

Identifizierung  
und  
interindividuelle  
Expressionsvariabilität  
der  
hepatischen  
Doxorubizin-Reduktase  
im  
Menschen

Dissertation  
Zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Wissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Nina Kassner  
aus  
Göttingen

Mainz  
2007

„Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen, ein Ozean“

*Isaac Newton*

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Pharmakologische Grundlagen .....	1
1.1.1 Pharmakodynamik und Pharmakokinetik.....	1
1.1.2 Pharmakogenetik und Pharmakogenomik .....	1
1.1.3 Genetische Determinanten der Pharmakokinetik .....	2
1.2 Doxorubizin und andere Anthrazykline in der Antitumorthherapie .....	3
1.3 Wirkmechanismen der Anthrazykline in der Antitumorthherapie.....	5
1.4 Toxizität von Anthrazyklinen .....	6
1.4.1 Allgemeine unerwünschte Nebenwirkungen.....	6
1.4.2 Kardiotoxizität bei Anthrazyklingabe .....	7
1.4.3 Ursachen der Anthrazyklin-vermittelten Herzschäden.....	8
1.4.4 Metabolismus von Doxorubizin .....	12
1.5 Fragestellung.....	19
2. Material und Methoden .....	22
2.1 Material .....	22
2.1.1 Chemikalien.....	22
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	24
2.1.3 Lösungsmittel .....	25
2.1.4 Geräte.....	25
2.1.5 Software.....	26
2.1.6 Biologisches Material .....	27
2.2 Allgemeine molekulargenetische Verfahren.....	31
2.2.1 Mini-Präparation von Gesamt-RNA.....	31
2.2.2 Isolation genomischer DNA .....	31
2.2.3 Isolation bakterieller Plasmid-DNA .....	31
2.2.4 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten .....	32
2.2.5 Alkalische Phosphatase-Behandlung.....	32
2.2.6 Ligation.....	33
2.2.7 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	33
2.2.8 Chemische Transformation von <i>E. coli</i> .....	34
2.2.9 Bakteriendauerkultur .....	35
2.2.10 Ethanol-fällung von DNA oder RNA .....	36

2.2.11 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	36
2.2.12 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	36
2.2.13 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	37
2.2.14 cDNA-Synthese.....	38
2.2.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Methoden.....	38
2.2.16 Kriterien bei der Ableitung von synthetischen Oligonukleotiden (Primern).....	39
2.2.17 Polymerase-Kettenreaktion.....	39
2.2.18 Kolonie-PCR.....	41
2.2.19 Real Time PCR ( <i>TaqMan PCR</i> ).....	41
2.2.20 DNA-Sequenzierung.....	43
2.3 Proteinchemische Methoden.....	44
2.3.1 Zytosolisolation von menschlichen Gewebeproben.....	44
2.3.2 Enzymatische Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol.....	44
2.3.3 Inhibition des Umsatzes von Doxorubizin zu Doxorubizinol.....	46
2.3.4 Chromatographische Bestimmung von Doxorubizin-Metaboliten.....	46
2.3.5 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford.....	48
2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	48
2.3.7 Coomassie-Färbung.....	50
2.3.8 Western Blot.....	50
2.3.9 Dot Blot.....	52
2.3.10 Quantitative Auswertung der Banden des Western Blots.....	53
2.4 Computergestützte Analyseverfahren.....	53
2.4.1 Sequenzanalyse von DNA und Proteinen.....	53
2.5 Statistische Auswertung der Experimente.....	54
2.5.1 Deskriptive Statistik.....	54
2.5.2 Beurteilende Statistik.....	55
3. Ergebnisse.....	58
3.1. HPLC-Messungen.....	58
3.1.1 Inter- und Intraday-Variabilität.....	58
3.1.2 Quantifizierungslimit und Detektionslimit.....	59
3.1.3 Auftrennung der zu analysierenden Substanzen.....	59
3.2 HPLC-Bestimmung der Bildung von Doxorubizinol aus Doxorubizin.....	60
3.2.1 Bestimmung der Bildung von Doxorubizinol aus Doxorubizin durch Zytosole aus verschiedenen humanen Organen.....	60

3.2.2 Bestimmung der Bildung von Doxorubizinol aus Doxorubizin durch rekombinante Aldo-Keto-Reduktasen und Carbonyl-Reduktasen .....	63
3.3 Expressionsmuster verschiedener Aldo-Keto-Reduktasen .....	66
3.3.1 Inhibition der Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol durch verschiedene Inhibitoren .....	73
3.3.2 Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol durch Leberzytosole .....	77
3.4 Western Blot Analyse von verschiedenen Leberzytosolen der IKP148-Studie .....	81
3.4.1 Normalisierung der Western Blots .....	82
3.4.2 Bestimmung der relativen Expression von CBR1 in humanen Lebern .....	83
3.5 Dot Blot Analyse .....	87
3.6 mRNA-Expressionsanalyse von CBR1 bei Proben der IKP148-Leberbank .....	89
3.7 Polymorphismen im CBR1-Gen bei Europäern .....	90
4. Diskussion .....	97
4.1 Charakterisierung der Doxorubizin-Reduktase in humaner Leber .....	97
4.1.1 Leber, Dünndarm und Niere sind die hauptmetabolisierenden Organe von Doxorubizin im Menschen .....	99
4.1.2 Zytosolische Doxorubizin reduzierende Enzyme .....	101
4.1.3 Gewebespezifische Expression verschiedener Aldo-Keto-Reduktasen und Carbonyl-Reduktasen .....	102
4.1.4 CBR1 ist die humane Doxorubizin-Reduktase in der Leber .....	105
4.1.5 Rolle der kardialen Doxorubizin-Reduktion bei der Anthrazyklin-vermittelten Kardiotoxizität .....	106
4.2 Interindividuelle Variabilität im Metabolismus von Doxorubizin .....	109
4.2.1 Starke interindividuelle Variabilität im Metabolismus von Doxorubizin in einer humanen Leberbank .....	109
4.2.2 Expressionsanalyse von CBR1 in Proben einer humanen Leberbank .....	110
4.3 Assoziation von zwei Haplotypen im CBR1-Gen mit einer veränderten Doxorubizin-Reduktase-Affinität .....	113
5. Zusammenfassung und Ausblick .....	117
6. Abkürzungsverzeichnis .....	120
7. Literaturverzeichnis .....	123
8. Anhang .....	149

# 1. Einleitung

## 1.1 Pharmakologische Grundlagen

### 1.1.1 Pharmakodynamik und Pharmakokinetik

Das Ansprechen eines Patienten auf eine Arzneimitteltherapie ist von zahlreichen Prozessen im Körper abhängig, die unter den Begriffen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik zusammengefasst werden. Die Pharmakodynamik beschreibt die Pharmakawirkungen auf die Zielmoleküle, während die Pharmakokinetik sich mit den quantitativen Veränderungen, die der Körper mit dem Arzneimittel vornimmt, in Abhängigkeit von der Zeit beschäftigt. Die Pharmakokinetik umfasst die Freisetzung, die Resorption, die Verteilung, den Metabolismus und die Ausscheidung (Elimination) des Pharmakons. So wird nach der Applikation ein Arzneistoff zunächst aus der Arzneiform freigesetzt, anschließend resorbiert und im Körper verteilt. Die Eliminationsvorgänge, wie Biotransformation und Ausscheidung führen zu einer Abnahme des Wirkstoffes im Organismus. Das Ansprechen auf eine Therapie sowie die toxischen Wirkungen hängen unter anderem von der Konzentration des Medikaments am Wirkort ab. Diese wird ebenfalls durch Biotransformation, Elimination und Verteilungsprozesse beeinflusst.

### 1.1.2 Pharmakogenetik und Pharmakogenomik

Trotz Gabe der gleichen Dosis wird bei den einzelnen Patienten sehr unterschiedliches Ansprechen auf Medikamente beobachtet. Dies kann sowohl mit Lebensumständen (Stress, Ernährung, Rauchgewohnheiten etc.) und der weiteren Medikation zusammenhängen, als auch genetische Ursachen haben. Für die genetischen Faktoren haben sich in den letzten Jahren die Begriffe der Pharmakogenomik und Pharmakogenetik geprägt. Die Pharmakogenetik beschäftigt sich mit der genetischen Variabilität einzelner Gene, die das Ansprechen auf einzelne Arzneimittel bestimmt. Die Pharmakogenomik hingegen beschreibt genomweite Analysen von Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP) als auch mRNA- und Proteinmuster, um Effekte von Arzneistoffen voraussagen oder optimale Arzneimittel für bestimmte Populationsgruppen entwickeln zu können.

Der häufigste Typ eines Polymorphismus' ist ein einzelner Basenaustausch (SNP), der auch Punktmutation genannt wird. Zwischen zwei menschlichen Genomen findet man ca. 1–3 Millionen SNPs, also ungefähr einen alle 1000 – 3000 Basenpaare (Cargill et al 1999, Venter et al 1998, 2001). Der Unterschied zwischen zwei Individuen entspricht somit bis zu 0,1% des Gesamtgenoms. Die Anzahl der SNPs in der Gesamtpopulation beträgt 6-12 Millionen (12 Millionen sind bei der Datenbank dbSNP vermerkt, davon knapp 6 Millionen bestätigt). Davon befinden sich knapp 4 Millionen in intronischen Bereichen und ca. 1 Million in kodierenden Bereichen ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_summary.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_summary.cgi)).

Bei Mutationen spielt ihre Lokalisierung eine große Rolle. In Bezug auf die proteinkodierende Sequenz wird unterschieden, ob der Basenaustausch im exprimierten Protein zu einem Aminosäureaustausch führt oder nicht. Ist dies der Fall, spricht man von einer „missense mutation“. Bewirkt der Austausch einen Abbruch der Translation bedingt durch ein Stopcodon, wird von einer „nonsense mutation“ gesprochen. Wird eine zusätzliche Base eingeschoben, kommt es zur Leserastermutation (frame shift mutation), welches meistens zur vorzeitigen Unterbrechung der Proteinsequenz führt. Die beiden letzteren Mutationsarten sind besonders schwerwiegend, weil sie meist zu einem nicht funktionsfähigen Protein führen (Guttmacher & Collins 2002). Aber auch Mutationen in regulatorischen Bereichen als auch an Spleißregionen können zu Änderungen der Proteinexpression bzw. Zusammensetzung führen.

### **1.1.3 Genetische Determinanten der Pharmakokinetik**

Genvarianten können sowohl die Pharmakokinetik als auch Pharmakodynamik von Arzneimitteln beeinflussen, wobei die erstere durch die einfachere Methodik besser verstanden ist. Besonders relevant sind Polymorphismen, welche die Pharmakokinetik der Arzneimittel mit einer geringen therapeutischen Breite beeinflussen. Mutationen können hierbei bewirken, dass die Wirkstoffspiegel sich außerhalb des therapeutischen Bereiches befinden und somit je nach Effekt eine zu niedrige oder zu hohe Dosis des Arzneimittels am Wirkort vorhanden ist. Beispielsweise führen Mutationen im Thiopurin-Methyltransferase-Gen (TPMT) zu einer herabgesetzten Enzymaktivität und damit zu einem zu hohen Wirkstoffspiegel von dem Chemotherapeutikum Mercaptopurin, welcher mit einer gastrointestinalen Toxizität, Myelosuppression, Mukositis und Alopezie einhergehen kann (Relling et al 1999, McLeod et al 1999). Interessanterweise können solche Mutationen auch von Vorteil sein: ALL-Patienten, die für eine der inaktivierenden TPMP-Mutationen

heterozygot sind, zeigen eine höhere Heilungsrate als Patienten mit zwei normalen Allelen (Stanulla et al 2005).

Eine enge Beziehung zwischen Nutzen und Nebenwirkung in Abhängigkeit vom Genotyp kann bei der Arzneimitteltherapie häufiger beobachtet werden. Je nach Grad des Metabolismus kann es entweder zu einem zu geringen Wirkstoffspiegel mit nicht ausreichender Wirkung oder bei verlangsamtem Abbau zu toxischen Wirkstoffspiegeln kommen. Eine individuelle Anpassung nach einem Gentest ist zur Zeit nur bei wenigen Medikamenten möglich wie z.B.: TPMT, 6-Mercaptopurin; UDP-Glucuronosyltransferase UGT1A1, Irinotecan (Marsh 2007, Fargher et al 2007, Hasegawa et al 2006, Innocenti et al 2006, Maitland et al 2006). Zur Herabsetzung einer möglichen Toxizität bei 5-Fluoruracil-Gabe und einem Dihydropyrimidin-Dehydrogenase-Polymorphismus wird ein Gentest z.Zt. diskutiert (Morel et al 2006, Yen & McLeod 2007, Marsh et al 2006).

Auch für Anthrazyklin-Chemotherapeutika wie das Doxorubizin beobachtet man große interindividuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik, die für das Ansprechen der Therapie oder aber für die Nebenwirkungen wichtig sein könnten. Variabel sind sowohl die Plasmaspiegel der Anthrazykline als auch ihrer Metaboliten (Andersen et al 1999, Dobbs et al 1995). Diese Unterschiede könnten zum Teil durch den individuell variablen Abbau der Anthrazykline zustande kommen. Ein zu starker Metabolismus des Medikaments kann zu einer verminderten Tumorresponse führen und Resistenzen begünstigen; ein zu langsamer Abbau könnte zu Nebenwirkungen führen, von denen eine irreversible Herzschiädigung am relevantesten ist. Die Ursachen dieser interindividuellen Unterschiede im Metabolismus des Chemotherapeutikums Doxorubizin, insbesondere bei der Bildung des toxischen C13-Alkohol-Metabolits Doxorubizinol, sollen in dieser Arbeit beschrieben werden. Insbesondere soll auf die Rolle der individuellen genetischen Ausstattung eingegangen werden.

## **1.2 Doxorubizin und andere Anthrazykline in der Antitumorthherapie**

Die ersten auf menschliche Zellen zytostatisch wirksamen Antibiotika wurden in den sechziger Jahren aus dem Pilz *Streptomyces peucetius* var. *Caesius* isoliert (Di Marco et al. 1969) und als Anthrazykline bezeichnet. Sie gehören seit über 40 Jahren zu den effektivsten Chemotherapeutika gegen Krebs. Alle Anthrazyklin-Chemotherapeutika bestehen aus einem Anthrachinonringsystem, an das ein weiterer Ring linear anneliert ist und an den glykosidisch ein Daunosaminzucker gebunden ist (Abb. 1.1). Seit der Einführung der



Anthrazykline Doxorubizin und Daunorubizin wurden immer weitere Analoga entwickelt wie z.B. Epirubizin, Idarubizin und verschiedene Iodo- und Morpholinodoxorubizin-Derivate (Hurteloup & Ganzina 1986, Gianni et al 1990, Robert & Gianni 1993).

Doxorubizin ist gegenwärtig das therapeutisch bedeutendste Anthrazyklin und eines der wichtigsten Chemotherapeutika in der Krebstherapie. Beim Doxorubizin ist im Vergleich zu Daunorubizin in der Seitenkette des Anthrachinons neben der bei Anthrazyklinen vorhandenen Carbonylgruppe eine zusätzliche primäre Hydroxylgruppe vorhanden (Abb. 1.1). Doxorubizin ist wichtiger Bestandteil der Polychemotherapie bei verschiedensten Formen der Krebstherapie (Doroshov et al 1991, Shan et al 1996). Es kommt in Kombination mit anderen Chemotherapeutika bei non- und Hodgkin-Lymphomen, Weichteilsarkomen, und dem Mamma-, Bronchial- und Harnblasenkarzinom zur Anwendung. Nur wenige Krebsarten wie z.B. Darmkrebs sprechen nicht auf eine Doxorubizin-Behandlung an (Weiß 1992).

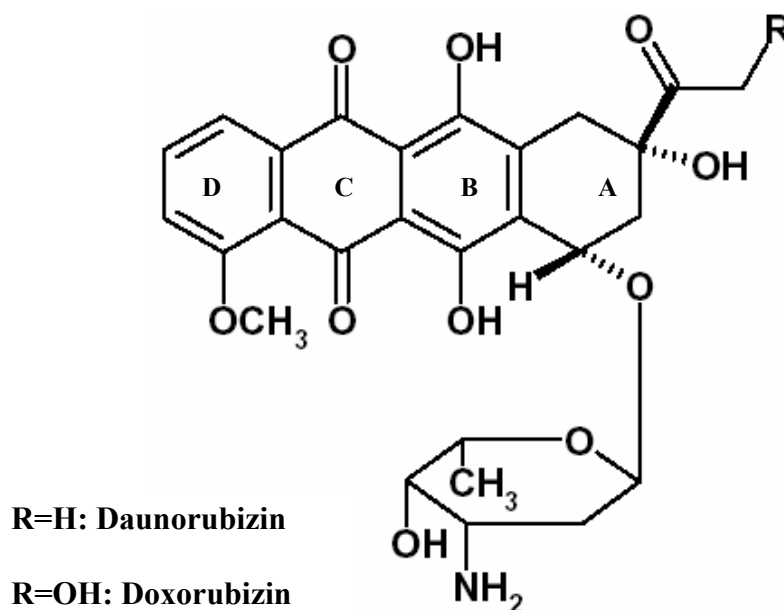


Abb. 1.1: Chemische Struktur von Doxorubizin und Daunorubizin: (8S,10S)-10-(4-amino-5-hydroxy-6-methyl-tetrahydro-2H-pyran-2-yloxy)-6,8,11-trihydroxy-8-(2-hydroxyacetyl)-1-methoxy-7,8,9,10-tetrahydrotetracene-5,12-dione und 8-acetyl-10-((3-amino-2,3,6-trideoxy-alpha-L-lyxo-hexopyranosyl)oxy)-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-1-methoxy-,(8S,10S)-5,12-naphthacenedione.

### 1.3 Wirkmechanismen der Anthrazykline in der Antitumortherapie

Für die zytotoxische Wirkung von Anthrazyklinen werden verschiedene Mechanismen postuliert, deren relative Bedeutung unklar ist:

Interkalation in die DNA: Anthrazykline bilden stabile Interkalationskomplexe mit der DNA (Facchinetti et al 1978, Frederick et al 1990). Dadurch kommt es zu einer teilweisen Entspiralisierung der DNA-Helix und damit zur Unterbrechung der DNA-Replikation und Transkription. Eine Komplexierung mit Anthrazyklinen wurde weiterhin für ribosomale RNA beschrieben (Patel et al 1978, 1981).

Hemmung der Topoisomerasen: Anthrazykline binden kovalent an die Topoisomerase I (Foglesong et al 1992) und II (Capranico et al 1990, Zunino et al 1990) sowie an die Helikase (Bachur et al 1992, 1998, Gewirtz 1999), wodurch indirekt die DNA-Synthese herabgesetzt wird. Der Hemmung der Topoisomerase II wird die größte Bedeutung zugeschrieben.

Bildung von freien Radikalen: Eine starke Bildung von Radikalen kann durch Schädigung der Zellorganellen zum Zelluntergang führen (del Maestro 1980). Die Bildung von freien Radikalen wird mit den antineoplastischen als auch mit den kardiotoxischen Nebenwirkungen der Anthrazykline in Verbindung gebracht. Der genaue Mechanismus der Radikalbildung wird in 1.4.3 beschrieben.

Unabhängig von der Wirkungsweise der Anthrazykline konnte in Mäusen mit Tumoren gezeigt werden, dass die Antitumor-Wirkung mit der Doxorubizin-Konzentration im Tumor einhergeht. So zeigten Boven et al 1996, dass die *in vitro* gemessene antiproliferative Wirkung von verschiedenen Anthrazyklinen mit der *in vivo* gemessenen Konzentration der Substanz und einer Wachstumshemmung des Tumors einhergeht. Weiterhin zeigten Sadzuka et al (1998, 2000, 2002, Sugiyama 2001), sowohl für Karzinomzellen als auch für Mäuse mit Tumoren, dass verschiedene Substanzen aus grünem Tee den Effluxtransport von Doxorubizin aus dem Tumor reduzieren bzw. verhindern und dadurch die Antitumorwirkung gesteigert wird. Verschiedene Inhibitoren von Effluxtransportern wie Verapamil (p-Glykoprotein-Inhibitor) als auch Dihydrokainat (Inhibitor des Glutamattransporters) hemmen effektiv den Transport von Doxorubizin aus dem Tumor und verbessern die Antitumoraktivität (Sugiyama & Sadzuka 2004, Sadzuka et al 2002, Kuffel & Ames 1995), da der Doxorubizingehalt im Tumor ansteigt.

Interessanterweise zeigen Anthrazyklin-resistente Tumorzelllinien oft eine Herabsetzung der Anthrazyklin-Konzentration und somit eine Reduktion der Antitumorwirkung, z.B. durch eine Hochregulation von p-Glykoproteinen (Coley et al 1993, Nielsen et al 1996,

Mankhetkorn et al 1998) oder durch verstärkten Metabolismus des Anthrazyklins, hauptsächlich zu dem C13-Alkohol-Metabolit. So zeigten Soldan et al (1996) und Ax et al (2000), dass eine Daunorubizin-resistente Karzinomzelllinie vermehrt Daunorubizin metabolisierende Enzyme exprimiert und unter verstärkter Bildung des C13-Metabolits die Anthrazyklin-Konzentration und damit die Antitumoraktivität sank. Auch die Transfektion einer human Pankreaskarzinomzelllinie mit den Daunorubizin-Reduktasen AKR1A1, AKR1B1 und CBR1 führte zu einem erhöhten Abbau zu Daunorubizinol und damit zu einer vermehrten Resistenzbildung (Plebuch et al 2007). *In vitro* wurde die wesentlich niedrigere zytotoxische Wirkung der C13-Alkohol-Metabolite als auch der Aglykone im Gegensatz zur Ausgangssubstanz an Tumorzellen vielfältig bewiesen (Schott & Robert 1989, Dorr et al 1991, Chang et al 1989, Kuffel et al 1992, Ozols et al 1980).

## **1.4 Toxizität von Anthrazyklinen**

### **1.4.1 Allgemeine unerwünschte Nebenwirkungen**

Wie alle Chemotherapeutika haben Anthrazykline neben den erwünschten zytostatischen Wirkungen an malignen Zellen auch Wirkungen auf normale Zellen. Dies betrifft am stärksten Gewebe mit sich schnell teilenden Zellen, die sogenannten Wechselgewebe. Insbesondere zählen dazu das Knochenmark, der Gastrointestinaltrakt, Schleimhäute und Haarfollikel. Die typischen Nebenwirkungen einer Chemotherapie mit Anthrazyklinen sind daher Knochenmarkdepression, Durchfall, Übelkeit, Erbrechen (Carl et al 1986, Love et al 1989, Zeltzer et al 1984), Haarausfall (Selleri et al 2006, Cece et al 1986) und palmar-plantare Erythrodyssästhesie (Hand - Fuß - Syndrom; Schmook et al 2005, Jones & Crawford 1989). Die Knochenmarkdepression bewirkt eine Schwächung der Immunabwehr durch verminderte Lymphozytenzahl, und daher eine stark erhöhte Infektanfälligkeit der therapierten Patienten. Weiterhin können langanhaltende Chemotherapien zu hämolytischen Anämien führen, die auf der Bildung freier Radikale bei vermindertem Glutathiongehalt der Erythrozyten beruhen (Amitai et al 1996). Die genannten Nebenwirkungen sind jedoch reversibel.

### 1.4.2 Kardiotoxizität bei Anthrazyklingabe

Die klinische Anwendung von Anthrazyklinen wird am stärksten durch seine kardiotoxische Wirkung eingeschränkt. Hierbei wird zwischen akuter und chronischer Kardiotoxizität unterschieden, wobei die Letztere von wesentlich größerer Bedeutung ist.

#### Akute Kardiotoxizität:

Die akute Kardiotoxizität zeigt sich während der Behandlung mit Anthrazyklinen meistens durch eine Abnahme der Myokardkontraktilität sowie durch Sinustachykardien oder ventrikuläre und supraventrikuläre Arrhythmien und andere Herzrhythmusstörungen im Elektrokardiogramm (EKG), seltener als Myokardinfarkt oder Perikarditis (Steinberg et al 1985). Diese Nebenwirkungen sind dosisunabhängig. Die meisten Symptome sind reversibel, und daher ist die akute Kardiotoxizität klinisch-epidemiologisch wenig relevant.

#### Chronische Kardiotoxizität:

Diese Form manifestiert sich Monate bis Jahrzehnte nach der Therapie als Herzinsuffizienz (Wojtacki et al 2000). Es wird vermutet, dass die Herzschädigung zunächst kompensiert werden kann, und erst durch den Einfluss weiterer Faktoren wie z.B. Infektionen, Gewichtszunahme und Alter (Von Hoff 1979) der Verlust der Kompensation manifest wird.

Die chronische Kardiotoxizität hängt stark von der kumulativen Anthrazyklin-Dosis ab. Bei Überschreiten eines Schwellenwertes von 550 mg Doxorubizin/m<sup>2</sup> Körperoberfläche wurde 1979 in der von Hoff-Studie (von Hoff et al 1979) ein besonders steiler Anstieg der Herzinsuffizienz beobachtet, welcher auf Schädigungen des Myokards zurückgeführt wird. Ausgehend von diesen Untersuchungen wurden für Anthrazykline kumulative Höchstdosen (z.B. 550mg/m<sup>2</sup> für Doxorubizin) veranschlagt. Jedoch belegen Daten aus den letzten Jahren eine nach wie vor hohe Prävalenz der chronischen Kardiotoxizität. So fand man bei 20% der Brustkrebspatientinnen bereits nach drei Jahren kongestives Herzversagen (Jensen et al 2002); bereits nach zehn Jahren Beobachtungszeit zeigten 38% der Patienten kardiale Funktionsabnormalitäten (Steinherz et al 1991). Von kardialen Funktionsabnormalitäten sind insbesondere Patienten betroffen, die als Kinder mit Anthrazyklinen behandelt wurden. Sie zeigen Beeinträchtigungen der Herzfunktion in bis zu 65% der Fälle (Lipshultz et al 1991, Grenier et al 1998).

Aus klinischer Sicht sind die Späteffekte der Anthrazyklingabe von großer Bedeutung, da Herzinsuffizienz eine gravierende Erkrankung darstellt, die mit hoher Sterblichkeit assoziiert ist (Praga et al 1979). Das Auftreten einer Herzinsuffizienz ist die Folge einer medikamentenbedingten Myozytenschädigung sowie des Versagens der kompensatorischen Mechanismen. Morphologisch zeigt sich diese in einem Verlust der zytoplasmatischen

Myofibrillen, einer vakuolären Degeneration und einer Degeneration der Cristae der Mitochondrien (Le Frak 1973, Friedman et al 1978). Es kommt zu einer dilatativen Kardiomyopathie, die durch Ventrikelvergrößerung und Dünnerwerden der Herzwände gekennzeichnet ist. Die Folge ist eine Einschränkung der kontraktiven Funktion des dilatierten Herzens. Infolgedessen kommt es zu Ödemen und eingeschränkter Leistungsfähigkeit.

Die interindividuelle Toleranz auf Doxorubizin ist sehr verschieden (Shan et al 1996). So zeigt sich bei einigen Patienten schon nach geringer Gabe von Doxorubizin eine chronische Kardiomyopathie, während andere Patienten zwanzigfach höhere Dosen gut tolerieren (Cortes et al 1975, Henderson et al 1989). Dies und die Tatsache, dass nicht alle Patienten diese Nebenwirkung zeigen, deutet auf eine genetische Prädisposition bzw. auf eine Beteiligung genetischer Polymorphismen hin. Risikofaktoren wie fortgeschrittenes Alter (von Hoff 1979), weibliches Geschlecht (Krischer et al 1997) vorbestehende Herzkrankheiten und Bluthochdruck (von Hoff et al 1979) spielen ebenfalls eine Rolle, können jedoch die interindividuelle Variabilität in der chronischen Kardiotoxizität nicht vollständig erklären.

### **1.4.3 Ursachen der Anthrazyklin-vermittelten Herzschäden**

Die herzscheidende Wirkung der Anthrazykline ist bisher nicht endgültig geklärt. Man vermutet jedoch, dass es mehrere kumulative Faktoren gibt, die zur chronischen Herzscheidigung beitragen können. Folgende Mechanismen stehen in Verdacht:

Kalzium-Homöostase: In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Doxorubizin Behandlung eine irreversible Abnahme der Kalzium-Beladungskapazität in den Mitochondrien bewirkt (Zhou et al 2001). Weiterhin stimuliert Doxorubizin die Freisetzung von Kalzium aus Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulums von isolierten Herzzellen und Zellen der quergestreiften Muskulatur (Holmberg & Williams 1990, Shadle et al 2000). Dieser Kalzium-Influx in die Kardiomyozyten beeinträchtigt die Herzkontraktilität und kann weiterhin zum Absterben der Zelle führen (Olson et al 1974). Auch diverse Proteine, welche die Kalzium-Homöostase steuern wie z.B. der Ryanodin-Rezeptor, die sarkoplasmatische Kalzium-ATPase und Calsequestrin werden erhöht, was zur Beeinträchtigung der Herzkontraktilität führen kann (Arai et al 1998).

Freisetzung von Radikalen: Die Ein-Elektronen-Reduktion von Doxorubizin zu einem Semichinon wird durch viele verschiedene Enzyme katalysiert und wurde *in vitro*

ausführlich untersucht (Bachur et al 1977, Gutierrez et al 1983, Lown et al 1982, Cummings et al 1992). Anthrazykline sind Substrate für verschiedene Oxidoreduktasen wie z.B. die NADPH-abhängige Cytochrom-P450-Reduktase (Bachur et al 1977, Schroterova et al 2004), endotheliale NO-Synthase (eNOS), NADH-Dehydrogenase des Komplexes I der mitochondrialen Atmungskette (Akman et al 1992, Wong et al 2000, Kasahara et al 1994), NADPH-Oxidase (Vasquez-Vivar et al 1997, Minotti et al 1999), DT-Diaphorase (Kasahara et al 1994, Badary et al 2004) u.v.m., welche Ein-Elektronen-Reduktionen katalysieren (Abb. 1.2). Durch die vorübergehende Reduktion der Anthrazykline zum Semichinonradikal durch verschiedene Oxidoreduktasen entstehen reaktive Sauerstoffspezies (radical oxygen species, ROS), welche sehr wahrscheinlich zur Kardiomyopathie beitragen (Shan et al 1996, Olson & Mushlin 1990, Suzuki & Ford 1999, Zhou et al 2001). Zudem sind Enzyme wie Katalasen, Peroxidasen und Dismutasen, die dem oxidativen Stress entgegenwirken könnten, im Vergleich zu anderen Geweben im Herzen nur gering exprimiert. Das Semichinon reagiert sofort mit Sauerstoff und bildet ein Superoxidradikal, wobei das Anthrazyklin wieder hergestellt wird (Anthrazyklin Redoxcycling) (Dikalov et al 1991,1992).

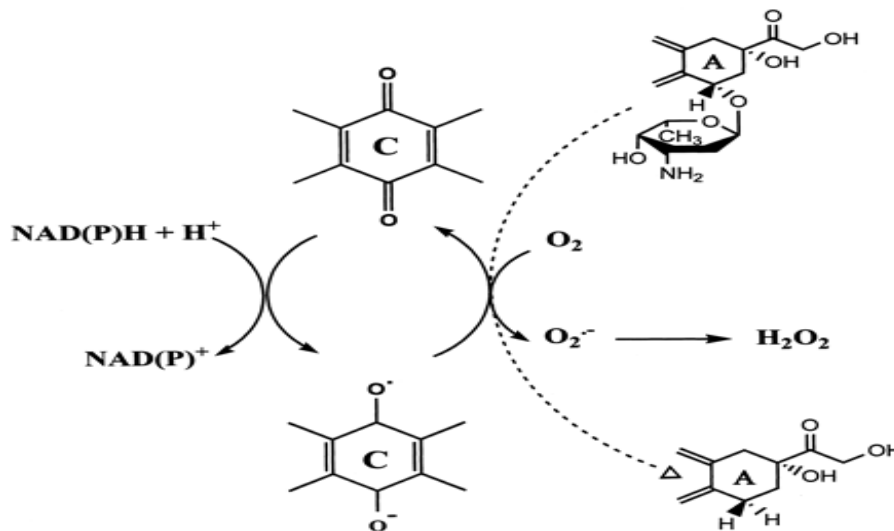
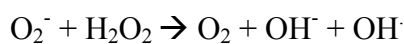


Abb. 1.2: Redoxzyklus von Doxorubizin

Die Superoxid-Dismutase katalysiert die Umsetzung von dem Superoxidradikal zu Wasserstoffperoxid, welches über die Haber-Weiß- und Fenton-Reaktion hoch reaktive Hydroxylradikale bilden kann (Kehrer et al 2000); letztere Reaktion oxidiert Eisen-Ionen.



Haber-Weiß Reaktion



Fenton Reaktion

Radikale können auch durch Bindung von Doxorubizin an Eisen-Spezies und anschließender Reduktion von molekularem Sauerstoff entstehen (Gianni et al 1985). Weiterhin können die gebildeten Radikale dreiwertiges Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) komplexieren (Mordente et al 2001, Minotti et al 1999, 2004, Kwok et al 2002, Menna et al 2002) und es eisenhaltigen Enzymen wie z.B. der Akonitase entziehen (Minotti et al 2004, Kwok et al 2002, Mordente et al 2001).

Freie Radikale besitzen ein enormes Potential für die unmittelbare Schädigung von DNA, RNA, Lipiden und Enzymen (del Maestro 1980, Halliwell 1989, 1994) und können bei starker Freisetzung zur Apoptose führen (Zhu et al 1999). Die Freisetzung von Radikalen wird üblicherweise mit den unerwünschten Nebenwirkungen der Anthrazykline, wie z.B. der kardiotoxischen Wirkung, in Zusammenhang gebracht (Rajagopalan et al 1988), sie könnte jedoch auch an der antineoplastischen Wirkung beteiligt sein. Da jedoch das Anthrazyklin Epirubizin keine radikalen Sauerstoffspezies verursacht (Salvatorelli et al 2006), aber auch bei diesem Anthrazyklin als Spätfolge Kardiotoxizität auftreten kann, kann die Bildung von ROS als alleiniger Auslöser einer Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität ausgeschlossen werden. Dieser Mechanismus wird deshalb hauptsächlich mit der akuten Kardiotoxizität in Verbindung gebracht (Menna et al 2007, Salvatorelli et al 2007).

Bildung von Doxorubizinol: In Kardiomyozyten als auch in anderen Geweben wird Doxorubizin zu dem C13-Alkohol-Metaboliten Doxorubizinol durch eine noch nicht genau charakterisierte NADPH-abhängige Aldo-Keto- (oder Carbonyl-) Reduktase umgesetzt (Kapitel 1.4.4, Abb. 1.3). Doxorubizinol ist der Hauptmetabolit des Doxorubizins. Die Bildung von Doxorubizinol führt einerseits zu einer starken Herabsetzung der chemotherapeutischen Wirkung, während andererseits dieser Metabolit im Verdacht steht, die Kardiomyozyten schwer zu schädigen und so zu einer Herzinsuffizienz zu führen. Dieser postulierte Mechanismus wird als Metaboliten-Theorie bezeichnet und im folgenden Abschnitt mit den bisherigen Erkenntnissen gesondert erläutert (1.4.3.1).

#### 1.4.3.1 Die „Metaboliten-Theorie“

Im Laufe der Erforschung der kardiotoxischen Wirkungen von Anthrazyklinen ließen viele Forschungsergebnisse die Vermutung zu, dass der C13-Alkohol-Metabolit die schwerwiegenden Herzschädigungen der chronischen Kardiotoxizität (mit)verursacht. Im Menschen wird die Umwandlung von Doxorubizin zu Doxorubizinol von einer nicht weiter charakterisierten zytosolischen Oxidoreduktase (Aldo-Keto-Reduktase (AKR), short chain

dehydrogenase/reductase (SDR) (1.4.4.1)) katalysiert (Mordente et al 2003), die hauptsächlich in Leber und Niere vorkommt (Loveless et al 1978) und deren Charakterisierung der Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist. Auf die Gesamtheit des Metabolismus von Doxorubizin wird in Abschnitt 1.4.4 eingegangen.

Die Rolle des Doxorubizinols bei der Anthrazyklin-Toxizität ist noch nicht hinreichend geklärt. Untersuchungen haben gezeigt, dass erst nach Abklingen des Doxorubizin-Plasmaspiegels, während der Doxorubizinol-Spiegel seinen Höhepunkt hat, die ersten Anzeichen einer Herzschiädigung auftreten können (Olson & Mushlin 1990, Cusack et al 1993, Sacco et al 2003). Auch Stewart zeigte 1993 *antemortem* am Menschen, dass die Menge an Doxorubizinol im Herzen proportional mit der Zeit seit der ersten Doxorubizin-Behandlung und der kumulativen Dosis anstieg, während die Doxorubizin-Konzentration abnahm.

Doxorubizinol wirkt weniger toxisch gegen Tumorzellen, umso mehr ist es jedoch kardiotoxisch im Vergleich zur Ausgangssubstanz (Wang et al 2001). In Tierstudien zeigte sich, dass Doxorubizinol sich durch die gestiegene Polarität im Herzgewebe anreichert und mit ansteigendem Doxorubizinol-Gehalt die Herzfunktion abnimmt (Cusack et al 2003, Del Tacca et al 1985, Rossini et al 1986). Weiterhin korreliert in transgenen Mäusen, die humane Carbonyl-Reduktase 1 (CBR1) im Herzen exprimieren, der Anstieg von Doxorubizinol mit der Bildung von Herzschiädigungen (Olson et al 2003). CBR-Knock-Out-Mäuse liefern ein entgegengesetztes Bild; Herzschiädigungen traten bei ihnen wesentlich später auf als in Kontrolltieren (Forrest et al 2000). Die Hemmung der kardialen Kontraktilität wird auf die Doxorubizinol-Fähigkeit zurückgeführt, ATPasen im sarkoplasmatischen Retikulum, in den Mitochondrien und im Sarkolemma zu hemmen (Mushlin et al 1993, Moore et al 1977, Unverferth et al 1982, Olson et al 1988, Boucek et al 1987). Insbesondere die Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im sarkoplasmatischen Retikulum durch Doxorubizinol scheint durch Modulation der Kalzium-Homöostase zu der Pathophysiologie im Herzen beizutragen.

Doxorubizinol ist weiterhin in der Lage,  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen aus Proteinen zu lösen, welche zu  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen reduziert werden und dabei Doxorubizinol zu Doxorubizin oxidieren. (Brazzolotto et al 2003, Minotti et al 1995, 1998). Dabei entstehen ROS. Nach dem Entfernen des  $\text{Fe}^{3+}$ -Ions durch Doxorubizinol aus der Aconitase löst sich der [4Fe-4S] Cluster aus dem Protein, es kommt zu einer Konformationsänderung und das Protein erfüllt nun die Funktion eines transkriptionellen Regulators IRP-1 (iron regulatory protein 1) (Minotti et al 1995, 1998, 2000, 2001). Es kommt zur Transkriptionsveränderung einiger eisenhaltigen Proteine, die



Eisen-Ionen Verfügbarkeit wird reduziert, die Eisen-Homöostase gestört (Minotti et al 1998, Brazzolotto et al 2003).

Einige Forschungsergebnisse argumentieren auch gegen die Metaboliten-Theorie. So gibt es Studien, die zeigen, dass in künstlich durchbluteten Herzen Doxorubizin eine höhere Toxizität zeigt als Doxorubizinol (Platel et al 2001). Auch in einem Rattenmodell zeigte Doxorubizin stärkere Schädigungen am Herzen wie EKG-Veränderungen und Zellläsionen als Doxorubizinol (Danesi et al 1986, 1987). Eines der größten Probleme ist jedoch, dass bei den Forschungen meistens höhere Medikamenten-Konzentrationen eingesetzt werden, als sie bei einer Anthrazyklin-Therapie im Menschen vorkommen.

Ungeklärt ist weiterhin auch die kardiale Aufnahme von Alkohol-Metaboliten in das Herz aus dem Blutkreislauf. Kang et al (2001, 2003) zeigten für Idarubizin, dass der kardiale Gehalt des Anthrazyklins durch „Multidrug resistance“-Proteine MDR moduliert wird. Dies bedeutet, dass Anthrazykline über den Blutkreislauf in das Herz aufgenommen werden können. Die erhöhte Aufnahme des Anthrazyklins führt zu einem erhöhten Metabolismus zu dem Alkohol-Metaboliten im Herzen. Eine kardiale Aufnahme von Anthrazyklin-Alkohol-Metaboliten konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden.

Die für die Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol verantwortlichen Enzyme sind unzureichend bekannt und sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifiziert und näher charakterisiert werden. Die Kandidaten-Proteine werden im Folgenden zusammen mit dem Wissensstand über den Anthrazyklin-Metabolismus beschrieben.

#### **1.4.4 Metabolismus von Doxorubizin**

Nach einer Doxorubizin-Injektion wird Doxorubizin zu einem großen Teil unverändert über die Galle ausgeschieden, während der andere Teil (über 50%) bei der ersten Leberpassage durch Phase-I-Enzyme metabolisiert und ausgeschieden wird (Mross et al 1988, Takanashi & Bachur 1976). Der wichtigste Metabolit ist das weniger zytotoxische Doxorubizinol (I in Abb. 1.3). Darüber hinaus sind zwei andere Metabolisierungswege bekannt (Bachur & Gee 1971), die eine Ausscheidung des Doxorubizins möglich machen:

- Eine reduktive Abspaltung des Daunosaminrests unter Bildung des Aglykons 7-Deoxy-Doxorubizinon (III in Abb. 1.3) und
- eine hydrolytische Abspaltung des Daunosaminrests unter Bildung des Aglykons 7-Hydroxy-Doxorubizinon (IIA in Abb. 1.3), welche durch die Reduktion der C13-

Carbonylgruppe zu 7-Hydroxy-Doxorubizinolon weiter reagieren kann (IIB in Abb. 1.3) (Licata et al 2001).

Die Bildung von 7-Hydroxy-Doxorubizinolon wird durch Hydrolase-ähnliche Glykosidasen katalysiert. 7-Deoxy-Doxorubizinon kann durch Reduktase-ähnliche Glykosidasen als auch durch intramolekulare Umlagerungen gebildet werden. Dabei wird das Chinongerüst des Doxorubizins durch eine Ein-Elektronen-Reduktion zum Semichinon umgesetzt, welches durch Abspaltung des Zuckerrestes das 7-Deoxy-Doxorubizinon bildet (Licata et al 2001). Diese Aglykon-Metaboliten sind nicht mehr zytotoxisch wirksam (Dessypris et al 1986). Die Ein-Elektronen-Reduktion von Doxorubizin zu einem Semichinon wurde bereits in Abschnitt 1.4.3 beschrieben.

In der letzten Zeit gab es weiterhin Publikationen, die von einer Degradation des Doxorubizins durch zelluläre Peroxidasen zu 3-Methoxyphthalsäure und 3-Methoxysalicylsäure berichten. Diverse Peroxidasen und Enzyme mit Pseudoperoxidase-Aktivität können in Anwesenheit von  $H_2O_2$  diese Reaktion katalysieren. Diese Degradation führt zur kompletten Inaktivierung der antineoplastischen Wirkung (Reszka et al 2005, Cartoni et al 2004, Bomgaars et al 1997).

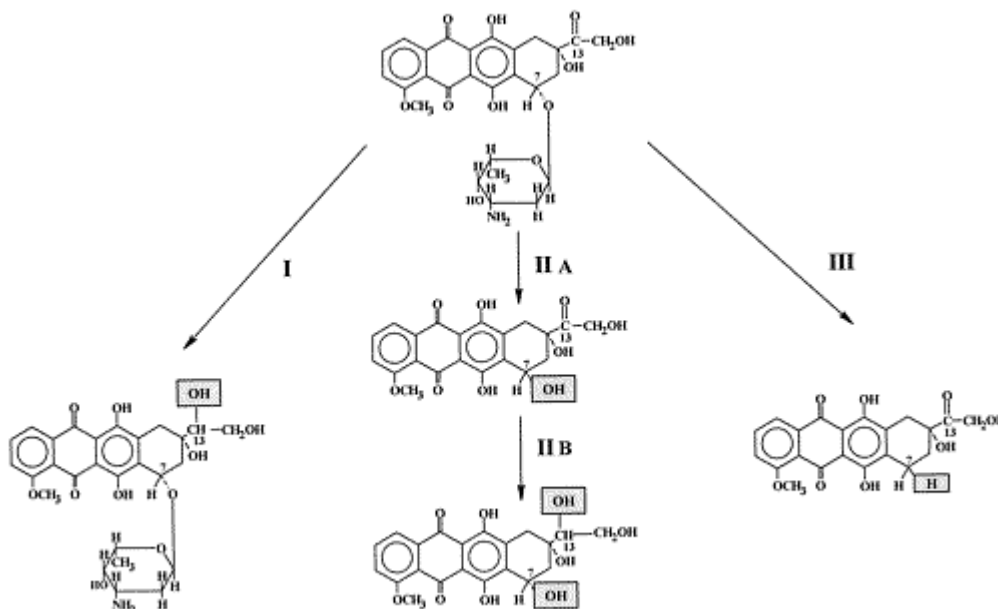


Abb. 1.3: Metabolismus von Doxorubizin: Carbonyl-Reduktion zu Doxorubizinolon (I), Hydrolase vermittelte Deglykosilierung zu 7-Hydroxy-Doxorubizinon (IIA) mit anschließender Carbonyl-Reduktion zu 7-Hydroxy-Doxorubizinolon (IIB) und Reduktase-vermittelte Deglykosilierung zu 7-Deoxy-Doxorubizinon (III). (Licata et al 2001).

Die Bildung vom wichtigsten Metaboliten, Doxorubizinol, erfordert eine Zwei-Elektronen-Reduktion und wird bei Mäusen und Kaninchen durch eine Carbonyl-Reduktase vermittelt (Mordente et al 2003, Olson et al 2003). Im Menschen wird die Reaktion von einer nicht weiter charakterisierten zytosolischen Oxidoreduktase (Aldo-Keto-Reduktase (AKR) bzw. short chain reductase (SDR) (1.4.4.1)) katalysiert (Mordente et al 2003), die hauptsächlich in Leber und Niere vorkommt (Loveless et al 1978) und deren Charakterisierung der Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist.

#### 1.4.4.1 Carbonyl reduzierende Enzyme

Die Carbonyl-Reduktion ist ein wichtiger Schritt der Phase-I-Biotransformation einer großen Anzahl physiologischer und xenobiotischer Substanzen, die eine Carbonylgruppe besitzen (Ikeda et al 1981, Higuchi et al 1993, Imamura et al 1991, 1993).

Die Carbonyl-Reduktion bewirkt bei einigen Medikamenten eine Inaktivierung (Rosemond & Walsh 2004) wie z.B. bei R-Warfarin (bis zu 40%, Hewick & Moreland 1975, Hermans & Thijssen 1992, Kaminsky & Zhang 1997, Takahashi & Echizen 2001) und Haloperidol (Imamura et al 1993, Chang 1992). Andererseits werden auch viele Pharmaka durch Carbonyl-Reduktion zu aktiven Metaboliten umgewandelt wie z.B. bei Naltrexon (Porter et al 2002) und Propanolol (Bodor und Prokai 1990). Weiterhin hat die Carbonyl-Reduktion eine wichtige Funktion bei der Detoxifizierung von Chinonen (Wermuth et al 1986) und Aflatoxin B<sub>1</sub> (Hayes et al 1993).

In der Vergangenheit wurden Enzyme, welche ein breites Substratspektrum für xenobiotische Carbonylverbindungen aufzeigten, als Aldo-Keto-Reduktasen bzw. Carbonyl-Reduktasen bezeichnet. Nach Aufklärung ihrer Primärstruktur wurden die Enzyme in zwei Superfamilien, die Aldo-Keto-Reduktasen (AKR) und die kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (short-chain dehydrogenase/reductase = SDR) eingeteilt.

Einige Unterschiede zwischen den AKRs und den SDRs zeigt Tabelle 1.1:

Superfamilie	AKR	SDR
<b>Kettenlänge, Aminosäuren</b>	ca. 320	250-350
<b>Struktur</b>	TIM barrel	Rossmann Faltung
<b>Co-Faktor</b>	NADPH	NADPH
<b>Aktives Zentrum</b>	Asp - Tyr - Lys - His	Ser - Tyr - Lys

Tabelle 1.1: Merkmale der SDR und AKR Superfamilie.

### Die SDR-Superfamilie:

Enzyme der SDR-Superfamilie bestehen aus 250-320 Aminosäuren, sie liegen in der Rossmann-Faltung vor und binden als Co-Faktor NADPH. Die katalytische Triade besteht aus den Aminosäuren Serin, Tyrosin und Lysin (Hoffmann & Maser 2007).

Im Menschen sind sechs Carbonyl reduzierende Enzyme aus der SDR Superfamilie bekannt: 11- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1(11- $\beta$ -HSD), welche in den Mikrosomen lokalisiert ist, Dehydrogenase/Reduktase (DHRS4), welche sich in den Peroxisomen befindet, und die zytosolischen Enzyme L-Xylulose-Reduktase sowie drei verschiedene Isoformen von Carbonyl-Reduktasen (CBRs). Die humanen CBR-Gene werden als CBR1, CBR3 und CBR4 bezeichnet. In dieser Arbeit wurden primär zytosolische Carbonyl reduzierende Enzyme untersucht, weil die Carbonyl-Reduktion von Doxorubizin durch die zytosolische Zellfraktion katalysiert wird (Leibman 1971, Bachur et al 1971, Loveless et al 1978).

CBR1 wurde 1988 von Wermuth et al isoliert. Es zeigt eine ubiquitäre Verteilung in verschiedenen menschlichen Geweben und ist auf dem Chromosom 21 in der Nähe von CBR3 und dem Superoxid-Dismutase-Gen (SOD) lokalisiert. Humanes CBR1 ist ein 30 kDa großes Monomer mit 277 Aminosäuren; die Kristallstrukturanalyse wurde 2005 von Tanaka et al aufgeklärt. CBR1 katalysiert in einer NADPH-abhängigen Reaktion viele Carbonyl-Reduktionen, insbesondere Chinon- und aromatische Hydrochinonstrukturen. Endogene Substrate sind hingegen einige Prostaglandine, Isatin und 3-Ketosteroide sowie Produkte der Lipidperoxidation.

CBR1-Knock-Out-Mäuse sind nicht überlebensfähig (Olson et al 2003), daher vermutet man eine entscheidende Rolle in der Embryogenese und in der Zellsignalübertragung. Auch in einigen Krebsarten scheint CBR1 eine Rolle zu spielen. So zeigten einige Studien, dass eine Herunterregulation von CBR1 mit einer schlechten Überlebensrate bei Lymphknotenmetastasen und Eierstockkrebs (Umemoto et al 2001) einhergeht und eine Tumorprogression und Angiogenese in Lungenkrebs bewirken (Takenaka et al 2005). Die genaue Rolle von CBR1 in der Signalübertragung, Apoptose und Krebs muss weiter untersucht werden.

CBR1 metabolisiert viele Medikamente, unter anderem die Anthrazykline Doxorubizin und Daunorubizin (Forrest & Gonzales 2000). Da der Daunorubizin-Metabolit Daunorubizinol kardiotoxisch ist, vermutet man, dass CBR1 verantwortlich für die schwere Kardiotoxizität von Daunorubizin ist. Diese Annahme wird dadurch erhärtet, dass heterozygote CBR1-Nullallel-Mäuse eine herabgesetzte Anthrazyklin-vermittelte Kardiotoxizität zeigen (Forrest

et al 2000). Umgekehrt zeigen Mäuse mit einer Herz-spezifischen Expression von humaner CBR1 eine erhöhte Kardiotoxizität im Vergleich zum Wildtyp (Olson et al 2003).

CBR3 befindet sich 62 kb vom CBR1-Gen entfernt auf Chromosom 21. Es besteht aus 277 Aminosäuren und hat eine Sequenzidentität mit CBR1 von 71%. Ein natürlich auftretendes Allel (V244M) wurde kürzlich entdeckt, welches vermehrt bei Afro-Amerikanern auftritt (Lakhman et al 2005). Bei dem Allel wurde die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  und die maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{max}$  mit Menadion bestimmt. Die maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{max}$  war bei dem M-Allel zweifach erhöht. Die mRNA findet sich in verschiedenen Geweben, wobei die Expression wesentlich niedriger ist als bei CBR1 (Matsunaga et al 2006). Es existieren bis dato nur wenige Studien zu CBR3, so dass ihre physiologische Rolle im Körper als auch im Fremdstoffmetabolismus ungeklärt ist.

CBR4 wurde erst durch die Genomanalyse auf Chromosom 4 entdeckt. Die Protein-Sequenzidentität mit CBR1 beträgt nur 23%, jedoch sind die typischen dreidimensionalen Strukturen als auch die typische katalytische Triade aus Serin, Tyrosin und Lysin (S-Y-K) im aktiven Zentrum konserviert. Homologe findet man in Maus, Ratte und Hund, daher vermutet man eine Rolle im endogenen Metabolismus. Genauere Funktionen des Enzyms sind jedoch nicht bekannt. CBR2 kommt in der Maus und im Schwein vor, jedoch nicht im Menschen.

#### Die AKR-Superfamilie:

Die AKRs sind NADPH-abhängige Oxidoreduktasen mit einem breiten Substratspektrum. Sie finden sich in Vertebraten, Invertebraten, Pflanzen, Protozoen, Pilzen, Eubakterien und Archebakterien und scheinen in der Evolution früh entstanden zu sein. AKRs sind monomere  $(\alpha/\beta)_8$ -barrel-Proteine, ca. 320 Aminosäuren lang und enthalten eine katalytische Tetrade aus Tyrosin, Lysin, Aspartat und Histidin.

Im Menschen sind bis dato 13 AKRs bekannt, davon sind 2 Untereinheiten eines Kalium-Kanal-Proteins, die in dieser Arbeit nicht weiter betrachtet werden. 1996 wurde für diese Enzyme eine einheitliche Nomenklatur eingeführt. Jedes Mitglied heißt zunächst AKR als Abkürzung für Aldo-Keto-Reduktase, es folgt eine arabische Nummer, welche die Familie charakterisiert und weiter ein Buchstabe, der die Subfamilie benennt. Um die einzelnen teilweise sehr ähnlichen Proteine zu unterscheiden, wird erneut eine Zahl angehängt, die die einzigartige Proteinsequenz beschreibt. Die Familien werden durch eine Sequenzidentität von mindestens 40%, Subfamilien von mindestens 60%, definiert. Proteine mit einer Sequenzidentität von über 97% werden als Allele bezeichnet, außer sie haben verschiedene

enzymatische Aktivitäten, unterschiedliche 3'UTRs und entstehen aus Genen mit unterschiedlicher Struktur oder unterschiedlichem Locus.

AKRs besitzen typische Motive, die in allen AKRs sehr konserviert sind. Man findet unter anderem ein N-terminales Motiv LxxxGxxxPxxGxG, eine Region im aktiven Zentrum GxxxxDxAxxY, welche die für die Katalyse verantwortlichen Asparaginsäure- (D) und Tyrosin- (Y) Reste enthält, sowie eine dritte Region, die ebenfalls zum aktiven Zentrum gehört (LxxxxxxxxDxxxxH) und das katalytische Histidin (H) enthält. Ein weiteres konservierte Lysin (K) ist ebenfalls für die Katalyse essentiell (Jez et al 1997, Jez et al 2001).

