingungen der <i>N</i> -Reduktion von Guanoxabenz	107
3.3.2.2.1	Zeitabhängigkeit	107
3.3.2.2.2	Proteinabhängigkeit	108
3.3.2.2.3	pH-Abhängigkeit	109
3.3.2.2.4	Cosubstratabhängigkeit	110
3.3.2.2.5	Substratabhängigkeit	111
3.3.2.3	<i>N</i> -Reduktion von Guanoxabenz durch Mitochondrien verschiedener Spezies	113
3.4	<i>N</i>-REDUKTION VON Ro 48-3656 DURCH MITOCHONDRIALE ENZYME	116

3.4.1	METHODEN	116
3.4.1.1	Materialien und Geräte	116
3.4.1.2	HPLC	116
3.4.1.3	Gewinnung der Enzympräparationen	118
3.4.1.4	Inkubationsbedingungen	118
3.4.1.4.1	Schweineleber- und Schweinenierenmitochondrien	118
3.4.1.4.2	Humane Leber- und Nierenmitochondrien	118
3.4.2	ERGEBNISSE	119
3.4.2.1	Umsetzungsraten der einzelnen mitochondrialen Präparationen	119
3.4.2.2	Kinetik und optimale Bedingungen der <i>N</i> -Reduktion von Ro 48-3656 zu Ro 44-3888	121
3.4.2.2.1	Zeitabhängigkeit	122
3.4.2.2.2	Proteinabhängigkeit	123
3.4.2.2.3	Abhängigkeit der Reduktion vom pH-Wert	124
3.4.2.2.4	Cosubstratabhängigkeit	125
3.4.2.2.5	Substratabhängigkeit	126
3.4.2.3	<i>N</i> -Reduktion von Ro 48-3656 durch Mitochondrien verschiedener Spezies	127
3.5	DISKUSSION	129
4	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER KOMPONENTEN DES <i>N</i>-REDUKTIVEN MITOCHONDRIALEN ENZYMSYSTEMS	137
4.1	EINLEITUNG	137
4.1.1	<i>N</i> -REDUKTIVE ENZYMSYSTEME	137
4.1.2	CYTOCHROM B5	138
4.1.3	NADH CYTOCHROM B5 REDUKTASE	141
4.1.4	CYTOCHROM P450 IN MITOCHONDRIEN	143
4.2	THEMA UND ZIELSETZUNG	145
4.3	METHODEN	146
4.3.1	INHIBITORSTUDIEN	146
4.3.1.1	Allgemeine Durchführung	146
4.3.1.2	Hemmstudien mit typischen P450 Inhibitoren	147
4.3.1.3	Hemmstudien mit anderen selektiven Inhibitoren	147
4.3.2	REINIGUNG UND IDENTIFIZIERUNG DER KOMPONENTEN DER MITOCHONDRIALEN BENZAMIDOXIMREDUKTASE	147
4.3.2.1	Allgemeine Anmerkungen und Geräte	147

INHALTSVERZEICHNIS

4.3.2.2	Gewinnung der Enzympräparationen	148
4.3.2.3	Pufferlösungen: pH 7.4	148
4.3.2.4	Solubilisation	151
4.3.2.5	Hydrophobe Interaktionschromatographie	151
4.3.2.6	Anionenaustauschchromatographie an Hydroxylapatit	152
4.3.2.7	Anionenaustauschchromatographie an DE-52 DEAE-Cellulose	153
4.3.2.8	Gewinnung und Abtrennung der NADH Cytochrom b5-Reduktase durch Bioaffinitäts-Chromatographie an 5'-AMP-Sepharose	153
4.3.2.9	Analytische Methoden zur Überprüfung des Reinigungsverlaufes	154
4.3.2.10	Bestimmung des Proteingehaltes	154
4.3.2.11	Charakterisierung der Proteinfractionen	154
4.3.2.12	Bestimmung der Benzamidoximreduktase-Aktivität	154
4.3.2.13	Verfolgen des Reinigungsverlaufes mittels SDS-Page und Western-Blot	155
4.3.2.14	Materialien und Geräte	155
4.3.2.15	Durchführung	155
4.3.2.16	Sequenzierung des isolierten Enzyms	157
4.4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	157
4.4.1	INHIBITORSTUDIEN	157
4.4.1.1	Übersicht	157
4.4.1.2	Hemmstudien mit typischen P450 Inhibitoren	158
4.4.1.3	Hemmstudien mit anderen selektiven Inhibitoren	163
4.4.2	REINIGUNG DER MITOCHONDRIALEN BENZAMIDOXIMREDUKTASE	165
4.4.2.1	Hydrophobe Interaktionschromatographie	165
4.4.2.2	Anionenaustauschchromatographie an Hydroxylapatit	169
4.4.2.3	Anionenaustauschchromatographie an DE-52 DEAE-Cellulose	173
4.4.2.4	Bioaffinitätschromatographie an 5'-AMP-Sepharose	177
4.4.2.5	Sequenzierung der Proteinbanden	183
4.4.3	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	186
5	ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	188
6	ANHANG	192
7	LITERATURVERZEICHNIS	196