In Tabelle 1.2 sind typische Substrate dieser Enzyme aufgeführt:

<b>xenobiotische Substrate</b>	
<b>AKR1A1</b>	Daunorubizin, Doxorubizin, 4-Hydroxynonenal, Acetohexamid, 4-Nitrobenzaldehyd
<b>AKR1B1</b>	Doxorubizin, Daunorubizin, 4-Hydroxynonenal,
<b>AKR1B10</b>	Dolasetron, Indanol, NNK, Daunorubizin, Naltrexon
<b>AKR1C1</b>	Dolasetron, Naloxon, Naltrexon, Ketotifen, Haloperidol, Daunorubizin, Acetohexamid
<b>AKR1C2</b>	Dolasetron, Ketoprofen, Ketotifen, Daunorubizin, Naloxon, Naltrexon
<b>AKR1C3</b>	Naloxon, Naltrexon, 9,10-Phenanthrenchinon, 4-Nitrobenzaldehyd
<b>AKR1C4</b>	Naloxon, Naltrexon, Dolasetron, Acetohexamid, Chlordecon, NNK
<b>AKR7A2</b>	Aflatoxin A
<b>AKR7A3</b>	Aflatoxin A, 4-Nitrobenzaldehyd

Tabelle 1.2: xenobiotische Substrate der verschiedenen AKRs (Rosemond & Walsh 2004, O'Connor et al 1999, Matsunaga et al 2006).

AKR1A1 wird auch als Aldehydreduktase bezeichnet, da sie eine spezifische hohe Aktivität gegen verschiedene aromatische und aliphatische Aldehyde wie z.B. 3-Nitrobenzaldehyd und Pyrimidin-Aldehyde besitzt (O'Connor et al 1999). Weiterhin katalysiert sie ein Produkt der Lipidperoxidation 4-Hydroxynonenal und Aldosederivate wie Glycerinaldehyd und Glukuronsäure. AKR1B1, welche früher als Aldosereduktase bezeichnet wurde, zeigt ein gleiches Substratspektrum wie AKR1A1, jedoch zeigt AKR1B1 im Vergleich zu AKR1A1 wesentlich kleinere  $K_m$ -Werte für die verschiedenen Aldehyde. Daher kann man für viele AKR1B1-Substrate Sättigungskinetiken beobachten, für AKR1A1-Substrate jedoch nicht (Wermuth et al 1977, Grimshaw et al 1989). AKR1B1 ist an der Bildung von diabetischen Komplikationen und Myokardischämie beteiligt (Hwang et al 2004).

AKR1B10 ist ein AKR1B1-ähnliches Protein, welches eine 70-prozentige Sequenzidentität zu AKR1B1 besitzt und sich ebenfalls auf dem Chromosom 7 befindet. Es besitzt eine ähnliche Substratspezifität wie AKR1B1, d.h. es setzt verschiedene aliphatische und aromatische Aldehyde um (Crosas et al 2003, Cao et al 1998). Hohe Expressionslevel finden

sich im Dünndarm und im Kolon; mehrere Arbeitsgruppen stellten fest, dass AKR1B10 in Tumoren stark hochreguliert wird und damit wahrscheinlich stark am Metabolismus von Chemotherapeutika beteiligt ist (Cao et al 1998, Hyndman et al 1999, Scuric et al 1998).

AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 und AKR1C4 gehen alle aus einem Gencluster auf Chromosom 10 hervor. Sie bestehen aus 323 Aminosäuren, zeigen eine hohe Sequenzidentität von 83%, jedoch sind ihre biochemischen Eigenschaften untereinander unterschiedlich. Enzyme der AKR1C-Subfamilie zeigen alle unterschiedliche Aktivitäten als Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSD) und spielen eine Rolle in der Pre-Rezeptor-Regulation von Steroidrezeptoren und membrangebundenen Liganden-kontrollierten Ionenkanälen. Weiterhin zeigen AKR1Cs im Gegensatz zu anderen AKRs eine hohe Dihydrodiol-Dehydrogenase-Aktivität, welche trans-Dihydrodiole der aromatischen Hydrokarbonverbindungen in Katechole oxidiert (Palackal et al 2002).

AKR1C1 wird auch als 20 $\alpha$ -HSD bezeichnet und ist vielen Geweben exprimiert (Penning et al 2000). Es reduziert eine Reihe von Carbonylverbindungen wie z.B. Prostaglandine und NNK (4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon) und wird mit der Entwicklung von Prostatakrebs in Verbindung gebracht (Bauman et al 2004).

AKR1C2 wird auch als 3 $\alpha$ -HSD bezeichnet und ist wie AKR1C1 in vielen Geweben exprimiert. Aufgrund der hohen Expression von AKR1C2 bei Patienten mit Glaukomen und Adipositas bei Frauen wird dieses Enzym mit den Krankheitsbildern in Verbindung gebracht (Blouin et al 2005). Im Fremdstoffmetabolismus zeigt AKR1C2 ein ähnliches Substratspektrum wie AKR1C1 und andere AKRs. Es wird stark durch Gallensäuren gehemmt und ist identisch mit dem humanen Gallensäuren-bindenden Protein (Hara et al 1996).

AKR1C3 zeigt eine starke 17 $\beta$ -HSD Aktivität und wird daher als eine 17 $\beta$ -HSD bezeichnet. Eine Expression ist in den meisten menschlichen Organen zu beobachten. Das Enzym ist am Metabolismus von Androgenen und an der Entstehung von Prostatakrebs beteiligt. Im Fremdstoffmetabolismus ist eine Aktivität von AKR1C3 gegenüber Naloxon und Naltrexon sowie 4-Nitrobenzaldehyd bekannt (Nishizawa et al 2000, Matsunaga et al 2006).

AKR1C4 zeigt eine 3 $\alpha$ -HSD- und eine schwache 20 $\alpha$ -HSD- und 17 $\beta$ -HSD-Aktivität. Dieses Enzym ist ausschließlich in der Leber exprimiert und dort in dem Metabolismus von Steroidhormonen und Gallensäuren involviert (Bauman et al 2004). AKR1C4 reduziert verschiedenste Carbonylverbindungen wie z.B. Chlordecon, Daunorubizin, Naloxon, Naltrexon, Haloperidol, Ketotifen und Befunolol. Das Enzym ist für seine interindividuelle Aktivität, vermutlich verursacht durch die Regulation durch Transkriptionsfaktoren, bekannt

(Molowa et al 1986). Weiterhin ist eine Aktivierung der Enzymaktivität durch anti-inflammatorische 2-Arylpropionsäure-Derivate bekannt (Yamamoto et al 1998).

Enzyme der AKR7A Subfamilie werden auch als Aflatoxin-Reduktasen bezeichnet, da sie den toxischen Aflatoxin-Metaboliten Aflatoxin B<sub>1</sub> Dialdehyd detoxifizieren. Sie bilden Homodimere und zeigen ein ähnliches Substratspektrum für verschiedene aromatische Aldehyde und Dikarbon-Verbindungen. AKR7A2 ist in vielen Geweben exprimiert, und vermutlicherweise mit dem Golgi-Apparat assoziiert (Kelly et al 2002). Es zeigt einen niedrigen  $K_m$ -Wert für die Umsetzung von Succinat-Semialdehyd und deutet damit auf die physiologische Bedeutung im  $\gamma$ -Hydroxybutyrat-Stoffwechsel hin (Schaller et al 1999). Als xenobiotische Fremdstoffe reduziert AKR7A2 auch  $\alpha$ -Dikarbonyl (O'Connor et al 1999), jedoch ist es weitgehend inaktiv gegenüber aliphatischen und aromatischen Ketonen. Über AKR7A3 ist bisher wenig bekannt. Es wurde jedoch über den Umsatz von Aflatoxin B<sub>1</sub> Dialdehyd und 4-Nitrobenzaldehyd berichtet (Knight et al 1999).

Betrachtet man die Literatur, so scheinen CBR1, AKR1C1, AKR1C2 und AKR1C4 die Hauptreduktasen im Fremdstoffmetabolismus von Ketonen zu sein, jedoch sind die Substratspektren der einzelnen Enzyme unterschiedlich.

## 1.5 Fragestellung

Doxorubizin ist ein weit verbreitetes Chemotherapeutikum in der Tumorthherapie von Leukämien, malignen Lymphomen und soliden Tumoren. Sowohl die Wirkung als auch die Nebenwirkungen sind trotz gleicher Doxorubizin-Dosierung individuell stark ausgeprägt (Shan et al 1996). Auch die Plasmaspiegel des Medikaments und seines Hauptmetaboliten Doxorubizinol sind individuell unterschiedlich (Andersen et al 1999), was der genannten Variabilität zugrunde liegen kann. Ein zu starker Metabolismus verringert den verfügbaren Anteil an Doxorubizin und somit die antineoplastische Wirkung, weil das Hauptabbauprodukt Doxorubizinol weniger antineoplastisch wirkt (Schott & Robert 1989, Dorr et al 1991, Chang et al 1989, Kuffel et al 1992, Ozols et al 1980); weiterhin kann es dadurch vermehrt zur Bildung von Resistenzen kommen (Chen et al 1994, Pang et al 2005, Turton et al 2001). Das in der Leber gebildete Doxorubizinol könnte andererseits für die Doxorubizin-induzierte Kardiotoxizität verantwortlich sein (Metaboliten-Theorie (1.4.3.1), Olson et al 2003, Forrest et al 2000, Mordente et al 2003), falls eine kardiale Aufnahme des Metaboliten möglich ist. Die für den Abbau des Doxorubizins hauptverantwortliche



Reduktase ist für diese Betrachtungen zentral, ihre Identität ist allerdings weitgehend unerforscht.

Die vorliegende Arbeit soll untersuchen, welche Enzyme den Abbau von Doxorubizin zu Doxorubizinol in humaner Leber vermitteln. Die Leber ist das Hauptorgan des Doxorubizin-Metabolismus (Ballet et al 1987, Dodion et al 1987). Die partielle Inaktivierung des Doxorubizins führt zu einer Verminderung der antineoplastischen Wirkung im Körper, aber auch im Tumorgewebe. Die Akkumulation von Doxorubizin im Herzen und die damit verbundene Reduktion zu Doxorubizinol könnte durch einen ausgeprägten Metabolismus von Doxorubizin in der Leber herabgesetzt werden, was die Herzschädigungen verringern würde. Der Lebermetabolismus von Doxorubizin kann somit möglicherweise nicht nur die Tumorresponse, sondern auch die Doxorubizin-induzierte Kardiotoxizität beeinflussen.

Die Identifizierung der hepatischen Doxorubizin-Reduktase im Menschen könnte die Möglichkeit eröffnen, diese Reaktion gezielt mit Hemmstoffen zu unterbinden um die mit dieser Reaktion verbundene Inaktivierung der antikanzerogenen Wirkung von Doxorubizin zu reduzieren. Es wäre eine Dosisreduktion möglich, um die Rate an unerwünschten Nebenwirkungen zu senken, jedoch die vollständige antineoplastische Wirkung zu gewährleisten.

Um die verantwortliche Reduktase zu identifizieren, sollen unterschiedliche kinetische Parameter dieser Reaktion bei verschiedenen Enzymen als auch in humanen Zytosolen bestimmt werden. Die Erfassung der mRNA-Expressionsdaten der Enzyme soll bei der Bestimmung des katalysierenden Enzyms behilflich sein.

Aufgrund der starken interindividuellen Unterschiede beim Metabolismus von Doxorubizin soll weiterhin das metabolisierende Enzym auf genetische Varianten untersucht werden.

Folgende Teilprojekte waren zu bearbeiten:

1. Bestimmung des Umsatzes von Doxorubizin zu Doxorubizinol in unterschiedlichen humanen Organen und Bestimmung der kinetischen Parameter (Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$ , maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{max}$ )
2. Bestimmung des Umsatzes von Doxorubizin zu Doxorubizinol durch mehrere Carbonyl reduzierende Enzyme (Aldo-Keto-Reduktasen und Carbonyl-Reduktasen) und Bestimmung der kinetischen Parameter (Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$ , maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{max}$ )
3. Hemmstoffversuche an Doxorubizin reduzierenden Enzymen und humanem Leberzytosol
4. mRNA-Expressionsanalyse verschiedener Carbonyl reduzierender Enzyme

5. mRNA-Expressionsanalyse von CBR1 in einer humanen Leberbank
6. Protein-Expressionsanalyse von CBR1 in Zytosolen einer humanen Leberbank im Western Blot
7. Analyse genetischer Polymorphismen im CBR1-Gen

## 2. Material und Methoden

Für alle molekularbiologischen Arbeiten wurden nur sterilisierte Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet. Alle Lösungen wurden mit dd H<sub>2</sub>O angesetzt und, falls nicht anders beschrieben, entweder autoklaviert oder steril filtriert.

Die Standard-Chemikalien entsprachen dem analytischen Reinheitsgrad und wurden von den Herstellern Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Die Zentrifugationen wurden, soweit nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur und bei 13000 Upm (= 16000 x g) in einer Biofuge pico (Heraeus, Hanau), die nachfolgend als Tischzentrifuge bezeichnet wird, durchgeführt.

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Rutin		Sigma-Aldrich, Steinheim
Quercitrin		Sigma-Aldrich, Steinheim
Quercetin		Sigma-Aldrich, Steinheim
Diclofenac		Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Taq</i> polymerase		Qiagen, Hilden
dNTP set		New England Biolabs, Frankfurt
Real-time PCR Mastermix	TaqMan universal PCR master mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
Doxorubizin		Pfizer, Karlsruhe
Daunorubizin		Pfizer, Karlsruhe
Acrylamid Stock		AppliChem, Darmstadt
TEMED		AppliChem, Darmstadt
Hydroxy-PP		Institut für organische Chemie der Johannes-Gutenberg- Universität Mainz
APS		AppliChem, Darmstadt

Pefablock (AEBSF)		AppliChem, Darmstadt
Glycerin		Roth, Karlsruhe
Bromphenol Blau		Roth, Karlsruhe
Ponceau S		Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)		AppliChem, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol		AppliChem, Darmstadt
X-Gal		AppliChem, Darmstadt
Tween-20		AppliChem, Darmstadt
Ampicillin		Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS		AppliChem, Darmstadt
Eisessig		AppliChem, Darmstadt
ECL Reagenz	ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, München
NADPH		Roth, Karlsruhe
Entwickler	LX24	Kodak, Stuttgart
Borsäure		AppliChem, Darmstadt
Fixierer	AL4	Kodak, Stuttgart
9,10-Phenanthrenchinon		Sigma-Aldrich, Steinheim
Menadion		Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinmarker	PageRuler Prestained Ladder Plus	Fermentas, St.Leon-Roth
Proteingel - Färbelösung	Page Blue	Fermentas, St.Leon-Roth
DMSO		Sigma-Aldrich, Steinheim
Hefeextrakt		AppliChem, Darmstadt
Trypton		AppliChem, Darmstadt
Agar		AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid		AppliChem, Darmstadt
BSA		AppliChem, Darmstadt
Bradford Farbreagenz	Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München

**2.1.2 Verbrauchsmaterial**

Pipettenspitzen		Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten	2, 5, 10, 25 ml	Greiner, Frickenhausen
Küvetten	UVette 0030106300	Eppendorf, Hamburg, Germany
Falcon Röhrechen 15 ml		Greiner, Frickenhausen
Falcon Röhrechen 50 ml		Greiner, Frickenhausen
HPLC-Röhrechen	Rollrand Mikroflasche 6x32mm konisch	CZT, Kriftel
HPLC-Röhrechen-Kappen	Snap on Kappen, PE klar, Sil/PTFE	CZT, Kriftel
Reaktionsgefäße	Eppendorf reaction tubes safe-lock	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Micro tubes 1.5 ml with cap	Sarstedt, Nürmbrecht- Rommelsdorf
Nitrile Handschuhe	Nitra-TEX, puderfrei	Ansell, München
Latexhandschuhe	Latex Handschuhe puderfrei	Kimberley-Clark, Koblenz
Zytostatika Handschuhe	Zytostatika Handschuhe, S M	Berner International, Elmshorn
HPLC-UV-Lampe		Merck, Darmstadt
HPLC-Säulen	LiChroCART® 125-4, LiChrospher® 100 RP-8, 5µm	Merck, Darmstadt
	LiChroCART® 4-4, LiChrospher® 100CN, 5µm	Merck, Darmstadt
96-Well Platten PCR		ABgene, Epsom, UK
Verschlüsse für 96-Well Platten PCR	Flat Cap Strips	ABgene, Epsom, UK
Pipettenspitzen		Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter		Sarstedt, Nürmbrecht- Rommelsdorf
96-Well Platten		Greiner, Frickenhausen
Blotting Papier	MN 218 B	Macherey & Nagel, Düren
Proteintransfermembran	Hybond-P PVDF Membran	GE Healthcare, München

Auflegefilm	Hyperfilm ECL RPN 3103K	GE Healthcare, München
-------------	-------------------------	------------------------

### 2.1.3 Lösungsmittel

Aceton		VWR, Darmstadt
Acetonitril		VWR, Darmstadt
Methanol		VWR, Darmstadt
Ethanol		VWR, Darmstadt
Isopropanol		VWR, Darmstadt

### 2.1.4 Geräte

HPLC - Pumpe	Intelligent Pump 301	Flom, Tokyo, Japan
Autosampler	AS-950	Jasco, Groß-Umstadt
UV-Detektor	Intelligent Fluorescence Detector FP-920	Jasco, Groß-Umstadt
Degasser	964	Gilson, Bad Camberg
Photometer	Uvikon 941	Kontron Instruments, Neufahrn
Photometer	Biophotometer 6313	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugen	Biofuge Pico	Kendro, Berlin
	Rotina 35R	Hettich, Tuttlingen
	L8-70M ultracentrifuge	Beckman, USA
	Biofuge fresco	Kendro, Berlin
ICycler		BioRad, München
Mastercycler gradient		Eppendorf, Hamburg
pH Elektrode	SenTix 81	VWR, Darmstadt
pH Meter	inoLab pH Level 1	VWR, Darmstadt
Gelelektrophoresekammer	Horizontal Midi-gel system MGU-	C.B.S. Scientific Company,

	502T	USA
Gleichstromquelle	Power Supply E835	Consort, Belgien
UV-Leuchttisch	Gel Jet Imager 2000	Intas, Göttingen
Waagen	BL1500	Sartorius, Göttingen
	440-33N Kompaktwaage	Kern, Balingen-Frommern
SDS PAGE Apparatur	Mini Protean 3 Cell	Bio-Rad, München
Tank Blot Apparatur	Mini Trans-Blot	Bio-Rad, München
Dot Blot Apparatur	Minifold	Schleicher & Schüll, Kassel
Kippschüttler	ST5	CAT
Wärmeschrank		Kendro, Berlin
Schüttel-Wärmeschrank	Bibby Sterilin	VWR, Darmstadt
Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q-Plus	Millipore, Eschborn
Photometer	Sunrise	Tecan, Crailsheim
Filtrierapparatur	SolVac Filter Holder	Pall, Dreieich

### 2.1.5 Software

Densitometrische Bestimmung	Quantity One	Biorad, München
Statistische Auswertungen	PRISM	Graphpad, San Diego, USA
Michaelis-Menten-Kinetiken	Sigma Plot	Sigma Plot, Systat, Erkrath
Statistik Auswertung, SNP Analyse	SPSS	SPSS GmbH, München
Sequenz-Chromatogramm Auswertung	Chromas	Technelysium, Tewantin, Australien
HPLC-Auswertung	Clarity Lite	DataApex, Prag, Tschechien
Auswertung real-time PCR	iCycler 3.10.7050	BioRad, München

## 2.1.6 Biologisches Material

### 2.1.6.1 Bakterienstämme

Zur Transformation von subklonierten PCR-Fragmenten wurden *Escherichia coli* Zellen One Shot TOP 10 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet:

Genotyp: F' mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15 lacZX74 deoR araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str<sup>r</sup>) endA1 nupG

### 2.1.6.2 Plasmide

pGEM-T Easy	Amp <sup>R</sup>	Promega, Mannheim
pGEM-T	Amp <sup>R</sup>	Promega, Mannheim

### 2.1.6.3 Oligonukleotide und Taqman Sonden

CBR1	Hs00156323_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
CBR3	Hs00154295_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
AKR1A1	Hs00252524_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
AKR1B1	Hs00739326_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
AKR1B10	Hs00559542_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
AKR1C1	Hs00912746_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
AKR1C2	Hs00912742_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
AKR1C3	Hs00366267_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA



AKR1C4	Hs00195992_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
AKR1D1	Hs00818881_m1	Applied Biosystems, Foster City, USA
AKR7A2	Hs00761005_s1	Applied Biosystems, Foster City, USA
AKR7A3	Hs00792041_gH	Applied Biosystems, Foster City, USA
CBRf1	TGAGGATGGATCCCTGTTTC	Roth, Karlsruhe
CBRr1	AGCCAGCTAGCCTGACTTTG	Roth, Karlsruhe
CBRf2	CTCAGAGAACCAAGGGCAAG	Roth, Karlsruhe
CBRr2	GATGTCCAGCTGGTGGAAAG	Roth, Karlsruhe
CBRf3	GCCAGACTCGAGCAGTCTCT	Roth, Karlsruhe
CBRr3	CAGCCAGGGAAACACAAAGT	Roth, Karlsruhe
CBRf4	CGAAGAAGAACCGATGCACT	Roth, Karlsruhe
CBRr4	CCGAGATGTGTGCACAGAAT	Roth, Karlsruhe
CBRf5	CTTTAGGCAGAGGGCACTAAG	Roth, Karlsruhe
CBRr5	AGGGTACAGGATGGACTCCC	Roth, Karlsruhe
CBRf6	TTTCTGCTCCAAAATCCCTG	Roth, Karlsruhe
CBRr6	TTGTAAATGCCCTTTGGACC	Roth, Karlsruhe
CBRf7	GAAAGGGGACAAGATCCTCC	Roth, Karlsruhe
CBRf7	ACTGTCCCTTCCCTTGACCT	Roth, Karlsruhe
CBRf8	TGAGCAACCTACGCACTCAG	Roth, Karlsruhe
CBRr8	ATGTTGTACACCTGGGGCAT	Roth, Karlsruhe
CBR1Pf1	ACCACCAGAATCAAGACCCA	Roth, Karlsruhe
CBR1Pr1	GAACCTTGGACAGGGTGAGG	Roth, Karlsruhe
CBR1Pf2	AGAAAGCATTTCCTACTGA	Roth, Karlsruhe
CBR1Pr2	CTTTCCTATCCCAGTGTGTGC	Roth, Karlsruhe
CBR1Pf3	GAGAGAACCCAGCCAATGAC	Roth, Karlsruhe

CBR1Pr3	AATCAAGGAAAGACCCTTGC	Roth, Karlsruhe
CBR1Pf4	GCAAGGGTCTTTCCTTGATTA	Roth, Karlsruhe
CBR1Pr4	GGGAATTGGGAATAAGGTCAA	Roth, Karlsruhe
CBR1Pf5	TTGACCTTATTCCCAATTCCC	Roth, Karlsruhe
CBR1Pr5	GAAACAGGGATCCATCCTCA	Roth, Karlsruhe

#### 2.1.6.4 Antikörper

Polyklonaler primärer Antikörper gegen humane CBR1 Ab4148	Abcam, Cambridge, UK
Polyklonaler primärer Antikörper gegen humanes GAPDH Sc-32233	Santa Cruz, Heidelberg
Monoklonaler primärer Antikörper gegen humanes $\beta$ -Actin Sc-8432	Santa Cruz, Heidelberg
Monoklonarer primärer Antikörper gegen humanes $\alpha$ -Tubulin Clone DM1A,	Dianova, Hamburg
Polyklonaler sekundärer Antikörper gegen Ziege IgG, Peroxidase-konjugiert Ab7132	Abcam, Cambridge, UK
Polyklonaler sekundärer Antikörper gegen Maus IgG, Peroxidase-konjugiert A9044	Sigma Aldrich, Taufkirchen

#### 2.1.6.5 Zytosole

Humanes Leberzytosol	Pooled human liver cytosol 452861	Gentest, BD Biosciences, Heidelberg
Humanes Dünndarmzytosol	Human small intestine cytosol CYT318003	Biopredic, Rennes, Frankreich

#### 2.1.6.6 Rekombinante Enzyme

AKR1A1 (Bestell. Nr. ABV0051108016) wurde von der Firma Abnova (Taipei City, Taiwan) bezogen. CBR1, CBR3, AKR1B1 und AKR1B10 wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Maser (Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler, Kiel) und AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3 und AKR1C4 von Herrn Prof. Penning (Department of Pharmacology, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.6.7 Gewebeproben aus klinischen Studien

Für die Untersuchung der Expression von mRNA und Protein als auch für Aktivitätsmessungen wurden Proben von verschiedenen Organen verwendet. Es wurden Gewebeproben von Milz, Niere, Leber, Kolon, Magen, Lunge und Muskel aus dem Institut für Pathologie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz erhalten. Die Gewebeproben vom Herzen wurden durch die Herzchirurgie der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz zur Verfügung gestellt. Die Herzproben sind Gewebestücke aus dem Vorhof, die bei Bypass-Operationen anfallen. Pankreasproben wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Hennig aus Heidelberg zur Verfügung gestellt.

Des Weiteren wurden die meisten Versuche an einer Lebergewebepank durchgeführt. Die Entnahme der Proben war von der Ethikkommission genehmigt. Im Rahmen einer Studie (IKP148) wurde 1999 am Dr. Margarete-Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie in Stuttgart eine Gewebepank mit menschlichen Leberproben erstellt. Die Leberproben sind Gewebestücke, die bei Resektion von Lebermetastasen entfernt werden mussten. An zytosolischen Proben dieses Leberkollektivs wurde die Verteilung der Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol ermittelt. Die Abwesenheit von Tumormaterial wurde durch eine histologische Analyse bestätigt. Die Gewebe wurden bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

## **2.2 Allgemeine molekularbiologische Verfahren**

### **2.2.1 Mini-Präparation von Gesamt-RNA**

Gesamt-RNA von menschlichen Geweben wurde durch den „RNeasy Kit“ von Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

### **2.2.2 Isolation genomischer DNA**

Genomische DNA wurde durch den „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

### **2.2.3 Isolation bakterieller Plasmid-DNA**

#### **2.2.3.1 Plasmid-Mini-Präparation aus *E. coli***

Zur Kontrolle potentiell positiver Kolonien auf Transformationsplatten wurden von diesen mit einem sterilen Zahnstocher jeweils 3 ml LB-Flüssigmedium mit einem entsprechenden Antibiotikum (2.1.6.2) angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Reagenzglasschüttler inkubiert. Ein Teil der gewachsenen Bakterienkulturen wurden auf 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgeteilt und die Zellen 1 min bei 13000 Upm pelletiert. Aus dem Bakterienpellet wurde dann Plasmid-DNA mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Der Kit basiert auf der Birnboim-Methode (Birnboim & Doly 1979), bei der die Zellen alkalisch lysiert werden, so dass genomische DNA denaturiert, während die superspiralisierte Plasmid-DNA intakt bleibt. Bei der folgenden Neutralisation verklumpt die genomische DNA mit den übrigen Zelltrümmern, Plasmide bleiben im Überstand.

#### **2.2.3.2 Plasmid-Midi-Präparation aus *E. coli***

Um größere Mengen sauberer Plasmid-DNA für präparative Restriktion o.ä. zu erhalten, wurden von einer Bakterienkolonie 25 ml LB-Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum (2.1.6.2) angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. 25 ml

LB-Medium wurden mit 25 µl der gewachsenen Starterkultur angeimpft und 8h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Alternativ konnten als Starterkultur auch 25 µl einer Plasmid-Mini-Kultur (2.2.3.1) benutzt werden. Anschließend wurde die DNA mit dem QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

#### 2.2.4 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten

Um festzustellen, ob ein Insert der richtigen Größe in ein Plasmid ligiert wurde, musste der Vektor mit Restriktionsenzymen verdaut werden. Da z.B. der pGEM-T Easy-Vektor auf beiden Seiten der Insertionsstelle eine *EcoRI*-Schnittstelle besitzt, konnte bei diesem Plasmid ein Restriktionsverdau mit diesem Enzym durchgeführt werden:

7.5 µl Plasmid-Lösung (z.B. Mini-Prep-Eluat)  
10 µl H<sub>2</sub>O  
2 µl 10x Reaktions-Puffer  
0.5 µl *EcoRI* (= 5 U) oder anderes Restriktionsenzym

Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 1 µl davon auf ein TBE-Agarose-Gel aufgetragen (2.2.12), um die Größe des Inserts festzustellen. Bei anderen Vektoren wurden jeweils andere Restriktionsenzyme verwendet, die das Insert in der „multiple cloning site“ ausschneiden konnten.

#### 2.2.5 Alkalische Phosphatase-Behandlung

Eine geringe Insertionsrate tritt besonders häufig bei Ligationen von DNA-Strängen mit glatten ("blunt") Enden auf. Um den Einbau eines Inserts mit „blunt end“ in ein Plasmid zu gewährleisten, wurden diese Plasmide mit dem Enzym Phosphatase behandelt. Dieses Enzym entfernt die Phosphatreste an den 5'-Enden eines DNA-Doppelstrangs und verhindert damit eine Religation. Anschließend kann diese nur durch Einbau eines Inserts mit intakten 5'-Phosphatresten erfolgen.

Nachdem ein Plasmid mit den gewünschten Restriktionsenzymen aufgeschnitten worden war, wurde dem Versuchsansatz 1 U alkalische Phosphatase pro µg DNA (Promega, Mannheim) zugegeben und mit 1x Dephosphorylierungspuffer auf 30-50 µl aufgefüllt. Es

folgte eine Inkubation für 15 min bei 37°C. Vor der Verwendung des so behandelten Plasmids in einer Ligation mussten die Restriktionsenzyme und die Phosphatase durch z.B. einen PCR Reinigungskit oder Phenol-Chloroform-Fällung aus dem Ansatz entfernt werden.

10x Dephosphorylierungspuffer:	Tris/HCl pH 9.0	0.5	M
	EDTA	1	mM

### 2.2.6 Ligation

Das durch Elution gereinigte DNA-Fragment (z.B. PCR-Produkt) wurde durch Ligation in ein geeignetes Plasmid (z.B. Klonierungsvektor pGEM-T Easy, Fa. Promega) eingebaut. Für PCR-Produkte konnte die sogenannte T/A-Klonierung genutzt werden, da PCR-Produkte an ihren 3'-Enden ein überhängendes A besitzen. pGEM-T Easy besitzt korrespondierend dazu ein überhängendes T an seinen freien 3'-Enden. In den übrigen Fällen musste darauf geachtet werden, dass die durch Restriktionsenzyme gewonnenen Enden von Vektor und Insert übereinstimmten.

Für die Ligation wurden i.d.R. 0.5 µl Plasmid, 1 µl 10x T4-DNA-Ligase-Puffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (Fa. Promega) und 7.5 µl zu inserierendes DNA-Fragment gemischt und bei 4°C über Nacht inkubiert. 5 µl des Ansatzes wurden für die Transformation (2.2.8) verwendet, der Rest wurde für eine mögliche zweite Transformation bei 4°C gelagert.

10x T4-DNA-Ligase-Puffer:	300 mM	Tris/HCl pH 7.8
	100 mM	MgCl <sub>2</sub>
	100 mM	DTT
	10 mM	ATP

### 2.2.7 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde die Methode von Inoue et al (1990) benutzt. Es wurde eine Kultur *E. coli* One Shot TOP 10 (Invitrogen, Karlsruhe) in 5 ml SOC-Medium in einem 50 ml Falcon-Tube über Nacht bei 37 °C inkubiert. Hieraus wurden 200 ml SOC-Medium in einem 2 l - Erlenmeyer-Kolben angeimpft und bei 18 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.4-0.6 wachsen gelassen. Der Erlenmeyer-Kolben war, wie alle anderen

Glasgefäße auch, zuvor mit H<sub>2</sub>O gefüllt autoklaviert worden. Die Bakterienkultur wurde dann auf Falcon-Tubes aufgeteilt und bei 4000 Upm für 10 min in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge (Hettich Rotina 35R, Tuttlingen) abzentrifugiert.

Die Bakterienpellets wurden auf Eis mit je 15 ml kaltem Transformationspuffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 4000 Upm in zwei Falcon-Tubes. Die Pellets wurden wieder in je 15 ml Transformationspuffer resuspendiert und unter kräftigem Mischen in jedes Tube 525 µl DMSO gegeben. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis wurden die Bakteriensuspensionen in 200 µl Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Transformationspuffer:      10 mM      PIPES  
   15 mM CaCl<sub>2</sub>  
   250 mM      KCl  
   pH-Wert mit KOH auf 6.7 einstellen  
   ad 55 mM      MnCl<sub>2</sub>  
   abschließend steril filtrieren

SOC-Medium (in 100 ml)    2 g    Select Pepton 140  
   0.5 g    Hefe-Extrakt  
   1 ml    1 M NaCl  
   0.25 ml      1 M KCl  
   separat für 10 Minuten autoklavieren  
   1 ml    1 M MgCl<sub>2</sub>  
   1 ml    1 M MgSO<sub>4</sub>  
   1 ml    2 M Glucose  
   steril filtrieren

### 2.2.8 Chemische Transformation von *E. coli*

200 µl kompetente Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Dann wurden 5 µl des Ligationsansatzes (2.2.6) zugegeben, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30 sec bei 42°C. Der Ansatz wurde wieder auf Eis gestellt und 1 ml SOC-Medium (2.2.7) zugegeben. Danach wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C inkubiert.

Die transformierten Zellen wurden nun auf zwei LB-IPTG-x-Gal-Agar-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen (jeweils 0.2 ml und 1 ml der Zellsuspension). Diese Platten wurden dann bei 37°C über Nacht inkubiert, so dass die transformierten Zellen Kolonien bilden konnten. Manche Vektoren ermöglichten eine Blau/Weiß-Selektion. Die Bakterien mit einem Vektor ohne Insert bildeten blaue Kolonien, da ihr *lacZ*-Gen nicht unterbrochen war. Bakterien mit einem Vektor mit Insert bildeten weiße Kolonien, da die kodierende Region für das  $\alpha$ -Peptid der  $\beta$ -Galactosidase durch die Insertion unterbrochen war. Das *lacZ*-Gen (=  $\beta$ -Galactosidase) bewirkt die Umsetzung des farblosen Stoffes x-Gal zu einem blauen Derivat.

Amp100: 100 mg Ampicillin/ml

Km50: 50 mg Kanamycin/ml

LB-Flüssigmedium: 10 g/l Trypton  
5 g/l Hefe Extrakt  
10 g/l NaCl  
mit NaOH auf pH 7.5 einstellen

LB-IPTG-x-Gal-Agar: x ml LB-Medium  
1.5% Select-Agar  
1:1000 Amp100 oder Km50  
1:500 100 mM IPTG  
1:500 x-Gal (2% (w/v) in DMF)

Amp100 bzw. Km50, IPTG und x-Gal wurden nach dem Autoklavieren zugegeben.

### 2.2.9 Bakteriendauerkultur

Zur Anlage von Bakteriendauerkulturen positiver Klone wurden 0.2 ml 60%iges Glycerin in 2 ml Schraubdeckel-Eppendorfgefäße gefüllt und autoklaviert. Von einer gut gewachsenen Übernachtskultur mit Antibiotikum wurden 0.8 ml zugegeben und gut gemischt. Die Glycerinkulturen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.



### 2.2.10 Ethanolfällung von DNA oder RNA

Zur Aufkonzentrierung von Nukleinsäurelösungen wurde eine Fällung der DNA oder RNA durchgeführt. Hierzu wurden 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 6,0 und 2,5 Vol. 99 % Ethanol zugegeben und die Nukleinsäuren bei -20 °C für mindestens eine Stunde aufbewahrt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13000 Upm bei 4°C wurde das Pellet mit 75 % Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert (5 min 13000 Upm bei 4°C), etwa 15 min bei 37 °C getrocknet und in einem geringeren Volumen H<sub>2</sub>O oder in 10 mM Tris, pH 8,0 resuspendiert.

### 2.2.11 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Eine genauere Quantifizierung der Nukleinsäuren erlaubt die UV-photometrische Bestimmung:

Doppelproben von 1 µl Nukleinsäurelösung wurden in einer bestimmten Menge Wasser oder Puffer verdünnt und die Extinktion bei 230, 260 und 280 nm ermittelt (Eppendorf Bio Photometer, Hamburg). Die Quotienten der Extinktionswerte (260nm/230nm und 260nm/280nm) stellen ein Maß für die Verunreinigung der Lösung mit Polysacchariden bzw. Proteinen dar. Idealerweise sollten der Quotient für 260nm/280nm bei 1,8 und für 260nm/230nm bei 2,0 liegen. Das Gerät berechnet die Nukleinsäurekonzentrationen nach folgenden Formeln, die für doppelsträngige DNA und einzelsträngige RNA gelten (Sambrook *et al.* 1989):

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} * 40 * V_{\text{Küvette}} * V_{\text{Aliquot}}^{-1}$$

$$\text{DNA } [\mu\text{g/ml}] = E_{260} * 50 * V_{\text{Küvette}} * V_{\text{Aliquot}}^{-1}$$

Dabei beschreibt  $V_{\text{Küvette}}$  das Gesamtvolumen in der Küvette, während  $V_{\text{Aliquot}}$  das Volumen der DNA bzw. RNA Lösung bezeichnet.

### 2.2.12 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von DNA oder RNA durch TBE-Agarose-Gelelektrophorese diente zur Quantifizierung und Reinheitsüberprüfung, Fragment-Größenbestimmung, Kontrolle von Restriktionsverdau (2.2.4), Detektion von PCR-Produkten (2.2.17) und zur gezielten

Isolierung einzelner Fragmente. Im letzteren Fall musste die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA aus der Agarosematrix eluiert werden (2.2.13). Die Gele bestanden aus 1 % (w/v) Agarose (Roth, Karlsruhe) in 1 x TBE-Puffer, die durch Aufkochen geschmolzen und mit 3 µl (v/v) Ethidiumbromid versetzt wurden. Für die Gelelektrophorese von RNA wurden die Gelkammer und Gießvorrichtung 1 h in 1 % SDS eingelegt, um RNasen zu inaktivieren. Vor dem Probenauftrag wurde den Proben jeweils 1/5 Vol. „loading dye“ zugesetzt. Als Größenstandard diente als Marker der GeneRuler 1 kb Ladder oder 100 bp DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Roth). Die Elektrophorese erfolgte bei 70 Volt in 1 x TBE-Puffer. Die DNA-Banden konnten dann durch UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert werden (Intas UV Systeme, Göttingen).

10 x TBE-Puffer:	1 M	TRIS
	1 M	Borsäure
	20 mM	Na EDTA
„loading dye“:	50 % (v/v)	Glycerin
	10 mM	NaPO <sub>4</sub> pH 7,0
	0,4 % (w/v)	Orange G

### 2.2.13 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Häufig ist es notwendig, ein bestimmtes DNA-Fragment von anderen z.B. PCR-Produkten (2.2.17) oder Fragmenten eines Restriktionsverdau (2.2.4) zu trennen, um es in einer Ligation (2.2.6) einzusetzen. Dazu wurden die DNA-Fragmente in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt, das besonders dick gegossen war, so dass die Geltaschen das Auftragen von bis zu 50 µl Probenvolumen erlaubten. Die gewünschte Bande wurde aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel eluiert. Dazu wurde der "QIAEX Gel Extraction Kit" (Qiagen, Hilden) verwendet. Dieser Kit beruht auf dem Schmelzen der Agarose bei relativ niedriger Temperatur (50 °C) in einem Puffer, der ein chaotropes Salz enthält. Anschließend wird die DNA bei hoher Salzkonzentration selektiv an eine Kieselgel-Säule gebunden. Schließlich wurde die DNA mit 25 µl H<sub>2</sub>O eluiert und durch Agarose-Gelelektrophorese von 1 µl Eluat semi-quantifiziert (2.2.12).

### 2.2.14 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription (RT) von mRNA-Vorlagen in cDNA ("copy DNA") Kopien ermöglicht es, indirekt RNA als Ausgangspunkt einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, 2.2.17) zu verwenden (=RT-PCR), und so bestimmte mRNA-Spezies spezifisch nachzuweisen oder die transkribierte Sequenz eines Gens frei von Introns zu erhalten. Ein an das PolyA-Ende von eukaryontischen mRNA bindender dT<sub>20</sub>-Primer dient dabei als unspezifischer Primer der Reversen Transkriptase.

3 µg RNA, 1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primer (500µg/ml) und 1 µl 10mM dNTP Mix wurden mit H<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt und RNA-Sekundärstrukturen durch Inkubation für 5 min bei 65 °C denaturiert. Die Probe wurde wieder auf Eis gestellt und 4 µl des 5x First Strand Buffer (Invitrogen, Karlsruhe), 1 µl RNase-Inhibitor und 2 µl DTT zugegeben. Nach einer zweiminütigen Inkubation bei 42 °C wurde 1 µl (200 U) Superscript II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) hinzugefügt. Die RT-Reaktion erfolgte für 50 Minuten bei 42 °C. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase 15 min bei 70 °C inaktiviert. Das Produkt der RT-Reaktion ist nur ein einzelner DNA-Strang (Erststrang), da für die Synthese des zweiten Stranges kein Primer zu Verfügung steht. Die Erststrang-cDNA reicht aber als Template für eine RT-PCR aus, bei der dann Primer für beide Polymerisationsrichtungen vorhanden sind, so dass der zweite DNA-Strang synthetisiert werden kann. Je 1-2 µl RT-Ansatz wurden als Template in einer PCR (2.2.17) eingesetzt.

### 2.2.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Methoden

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis & Faloona 1987) ist die Verwendung von hitzestabilen DNA-Polymerasen für einen zyklischen Reaktionsablauf, in dem eine DNA-Vorlage ("Template") immer wieder thermisch denaturiert und mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primern) hybridisiert wird ("Annealing"), die der Polymerase als Startpunkt für die Synthese des komplementären DNA-Stranges (Elongation) dienen. Da die DNA dabei exponentiell vervielfacht wird, ist es im Prinzip möglich, aus einem einzigen Ausgangsmolekül innerhalb von 25-35 Reaktionszyklen mehr als 10<sup>6</sup> Kopien herzustellen. Über die Basenpaarung der Primer mit der Vorlage ist dieser Vorgang außerordentlich spezifisch, und es wird so möglich, extrem seltene Moleküle, wie bestimmte mRNA-Spezies (eigentlich cDNA-Spezies) gezielt nachzuweisen und analysierbare Mengen davon herzustellen.

### 2.2.16 Kriterien bei der Ableitung von synthetischen Oligonukleotiden (Primern)

Bei der Auswahl von Primern für die PCR muss zwischen spezifischen und degenerierten Primern unterschieden werden. Spezifische Primer können immer dann benutzt werden, wenn die genaue Sequenz der zu amplifizierenden DNA bekannt ist. Sie sollten aus 20-30 Nukleotiden bestehen, einen ausgewogenen G/C-Gehalt von 40-60 % besitzen und mit einem G oder C enden. Zudem sollten die Primer, die jeweils zusammen in einer PCR eingesetzt werden, eine ähnliche Schmelz-Temperatur haben. Dies ist die Temperatur, bei der sich die Primer von der Ziel-DNA ablösen. Sie kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$T_m = 69,3 + 0,41 \times [\% \text{ G/C}] - 650/\text{Primerlänge}$$

In der Regel wurden Primer so gewählt, dass sie eine Schmelztemperatur zwischen 55 und 63 °C hatten. Außerdem mussten die Primer so beschaffen sein, dass sie eine geringe Tendenz zur Bildung von Sekundärstrukturen und zur Hybridisierung mit sich selbst besaßen. Dies konnte auf der Internetseite [www.justbio.com](http://www.justbio.com) mit dem Tool Primer3 getestet werden.

### 2.2.17 Polymerase-Kettenreaktion

PCR-Reaktionen wurden im Thermocycler mit beheizbarem Deckel (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt, die bei Bedarf auch einen Temperaturgradienten gestatteten. Es wurde hierfür der *taq* DNA Polymerase-Kit von Qiagen (Hilden) verwendet.

Ein Standardansatz (25 µl) bestand aus folgenden Komponenten:

2,5 µl	10 x <i>Taq</i> -Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,0; 500 mM KCl)
1-3,5 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub> (Endkonzentration 1-3,5 mM)
0,5 µl	10 mM dNTP
0,5 µl	5'-Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	3'-Primer (10 pmol/µl)
1 µl	Template
0,25 µl	<i>Taq</i> -Polymerase
ad 25 µl	H <sub>2</sub> O

Standard-Programmierung:

94 °C	1 min (Denaturierung)	
94 °C	1 min (Denaturierung)	} 36x
55 °C	1 min (Annealing)	
72 °C	1 min (Elongation)	
72°C	10 min (terminale Elongation)	

Diese Bedingungen wurden je nach Art der Primer und des zu amplifizierenden Templates optimiert: Wurde kein Produkt erhalten, so wurde die Spezifität der PCR verringert, bei unerwünschten Nebenprodukten wurde sie erhöht. Die Annealing-Temperatur wurde zunächst 3 °C niedriger als die errechnete Schmelztemperatur der Primer gewählt, konnte aber zur Erhöhung der Spezifität höher oder zur Verringerung niedriger eingestellt werden. Bei Thermoblocks mit einstellbarem Temperaturgradient konnte innerhalb einer PCR die optimale Temperatur ermittelt werden. Die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration wurde zwischen 1 mM (spezifischer) und 3,5 mM (unspezifischer) variiert. Die Elongationszeit war abhängig von der Länge des Templates, es wurde für die *Taq*-Polymerase eine Elongationszeit von ca. 1 kb/min veranschlagt. Weiterhin konnte die Primerkonzentration auf 100 pmol/μl und die Zyklenzahl auf 35 erhöht werden, wenn mit den Standard-Bedingungen kein Produkt erhalten wurde. Wurde mit spezifischen Primern kein Produkt oder ein starker Hintergrund unspezifischer Nebenprodukte erhalten, so wurde das PCR-Produkt z.T. reamplifiziert, indem 1 μl als Template in einer weiteren PCR - z.B. mit spezifischeren Amplifikationsbedingungen - eingesetzt wurden. Bei einer RT-PCR, bei der ein cDNA-Synthese-Ansatz als Template diente, wurde die Template-Menge auf bis zu 4 μl erhöht.

Zwei stärkere Abwandlungen des Standard-Protokolls waren "Touch Down" und "Inverser Touch Down". Bei diesen PCR-Methoden wurde die Annealing-Temperatur zunächst ca. 10 °C über bzw. unter der endgültigen Temperatur eingestellt, die dann im Laufe von etwa 10 Zyklen mit 1 °C/Zyklus erreicht und für weitere 20-25 Zyklen beibehalten wurde. Beim Touch Down wurde die Annealing Temperatur von oben kommend allmählich verringert und so die PCR mit extrem spezifischen Bedingungen begonnen, um Nebenprodukte zu vermeiden, die dann allmählich unspezifischer wurden, nachdem das gewünschte Produkt bereits angereichert war. Beim Inversen Touch Down wurde umgekehrt zunächst eine sehr unspezifische, niedrige Annealing-Temperatur gewählt, um bei schwierigen PCRs überhaupt erst ein Produkt zu erhalten, und dann langsam die Spezifität erhöht.

### 2.2.18 Kolonie-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt auch, Bakterienkolonien schnell und sequenzspezifisch auf das Vorhandensein eines Plasmids mit dem gewünschten Insert zu untersuchen. Vorteile gegenüber der Plasmid-Mini-Präparation mit anschließendem Restriktionsverdau (2.2.4) sind dabei die schnellere Durchführung und der v.a. bei großen Probenzahlen geringere Arbeitsaufwand, sowie die Möglichkeit, durch geeignete Primerwahl gleichzeitig die Richtung der Insertion zu bestimmen. Dazu müssen ein im Insert bindender und ein Vektor-spezifischer Primer kombiniert werden, so dass ein PCR-Produkt nur dann gebildet werden kann, wenn die Insertion so erfolgt ist, dass die 3' Enden beider Primer in entgegengesetzte Richtungen weisen.

Für eine Kolonie-PCR wurden 25 µl Standard PCR-Ansätze (2.2.17) ohne Template angesetzt. Dann wurden im Anschluss an eine Transformation (2.2.8) gewachsene Bakterienkolonien mit sterilen Zahnstochern gepickt, und mit jedem Zahnstocher zuerst ein PCR-Ansatz und anschließend eine Übernacht-Kultur mit LB-Medium und geeignetem Antibiotikum angeimpft. Diese Kulturen konnten am nächsten Tag für Plasmid-Mini-Präparationen der anhand der Kolonie-PCR als positiv identifizierten Kolonien verwendet werden. Die angeimpften PCR-Ansätze wurden dem unter 2.2.17 beschriebenen Programm in einem Thermocycler unterzogen, wobei aber der anfängliche Denaturierungsschritt auf 5 min verlängert wurde, um die im Ansatz vorhandenen Bakterienzellen zu lysieren und ihre Plasmide freizusetzen. Die PCR-Produkte wurden durch TBE-Agarose-Gelelektrophorese (2.2.12) analysiert.

### 2.2.19 Real Time PCR (*TaqMan PCR*)

Eine TaqMan PCR läuft prinzipiell wie eine konventionelle PCR ab. Neben den zwei Primern wird bei dieser Methode noch eine Sonde (engl.: probe) verwendet, die aus einem kurzen DNA Fragment besteht, das spezifisch an den DNA-Strang bindet. Die Sonde hat eine 10°C höhere Annealingtemperatur als die Primer. Sie hat an ihrem 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff. Bei den verwendeten Sonden war dieser ausschließlich FAM (6-Carboxy-Fluorescein), welcher eine Emission bei 518 nm zeigt. Am 3'-Ende jeder Sonde liegt der Quencher Dabcyl, Methylorange (Dark Quencher).

Während der PCR im iCycler (Bio-Rad, München) wird jeder der 96 Reaktionsansätze mit Licht der Wellenlänge 488 nm bestrahlt. Durch die räumliche Nähe von Reporter (ein

Farbstoff, der eine Anregungswellenlänge von 488 nm besitzt) und Quencher (ein Farbstoff, der die Energie von angeregten Reporter-Molekülen aufnimmt und bei einer anderen Wellenlänge abgibt als der Reporter) findet ein Fluoreszenz-Energietransfer (Fluorescent Resonant Energy Transfer, FRET) vom Reporter auf den Quencher statt, es wird kein Fluoreszenzsignal vom Gerät erfasst. Nach Hybridisierung der Primer und der Sonde an den cDNA-Strang wird die Sonde in der Extensionsphase von der *Taq*-Polymerase in eine y-förmige Sekundärstruktur gebracht. Während der PCR wird durch die 5'-Exonukleaseaktivität der Polymerase die Sonde gespalten, wobei Reporter und Quencher voneinander getrennt werden. Es kommt zu einer Unterbrechung des Fluoreszenz-Energie-Transfers und somit zu einer Emission des Reporter-Farbstoffes; die Anzahl der Lichtsignale steigt proportional zur Amplifizierungsrate. Das Fluoreszenzsignal der Proben wird durch den iCycler fortlaufend für bis zu 96 Proben gleichzeitig während der gesamten PCR registriert. Seine Intensität ist ein Maß für die Anzahl an synthetisierter DNA. Man spricht von einer PCR in „Echtzeit“ (engl: real time).

Die iCycler Software zur Auswertung der registrierten Daten geben einen „Amplification plot“ aus. In ihm wird das registrierte Fluoreszenzsignal jeder Probe in Abhängigkeit vom Zyklus gezeigt. Um den „amplification plot“ auswerten zu können, muss ein Schwellenwert definiert werden, bei dem alle Reportersignalwerte im linearen Bereich liegen. Weiterhin sollte er spezifische Amplifikationssignale von unspezifischen Signalen trennen. Diese Schwelle wird als „threshold“ bezeichnet. Der threshold Zyklus gibt die Zykluszahl an, an der das Fluoreszenzsignal der jeweiligen Probe erstmals den Schwellenwert erreicht. Er ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Kopienzahl zu Beginn der PCR, d.h. je mehr cDNA am Anfang der Reaktion vorhanden ist, desto weniger Zyklen sind notwendig, um den Schwellenwert zu erreichen. In dem linearen Bereich wird eine Effizienz von 100% angenommen; eine Zykluszunahme von einer Einheit bedeutet daher eine Verdopplung der Kopienzahl.

Die Real-Time-PCR wurde zur Bestimmung der Expressionsmuster verschiedener Kandidatengene in unterschiedlichen menschlichen Geweben herangezogen. Als cDNA wurden die Human MTC Panels I und II (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet, die eingesetzten Sonden für die spezifischen Kandidatengene wurden von Applied Biosystems (Foster City, USA) bezogen.

Es wurde ein einheitliches Pipettierschema pro 96-Well-Platte erstellt, dass vier Kontrollen ohne cDNA, 6 Verdünnungsstufen des Plasmidstandards ( $10^1$ - $10^6$  Kopien) in Duplikaten und die jeweiligen cDNA Proben in Duplikaten beinhaltet.

Pro 25  $\mu$ l Ansatz wurden folgende Komponenten pipettiert:

12,5	$\mu$ l	Taqman Universal PCR Mastermix (Applied Biosystems, Foster City, USA)
1,25	$\mu$ l	20x Sonden-Primer-Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA)
2,5	$\mu$ l	cDNA (Human MTC Panels I und II, BD Biosciences, Heidelberg)
8,75	$\mu$ l	dd H <sub>2</sub> O

Zur Herstellung des Plasmidstandards wurde das nachzuweisende Fragment des Kandidatengens in einer PCR mit den Taqman-Sonden amplifiziert und kloniert. Das erhaltene und sequenzierte Plasmid mit dem Genfragment wurde so verdünnt, dass man eine Ausgangskonzentration von  $10^6$  Moleküle/Ansatz erhielt. Diese Lösung wurde in 10er Stufen bis zu einer Konzentration von 10 Molekülen/Ansatz verdünnt.

Die real-time quantitative PCR erfolgte im iCycler (Bio-Rad, München) und wurde mit der zugehörigen Software ausgewertet.

Die Reaktion lief unter folgenden Bedingungen ab:

Aktivierung der Polymerase	10min	95°C	} 40 Zyklen
Denaturierung	15 s	95°C	
Anlagerung und Elongation	60 s	60°C	

Mittels der vorhanden Software wurden die erhaltenen Ct-Werte gemittelt gegen den Logarithmus der eingesetzten Molekülzahl aufgetragen. Bei einer Amplifikationseffizienz von 100% sollte sich nach linearer Regression eine Gerade ergeben, deren Korrelationskoeffizient über 0,99 liegt. Die Steigung  $x$  gibt die Anzahl der Zyklen an, die benötigt werden, um die zehnfache Menge an Kopien zu erhalten. Sie beträgt normalerweise ca. 3,32. Anhand der Standardkurve kann jeder cDNA-Probe eine bestimmte Kopienzahl zugeordnet werden und das Expressionsmuster des Kandidatengens in verschiedenen Organen ermittelt werden.

### 2.2.20 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach Sanger et al (1977). Die Aufbereitung der Proben sowie die anschließende Sequenzierung wurde von der Firma GENterprise in Mainz durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in einem Textfile und dem zugehörigen



Chromatogramm geliefert, so dass eine Nachbearbeitung der Sequenzen möglich war. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit denen bekannter Gene verglichen, um Sequenzfehler bzw. Mutationen zu detektieren. Dazu wurde die Datenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), „BLAST“, Altschul et al. 1990) verwendet.

## 2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.3.1 Zytosolisolation von menschlichen Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden jeweils in 1,5 – 2 ml Homogenisationspuffer (ca. 1g Gewebe/ 4ml Puffer) aufgenommen und im Ultraturax (Stufe grün, 9500 rpm) solange zerkleinert, bis keine größeren Stücke mehr zu sehen waren. Die Homogenate wurden 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und die Überstände in frische Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Bei besonders fetthaltigen Proben musste die fetthaltige Schicht mit einer Pipettenspitze vorsichtig abgenommen und verworfen werden. Es folgte eine Zentrifugation in der Ultrazentrifuge (Ultrafuge L8-70M, Beckman) für 45 min bei 30000 Upm. Die Überstände wurden nun vereinigt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Homogenisationspuffer:	10mM	HEPES, pH 7,4
	0,15 M	KCl
	1mM	Natrium EDTA
	1mM	DTT
	0,2 mM	Pefablock SC

DTT und Pefablock wurden frisch hinzugegeben

### 2.3.2 Enzymatische Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol

Die Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol durch zytosolische bzw. rekombinante Enzyme wurde mittels HPLC bestimmt. Die Tabelle 2.1 enthält ein typisches Pipettierschema. Hierbei wurden anhand der Umsetzungen von Doxorubizin zu Doxorubizinol bei verschiedenen Ausgangskonzentrationen die Michaelis-Menten-Kinetiken  $K_m$  und  $V_{max}$  (Sigma Plot, Systat, Erkrath) ermittelt. Bei jeder Messung wurde als

interne Kontrolle eine Doppelprobe eines Mauszytosols mitbestimmt (Inkubation Nr. 1 in der Tabelle 2.1). Weiterhin wurden als Negativkontrollen eine Probe ohne Zugabe von zytosolischen Enzymen (Inkubation Nr. 2) bzw. rekombinantem Enzym, als auch eine Probe ohne Doxorubizin (Inkubation 3) mitgemessen.

Inkubation		1	2	3	4	5	6	7	8
		<b>Pooled mL</b>	<b>(-) Cyt</b>	<b>(-) Dox</b>					
<b>Endkonz.Doxorubizin</b>		<b>25<math>\mu</math>M</b>	<b>1<math>\mu</math>M</b>		<b>10<math>\mu</math>M</b>	<b>25<math>\mu</math>M</b>	<b>50<math>\mu</math>M</b>	<b>100<math>\mu</math>M</b>	<b>250<math>\mu</math>M</b>
<b>Doxorubizin (mM; <math>\mu</math>l)</b>		<b>0,25; 10</b>	<b>0,01; 10</b>		<b>0,1; 10</b>	<b>0,25; 10</b>	<b>0,5; 10</b>	<b>1; 10</b>	<b>2,5; 10</b>
Tris/HCl, 100mM, pH 7,4/ 37°C	$\mu$ l	30	30	40	30	30	30	30	30
Homogenisationspuffer	$\mu$ l		20						
Doxorubizin i. Tris/HCl, pH 7,4	$\mu$ l	10	10	-	10	10	10	10	10
Zytosol, 3 $\mu$ g/ $\mu$ l	$\mu$ l	20	-	20	20	20	20	20	20
Vorinkubation 37°C	min	6	6	6	6	6	6	6	6
NADPH, 5mM	$\mu$ l	40	40	40	40	40	40	40	40
Inkubation 37°C	min	30	30	30	30	30	30	30	30
Acetonitril + Daunorubizin (IS)	$\mu$ l	100	100	100	100	100	100	100	100
Aufbewahrung auf Eis Zentrifugation, 13000rpm	min	5	5	5	5	5	5	5	5
Eindampfen, Lösen in 90 $\mu$ l Fließmittel	min	5	5	5	5	5	5	5	5
		-	ja	ja	ja	-	-	-	-
Verdünnung	$\mu$ l	180+720				180+720	180+720	180+1620	180+1620
HPLC-Analyse; Verd., $\mu$ l Injektion		1:5, 10	40	40	40	1:5, 10	1:5, 10	1:10, 10	1:10, 10

Daunorubizin in Acetonitril als IS, c= 0,8 $\mu$ g/ml

Tabelle 2.1: Pipettierschema des Assays für den Umsatz von Doxorubizin zu Doxorubizinol durch humane Zytosole oder rekombinantes Protein bei verschiedenen Doxorubizin-Konzentrationen.

Weiterhin wurde je nach Messung entweder 20 $\mu$ l Zytosol (3 $\mu$ g/ $\mu$ l) oder 2,5-5 $\mu$ g rekombinantes Protein in 20 $\mu$ l hinzugefügt. Bei der Negativkontrolle ohne Protein wurde lediglich der Homogenisationspuffer hinzugegeben. Es folgte eine 6-minütige Vorinkubation bei 37 °C. Anschließend wurde durch Zugabe von 40 $\mu$ l 5mM NADPH die Reaktion gestartet und 30min bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 $\mu$ l eiskaltem Acetonitril mit 0,8  $\mu$ g/ml Daunorubizin abgestoppt. Daunorubizin diente als interner Standard in der nachfolgenden HPLC-Analyse. Den Kalibrierproben wurden ebenfalls 100 $\mu$ l der Stop-Lösung hinzugefügt, um die gleiche Menge internen Standards im Ansatz wiederzufinden. Durch Zugabe des eiskalten Acetonitrils wurden die Proteine in dem Ansatz 5 min auf Eis denaturiert und anschließend 5 min bei 13000 Upm abzentrifugiert. Eine Kalibrierreihe mit 0, 0,35 und 3,5  $\mu$ M Doxorubizinol in 100 $\mu$ l Tris/HCl wurde ebenfalls parallel angesetzt. Ansätze mit einer

Ausgangskonzentration von 1µM Doxorubizin, die Kontrolle ohne Doxorubizin sowie die Doxorubizinol-Kalibrierreihe wurden bis zur Trockne eingeengt und anschließend in 90µl Fließmittel aufgenommen, wovon 40µl chromatographiert wurden. Die anderen Proben wurden jeweils 1:5 bzw. 1:10 in Fließmittel verdünnt und 10µl von jeder Probe wurden chromatographiert (2.3.4).

### **2.3.3 Inhibition des Umsatzes von Doxorubizin zu Doxorubizinol**

Für die Inhibitionsuntersuchungen wurden höhere Konzentrationen von Doxorubizin eingesetzt, da der zu erhaltende Doxorubizinol Peak groß genug sein musste, um die Detektion der Inhibition zu ermöglichen. Sie wurden daher bei 250µM Doxorubizin durchgeführt.

In Tabelle 2.1 ist die genaue Zusammensetzung eines Assays beschrieben. Anstelle der 30µl TRIS wurden in manchen Ansätzen verschiedene Konzentrationen des Inhibitors oder des jeweiligen Antikörpers in einer Konzentration von 1:100 in TRIS eingesetzt.

Getestet wurden unter anderem Rutin, Quercetin, Quercitrin, Diclofenac, Hydroxy-PP und Antikörper gegen die humane CBR1 und AKR1C3. Wurde aufgrund der Löslichkeit des Inhibitors Lösungsmittel zugesetzt, so musste der gleiche Anteil der jeweiligen Lösung ebenfalls in der Negativkontrolle vorhanden sein, um eine mögliche Beeinflussung der Aktivität auszuschließen. Weiterhin sollte der Lösungsmittelanteil nicht höher als 1% sein. Die Inkubation erfolgte analog zur unter 2.3.2 beschriebenen Prozedur ebenfalls 30 min bei 37°C, und die Proteine wurden anschließend mit Acetonitril gefällt. Nach einem Verdünnungsschritt (1:10) in TRIS Puffer wurden die Proben chromatographiert (2.3.4).

### **2.3.4 Chromatographische Bestimmung von Doxorubizin-Metaboliten**

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC = high pressure liquid chromatography) ist eine bestimmte Form der Säulenchromatographie, bei der eine stationäre und mobile Phase zur Auftrennung von Substanzen verwendet werden. Die stationäre Phase besteht aus Kieselgelpartikeln, die durch freie Hydroxyl-Gruppen an der Oberfläche polare Eigenschaften besitzen, während die mobile Phase ein unpolares Lösungsmittelgemisch ist. Bei der Umkehrphasen-Chromatographie sind die OH-Gruppen des Kieselgels mit Kohlenwasserstoffketten veräthert, wobei die stationäre Phase unpolare

Eigenschaften erlangt. Die mobile Phase besteht hierbei aus einem Gemisch gepufferter, polarer Lösungen. Die Umkehrphasen-Säulenchromatographie hat sich als Standardmethode zur Auftrennung von Anthrazyklinen wie Doxorubizin und ihren Metaboliten (Hulhoven & Desager 1976) etabliert.

Die chromatographische Bestimmung von Anthrazyklin-Metaboliten erfolgte über ein HPLC-System mit Fluoreszenz-Detektion. Die Metaboliten wurden über eine Säule LiChroCART® 125-4, LiCrospher® 100 RP-8, 5µm (Merck, Darmstadt) mit zugehöriger Vorsäule LiChroCART® 4-4, LiChrospher® 100CN, 5µm (Merck, Darmstadt) aufgetrennt und isokratisch mit einem Gemisch aus Ammoniumacetat, pH 4,0 und Acetonitril (80:20) eluiert. Die Flussrate (1,5 ml/min) und die Elutionsdauer (30 min pro Lauf) wurden über eine Pumpe (Intelligent Pump 301, Flom, Tokyo, Japan) gesteuert. Das Fließmittel wurde zuvor über ein Filtriersystem (SolVac Filter Holder, Pall, Dreieich) gereinigt und anschließend 15 min im Ultraschallbad unter Anlegung eines leichten Vakuums entgast. Weiterhin war vor der Pumpe ein Degasser (Degasser 964, Gilson, Bad Camberg) vorgeschaltet, der mögliche verbliebene Luftblasen entfernte. Zum Probenauftrag stand ein automatischer Probengeber (Autosampler AS-950, Jasco, Groß-Umstadt) zur Verfügung. Zur Anregung der Metabolite wurde ein 480 nm Interferenzfilter verwendet. Die Emission des Eluats wurde bei 595 nm direkt am Säulenausgang mit einer Empfindlichkeit von 1000 nA aufgezeichnet. Die elektrochemische Detektion erfolgte durch einen Fluoreszenzdetektor (Intelligent Fluorescence Detector FP-920, Jasco, Groß-Umstadt).

Für die Stabilität der Basislinie war es notwendig, nur hochreine Substanzen und HPLC-reines Wasser zu verwenden. Jede Messreihe erforderte eine eigene Kalibrierung. Die Kalibrierung erfolgte mit Doxorubizinol-Konzentrationen im Bereich von 0,07 – 3,5 µM. Die Linearität der Eichgeraden war in diesem Bereich gegeben. Der interne Standard wird verwendet, um mögliche Ungenauigkeiten bei der Bearbeitung der Proben und des automatischen Probengebers nachzuweisen.

Die Daten wurden kontinuierlich gespeichert und mit Hilfe des Integrationsprogramms Clarity Lite (DataApex, Prag, Tschechien) ausgewertet. Die Grundlinien der Peaks wurden hierbei per Hand nachbearbeitet. Unter der Annahme, dass jeder Metabolit im Chromatogramm sichtbar wird, wurde der Doxorubizinol-Gehalt als Anteil seines Peaks an der Summe aller aufgetretenen Peaks (Ausgangskonzentration war bekannt) berechnet.

### 2.3.5 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Eine einfache Methode zur Bestimmung des Gehalts an löslichem Protein nutzt nach Bradford (1976) die Färbung von Proteinen durch Coomassie Brilliant Blue. 100 µl Probe (Proteingehalt zwischen 1-5 µg) wurden mit 100 µl 40%igem Farbreagenz (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, München) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gegen gleich behandelten Probenpuffer gemessen (Photometer Sunrise, Tecan, Crailsheim). Die Proteinmenge wurde anhand einer Eichreihe von 0 bis 6 µg aus entfettetem BSA (Applichem, Darmstadt) bestimmt. Bei Proteinkonzentrationen über 6 µg/µl besteht kein linearer Zusammenhang mehr zwischen Proteinmenge und Extinktion, die 100 µl Proben sollten deshalb zwischen 1 und 5 µg Protein enthalten.

### 2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli 1970) werden Proteine durch die Einlagerung von Natrium-Dodecylsulfat (SDS) linearisiert und mit einer einheitlichen, negativen Oberflächenladung versehen. Dies erlaubt in der Gelelektrophorese eine Auftrennung, die nur durch das Molekulargewicht und nicht durch die Tertiärstruktur oder Eigenladung der Proteine bestimmt ist. Die Proteinproben wurden in 1x Probenpuffer aufgenommen oder mit 2x Probenpuffer 1:1 verdünnt. Durch Aufkochen für 3-5 min bei 95 °C wurden die Proteine solubilisiert und denaturiert. Membranproteinproben wurden wegen ihrer größeren Empfindlichkeit nur bei 65°C denaturiert.

2x Probenpuffer:	125 mM	Tris/HCl pH 6,8
	4 % (w/v)	SDS
	2 mM	Na EDTA
	20 % (v/v)	Glycerin
	0,02 % (v/v)	Bromphenolblau
	40 mM	DTT frisch hinzufügen

Die Polyacrylamidgele enthielten 12 % (w/v) Acrylamid im Trenngel und wurden in Mini Protean 3-Kammern (BioRad, München) gegossen. Die Gele waren 0,75 mm dick, die Länge des Sammelgels betrug ca. 0,8 cm und die Länge des Trenngels 7 cm.

Für zwei 12%ige Acrylamid-Gele wurden folgende Komponenten gemischt:

	Trenngel	Sammelgel
1,5 mM Tris/HCl pH 8,8	3,8 ml	-
0,5 mM Tris/HCl pH 8,8	-	2,5 ml
30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	6,0 ml	1,3 ml
H <sub>2</sub> O	4,9 ml	6,1 ml
10% SDS	150 µl	100 µl
APS	100 µl	66 µl
TEMED (Start der Polymerisation)	10 µl	13 µl

Acrylamid Stock: 30 % (w/v) Acrylamid  
 0,8 % (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid (Applichem, Darmstadt)

APS: 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat

TEMED: 100 % N,N,N',N'-Tetramethyldiamin

Es wurde zunächst das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet, um Luftblasenbildung zu verhindern und eine gerade Geloberfläche zu erzeugen. Nach der Auspolymerisation (ca. 30 min) wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Die Polymerisationsdauer betrug etwa 30 min. Im Anschluss daran wurde das Gel in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt und diese mit Laufpuffer befüllt. Pro Geltasche konnten bis zu 20 µl Probe auf das Gel geladen werden. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 15 min bei 100V (Power Supply E 835, Consort, Turnhout, Belgien), dann für weitere ca. 1,5 h bei 200V, bis der zu untersuchende Bereich gut aufgetrennt war. Die Auftrennung konnte durch den vorgefärbten ebenfalls mitlaufenden Marker (PageRuler Prestained Protein Ladder Plus, Fermentas, St.Leon-Roth) mit Markerproteinen im Bereich von 11 bis 230 kDa überprüft werden.

Laufpuffer, pH 8,3: 25 mM Tris/HCl  
 192 mM Glycin  
 0,1 % (w/v) SDS

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden durch eines von mehreren im Folgenden dargestellten Färbeverfahren sichtbar gemacht oder zur immunologischen Detektion auf eine PVDF-Membran (GE Healthcare, München) geblottet (2.3.8.1).

### 2.3.7 Coomassie-Färbung

Für eine Coomassie-Brilliant-Blue-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen muss die nach dem Blotten verbliebene Proteinmenge ca. 5-10 ng betragen. Das Gel wurde für 30-60 min in Färbelösung (PageBlue, Fermentas, St. Leon-Roth) angefärbt. Anschließend wurde das Gel in Wasser gewaschen. Das entfärbte Gel konnte dann für lange Zeit in H<sub>2</sub>O gelagert werden.

### 2.3.8 Western Blot

#### 2.3.8.1 Proteintransfer auf PVDF-Membranen

Nachdem die zu untersuchenden Proben durch eine SDS-PAGE (2.3.6) aufgetrennt worden waren, wurde das Gel in eine Tank- oder Nasszellen-Blotting-Kammer eingespannt. Dieses Verfahren eignet sich besonders für niedermolekulare Proteine. Die Elektroden sind hierbei vertikal angeordnet und bestehen aus mäanderförmig gebogenem Platindraht, der auf Kunststoffplatten befestigt ist. Zwischen diese Elektroden werden Kunststoffkassetten aus durchlöchernten Kunststoffplatten platziert, die den Gel-Transfermembran-Sandwich umschließen. Der Transfer-Sandwich besteht aus einer Lage Schaumstoff, zwei Lagen angefeuchtetes Fließpapier, dem Gel, der Membran und wieder zwei Lagen Fließpapier und eine Lage Schaumstoff und ist wie beschrieben von Kathode zur Anode ausgerichtet. Die Fließpapiere wurden vorher in Blotpuffer, die PVDF-Membran kurz in Methanol, für 5 min in Wasser und anschließend für 15 min ebenfalls in Blotpuffer äquilibriert. Da bei diesem Verfahren viel Wärme freigesetzt wird, muss die gesamte Apparatur gekühlt werden. Der Transfer erfolgt bei 200 mA für 2h.

Blotpuffer:           Tris       25 mM  
                          Glycin   192 mM  
                          Methanol 20 % (v/v)

### 2.3.8.2 Färbung des Blots

Die PVDF-Membran wurde aus der Halterung entfernt und anschließend für 5 min in Ponceau-S-Färbelösung gefärbt. Diese fixiert die Proteine, die Färbung ist reversibel und dient als Kontrolle für die Übertragung. Anschließend wurde die Färbung 10 min mit H<sub>2</sub>O abgewaschen. Der Blot wurde nun auf die passende Größe zurechtgeschnitten und auf der Proteinseite gekennzeichnet.

Färbelösung: Ponceau S    0.2 % (w/v)  
                  Eisessig        10 % (v/v)

### 2.3.8.3 Antikörperreaktion

Die PVDF-Membran wurde zur Absättigung überschüssiger Bindungskapazitäten für 1 h bei Raumtemperatur in Blockpuffer auf einem Kippschüttler (ST5, CAT, Staufen) inkubiert. Nach einmaligem Waschen in TBS-T für 5 min erfolgte die anschließende Inkubation mit dem Primär-Antikörper (2.1.6.4) in der gewünschten Verdünnung über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Blot dreimal für 15 min in TBS-T gewaschen, um nicht oder unspezifisch gebundene IgG-Moleküle zu entfernen. In einer anschließenden Inkubation wurde der mit Peroxidase-gekoppelte Sekundär-Antikörper (2.1.6.4) an die auf dem Blot haftenden Primär-Antikörper gebunden. Es folgten drei Waschschritte für 15 min in TBS-T.

TBS:            Tris/HCl pH 7.5        10 mM  
                  NaCl    150 mM

TBS-T:        Tween 20        0.05 % (v/v)  
                  in TBS

Blockpuffer: BSA    3 % (w/v)  
                  in TBS-T



#### 2.3.8.4 Peroxidase-Nachweis über „Enhanced Chemiluminescence“

Die Methode der „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL) dient als empfindlicher Nachweis der Reaktion der an Protein A gekoppelten Peroxidase. Unter alkalischen Bedingungen katalysiert die Peroxidase die Oxidation von Luminol durch  $H_2O_2$ , wodurch Luminol zur Lichtemission angeregt wird. Verstärkt wird diese Reaktion durch Phenole. Die Halbwertszeit der Reaktion beträgt ca. 1 h.

Die PVDF-Membran wurde mit der Proteinseite nach oben auf eine mit Haushaltsfolie belegte Platte gelegt. Es musste darauf geachtet werden, dass die Membran völlig plan lag. Es wurden nun je nach Blotgröße verschiedene Mengen der zwei Lösungen des „ECL Plus Western Blot Detection System“ Kits nach Herstellerangaben (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) gemischt, auf die Membran gegeben und für 2 min inkubiert. Die überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt und die Membran auf Papier getrocknet und luftblasenfrei unter Klarsichtfolie in eine Fotokassette gelegt. Es wurde nun je nach Signalintensität ein Film (GE Healthcare, München) für 1 sec bis mehrere Minuten aufgelegt. Nach dem Abnehmen des Films wurde er entwickelt (Entwickler LX24, Fixierer AL4, Kodak, Stuttgart).

#### 2.3.9 Dot Blot

Mit der Dot Blot Analyse kann man schnell und einfach ein Antigen an eine Nitrozellulose oder PVDF-Membran adsorbieren und nachweisen, ohne eine vorherige Auftrennung nach Molekulargewicht durch eine SDS-PAGE vorzustellen. Das Dot Blot Verfahren ist allerdings nur möglich bei Antikörpern, die spezifisch ein Antigen erkennen und keine weiteren unspezifischen Bindungen aufweisen.

Um mittels Dot Blot Analyse die Expression von CBR1 und GAPDH in verschiedenen Proben nachzuweisen, wurden 500 ng Leberzytosol auf die Dot Blot Apparatur aufgetragen. Zwei Schichten Whatman Papier und die PVDF Membran wurden in die Dot Blot Apparatur eingespannt und über die Slots mit dem in großem Volumen aufgenommenen Protein beladen. Durch Anlegen eines Vakuums wurden die Proteine an die Membran adsorbiert. Zur Fixierung des Proteins wurde die Membran mit 30 mJ UV-Licht bestrahlt, was zu einer kovalenten Bindung des Proteins an die Membran führt. Diesen Vorgang bezeichnet man als Crosslinking.

Zur Absättigung überschüssiger Bindungsstellen wurde nach einem 5-minütigem Waschschrift mit TBS-T 1h mit Blockingpuffer inkubiert. Anschließend wurde 5 min mit

TBS-T gewaschen und schließlich die Membran über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Es folgte nach drei 5-minütigen Waschschritten in TBS-T die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1h. Anschließend wurde erneut dreimal je 5 min mit TBS-T gewaschen und die Bindung der Antikörper über die Methode des „enhanced chemiluminescence“ (ECL, 2.3.8.4) nachgewiesen.

### **2.3.10 Quantitative Auswertung der Banden des Western Blots**

Mit Hilfe der Software Quantity One (Bio-Rad, München) wurden Rechtecke um die zu bestimmenden Banden und in einen bandenfreien Bereich gelegt, um Bandenintensität als auch Hintergrundintensität bestimmen zu können. Es erfolgte eine automatische Berechnung der Banden als Pixelintensität pro Fläche. Nach Abzug des Hintergrundes ergaben sich absolute Werte, die dividiert durch die Signalintensität des Normalisierungsproteins eine relative Expressionsintensität beschreiben.

Da bei verschiedenen Blots die Singnalintensität zwischen den Blots, jedoch nicht zwischen einzelnden Proben auf einem Blot variierten, musste ein weiterer Blot zur Normalisierung der Bandenintensitäten zwischen den Blots angefertigt werden.

Bei dem Vergleich von verschiedenen Blots wurde jeweils ein Normalisierungsblot mit wenigstens einer Probe der jeweils vorangegangenen Western Blot-Proben angefertigt, um die Signalintensitäten der gleichen Proben auf dem vorangegangenen Blot mit dem Normalisierungsblot vergleichen zu können. Die vorangegangenen Expressionsintensitäten der Blots wurden für jedes Protein auf die Intensitäten des Normalisierungsblots umgerechnet.

## **2.4 Computergestützte Analyseverfahren**

### **2.4.1 Sequenzanalyse von DNA und Proteinen**

Für die Suche und den Vergleich von öffentlich zugänglichen Sequenzen wurden die GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, „BLAST“, Altschul et al. 1990) genutzt.

Die Analyse von DNA- und Proteinsequenzen erfolgte im wesentlichen mit Programmen von [www.justbio.com](http://www.justbio.com). Hierzu gehörten Programme, mit denen Nukleotid- in Aminosäure-Sequenzen übersetzt werden konnten; Programme, die Restriktionsschnittstellen und ORFs

finden konnten, oder auch Programme, mit denen sogenannte Alignments erstellt werden konnten (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

## 2.5 Statistische Auswertung der Experimente

### 2.5.1 Deskriptive Statistik

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden verschiedene statistische Parameter verwendet, die kurz erläutert werden.

#### 2.5.1.1 Arithmetischer Mittelwert MW

Der arithmetische Mittelwert wird berechnet, indem man die Summe aller Werte durch die Anzahl aller Werte ( $n$ ) teilt.

$$\bar{x}_{\text{arithm}} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

#### 2.5.1.2 Median

Bei einer nach Größe sortierten Reihe von Messwerten ist der Median der Wert, der von gleich vielen kleineren und größeren Werten eingerahmt wird. Bei einer geraden Anzahl von Messwerten ist der Median das arithmetrische Mittel der beiden mittleren Werte. Für eine ungerade und gerade Anzahl an Messwerten gelten unterschiedliche Formeln:

$$\tilde{x} = \begin{cases} x_{\frac{n+1}{2}} & n \text{ ungerade} \\ \frac{1}{2} (x_{\frac{n}{2}} + x_{\frac{n}{2}+1}) & n \text{ gerade} \end{cases}$$

### 2.5.1.3 Absolute Standardabweichung SD

Die absolute Standardabweichung ergibt sich aus den Ergebnissen der mehrmaligen Wiederholung einer Analyse unter gleichen Bedingungen. Die Berechnung erfolgt mit folgender Gleichung:

$$S = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N (X_j - X)^2}$$

### 2.5.1.4 Variationskoeffizient

Der Variationskoeffizient ist definiert als relative Standardabweichung, d.h. die absolute Standardabweichung, dividiert durch den Mittelwert der Messung. Meist wird er zum Vergleich von unabhängigen Messreihen in Prozent angegeben.

$$VK = SD * 100 / MW$$

## 2.5.2 Beurteilende Statistik

Anhand der Teststatistik kann zwischen verschiedenen Hypothesen beurteilt werden. Je nach Beschaffenheit der Ergebnisse und der Genauigkeit der Messmethoden wird ein statistischer Test ausgesucht und die jeweilige Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) und das Signifikanzniveau (r-Wert) bestimmt. In den Versuchen wurde ein Konfidenzintervall von 95% benutzt, d.h. die gesuchten Parameter sind mit 95% Wahrscheinlichkeit in der Messung enthalten. Das Ergebnis wurde als signifikant bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit mit  $p < 0,05$  unter 5% lag. Ganz konkret bedeutet dies, dass in 5% der Fälle ein Befund falsch positiv sein kann. Bei Irrtumswahrscheinlichkeiten  $p < 0,01$  lag ein hoch signifikantes, bei  $p < 0,001$  ein höchst signifikantes Ergebnis vor.

Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm PRISM (Graphpad, San Diego, USA) durchgeführt.

### 2.5.2.1 Prüfung auf Normalverteilung

Die Normalverteilung beschreibt die Streuung von Messwerten und unterstellt eine symmetrische glockenförmige Verteilungsform, bei der sich die Werte der Zufallsvariablen in der Mitte der Verteilung konzentrieren und mit größerem Abstand zur Mitte immer seltener auftreten.

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit Hilfe der statistischen Tests nach Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk. Diese Tests treffen keine eindeutige Aussage, ob eine Normalverteilung vorliegt, sondern können nur ausschließen, dass eine Normalverteilung vorliegt.

### 2.5.2.2 Gruppenvergleich und Haplotypanalyse

Beim Vergleich zweier oder mehrerer Gruppen von Beobachtungen wird die Frage untersucht, ob sich die Mittelwerte der Gruppen signifikant unterscheiden. Für den Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen wird üblicherweise der t-test verwendet. Im Falle von drei oder mehreren Gruppen verwendet man bei Normalverteilung der Gruppen die Varianzanalyse ANOVA. Sind die Gruppen jedoch nicht normalverteilt, wird der nicht parametrische Wilcoxon Test (zwei Gruppen) bzw. der Kruskal-Wallis Test (drei oder mehrere Gruppen) verwendet. Eine statistische Signifikanz lag bei  $p < 0,05$  vor.

Die Abschätzungen der Frequenzen für die Polymorphismen, ausgehend vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) erfolgte mit der statistischen Analyse des Chi-Quadrat-Tests. Die Berechnung der Linkage Disequilibriums (LD) D-Werte erfolgte mit der Software PHASE (<http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>, Scheet & Stephens 2006).

### 2.5.2.3 Korrelationsanalyse

Die Korrelationsanalyse untersucht Zusammenhänge zwischen Zufallsvariablen anhand einer Stichprobe. Eine Maßzahl für die Stärke und Richtung eines linearen Zusammenhanges ist der Korrelationskoeffizient  $r$ . Für den Korrelationskoeffizient  $r$  der Merkmale (Zufallsvariablen)  $x$  und  $y$  gilt:  $-1 \leq r \leq 1$ . Bei  $r=1$  oder  $r=-1$  wird ein starker Zusammenhang ausgedrückt, bei  $r=0$  hingegen besteht kein Zusammenhang zwischen zwei

Variablen. Negative Korrelationskoeffizienten erläutern gegenläufige Zusammenhänge. Je näher der Korrelationskoeffizient an 1 oder -1 ist, desto enger ist der Zusammenhang und umso näher liegen die Messwerte an der sogenannten Regressionsgeraden. Weiterhin ist es wichtig, ebenfalls die Signifikanz der Korrelation zu überprüfen, insbesondere wenn die Stichprobenanzahl klein ist bzw. der Korrelationskoeffizient nicht besonders hoch. Bei dieser Testung wird geprüft, ob die Steigung der Korrelationsgerade sich signifikant von 0 unterscheidet.

Die Korrelationsanalyse wurde nach statistischen Tests nach Pearson oder Spearman angewandt. Die Korrelationsanalyse nach Pearson kann hierbei nur lineare Zusammenhänge erfassen, während die Analyse nach Spearman auch nicht lineare Zusammenhänge erkennen kann.

#### 2.5.2.4 Regressionsanalyse

Die Regressionsanalyse bezeichnet den Zusammenhang zwischen einer unabhängigen und einer abhängigen Variablen. Im Unterschied zur Korrelationsanalyse ist hier an der Richtigkeit und Genauigkeit einer der beiden Messungen kein Zweifel, wie z.B. die gemessene Zeit oder die Konzentration einer Eichgerade für die Kalibrierung.

### 3. Ergebnisse

In dieser Arbeit werden experimentelle Daten zum Umsatz von Doxorubizin zu Doxorubizinol in humanen Geweben und durch verschiedene humane Aldo-Keto-Reduktasen und Carbonyl-Reduktasen dargestellt. Hierbei wurden einerseits die kinetischen Parameter des Doxorubizin-Umsatzes wie die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  und die maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{max}$  in verschiedenen Geweben, in einer Leberbank und für einige rekombinante Enzyme bestimmt. Des Weiteren wurde die Inhibition dieser Reaktion an den Kandidatenenzymen und humanen Leberzytosolen gezeigt.

Außerdem wurden die in einer Leberbank gemessenen Expressionsdaten für das identifizierte Kandidatengen CBR1 auf mRNA- und Proteinebene dargestellt. Ebenfalls wurden diese Leberproben auf Polymorphismen des Kandidatengens CBR1 untersucht, um eine mögliche Assoziation mit der Umsatzrate von Doxorubizin zu finden.

#### 3.1. HPLC-Messungen

##### 3.1.1 Inter- und Intraday-Variabilität

Um die Richtigkeit und Präzision der HPLC zu überprüfen, wurde ein Gemisch von Doxorubizin, Doxorubizinol und Daunorubizin durch zehn Wiederholungsmessungen an einem Tag (intraday-Variabilität) als auch an zehn verschiedenen Tagen (interday-Variabilität) gemessen und die relativen Standardabweichungen (Variationskoeffizienten) bestimmt.

Für Doxorubizinol betrug der Variationskoeffizient bei der Intraday-Messung 6,1%, für Doxorubizin 6,7% und für Daunorubizin 6,4%.

Bei der Interday-Bestimmung betrug der Variationskoeffizient 8,1% für Doxorubizin, 8,5% für Doxorubizinol und 9,8% für Daunorubizin.

Die „interday-assay“ Variabilität wurde durch eine Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol mit eingefrorenen Aliquots eines murinen Leberzytosols an verschiedenen Tagen gemessen. Der Variationskoeffizient betrug 14,5 %.

### 3.1.2 Quantifizierungslimit und Detektionslimit

Das Detektionslimit einer HPLC wird als dreifacher Wert des Rauschens der HPLC-Aufzeichnung definiert. Es betrug 0,1 ng Doxorubizin, 0,1 ng Doxorubizinol und 0,2 ng Daunorubizin.

Üblicherweise sind Variationskoeffizienten größer bei geringen als bei hohen Konzentrationen. Daher wird ein Quantifizierungslimit bestimmt. Das untere Quantifizierungslimit (lower limit of quantification, LLQ) beschreibt die Konzentration, die bei verschiedenen Messungen an unterschiedlichen Tagen noch eine relative Standardabweichung kleiner als 15% aufweist. Das untere Quantifizierungslimit wurde für Doxorubizin zu 0,2 ng, für Doxorubizinol zu 0,2 ng und Daunorubizin zu 0,4 ng bestimmt.

### 3.1.3 Auftrennung der zu analysierenden Substanzen

Zur Ermittlung der Retentionszeiten und zur Kontrolle der Trennwirkung der Säule wurde ein Testgemisch der zu trennenden Substanzen analysiert (Abb. 3.1). Die Peaks der einzelnen Anthrazyklin-Metabolite sind klar voneinander getrennt. Eine eindeutige Trennung der Peaks ist wichtig, da die Quantifizierung der Substanzen über die Peakflächen erfolgt. Da bei den weiteren HPLC-Analysen der Messreihe gleiche Substanzen zu denselben Retentionszeiten eluieren wie im Testgemisch, sind auch in den Zytosolinkubationen die Peaks für Doxorubizin, Doxorubizinol und dem internen Standard Daunorubizin klar voneinander getrennt und die Substanzen somit eindeutig quantifizierbar.

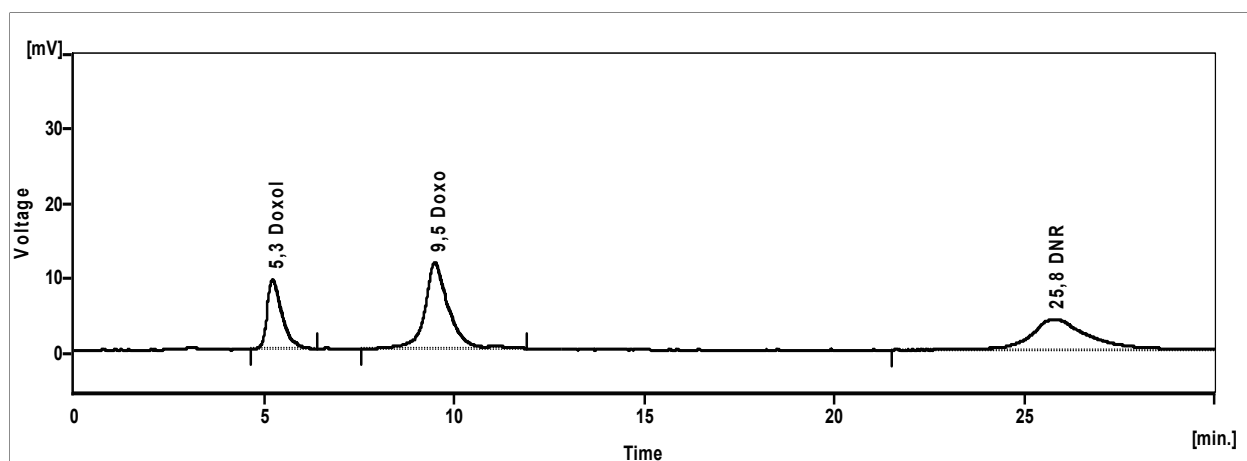


Abb. 3.1: Chromatogramm und Auftrennung eines Gemisches von Doxorubizin, Doxorubizinol und Daunorubizin. (Programm: Clarity Lite, DataApex, Prag, Tschechien)



Doxorubizinol wurde mit der verwendeten Methode als erstes bei 5,3 Minuten eluiert. Es folgte Doxorubizin bei 9,5 Minuten und Daunorubizin bei 25,8 Minuten.

### 3.2 HPLC-Bestimmung der Bildung von Doxorubizinol aus Doxorubizin

#### 3.2.1 Bestimmung der Bildung von Doxorubizinol aus Doxorubizin durch Zytosole aus verschiedenen humanen Organen

Die Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol durch zytosolische Enzyme menschlicher Organe wurde mittels HPLC bestimmt. Hierbei wurden anhand der einzelnen Umsetzungen  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte berechnet.

$K_m$  ist die Michaeliskonstante und gibt die Substratkonzentration wieder, bei der ein Enzym die Hälfte der maximalen Umsatzgeschwindigkeit erreicht. Diese Konstante ist abhängig von der Spezifität bzw. Affinität des Enzyms zum Substrat. Ist  $K_m$  niedrig, liegt eine hohe Affinität vor.

$V_{max}$  ist nach der Michaelis-Menten-Kinetik die maximale Geschwindigkeit, mit der ein Enzym sein Substrat zum Produkt umsetzen kann. Der Quotient aus der maximalen Umsatzgeschwindigkeit und der Michaelis-Menten-Konstante wird als metabolische Clearance bezeichnet. Sie ist ein direktes Maß für die Effizienz eines Enzyms zu einem Substrat.

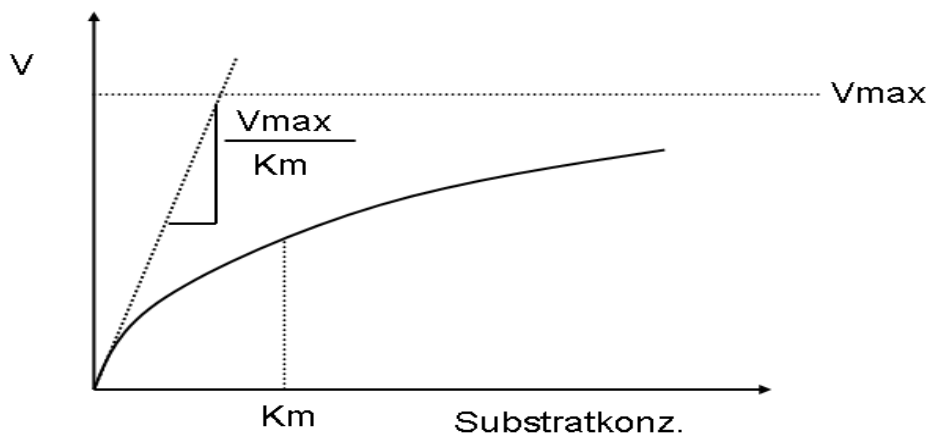


Abb. 3.2: Michaelis-Menten-Kinetik unter Angabe der kinetischen Parameter  $K_m$ ,  $V_{max}$  und der metabolischen Clearance.

Die ermittelten  $K_m$ -Werte bewegen sich zwischen  $86 \mu\text{M}$  im Dünndarm bis  $245 \mu\text{M}$  im Muskel (Tabelle 8.1, Anhang). Die Abb. 3.3 lässt vermuten, dass es wenigstens zwei verschiedene Reduktasen mit  $K_m$ -Werten von ca.  $150 \mu\text{M}$  und  $230 \mu\text{M}$  gibt. Für Herz, Leber, Niere, Milz und Magen können signifikante Unterschiede zwischen den Werten festgestellt werden (Kruskal-Wallis  $p=0,019$ ). Die anderen Organe konnten wegen geringer Fallzahlen jedoch nicht in die Analyse einbezogen werden.

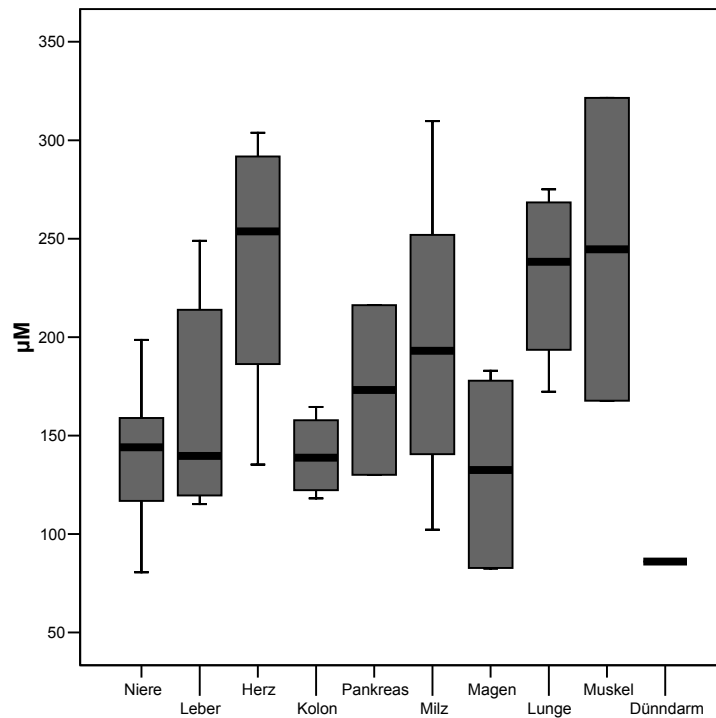


Abb. 3.3: Boxplot der Michaelis – Konstanten (Median,  $\mu\text{M}$ ) der Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol durch zytosolische Enzyme in verschiedenen menschlichen Organen. Der dicke Balken in der Box bezeichnet den Median, der obere Rand der Box das 75. Perzentil, der untere Rand das 25. Perzentil.

Die ermittelten maximalen Geschwindigkeiten ( $V_{\text{max}}$ ) für die Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol in den verschiedenen Organen bewegten sich zwischen  $37,9 \text{ pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  in Milz und  $337,1 \text{ pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  in Leber (Abb. 3.4 und Tabellen 8.1, Anhang). Neben Leber zeigten auch Dünndarm ( $197,6 \text{ pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ ) und Niere ( $126,9 \text{ pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ ) hohe  $V_{\text{max}}$ -Werte. Die  $V_{\text{max}}$ -Werte der anderen Organe lagen in einem geringeren Bereich zwischen  $37,9 \text{ pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  (Milz) bis  $83,5 \text{ pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  in Magen.

Die metabolische Clearance (Abb. 3.5) war am höchsten in Dünndarm und Leber mit  $2,3$  und  $2,1 \text{ pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg} \cdot \mu\text{M})$ . Die anderen Organe zeigten eine wesentlich geringere Clearance im Bereich von  $0,19$  (Milz) bis  $0,86$  (Niere)  $\text{pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg} \cdot \mu\text{M})$ .

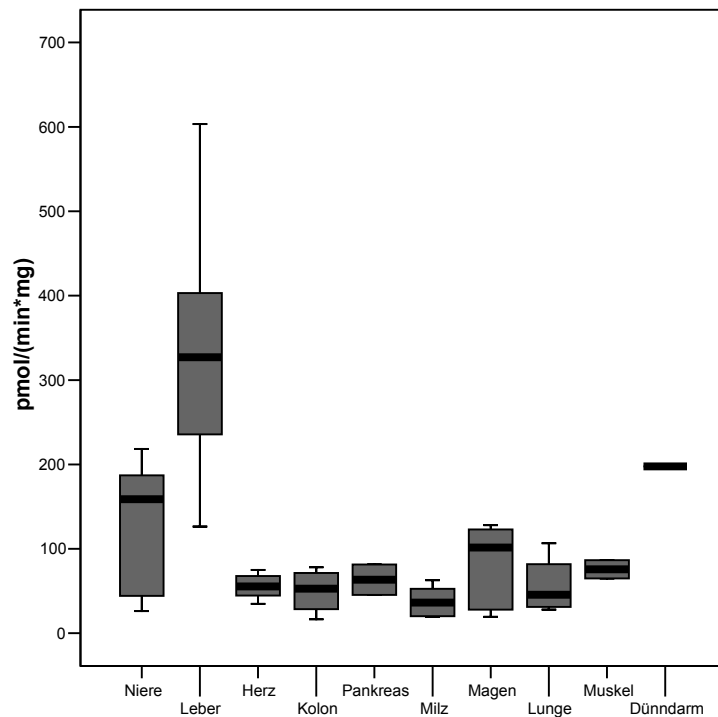


Abb. 3.4: Boxplot der maximalen Umsatzgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ , Median, pmol/(min\*mg) Protein) der Umsetzung von Doxorubicin zu Doxorubicinol durch zytosolische Enzyme in verschiedenen menschlichen Organen. Der dicke Balken in der Box bezeichnet den Median, der obere Rand der Box das 75. Perzentil, der untere Rand das 25. Perzentil.

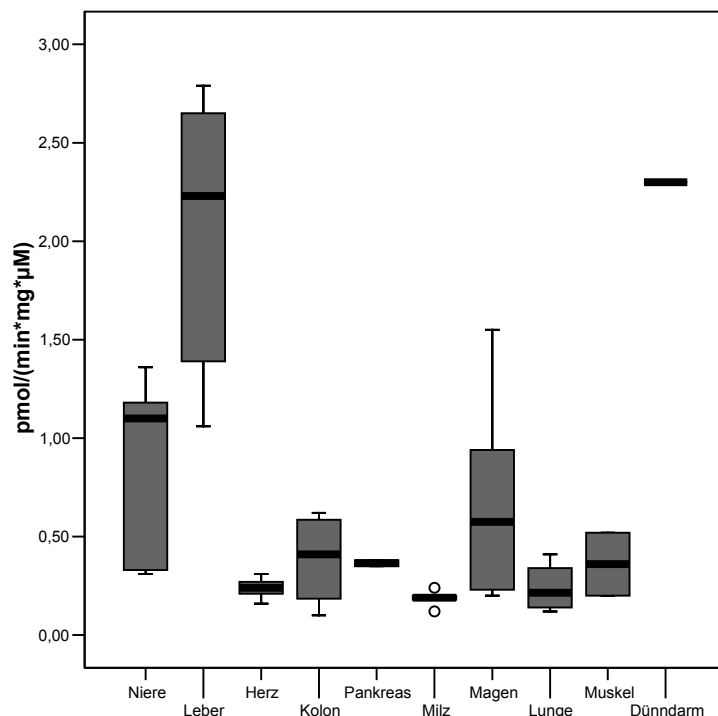


Abb. 3.5: Boxplot der metabolischen Clearance von Doxorubicin zu Doxorubicinol ( $V_{\max}/K_m$ , pmol/(min\*mg\*µM) durch zytosolische Enzyme in verschiedenen humanen Organen. Der dicke Balken in der Box bezeichnet den Median, der obere Rand der Box das 75. Perzentil, der untere Rand das 25. Perzentil. Ausreißer, die mehr als 1,5 Boxlängen vom 25. bzw. 75. Perzentil liegen, werde mit Kreisen markiert.

Da  $V_{\max}$ -Werte als auch die metabolische Clearance mit der Expression des umsetzenden Enzyms korrelieren, wurde bei der weiteren Eingrenzung des Kandidatenenzym nach solchen mit  $K_m$ -Werten um  $150 \mu\text{M}$  mit möglichst hoher Expression in Leber, Dünndarm und Niere gesucht.

### 3.2.2 Bestimmung der Bildung von Doxorubizinol aus Doxorubizin durch rekombinante Aldo-Keto-Reduktasen und Carbonyl-Reduktasen

Zunächst wurde die spezifische Aktivität der Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol durch verschiedene rekombinante Aldo-Keto-Reduktasen bei einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  bestimmt (Abb. 3.6 und Tabelle 8.2, Anhang).

Hierbei zeigten CBR1 und AKR1C3 sehr hohe Umsatzraten im Bereich von  $4,4 \pm 0,3$  und  $63,9 \pm 0,6 \text{ nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ , während AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10 und AKR1C4 moderate Umsatzraten zwischen  $202 \pm 20 \text{ pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  bei AKR1C4 und  $576 \pm 7 \text{ pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  bei AKR1B10 zeigten.

AKR1C1 und AKR1C2 zeigten fast gar keinen Umsatz ( $<0,01\%$ ). Für CBR3 konnte auch bei sehr hohen Proteinmengen ( $40 \mu\text{g}$ ) gar kein Umsatz von Doxorubizin zu Doxorubizinol gemessen werden. Das Enzym ist bisher wenig charakterisiert. Dieselbe Proteinpräparation zeigte den Umsatz von 9,10-Phenanthrenchinon, nicht jedoch den beschriebenen (Lakhman et al 2005) Umsatz von Menadion (persönliche Mitteilung von Dr. Martin, Universität Kiel).

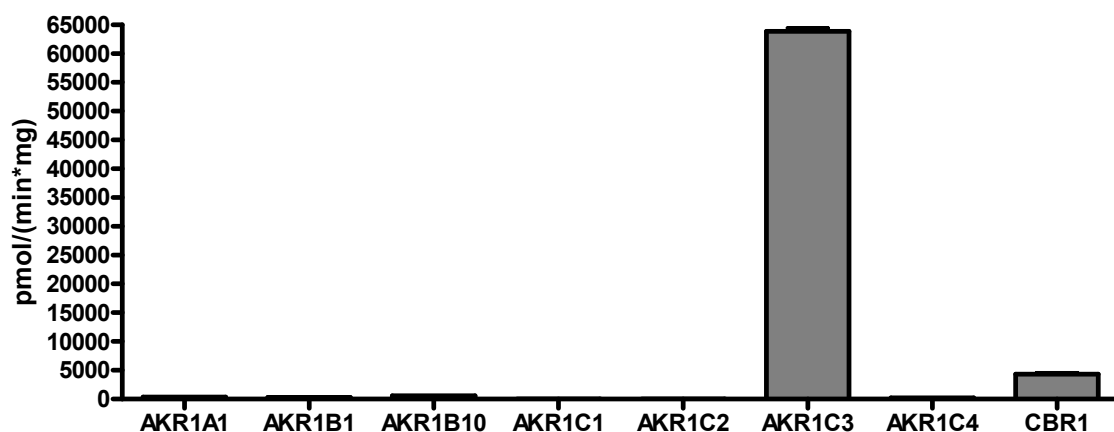


Abb. 3.6: spezifische Aktivitäten (pmol/(min\*mg), Mittelwerte mit Standardabweichung) von verschiedenen Enzymen beim Umsatz von  $100 \mu\text{M}$  Doxorubizin zu Doxorubizinol.

Die Enzyme mit einer moderaten oder hohen Umsatzrate von Doxorubizin wurden nun konzentrationsabhängig untersucht, um  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte berechnen zu können (Abb. 3.7).

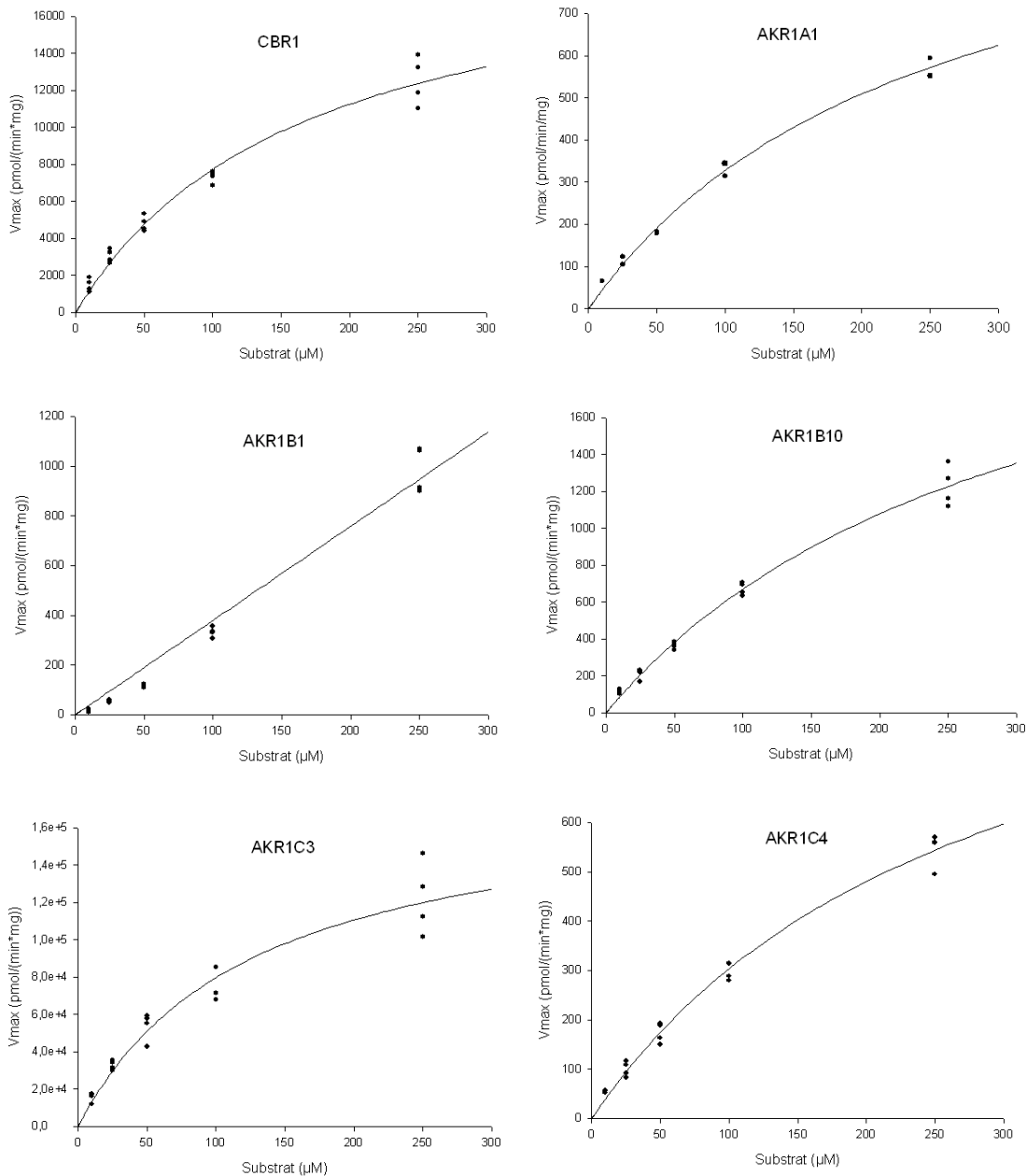


Abb. 3.7: Michaelis-Menten-Kinetiken für CBR1, AKR1A1, AKR1B1, AKR1B10, AKR1C3, AKR1C4.

Die ermittelten  $K_m$ -Werte für AKR1C3 und CBR1 lagen bei  $128,6 \pm 26,4$  und  $167,1 \pm 15,8$   $\mu\text{M}$ , während für AKR1B10 und AKR1C4 wesentlich höhere Werte ( $311,2 \pm 27,4$  und  $281,3 \pm 23,2$   $\mu\text{M}$ ) gemessen wurden (Abb. 3.8). Die kinetischen Daten für AKR1A1 konnten aufgrund der geringen Proteinmenge nur einfach bestimmt werden; der  $K_m$ -Wert betrug hierbei  $247,3$   $\mu\text{M}$ . Für AKR1B1 war in dem gemessenen Konzentrationsbereich keine Sättigung zu beobachten. Daher konnten  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Wert für dieses Enzym nicht bestimmt werden (Tabelle 8.3, Anhang).

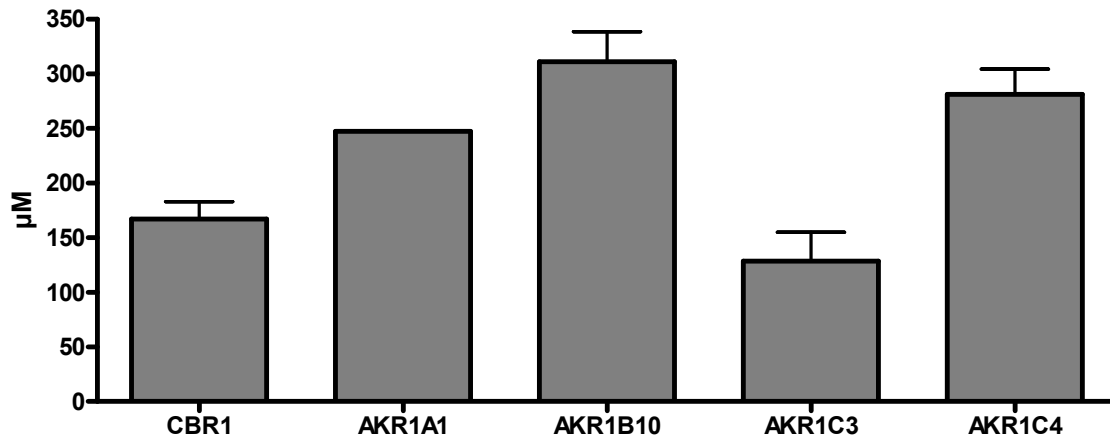


Abb. 3.8: Michaelis-Konstanten ( $\mu\text{M}$ , Mittelwert mit Standardabweichung) für fünf verschiedene Aldo-Keto-Reduktasen.

Die ermittelten maximalen Umsatzgeschwindigkeiten für AKR1C3 und CBR1 lagen bei  $183,5 \pm 34,7$  und  $20,6 \pm 0,3$   $\text{nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ , während die  $V_{\text{max}}$ -Werte für AKR1B10 und AKR1C4 klein waren ( $2,8 \pm 0,3$  und  $1,2 \pm 0,02$   $\text{nmol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$ ). Für AKR1A1 wurde er zu  $1,1$   $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  bestimmt (Abb. 3.9).

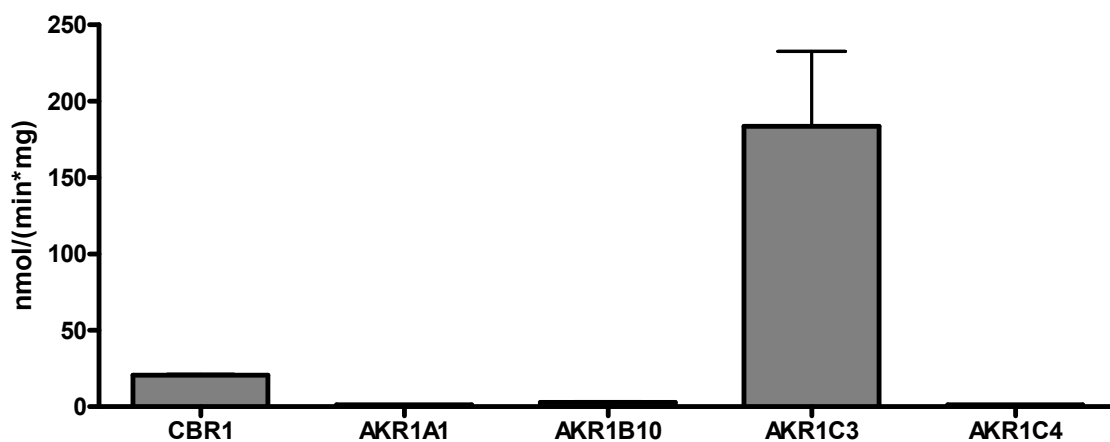


Abb. 3.9: Maximale Umsatzgeschwindigkeiten ( $V_{\text{max}}$ , Mittelwert mit Standardabweichung,  $\text{nmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ ) für fünf verschiedene Aldo-Keto-Reduktasen.

Die Clearance zeigt ein ähnliches Bild (Abb. 3.10): AKR1C3 und CBR1 zeigten die höchsten Clearances mit  $1432 \pm 34$  und  $124,8 \pm 18,9$   $\text{pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg} \cdot \mu\text{M})$ , während die Clearances der anderen Enzyme wesentlich niedriger waren, mit Werten zwischen  $4,14 \pm 0,57$   $\text{pmol}/(\text{mg} \cdot \text{min} \cdot \mu\text{M})$  für AKR1C4 und  $8,87 \pm 0,38$   $\text{pmol}/(\text{mg} \cdot \text{min} \cdot \mu\text{M})$  für AKR1A1.

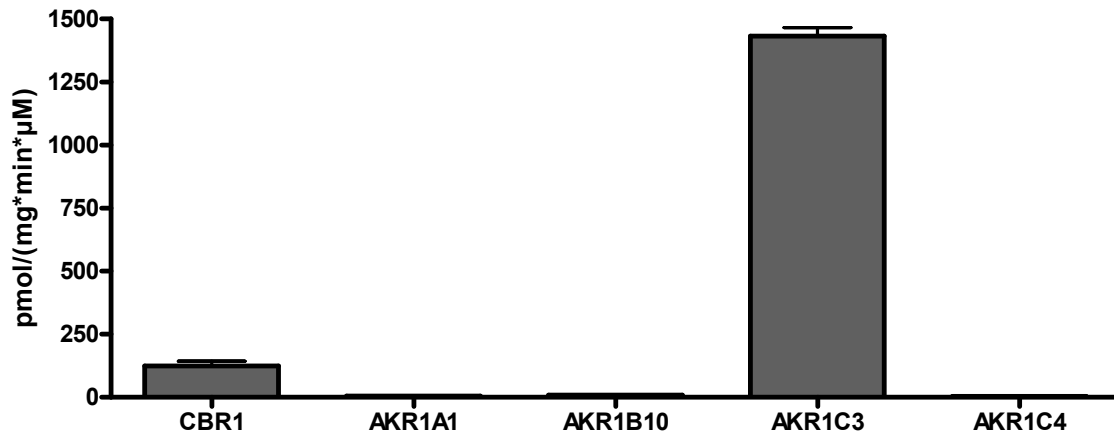


Abb. 3.10: Metabolische Clearance (Mittelwert mit Standardabweichung, pmol/(min\*mg\*µM)) für fünf verschiedene Aldo-Keto-Reduktasen.

### 3.3 Expressionsmuster verschiedener Aldo-Keto-Reduktasen

Die Expression verschiedener Carbonyl reduzierenden Enzyme wurde durch die semi-quantitative real-time PCR bestimmt. Die cDNA-Präparationen verschiedener menschlicher Gewebe, die bereits auf vier Gene normalisiert sind, wurden käuflich erworben (Human MTC Panel I+II, BD Biosciences, Heidelberg). Jede cDNA eines Gewebes wurde aus gepoolter RNA von verschiedenen Individuen hergestellt. Pro real-time PCR-Reaktion wurden 2,5 ng cDNA eingesetzt. Für die Quantifizierung des zu untersuchenden Gens wurde eine Standardreihe von 10 – 1.000.000 Kopien eines Plasmids mit amplifiziert. Die mRNA-Expressionsmuster wurden für 12 verschiedene Carbonyl reduzierenden Enzyme ermittelt. Die ermittelten Werte sind in der Tabelle 8.4 (Anhang) zusammengestellt.

CBR1 zeigte eine sehr hohe mRNA-Expression in Leber von  $1 \cdot 10^5$  Kopien/ng cDNA, und eine moderate Expression in Niere, Pankreas und Dünndarm im Bereich von  $2 \cdot 10^4$  Kopien/ng cDNA (Abb. 3.11).

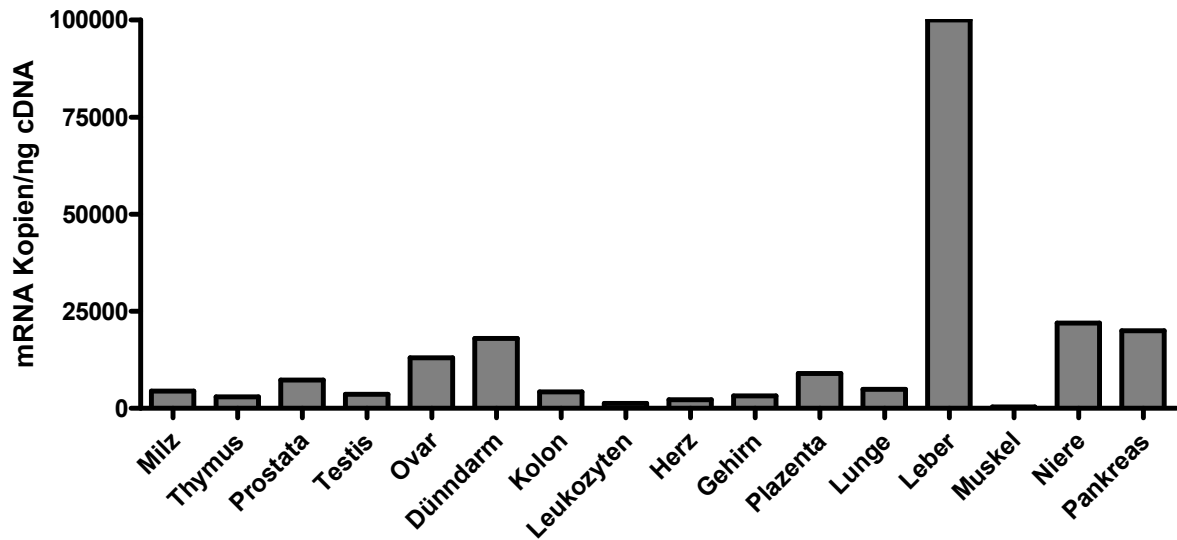


Abb. 3.11: mRNA-Expression von CBR1 in humanen Organen.

CBR3 hingegen zeigte nur eine geringe Expression im Bereich bis  $1 \cdot 10^3$  Kopien/ng cDNA (Prostata) in den verschiedenen Organen (Abb. 3.12). In Leber wurde CBR3 fast gar nicht exprimiert.

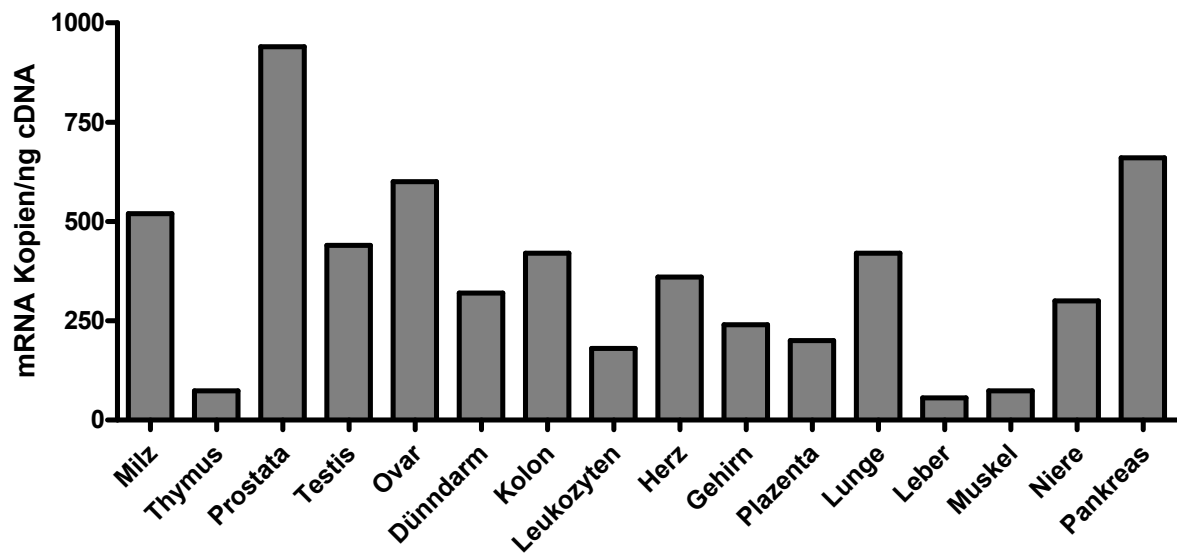


Abb. 3.12: mRNA-Expression von CBR3 in humanen Organen.

Die Expression von AKR1A1 (Abb. 3.13) war der von CBR1 recht ähnlich. Das Gen zeigte eine starke Expression in Leber, Niere und Pankreas von bis zu  $1,5 \cdot 10^5$  Kopien/ng cDNA in Leber und eine moderate Expression in den anderen gemessenen Organen von bis zu  $3,8 \cdot 10^4$  Kopien/ng cDNA in Ovar.



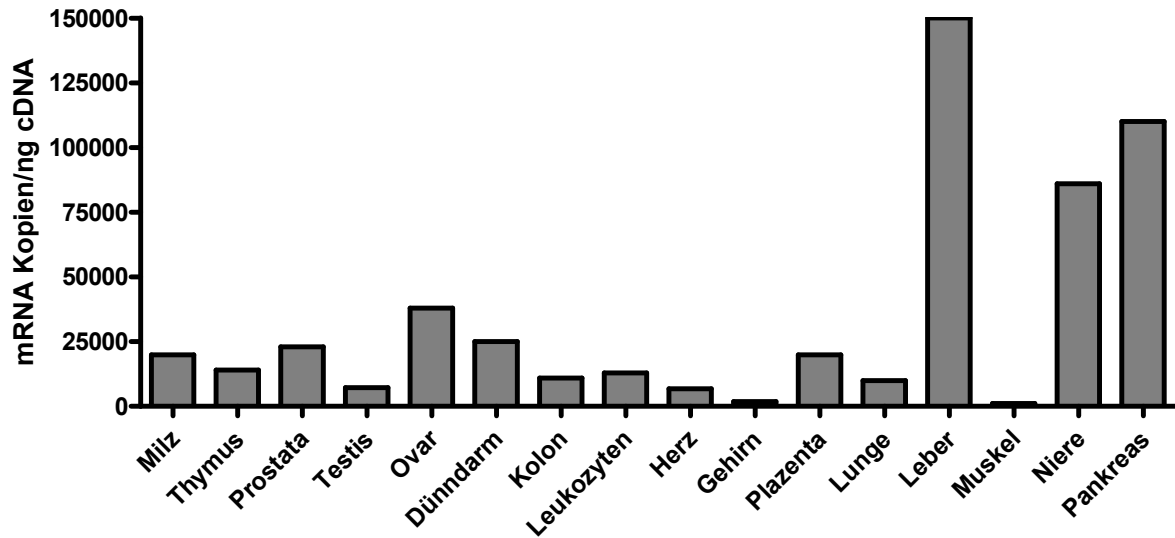


Abb. 3.13: mRNA-Expression von AKR1A1 in humanen Organen.

AKR1B1 (Abb. 3.14) zeigte in Herz, Plazenta, Muskel und Niere eine moderate Expression von bis zu  $1,2 \cdot 10^4$  mRNA Kopien/ng cDNA in Niere. Die anderen Organe zeigten hingegen nur eine niedrige Expression.

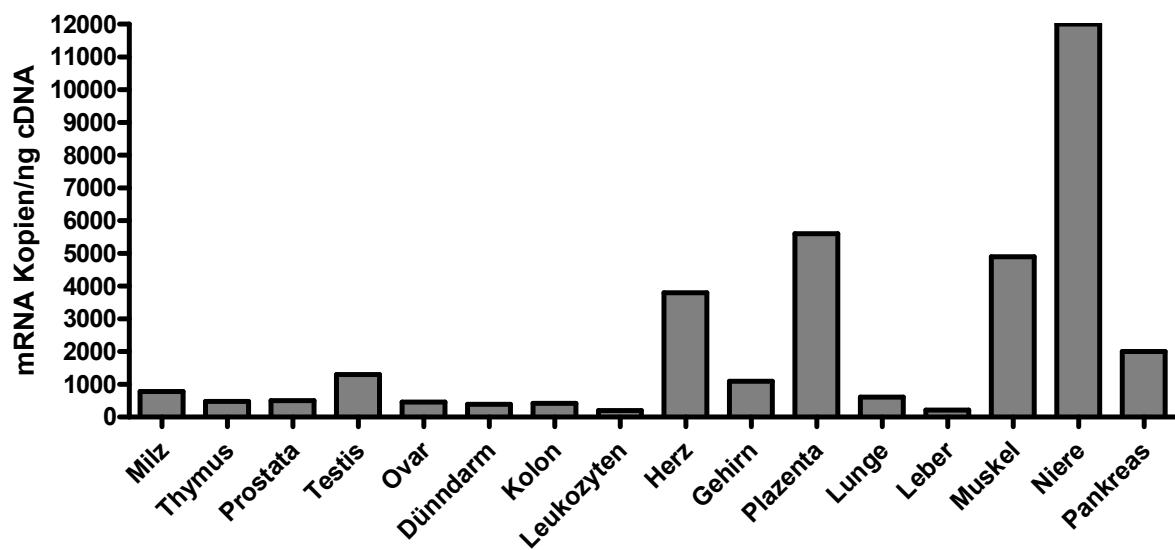


Abb. 3.14: mRNA-Expression von AKR1B1 in humanen Organen.

AKR1B10 (Abb. 3.15) zeigte eine niedrige Expression (bis  $3,5 \cdot 10^2$  Kopien/ng cDNA), mit großen Unterschieden zwischen den einzelnen Organen. Die höchsten mRNA Kopienzahlen konnten in Kolon, Dünndarm, Lunge, Leber und Thymus gemessen werden.

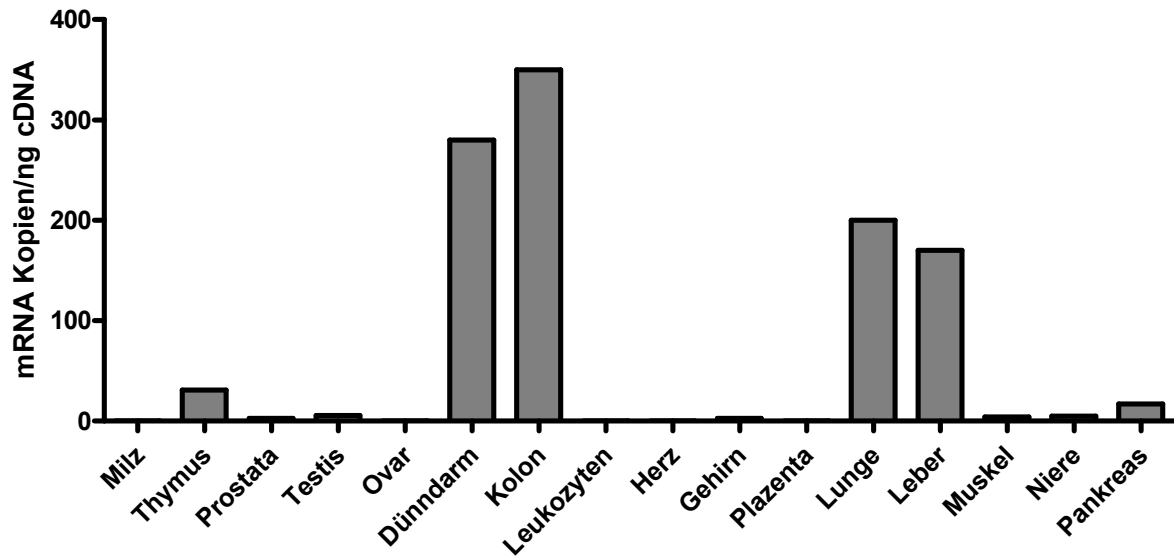


Abb. 3.15: mRNA-Expression von AKR1B10 in humanen Organen.

Auch AKR1C1 (Abb. 3.16) zeigte eine sehr unterschiedliche Expression in den verschiedenen Organen. So war eine sehr starke Expression in Leber zu beobachten ( $9,2 \cdot 10^4$  Kopien/ng cDNA), während die anderen Organe keine oder nur sehr geringe mRNA-Expression zeigten.

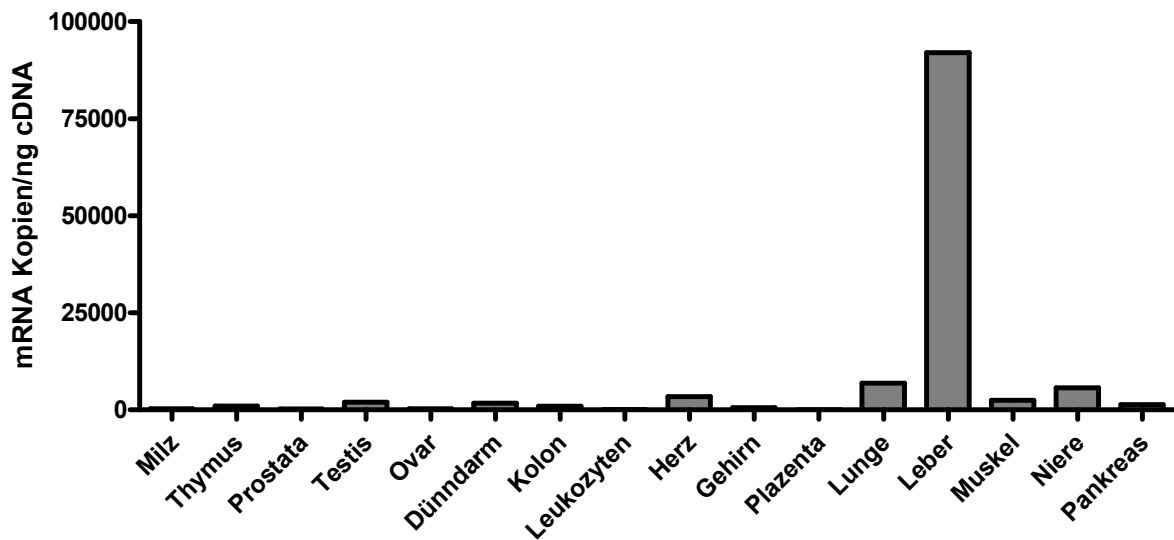


Abb. 3.16: mRNA-Expression von AKR1C1 in humanen Organen.

AKR1C2 (Abb. 3.17) zeigte in allen Organen eine ähnliche, aber geringe Expression von bis zu  $8,4 \cdot 10^1$  Kopien/ng cDNA in Muskelgewebe.

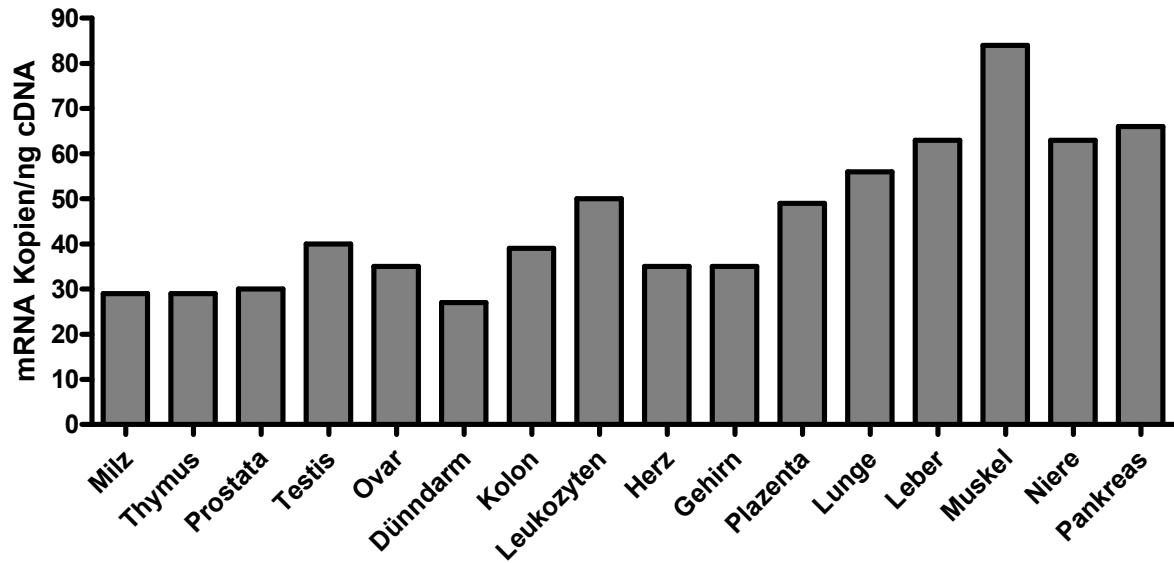


Abb. 3.17: mRNA-Expression von AKR1C2 in humanen Organen.

Auch AKR1C3 (Abb. 3.18) zeigte eine sehr unterschiedliche Expression in den verschiedenen Organen. Die höchste mRNA-Expression mit bis zu  $2 \cdot 10^3$  Kopien/ng cDNA (Leber) war in Leber und Niere zu beobachten, während die anderen Organe keine oder nur sehr schwache Expression zeigten.

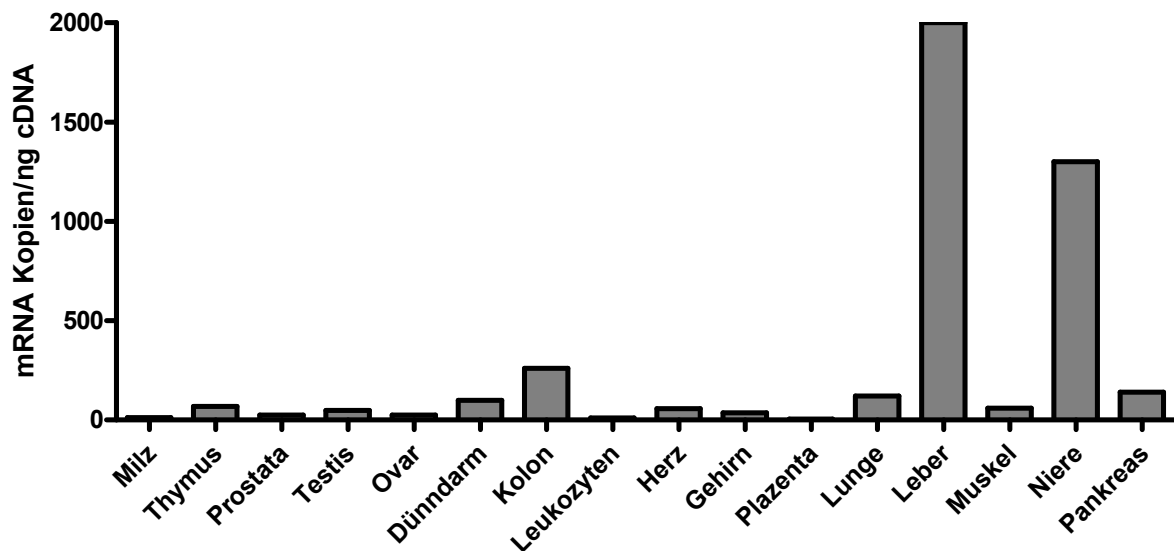


Abb. 3.18: mRNA-Expression von AKR1C3 in humanen Organen.

AKR1C4 (Abb. 3.19) zeigte eine sehr hohe Expression ( $1,4 \cdot 10^7$  mRNA Kopien/ng cDNA), die auf die Leber beschränkt ist.

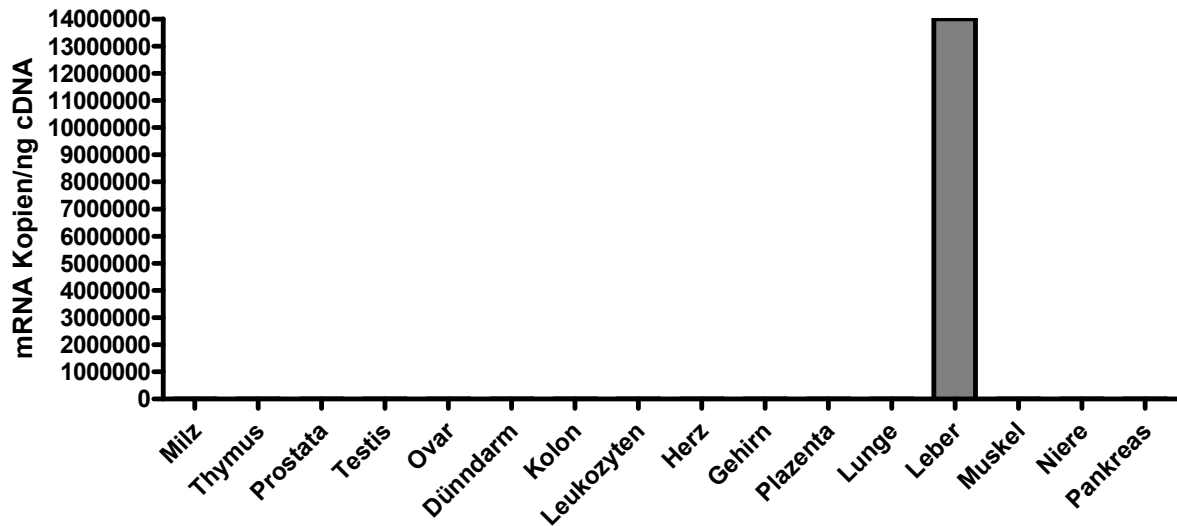


Abb. 3.19: mRNA-Expression von AKR1C4 in humanen Organen.

Auch AKR1D1 (Abb. 3.20) zeigte eine sehr starke Expression in Leber ( $8,4 \cdot 10^4$  Kopien/ng cDNA), eine moderate Expression in Testis ( $8,1 \cdot 10^3$  Kopien/ng cDNA), während die Expression in den anderen Organen vergleichsweise niedrig war.

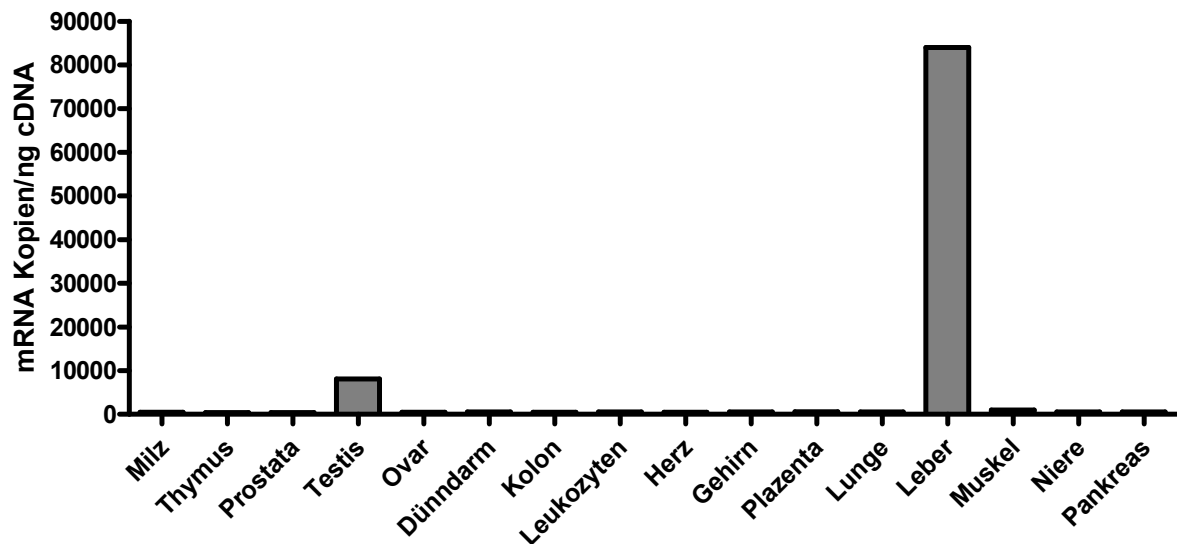


Abb. 3.20: mRNA-Expression von AKR1D1 in humanen Organen.

AKR7A2 (Abb. 3.21) zeigte in allen Organen eine sehr ausgeprägte Expression im Bereich um  $5 \cdot 10^4$  Kopien/ng cDNA. Die höchsten Transkriptzahlen war in Niere ( $5,5 \cdot 10^5$  Kopien/ng cDNA), Pankreas ( $3,3 \cdot 10^5$  Kopien/ng cDNA) und Leber ( $2,3 \cdot 10^5$  Kopien/ng cDNA) zu beobachten.

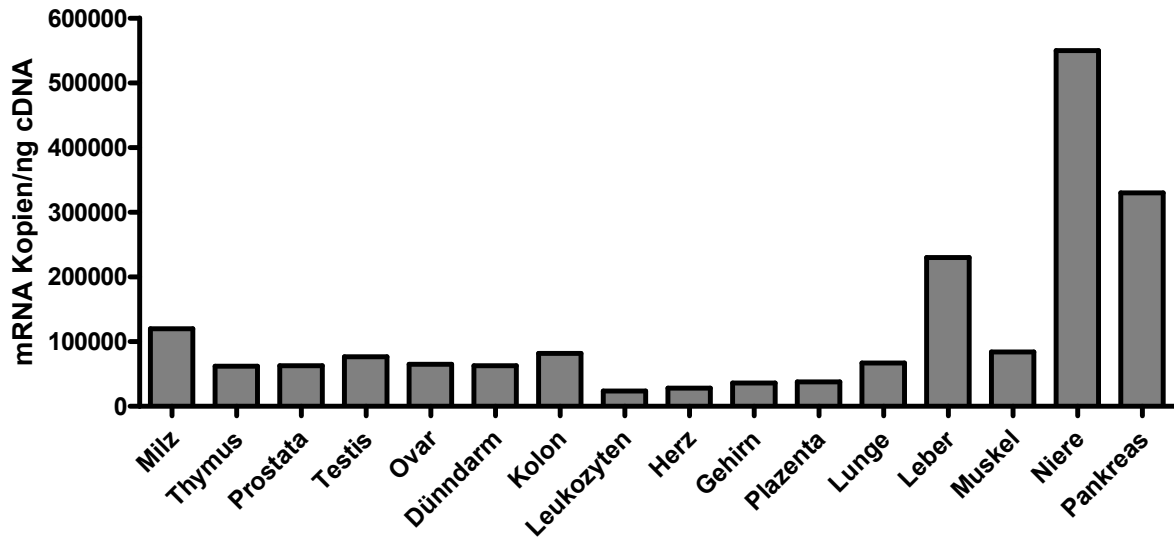


Abb. 3.21: mRNA-Expression von AKR7A2 in humanen Organen.

AKR7A3 (Abb. 3.22) zeigte eine starke Expression in Pankreas ( $4,8 \cdot 10^5$  Kopien/ng cDNA), Niere ( $1,6 \cdot 10^5$  Kopien/ng cDNA) und Leber ( $1,2 \cdot 10^5$  Kopien/ng cDNA) und eine moderate bis mäßige Expression in den anderen Organen im Bereich von  $4,8 \cdot 10^1$  bis  $8,4 \cdot 10^3$  Kopien/ng cDNA.

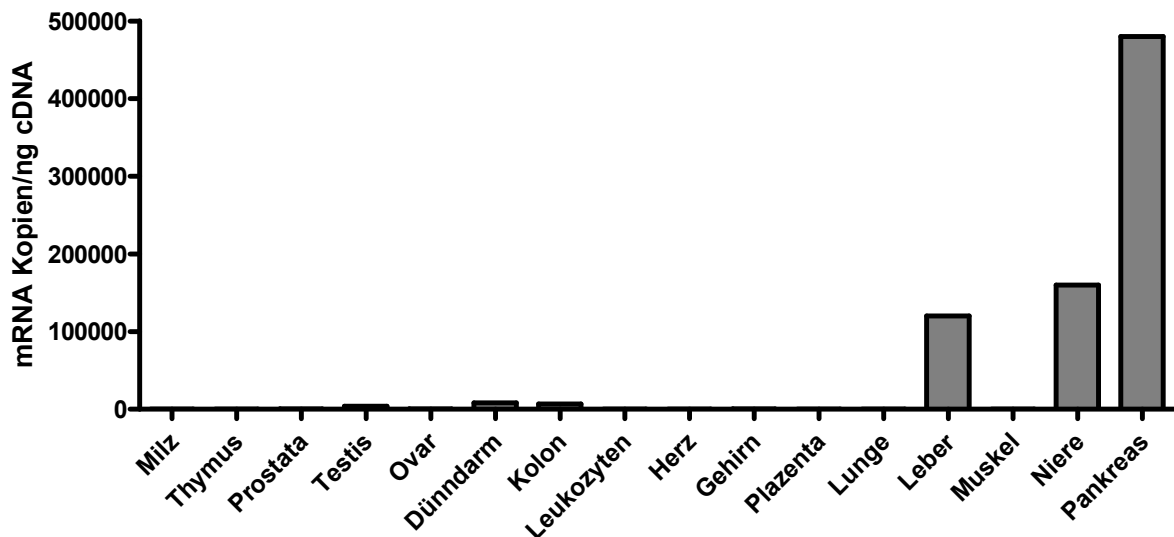


Abb. 3.22: mRNA-Expression von AKR7A3 in humanen Organen.

Die Expression der untersuchten Aldo-Keto-Reduktasen in den verfügbaren menschlichen Geweben war sehr unterschiedlich. So zeigen AKR1C4 und AKR1D1 fast ausschließlich eine sehr starke Expression in Leber ( $1,4 \cdot 10^7$  Kopien und  $8,4 \cdot 10^4$  Kopien/ng cDNA), während die Expression in den anderen Organen vergleichsweise gering war. CBR1, CBR3, AKR1A1,

AKR1B1, AKR1B10, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, AKR7A2 und AKR7A3 zeigten in allen Organen eine Expression, jedoch unterschiedlich ausgeprägt. Die Expression von CBR1, AKR1A1, AKR1C1, AKR1C3, AKR1C4 und AKR1D1 war im Vergleich zu den anderen Organen in Leber am stärksten ausgeprägt. Hierbei lagen die Kopienzahlen bei CBR1, AKR1A1, AKR1C1 und AKR1D1 im Bereich von  $10^5$  Kopien/ng cDNA, während AKR1C3 Kopienzahlen/ng cDNA von  $2 \cdot 10^3$  in Leber aufwies.

Vergleicht man die Expression der einzelnen Enzyme mit der Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol (stärkster Umsatz in Leber, Niere und Dünndarm), ergibt sich ein ähnliches Muster bei CBR1, AKR1A1 und AKR1C3. Aufgrund dieses Befundes können diese drei Enzyme als nähere Kandidatenenzyme für die Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol angenommen werden. Da AKR1A1 jedoch einen wesentlich höheren  $K_m$ -Wert als humanes Leberzytosol für den Umsatz von Doxorubizin zu Doxorubizinol zeigt, sind die stärksten Kandidatengene für die Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol in Leber AKR1C3 und CBR1.

### **3.3.1 Inhibition der Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol durch verschiedene Inhibitoren**

Bindet ein Inhibitor reversibel an die Substratbindungsstelle eines Enzyms, wird er als kompetitiver Hemmstoff bezeichnet. Um die Stärke eines Hemmstoffes genauer charakterisieren zu können, werden der  $IC_{50}$ - und der  $K_i$ -Wert bestimmt.

Der  $IC_{50}$ -Wert bezeichnet die Konzentration eines Inhibitors, die benötigt wird, um die Enzymaktivität um 50% zu reduzieren. Der  $IC_{50}$ -Wert eines Inhibitors hängt von der eingesetzten Substratkonzentration und vom  $K_m$ -Wert des Substrates ab. Je höher die eingesetzte Substratkonzentration, desto höher muss die Konzentration des Hemmstoffes sein, um 50% des Umsatzes zu hemmen. Je niedriger der  $K_m$ -Wert, desto höher die Inhibitorkonzentration, die zur Hemmung des Enzyms notwendig ist.

Als  $K_i$  wird die Dissoziationskonstante des Inhibitors zu dem Enzym bezeichnet. Ist der  $K_i$ -Wert niedrig, ist die Affinität zu dem Enzym groß. Es bedarf nur einer kleinen Konzentration des Inhibitors, um 50% des Enzymumsatzes zu hemmen, der zu erwartende  $IC_{50}$ -Wert ist also klein.

Der  $IC_{50}$ -Wert wird bestimmt, indem man die Abnahme der Enzymaktivität bei einer festen Substratkonzentration und einer variierenden Inhibitorkonzentration misst. Bei dem  $K_i$ -Wert

misst man hingegen die Abnahme der Enzymaktivität bei verschiedenen Substrat- wie auch Inhibitorkonzentrationen. Wird nur der  $IC_{50}$ -Wert bestimmt, kann der  $K_i$ -Wert nach Angabe der Substratkonzentration und des  $K_m$ -Wertes des Enzyms jedoch berechnet werden. Für diese Kalkulationen wurde GraphPad PRISM (San Diego, USA) benutzt. Diese Betrachtungen gelten nur für reversible Enzyminhibitoren.

Um die humanen Doxorubizin-Reduktasen genauer charakterisieren zu können, wurden Substanzen getestet, die in der Literatur als spezifische Inhibitoren einzelner Aldo-Keto-Reduktasen bzw. Carbonyl-Reduktasen beschrieben worden sind. In der Literatur wurden die Flavonoide Rutin, Quercetin und Quercitrin als spezifische Inhibitoren der Carbonyl-Reduktase bezeichnet (Pröpper & Maser 1997, Wermuth et al 1981, Iffert et al 2000). Weiterhin werden verschiedene Analgetika wie Indomethacin als selektive AKR1C- (Desmond et al 2003) und Diclofenac als selektiver AKR1C3-Hemmer (Gobec et al 2005) bezeichnet.

Bei den Inhibitionsmessungen wurden insbesondere Enzyme berücksichtigt, die sowohl eine hohe Umsatzrate von Doxorubizin zu Doxorubizinol als auch eine hohe Expression in Leber zeigten; weiterhin sollten die Enzyme eine ähnliche Michaelis-Menten-Konstante wie humanes Leberzytosol aufweisen. AKR1C3 und CBR1 zeigten mit  $150\mu\text{M}$  einen ähnlichen  $K_m$ -Wert wie humanes Leberzytosol (vgl. Tabellen 8.1 und Tabellen 8.3). Diese Enzyme zeichneten sich darüber hinaus durch eine hohe Umsatzrate (Tabelle 8.2, 8.3) und eine ausgeprägte mRNA-Expression in Leber aus (Abb. 3.11 und 3.18).

In Vorversuchen zeigten Inhibitoren wie Quercetin, Quercitrin und Diclofenac in verschiedenen Konzentrationen keine ausreichend spezifische Hemmung (AKR1C3 und CBR1 wurden in gleichem Maße gehemmt), so dass von weiteren Hemmstoffversuchen abgesehen wurde. Weiterhin wurde probiert, eine Hemmung des jeweiligen Enzyms mit dem entsprechenden Antikörper zu erreichen. Die Antikörper gegen CBR1 und AKR1C3 wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt, als Kontrolle diente ein Ansatz mit demselben Enzym und einem anderen Antikörper. Es konnte jedoch sowohl für AKR1C3 als auch für CBR1 keine Hemmung beobachtet werden.

2005 wurde in einer Veröffentlichung (Tanaka et al 2005) von einem spezifischen CBR1-Hemmstoff, dem 4-amino-1-tert-butyl-3-(2-hydroxyphenyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin, berichtet. Der Hemmstoff, der weiterhin als „Hydroxy-PP“ bezeichnet wird, wurde von Herrn Perscheid am Institut für organische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Arbeitskreis Nubbemeyer) synthetisiert und gereinigt. Anschließend wurde die Bildung von Doxorubizinol durch CBR1 und AKR1C3 und in humanen Leberzytosolen in An- und

Abwesenheit von verschiedenen Hydroxy-PP-Konzentrationen gemessen und dadurch die Hemmung bestimmt.

Der  $IC_{50}$ -Wert für die Hemmung der Umsetzung des CBR1-Substrates Menadion wurde von Tanaka et al (2005) mit 755 nM angegeben. Wir konnten den  $IC_{50}$ -Wert spektrophotometrisch unter analogen Bedingungen zu 1,3  $\mu$ M bestimmen (Abb. 3.23).

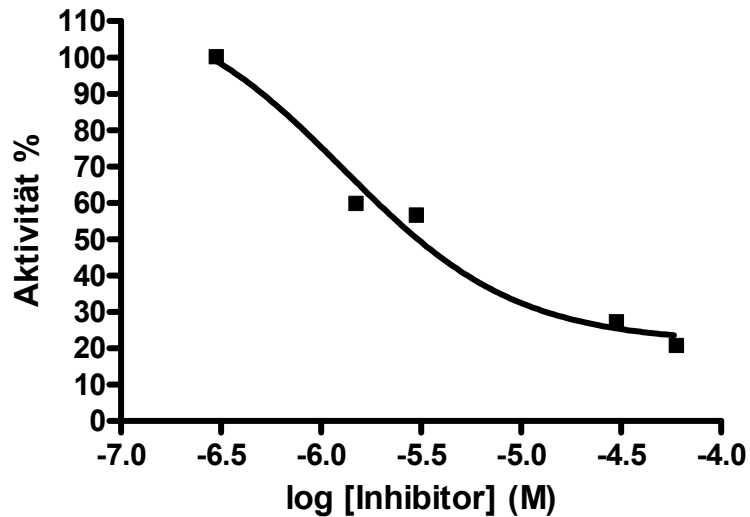


Abb. 3.23: Hemmung des Menadion-Umsatzes von CBR1 durch den Inhibitor Hydroxy-PP.

Bei 100  $\mu$ M Doxorubizin zeigte Hydroxy-PP für CBR1 einen  $IC_{50}$ -Wert von 16,7  $\mu$ M. Der errechnete  $K_i$ -Wert lag bei 10,5  $\mu$ M (Abb. 3.24).

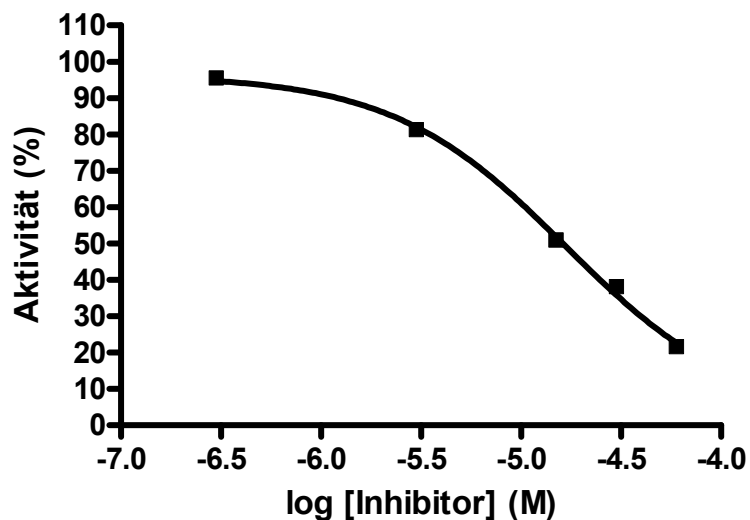


Abb. 3.24: Hemmung des Doxorubizin-Umsatzes von CBR1 durch Hydroxy-PP.



Hydroxy-PP ist für CBR1 keineswegs spezifisch und hemmt auch den Doxorubizin-Metabolismus durch AKR1C3. Die Hemmung war sogar stärker im Vergleich zu CBR1 und zeigte einen  $IC_{50}$ -Wert von  $2,5\mu\text{M}$ . Der berechnete  $K_i$ -Wert lag bei  $1,4\mu\text{M}$  (Abb. 3.25).

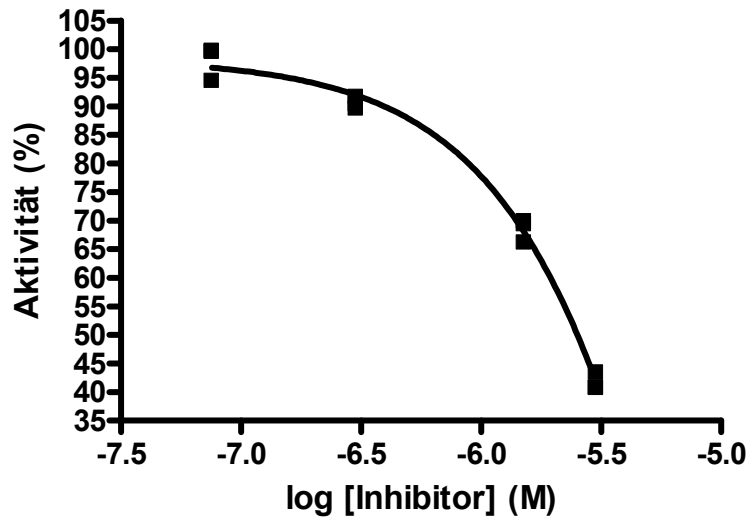


Abb. 3.25: Hemmung des Doxorubizin-Umsatzes von AKR1C3 Hydroxy-PP.

Das Leberzytosol wurde mit einem  $IC_{50}$  von  $17,3\mu\text{M}$  gehemmt, der berechnete  $K_i$ -Wert war  $9,9\mu\text{M}$  (Abb. 3.26).

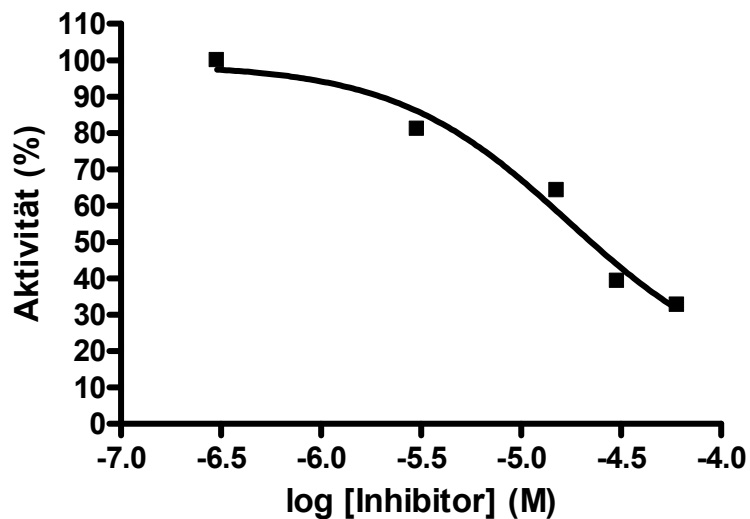


Abb. 3.26: Hemmung des Doxorubizin-Umsatzes von humanem Leberzytosol durch Hydroxy-PP.

Die Übereinanderlagerung der Abbildungen 3.24, 3.25 und 3.26 zeigt, dass die Verläufe der enzymatischen Aktivitäten bei steigenden Konzentrationen von Hydroxy-PP für CBR1 und humanes Leberzytosol fast identisch sind (Abb. 3.27). Die Hemmung der AKR1C3 erfolgte dagegen bereits bei wesentlich geringeren Hemmstoff-Konzentrationen. Bei einer Inhibitor-

Konzentration von  $2,5\mu\text{M}$  ( $=\text{IC}_{50}$ -Wert) wurde die AKR1C3-Aktivität um 50% gehemmt. Bei dieser Konzentration im Leberzytosol konnte nur eine Hemmung von ca. 12% beobachtet werden. Dementsprechend erscheint als unwahrscheinlich, dass AKR1C3 die dominierende oder gar alleinige Doxorubizin-Reduktase in humaner Leber ist. Weiterhin hatte Hydroxy-PP bis zu der höchsten getesteten Konzentration von  $30\mu\text{M}$  keinen Effekt auf den Umsatz von 9,10-Phenanthrenchinon durch CBR3. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der hepatische Metabolismus von Doxorubizin zu Doxorubizinol hauptsächlich durch die CBR1 katalysiert wird.

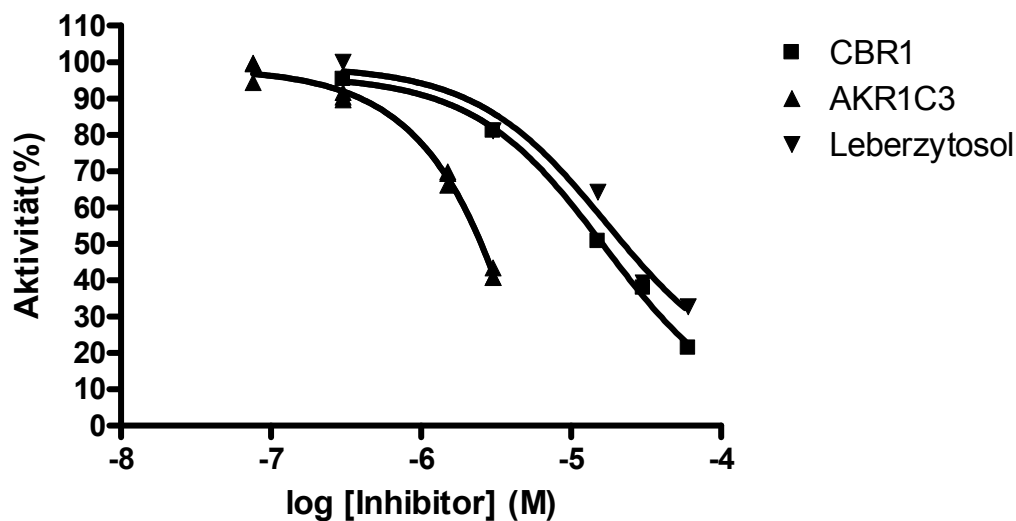


Abb. 3.27: Hemmung des Doxorubizinsatzes von CBR1, AKR1C3 und humanen Leberzytosols durch Hydroxy-PP.

### 3.3.2 Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol durch Leberzytosole

110 Leberzytosole aus der IKP148-Studie wurden auf die Variabilität des Metabolismus von Doxorubizin zu Doxorubizinol untersucht. Des Weiteren wurden Korrelationsanalysen zwischen der gemessenen Aktivität mit dem mRNA und Proteingehalt des Kandidatenproteins durchgeführt. Von den 110 Proben wurden 20 Proben von den Messungen aufgrund der nicht-homogenen Konsistenz der erhaltenen Zytosole ausgeschlossen.

Für die Bestimmung der Variabilität des Doxorubizin-Metabolismus in verschiedenen humanen Leberzytosolen wurden die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  bestimmt. Für die Bestimmung von  $V_{max}$ - und  $K_m$ -Werten wurden Inkubationen bei den folgenden Doxorubizin-Konzentrationen gemessen: 1, 25, 50, 100 und  $250\mu\text{M}$ . In einer weiteren Untersuchung, die

knapp 3 Jahre nach der ersten Messung erfolgte, wurde die Aktivität bei einer dieser Doxorubizin-Konzentrationen ( $250\mu\text{M}$ ) erneut gemessen und mit dem früheren Wert bei derselben Doxorubizin-Konzentration verglichen.

Bei der Auswertung der kinetischen Daten der Leberproben gab es einige wenige Proben, bei denen die Umsetzung zu Doxorubizinol bei der höchsten Doxorubizin-Konzentration ( $250\mu\text{M}$ ) nicht bestimmt worden war. Die Umsatzraten bei hohen Konzentrationen sind für die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes und der maximalen Umsatzgeschwindigkeit jedoch von besonderer Bedeutung. Weiterhin gab es Messwerte, die stark von der Michaelis-Menten-Kinetik abwichen. Dies kann an einer möglichen biologischen Streuung, als auch an Messfehlern gelegen haben.

Die Daten wurden daher in zwei Sätzen ausgewertet. Der erste Satz enthielt alle gemessenen Proben ( $n=92$ ). Der zweite Satz ( $n=80$ ) enthielt nur die Proben, für die Messpunkte bei 100 und  $250\mu\text{M}$  nicht mehr als 15% von der berechneten Michaelis-Menten-Kinetik abwichen und für die Werte für alle 5 Doxorubizin-Konzentrationen vorlagen.

Die Proben aus Satz 1 zeigten im Histogramm für  $K_m$  eine Verteilung, die von der Gauß'schen Normalverteilung abwich (Shapiro-Wilk,  $p<0,001$ ) und stark nach rechts verzerrt war. Mit Werten von 43 bis  $502\mu\text{M}$  betrug der Variationskoeffizient 258%, der Median war  $100\mu\text{M}$  (Abb. 3.28).

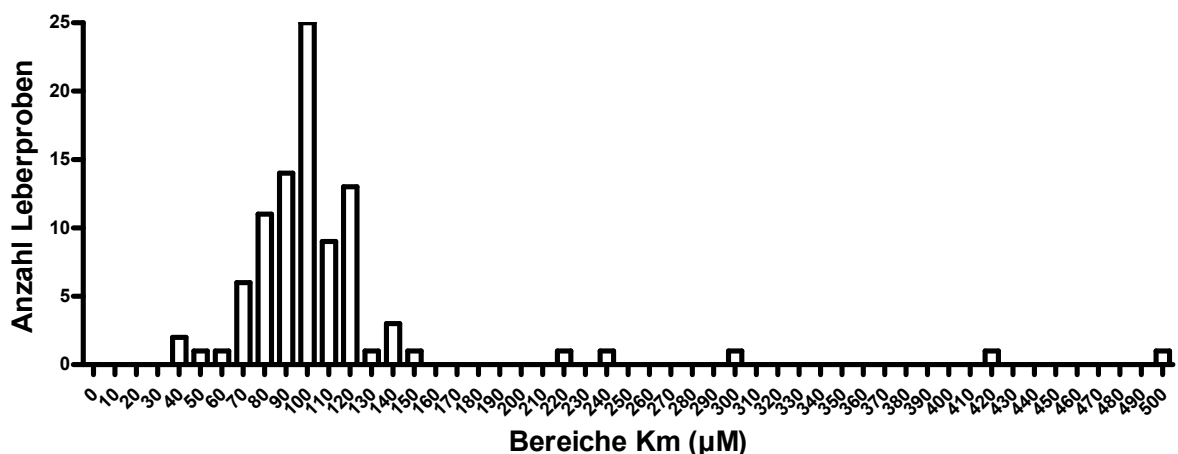


Abb. 3.28: Verteilung des  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ ) in 92 Leberproben (Satz 1).

Das Histogramm für  $V_{\text{max}}$  zeigte ebenfalls eine Verteilung, die von der Normalverteilung abwich (Shapiro-Wilk,  $p<0,001$ ) und nach rechts verzerrt war. Die Werte lagen zwischen 131 bis  $4914\text{ pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ . Der Variationskoeffizient betrug 282%, der Median war  $409\text{ pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  (Abb. 3.29).

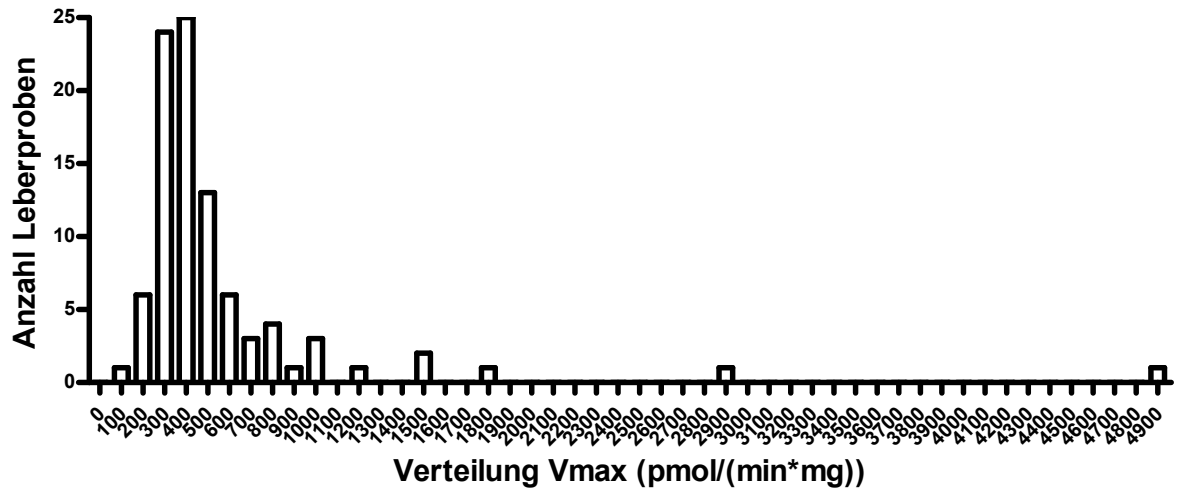


Abb. 3.29: Verteilung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit in 92 Leberproben (Satz 1).

Der zweite Satz zeigte im Histogramm eine  $K_m$ -Verteilung, die ebenfalls von der Normalverteilung abwich (Shapiro-Wilk,  $p < 0,001$ ) und leicht nach rechts verzerrt war. Der Minimalwert betrug  $53 \mu\text{M}$ , der Maximalwert  $298 \mu\text{M}$ . Der Median betrug  $100 \mu\text{M}$ , der Variationskoeffizient lag bei 210% (Abb. 3.30). Betrachtete man die  $K_m$ -Werte, fielen zwei Proben auf, die wesentlich höhere  $K_m$ -Werte zeigten (Probe 23, 24). Probe 23 wies neben dem hohen  $K_m$ -Wert auch noch einen der höchsten  $V_{\text{max}}$ -Werte auf. Probe 24 zeigte ebenfalls einen  $V_{\text{max}}$  im oberen Bereich.

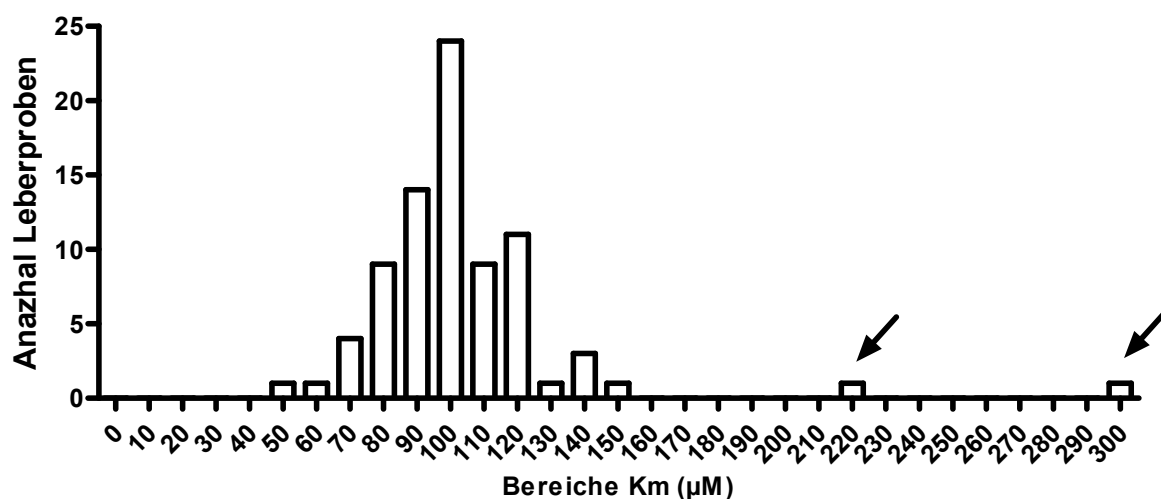


Abb. 3.30: Verteilung des  $K_m$  in 80 Leberproben (Satz 2).

Für  $V_{\text{max}}$  zeigte der zweite Wertesatz eine Verteilung, die ebenfalls von der Normalverteilung (Shapiro-Wilk,  $p < 0,001$ ) abwich und stark nach rechts verzerrt war. Der Minimalumsatz betrug  $131 \text{ pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$  und der Maximalumsatz  $2807 \text{ pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ . Der Median lag

bei 408 pmol/(min\*mg) und der Variationskoeffizient betrug damit 219% (Abb. 3.31). Betrachtet man die Verteilung bei  $V_{\max}$ , so erkennt man neben Probe 23 zwei weitere Proben (Probe 47 und 35), die eine wesentlich höhere Aktivität zeigten, als die anderen Proben.

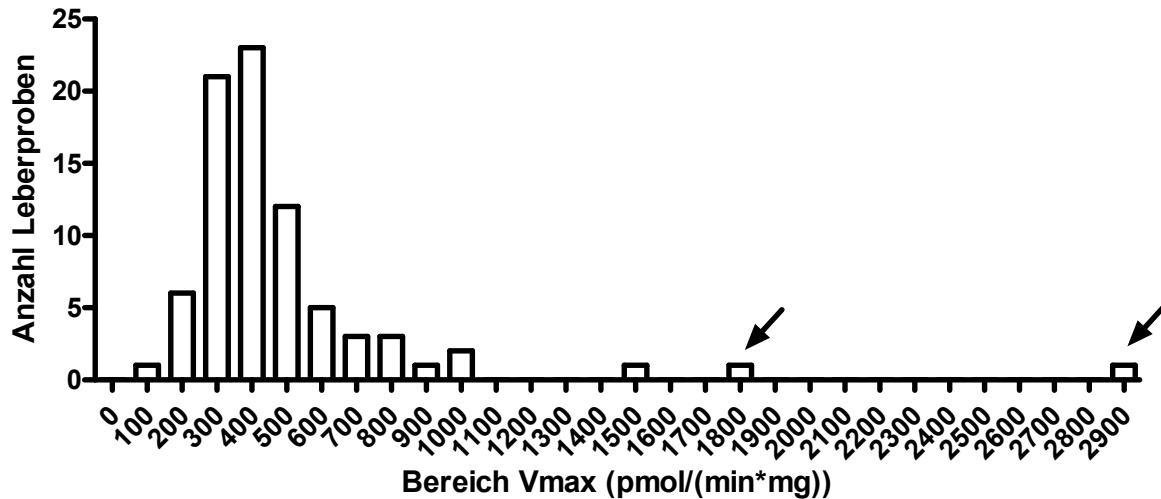


Abb. 3.31: Verteilung von  $V_{\max}$  in 80 Leberproben (Satz 2).

Der Median ist bei  $K_m$  und  $V_{\max}$  zwischen den Sätzen unverändert. Jedoch zeigten die Proben, die aus Satz 2 ausgeschlossen wurden, besonders hohe oder niedrige Werte. Dies deutet eher auf fehlerhafte bzw. fehlende Messungen der Proben als auf biologische Streuung hin. Durch das Fehlen der hohen Messwerte war der Variationskoeffizient im Satz 2 deutlich kleiner als im Satz 1. Für  $K_m$  betrug die Differenz 19%, für  $V_{\max}$  sogar 22%.

Als weitere Kontrolle der Messwerte wurden die spezifischen Aktivitäten bei 250  $\mu$ M und die Maximalgeschwindigkeiten des Doxorubizin-Umsatzes mit der als Kontrolle nach ca. 30 Monaten erneut nachgemessenen spezifischen Aktivität bei 250  $\mu$ M Doxorubizin verglichen.

Im Messdatensatz 1 konnte nur  $V_{\max}$  gegen die als Kontrolle nachgemessene spezifische Aktivität bei 250  $\mu$ M Doxorubizin verglichen werden, da bei einigen Kinetiken der Umsatzwert bei 250  $\mu$ M Doxorubizin nicht vorhanden war. Die Korrelation betrug hierbei 74,2% ( $p < 0,001$ ).

Vergleicht man diese Daten im Satz 2, so zeigte sich eine Korrelation von 86,1% ( $p < 0,001$ ). Eine Korrelation von 91% ( $p < 0,001$ ) wurde erreicht, wenn man die jeweiligen spezifischen Aktivitäten bei 250  $\mu$ M Doxorubizin miteinander verglich (Abb. 3.32). Allerdings waren die später gemessenen Aktivitäten etwa 2-fach geringer als die früheren.

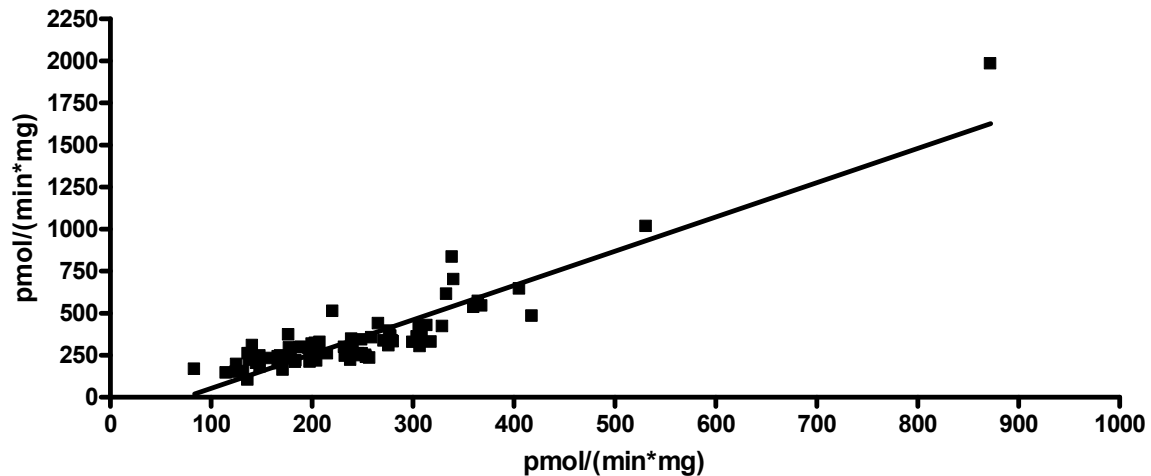


Abb. 3.32: Korrelation der früher und nachträglich gemessenen spezifischen Aktivitäten bei 250 $\mu$ M Doxorubicin.  $r=0,91$ ,  $p<0,001$ ,  $n=80$  (Satz 2).

Auch dieser Unterschied zwischen Satz 1 zu Satz 2 deutet auf eine ungenaue Bestimmung von  $V_{\max}$  bei den aus dem Satz 2 ausgeschlossenen Proben hin. Die 2003 gemessene Aktivität sollte proportional zu der 2006 bestimmten Aktivität sein.

Die starke interindividuelle Variabilität der  $V_{\max}$ -Werte der Umsetzung von Doxorubicin zu Doxorubicinol deutete auf unterschiedliche Expressionslevel des verantwortlichen Enzyms hin. Um die verantwortliche Haupt-Doxorubicin-Reduktase in humaner Leber näher charakterisieren zu können, wurden im weiteren Verlauf Kandidatenenzyme als auch Zytosole aus verschiedenen humanen Organen untersucht.

### 3.4 Western Blot Analyse von verschiedenen Leberzytosolen der IKP148-Studie

Die oben dargestellten Ergebnisse wiesen darauf hin, dass CBR1 die dominierende Doxorubicin-Reduktase in den humanen Lebern darstellt. Um eine Korrelation des Kandidatenproteins CBR1 mit den gemessenen  $V_{\max}$ -Werten der humanen Leberzytosolproben aus der IKP148-Studie zu erstellen, wurden Western Blots von diesen Proben erstellt. Da  $V_{\max}$  häufig proportional zur Proteinmenge des Doxorubicin-umsetzenden Enzyms ist, wäre eine Korrelation ein weiterer Hinweis, dass es sich bei CBR1 um das Doxorubicin umsetzende Protein handelt.

90 Proben wurden im Western Blot auf den CBR1-Protein-Gehalt untersucht. Da jeweils nur 10 Proben auf ein SDS-PAGE aufgetragen werden konnten, mussten neun Western Blots angefertigt werden, um die Expression aller Proben zu bestimmen. Trotz gleicher

Bedingungen (Gellaufzeit, Antikörperkonzentration, Inkubationszeiten, Belichtung) war die Signalintensität zwischen den Blots nicht immer gleich. Die Verhältnisse der Intensitäten zwischen verschiedenen Proben auf einem Blot waren jedoch immer reproduzierbar. Daher wurde für die Vergleichbarkeit zwischen den Blots ein weiterer Western Blot erstellt, der Proben von jedem der vorangegangenen Blots beinhaltet hat. Der relative Proteingehalt von CBR1 konnte so bestimmt werden.

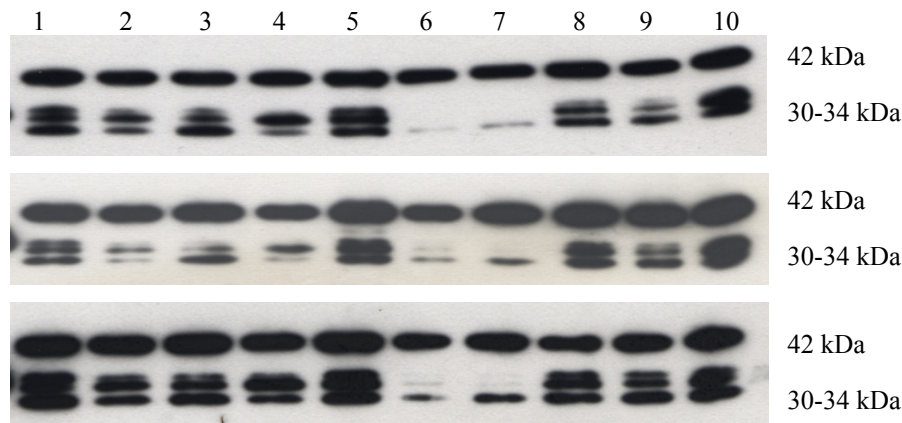


Abb. 3.33: Vergleich der CBR1- und GAPDH-Signalintensitäten von zehn humanen Leberproben im Western Blot an 3 verschiedenen Tagen.

CBR1 zeigt im Western Blot eine Dreierbande. CBR1 ist in der Lage, autokatalytisch an das Lysin 239 verschiedene 2-Oxocarboxylsäuren, wie Pyruvat oder 2-Oxoglutarat, zu addieren. Diese CBR1-Isoformen sind etwas schwerer und laufen daher langsamer in der SDS-PAGE. Mit Menadion zeigten die Isoformen keine veränderten Umsatzraten als die unmodifizierte CBR1 (Bohren et al 1987, Wermuth et al 1993, Krook et al 1993). Die Bildung der Addukte hängt von dem metabolischen Zustand der Zelle ab (Bohren et al 1994).

Bei der Auswertung der Western Blots wurden die drei CBR1-Banden zusammen densitometrisch erfasst und ausgewertet.

### 3.4.1 Normalisierung der Western Blots

Zur Normalisierung von Western Blots benötigt man ein Protein, von dem man annimmt, dass es in den zu vergleichenden Gewebeproben im gleichen Maßstab gebildet wird. Mögliche Unterschiede in der aufgetragenen Proteinmenge können durch einen Standard erkannt und bei der Kandidaten-Proteinbestimmung miteinberechnet werden.

Die Normalisierung der IKP148-Leberproben stellte sich als schwierig dar, da viele der bekannten Standards wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin als auch  $\beta$ -Actin sehr polymorph exprimiert

werden. So zeigten die untersuchten Leberzytosole bis zu drei  $\alpha$ -Tubulin- (55-60 kDa, Abb. 3.34) Banden in unterschiedlichen Verhältnissen.  $\beta$ -Tubulin zeigte ein ähnliches Bild (nicht dargestellt).

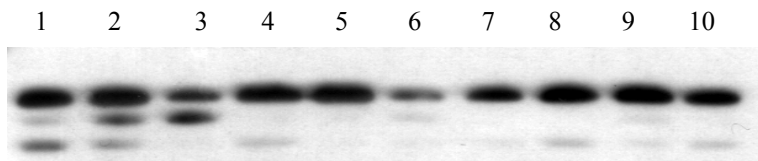


Abb. 3.34:  $\alpha$ -Tubulin-Banden im Western Blot (55-60kDa). Aufgetrennt wurden je 2 $\mu$ g Leberzytosol in einer 12 prozentigen SDS PAGE.

Bei  $\beta$ -Actin (Abb. 3.35) waren sogar bis zu vier (50-60 kDa) verschiedene Banden zu erkennen, die in den unterschiedlichen Zytosolen unterschiedlich stark ausgeprägt waren.

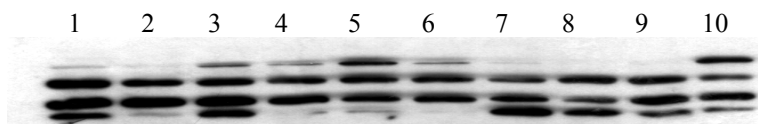


Abb. 3.35:  $\beta$ -Actin-Banden im Western Blot, (50-60kDa). Aufgetrennt wurden je 2 $\mu$ g Leberzytosol in einer 12 prozentigen SDS PAGE.

Zur Normalisierung wurde schließlich GAPDH herangezogen, da es nur eine Bande bei 42 kDa im Western Blot zeigte und somit zu einer einfachen Quantifizierung und anschließenden Normalisierung am Besten geeignet war (Abb. 3.36).

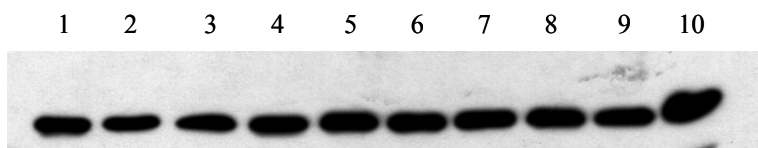


Abb. 3.36: GAPDH-Bande im Western Blot, 42kDa. Aufgetrennt wurden je 2 $\mu$ g Leberzytosol in einer 12 prozentigen SDS PAGE.

### 3.4.2 Bestimmung der relativen Expression von CBR1 in humanen Lebern

Die relative Expression der CBR1 und der GAPDH einer Probe wurde mit dem Programm Clarity Lite (Bio-Rad, München) densitometrisch bestimmt. Hierfür wurde jeweils auf einer definierten Fläche die Schwärzung des Blot gemessen, die Hintergrundschwärzung wurde subtrahiert. Zur Normalisierung wurde die ermittelte relative Expression von CBR1 durch die relative Expression von GAPDH geteilt.



Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Blots gewährleisten zu können, wurde die relative Expression von CBR1 und GAPDH in einer Probe von jedem Blot auf einem weiteren Blot bestimmt. So konnten die unterschiedlichen Intensitäten der einzelnen Blots gegeneinander normalisiert werden. Die kompletten Expressionsdaten für die einzelnen Leberproben sind in Tabelle 8.5 (Anhang) dargestellt.

Die Verteilung der ermittelten CBR1-Proteinexpressionsdaten wich von einer Normalverteilung ab (Shapiro-Wilk  $p < 0,0001$ ) und war stark nach rechts verzerrt. Die ermittelten Werte (Satz 1) variierten zwischen 0,16 und 51,19 relativen Expressionseinheiten. Der Median betrug 2,03 Expressionseinheiten, der Variationskoeffizient betrug 187%. Satz 2 zeigte zum Satz 1 wenig Unterschiede, lediglich der Variationskoeffizient war mit 146% etwas geringer, da der Maximalwert auch kleiner war; der Median blieb unverändert. Proben 46 und 64 zeigen besonders hohe relative Proteinexpressionen.

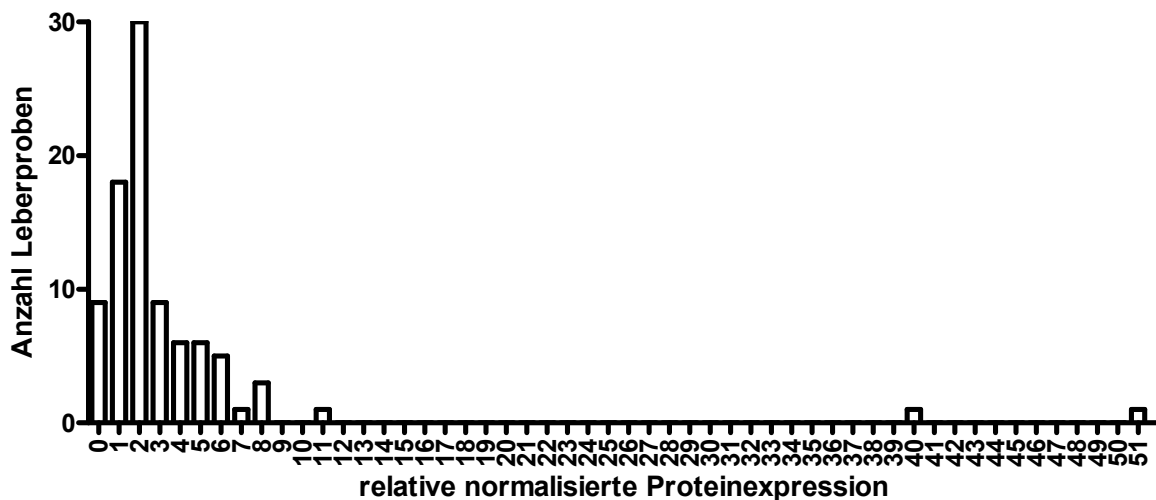


Abb. 3.37: Histogramm für die relative normalisierte CBR1-Proteinexpression aus 90 Lebern.

Betrachtet man die Werte für die relative normalisierte CBR1-Expression in Bezug auf die gemessenen maximalen Umsatzraten, so kann man visuell keine deutliche Korrelation im Datensatz 1 und 2 erkennen (Abb. 3.38).

Der Pearson  $r$ -Wert war im Satz 1 hoch mit 0,62 ( $p < 0,0001$ ), zeigte in der Spearman Korrelationsanalyse jedoch keine signifikante Korrelation ( $r = 0,19$ ,  $p = 0,074$ ).

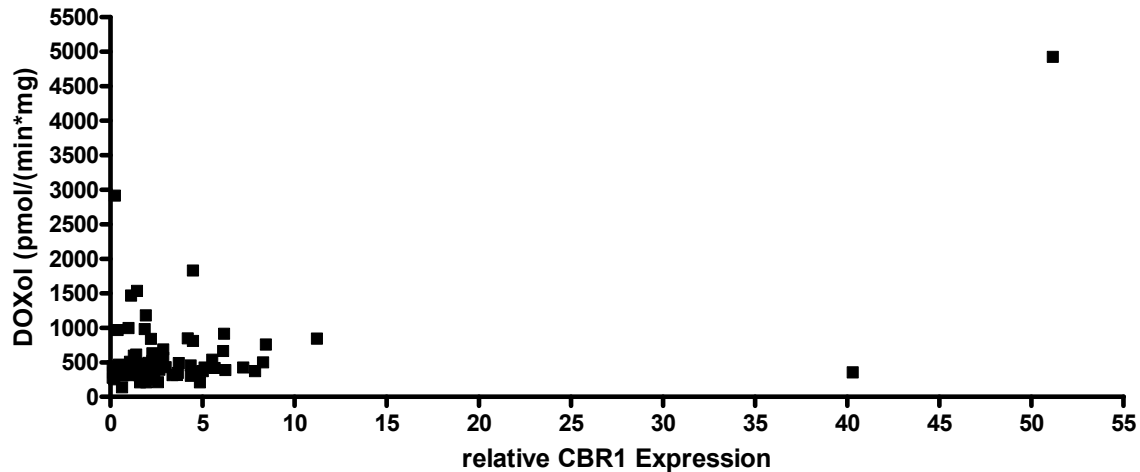


Abb. 3.38: Korrelation der relativen Expression von CBR1 mit der maximalen Umsatzrate von Doxorubizin zu Doxorubizinol in 92 Leberzytosolen, Datensatz 1.  $r=0,62$ ,  $p<0,0001$ .

Satz 2 (Abb. 3.39) zeigte hingegen keine Korrelation mit dem Pearson r-Wert bei  $-0,015$  ( $p=0,90$ ). In der Spearman Korrelationsanalyse konnte ebenfalls keine Korrelation erkannt werden ( $r=0,19$ ,  $p=0,09$ ).

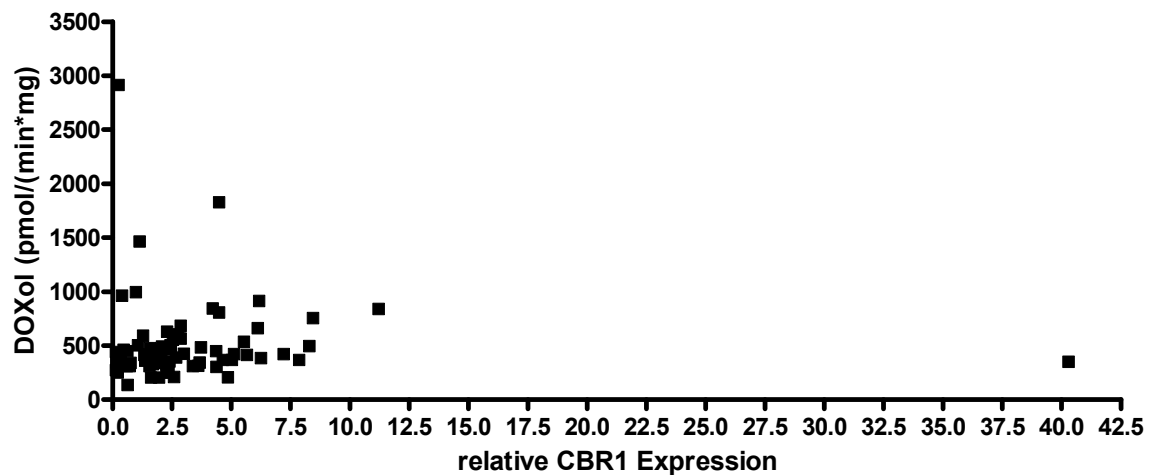


Abb. 3.39: Korrelation der relativen Expression von CBR1 mit der maximalen Umsatzrate von Doxorubizin zu Doxorubizinol in 80 Leberzytosolen, Datensatz 2.  $r=0,0002$ ,  $p=0,90$ .

Dennoch war für 6 der 9 einzelnen Blots durchaus eine Korrelation zwischen der relativen Expression von CBR1 und dem Umsatz von Doxorubizin zu erkennen (Tabelle 3.2). Die Korrelationsanalyse wurde für die maximale Umsatzrate als auch für eine spezifische Aktivität bei  $100 \mu\text{M}$  bestimmt. Kinetikmessungen, die aufgrund fehlender Messpunkte bei  $250 \mu\text{M}$  zu einem ungenauen  $V_{\text{max}}$ -Wert führten (Proben 6, 7, 8, 10), konnten so mit in die Analyse einbezogen werden.

Western Blot Proben	1-12	13-25	27-42	43-62	63-77	78-92	95-104	105-117	118-128
V <sub>max</sub>	r=0,49 p=0,15	r=0,60 p=0,068	r=0,48 p=0,16	<b>r=0,97</b> <b>p&lt;0,0001</b>	r=0,18 p=0,62	<b>r=0,73</b> <b>p=0,02</b>	<b>r=0,89</b> <b>p=0,0007</b>	<b>r=0,65</b> <b>p=0,041</b>	r=0,07 p=0,85
spez. Akt bei 100µM	<b>r=0,62</b> <b>p=0,05</b>	<b>r=0,86</b> <b>p=0,0014</b>	r=0,44 p=0,20	<b>r=0,74</b> <b>p=0,014</b>	r=0,13 p=0,73	<b>r=0,73</b> <b>p=0,016</b>	<b>r=0,81</b> <b>P=0,0045</b>	<b>r=0,66</b> <b>p=0,039</b>	r=0,01 p=0,98

Tabelle 3.2: Korrelation der spezifischen Aktivität (bei 100µM) und maximalen Aktivität mit der relativen Expression von CBR1 im Western Blot. Das Konfidenzintervall betrug 95%.

Weiterhin wurde bei einer Korrelation zwischen der spezifischen Aktivität bei 100 µM und V<sub>max</sub> ein r-Wert von 0,95 (p<0,0001) bestimmt. Auch eine Korrelation bei einer niedrigen Konzentration (25µM) und einer hohen Konzentration (250µM) zeigt einen sehr hohen r-Wert (0,9; p<0,0001). Dies führt zur Annahme, dass die untersuchte Reaktion hauptsächlich nur von einem Enzym katalysiert wird; Enzyme mit einer hohen Affinität (niedrigem K<sub>m</sub>-Wert) und einer niedrigen Kapazität (niedriger V<sub>max</sub>-Wert) bzw. Enzyme mit einer niedrigeren Affinität (hoher K<sub>m</sub>-Wert) und hoher Kapazität (hoher V<sub>max</sub>-Wert) scheinen nicht zum Tragen zu kommen (Nakajima et al 1996).

Die zwölf aussortierten Proben aus Satz 1 im Vergleich zu Satz 2 betreffen jeweils vier Proben in Blot 1-12, Blot 27-42 und Blot 43-62. Bei Blot 1-12 und Blot 27-42 konnte keine signifikante Korrelation beobachtet werden; bei Blot 43-62 hingegen trat eine hohe Korrelation der CBR1-Expression im Western Blot mit der gemessenen Umsatzrate von Doxorubizin zu Doxorubizinol auf. Bei Blot 118-128 waren die Aktivitäten alle im gleichen Bereich, so dass eine Korrelation schwer zu erkennen wäre.

Durch die erfolgte Western Blot-Analyse kann nicht hinreichend geklärt werden, ob eine Korrelation zwischen der Expression von CBR1 und der maximalen Umsatzrate von Doxorubizin zu Doxorubizinol in Leberzytosolen besteht. Betrachtet man die einzelnen Western Blots und die Korrelationen mit den spezifischen Aktivitäten der gesuchten Reaktion, kann eine Beteiligung von CBR1 an der untersuchten Reaktion jedoch vermutet werden.

Da die Auswertung der vielen Western Blots und die Normalisierung gegeneinander eine hohe Fehlerquelle darstellt, wurde nach Alternativen für die Expressionsanalyse von CBR1 gesucht.

### 3.5 Dot Blot Analyse

Der Dot Blot basiert, ähnlich wie der Western Blot, auf der Detektion eines Proteins durch eine gekoppelte Antikörperreaktion. Jedoch erfolgt beim Dot Blot nicht, wie im Western Blot, eine Auftrennung der Proteine durch eine SDS-PAGE, sondern die Proteine werden direkt auf eine Membran aufgetragen, fixiert und anschließend wie im Western Blot durch eine gekoppelte Antikörperreaktion detektiert. Da keine Auftrennung nach der Größe der Proteine erfolgt, ist es besonders wichtig, dass die Antikörperreaktion absolut spezifisch ist, sonst würden unspezifische und spezifische Signale sich überlagern. Diese Spezifität wurde in einem Western Blot für die eingesetzten CBR1- und GAPDH-Antikörper in dem eingesetzten Konzentrationsbereich bestätigt und wird in Abb. 3.40 gezeigt. Die Antikörper zeigen keine Kreuzreaktionen und können somit für den Dot Blot eingesetzt werden. Im Dot Blot wurde jeweils eine Protein beladene Membran mit dem CBR1- und eine mit dem GAPDH-Antikörper inkubiert.

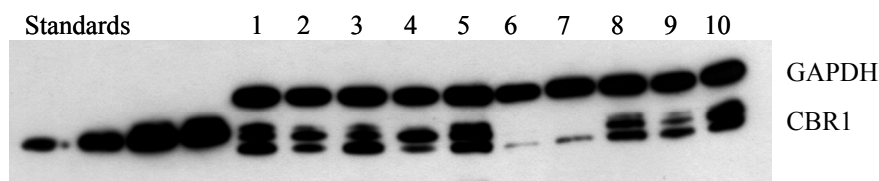


Abb. 3.40: Western Blot von CBR1 und GAPDH in verschiedenen Leberzytosolen. Aufgetragen wurden 25, 50, 75 und 100ng rekombinantes CBR1 und je 500ng von 10 humanen Leberzytosolen.

Die Dot Blot-Analyse wurde in zwei verschiedenen Apparaturen (SlotBlot Manifold, Gibco BRL; Minifold DotBlot Apparatus, Schleicher & Schüll, Kassel) durchgeführt. Die GIBCO-Apparatur war bereits recht veraltet. Die Membran wurde in ein Vakuumsystem eingespannt, über Slots konnten die Proben auf die Membran aufgebracht werden. Da die Slots bei längerem Vakuum nicht vollständig dicht waren und die Probe auf der Membran verschmierte, wurde versucht, alle Proben über die Slots aufzutragen und sie anschließend auf die Membran durch Anlage des Vakuums aufzubringen.

Hierbei trat das Problem auf, dass die Signalintensität erheblich mit der Verweildauer des Proteins auf der Membran anstieg (Abb. 3.41). Für die weiteren Dot Blot-Analysen wurde daher eine modernere Dot Blot Apparatur verwendet (Minifold Dot Blot system, Schleicher & Schüll, Kassel).

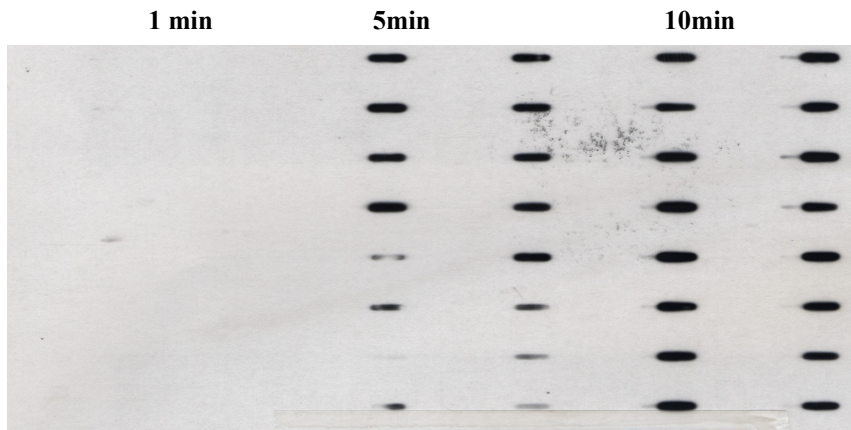


Abb. 3.41: Dot Blot-Analyse von CBR1. Aufgetragen wurden je 500ng eines Leberzytosols mit unterschiedlicher Verweildauer (1, 5 und 10 min) auf der Membran.

Hierbei werden zwei Whatman-Filterpapiere und die Membran in eine Apparatur gespannt. Über 96 gut isolierte Slots können die Proben bereits bei Anlage des Vakuums auf die Membran aufgebracht werden. Da jeder Slot mit einem Gummiring isoliert ist, erhielt man saubere Dots, da ein Verlaufen der Proben untereinander unterbunden wurde.

Für die Etablierung des Dot Blots wurden verschiedene Konzentrationen des rekombinanten Proteins (10-50 ng) als auch eines humanen Leberzytosols (0,25-10 $\mu$ g) aufgetragen. Die Beladung der Membran wurde durch Ponceau S-Färbung kontrolliert.

Während in der Ponceau S-Färbung die verschiedenen Konzentrationen des aufgetragenen Leberzytosols deutlich sichtbar waren (nicht gezeigt), zeigte die Signalintensität der Antikörperreaktion nur geringe sichtbare Unterschiede (bis zum Faktor 3) bei geringen Leberzytosol-Proteinmengen (<1 $\mu$ g). Bei höheren Konzentrationen konnte kein proportional zur Proteinmenge ansteigendes Signal mehr beobachtet werden. Bei sehr hohen Konzentrationen waren hingegen helle Spots in den Banden zu sehen (Abb. 3.42). Möglicherweise kommt es bei höheren Proteinkonzentrationen zu einem Quenching des Signals, oder mehrere unspezifische Signale, die im Western Blot nicht erkennbar waren, addieren sich zu einem sichtbaren Signal. Für eine genaue Expressionsanalyse von CBR1 war die Dot Blot Analyse aufgrund ihrer Ungenauigkeit nicht geeignet.

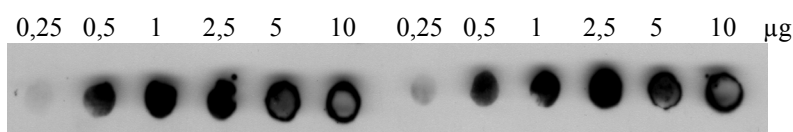


Abb. 3.42: Dot Blot Analyse von CBR1 bei unterschiedlichen Mengen von humanem Leberzytosol und verschiedenen Antikörperkonzentrationen. Aufgetragen wurden jeweils 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10  $\mu$ g Leberzytosol.

### 3.6 mRNA-Expressionsanalyse von CBR1 bei Proben der IKP148-Leberbank

Zur weiteren Validierung des Doxorubizin reduzierenden Enzyms in humanen Lebern wurde für 69 Proben der IKP148-Leberbank via real-time PCR die relative mRNA-Expression von CBR1 bestimmt, auf das Housekeeping-Gen 18S rRNA normalisiert (Koch et al 2002) und auf eine mögliche Korrelation mit dem Doxorubizin-Umsatz in den jeweiligen Leberzytosolproben untersucht.

CBR1 ist aufgrund des Expressionsmusters, der Ähnlichkeit des  $K_m$ -Wertes mit dem in Lebern gemessenen  $K_m$ -Wert der Doxorubizin-Reduktion zum Doxorubizinol als auch mit der Hemmung durch Hydroxy-PP ein mögliches Kandidatenenzym für den Umsatz in Leber. Die Inhibitionsuntersuchungen für AKR1C3 (3.3.1) haben gezeigt, dass letzteres nicht die Haupt-Doxorubizin-Reduktase in Leber sein kann.

Auch für die mRNA-Expression wurden zwei Datensätze ausgewertet; Satz 1 enthielt alle vorhandenen Werte, während bei Satz 2, wie bereits unter 3.2.1 beschrieben, Proben mit größeren Abweichungen bei der Michaelis-Menten-Kinetik ausgeschlossen wurden. Datensatz 1 (n=69) und Datensatz 2 (n=61) wiesen keine größeren Unterschiede auf; beide Histogramme wichen von der Normalverteilung ab (Shapiro Wilk,  $p < 0,0001$ ) und waren stark nach rechts verzerrt. Sie zeigten Werte zwischen 1254 und 25597 Transkripten/ng RNA. Der Median der Transkripte/ng RNA betrug 5053 im Satz 1 und 4864 im Satz 2; der Variationskoeffizient variierte zwischen den Sätzen mit 75% in Satz 1 und 78% in Satz 2.

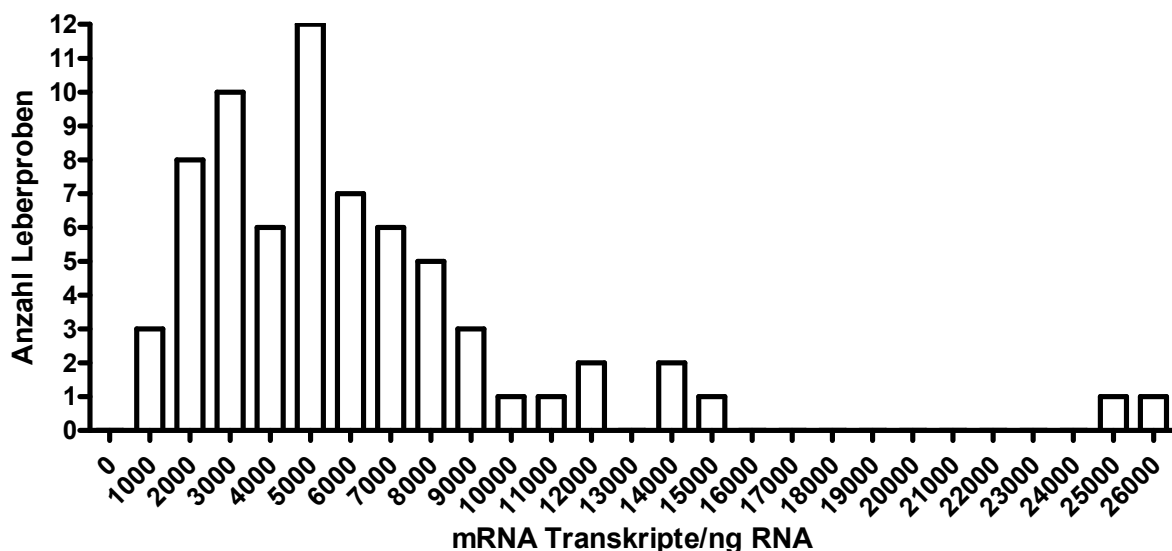


Abb. 3.43: Verteilung der mRNA-Transkripte/ng RNA von CBR1 in 69 humanen Lebern.

Beide Sätze zeigten keine Korrelation zwischen der mRNA-Expression der CBR1 und der maximalen Umsatzgeschwindigkeit von Doxorubizin zu Doxorubizinol (Abb. 3.44: Satz 1:  $r=0,09$ ,  $p=0,48$ , Abb. 3.42; Satz 2:  $r=0,21$ ,  $p=0,11$ ).

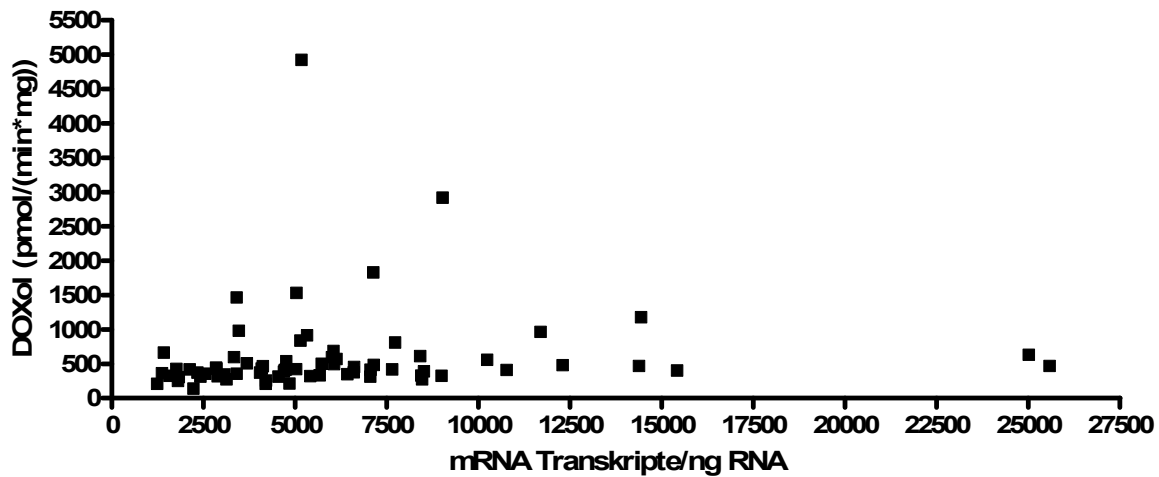


Abb. 3.44: mRNA-Expression/ng eingesetzter RNA von CBR1 gegen die maximale Umsatzgeschwindigkeit (pmol/(min\*mg)) ausgewählter humaner Leberproben, Satz1.  $r=0,09$ ,  $p=0,48$ .

Betrachtet man die Korrelation zwischen dem relativen CBR1 mRNA-Gehalt der Proben und der normalisierten CBR1-Proteinexpression, erkennt man sowohl in Satz 1 als auch in Satz 2 keinerlei Korrelation (Satz 1  $r=-0,78$ ,  $p=0,53$ ; Satz 2:  $r=-0,085$ ,  $p=0,53$ ).

### 3.7 Polymorphismen im CBR1-Gen bei Europäern

In unserer Untersuchung einer humanen Leberbank haben wir sowohl Unterschiede in der Umsetzung von Doxorubicin zu Doxorubicinol gesehen, als auch eine unterschiedlich stark ausgeprägte Expression des Kandidatenproteins CBR1 gefunden. Diese Unterschiede können genetisch bedingt sein. Basenaustausche in Genen können zu einer Änderung der Aktivität des kodierten Proteins führen, wenn sie funktionsrelevante Aminosäuren betreffen. Alternativ können sie transkriptionelle, translationelle, oder protein-abbauende Mechanismen beeinflussen und dadurch eine Änderung der Expression und infolge dessen der Aktivität bewirken.

Der kodierende Bereich des CBR1-Gens wurde daher in 50 Proben komplett sequenziert und auf Assoziationen mit genetischen Polymorphismen untersucht. Die Präsenz von häufigen Nullallelen wird durch die im Western Blot erhaltenen Daten ausgeschlossen, da in jeder Probe CBR1 detektierbar war. In den Datenbanken GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>) und Swiss-Prot (<http://us.expasy.org/sprot/>) gibt es ebenfalls keine Hinweise auf Allele, die zu einem Funktionsverlust führen.

In Tabelle 3.3 werden die bereits bekannten SNPs (dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Snp>) aus Kaukasiern und die gefundenen Genvarianten aus den IKP148-Proben (fett markiert) aufgeführt und ihre Häufigkeit in Kaukasiern dargestellt.

Im Promotorbereich fand sich eine neue, bislang nicht beschriebene Insertions-Deletions-Variante (Indel\_neu). Die gefundenen SNPs aus den 50 IKP148-Leberproben wurden auf Assoziationen mit dem enzymatischen Doxorubizinsatz untersucht. Bis auf einen SNP waren alle untersuchten Polymorphismen „silent“, d.h. es kommt durch den Basenaustausch zu keinem Austausch einer Aminosäure im Protein. Lediglich der SNP rs9024 zerstört die potentielle 3'UTR Poly-A Erkennung und kann somit zu einer Änderung der Expression führen (Beaudoing et al 2000). Weiterhin wurden zwei intergenische Abschnitte untersucht, die hinter dem codierenden Abschnitt von CBR1, liegen (rs 998384, rs998384).

Die in den untersuchten Leberproben gefundenen SNPs sind mit ihren Allelfrequenzen in Tabelle 3.4 zusammengestellt. Aus den beobachteten Häufigkeiten für die einzelnen Genotypen wurden die Allelfrequenzen berechnet (angegeben ist jeweils die des selteneren Allels, Tabelle 3.4) und mit diesen die zu erwartenden Genotyp-Häufigkeiten kalkuliert.

Nr.	Variante	AA	AB	BB	Summe	MAF	X <sup>2</sup> -Test
<b>1</b>	Indel_neu	55	1	1	57	0.03	<0.001
	rs25678	57	0	0	57	0.00	n.a
<b>2</b>	rs2239859	24	16	17	57	0.44	0.005
	rs2282500	57	0	0	57	0.00	n.a
<b>3</b>	rs1005696	18	22	17	57	0.49	0.23
<b>4</b>	rs1005695	19	27	11	57	0.43	0.97
<b>5</b>	rs2835265	41	11	5	57	0.18	0.03
<b>6</b>	rs2835266	54	3	0	57	0.03	0.98
	rs1051543	57	0	0	57	0.00	n.a
	rs2230191	57	0	0	57	0.00	n.a
<b>7</b>	rs20572	41	11	5	57	0.18	0.03
<b>8</b>	rs2230192	56	1	0	57	0.01	1.00
	rs1803321	57	0	0	57	0.00	n.a
<b>9</b>	rs9024	38	14	5	57	0.21	0.14
<b>10</b>	rs998384	25	24	8	57	0.35	0.85
<b>11</b>	rs998383	25	24	8	57	0.35	0.85

Tabelle 3.4: Statistische Auswertung der in den 50 IKP148-Leberproben gefundenen SNPs: Diejenigen Marker mit mindestens einem Variantenallel sind fortlaufend nummeriert; AA= Anzahl der beobachteten Wildtypen, AB = Anzahl der beobachteten Heterozygoten für das Variantenallel, BB = Anzahl der beobachteten Homozygoten für das Variantenallel; MAF = *minor allele frequency*;



Region	Kontig Position	mRNA Position	Reference SNP ID	Heterozygotizität Kaukasier/ Europäer	Funktion	SNP Allel	Austausch Aminosäure	Codon Position	Aminosäure-Position
exon_1	23104502	348	<b>rs25678</b>	0,064	synonym	C/G	Leu [LY] Leu [L]	3	73
intron_2	23105350		<b>rs1005696</b>	0,550	intron	A/C			
intron_2	23105435		<b>rs1005695</b>	0,450	intron	C/G			
intron_2	23105528		rs1005694	0,117	intron	A/G			
intron_2	23105532		rs3787726	0,000	intron	A/T			
intron_2	23105541		rs2156406	0,050	intron	A/G			
intron_2	23105763		rs3787728	0,260	intron	C/T			
intron_2	23105851		rs1005111	0,000	intron	A/T			
intron_2	23106566		<b>rs2835265</b>	0,119	intron	C/T			
intron_2	23106567		<b>rs2835266</b>	0,067	intron	A/G			
exon_3	23106807	720	<b>rs2230191</b>	0,000	synonym	A/G	Thr [TY] Thr [T]	3	197
exon_3	23106843	756	<b>rs20572</b>	0,100	synonym	T/C	Ala [AY] Ala [A]	3	209
exon_3	23106882	795	rs5031013	0,000	synonym	A/C	Leu [LY] Leu [L]	3	222
exon_3	23106909	822	<b>rs2230192</b>	0,017	synonym	A/G	Val [VY] Val [V]	3	231
	23107183	1096	<b>rs9024</b>	0,150	untranslatiert	A/G			

Tabelle 3.3: SNPs des CBR1-Gens in Kaukasier. Die fett markierten SNPs wurden im Rahmen der IKP148 Studie in 50 Leberproben bestimmt. Die mRNA-Position bezieht sich auf die Gesamt-mRNA. Das Start-Codon hat die Position 130.

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde mit dem Chi-Quadrat-Test durch Vergleich der beobachteten mit den zu erwartenden Genotypenverteilungen geprüft. Dieses ist ein Anhaltspunkt für die interne Richtigkeit der Genotypisierung und sollte durch die Teststatistik nicht verworfen werden, d. h. der p-Wert soll jeweils größer 0,05 sein. Bei Untersuchung mehrerer Varianten soll auf Grund des multiplen Testens dieser Schwellenwert niedriger angesetzt werden, nach dem klassischen Verfahren nach Bonferroni dividiert man den Wert von 0,05 durch die Anzahl der Tests. Bei den hier insgesamt elf polymorphen Markern wurde der Grenzwert auf 0,005 gesetzt und somit erfüllte nur die Insertions/Deletions-Variante (Indel\_neu, #1) das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht nicht und wurde von den Genotyp-Phänotyp-Korrelationen ausgeschlossen.

Auf dem Genom eng benachbarte Varianten werden häufig gemeinsam vererbt. Man spricht dann von genetischer Kopplung (engl. *linkage*). Ein so genanntes Kopplungs-Ungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) liegt dann vor, wenn bestimmte Kombinationen von genetischen Markern häufiger oder seltener beobachtet werden als auf Grund der Allelfrequenzen zu erwarten wäre. Für die hier ermittelten Marker im Genbereich von CBR1 wurde mit dem Programm HaploView eine Kopplungskarte erstellt (Abb. 3.45):

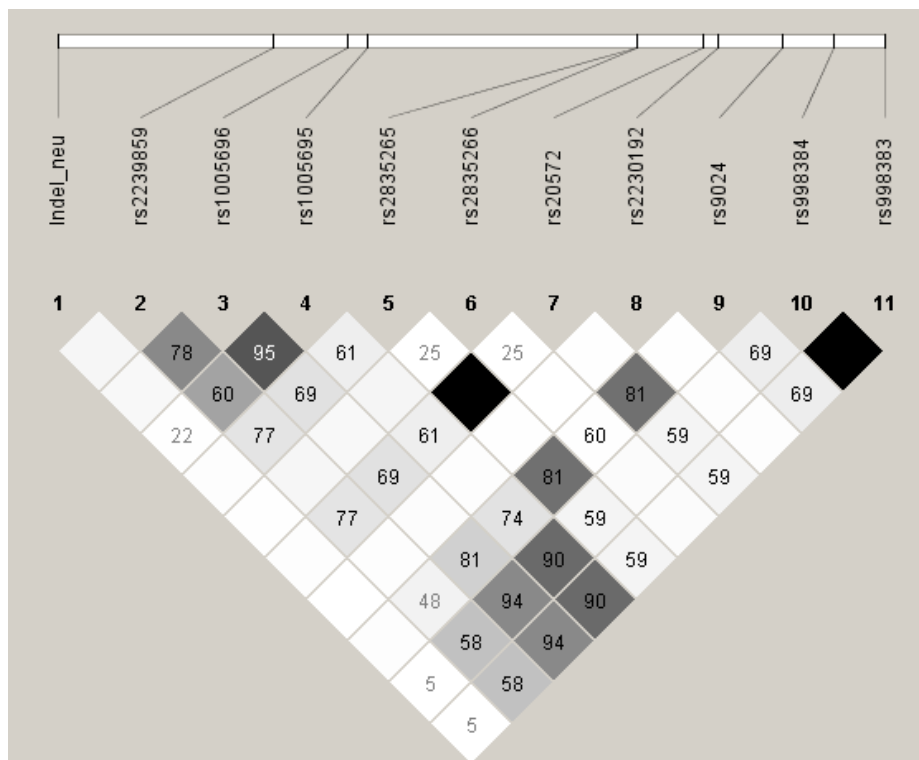


Abb. 3.45: Genetische Kopplung der in CBR1 gefundenen Genvarianten. Als Darstellungsmodus in HaploView wurde die paarweise statistische Korrelation  $r^2$  verwendet. Je dunkler ein Feld eingefärbt ist, desto höher ist der Grad der Kopplung. Die genetischen Marker sind wie in Tabelle 3.3 benannt und die zugehörige rs-Nummer der Datenbank dbSNP ist angegeben. Auf der Skala oben im Bild sind die relativen genomischen Abstände der Varianten auf Chromosom 21 wiedergegeben.

Das aus unseren Bestimmungen erhaltene Kopplungsmuster ist ähnlich den Daten in HapMap (<http://www.hapmap.org/index.html.en>). In perfektem LD zeigten sich die Marker #5 und #7 ( $r^2 = 1$ , schwarz in der Abbildung) sowie #10 mit #11. Das bedeutet, dass eine Allelausprägung des einen Markers immer mit derselben des anderen vorkommt. Bei statistischen Tests zur Prüfung von Korrelationen mit Phänotypen sind hier grundsätzlich für beide Marker identische Ergebnisse zu erwarten. Dies ist für SNP #5 und #7 beispielhaft in der Abbildung 3.46 in Bezug zur maximalen Umsatzgeschwindigkeit von Doxorubizin zu Doxorubizinol gezeigt. Für diese beiden wie für alle anderen untersuchten Einzel-Polymorphismen ergab sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang ( $p > 0,1$  mit Kruskal-Wallis-Test) mit den Parametern des Doxorubizinsatzes ( $K_m$ -Wert, maximale Umsatzrate bzw. Clearance) in den verschiedenen Leberproben.

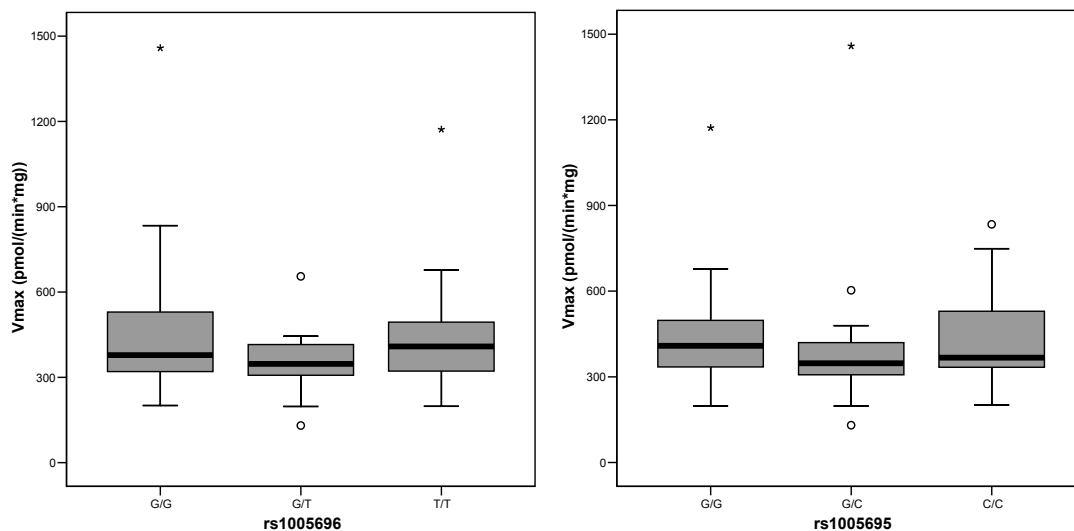


Abb. 3.46: Boxplots für die SNPs #5 und #7 (rs1005696 und rs1005695) in Bezug auf den Doxorubizin-Umsatz (Kruskal Wallis  $p=0,325$  und  $p=0,356$ ). Der dicke Balken in der Box bezeichnet den Median, der obere Rand der Box das 75. Perzentil, der untere Rand das 25. Perzentil. Ausreißer, die mehr als 1,5 Boxlängen vom 25. bzw. 75. Perzentil liegen, werden mit Kreisen markiert. Noch extremere Ausreißer werden als Sternchen dargestellt und liegen mehr als 3 Boxlängen vom 25. bzw. 75. Perzentil entfernt.

Der SNP rs9024 (#9), der zu einer veränderten Poly-A Erkennungsstelle führte, war mit einer heterozygoten Frequenz von 23% ebenfalls in den untersuchten IKP148-Leberproben vorhanden. Dieser SNP war mit #5 bzw. #7 mit einem  $r^2$ -Wert von 0,81 stark gelinkt und zeigte auch keine Assoziation mit der Umsatzrate von Doxorubizin zu Doxorubizinol in den verschiedenen Leberproben (Kruskal Wallis  $p=0,80$ ).

CBR1-mRNA-Daten waren nur für 31 der 50 Proben vorhanden. Bei ihnen konnte jedoch ebenfalls keine signifikante Assoziation zwischen einem der untersuchten SNPs und der gemessenen Expressionsstärke erkannt werden.

Aus den detektierten polymorphen Markern (ohne #1, weil dieser sich nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht befindet) wurden die Haplotypen mit dem Programm PHASE berechnet (<http://www.stat.washington.edu/stephens/software.html>, Version 2.1). Auf Grund der nur partiellen Kopplung ergab sich eine große Zahl von Haplotypen ( $n=19$ ). Der Übersichtlichkeit halber sind in Tabelle 3.5 nur diejenigen mit mindestens 2% Häufigkeit aufgeführt. Diese neun Haplotypen machen ca. 82% aller Haplotypen aus (einschließlich der von PHASE theoretisch für eine Gesamtpopulation berechneten, jedoch in der Stichprobe nicht enthaltenen Haplotypen). Die nachfolgenden Analysen beziehen sich auf diese neun Haplotypen.

Haplotyp	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	Frequenz
H1	T	T	G	C	G	C	G	G	G	C	25,4%
H2	G	G	C	C	G	C	G	G	C	G	22,3%
H3	T	T	G	T	G	T	G	A	G	C	13,5%
H4	G	G	C	C	G	C	G	G	G	C	5,1%
H5	T	G	C	C	G	C	G	G	C	G	4,8%
H6	G	G	G	C	G	C	G	G	G	C	3,1%
H7	T	G	G	C	G	C	G	G	G	C	2,8%
H8	G	G	C	C	A	C	G	G	G	C	2,6%
H9	G	T	G	C	G	C	G	G	G	C	2,5%

Tabelle 3.5: CBR1-Haplotypen. Es sind die neun häufigsten Kombinationen aus den zehn Markern gezeigt. H1 wurde als Referenz-Haplotyp definiert. Davon abweichende Allele in den anderen Haplotypen sind grau unterlegt.

Die Haplotypen wurden nun auf eine Assoziation mit den Expressionsmessungen (mRNA für CBR1) sowie mit den kinetischen Parametern von Doxorubizin zu Doxorubizinol getestet. Dazu wurde zunächst mit dem Kruskal-Wallis-Test geprüft, ob sich ein Haplotyp signifikant von den anderen unterscheidet. Der Boxplot in Abb. 3.47 lässt vermuten, dass H2 einen niedrigeren und H5 einen bedeutend höheren  $K_m$ -Wert aufweist als der Durchschnitt der Haplotypen.

Deshalb wurde eine post-hoc-Analyse mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, indem H2 gegen die übrigen bzw. H5 gegen die übrigen kontrastiert wurde (Abb. 3.48). In beiden Fällen erwies sich dieser Vergleich als statistisch signifikant (H2 mit niedrigerem  $K_m$ ,  $p = 0,008$ ; H5 mit größerem  $K_m$ ,  $p = 0,009$ ).

Die ermittelten Haplotypen können einen geringen Teil der interindividuellen Unterschiede der CBR1-Aktivität beschreiben. Da es sich bei diesen Ergebnissen um eine Post-hoc-Analyse handelt, sollten sie in einer weiteren Studie genauer untersucht werden.

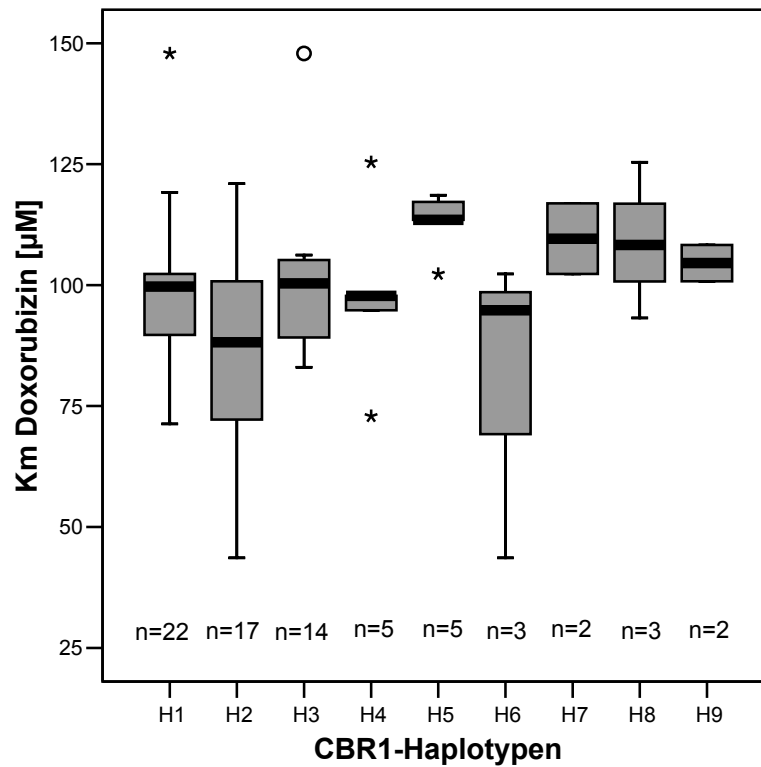


Abb. 3.47:  $K_m$ -Wert für Doxorubicin in Abhängigkeit von neun verschiedenen CBR1-Haplotypen. Der dicke Balken in der Box bezeichnet den Median, der obere Rand der Box das 75. Perzentil, der untere Rand das 25. Perzentil. Ausreißer, die mehr als 1,5 Boxlängen vom 25. bzw. 75. Perzentil liegen, werden mit Kreisen markiert. Noch extremere Ausreißer werden als Sternchen dargestellt und liegen mehr als 3 Boxlängen vom 25. bzw. 75. Perzentil entfernt.

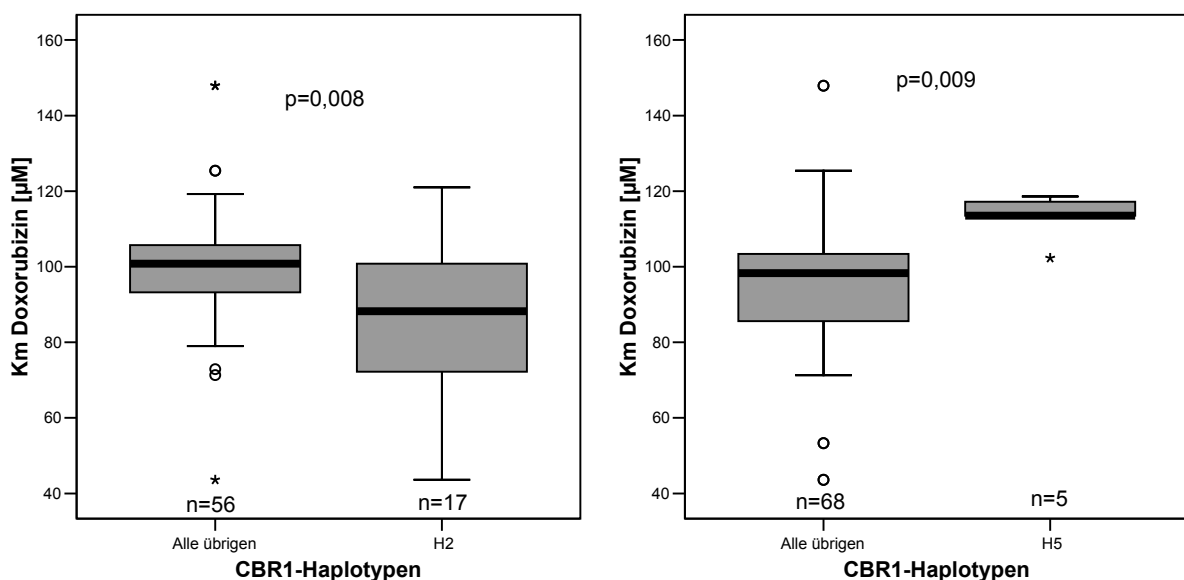


Abb. 3.48: Haplotyp H2 mit dem kleinsten  $K_m$  (links), Haplotyp H5 mit dem größten  $K_m$  (rechts) jeweils den übrigen Haplotypen gegenüber gestellt. Der dicke Balken in der Box bezeichnet den Median, der obere Rand der Box das 75. Perzentil, der untere Rand das 25. Perzentil. Ausreißer, die mehr als 1,5 Boxlängen vom 25. bzw. 75. Perzentil liegen, werden mit Kreisen markiert. Noch extremere Ausreißer werden als Sternchen dargestellt und liegen mehr als 3 Boxlängen vom 25. bzw. 75. Perzentil entfernt.

## 4. Diskussion

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen befassten sich mit zwei größeren Teilgebieten: 1) mit der Identifizierung des für den Metabolismus von Doxorubizin zu Doxorubizinol verantwortlichen hepatischen Enzyms beim Menschen und 2) mit den interindividuellen Unterschieden bezüglich der Aktivität dieser Reaktion.

Die Identifizierung der Doxorubizin-Reduktase in humaner Leber wird in Abschnitt 4.1 betrachtet. Das identifizierte Enzym, CBR1, scheint für den gesamten, oder zumindest für einen Großteil des hepatischen Doxorubizinmetabolismus' verantwortlich zu sein. Weiterhin wird die Identität der Doxorubizin-Reduktase in humanen Herzen, die von dem Leberenzym verschieden zu sein scheint, und seine Rolle bei der Anthrazyklin-vermittelten Kardiotoxizität diskutiert. Das kardiale Enzym trägt vermutlich zu der Kardiotoxizität von Doxorubizin bei, da die kardiale Bildung von Doxorubizinol das Herz stark schädigen kann. Unsere Ergebnisse unterstützen die These, dass es sich hierbei um AKR1A1 handelt.

In Abschnitt 4.2 wird die starke Variabilität des Doxorubizinmetabolismus' in humanen Lebern betrachtet. Diese Variabilität wird durch Unterschiede in der Expressionsstärke der in Abschnitt 4.1 beschriebenen humanen Doxorubizin-Reduktase der Leber, CBR1, bestätigt. Des Weiteren wurden ebenfalls genetische Polymorphismen des CBR1-Gens bestimmt, um Assoziationen der gemessenen Aktivität mit dem CBR1-Genotyp untersuchen zu können.

### 4.1 Charakterisierung der Doxorubizin-Reduktase in humaner Leber

Um die hepatische Doxorubizin-Reduktase im Menschen näher zu charakterisieren, wurden in verschiedenen humanen Organen die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  bestimmt. Weiterhin wurden für verschiedene rekombinante zytosolische Aldo-Keto-Reduktasen ebenfalls  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte bestimmt und die  $K_m$ -Werte mit den ermittelten  $K_m$ -Werten der humanen Zytosole verglichen. Wird eine Reaktion von einem bestimmten Enzym in einem Organ katalysiert, so sollte der ermittelte  $K_m$ -Wert in dem humanen Zytosol dem  $K_m$ -Wert des umsetzenden Enzyms entsprechen. Zur weiteren Eingrenzung der Enzyme wurden ebenfalls mRNA-Expressions-Daten der verschiedenen Carbonyl reduzierenden Enzyme herangezogen, um die Expression in Leber des jeweiligen Enzyms in die Analyse einzubeziehen und Enzyme mit sehr geringer oder nicht vorhandener Expression ausschließen zu können.

Doxorubizin wird von einer Vielzahl an Enzymen zu vielen Metaboliten umgesetzt (1.4.4). Die zytosolische Umwandlung von Doxorubizin zu Doxorubizinol ist jedoch die bedeutendste (Leibman et al 1971, Bachur et al 1971, Loveless et al 1978), da sie am stärksten ausgeprägt und der Alkohol-Metabolit Doxorubizinol weniger zytotoxisch als die Ausgangssubstanz ist. Weiterhin ist der Alkohol-Metabolit kardiotoxischer als seine Ausgangssubstanz.

Doxorubizin metabolisierende Enzyme sind im Zytosol vielfach vorhanden, wie z.B. Reduktasen, Hydrolasen, Oxidasen und Peroxidasen. Während Hydrolase- und Reduktase-ähnliche Glykosidasen die Bildung von Aglykonen katalysieren, führen Peroxidasen zur vollständigen Degradation von Doxorubizin. Die Bildung von diesen nicht mehr zytostatisch wirksamen Metaboliten konnte jedoch in unseren Messungen nur geringfügig oder gar nicht nachgewiesen werden. Der Anteil an Hydrolasen in den Zytosolen beeinflusst jedoch die Carbonyl-Reduktion, da Doxorubizin-Aglykone ebenfalls der Carbonyl-Reduktion durch die gleichen Enzyme unterliegen (Licata et al 2000, Slupe et al 2005). Die Bildung von Aglykonen erfolgt durch viele mikrosomale Enzyme, aber auch durch die zytosolische NQO (auch als DT-Diaphorase bekannt, Kasahara et al 1994). Auch dieser Metabolismus ist interindividuell verschieden; Gonzalez-Covarrubias (2006) zeigten, dass die Expression von der NQO in Kaukasiern stark variiert und in Afro-Amerikanern signifikant höher ist. Eine vermehrte Bildung von Aglykonen führt somit nicht nur zu einer partiellen Inaktivierung von Doxorubizin, sondern indirekt zu einer herabgesetzten Bildung von Doxorubizinol.

In den von uns untersuchten Proben konnten zwar teilweise andere Peaks als Doxorubizinol gesehen werden (hauptsächlich in Leberproben), bei denen es sich nach der Retentionszeit zu urteilen vermutlich um Doxorubizinol-Aglykon und Doxorubizin-Aglykon handelte (Mross et al 1988). Die genaue Beurteilung konnte jedoch nicht erfolgen, da die Standards für diese Proben nicht vorhanden waren. Da diese Peaks nicht immer - und wenn - nur in sehr geringem Maßstab außerhalb des Quantifizierungslimits im Chromatogramm zu erkennen waren, kann man davon ausgehen, dass der Anteil der anderen Metabolisierungswege vernachlässigbar gering in unseren Messungen gewesen ist.

Für die Identifizierung der humanen Doxorubizin-Reduktase in der Leber wurden zunächst alle bekannten zytosolischen Carbonyl reduzierenden Enzyme betrachtet. Als Carbonyl reduzierende Enzyme werden in der Literatur die AKRs, SDRs, NQO und die „medium-chain dehydrogenases/reductases“ (MDRs) bezeichnet (Rosemond & Walsh 2004). Die Reduktion von Doxorubizin zu Doxorubizinol findet im humanen Zytosol unter Verbrauch von NADPH, jedoch nicht von NADH statt. MDRs wie z.B. die Alkohol-Dehydrogenase benutzen als Co-Faktor jedoch nur NADH; somit konnte diese Enzymklasse von den weiteren Betrachtungen

ausgeschlossen werden. Auch nicht-zytosolische Enzyme können ebenfalls von diesen Betrachtungen ausgeschlossen werden.

Für die Reduktion von Doxorubizin zu Doxorubizinol in Menschen kommen somit nur die SDRs und AKRs in Betracht. Die SDRs beinhalten als zytosolische Enzyme neben den Carbonyl-Reduktasen weiterhin die Xylulose-Reduktase. Diese lag für die Untersuchungen nicht vor. Für die Aldo-Keto-Reduktasen lagen bis auf AKR1D1 alle zytosolischen Enzyme vor. Jedoch muss bei diesem Ausschlussverfahren in Betracht gezogen werden, dass ein bisher uncharakterisiertes oder nicht untersuchtes Enzym ebenfalls die Reaktion von Doxorubizin zu Doxorubizinol katalysieren könnte.

Doxorubizinol ist kardiotoxischer, jedoch weniger zytotoxisch als seine Ausgangssubstanz. Das Ausmaß der Umsetzung zu Doxorubizinol beeinflusst daher sowohl die Kardiotoxizität als auch die Tumorantwort. Die Charakterisierung der Doxorubizin reduzierenden Enzyme im Menschen könnte somit einen wichtigen Beitrag leisten, durch Inhibition dieses Enzyms die Tumorantwort zu steigern und Resistenzen vorzubeugen. Weiterhin kann die Anthrazyklin-vermittelte Kardiotoxizität verringert und die Therapie nebenwirkungsfreier gestaltet werden.

#### **4.1.1 Leber, Dünndarm und Niere sind die hauptmetabolisierenden Organe von Doxorubizin im Menschen**

Zur Charakterisierung der hepatischen Doxorubizin-Reduktase im Menschen wurden der Umsatz von Doxorubizin zu Doxorubizinol und die kinetischen Parameter dieser Reaktion in humanen Zytosolen zehn menschlicher Organe quantitativ durch HPLC bestimmt. Hierbei konnte ein starker Metabolismus von Doxorubizin zu Doxorubizinol in Leber, Dünndarm und Niere festgestellt werden. Auch die Affinität dieser Enzyme zu Doxorubizin war wesentlich höher als in den anderen untersuchten Organen. Kinetische Parameter für diese Reaktion wurden bis dato nur für wenige humane Organe bestimmt, darunter für Herz (Mordente et al 2003, Salvatorelli et al 2006), Leber und Niere (Loveless et al 1978). Loveless et al ermittelten 1978 für eine Leber und eine Niere sowohl den  $K_m$ - als auch den  $V_{max}$ -Wert. Der  $K_m$ -Wert für Leber und Niere wurde damals zu  $275 \pm 70 \mu\text{M}$  und  $539 \pm 113 \mu\text{M}$  bestimmt und liegt somit zwei- bzw. viermal höher als unsere Messwerte. Unterschiede im  $K_m$ -Wert vom Faktor 2-3 sind in der Regel nicht ungewöhnlich bei verschiedenen Präparationen und Nachweismethoden. Die von Loveless et al angewandte Bestimmung der Metabolite durch Dünnschichtchromatographie zeigt eine geringere Präzision als die HPLC-Messung. Ermittelt



man die kinetischen Parameter einer Reaktion über die Michaelis-Menten-Kinetik nur bei geringen Konzentrationen, wird  $V_{\max}$  und  $K_m$  meist zu hoch bestimmt. Auch die lineare Bestimmung nach Lineweaver-Burk führt zu ungenauen  $K_m$ - und  $V_{\max}$ -Werten. Die Messungen der Kinetikdaten bei Loveless et al erfolgte nur bis  $100\mu\text{M}$  Doxorubizin. Der  $V_{\max}$ -Wert wurde damals zu  $18\pm 2$  und  $44\pm 5$   $\text{pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  für Leber und Niere angegeben. Unsere  $V_{\max}$ -Werte lagen hingegen dreimal höher für Niere, und zwanzigfach höher für Leberzytosol. Möglicherweise waren die naturierenden Bedingungen 1978 noch nicht so gut erprobt, und ein großer Anteil des Zytosols war bereits denaturiert/inaktiv. Weiterhin wurde in der Arbeit von Loveless das Gewebe erst innerhalb 24h *postmortem* entnommen und kann daher bereits einiges an Enzymaktivität eingebüßt haben.

Von der italienischen Arbeitsgruppe um Minotti wurden ebenfalls einige, zum Teil widersprüchliche Publikationen zum Doxorubizin-Metabolismus im Herzytosol veröffentlicht. So wurde von Mordente et al (2003) für humanes Herzytosol keine Sättigung gemessen (bis  $1\text{mM}$ ), jedoch linear eine maximale Umsatzgeschwindigkeit von  $37,5$   $\text{pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  ermittelt. Wir konnten hingegen immer eine Sättigung der untersuchten Reaktion bei humanen Herzytosolen beobachten, der  $K_m$ -Wert wurde zu  $239\pm 57$   $\mu\text{M}$  bestimmt. Der von uns ermittelte  $V_{\max}$ -Wert ( $55,6\pm 12,2$   $\text{pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ) war mit dem von Mordente angegebenen  $37,5$   $\text{pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  vergleichbar. In einer neueren Publikation wurde der  $K_m$ -Wert für humanes Herzytosol zu  $81\mu\text{M}$  bestimmt (Salvatorelli et al 2006). Als Grund für den kleineren  $K_m$ -Wert wird angeführt, dass in dieser neueren Publikation die eingesetzten Zytosole komplett von Fe-S Cluster befreit wurden, um eine Rückreaktion vom Alkohol-Metaboliten zu Doxorubizin zu verhindern (Salvatorelli et al 2006, Minotti et al 2004); bei unseren Versuchen wurde dies jedoch nicht berücksichtigt.  $V_{\max}$  dürfte durch eine vermehrte Rückreaktion jedoch nicht beeinflusst werden. Der von Salvatorelli et al (2006) angeführte  $K_m$ -Wert war dreifach kleiner als der von uns ermittelte  $K_m$ -Wert. Die bestimmte spez. Aktivität bei  $50$   $\mu\text{M}$  war jedoch mit  $15$   $\text{pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  sehr gut vergleichbar mit den von uns gemessenen Daten ( $7-12$   $\text{pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ). Für andere Organe wurde unseres Wissens bisher kein Umsatz für Doxorubizin zu Doxorubizinol ermittelt.

In den von uns untersuchten Organen scheint es zwei Doxorubizin-Reduktasen mit  $K_m$ -Werten von  $150$  und  $250$   $\mu\text{M}$  zu geben. Eine dritte Doxorubizin-Reduktase könnte es im Pankreas und in der Milz geben, weil die  $K_m$ -Werte dieser Organe keinem der beiden oben genannten  $K_m$ -Werte zugeordnet werden konnten (Abb. 3.3). Die metabolische Clearance zeigte hohe Werte für Dünndarm und Leber und weiterhin mäßige Aktivität für Niere und Magen. Die anderen untersuchten metabolischen Clearances waren hingegen eher gering. Die

höhere Aktivität in Niere, Leber, Magen und Dünndarm deutet auf ein Enzym hin, welches im Fremdstoffmetabolismus eine wichtige Rolle spielt. Auf die Identität der kardialen Doxorubizin-Reduktase im Menschen und die Rolle der Doxorubizinreduktion bei der Anthrazyklin-verursachten Kardiotoxizität wird gesondert in Abschnitt 4.1.5 eingegangen.

#### 4.1.2 Zytosolische Doxorubizin reduzierende Enzyme

Zur Analyse der hepatischen Doxorubizin-Reduktase wurden verschiedene Aldo-Keto-Reduktasen und Carbonyl-Reduktasen auf ihre Doxorubizin-Reduktaseaktivität untersucht. CBR1 und AKR1C3 zeigten dabei eine starke Aktivität, AKR1B1, AKR1B10 und AKR1C4 eine moderate Aktivität, und CBR3, AKR1C1 und AKR1C2 zeigten keine Aktivität. Weiterhin waren die  $K_m$ -Werte von CBR1 und AKR1C3 wesentlich geringer als die der anderen untersuchten Enzyme (Abb. 3.8).

Kinetische Daten für den Umsatz von Doxorubizin zu Doxorubizinol liegen in der Literatur nur für wenige Enzyme vor. Lediglich für CBR1 liegt eine Bestimmung von  $K_m$  und  $V_{max}$  vor (Slupe et al 2005); weiterhin sind spezifische Aktivitäten für CBR1 (Ahmed et al 1978) und für AKR1A1, AKR1B1, AKR1C1 und AKR1C4 (O'Connor et al 1999) beschrieben worden. Für AKR1C1 und AKR1C4 wurde in der Literatur eine Aktivität für Doxorubizin unter 5 nmol/(min\*mg) angegeben (O'Connor et al 1999). Für diese beiden Enzyme konnten wir ebenfalls nur sehr geringe bis keine Umsatzraten beobachten.

Ahmed et al gaben 1978 die spezifische Aktivität für die beschriebene Reaktion für gereinigte CBR1 aus humaner Leber mit 83 pmol/(min\*mg) an. Wir haben jedoch mit 21 nmol/(min\*mg) einen wesentlich höheren Wert gemessen. Slupe et al (2005) hingegen bestimmten den  $K_m$ -Wert von rekombinanter CBR1 für Doxorubizin photometrisch zu 90  $\mu$ M und ermittelten weiterhin  $K_{cat}$ . Der genannte  $K_m$ -Wert von Slupe et al (2005) stimmt mit dem von uns ermittelten  $K_m$ -Wert von 167  $\mu$ M gut überein. Bei Messungen mit unterschiedlichen Methoden und Präparationen sind Unterschiede im  $K_m$  um den Faktor 2 nicht ungewöhnlich.  $K_{cat}$  wird als katalytische Konstante oder Wechselzahl eines Enzyms bezeichnet und gibt die Umsatzgeschwindigkeit pro Zeiteinheit wieder.  $K_{cat}$  wurde von Slupe et al (2005) zu 16,2/s bestimmt. Der von uns gemessene Wert liegt jedoch weit darunter mit 0,62/min. Auch die Aktivitäten für rekombinante AKR1A1, AKR1B1 lagen wesentlich niedriger als von O'Connor et al (1999) angegeben. Jedoch gab es bei den Messungen erhebliche Unterschiede im pH-Wert, Temperatur, Puffer und Messmethode (photometrische Bestimmung). So zeigten Forrest et al (1991), dass das pH-Optimum für CBR1 bei pH 6,0 liegt und die Aktivität bei pH

7,0 um 27% reduziert und bei pH 8,0 sogar bis zu 84% vermindert war. Der pH-Wert spielt bei dieser Bestimmung also eine entscheidende Rolle. Auch der Gehalt an Natriumchlorid im Testpuffer beeinflusst die Aktivität von CBR1 erheblich; so zeigten Tinguely & Wermuth 1999, dass die Zugabe von 300 mM NaCl eine sechzehnfache Aktivitätssteigerung bewirkte, den  $K_m$  jedoch unbeeinflusst ließ. Weiterhin wird in photometrischen Messungen jede Reaktion detektiert, die NADPH verbraucht, da es sich um ein indirektes Messverfahren handelt. So zeigte Deng et al (2007), dass Doxorubizin mit NADPH sogar ohne enzymatische Beteiligung Superoxidradikale unter NADPH-Verbrauch bilden kann. Der von uns bestimmte Maximalumsatz und somit auch die Clearance von Doxorubizin zu Doxorubizinol wurde aufgrund des pH-Wertes eher unterschätzt. Der von uns ermittelte höhere  $K_m$ -Wert für CBR1 trägt weiterhin zu einer unterschätzten Clearance bei.

In unseren Untersuchungen wurde weiterhin die Doxorubizin-Reduktase-Aktivität von CBR3 getestet. In einem Abstract von 2006 (Aplenc et al 2006) wurde ein Polymorphismus im CBR3-Gen mit dem Risiko einer Anthrazyklin induzierten Kardiomyopathie assoziiert. Die Vermutung lag nahe, dass CBR3 möglicherweise mit der Bildung von Anthrazyklin-Alkohol-Metaboliten in Verbindung gebracht werden könnte; der Umsatz war bisher jedoch nicht untersucht worden. Wir haben allerdings in unseren Untersuchungen keinen Umsatz von Doxorubizin zu Doxorubizinol durch CBR3 messen können, obwohl das eingesetzte Enzym aktiv war.

Von den untersuchten Enzymen zeigten insgesamt zwei Enzyme, CBR1 und AKR1C3 einen hohen Umsatz von Doxorubizin zu Doxorubizinol, während die anderen Enzyme nur geringe oder keine Aktivität für die untersuchte Reaktion zeigten. Aufgrund der mit dem humanen Leberzytosol vergleichbaren  $K_m$ -Werte und der hohen spezifischen Aktivität können CBR1 und AKR1C3 als die Hauptkandidatenzyme für humanes Leberzytosol betrachtet werden. Die Identität der hepatischen Doxorubizin-Reduktase wurde weiterhin durch Bestimmung der mRNA-Expressionsstärke der Kandidatenzyme in verschiedenen menschlichen Organen untermauert, was im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

#### **4.1.3 Gewebespezifische Expression verschiedener Aldo-Keto-Reduktasen und Carbonyl-Reduktasen**

Um bei der Bestimmung der hepatischen Doxorubizin-Reduktase weitere Kandidatenzyme ausschließen zu können, wurde neben der Ermittlung der kinetischen Daten der Reaktion in

humanen Zytosolen und rekombinanten Aldo-Keto- und Carbonyl-Reduktasen die mRNA-Expression dieser Enzyme in verschiedenen menschlichen Organen betrachtet. Solche Bestimmungen wurden für die genannten Enzyme unseres Wissens gar nicht oder nur für einzelne Organe und Enzyme durchgeführt. Die gemessenen mRNA-Expressionsmuster wurden mit bisherigen Western Blot-Analysen in früheren Literaturangaben verglichen.

O'Connor et al führten 1999 Expressionsanalysen von AKR1A1, AKR1B1, AKR1C1, AKR1C4 und AKR7A2 durch. Im Western Blot für AKR1A1 konnte man eine starke Expression in Leber und Niere und schwache Expressionen in anderen Organen erkennen. Dies stimmt mit der von uns gemessenen mRNA-Transkripten überein, jedoch haben wir auch eine sehr ausgeprägte Transkriptzahl im Pankreasgewebe gemessen, die im Western Blot von O'Connor et al nicht zu sehen war.

Die gemessene mRNA-Expression von AKR1B1 wich etwas von der im Western Blot (O'Connor et al 1999) bestimmten Expression ab. Dort war Muskel und Testisgewebe mit einer starken Expression verzeichnet, während wir die höchsten Transkriptzahlen in Niere messen konnten. Die geringe Expression dieses Enzyms in der Leber wird dagegen durch unsere mRNA-Messungen bestätigt.

Die gemessene mRNA-Expression von AKR1C1 ist konsistent mit dem im Western Blot ermittelten Ergebnis. Leber und Niere zeigten hohe Transkriptzahlen, während in den anderen Organen nur geringe Mengen an Transkripten zu messen war. AKR1C4 wurde im Western Blot nur in Leber detektiert. Dies deckt sich gut mit den von uns gemessenen mRNA-Expressionen.

Auch für AKR7A-Enzyme waren die gemessenen mRNA-Transkriptzahlen in allen Organen mit den Western Blot-Ergebnissen von 1999 konsistent (O'Connor et al 1999). Lediglich ist dort im Gegensatz zu unseren Ergebnissen für Pankreas keine Expression zu sehen. Der benutzte Antikörper konnte zwischen den zwei AKR7As jedoch nicht unterscheiden. In der gleichen Publikation wurden weiterhin für Leberzytosol unterschiedliche Expressionsstärken für AKR1A1, AKR1B1 und AKR1C1 in Leberproben von verschiedenen Individuen festgestellt. Knight et al (1999) konnten im Western Blot AKR7A3 für Leber, Niere, Pankreas, Kolon und Dünndarm nachweisen. Dies stimmt ebenfalls mit der von uns gemessenen mRNA-Transkription überein.

AKR1B10 ist in gesunden Geweben kaum vorhanden, zeigt jedoch eine schwache Expression in Leber, Kolon und Dünndarm (Cao et al 1998). Dieses Ergebnis konnte in unseren Messungen bestätigt werden. Eine stärkere Expression von AKR1B10 findet man jedoch in verschiedenen Krebsarten wie z.B. im kleinzelligen Lungenkarzinom.

AKR1C2-mRNA-Transkripte wurden in verschiedenen Geweben gefunden (Palackal et al 2002), was in unseren Messungen mit Ausnahme der Plazenta und Milz bestätigt wurde.

Auch das im Western Blot ermittelte Expressionsmuster für AKR1C3 (Lin et al 1997) deckte sich sehr genau mit den von uns ermittelten mRNA Daten und zeigte eine starke Expression in Leber, Niere, Kolon und Dünndarm.

Für CBR1 wurden Expressionsdaten immunohistochemisch erhoben (Wirth & Wermuth 1985, 1992). Sie zeigten eine starke Expression in Leberparenchymzellen, in Magen- und Dünndarmepithelzellen, in proximalen Tubuli der Niere, im ZNS und im Herzen. Diese Beobachtung stimmt größtenteils gut mit den von uns untersuchten mRNA-Expressionsraten für CBR1 überein. Für CBR3 wurden bisher keine Expressionsdaten publiziert, jedoch ist bekannt, dass CBR3 im Vergleich zu CBR1 nur im geringen Maßstab in verschiedenen Organen exprimiert wird (persönliche Mitteilung von Dr. T. Terada, zitiert in: Matsunaga et al 2006). Dies deckt sich ebenfalls mit unseren Ergebnissen.

Insgesamt passen die untersuchten Expressionsmuster gut mit den Literaturwerten überein. Für die Bestimmung der Expressionsstärke der Kandidatenproteine scheinen die mRNA-Daten geeignet zu sein. Das ist nicht immer gegeben, da posttranskriptionelle Prozesse die Expression eines Proteins stark beeinflussen können. Dieses Phänomen wird in Abschnitt 4.2.3 ausführlich beschrieben.

In humanen Zytosolen wurde die stärkste Aktivität von Doxorubizin zu Doxorubizinol in Leber, Niere und Dünndarm gesehen. Die gemessene Aktivität ist abhängig von der Expressionsstärke der jeweiligen Doxorubizin-Reduktase in dem untersuchten Gewebe. Aufgrund fehlender oder sehr niedriger mRNA-Expression konnten CBR3, AKR1B1 und AKR1B10 als Doxorubizin-Reduktase in humaner Leber ausgeschlossen werden. AKR1C1, AKR1C4 und AKR1D1 zeigten eine spezifische Expression nur in Leber, jedoch nicht - oder nur gering - in anderen Organen. Der starke Umsatz in Leber, Niere und Dünndarm sowie ein ähnlicher  $K_m$ -Wert lassen jedoch vermuten, dass es sich in der Niere und im Dünndarm um die gleiche Doxorubizin-Reduktase wie in der Leber handeln könnte. Weiterhin können aufgrund des fehlenden Umsatzes von Doxorubizin zu Doxorubizinol AKR1C1 und AKR1C2 ausgeschlossen werden. Bezieht man den  $K_m$ -Wert der Zytosol- und Enzymmessungen in die Betrachtungen ein, gibt es zwei Enzyme, CBR1 und AKR1C3, die den gleichen  $K_m$ -Wert wie humanes Leberzytosol zeigen und auch in Leber, Niere und Dünndarm ausreichend exprimiert sind. CBR1 und AKR1C3 sind damit die stärksten Kandidatenenzyme für die Reaktion von Doxorubizin zu Doxorubizinol in humanem Leberzytosol.

#### 4.1.4 CBR1 ist die humane Doxorubizin-Reduktase in der Leber

Ein üblicher Ansatz zur Charakterisierung eines Enzyms in Gewebehomogenaten ist die Bestimmung der kinetischen Parameter einer Reaktion und der Vergleich mit den Parametern der rekombinanten Kandidaten-Enzyme. Zur genaueren Unterscheidung werden vielfach Hemmstoffe eingesetzt (Rosemond & Walsh 2004). In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass CBR1 und AKR1C3 aufgrund der kinetischen Parameter und der mRNA-Expressionsmuster als Kandidatenenzyme für die Reaktion von Doxorubizin zu Doxorubizinol in humaner Leber anzusehen sind. Daher wurden Hemmstoffe der jeweiligen Kandidatenenzyme eingesetzt.

In der Literatur wurden vielfach die Flavonoide Rutin, Quercetin und Quercitrin als spezifische Inhibitoren der Carbonyl-Reduktase CBR1 bezeichnet (Pröpper & Maser 1997, Wermuth et al 1981, Iffert et al 2000). Komoto et al (2004) hingegen beschrieb für Rutin auch eine inhibitorische Wirkung auf AKR1C3. Weiterhin werden verschiedene Analgetika wie Indomethacin als selektiver AKR1C- (Desmond et al 2003) und Diclofenac als selektiver AKR1C3-Hemmer (Gobec et al 2005) bezeichnet. Es muss jedoch betont werden, dass meist keine anderen Enzyme als Kontrollen mitgetestet wurden; somit ist nicht gewährleistet, dass diese Hemmstoffe tatsächlich nur das getestete Enzym zu hemmen vermögen.

Die von uns untersuchten Hemmstoffe Quercitrin, Quercetin, Rutin und Diclofenac zeigten keine ausreichend spezifische Wirkung auf die Doxorubizin umsetzenden Enzyme. Die untersuchten Substanzen zeigten bei der Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol durch CBR1 als auch durch AKR1C3 eine ähnlich große Hemmung, so dass sie zur Identifizierung der Doxorubizin-Reduktase in humaner Leber nicht zum Einsatz gekommen sind. Weiterhin stellten Mordente et al (2003) und Silvestrini et al (2006) ebenfalls fest, dass Flavonoide wie Rutin und Quercetin die Anthrazyklin-Alkohol-Metabolit-Bildung modulieren können; so können Flavonoide die Doxorubizinol-Produktion in Herzzytosol um 35-50% steigern, die Bildung von Daunorubizinol jedoch hemmen.

2005 wurde in einer Veröffentlichung von Tanaka et al von einem spezifischen CBR1-Hemmstoff berichtet. Aufgrund der vielfältigen Untersuchungsergebnisse als auch einer Affinitätschromatographie schien es, dass diese Substanz, 4-amino-1-tert-butyl-3-(2-hydroxyphenyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin, weiterhin als Hydroxy-PP bezeichnet, tatsächlich kein weiteres Enzym binden würde. Daher wurde diese Substanz für unsere Hemmstoffversuche eingesetzt.

In einem Vorversuch wurde die Inhibition des durch CBR1 katalysierten Menadion-Umsatzes durch Hydroxy-PP gemessen. Der ermittelte  $IC_{50}$ -Wert von  $1,5\mu M$  stimmt gut mit dem von

Tanaka et al publizierten Wert überein. Bei der Bestimmung der Inhibition der Reaktion von Doxorubizin zu Doxorubizinol zeigte sich, dass neben CBR1 auch AKR1C3 gehemmt wurde, der Inhibitor also auch nicht spezifisch ist. AKR1C3 zeigte einen zehnfach kleineren  $K_i$ -Wert als CBR1, wird durch Hydroxy-PP also wesentlich stärker gehemmt.

Die sehr hohe Aktivität von AKR1C3 für diese Reaktion als auch die Hemmung durch Hydroxy-PP wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Aufgrund der hohen Umsatzrate ist es denkbar, dass AKR1C3 ebenfalls eine Rolle bei dem Metabolismus von Doxorubizin zu Doxorubizinol im Menschen einnehmen könnte. Jedoch sprechen die ermittelten, sehr geringen mRNA-Expressionsraten in anderen Organen, außer Leber und Niere, dagegen (Abb. 3.18). AKR1C3 metabolisiert eine Vielzahl an Steroiden, es spielt z.B. bei dem Östrogen-, Androgen- und Progesteron- als auch beim Kortison- und Aldosteron-Metabolismus eine Rolle. Der Wirkstoff könnte somit möglicherweise bei der für Hormon-abhängige Formen von Krebs wie z.B. Prostatakrebs oder Brustkrebs als auch bei Endometriose zum Einsatz kommen (Gobec et al 2005, Brozic et al 2006, Penning et al 2006). CBR1 und humanes Leberzytosol wurden in gleichem Maße durch Hydroxy-PP gehemmt; die Hemmstoffkurven überlappen sich vollständig,  $IC_{50}$  und  $K_i$  waren gleich (Abb. 3.27). Dies deutet darauf hin, dass für den Umsatz von Doxorubizin zu Doxorubizinol hauptsächlich CBR1 verantwortlich ist. Der Anteil von AKR1C3 am Metabolismus von Doxorubizin zu Doxorubizinol in der humanen Leber ist, wenn überhaupt, gering.

In Abschnitt 4.2 wird die Variabilität des Metabolismus von Doxorubizin zu Doxorubizinol in einer humanen Leberbank beschrieben. Um diese Variabilität genauer darstellen und verstehen zu können, wurden für das Kandidatenenzym CBR1 Expressionsdaten ermittelt. Außerdem wurde nach genetischen Polymorphismen gesucht, die die starke Variabilität des hepatischen Metabolismus erklären könnten. Die CBR1-Proteinexpression erhärtet ebenfalls die Hypothese, dass dieses Enzym die hepatische Doxorubizin-Reduktase ist.

#### **4.1.5 Rolle der kardialen Doxorubizin-Reduktion bei der Anthrazyklin-vermittelten Kardiotoxizität**

Vorangegangene Forschungen ließen die Vermutung zu, dass es sich bei CBR1 um die Doxorubizin-Reduktase im Herzen handeln könnte (Olson et al 2003). Jedoch bewies die heterologe Expression der humanen CBR1 in Mäuseherzen lediglich, dass CBR1 Doxorubizin zu Doxorubizinol umsetzen kann und dieser Metabolit Herzschädigungen verursachen kann.

2003 berichtete die Minotti-Gruppe erstmals, dass es sich bei der kardialen Doxorubizin-Reduktase im Menschen um AKR1A1 handeln könnte.

AKR1A1 zeigt in den von uns gemessenen Expressionsmustern eine mittelstarke Aktivität von  $6,8 \cdot 10^3$  Kopien/ng cDNA (3.13). Allerdings kann die Aktivität der AKR1A1 durch Flavonoide als auch durch das Taxan Paclitaxel allosterisch moduliert werden (Mordente et al 2003, Salvatorelli et al 2006, Minotti et al 2001). Diese Beobachtung wird durch die fortgeschrittene Kardiomyopathie bei Brustkrebspatienten erhärtet, die Doxorubizin mit Paclitaxel erhalten hatten (Gianni et al 1997, 2001). Weiterhin stimmt der von uns gemessene  $K_m$ -Wert für Herzzytosol von  $239 \mu\text{M}$  (Abb. 3.3) mit dem von uns bestimmten  $K_m$ -Wert für AKR1A1 von  $247 \mu\text{M}$  sehr gut überein (Abb. 3.8). Diese Übereinstimmungen bestätigen die Hemmstoff-basierenden Berichte der Minotti-Gruppe, dass AKR1A1 die kardiale Doxorubizin-Reduktase im Menschen darstellt (Mordente et al 2003, Salvatorelli et al 2006). Der AKR1A1- und AKR1B1-Inhibitor 2,7-difluorospirofluorene-9,5'-imidazolidine-2',4'-dione (AL1576), der bei Diabetes-induzierten Sehnervschädigungen eingesetzt wird, zeigte eine 50%ige Reduktion der Doxorubizinol-Bildung in humanen Herzen (Mordente et al 2003). Jedoch konnten spezifischere AKR1B1-Inhibitoren (z.B. EPBC) die Doxorubizinol-Bildung in diesen Versuchen nicht unterdrücken. Dies führte zu der Annahme, dass AKR1A1 die verantwortliche Doxorubizin-Reduktase im humanen Herzen ist. Dieses Ergebnis wurde jedoch nicht durch z.B. Korrelationen des AKR1A1-Gehalts in humanen Herzen mit den gemessenen Aktivitäten bestätigt. Angesichts der Ergebnisse unserer Hemmstoffversuche ist die Hemmung durch einen vermeintlich spezifischen Inhibitor kein ausreichender Beweis, da die mögliche Inhibition anderer Enzyme nicht mitgetestet wurde. Die Korrelation von Expressionsdaten des Enzyms mit der Aktivität des kardialen Zytosols sowie weitere Untersuchungen wären daher sinnvoll.

Interessant ist weiterhin, dass Minotti et al (2003) für Herzzytosol keine Sättigung mit Doxorubizin messen konnte. Wir haben das gleiche Phänomen für AKR1B1 gesehen. Dies könnte durch eine AKR1A1-Defizienz in dem untersuchten humanen Herzzytosol erklärt werden. Jedoch sprechen die Hemmstoffversuche von Mordente und die von uns bestimmten geringen Expressionsraten (3.14) gegen eine größere Rolle der AKR1B1 im kardialen Doxorubizinmetabolismus.

Die Anthrazyklin-vermittelte Kardiotoxizität kann durch die bestimmten kinetischen Parameter der AKR1A1-vermittelten Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol nicht erklärt werden. So zeigen sowohl AKR1A1 als auch Herzzytosole hohe  $K_m$ -Werte von ca.  $250 \mu\text{M}$  (Abb. 3.3). Damit ist die Affinität der Enzyme des Herzgewebes für die Doxorubizin-



Reduktion niedriger als die der meisten anderen Organe. Auch die maximalen Umsatzraten von Herzzytosol und die metabolische Clearance waren im Vergleich zu den anderen Organen sehr gering (Abb. 3.4 und 3.5). Die erhöhte Empfindlichkeit gegen Doxorubizinol kann daher nur durch eine erhöhte Akkumulation im Herzen und die höhere Empfindlichkeit der Kardiomyozyten gegen ROS und Doxorubizinol und den mit diesen Substanzen ausgelösten Veränderungen erklärt werden. Möglicherweise entsteht durch diese Reaktion ein „circulus vitiosus“: Im Herz entstehen geringe Mengen an Doxorubizinol, die zu der Bildung von ROS und Störung der Eisen- und Kalziumhomöostase führen. Durch ROS können jedoch weitere Doxorubizin umsetzende Enzyme wie z.B. die Aldo-Keto-Reduktase AKR1B1 aktiviert werden (Spycher et al 1997); es entsteht noch mehr Doxorubizinol, was diesen Kreislauf weiter vorantreibt. In Autopsien nach einer Doxorubizin-Therapie zeigt humanes Herz die vierthöchste Doxorubizinol- und die fünftgrößte Doxorubizin-Konzentration; diese Werte lagen in einem gleichen Konzentrationsbereich wie die der Niere (Stewart et al 1993). Diese Ergebnisse und die niedrige Clearance des Herzzytosols verdeutlichen, dass die Empfindlichkeit dieses Organs eher auf die erhöhte Akkumulierung als auf den aktiveren Metabolismus von Doxorubizin zu Doxorubizinol zurück zu führen ist.

Ungeklärt ist hingegen die kardiale Aufnahme von Alkohol-Metaboliten in das Herz aus dem Blutkreislauf. Kang et al (2001, 2003) zeigten für Idarubizin und Idarubizinol, dass der kardiale Gehalt in Ratten durch Hemmstoffe der „Multidrug resistance“-Proteine MDR erhöht wird. Dies belegt, dass das Anthrazyklin ins Herz aufgenommen werden kann und MDR-Proteine dabei einen Efflux vermitteln. Die erhöhte Aufnahme des Anthrazyklins führt zu einem erhöhten Metabolismus zu dem Alkohol-Metaboliten. So zeigte van Asperen (2000), dass ein Knock-Out des MDR1-Transporters in Mäusen zu einer verstärkten Akkumulation von Doxorubizin im Herzen mit kardiotoxischen Wirkungen führt. Für MDR1 und ABCG2 ist der Transport von Doxorubizin und die Expression in humanen Herzen bewiesen (Solbach et al 2006). Viele der untersuchten Transporter scheinen eine wichtige Rolle in der Kardioprotektion zu spielen, da eine starke Expression im Herzgewebe, teilweise begrenzt auf linksventrikuläre Endothelzellen, gemessen wird, wie z.B. für MDR1 und ABCG2 (Meissner et al 2002, Lazarowski et al 2005). Bei Letzterem ist die Expression stark erhöht bei kardiomyopathischen Herzen (Meissner et al 2006). Die Akkumulation von Anthrazyklinen und ihren Metaboliten wird also erheblich durch ABC-Transporter moduliert. Die kardiale Aufnahme als auch der Efflux von Anthrazyklin-Alkohol-Metaboliten ist jedoch noch nicht weiter geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

## 4.2 Interindividuelle Variabilität im Metabolismus von Doxorubizin

Die interindividuelle Variabilität der Reaktion von Doxorubizin zu Doxorubizinol wurde in 92 humanen Leberproben durch Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  festgestellt. Um diese große Variabilität zwischen verschiedenen Individuen erklären zu können, wurden Expressionsdaten (mRNA, Protein) des Kandidatenenzym CBR1 in den einzelnen Leberproben bestimmt. Außerdem wurde das Gen auf genetische Polymorphismen untersucht, die zu einer veränderten Aktivität der Doxorubizin-Reduktase in Leber führen könnten.

### 4.2.1 Starke interindividuelle Variabilität im Metabolismus von Doxorubizin in einer humanen Leberbank

Der hepatische Metabolismus von Doxorubizin zu Doxorubizinol wurde bis dato noch nie an einer größeren Stichprobe der Gesamtpopulation untersucht. Bisher liegen nur Forschungsergebnisse zum Metabolismus aus einer humanen Leber vor (Felsted et al 1980).

In unserer Untersuchung einer kaukasischen Leberbank konnte eine große interindividuelle Variabilität im Umsatz von Doxorubizin zu Doxorubizinol festgestellt werden. Die  $K_m$ -Werte lagen im Satz 1 zwischen 43-502 $\mu$ M, während der Satz 2 Werte im Bereich von 53 – 298 $\mu$ M zeigte. Die  $V_{max}$ -Werte lagen im Satz 1 zwischen 131 – 4914 pmol/(min\*mg) und im Satz 2 zwischen 131 – 2807 pmol/(min\*mg). Damit variierte der  $K_m$ -Wert zwischen der niedrigsten und höchsten gemessenen Probe um das Zwölfwache (Satz 1) bzw. Sechsfache; die  $V_{max}$ -Werte variierten sogar bis um das 38-fache (Satz 1) bzw. um das 21-fache. Proben, bei denen kein Messpunkt bei 250 $\mu$ M Doxorubizin vorhanden war, und Proben, wo ein Messpunkt mehr als 15% von der Michaelis-Menten Kinetik abwich, wurden aus dem Satz 2 - im Gegensatz zu Satz 1 - ausgeschlossen. Die starken Unterschiede zwischen Satz 1 und Satz 2 lassen die Vermutung zu, dass die aussortierten Proben aus Satz 1 tatsächlich auf Messfehler hindeuten. Sie weichen stark von den anderen Proben ab und zeigen große Unterschiede zwischen den 2003 und 2006 gemessenen Werten. Bei den weiteren Betrachtungen wird daher nur noch Satz 2 beschrieben.

In den untersuchten Lebern waren Proben vorhanden, die stark von dem Mittelwert abwichen. So zeigten Probe 23 und 24 bezüglich  $K_m$  Extremwerte, Probe 35 und 47 zeigen stark erhöhte  $V_{max}$ -Werte. Möglicherweise handelt es sich hier um genetische Mutanten, jedoch wurden

diese Proben bis auf Probe 47 nicht in der Sequenzierung berücksichtigt. Probe 47 zeigte jedoch keine Auffälligkeiten bei der Sequenzierung.

Die spezifische Aktivität eines Zytosols hängt von der Expression des Enzyms, welches die untersuchte Reaktion katalysiert, ab. Da bei der Reaktion von Doxorubizin zu Doxorubizinol große interindividuelle Unterschiede gesehen wurden, kann vermutet werden, dass das Kandidatenenzym in den Leberproben auch eine starke interindividuelle Expression zeigt. Die Kinetik- und Inhibitoruntersuchungen (Abschnitt 4.1) zeigten, dass CBR1 vermutlich die Doxorubizin-Reduktase in humaner Leber ist. Von diesem Enzym wurden daher die mRNA- und Proteinexpression bestimmt, um die starke Variabilität im Metabolismus erklären zu können.

#### **4.2.2 Expressionsanalyse von CBR1 in Proben einer humanen Leberbank**

CBR1 stellte sich anhand der kinetischen Daten und der Inhibitorversuche als wahrscheinlichstes Kandidatenenzym heraus, die hepatische Doxorubizin-Reduktase im Menschen zu sein. Die Expression von CBR1 wurde daher im Western Blot ermittelt und mit den gemessenen Aktivitäten der Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol verglichen/korreliert.

Die Normalisierung der Western Blots zeigte sich als schwierig, da einige typisch verwandte Normalisierungsproteine wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin als auch  $\beta$ -Actin sehr polymorph exprimiert wurden. Dies kann folgende Ursachen haben:

Auch Housekeeping-Gene/Proteine können in verschiedenen Organen als auch in verschiedenen Entwicklungsstadien sehr unterschiedlich exprimiert werden (Foss et al 1998, Schmittgen & Zakrajsek 2000, Ferguson et al 2005). Außerdem zeigten Brockmann et al (2007), dass äußere Stressfaktoren die Translationsrate erheblich beeinflussen können.

Die Lebergewebe stammen von kranken Patienten; Ferguson et al (2005) zeigten, dass in kranken oder Tumorgeweben massive Unterschiede in den Expressionen dieser Housekeeping-Proteine zu erkennen sind.

Weiterhin können viele posttranslationale Modifikationen dieser Proteine, z.B. Glykosylierungen oder Phosphorylierungen, zu einem veränderten Molekulargewicht führen (Reinders & Sickmann et al 2007). Es ist ebenfalls möglich, dass der Antikörper weitere Proteine unspezifisch erkennt und bindet. GAPDH zeigte hingegen in den untersuchten Lebern eine gleiche, nicht polymorphe Expression und konnte als Normalisierungsprotein untersucht werden. Wird CBR1 gegen GAPDH normalisiert, wird die Variabilität geringer als

ohne Normalisierung (nicht gezeigt), was auf eine Zuverlässigkeit des gewählten Proteins hinweist.

Die Expression von CBR1-Protein war interindividuell sehr unterschiedlich ausgeprägt. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Covarrubias et al (2006) überein, die einen sehr unterschiedlichen Umsatz von Menadion, dem Modell-Substrat für CBR1, in verschiedenen humanen Leberzytosolen beobachteten, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen Kaukasiern und Afro-Amerikanern festgestellt wurde.

Bei der Expressionsanalyse von CBR1 zeigte sich die gegenseitige Normalisierung der einzelnen Western Blots als problematisch, da die Intensitäten zwischen den Blots stark unterschiedlich waren, und auch die Signalstärken von CBR1 und GAPDH zwischen den verschiedenen Blots nicht immer einheitlich waren. Es erscheint daher nicht verwunderlich, dass die normalisierten Proben mit der spezifischen gemessenen Aktivität der Umsetzung von Doxorubizin zu Doxorubizinol keine Korrelation zeigten.

Betrachtet man jedoch die Korrelation der Proteinexpression von CBR1 in den einzelnen Blots mit der gemessenen Doxorubizin-Reduktase-Aktivität, so zeigten sechs von neun Blots eine signifikante Korrelation. Dieses Ergebnis weist, wie auch die Inhibitorversuche (3.3.1), auf eine direkte und hauptsächliche Beteiligung von CBR1 an dem Doxorubizinmetabolismus in der humanen Leber hin.

Die ermittelte mRNA-Expression von CBR1 zeigte dagegen zwar ebenfalls eine hohe Variabilität, jedoch keine Korrelation zu der gemessenen Aktivität oder der Proteinexpression im Western Blot. Die Synthese von Protein über den Translationsapparat als auch die Prozessierung sind jedoch multifaktorielle Prozesse, die von vielen Faktoren abhängen und weiterhin einer sättigbaren Michaelis-Menten-Kinetik folgen (Brockmann 2007).

Die Expression vieler Proteine ist abhängig von der mRNA-Expression und korreliert auch mit der gemessenen Aktivität des Proteins (Kamdem et al 2004, Haberl et al 2005, Greenbaum et al 2002). Neuere Publikationen zeigen jedoch, dass mRNA-Level nur teilweise mit den Proteinlevel korrelieren und auch von anderen Faktoren beeinflusst werden (Greenbaum et al 2002, 2003). Man geht davon aus, dass nur in ca. 40% der Fälle eine klare Korrelation zwischen der mRNA-Expression und der Protein-Expression besteht (Tian et al 2004).

Für die Abwesenheit einer Korrelation zwischen der mRNA- und der Protein-Expression gibt es verschiedenste Gründe: so ist die Halbwertszeit von den verschiedenen mRNAs und Proteinen unterschiedlich (Glickman et al 2002, Pratt et al 2002). Außerdem gibt es durch den genetischen Code viele synonyme Codons. Jedoch hängt die Translationsrate von der

Verfügbarkeit der einzelnen tRNAs ab; so werden häufige Codons 3-6 mal schneller und fehlerfreier translatiert (Precup et al 1987, Brockmann et al 2007, Greenbaum et al 2003). Auch posttranslationale Modifikationen können die Aktivität von Proteinen modifizieren und zu einer veränderten Halbwertszeit führen (Mata et al 2005). In Stresssituationen kann es zu einer schnellen Bereitstellung oder Degradierung von wichtigen Proteinen kommen, wo Transkription und Translation für diesen Prozess zu langsam wären. In diesem Fall wird ein Pool an mRNAs für die Translation gezielt von der Degradierung ausgeschlossen. Wenn Proteine schnell verfügbar sein müssen, kann sofort mit der Translation begonnen werden (Brockmann et al 2007, Sheth & Parker 2003, Coller et al 2005). Auch die cDNA Synthesereaktion mit Random-Hexameren kann zu einer Verfälschung der mRNA-Transkriptzahl führen (Zhang & Byrne 1999) und so eine Korrelation von mRNA und Protein verhindern.

Für CBR1 ist nicht geklärt, welche der posttranskriptionalen Modifikationen oder Variationen zu einer mangelnden Korrelation von der mRNA- und Proteinexpression führt. Krook et al zeigten 1993, dass CBR1 in der Lage ist, autokatalytisch an das Lysin 239 verschiedene Oxocarbonylsäuren wie Pyruvat oder 2-Oxoglutarat zu addieren. Neben der unmodifizierten Form wurden zwei modifizierte Formen im Western Blot gesehen (Abb. 3.3.3). Mit Menadion wurden zwar keine verschiedenen Umsatzraten für die Isoformen festgestellt (Wermuth et al 1993, Krook et al 1993, Bohren et al 1987); jedoch wäre es möglich, dass diese Modifikation bei anderen Substraten durchaus eine Aktivitätsänderung bewirkt. Die gute Korrelation zwischen der gemessenen Aktivität und der CBR1-Proteinexpression innerhalb der einzelnen Western Blots spricht jedoch dagegen (Tabelle 3.2).

CBR1 scheint aufgrund der durchgeführten Untersuchungen die hepatische Doxorubizin-Reduktase im Menschen zu sein. Neben den Inhibitormessungen (3.3.1) bestätigt auch die Korrelation der CBR1-Proteinexpression in den einzelnen Western Blots mit der gemessenen Doxorubizin-Reduktase-Aktivität in den Proben diese Schlussfolgerung. Jedoch konnte keine Assoziation zwischen der gemessenen Aktivität und der mRNA-Expression erkannt werden. Posttranskriptionelle Modifikationen des Enzyms sind jedoch möglich.

Die Variabilität der Proteinexpression von CBR1 kann die starke Variabilität der Doxorubizin-Reduktase-Aktivität erklären. Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß diese Variabilität durch CBR1-Genpolymorphismen zustande kommt.

### 4.3 Assoziation von zwei Haplotypen im CBR1-Gen mit einer veränderten Doxorubizin-Reduktase-Affinität

Um Assoziationen von genetischen Polymorphismen im CBR1-Gen mit der variablen Aktivität von Doxorubizin zu Doxorubizinol in humanen Leberproben untersuchen zu können, wurde der kodierende Bereich des CBR1-Gens in 50 Leberproben komplett sequenziert.

Bei der Analyse der bekannten Polymorphismen im CBR1-Gen fällt auf, dass es keine bekannten SNPs, die einen Aminosäureaustausch bewirken, mit einer größeren Allelfrequenz gibt. In Afrikanern wurde kürzlich über einen SNP V88I berichtet, der zu einem Aminosäureaustausch führt und die Aktivität des Enzyms erhöht (Gonzalez-Covarrubias et al 2007). Jedoch wurde kürzlich für den MDR1-Transporter gezeigt, dass auch synonyme SNPs zu einer veränderten Aktivität führen können (Kimchi-Sarfaty et al 2007). In diesem Fall führt der Polymorphismus vermutlich durch eine Konformationsänderung zu einer reduzierten Aktivität. Weiterhin sind auch Gene bekannt, bei denen bestimmte synonyme SNPs zu einer erniedrigten Proteinexpression und -aktivität führen (Nackley et al 2006). Diese wird durch eine reduzierte Proteinsynthese erklärt.

Bei der Analyse der Western Blots gab es keine Probe, die auf ein Null-Allel hindeuten würde; jede Leber zeigte eine CBR1-Expression. Auch in den Datenbanken ist kein Null-Allel (z.B. ein Stopkodon) erkennbar. Forschungen in Knock-Out-Mäusen zeigten, dass der CBR1  $-/-$  Knock-Out nicht überlebensfähig ist. CBR1 scheint also eine wichtige Funktion bei der Embryogenese zu haben (Olson et al 2003). Weiterhin scheint CBR1 eine physiologische Rolle bei der Neuroprotektion im Menschen einzunehmen; CBR1 entgiftet reaktive Aldehyde der Lipidperoxidation, sichert so das Überleben neuronaler Zellen und schützt vor ROS induzierter Degeneration des Gehirns (Maser 2006). Die neuroprotektive Rolle von dem CBR1-Analog „Sniffer“ ist in *Drosophila melanogaster* bewiesen (Botella et al 2004, Sgraja et al 2004).

Die von uns untersuchten Einzel-Polymorphismen des CBR1-Gens zeigten keinen signifikanten Zusammenhang mit den kinetischen Parametern  $K_m$ ,  $V_{max}$  oder der Clearance. Auch der SNP rs9024, der die potentielle 3'UTR Poly-A-Erkennung zerstört und somit zu einer Änderung der Expression führen kann (Beaudoing et al 2000), zeigt keine Assoziation mit der Umsatzrate von Doxorubizin zu Doxorubizinol in humaner Leber. Auch eine Deletion im Promotor mit Auswirkung auf die Bindung einiger Transkriptionsfaktoren,

Zinkfingerproteine und methylierte CpGs (Edwards 1990) und somit auf die epigenetische Regulation korrelierte in unserer Untersuchung nicht mit der variablen Doxorubizinaktivität. Für drei Fünftel der sequenzierten Proben wurde ebenfalls die mRNA-Expression für CBR1 gemessen. Jedoch konnte auch hier keine Assoziation mit den Einzel-Polymorphismen erkannt werden.

Aus den analysierten SNPs wurden die Haplotypen berechnet. Die untersuchten SNPs zeigten nur teilweise eine Kopplung, so dass sich 19 Haplotypen ergaben, von denen 9 genauer analysiert wurden, die eine Häufigkeit von über 2% zeigten und insgesamt 82% von allen Haplotypen ausmachten. Bei der Testung der Haplotypen auf Assoziationen mit den gemessenen Parametern (mRNA,  $K_m$ ,  $V_{max}$ , Clearance) zeigten sich für zwei Haplotypen signifikante Unterschiede zu den anderen analysierten Haplotypen in Bezug auf den  $K_m$ -Wert. Haplotyp H2 zeigte einen signifikant niedrigeren  $K_m$ -Wert (12,5%) als die anderen Haplotypen, während H5 einen signifikant höheren  $K_m$ -Wert (13,8%) zeigte. Dies bedeutet, dass auch genetisch synonyme Polymorphismen den Umsatz von Doxorubizin zu Doxorubizinol beeinflussen können. Eine Beeinflussung des  $K_m$ -Wertes kann z.B. durch Konformationsänderung des Proteins, wie für MDR1 (Kimchi-Sarfaty et al 2007) gezeigt, erfolgen. Der Unterschied zwischen den zwei beschriebenen Haplotypen liegt jedoch in einem intronischen SNP und kann daher nicht durch die Codon-Usage erklärt werden (Kotlar & Lavner et al 2006). Jedoch gibt es vielfältige Hinweise, dass auch synonyme SNPs in intronischen Bereichen einen Phänotyp zeigen (Duffy et al 2007).

Für CBR1 wurde bisher nur über einen nicht-synonymen SNP in Afrikanern berichtet, der zu einer 50%igen Aktivitätserhöhung des Enzyms führt (Gonzales-Covarrubias 2007). Die in dieser Publikation weiter beschriebenen SNPs rs2230192 und rs20572 zeigen ähnliche Frequenzen in Kaukasiern wie von uns ermittelt. Haplotyp-assoziierte Veränderungen von kinetischen Parametern wurden in der Literatur für CBR1 bisher nicht berichtet. Die ermittelten Haplotypen können einen geringen Teil der interindividuellen Unterschiede der CBR1-Aktivität erklären. Da es sich bei diesen Ergebnissen um eine Post-hoc-Analyse handelt, sollten sie in einer weiteren Studie untersucht werden.

Für eine weitere Variabilität kann eine epigenetische Regulation des Gens verantwortlich sein. Der CBR1-Promoter enthält viele Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren SP-1 (Briggs et al 1986) und AP-2 (Mitchell et al 1987) wie auch für NF-kappa b2 und erfährt dadurch eine epigenetische Regulation (Forrest et al 1990, 1991). Die Induktion von CBR1 durch Substanzen, die Enzyme der xenobiotischen Detoxifizierung induzieren (Sudan I, BHA und  $\beta$ -Naphthoflavon), weisen auf eine epigenetische Regulation hin und verdeutlichen die

Rolle von CBR1 in der Zellprotektion (Forrest et al 1990, 1991). Bereits in dieser Publikation von Forrest wurde vermutet, dass diese Induktion durch den AHR-Locus vermittelt werden könnte. Der AHR-Locus kontrolliert die Induktion des Arylhydrocarbon-Hydroxylase-Systems, welches für die Detoxifizierung vieler xenobiotischer Substanzen bekannt ist und viele Enzyme beinhaltet (Gonzalez et al 1984). Erst kürzlich wurde eine fünffache Induktion für die CBR1-mRNA durch  $\beta$ -Naphthoflavon, ein Ligand des Arylhydrocarbon-Rezeptors (AHR), nachgewiesen. Substanzen, die auf andere Rezeptoren wirken, wie z.B. den Glukokortikoid-, den konstitutiven Androgen- und den Pregnan-X-Rezeptor, zeigten hingegen keine Wirkung. An AHR Knock-Out-Mäusen wurde nachgewiesen, dass der AH-Rezeptor zu einer Regulation des CBR1-Gens beiträgt; die Knock-Out-Mäuse zeigten im Vergleich zum Wildtyp keine Induktion durch den potenten AHR-Liganden TCDD (2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-Dioxin) (Lakhman et al 2007).

Für die untersuchten Carbonyl reduzierenden Enzyme sind weiterhin eine Vielzahl an Faktoren bekannt, welche die Expression der Gene modulieren können. Die Regulation erfolgt möglicherweise z.B. durch Xenobiotika und Hormone, die die Expression verändern, wie auch durch Transkriptionsveränderungen infolge einer Krebserkrankung. So werden durch Zigarettenkondensat neben verschiedenen Cytochrom-P450-Reduktasen auch die Carbonyl reduzierenden Enzyme AKR1C1, AKR1C3 und AKR1B10 bis zu 15-30fach stärker exprimiert und spielen vermutlich bei der Detoxifizierung eine Rolle (Nagaraj et al 2006). Für einige Carbonyl reduzierende Enzyme ist eine Regulation der Aktivität durch Östrogene und Gonatropin bekannt (Fujii et al 2005). Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass das weibliche Geschlecht ein Risikofaktor bei der Ausbildung einer Anthrazyklin-vermittelten Kardiomyopathie darstellt. Die Fähigkeit von CBR1, Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  und Prostaglandin  $E_2$  umzusetzen, lässt weiterhin auf eine regulatorische Rolle im Prostaglandin-Metabolismus schließen (Espey et al 2000).

Die Expression vieler Gene ist ebenfalls bei Krebserkrankungen moduliert. Auch für die untersuchten Carbonyl reduzierenden Enzyme sind Expressionsänderungen im Zusammenhang mit einer Krebserkrankung bzw. Krebstherapie bekannt. So ist die Expression von CBR1 bei vielen Krebsarten wie Lungenkrebs (Lopez de Cerain et al 1999) erhöht. Außerdem wurden Korrelationen zwischen einer erniedrigten CBR1-Expression und dem Grad der Dedifferenzierung in Leberkarzinomen (Suto et al 1999), einer erniedrigten Überlebensrate und Lymphknotenmetastasen im epithelialen Ovarienkrebs (Umemoto et al 2001) und der Tumorprogression und Angiogenese bei Lungenkrebs nachgewiesen (Takenaka et al 2005). AKR1C3 ist in verschiedenen Hormon-abhängigen Krebsarten wie Prostatakrebs



und Brustkrebs heraufreguliert (Gobec et al 2005, Brozic et al 2006, Penning et al 2006); AKR1B10 zeigt ebenfalls eine starke Expression in Lungenkrebszellen und dient als diagnostischer Marker (Penning 2005, Fukumoto et al 2005). Auch ROS, welche vermehrt bei einer Krebstherapie gebildet werden, sind in der Lage, die Expression von Aldo-Keto-Reduktasen zu aktivieren wie z.B. für AKR1B1 (Spycher et al 1997).

Bei der Anthrazyklinresistenz scheinen Überexpressionen von Carbonyl- und Aldo-Keto-Reduktasen eine Rolle zu spielen; so zeigten Ax et al (2000), dass bei einer Daunorubizin-resistenten Magenkarzinomzelllinie die abbauenden Enzyme CBR1, AKR1C2 und AKR1B1 stark heraufreguliert sind, was durch eine sechsfach erhöhte Rate der Daunorubizinol-Bildung begleitet wird. Auch die Transfektion einer humanen Pankreaskarzinomzelllinie mit den Daunorubizin-Reduktasen AKR1A1, AKR1B1 und CBR1 führte zu einem erhöhten Abbau zu Daunorubizinol und damit zu einer vermehrten Resistenzbildung (Plebuch et al 2007). Weiterhin sind AKR1B1 und AKR1B10 bei Daunorubizin-resistenten Leberkrebsarten stark erhöht (Lee et al 2001). Durch einen AKR1B1-Hemmstoff wird die Sensitivität der Krebszelle zu dem Anthrazyklin jedoch wieder hergestellt.

Die Variabilität des Doxorubizinmetabolismus' kann nicht ausreichend durch die hier beschriebenen Polymorphismen geklärt werden; eine epigenetische Regulation erscheint daher wahrscheinlich. Jedoch liefern die Inhibitionsuntersuchungen als auch die Western Blot-Ergebnisse starke Hinweise dafür, dass es sich bei der hepatischen Doxorubizin-Reduktase im Menschen um die interindividuell exprimierte CBR1 handelt. Mit diesem Wissen können nun gezielt Variabilitäten, weitere Polymorphismen als auch Modulationen der Expression genauer untersucht werden.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen befassen sich mit der Identifizierung des metabolisierenden Enzyms der Reaktion von dem Zytostatikum Doxorubizin zu dem Alkohol-Metaboliten Doxorubizinol in humanem Leberzytosol. Weiterhin wurde der interindividuelle Metabolismus dieser Reaktion in einer humanen Leberbank analysiert.

Die untersuchte Leberbank zeigte eine große Variabilität in Bezug auf den Doxorubizin-Metabolismus. Der Variationskoeffizient betrug für den  $K_m$ -Wert 210%, während er für  $V_{max}$  219% betrug. Da  $V_{max}$  häufig proportional zu der Expression des umsetzenden Enzyms in Leber ist, wurden in dieser Arbeit die Expressionsmuster der Kandidatenenzyme, verschiedene Aldo-Keto-Reduktasen sowie Carbonyl-Reduktasen ermittelt. Außerdem wurde der Umsatz von Doxorubizin zu Doxorubizinol in verschiedenen humanen Organen gemessen.

Die  $K_m$ -Werte für Dünndarm, Magen, Niere, Kolon, Leber und Pankreas lagen im Bereich von 86 – 172  $\mu\text{M}$ , während Milz, Lunge, Herz und Muskel höhere  $K_m$ -Werte zwischen 198 – 245  $\mu\text{M}$  zeigten. In den von uns untersuchten Organen scheint es zwei Doxorubizin-Reduktasen mit  $K_m$ -Werten von ca. 150 und 250  $\mu\text{M}$  zu geben. Eine dritte Doxorubizin-Reduktase könnte es im Pankreas und in der Milz geben, weil die  $K_m$ -Werte dieser Organe keinem der beiden oben genannten  $K_m$ -Werte zugeordnet werden konnten (Abb. 3.3). Die metabolische Clearance war am höchsten in Dünndarm und Leber mit 2,3 und 2,1  $\text{pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\mu\text{M})$ , während die anderen Organe eine wesentlich geringere Clearance von 0,19 (Milz) bis 0,86 (Niere)  $\text{pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg}\cdot\mu\text{M})$  zeigten. Dies steht im Einklang mit der prominenten Rolle dieser Organe in der Detoxifizierung von Fremdstoffen.

Der Umsatz von Doxorubizin zu Doxorubizinol wurde von den verschiedenen Enzymen in sehr unterschiedlichem Maßstab katalysiert. Die  $K_m$ -Werte unterschieden sich teilweise bei den untersuchten Enzymen. Die ermittelten  $K_m$ -Werte für AKR1C3 und CBR1 lagen bei 129 und 167  $\mu\text{M}$ , während für AKR1A1, AKR1B10 und AKR1C4 höhere  $K_m$ -Werte bei 247, 311 und 281  $\mu\text{M}$  gemessen wurden. Bei den maximalen Umsatzgeschwindigkeiten der Reaktion gab es deutliche Unterschiede: AKR1C3 und CBR1 zeigten einen ausgeprägten Metabolismus von Doxorubizin mit maximalen Umsatzgeschwindigkeiten von 183 und 21  $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ , während AKR1A1, AKR1B10 und AKR1C4 nur geringen Maximalumsatz zeigten mit Werten bei 1,1, 1,2 und 2,8  $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ . AKR1B1 wies keine Sättigung auf, aber ähnliche Umsatzraten wie AKR1A1 bei 100  $\mu\text{M}$  Doxorubizin. AKR1C1, AKR1C2 und CBR3 zeigten keinen Umsatz für die untersuchte Reaktion.

Das Expressionmuster von drei Kandidatenenzymen (CBR1, AKR1A1, AKR1C3) war proportional zu den Organen mit dem höchsten Umsatz (Leber, Niere und Dünndarm). Zur weiteren Eingrenzung der Kandidatenenzyme wurden für die rekombinanten Enzyme ebenfalls die kinetischen Parameter bestimmt. AKR1A1 konnte jedoch aufgrund des wesentlich höheren  $K_m$ -Wertes im Vergleich zu den  $K_m$ -Werten in humanem Leber-, Nieren- und Dünndarmzytosol ausgeschlossen werden.

Zur weiteren Bestimmung durchgeführte Inhibitoruntersuchungen zeigten, dass die als spezifischer CBR1-Inhibitor beschriebene Substanz Hydroxy-PP AKR1C3 bei einer wesentlich geringeren Konzentration hemmt als CBR1. Die Hemmung der Reaktion durch CBR1 als auch humanes Leberzytosol war hingegen kongruent. Dieses Ergebnis schließt AKR1C3 als Haupt-Doxorubizin-Reduktase in humaner Leber aus und deutet auf CBR1 als Haupt-Doxorubizin-Reduktase hin. Diese Ergebnisse wurden in anfangs erwähnter humaner Leberbank weiter untersucht. Der Gehalt von CBR1-Protein wurde im Western Blot bestimmt und mit der gemessenen spezifischen Aktivität korreliert.

In den verschiedenen Leberproben wurde ebenfalls eine hohe Variabilität im CBR1-Gehalt gesehen. Jedoch war keine Probe vorhanden, die auf ein Null-Allel hingewiesen hätte; jede Probe zeigte CBR1-Protein. Der Proteingehalt korrelierte mit der gemessenen spezifischen Aktivität in sechs von neun Western Blots. Dieses Ergebnis unterstützt die Beobachtung aus den Inhibitorversuchen und läßt vermuten, dass CBR1 als Haupt-Doxorubizin-Reduktase in humaner Leber betrachtet werden kann.

Einzel-Polymorphismus-Analysen des CBR1-Gens zeigten keine Assoziation mit dem gemessenen Doxorubizin-Metabolismus. Jedoch zeigte die Haplotyp-Analyse zwei Haplotypen, die einen signifikant verschiedenen  $K_m$ -Wert zeigten als die übrigen Haplotypen. Diese Haplotypen können jedoch nur einen geringen Teil der Variabilität des Doxorubizin-Metabolismus erklären. Da jedoch ein sehr starker interindividueller Doxorubizin-Metabolismus in humaner Leber beobachtet wird, deutet dies auf eine starke epigenetische Regulation des CBR1-Gens hin. Analysen der Promoterregion zeigten viele Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren; eine Aktivierung durch xenobiotische Substanzen kann vermutet werden.

Der beobachtete stark ausgeprägte interindividuelle Metabolismus von Doxorubizin kann zu einer variablen Deaktivierung des Medikaments und damit zu einer verminderten chemotherapeutischen Wirkung führen; die kardiotoxische Substanz Doxorubizinol ist dabei der Hauptmetabolit. Eine Therapie mit Doxorubizin könnte vermutlich durch ein therapeutisches Drug-Monitoring verbessert werden. Kennt man das umsetzende Enzym der

untersuchten Reaktion, besteht die Möglichkeit, diese Reaktion gezielt durch Hemmstoffe zu unterbinden. Für den getesteten Hemmstoff Hydroxy-PP wurde bereits für diese Anwendung ein Patent angemeldet. Auch die Kenntnis von verschiedenen Polymorphismen, die die Doxorubizinol-Bildung beeinflussen, könnte bei einem Drug-Monitoring miteinbezogen werden. Die in dieser Arbeit gezeigte Hemmung von AKR1C3 legt weiterhin eine Anwendung von Hydroxy-PP bei hormon-abhängigen Krebsarten wie z.B. Prostatakrebs oder Brustkrebs als auch bei Endometriose nahe (Gobec et al 2005, Brozic et al 2006, Penning et al 2006).

Die Charakterisierung der Doxorubizin-Reduktase in Leber ermöglicht die gezielte Suche nach Hemmstoffen für dieses Enzym. Dies ist heutzutage durch molekulare Struktur-Funktions-Modellierung vielfach verbreitet (Crivori et al 2006, Bauman et al 2005). So zeigten Silvestrini et al (2006) z.B., dass Chalkone (Zwischenprodukte der pflanzlichen Flavonoide) die Doxorubizinol-Bildung in humanen Herzen und Krebszellen unterbinden können. Die Bildung der kardiotoxischen Substanz könnte damit gezielt vermindert werden und das Auftreten einer Anthrazyklin-induzierten Kardiomyopathie verzögern oder gar unterbinden. Weiterhin wird eine Inaktivierung der chemotherapeutischen Wirkung im Tumor verringert, es werden weniger Resistenzen gebildet. Auch für die hepatische Doxorubizin-Reduktase im Menschen besteht die Möglichkeit, die Bildung von Doxorubizin zu Doxorubizinol zu verringern und damit die Inaktivierung der antineoplastischen Wirkung zu vermeiden. Durch die Gewährleistung einer ausreichend antikanzerogenen Dosis im Tumorgewebe würde die Tumor-Response verbessert und die Bildung von Resistenzen vermieden. Durch eine damit verbundene mögliche Herabsetzung der Dosis könnte eine bessere Verträglichkeit des Medikaments erreicht werden; die schweren Nebenwirkungen könnten reduziert werden. Die Identifizierung der verantwortlichen hepatischen Doxorubizin-Reduktase im Menschen kann somit einen wichtigen Beitrag leisten, durch Inhibition dieses Enzyms die Krebstherapie in Zukunft verträglicher und nebenwirkungsfreier zu gestalten und Resistenzbildungen vorzubeugen.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

$\mu\text{M}$	mikromolar
Abb.	Abbildung
AHR	Arylhydrokarbon-Rezeptor
AKR	Aldo-Keto-Reduktasen
Amp	Ampicillin
ANOVA	Analysis of variance, Varianzanalyse
APS	Ammonium Persulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
$\text{Ca}^{2+}$	Zweiwertiges Kalzium-Ion
CARP	Kardiales Ankyrin Protein, (cardiac ankyrin repeat protein)
CBR	Carbonyl-Reduktase
cDNA	copy DNA
CHF	chronische Herzinsuffizienz (Congestive heart failure)
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotridtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DOX	Doxorubizin
DTT	Dithiothreitol
ECL	„Enhanced Chemiluminescence“, Verstärkte Chemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Echokardiogramm
$\text{Fe}^{3+}$	dreiwertiges Eisen
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
$\text{H}_2\text{O}$	Wasser
$\text{H}_2\text{O}_2$	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure
HPLC	High performance liquid chromatography

HRP	Meerrettichperoxidase
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
IC <sub>50</sub>	Halbmaximale Hemmstoffkonzentration
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
IRP	iron regulatory protein 1
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
K <sub>i</sub>	Dissoziationskonstante eines Inhibitors
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten Konstante
Km	Kanamycin
<i>lacZ</i>	β-Galactosidase
MDR	Medium-kettige Dehydrogenasen/Reduktasen (medium-chain dehydrogenases/reductases)
mRNA	Messenger-RNA
MW	Mittelwert
NADH	Nicotinamidadenindinucleotid
NADPH	Dihyronicotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NOS	NO Synthase
NQO	NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase
O <sub>2</sub>	Molekularer Sauerstoff
OD	optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster (Open reading frame)
p	pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PIPES	Piperazin-Diethansulfonsäure
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoff Spezies (Reactive oxygen species)
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
SD	Standardabweichung

---

SDR	Short chain reductase, kurzkettige Reduktasen
SDS	Natrium Dodecylphosphat
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (Single nucleotide polymorphism)
SOD	Superoxid-Dismutase
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-Dioxin
TEMED	N-N-N'-N'-Tetramethyldiamin
$T_m$	Schmelztemperatur
TPMT	Thiopurin-Methyltransferase
Tris	Trishydroxymethylaminomethan-Borsäure-EDTA
U	Enzym-Einheit (Unit)
UGT1A1	UDP-Glucuronosyltransferase
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Bereich
UV	Ultraviolett
$V_{max}$	Maximale Umsatzgeschwindigkeit
VNTR	Minisatelliten-DNA (variable number of tandem repeats)
Vol.	Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid

## 7. Literaturverzeichnis

- Ahmed, N. K., R. L. Felsted and N. R. Bachur (1978).** Heterogeneity of anthracycline antibiotic carbonyl reductases in mammalian livers. *Biochem Pharmacol* 27(23): 2713-9.
- Akman, S. A., J. H. Doroshow, T. G. Burke and M. Dizdaroglu (1992).** DNA base modifications induced in isolated human chromatin by NADH dehydrogenase-catalyzed reduction of doxorubicin. *Biochemistry* 31(13): 3500-6.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990).** Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215(3): 403-10.
- Amitai, Y., T. Bhooma and H. Frischer (1996).** Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency severely restricts the biotransformation of daunorubicin in human erythrocytes. *J Lab Clin Med* 127(6): 588-98.
- Andersen, A., H. Holte and L. Slordal (1999).** Pharmacokinetics and metabolism of doxorubicin after short-term infusions in lymphoma patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 44(5): 422-6.
- Aplenc, R., J. G. Blanco, W. Leisenring, S. Davies, M. V. Relling, L. Robinson, C. Sklar, M. Stovall and S. Bhatia (2006).** Polymorphisms in candidate genes in patients with congestive heart failure (CHF) after childhood cancer: A report from the Childhood Cancer Survivor Study (CCSS).
- Arai, M., K. Tomaru, T. Takizawa, K. Sekiguchi, T. Yokoyama, T. Suzuki and R. Nagai (1998).** Sarcoplasmic reticulum genes are selectively down-regulated in cardiomyopathy produced by doxorubicin in rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 30(2): 243-54.
- Ax, W., M. Soldan, L. Koch and E. Maser (2000).** Development of daunorubicin resistance in tumour cells by induction of carbonyl reduction. *Biochem Pharmacol* 59(3): 293-300.
- Bachur, N. R. and M. Gee (1971).** Daunorubicin metabolism by rat tissue preparations. *J Pharmacol Exp Ther* 177(3): 567-72.
- Bachur, N. R., F. Yu, R. Johnson, R. Hickey, Y. Wu and L. Malkas (1992).** Helicase inhibition by anthracycline anticancer agents. *Mol Pharmacol* 41(6): 993-8.
- Bachur, N. R., L. Lun, P. M. Sun, C. M. Trubey, E. E. Elliott, M. J. Egorin, L. Malkas and R. Hickey (1998).** Anthracycline antibiotic blockade of SV40 T antigen helicase action. *Biochem Pharmacol* 55(7): 1025-34.
- Bachur, N. R., S. L. Gordon and M. V. Gee (1977).** Anthracycline antibiotic augmentation



- of microsomal electron transport and free radical formation. *Mol Pharmacol* 13(5): 901-10.
- Bachur, N.R. and D.H. Huffman (1971)**, Daunorubicin metabolism: estimation of daunorubicin reductase. *Br J Pharmacol.* 43(4): p. 828-33.
- Bachur, N.R. and M. Gee (1971.)** Daunorubicin metabolism by rat tissue preparations. *J Pharmacol Exp Ther*, 177(3): p. 567-72.
- Badary, O. A., A. S. Awad, S. Abdel-Maksoud and F. M. Hamada (2004)**. Cardiac DT-diaphorase contributes to the detoxification system against doxorubicin-induced positive inotropic effects in guinea-pig isolated atria. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31(12): 856-61.
- Ballet, F., P. Vrignaud, J. Robert, C. Rey and R. Poupon (1987)**. Hepatic extraction, metabolism and biliary excretion of doxorubicin in the isolated perfused rat liver. *Cancer Chemother Pharmacol* 19(3): 240-5.
- Bauman, D. R., S. I. Rudnick, L. M. Szewczuk, Y. Jin, S. Gopishetty and T. M. Penning (2005)**. Development of nonsteroidal anti-inflammatory drug analogs and steroid carboxylates selective for human aldo-keto reductase isoforms: potential antineoplastic agents that work independently of cyclooxygenase isozymes. *Mol Pharmacol* 67(1): 60-8.
- Bauman, D. R., S. Steckelbroeck and T. M. Penning (2004)**. The roles of aldo-keto reductases in steroid hormone action. *Drug News Perspect* 17(9): 563-78.
- Beaudoing, E., S. Freier, J. R. Wyatt, J. M. Claverie and D. Gautheret (2000)**. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res* 10(7): 1001-10.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979)**. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-23.
- Blouin, K., S. Blanchette, C. Richard, P. Dupont, V. Luu-The and A. Tchernof (2005)**. Expression and activity of steroid aldoketoreductases 1C in omental adipose tissue are positive correlates of adiposity in women. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(2): E398-404.
- Bodor, N. and L. Prokai (1990)**. Site- and stereospecific ocular drug delivery by sequential enzymatic bioactivation. *Pharm Res* 7(7): 723-5.
- Bohren, K. M., B. Wermuth, D. Harrison, D. Ringe, G. A. Petsko and K. H. Gabbay (1994)**. Expression, crystallization and preliminary crystallographic analysis of human carbonyl reductase. *J Mol Biol* 244(5): 659-64.
- Bohren, K. M., J. P. von Wartburg and B. Wermuth (1987)**. Kinetics of carbonyl

- reductase from human brain. *Biochem J* 244(1): 165-71.
- Bomgaars, L., S. Gunawardena, S. E. Kelley and A. Ramu (1997).** The inactivation of doxorubicin by long ultraviolet light. *Cancer Chemother Pharmacol* 40(6): 506-12.
- Botella, J. A., J. K. Ulschmid, C. Gruenewald, C. Moehle, D. Kretzschmar, K. Becker and S. Schneuwly (2004).** The *Drosophila* carbonyl reductase sniffer prevents oxidative stress-induced neurodegeneration. *Curr Biol* 14(9): 782-6.
- Boucek, R. J., Jr., R. D. Olson, D. E. Brenner, E. M. Ogunbunmi, M. Inui and S. Fleischer (1987).** The major metabolite of doxorubicin is a potent inhibitor of membrane-associated ion pumps. A correlative study of cardiac muscle with isolated membrane fractions. *J Biol Chem* 262(33): 15851-6.
- Boven, E., J. de Jong, C. M. Kuiper, A. Bast and W. J. van der Vijgh (1996).** Relationship between the tumour tissue pharmacokinetics and the antiproliferative effects of anthracyclines and their metabolites. *Eur J Cancer* 32A(8): 1382-7.
- Brazzotto, X., M. Andriollo, P. Guiraud, A. Favier and J. M. Moulis (2003).** Interactions between doxorubicin and the human iron regulatory system. *Biochim Biophys Acta* 1593(2-3): 209-18.
- Briggs, M. R., J. T. Kadonaga, S. P. Bell and R. Tjian (1986).** Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* 234(4772): 47-52.
- Brockmann, R., A. Beyer, J. J. Heinisch and T. Wilhelm (2007).** Posttranscriptional Expression Regulation: What Determines Translation Rates? *PLoS Comput Biol* 3(3): e57.
- Brozic, P., B. Golob, N. Gomboc, T. L. Rizner and S. Gobec (2006).** Cinnamic acids as new inhibitors of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (AKR1C3). *Mol Cell Endocrinol* 248(1-2): 233-5.
- Cao, D., S. T. Fan and S. S. Chung (1998).** Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J Biol Chem* 273(19): 11429-35.
- Capranico, G., F. Zunino, K. W. Kohn and Y. Pommier (1990).** Sequence-selective topoisomerase II inhibition by anthracycline derivatives in SV40 DNA: relationship with DNA binding affinity and cytotoxicity. *Biochemistry* 29(2): 562-9.
- Cargill, M., D. Altshuler, J. Ireland, P. Sklar, K. Ardlie, N. Patil, N. Shaw, C. R. Lane, E. P. Lim, N. Kalyanaraman, J. Nemesh, L. Ziaugra, L. Friedland, A. Rolfe, J. Warrington, R. Lipshutz, G. Q. Daley and E. S. Lander (1999).** Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22(3):

- 231-8.
- Carl, W. (1986).** Oral manifestations of systemic chemotherapy and their management. *Semin Surg Oncol* 2(4): 187-99.
- Cartoni, A., P. Menna, E. Salvatorelli, D. Braghiroli, R. Giampietro, F. Animati, A. Urbani, P. Del Boccio and G. Minotti (2004).** Oxidative degradation of cardiotoxic anticancer anthracyclines to phthalic acids. Novel function of ferrylmyoglobin. *J Biol Chem* 279(7): 5088-99.
- Cece, R., S. Cazzaniga, D. Morelli, L. Sfondrini, M. Bignotto, S. Menard, M. I. Colnaghi and A. Balsari (1996).** Apoptosis of hair follicle cells during doxorubicin-induced alopecia in rats. *Lab Invest* 75(4): 601-9.
- Chang, B. K., D. E. Brenner and R. Gutman (1989).** Cellular pharmacology of doxorubicinol alone and combined with verapamil in pancreatic cancer cell lines. *Anticancer Res* 9(2): 341-5.
- Chang, W. H. (1992).** Reduced haloperidol: a factor in determining the therapeutic benefit of haloperidol treatment? *Psychopharmacology (Berl)* 106(3): 289-96.
- Chen, G., J. P. Jaffrezou, W. H. Fleming, G. E. Duran and B. I. Sikic (1994).** Prevalence of multidrug resistance related to activation of the *mdr1* gene in human sarcoma mutants derived by single-step doxorubicin selection. *Cancer Res* 54(18): 4980-7.
- Coley, H. M., P. R. Twentyman and P. Workman (1993).** The efflux of anthracyclines in multidrug-resistant cell lines. *Biochem Pharmacol* 46(8): 1317-26.
- Coller, J. and R. Parker (2005).** General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* 122(6): 875-86.
- Cortes, F. M. (1975).** Cardiology mediquiz. Case 8. *Med Times* 103(3): 164-168.
- Covarrubias, V. G., S. S. Lakhman, A. Forrest, M. V. Relling and J. G. Blanco (2006).** Higher activity of polymorphic NAD(P)H:quinone oxidoreductase in liver cytosols from blacks compared to whites. *Toxicol Lett* 164(3): 249-58.
- Crivori, P., B. Reinach, D. Pezzetta and I. Poggesi (2006).** Computational models for identifying potential P-glycoprotein substrates and inhibitors. *Mol Pharm* 3(1): 33-44.
- Crosas, B., D. J. Hyndman, O. Gallego, S. Martras, X. Pares, T. G. Flynn and J. Farres (2003).** Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism. *Biochem J* 373(Pt 3): 973-9.
- Cummings, J., L. Allan, N. Willmott, R. Riley, P. Workman and J. F. Smyth (1992).** The enzymology of doxorubicin quinone reduction in tumour tissue. *Biochem Pharmacol*

- 44(11): 2175-83.
- Cummings, J., N. Willmott, B. M. Hoey, E. S. Marley and J. F. Smyth (1992).** The consequences of doxorubicin quinone reduction in vivo in tumour tissue. *Biochem Pharmacol* 44(11): 2165-74.
- Cusack, B. J., B. Musser, H. Gambliel, N. E. Hadjokas and R. D. Olson (2003).** Effect of dexrazoxane on doxorubicin pharmacokinetics in young and old rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 51(2): 139-46.
- Cusack, B. J., S. P. Young, J. Driskell and R. D. Olson (1993).** Doxorubicin and doxorubicinol pharmacokinetics and tissue concentrations following bolus injection and continuous infusion of doxorubicin in the rabbit. *Cancer Chemother Pharmacol* 32(1): 53-8.
- Danesi, R., M. del Tacca, C. Bernardini and S. Penco (1987).** Exogenous doxorubicinol induces cardiotoxic effects in rats. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23(7): 907-13.
- Danesi, R., M. Del Tacca, P. Della Torre and C. Bernardini (1986).** General and cardiac toxicity of adriamycinol in rats. *Anticancer Res* 6(5): 967-72.
- Del Maestro, R., H. H. Thaw, J. Bjork, M. Planker and K. E. Arfors (1980).** Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand Suppl* 492: 43-57.
- Del Tacca, M., R. Danesi, M. Ducci, C. Bernardini and A. Romanini (1985).** Might adriamycinol contribute to adriamycin-induced cardiotoxicity? *Pharmacol Res Commun* 17(11): 1073-84.
- Deng, S., A. Kruger, A. L. Kleschyov, L. Kalinowski, A. Daiber and L. Wojnowski (2007).** Gp91phox-containing NAD(P)H oxidase increases superoxide formation by doxorubicin and NADPH. *Free Radic Biol Med* 42(4): 466-73.
- Desmond, J. C., J. C. Mountford, M. T. Drayson, E. A. Walker, M. Hewison, J. P. Ride, Q. T. Luong, R. E. Hayden, E. F. Vanin and C. M. Bunce (2003).** The aldo-keto reductase AKR1C3 is a novel suppressor of cell differentiation that provides a plausible target for the non-cyclooxygenase-dependent antineoplastic actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cancer Res* 63(2): 505-12.
- Dessypris, E. N., D. E. Brenner and K. R. Hande (1986).** Toxicity of doxorubicin metabolites to human marrow erythroid and myeloid progenitors in vitro. *Cancer Treat Rep* 70(4): 487-90.
- Di Marco, A., M. Gaetani and B. Scarpinato (1969).** Adriamycin (NSC-123,127): a new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemother Rep* 53(1): 33-7.
- Dikalov, S., P. Alov and D. Rangelova (1993).** Role of iron ion chelation by quinones in

- their reduction, OH-radical generation and lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 195(1): 113-9.
- Dikalov, S., U. Landmesser and D. G. Harrison (2002).** Geldanamycin leads to superoxide formation by enzymatic and non-enzymatic redox cycling. Implications for studies of Hsp90 and endothelial cell nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 277(28): 25480-5.
- Dobbs, N. A., C. J. Twelves, H. Gillies, C. A. James, P. G. Harper and R. D. Rubens (1995).** Gender affects doxorubicin pharmacokinetics in patients with normal liver biochemistry. *Cancer Chemother Pharmacol* 36(6): 473-6.
- Dodion, P., A. L. Bernstein, B. M. Fox and N. R. Bachur (1987).** Loss of fluorescence by anthracycline antibiotics: effects of xanthine oxidase and identification of the nonfluorescent metabolites. *Cancer Res* 47(4): 1036-9.
- Dorr, R. T., N. G. Shipp and K. M. Lee (1991).** Comparison of cytotoxicity in heart cells and tumor cells exposed to DNA intercalating agents in vitro. *Anticancer Drugs* 2(1): 27-33.
- Duffy, D. L., G. W. Montgomery, W. Chen, Z. Z. Zhao, L. Le, M. R. James, N. K. Hayward, N. G. Martin and R. A. Sturm (2007).** A three-single-nucleotide polymorphism haplotype in intron 1 of OCA2 explains most human eye-color variation. *Am J Hum Genet* 80(2): 241-52.
- Edwards, Y. H. (1990).** CpG islands in genes showing tissue-specific expression. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 326(1235): 207-15.
- Espey, L. L., S. Yoshioka, D. Russell, T. Ujioka, B. Vladu, M. Skelsey, S. Fujii, H. Okamura and J. S. Richards (2000).** Characterization of ovarian carbonyl reductase gene expression during ovulation in the gonadotropin-primed immature Rat. *Biol Reprod* 62(2): 390-7.
- Facchinetti, T., A. Mantovani, L. Cantoni, R. Cantoni and M. Salmona (1978).** Intercalation with DNA is a prerequisite for daunomycin, adriamycin and its congeners in inhibiting DNAase I. *Chem Biol Interact* 20(1): 97-102.
- Fargher, E. A., K. Tricker, W. Newman, R. Elliott, S. A. Roberts, J. L. Shaffer, I. Bruce and K. Payne (2007).** Current use of pharmacogenetic testing: a national survey of thiopurine methyltransferase testing prior to azathioprine prescription. *J Clin Pharm Ther* 32(2): 187-95.
- Felsted, R. L. and N. R. Bachur (1980).** Mammalian carbonyl reductases. *Drug Metab Rev* 11(1): 1-60.
- Ferguson, R. E., H. P. Carroll, A. Harris, E. R. Maher, P. J. Selby and R. E. Banks**

- (2005). Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics* 5(2): 566-71.
- Foglesong, P. D., C. Reckord and S. Swink (1992).** Doxorubicin inhibits human DNA topoisomerase I. *Cancer Chemother Pharmacol* 30(2): 123-5.
- Forrest, G. L. and B. Gonzalez (2000).** Carbonyl reductase. *Chem Biol Interact* 129(1-2): 21-40.
- Forrest, G. L., B. Gonzalez, W. Tseng, X. Li and J. Mann (2000).** Human carbonyl reductase overexpression in the heart advances the development of doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. *Cancer Res* 60(18): 5158-64.
- Forrest, G. L., S. Akman, J. Doroshov, H. Rivera and W. D. Kaplan (1991).** Genomic sequence and expression of a cloned human carbonyl reductase gene with daunorubicin reductase activity. *Mol Pharmacol* 40(4): 502-7.
- Foss, D. L., M. J. Baarsch and M. P. Murtaugh (1998).** Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim Biotechnol* 9(1): 67-78.
- Frederick, C. A., L. D. Williams, G. Ughetto, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich and A. H. Wang (1990).** Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry* 29(10): 2538-49.
- Friedman, M. A., M. J. Bozdech, M. E. Billingham and A. K. Rider (1978).** Doxorubicin cardiotoxicity. Serial endomyocardial biopsies and systolic time intervals. *Jama* 240(15): 1603-6.
- Fujii, J., Y. Iuchi and F. Okada (2005).** Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod Biol Endocrinol* 3: 43.
- Fukumoto, S., N. Yamauchi, H. Moriguchi, Y. Hippo, A. Watanabe, J. Shibahara, H. Taniguchi, S. Ishikawa, H. Ito, S. Yamamoto, H. Iwanari, M. Hironaka, Y. Ishikawa, T. Niki, Y. Sohara, T. Kodama, M. Nishimura, M. Fukayama, H. Dosaka-Akita and H. Aburatani (2005).** Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 11(5): 1776-85.
- Gewirtz, D. A. (1999).** A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57(7): 727-41.
- Gianni, L., J. L. Zweier, A. Levy and C. E. Myers (1985).** Characterization of the cycle of

- iron-mediated electron transfer from Adriamycin to molecular oxygen. *J Biol Chem* 260(11): 6820-6.
- Gianni, L., L. Vigano, A. Locatelli, G. Capri, A. Giani, E. Tarenzi and G. Bonadonna (1997).** Human pharmacokinetic characterization and in vitro study of the interaction between doxorubicin and paclitaxel in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 15(5): 1906-15.
- Gianni, L., L. Vigano, A. Surbone, D. Ballinari, P. Casali, C. Tarella, J. M. Collins and G. Bonadonna (1990).** Pharmacology and clinical toxicity of 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin: an example of successful application of pharmacokinetics to dose escalation in phase I trials. *J Natl Cancer Inst* 82(6): 469-77.
- Gianni, L., P. Dombernowsky, G. Sledge, M. Martin, D. Amadori, S. G. Arbuck, P. Ravdin, M. Brown, M. Messina, D. Tuck, C. Weil and B. Winograd (2001).** Cardiac function following combination therapy with paclitaxel and doxorubicin: an analysis of 657 women with advanced breast cancer. *Ann Oncol* 12(8): 1067-73.
- Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002).** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82(2): 373-428.
- Gobec, S., P. Brozic and T. L. Rizner (2005).** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and their analogues as inhibitors of aldo-keto reductase AKR1C3: new lead compounds for the development of anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* 15(23): 5170-5.
- Gonzalez-Covarrubias, V., D. Ghosh, S. S. Lakhman, L. Pendyala and J. G. Blanco (2007).** A functional genetic polymorphism on human carbonyl reductase 1 (CBR1) impacts on catalytic activity and NADPH binding affinity. *Drug Metab Dispos*.
- Greenbaum, D., C. Colangelo, K. Williams and M. Gerstein (2003).** Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol* 4(9): 117.
- Greenbaum, D., R. Jansen and M. Gerstein (2002).** Analysis of mRNA expression and protein abundance data: an approach for the comparison of the enrichment of features in the cellular population of proteins and transcripts. *Bioinformatics* 18(4): 585-96.
- Grenier, M. A. and S. E. Lipshultz (1998).** Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children and adults. *Semin Oncol* 25(4 Suppl 10): 72-85.
- Grimshaw, C. E. and E. J. Mathur (1989).** Immunoquantitation of aldose reductase in human tissues. *Anal Biochem* 176(1): 66-71.
- Gutierrez, P. L. and N. R. Bachur (1983).** Free radicals in quinone containing antitumor agents. The nature of the diaziquone (3,6,-diaziridinyl-2,5-bis(carboethoxyamino)-1,4-benzoquinone) free radical. *Biochim Biophys Acta* 758(1): 37-41.

- Guttmacher, A. E. and F. S. Collins (2002).** Genomic medicine--a primer. *N Engl J Med* 347(19): 1512-20.
- Haberl, M., B. Anwald, K. Klein, R. Weil, C. Fuss, A. Gepdiremen, U. M. Zanger, U. A. Meyer and L. Wojnowski (2005).** Three haplotypes associated with CYP2A6 phenotypes in Caucasians. *Pharmacogenet Genomics* 15(9): 609-24.
- Halliwell, B. (1989).** Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br J Exp Pathol* 70(6): 737-57.
- Halliwell, B. and C. E. Cross (1994).** Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 10: 5-12.
- Hara, A., K. Matsuura, Y. Tamada, K. Sato, Y. Miyabe, Y. Deyashiki and N. Ishida (1996).** Relationship of human liver dihydrodiol dehydrogenases to hepatic bile-acid-binding protein and an oxidoreductase of human colon cells. *Biochem J* 313 ( Pt 2): 373-6.
- Hasegawa, Y., Y. Ando and K. Shimokata (2006).** Screening for adverse reactions to irinotecan treatment using the Invader UGT1A1 Molecular Assay. *Expert Rev Mol Diagn* 6(4): 527-33.
- Hasegawa, Y., Y. Ando, M. Ando, N. Hashimoto, K. Imaizumi and K. Shimokata (2006).** Pharmacogenetic approach for cancer treatment-tailored medicine in practice. *Ann N Y Acad Sci* 1086: 223-32.
- Hayes, J. D., D. J. Judah and G. E. Neal (1993).** Resistance to aflatoxin B1 is associated with the expression of a novel aldo-keto reductase which has catalytic activity towards a cytotoxic aldehyde-containing metabolite of the toxin. *Cancer Res* 53(17): 3887-94.
- Henderson, I. C., J. C. Allegra, T. Woodcock, S. Wolff, S. Bryan, K. Cartwright, G. Dukart and D. Henry (1989).** Randomized clinical trial comparing mitoxantrone with doxorubicin in previously treated patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 7(5): 560-71.
- Hermans, J. J. and H. H. Thijssen (1992).** Stereoselective acetyl side chain reduction of warfarin and analogs. Partial characterization of two cytosolic carbonyl reductases. *Drug Metab Dispos* 20(2): 268-74.
- Hewick, D. S. and T. A. Moreland (1975).** Proceedings: An NADPH dependent warfarin reductase in human and rat liver and kidney soluble fraction. *Br J Pharmacol* 53(3): 441.
- Higuchi, T., Y. Imamura and M. Otagiri (1993).** Kinetic studies on the reduction of acetohexamide catalyzed by carbonyl reductase from rabbit kidney. *Biochim Biophys*



- Acta 1158(1): 23-8.
- Hoffmann, F. and E. Maser (2007).** Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily. *Drug Metab Rev* 39(1): 87-144.
- Holmberg, S. R. and A. J. Williams (1990).** Patterns of interaction between anthraquinone drugs and the calcium-release channel from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ Res* 67(2): 272-83.
- Hulhoven, R. and J. P. Desager (1976).** Quantitative determination of low levels of daunomycin and daunomycinol in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 125(1): 369-74.
- Hurteloup, P. and F. Ganzina (1986).** Clinical studies with new anthracyclines: epirubicin, idarubicin, esorubicin. *Drugs Exp Clin Res* 12(1-3): 233-46.
- Hwang, Y. C., M. Kaneko, S. Bakr, H. Liao, Y. Lu, E. R. Lewis, S. Yan, S. Ii, M. Itakura, L. Rui, H. Skopicki, S. Homma, A. M. Schmidt, P. J. Oates, M. Szabolcs and R. Ramasamy (2004).** Central role for aldose reductase pathway in myocardial ischemic injury. *Faseb J* 18(11): 1192-9.
- Hyndman, D. and T. G. Flynn (1999).** The aldo-keto reductases and their role in cancer. *Adv Exp Med Biol* 463: 427-34.
- Iffert, T., M. Soldan, A. Moeller and E. Maser (2000).** Modulation of daunorubicin toxicity by liposomal encapsulation and use of specific inhibitors in vitro. *Toxicology* 144(1-3): 189-95.
- Ikeda, M., H. Hattori and S. Ohmori (1984).** Properties of NADPH-dependent carbonyl reductases in rat liver cytosol. *Biochem Pharmacol* 33(24): 3957-61.
- Imamura, Y., T. Higuchi and M. Otagiri (1993).** Chemical modification of histidine residue in substrate-binding domain of carbonyl reductase from rabbit kidney. *Biochem Mol Biol Int* 31(6): 1105-10.
- Imamura, Y., T. Higuchi, Y. Nozaki, E. Sugino, S. Hibino and M. Otagiri (1993).** Purification and properties of carbonyl reductase from rabbit kidney. *Arch Biochem Biophys* 300(2): 570-6.
- Innocenti, F. and M. J. Ratain (2006).** Pharmacogenetics of irinotecan: clinical perspectives on the utility of genotyping. *Pharmacogenomics* 7(8): 1211-21.
- Inoue, H., H. Nojima and H. Okayama (1990).** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1): 23-8.
- Jensen, B. V., T. Skovgaard and S. L. Nielsen (2002).** Functional monitoring of

- anthracycline cardiotoxicity: a prospective, blinded, long-term observational study of outcome in 120 patients. *Ann Oncol* 13(5): 699-709.
- Jez, J. M. and T. M. Penning (2001).** The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem Biol Interact* 130-132(1-3): 499-525.
- Jez, J. M., M. J. Bennett, B. P. Schlegel, M. Lewis and T. M. Penning (1997).** Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem J* 326 ( Pt 3): 625-36.
- Jez, J. M., T. G. Flynn and T. M. Penning (1997).** A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem Pharmacol* 54(6): 639-47.
- Jones, A. P. and S. M. Crawford (1989).** Anthracycline-induced toxicity affecting palmar and plantar skin. *Br J Cancer* 59(5): 814.
- Kamdern, L. K., I. Meineke, I. Koch, U. M. Zanger, J. Brockmoller and L. Wojnowski (2004).** Limited contribution of CYP3A5 to the hepatic 6beta-hydroxylation of testosterone. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370(1): 71-7.
- Kaminsky, L. S. and Z. Y. Zhang (1997).** Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol Ther* 73(1): 67-74.
- Kang, W. and M. Weiss (2001).** Influence of P-glycoprotein modulators on cardiac uptake, metabolism, and effects of idarubicin. *Pharm Res* 18(11): 1535-41.
- Kang, W. and M. Weiss (2003).** Kinetic analysis of saturable myocardial uptake of idarubicin in rat heart: effect of doxorubicin and hypothermia. *Pharm Res* 20(1): 58-63.
- Kang, W. and M. Weiss (2003).** Modeling the metabolism of idarubicin to idarubicinol in rat heart: effect of rutin and phenobarbital. *Drug Metab Dispos* 31(4): 462-8.
- Kasahara, K., K. Shibata, T. Bando, Y. Numata, M. Fujimura and T. Matsuda (1994).** DT-diaphorase as a determinant of sensitivity to adriamycin in non-small-cell lung-cancer cell lines. *Int J Cancer* 59(2): 204-7.
- Kehrer, J. P. (2000).** The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149(1): 43-50.
- Kelly, V. P., P. J. Sherratt, D. H. Crouch and J. D. Hayes (2002).** Novel homodimeric and heterodimeric rat gamma-hydroxybutyrate synthases that associate with the Golgi apparatus define a distinct subclass of aldo-keto reductase 7 family proteins. *Biochem J* 366(Pt 3): 847-61.
- Kimchi-Sarfaty, C., J. M. Oh, I. W. Kim, Z. E. Sauna, A. M. Calcagno, S. V. Ambudkar and M. M. Gottesman (2007).** A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes

- substrate specificity. *Science* 315(5811): 525-8.
- Knight, L. P., T. Primiano, J. D. Groopman, T. W. Kensler and T. R. Sutter (1999).** cDNA cloning, expression and activity of a second human aflatoxin B1-metabolizing member of the aldo-keto reductase superfamily, AKR7A3. *Carcinogenesis* 20(7): 1215-23.
- Koch, I., R. Weil, R. Wolbold, J. Brockmoller, E. Hustert, O. Burk, A. Nuessler, P. Neuhaus, M. Eichelbaum, U. Zanger and L. Wojnowski (2002).** Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos* 30(10): 1108-14.
- Komoto, J., T. Yamada, K. Watanabe and F. Takusagawa (2004).** Crystal structure of human prostaglandin F synthase (AKR1C3). *Biochemistry* 43(8): 2188-98.
- Kotlar, D. and Y. Lavner (2006).** The action of selection on codon bias in the human genome is related to frequency, complexity, and chronology of amino acids. *BMC Genomics* 7: 67.
- Krischer, J. P., S. Epstein, D. D. Cuthbertson, A. M. Goorin, M. L. Epstein and S. E. Lipshultz (1997).** Clinical cardiotoxicity following anthracycline treatment for childhood cancer: the Pediatric Oncology Group experience. *J Clin Oncol* 15(4): 1544-52.
- Krook, M., D. Ghosh, R. Stromberg, M. Carlquist and H. Jornvall (1993).** Carboxyethyllysine in a protein: native carbonyl reductase/NADP(+)-dependent prostaglandin dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(2): 502-6.
- Kuffel, M. J. and M. M. Ames (1995).** Comparative resistance of idarubicin, doxorubicin and their C-13 alcohol metabolites in human MDR1 transfected NIH-3T3 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 36(3): 223-6.
- Kuffel, M. J., J. M. Reid and M. M. Ames (1992).** Anthracyclines and their C-13 alcohol metabolites: growth inhibition and DNA damage following incubation with human tumor cells in culture. *Cancer Chemother Pharmacol* 30(1): 51-7.
- Kwok, J. C. and D. R. Richardson (2002).** Unexpected anthracycline-mediated alterations in iron-regulatory protein-RNA-binding activity: the iron and copper complexes of anthracyclines decrease RNA-binding activity. *Mol Pharmacol* 62(4): 888-900.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.
- Lakhman, S. S., D. Ghosh and J. G. Blanco (2005).** Functional significance of a natural allelic variant of human carbonyl reductase 3 (CBR3). *Drug Metab Dispos* 33(2): 254-

7.

- Lakhman, S. S., X. Chen, V. M. Gonzalez-Covarrubias, E. G. Schuetz and J. G. Blanco (2007).** "Functional characterization of the promoter of human carbonyl reductase 1 (CBR1). Role of XRE elements in mediating induction of CBR1 by ligands of the aryl hydrocarbon receptor." *Mol Pharmacol*.
- Lazarowski, A. J., H. J. Garcia Rivello, G. L. Vera Janavel, L. A. Cuniberti, P. M. Cabeza Meckert, G. G. Yannarelli, A. Mele, A. J. Crottogini and R. P. Laguens (2005).** Cardiomyocytes of chronically ischemic pig hearts express the MDR-1 gene-encoded P-glycoprotein. *J Histochem Cytochem* 53(7): 845-50.
- Lee, K. W., B. C. Ko, Z. Jiang, D. Cao and S. S. Chung (2001).** "Overexpression of aldose reductase in liver cancers may contribute to drug resistance." *Anticancer Drugs* 12(2): 129-32.
- Lefrak, E. A., J. Pitha, S. Rosenheim and J. A. Gottlieb (1973).** A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer* 32(2): 302-14.
- Leibman, K.C.(1971)** Reduction of ketones in liver cytosol. *Xenobiotica*, 1(1): p. 97-104.
- Licata, S., A. Saponiero, A. Mordente and G. Minotti (2000).** Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chem Res Toxicol* 13(5): 414-20.
- Lin, H. K., J. M. Jez, B. P. Schlegel, D. M. Peehl, J. A. Pachter and T. M. Penning (1997).** Expression and characterization of recombinant type 2 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) from human prostate: demonstration of bifunctional 3 alpha/17 beta-HSD activity and cellular distribution. *Mol Endocrinol* 11(13): 1971-84.
- Lipshultz, S. E., S. D. Colan, R. D. Gelber, A. R. Perez-Atayde, S. E. Sallan and S. P. Sanders (1991).** Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med* 324(12): 808-15.
- Lopez de Cerain, A., A. Marin, M. A. Idoate, M. T. Tunon and J. Bello (1999).** Carbonyl reductase and NADPH cytochrome P450 reductase activities in human tumoral versus normal tissues. *Eur J Cancer* 35(2): 320-4.
- Love, R. R., H. Leventhal, D. V. Easterling and D. R. Nerenz (1989).** Side effects and emotional distress during cancer chemotherapy. *Cancer* 63(3): 604-12.
- Lovless, H., E. Arena, R. L. Felsted and N. R. Bachur (1978).** Comparative mammalian metabolism of adriamycin and daunorubicin. *Cancer Res* 38(3): 593-8.
- Lown, J. W., H. H. Chen, J. A. Plambeck and E. M. Acton (1982).** Further studies on the generation of reactive oxygen species from activated anthracyclines and the

- relationship to cytotoxic action and cardiotoxic effects. *Biochem Pharmacol* 31(4): 575-81.
- Maitland, M. L., A. DiRienzo and M. J. Ratain (2006).** Interpreting disparate responses to cancer therapy: the role of human population genetics. *J Clin Oncol* 24(14): 2151-7.
- Maitland, M. L., K. Vasisht and M. J. Ratain (2006).** TPMT, UGT1A1 and DPYD: genotyping to ensure safer cancer therapy? *Trends Pharmacol Sci* 27(8): 432-7.
- Mankhetkorn, S. and A. Garnier-Suillerot (1998).** The ability of verapamil to restore intracellular accumulation of anthracyclines in multidrug resistant cells depends on the kinetics of their uptake. *Eur J Pharmacol* 343(2-3): 313-21.
- Marsh, S. (2007).** Impact of pharmacogenomics on clinical practice in oncology. *Mol Diagn Ther* 11(2): 79-82.
- Marsh, S. and H. L. McLeod (2006).** Pharmacogenomics: from bedside to clinical practice. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 1: R89-93.
- Marsh, S., D. J. Van Booven and H. L. McLeod (2006).** Global pharmacogenetics: giving the genome to the masses. *Pharmacogenomics* 7(4): 625-31.
- Maser, E. (2006).** Neuroprotective role for carbonyl reductase? *Biochem Biophys Res Commun* 340(4): 1019-22.
- Mata, J., S. Marguerat and J. Bahler (2005).** Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends Biochem Sci* 30(9): 506-14.
- Matsunaga, T., S. Shintani and A. Hara (2006).** Multiplicity of mammalian reductases for xenobiotic carbonyl compounds. *Drug Metab Pharmacokinet* 21(1): 1-18.
- McLeod, H. L., S. Coulthard, A. E. Thomas, S. C. Pritchard, D. J. King, S. M. Richards, O. B. Eden, A. G. Hall and B. E. Gibson (1999).** Analysis of thiopurine methyltransferase variant alleles in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 105(3): 696-700.
- Meissner, K., B. Heydrich, G. Jedlitschky, H. Meyer Zu Schwabedissen, I. Mosyagin, P. Dazert, L. Eckel, S. Vogelgesang, R. W. Warzok, M. Bohm, C. Lehmann, M. Wendt, I. Cascorbi and H. K. Kroemer (2006).** The ATP-binding cassette transporter ABCG2 (BCRP), a marker for side population stem cells, is expressed in human heart. *J Histochem Cytochem* 54(2): 215-21.
- Meissner, K., B. Sperker, C. Karsten, H. M. Zu Schwabedissen, U. Seeland, M. Bohm, S. Bien, P. Dazert, C. Kunert-Keil, S. Vogelgesang, R. Warzok, W. Siegmund, I. Cascorbi, M. Wendt and H. K. Kroemer (2002).** Expression and localization of P-glycoprotein in human heart: effects of cardiomyopathy. *J Histochem Cytochem*

- 50(10): 1351-6.
- Menna, P., E. Salvatorelli, R. Giampietro, G. Liberi, G. Teodori, A. M. Calafiore and G. Minotti (2002).** Doxorubicin-dependent reduction of ferrylmyoglobin and inhibition of lipid peroxidation: implications for cardiotoxicity of anticancer anthracyclines. *Chem Res Toxicol* 15(9): 1179-89.
- Menna, P., G. Minotti and E. Salvatorelli (2007).** In vitro modeling of the structure-activity determinants of anthracycline cardiotoxicity. *Cell Biol Toxicol* 23(1): 49-62.
- Minotti, G., A. F. Cavaliere, A. Mordente, M. Rossi, R. Schiavello, R. Zamparelli and G. Possati (1995).** Secondary alcohol metabolites mediate iron delocalization in cytosolic fractions of myocardial biopsies exposed to anticancer anthracyclines. Novel linkage between anthracycline metabolism and iron-induced cardiotoxicity. *J Clin Invest* 95(4): 1595-605.
- Minotti, G., A. Saponiero, S. Licata, P. Menna, A. M. Calafiore, G. Teodori and L. Gianni (2001).** Paclitaxel and docetaxel enhance the metabolism of doxorubicin to toxic species in human myocardium. *Clin Cancer Res* 7(6): 1511-5.
- Minotti, G., G. Cairo and E. Monti (1999).** Role of iron in anthracycline cardiotoxicity: new tunes for an old song? *Faseb J* 13(2): 199-212.
- Minotti, G., S. Licata, A. Saponiero, P. Menna, A. M. Calafiore, G. Di Giammarco, G. Liberi, F. Animati, A. Cipollone, S. Manzini and C. A. Maggi (2000).** Anthracycline metabolism and toxicity in human myocardium: comparisons between doxorubicin, epirubicin, and a novel disaccharide analogue with a reduced level of formation and [4Fe-4S] reactivity of its secondary alcohol metabolite. *Chem Res Toxicol* 13(12): 1336-41.
- Minotti, G., S. Recalcati, A. Mordente, G. Liberi, A. M. Calafiore, C. Mancuso, P. Preziosi and G. Cairo (1998).** The secondary alcohol metabolite of doxorubicin irreversibly inactivates aconitase/iron regulatory protein-1 in cytosolic fractions from human myocardium. *Faseb J* 12(7): 541-52.
- Minotti, G., S. Recalcati, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Corna and G. Cairo (2004).** Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms. *Methods Enzymol* 378: 340-61.
- Mitchell, P. J., C. Wang and R. Tjian (1987).** Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen. *Cell* 50(6): 847-61.
- Molowa, D. T., A. G. Shayne and P. S. Guzelian (1986).** Purification and characterization

- of chlordecone reductase from human liver. *J Biol Chem* 261(27): 12624-7.
- Moore, L., E. J. Landon and D. A. Cooney (1977).** Inhibition of the cardiac mitochondrial calcium pump by adriamycin in vitro. *Biochem Med* 18(2): 131-8.
- Mordente, A., G. Minotti, G. E. Martorana, A. Silvestrini, B. Giardina and E. Meucci (2003).** Anthracycline secondary alcohol metabolite formation in human or rabbit heart: biochemical aspects and pharmacologic implications. *Biochem Pharmacol* 66(6): 989-98.
- Morel, A., M. Boisdron-Celle, L. Fey, P. Laine-Cessac and E. Gamelin (2007).** Identification of a novel mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene in a patient with a lethal outcome following 5-fluorouracil administration and the determination of its frequency in a population of 500 patients with colorectal carcinoma. *Clin Biochem* 40(1-2): 11-7.
- Morel, A., M. Boisdron-Celle, L. Fey, P. Soulie, M. C. Craipeau, S. Traore and E. Gamelin (2006).** Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance. *Mol Cancer Ther* 5(11): 2895-904.
- Moreland, T. A. and D. S. Hewick (1975).** Studies on a ketone reductase in human and rat liver and kidney soluble fraction using warfarin as a substrate. *Biochem Pharmacol* 24(21): 1953-7.
- Mross, K., P. Maessen, W. J. van der Vijgh, H. Gall, E. Boven and H. M. Pinedo (1988).** Pharmacokinetics and metabolism of epidoxorubicin and doxorubicin in humans. *J Clin Oncol* 6(3): 517-26.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-50.
- Mushlin, P. S., B. J. Cusack, R. J. Boucek, Jr., T. Andrejuk, X. Li and R. D. Olson (1993).** Time-related increases in cardiac concentrations of doxorubicinol could interact with doxorubicin to depress myocardial contractile function. *Br J Pharmacol* 110(3): 975-82.
- Nackley, A. G., S. A. Shabalina, I. E. Tchivileva, K. Satterfield, O. Korchynskiy, S. S. Makarov, W. Maixner and L. Diatchenko (2006).** Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* 314(5807): 1930-3.
- Nagaraj, N. S., S. Beckers, J. K. Mensah, S. Waigel, N. Vigneswaran and W. Zacharias (2006).** Cigarette smoke condensate induces cytochromes P450 and aldo-keto

- reductases in oral cancer cells. *Toxicol Lett* 165(2): 182-94.
- Nakajima, M., T. Yamamoto, K. Nunoya, T. Yokoi, K. Nagashima, K. Inoue, Y. Funae, N. Shimada, T. Kamataki and Y. Kuroiwa (1996).** Characterization of CYP2A6 involved in 3'-hydroxylation of cotinine in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 277(2): 1010-5.
- Nielsen, D., C. Maare and T. Skovsgaard (1996).** Cellular resistance to anthracyclines. *Gen Pharmacol* 27(2): 251-5.
- Nishizawa, M., T. Nakajima, K. Yasuda, H. Kanzaki, Y. Sasaguri, K. Watanabe and S. Ito (2000).** Close kinship of human 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene with three aldo-keto reductase genes. *Genes Cells* 5(2): 111-25.
- O'Connor, T., L. S. Ireland, D. J. Harrison and J. D. Hayes (1999).** Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Biochem J* 343 Pt 2: 487-504.
- Olson, H. M., D. M. Young, D. J. Prieur, A. F. LeRoy and R. L. Reagan (1974).** Electrolyte and morphologic alterations of myocardium in adriamycin-treated rabbits. *Am J Pathol* 77(3): 439-54.
- Olson, L. E., D. Bedja, S. J. Alvey, A. J. Cardounel, K. L. Gabrielson and R. H. Reeves (2003).** Protection from doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice with a null allele of carbonyl reductase 1. *Cancer Res* 63(20): 6602-6.
- Olson, R. D. and P. S. Mushlin (1990).** Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *Faseb J* 4(13): 3076-86.
- Olson, R. D., P. S. Mushlin, D. E. Brenner, S. Fleischer, B. J. Cusack, B. K. Chang and R. J. Boucek, Jr. (1988).** Doxorubicin cardiotoxicity may be caused by its metabolite, doxorubicinol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(10): 3585-9.
- Ozols, R. F., J. K. Willson, M. D. Wertz, K. R. Grotzinger, C. E. Myers and R. C. Young (1980).** Inhibition of human ovarian cancer colony formation by adriamycin and its major metabolites. *Cancer Res* 40(11): 4109-12.
- Palackal, N. T., S. H. Lee, R. G. Harvey, I. A. Blair and T. M. Penning (2002).** Activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiol proximate carcinogens by human aldo-keto reductase (AKR1C) enzymes and their functional overexpression in human lung carcinoma (A549) cells. *J Biol Chem* 277(27): 24799-808.
- Pang, E., Y. Hu, K. Y. Chan, P. B. Lai, J. A. Squire, P. F. Macgregor, B. Beheshti, M. Albert, T. W. Leung and N. Wong (2005).** Karyotypic imbalances and differential



- gene expressions in the acquired doxorubicin resistance of hepatocellular carcinoma cells. *Lab Invest* 85(5): 664-74.
- Patel, D. J. and L. L. Canuel (1978).** Anthracycline antitumor antibiotic nucleic-acid interactions. Structural aspects of the daunomycin poly(dA-dT) complex in solution. *Eur J Biochem* 90(2): 247-54.
- Patel, D. J., S. A. Kozlowski and J. A. Rice (1981).** Hydrogen bonding, overlap geometry, and sequence specificity in anthracycline antitumor antibiotic.DNA complexes in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(6): 3333-7.
- Penning, T. M. (2005).** AKR1B10: a new diagnostic marker of non-small cell lung carcinoma in smokers. *Clin Cancer Res* 11(5): 1687-90.
- Penning, T. M., M. E. Burczynski, J. M. Jez, C. F. Hung, H. K. Lin, H. Ma, M. Moore, N. Palackal and K. Ratnam (2000).** Human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem J* 351(Pt 1): 67-77.
- Penning, T. M., S. Steckelbroeck, D. R. Bauman, M. W. Miller, Y. Jin, D. M. Peehl, K. M. Fung and H. K. Lin (2006).** Aldo-keto reductase (AKR) 1C3: role in prostate disease and the development of specific inhibitors. *Mol Cell Endocrinol* 248(1-2): 182-91.
- Platel, D., S. Bonoron-Adele and J. Robert (2001).** Role of daunorubicinol in daunorubicin-induced cardiotoxicity as evaluated with the model of isolated perfused rat heart. *Pharmacol Toxicol* 88(5): 250-4.
- Plebuch, M., M. Soldan, C. Hungerer, L. Koch and E. Maser (2007).** "Increased resistance of tumor cells to daunorubicin after transfection of cDNAs coding for anthracycline inactivating enzymes." *Cancer Lett*.
- Porter, S. J., A. A. Somogyi and J. M. White (2002).** In vivo and in vitro potency studies of 6beta-naltrexol, the major human metabolite of naltrexone. *Addict Biol* 7(2): 219-25.
- Praga, C., G. Beretta, P. L. Vigo, G. R. Lenaz, C. Pollini, G. Bonadonna, R. Canetta, R. Castellani, E. Villa, C. G. Gallagher, H. von Melchner, M. Hayat, P. Ribaud, G. De Wasch, W. Mattsson, R. Heinz, R. Waldner, K. Kolaric, R. Buehner, W. Ten Bokkel-Huyninck, N. I. Perevodchikova, L. A. Manziuk, H. J. Senn and A. C. Mayr (1979).** Adriamycin cardiotoxicity: a survey of 1273 patients. *Cancer Treat Rep* 63(5): 827-34.
- Pratt, J. M., J. Petty, I. Riba-Garcia, D. H. Robertson, S. J. Gaskell, S. G. Oliver and R.**

- J. Beynon (2002).** Dynamics of protein turnover, a missing dimension in proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1(8): 579-91.
- Precup, J. and J. Parker (1987).** Missense misreading of asparagine codons as a function of codon identity and context. *J Biol Chem* 262(23): 11351-5.
- Propper, D. and E. Maser (1997).** Carbonyl reduction of daunorubicin in rabbit liver and heart. *Pharmacol Toxicol* 80(5): 240-5.
- Rajagopalan, S., P. M. Politi, B. K. Sinha and C. E. Myers (1988).** Adriamycin-induced free radical formation in the perfused rat heart: implications for cardiotoxicity. *Cancer Res* 48(17): 4766-9.
- Reinders, J. and A. Sickmann (2007)** Modificomics: Posttranslational modifications beyond protein phosphorylation and glycosylation. *Biomol Eng.*
- Relling, M. V., M. L. Hancock, G. K. Rivera, J. T. Sandlund, R. C. Ribeiro, E. Y. Krynetski, C. H. Pui and W. E. Evans (1999).** Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst* 91(23): 2001-8.
- Reszka, K. J., B. A. Wagner, L. M. Teesch, B. E. Britigan, D. R. Spitz and C. P. Burns (2005).** Inactivation of anthracyclines by cellular peroxidase. *Cancer Res* 65(14): 6346-53.
- Reszka, K. J., L. H. Britigan and B. E. Britigan (2005).** Oxidation of anthracyclines by peroxidase metabolites of salicylic Acid. *J Pharmacol Exp Ther* 315(1): 283-90.
- Robert, J. and L. Gianni (1993).** Pharmacokinetics and metabolism of anthracyclines. *Cancer Surv* 17: 219-52.
- Rosemond, M. J. and J. S. Walsh (2004).** Human carbonyl reduction pathways and a strategy for their study in vitro. *Drug Metab Rev* 36(2): 335-61.
- Rossini, L., E. Monti, D. Cova and F. Piccinini (1986).** Determination of doxorubicin and doxorubicin-3-ol in rat heart. *Arch Toxicol Suppl* 9: 474-8.
- Sacco, G., R. Giampietro, E. Salvatorelli, P. Menna, N. Bertani, G. Graiani, F. Animati, C. Goso, C. A. Maggi, S. Manzini and G. Minotti (2003).** Chronic cardiotoxicity of anticancer anthracyclines in the rat: role of secondary metabolites and reduced toxicity by a novel anthracycline with impaired metabolite formation and reactivity. *Br J Pharmacol* 139(3): 641-51.
- Sadzuka, Y., T. Sugiyama and S. Hirota (1998).** Modulation of cancer chemotherapy by green tea. *Clin Cancer Res* 4(1): 153-6.
- Sadzuka, Y., T. Sugiyama and T. Sonobe (2000).** Efficacies of tea components on

- doxorubicin induced antitumor activity and reversal of multidrug resistance. *Toxicol Lett* 114(1-3): 155-62.
- Sadzuka, Y., Y. Yamashita and T. Sonobe (2002).** Effects of glutamate transporter inhibitors on the antitumor activity of doxorubicin. *Clin Cancer Res* 8(12): 3943-7.
- Salvatorelli, E., P. Menna, L. Gianni and G. Minotti (2007).** Defective taxane stimulation of epirubicinol formation in the human heart: insight into the cardiac tolerability of epirubicin-taxane chemotherapies. *J Pharmacol Exp Ther* 320(2): 790-800.
- Salvatorelli, E., P. Menna, S. Cascegnà, G. Liberi, A. M. Calafiore, L. Gianni and G. Minotti (2006).** Paclitaxel and docetaxel stimulation of doxorubicinol formation in the human heart: implications for cardiotoxicity of doxorubicin-taxane chemotherapies. *J Pharmacol Exp Ther* 318(1): 424-33.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989).** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour, New York 2nd edition.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.
- Schaller, M., M. Schaffhauser, N. Sans and B. Wermuth (1999).** Cloning and expression of succinic semialdehyde reductase from human brain. Identity with aflatoxin B1 aldehyde reductase. *Eur J Biochem* 265(3): 1056-60.
- Scheet, P. and M. Stephens (2006).** A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. *Am J Hum Genet* 78(4): 629-44.
- Schmittgen, T. D. and B. A. Zakrajsek (2000).** Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 46(1-2): 69-81.
- Schmook, T., U. Jacobi, J. Lademann, M. Worm and E. Stockfleth (2005).** Detection of doxorubicin in the horny layer in a patient suffering from palmar-plantar erythrodysesthesia. *Dermatology* 210(3): 237-8.
- Schott, B. and J. Robert (1989).** Comparative activity of anthracycline 13-dihydrometabolites against rat glioblastoma cells in culture. *Biochem Pharmacol* 38(22): 4069-74.
- Schroterova, L., H. Kaiserova, V. Baliharova, J. Velik, V. Gersl and E. Kvasnickova (2004).** The effect of new lipophilic chelators on the activities of cytosolic reductases and P450 cytochromes involved in the metabolism of anthracycline antibiotics: studies in vitro. *Physiol Res* 53(6): 683-91.

- Scuric, Z., S. C. Stain, W. F. Anderson and J. J. Hwang (1998).** New member of aldose reductase family proteins overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 27(4): 943-50.
- Selleri, S., H. Seltmann, S. Gariboldi, Y. F. Shirai, A. Balsari, C. C. Zouboulis and C. Rumio (2006).** Doxorubicin-induced alopecia is associated with sebaceous gland degeneration. *J Invest Dermatol* 126(4): 711-20.
- Sgraja, T., J. Ulschmid, K. Becker, S. Schneuwly, G. Klebe, K. Reuter and A. Heine (2004).** Structural insights into the neuroprotective-acting carbonyl reductase Sniffer of *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol* 342(5): 1613-24.
- Shadle, S. E., B. P. Bammel, B. J. Cusack, R. A. Knighton, S. J. Olson, P. S. Mushlin and R. D. Olson (2000).** Daunorubicin cardiotoxicity: evidence for the importance of the quinone moiety in a free-radical-independent mechanism. *Biochem Pharmacol* 60(10): 1435-44.
- Shan, K., A. M. Lincoff and J. B. Young (1996).** Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Ann Intern Med* 125(1): 47-58.
- Sheth, U. and R. Parker (2003).** Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300(5620): 805-8.
- Silvestrini, A., E. Meucci, A. Vitali, B. Giardina and A. Mordente (2006).** Chalcone inhibition of anthracycline secondary alcohol metabolite formation in rabbit and human heart cytosol. *Chem Res Toxicol* 19(11): 1518-24.
- Slupe, A., B. Williams, C. Larson, L. M. Lee, T. Primbs, A. J. Bruesch, C. Bjorklund, D. L. Warner, J. Peloquin, S. E. Shadle, H. A. Gambliel, B. J. Cusack, R. D. Olson and H. A. Charlier, Jr. (2005).** Reduction of 13-deoxydoxorubicin and daunorubicinol anthraquinones by human carbonyl reductase. *Cardiovasc Toxicol* 5(4): 365-76.
- Solbach, T. F., J. Konig, M. F. Fromm and O. Zolk (2006).** ATP-binding cassette transporters in the heart. *Trends Cardiovasc Med* 16(1): 7-15.
- Soldan, M., K. J. Netter and E. Maser (1996).** Induction of daunorubicin carbonyl reducing enzymes by daunorubicin in sensitive and resistant pancreas carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 51(2): 117-23.
- Spycher, S. E., S. Tabataba-Vakili, V. B. O'Donnell, L. Palomba and A. Azzi (1997).** Aldose reductase induction: a novel response to oxidative stress of smooth muscle cells. *Faseb J* 11(2): 181-8.
- Stanulla, M., E. Schaeffeler, T. Flohr, G. Cario, A. Schrauder, M. Zimmermann, K.**

- Welte, W. D. Ludwig, C. R. Bartram, U. M. Zanger, M. Eichelbaum, M. Schrappe and M. Schwab (2005).** Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Jama* 293(12): 1485-9.
- Steinberg, J. S. and A. G. Wasserman (1985).** Radionuclide ventriculography for evaluation and prevention of doxorubicin cardiotoxicity. *Clin Ther* 7(6): 660-7.
- Steinherz, L. J., P. G. Steinherz, C. T. Tan, G. Heller and M. L. Murphy (1991).** Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy. *Jama* 266(12): 1672-7.
- Stewart, D. J., D. Grewaal, R. M. Green, N. Mikhael, R. Goel, V. A. Montpetit and M. D. Redmond (1993).** Concentrations of doxorubicin and its metabolites in human autopsy heart and other tissues. *Anticancer Res* 13(6A): 1945-52.
- Sugiyama, T. and Y. Sadzuka (2004).** Theanine, a specific glutamate derivative in green tea, reduces the adverse reactions of doxorubicin by changing the glutathione level. *Cancer Lett* 212(2): 177-84.
- Sugiyama, T., Y. Sadzuka, K. Tanaka and T. Sonobe (2001).** Inhibition of glutamate transporter by theanine enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin. *Toxicol Lett* 121(2): 89-96.
- Suto, K., H. Kajihara-Kano, Y. Yokoyama, M. Hayakari, J. Kimura, T. Kumano, T. Takahata, H. Kudo and S. Tsuchida (1999).** Decreased expression of the peroxisomal bifunctional enzyme and carbonyl reductase in human hepatocellular carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 125(2): 83-8.
- Suzuki, Y. J. and G. D. Ford (1999).** Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol* 31(2): 345-53.
- Swain, S. M., F. S. Whaley and M. S. Ewer (2003).** Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer* 97(11): 2869-79.
- Takahashi, H. and H. Echizen (2001).** Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 40(8): 587-603.
- Takenaka, K., E. Ogawa, H. Oyanagi, H. Wada and F. Tanaka (2005).** Carbonyl reductase expression and its clinical significance in non-small-cell lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14(8): 1972-5.
- Tanaka, M., R. Bateman, D. Rauh, E. Vaisberg, S. Ramachandani, C. Zhang, K. C. Hansen, A. L. Burlingame, J. K. Trautman, K. M. Shokat and C. L. Adams (2005).** An unbiased cell morphology-based screen for new, biologically active small

- molecules. *PLoS Biol* 3(5): e128.
- Terada, T., Y. Sugihara, K. Nakamura, H. Mizobuchi and M. Maeda (2003).** Further characterization of Chinese hamster carbonyl reductases (CHCRs). *Chem Biol Interact* 143-144: 373-81.
- Tian, Q., S. B. Stepaniants, M. Mao, L. Weng, M. C. Feetham, M. J. Doyle, E. C. Yi, H. Dai, V. Thorsson, J. Eng, D. Goodlett, J. P. Berger, B. Gunter, P. S. Linseley, R. B. Stoughton, R. Aebersold, S. J. Collins, W. A. Hanlon and L. E. Hood (2004).** Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* 3(10): 960-9.
- Tinguely, J. N. and B. Wermuth (1999).** Identification of the reactive cysteine residue (Cys227) in human carbonyl reductase. *Eur J Biochem* 260(1): 9-14.
- Turton, N. J., D. J. Judah, J. Riley, R. Davies, D. Lipson, J. A. Styles, A. G. Smith and T. W. Gant (2001).** Gene expression and amplification in breast carcinoma cells with intrinsic and acquired doxorubicin resistance. *Oncogene* 20(11): 1300-6.
- Umemoto, M., Y. Yokoyama, S. Sato, S. Tsuchida, F. Al-Mulla and Y. Saito (2001).** Carbonyl reductase as a significant predictor of survival and lymph node metastasis in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 85(7): 1032-6.
- Unverferth, D. V., R. D. Magorien, C. V. Leier and S. P. Balcerzak (1982).** Doxorubicin cardiotoxicity. *Cancer Treat Rev* 9(2): 149-64.
- van Asperen, J., O. van Tellingen and J. H. Beijnen (2000).** The role of mdr1a P-glycoprotein in the biliary and intestinal secretion of doxorubicin and vinblastine in mice. *Drug Metab Dispos* 28(3): 264-7.
- Vasquez-Vivar, J., P. Martasek, N. Hogg, B. S. Masters, K. A. Pritchard, Jr. and B. Kalyanaraman (1997).** Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry* 36(38): 11293-7.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I.**

Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferreira, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh and X. Zhu (2001). The sequence of the human genome. *Science* 291(5507): 1304-51.

Venter, J. C., M. D. Adams, G. G. Sutton, A. R. Kerlavage, H. O. Smith and M.

- Hunkapiller (1998).** Shotgun sequencing of the human genome. *Science* 280(5369): 1540-2.
- Von Hoff, D. D., M. W. Layard, P. Basa, H. L. Davis, Jr., A. L. Von Hoff, M. Rozenzweig and F. M. Muggia (1979).** Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann Intern Med* 91(5): 710-7.
- Wang, G. X., Y. X. Wang, X. B. Zhou and M. Korth (2001).** Effects of doxorubicinol on excitation--contraction coupling in guinea pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol* 423(2-3): 99-107.
- Weiss, R. B. (1992).** The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol* 19(6): 670-86.
- Wermuth, B. (1981).** Purification and properties of an NADPH-dependent carbonyl reductase from human brain. Relationship to prostaglandin 9-ketoreductase and xenobiotic ketone reductase. *J Biol Chem* 256(3): 1206-13.
- Wermuth, B., J. D. Munch and J. P. von Wartburg (1977).** Purification and properties of NADPH-dependent aldehyde reductase from human liver. *J Biol Chem* 252(11): 3821-8.
- Wermuth, B., K. L. Platts, A. Seidel and F. Oesch (1986).** Carbonyl reductase provides the enzymatic basis of quinone detoxication in man. *Biochem Pharmacol* 35(8): 1277-82.
- Wermuth, B., K. M. Bohren and E. Ernst (1993).** Autocatalytic modification of human carbonyl reductase by 2-oxocarboxylic acids. *FEBS Lett* 335(2): 151-4.
- Wermuth, B., K. M. Bohren, G. Heinemann, J. P. von Wartburg and K. H. Gabbay (1988).** Human carbonyl reductase. Nucleotide sequence analysis of a cDNA and amino acid sequence of the encoded protein. *J Biol Chem* 263(31): 16185-8.
- Wirth, H. and B. Wermuth (1992).** Immunohistochemical localization of carbonyl reductase in human tissues. *J Histochem Cytochem* 40(12): 1857-63.
- Wirth, H. P. and B. Wermuth (1985).** Immunochemical characterization of aldo-keto reductases from human tissues. *FEBS Lett* 187(2): 280-2.
- Wojtacki, J., E. Lewicka-Nowak and K. Lesniewski-Kmak (2000).** Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention--review of the literature. *Med Sci Monit* 6(2): 411-20.
- Wong, T. W., H. Y. Yu, S. K. Kong, K. P. Fung and T. T. Kwok (2000).** The decrease of mitochondrial NADH dehydrogenase and drug induced apoptosis in doxorubicin resistant A431 cells. *Life Sci* 67(9): 1111-8.
- Yamamoto, T., K. Matsuura, S. Shintani, A. Hara, Y. Miyabe, T. Sugiyama and Y.**



- Katagiri (1998).** Dual effects of anti-inflammatory 2-arylpropionic acid derivatives on a major isoform of human liver 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biol Pharm Bull* 21(11): 1148-53.
- Yen, J. L. and H. L. McLeod (2007).** Should DPD analysis be required prior to prescribing fluoropyrimidines? *Eur J Cancer* 43(6): 1011-6.
- Zeltzer, L. and S. LeBaron (1984).** Effects of the mechanics of administration on doxorubicin-induced side effects: a case report. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 6(2): 212-5.
- Zhang, J. and C. D. Byrne (1999).** Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR. *Biochem J* 337 ( Pt 2): 231-41.
- Zhou, S., C. M. Palmeira and K. B. Wallace (2001).** Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. *Toxicol Lett* 121(3): 151-7.
- Zhu, W., Y. Zou, R. Aikawa, K. Harada, S. Kudoh, H. Uozumi, D. Hayashi, Y. Gu, T. Yamazaki, R. Nagai, Y. Yazaki and I. Komuro (1999).** MAPK superfamily plays an important role in daunomycin-induced apoptosis of cardiac myocytes. *Circulation* 100(20): 2100-7.
- Zunino, F. and G. Capranico (1990).** DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anticancer Drug Des* 5(4): 307-17.

## 8. Anhang

	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	SD $K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ ( $\text{pmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ )	SD $V_{\max}$ ( $\text{pmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ )	n (Anzahl Proben)
<b>Niere</b>	139,80	39,69	126,9	77,4	5
<b>Leber</b>	162,82	50,45	337,1	148,3	6
<b>Herz</b>	239,08	57,36	55,6	12,2	10
<b>Kolon</b>	140,05	18,61	50,0	23,6	4
<b>Pankreas</b>	173,15	43,05	63,5	18,1	2
<b>Milz</b>	198,43	69,68	37,9	16,8	6
<b>Magen</b>	131,85	40,07	83,5	44,8	6
<b>Lunge</b>	231,00	40,62	56,4	30,9	4
<b>Muskel</b>	244,60	76,9	75,7	10,8	2
<b>Dünndarm</b>	86,00	0,00	197,6	0,0	1

Tabelle 8.1: Mittelwerte und Standardabweichungen (SD) der Michaelis Menten Konstanten  $K_m$  ( $\mu\text{M}$ ) und maximale Umsatzgeschwindigkeiten  $V_{\max}$  ( $\text{pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ) in verschiedenen humanen Organen.

	Spez. Aktivität ( $\text{pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ )	SD ( $\text{pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ )
<b>AKR1A1</b>	346,49	32,35
<b>AKR1B1</b>	300,84	8,72
<b>AKR1B10</b>	576,20	6,78
<b>AKR1C1</b>	9,63	9,00
<b>AKR1C2</b>	20,82	7,58
<b>AKR1C3</b>	63881,55	599,08
<b>AKR1C4</b>	201,68	19,70
<b>CBR1</b>	4352,33	270,50

Tabelle 8.2: spezifische Aktivität ( $\text{pmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ) von verschiedenen Aldo-Keto-Reduktasen.

	$K_m/$ ( $\mu\text{M}$ )	SD $K_m/$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}/$ ( $\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ )	SD $V_{\max}/$ ( $\text{nmol}/(\text{mg}\cdot\text{min})$ )	MW/ (Da)	$k_{\text{cat}}/$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}} / K_m/$ ( $1/(\text{min}\cdot\text{mM})$ )
<b>AKR1A1</b>	247,3	0,0	1,1	0,0	36400	0,04	0,17
<b>AKR1B10</b>	311,2	27,4	2,8	0,3	36000	0,10	0,32
<b>AKR1C3</b>	128,6	26,4	183,5	34,7	36800	6,75	52,51
<b>AKR1C4</b>	281,3	23,2	1,2	0,0	37100	0,04	0,16
<b>CBR1</b>	167,1	15,8	20,6	0,3	30200	0,62	3,72

Tabelle 8.3: Michaelis- Konstanten ( $\mu\text{M}$ ), maximale Umsatzgeschwindigkeiten ( $V_{\max}$ ,  $\text{nmol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ), Wechselzahl ( $k_{\text{cat}}$ ,  $\text{min}^{-1}$ ) und katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}} / K_m$ ,  $\text{min}\cdot\text{mg}$ ) für verschiedene Aldo-Keto-Reduktasen.

	<b>CBR1</b>	<b>CBR3</b>	<b>AKR1A1</b>	<b>AKR1B1</b>	<b>AKR1B10</b>	<b>AKR1C1</b>	<b>AKR1C2</b>	<b>AKR1C3</b>	<b>AKR1C4</b>	<b>AKR1D1</b>	<b>AKR7A2</b>	<b>AKR7A3</b>
<b>Milz</b>	4,5E+03	5,2E+02	2,0E+04	7,8E+02	0,0E+00	2,9E+02	2,9E+01	1,2E+01	3,9E+02	4,7E+02	1,2E+05	3,0E+02
<b>Thymus</b>	3,0E+03	7,4E+01	1,4E+04	4,8E+02	3,1E+01	1,0E+03	2,9E+01	6,8E+01	1,1E+00	3,9E+02	6,2E+04	3,5E+02
<b>Prostata</b>	7,3E+03	9,4E+02	2,3E+04	5,0E+02	2,6E+00	2,8E+02	3,0E+01	2,4E+01	4,0E+00	4,0E+02	6,3E+04	5,4E+02
<b>Testis</b>	3,6E+03	4,4E+02	7,2E+03	1,3E+03	5,5E+00	2,0E+03	4,0E+01	4,8E+01	1,6E+02	8,1E+03	7,7E+04	4,2E+03
<b>Ovar</b>	1,3E+04	6,0E+02	3,8E+04	4,6E+02	0,0E+00	3,3E+02	3,5E+01	2,5E+01	1,2E+00	4,5E+02	6,5E+04	5,4E+02
<b>Dünndarm</b>	1,8E+04	3,2E+02	2,5E+04	3,9E+02	2,8E+02	1,7E+03	2,7E+01	1,0E+02	4,2E+00	5,6E+02	6,3E+04	8,4E+03
<b>Kolon</b>	4,3E+03	4,2E+02	1,1E+04	4,2E+02	3,5E+02	9,4E+02	3,9E+01	2,6E+02	1,6E+00	4,7E+02	8,2E+04	6,9E+03
<b>Leukozyten</b>	1,3E+03	1,8E+02	1,3E+04	2,0E+02	0,0E+00	1,0E+02	5,0E+01	1,1E+01	2,1E+00	5,2E+02	2,4E+04	1,1E+02
<b>Herz</b>	2,2E+03	3,6E+02	6,8E+03	3,8E+03	0,0E+00	3,4E+03	3,5E+01	5,7E+01	1,8E+01	4,9E+02	2,8E+04	1,1E+02
<b>Gehirn</b>	3,2E+03	2,4E+02	1,9E+03	1,1E+03	2,8E+00	6,2E+02	3,5E+01	3,6E+01	2,2E+00	5,6E+02	3,6E+04	6,0E+02
<b>Plazenta</b>	9,0E+03	2,0E+02	2,0E+04	5,6E+03	0,0E+00	3,0E+01	4,9E+01	5,1E+00	2,4E+00	6,2E+02	3,8E+04	8,0E+01
<b>Lunge</b>	4,9E+03	4,2E+02	1,0E+04	6,1E+02	2,0E+02	6,9E+03	5,6E+01	1,2E+02	3,3E+00	5,2E+02	6,7E+04	3,1E+02
<b>Leber</b>	1,0E+05	5,6E+01	1,5E+05	2,2E+02	1,7E+02	9,2E+04	6,3E+01	2,0E+03	1,4E+07	8,4E+04	2,3E+05	1,2E+05
<b>Muskel</b>	3,8E+02	7,4E+01	1,1E+03	4,9E+03	4,0E+00	2,5E+03	8,4E+01	6,0E+01	2,3E+00	1,0E+03	8,4E+04	4,8E+01
<b>Niere</b>	2,2E+04	3,0E+02	8,6E+04	1,2E+04	4,9E+00	5,7E+03	6,3E+01	1,3E+03	4,4E+00	5,7E+02	5,5E+05	1,6E+05
<b>Pankreas</b>	2,0E+04	6,6E+02	1,1E+05	2,0E+03	1,7E+01	1,4E+03	6,6E+01	1,4E+02	7,5E+00	5,5E+02	3,3E+05	4,8E+05

Tabelle 8.4: mRNA-Expression (Kopienzahl/ng cDNA) verschiedener Carbonyl-Reduktasen und Aldo-Keto-Reduktasen in humanen Organen.

Leber Probe	Intensität CBR1	Intensität GAPDH	Quotient	Normalisierungsfaktor	Quotient Norm	spez Akt. 100µM	V <sub>max</sub>	K <sub>m</sub>
IKP 1	0,120	0,416	0,29	CBR1= 2,69 GAPDH= 0,60	1,31	302	587	89,8
IKP 2	0,026	0,321	0,08		0,36	200	408	101,3
IKP 4	0,096	0,394	0,24		1,10	285	497	83,2
IKP 5	0,143	0,451	0,32		1,44	239	412	85,9
IKP 6	<b>0,211</b>	<b>0,488</b>	<b>0,43</b>		<b>1,95</b>	<b>349</b>	<b>1172</b>	<b>238,3</b>
IKP 7	<b>0,156</b>	<b>0,492</b>	<b>0,32</b>		<b>1,43</b>	<b>269</b>	<b>603</b>	<b>124,7</b>
IKP 8	<b>0,165</b>	<b>0,507</b>	<b>0,33</b>		<b>1,47</b>	<b>252</b>	<b>1525</b>	<b>502,2</b>
IKP 9	0,164	0,541	0,30		1,37	207	408	99,7
IKP 10	<b>0,106</b>	<b>0,488</b>	<b>0,22</b>		<b>0,99</b>	<b>204</b>	<b>406</b>	<b>100,6</b>
IKP 12	0,219	0,619	0,35		1,60	236	472	116,3
IKP 13	0,491	0,275	1,79	CBR= 3,11 GAPDH= 0,90	6,20	480	907	97,6
IKP 14	0,382	0,312	1,23		4,24	495	839	85,8
IKP 16	0,166	0,351	0,47		1,64	228	382	75,5
IKP 18	0,010	0,219	0,05		0,16	150	267	81,9
IKP 19	0,008	0,119	0,07		0,24	105	245	122,9
IKP 21	0,189	0,255	0,74		2,57	243	549	135,6
IKP 22	0,297	0,228	1,30		4,51	374	802	118,6
IKP 23	0,413	0,317	1,30		4,52	453	1821	297,6
IKP 24	0,016	0,132	0,12		0,42	308	957	216,7
IKP 25	0,230	0,410	0,56		1,94	162	366	123,3
IKP 27	0,433	0,338	1,28	CBR1= 1,46 GAPDH= 0,75	2,48	220	461	98,3
IKP 28	0,262	0,300	0,87		1,68	226	461	102,3
IKP 29	0,359	0,299	1,20		2,32	267	623	143,5
IKP 31	<b>0,300</b>	<b>0,307</b>	<b>0,98</b>		<b>1,89</b>	<b>618</b>	<b>973</b>	<b>75,1</b>
IKP 32	0,500	0,358	1,40		2,70	336	587	90,9
IKP 34	0,025	0,295	0,08		0,16	217	437	114,9
IKP 35	0,043	0,308	0,14		0,27	1378	2907	114,3
IKP 38	<b>0,358</b>	<b>0,380</b>	<b>0,94</b>		<b>1,82</b>	<b>278</b>	<b>363</b>	<b>43,0</b>
IKP 41	<b>0,232</b>	<b>0,317</b>	<b>0,73</b>		<b>1,41</b>	<b>249</b>	<b>317</b>	<b>43,6</b>
IKP 42	<b>0,443</b>	<b>0,384</b>	<b>1,15</b>		<b>2,23</b>	<b>542</b>	<b>829</b>	<b>65,4</b>
IKP 43	0,309	0,357	0,86	CBR1= 1,48 GAPDH= 0,74	1,73	200	393	99,3
IKP 46	<b>0,341</b>	<b>0,013</b>	<b>25,59</b>		<b>51,18</b>	<b>929</b>	<b>4914</b>	<b>420,2</b>
IKP 47	0,048	0,082	0,58		1,16	772	1458	102,3
IKP 52	0,318	0,402	0,79		1,58	148	305	112,6
IKP 54	0,447	0,493	0,91		1,82	182	348	100,3
IKP 56	<b>0,399</b>	<b>0,432</b>	<b>0,92</b>		<b>1,85</b>	<b>211</b>	<b>314</b>	<b>68,7</b>
IKP 58	<b>0,440</b>	<b>0,381</b>	<b>1,16</b>		<b>2,31</b>	<b>326</b>	<b>508</b>	<b>79,7</b>
IKP 60	<b>0,145</b>	<b>0,252</b>	<b>0,58</b>		<b>1,15</b>	<b>138</b>	<b>305</b>	<b>120,6</b>
IKP 61	0,281	0,385	0,73		1,46	254	403	70,3
IKP 62	0,080	0,322	0,25		0,49	214	456	116,6
IKP 63	0,176	0,201	0,88	CBR1= 1,16 GAPDH= 0,35	2,90	220	559	139,3
IKP 64	0,109	0,009	12,22		40,32	188	346	79,1
IKP 65	0,108	0,155	0,70		2,30	158	266	79,5
IKP 66	0,269	0,123	2,19		7,24	211	417	102,3
IKP 69	0,076	0,250	0,31		1,01	550	989	95,2
IKP 73	0,039	0,294	0,13		0,44	143	316	118,1
IKP 74	0,313	0,221	1,42		4,67	183	362	99,3
IKP 75	0,065	0,121	0,54		1,78	151	335	116,9
IKP 76	0,236	0,137	1,72		5,69	223	409	88,4
IKP 77	0,043	0,039	1,10		3,64	168	307	94,1

<b>IKP 78</b>	0,640	0,696	0,92	CBR1= 0,89 GAPDH= 0,36	2,30	164	320	94,8
<b>IKP 79</b>	0,086	0,322	0,27		0,66	86	131	64,3
<b>IKP 83</b>	0,026	0,102	0,26		0,65	232	445	89,7
<b>IKP 84</b>	0,839	0,754	1,11		2,79	322	598	99,9
<b>IKP 85</b>	0,331	0,593	0,56		1,40	171	356	113,5
<b>IKP 86</b>	0,619	0,628	0,99		2,47	288	498	83,0
<b>IKP 87</b>	0,832	0,718	1,16		2,90	349	677	99,7
<b>IKP 90</b>	0,554	0,656	0,84		2,11	217	485	121,0
<b>IKP 91</b>	0,458	0,706	0,65		1,63	172	347	111,8
<b>IKP 92</b>	0,396	0,574	0,69		1,73	165	323	100,8
<b>IKP 95</b>	0,091	0,261	0,35	CBR1= 2,52 GAPDH= 0,34	2,61	120	204	80,8
<b>IKP 96</b>	0,448	0,300	1,50		11,24	376	834	118,6
<b>IKP 97</b>	0,086	0,347	0,25		1,86	181	338	102,3
<b>IKP 98</b>	0,222	0,301	0,74		5,56	254	529	117,2
<b>IKP 99</b>	0,004	0,183	0,02		0,18	184	340	90,9
<b>IKP 100</b>	0,172	0,210	0,82		6,15	291	655	119,2
<b>IKP 101</b>	0,111	0,353	0,31		2,36	128	243	89,3
<b>IKP 102</b>	0,520	0,462	1,13		8,47	439	749	88,2
<b>IKP 103</b>	0,051	0,195	0,26		1,98	103	198	93,2
<b>IKP 104</b>	0,137	0,164	0,83		6,28	152	378	125,4
<b>IKP 105</b>	0,277	0,183	1,51	CBR1= 3,01 GAPDH= 1,04	4,40	186	298	71,3
<b>IKP 106</b>	0,071	0,277	0,26		0,75	154	305	100,8
<b>IKP 108</b>	0,397	0,139	2,86		8,32	237	490	105,2
<b>IKP 109</b>	0,320	0,307	1,04		3,03	213	420	108,3
<b>IKP 110</b>	0,069	0,257	0,27		0,78	170	334	97,8
<b>IKP 112</b>	0,039	0,183	0,21		0,62	115	306	147,9
<b>IKP 113</b>	0,191	0,229	0,83		2,42	173	348	103,9
<b>IKP 115</b>	0,102	0,124	0,82		2,38	183	292	72,9
<b>IKP 116</b>	0,138	0,079	1,74		5,05	177	363	100,9
<b>IKP 117</b>	0,198	0,073	2,71		7,89	178	363	103,9
<b>IKP 118</b>	0,311	0,388	0,80	CBR1= 2,13 GAPDH= 0,46	3,69	232	336	53,3
<b>IKP 120</b>	0,156	0,192	0,81		3,75	250	479	102,3
<b>IKP 121</b>	0,153	0,207	0,74		3,41	145	305	103,4
<b>IKP 122</b>	0,295	0,264	1,12		5,15	196	416	114,7
<b>IKP 123</b>	0,158	0,444	0,36		1,65	109	198	82,3
<b>IKP 124</b>	0,257	0,438	0,59		2,70	208	384	86,2
<b>IKP 125</b>	0,573	0,541	1,06		4,89	107	201	72,2
<b>IKP 126</b>	0,153	0,339	0,45		2,08	207	422	106,2
<b>IKP 127</b>	0,373	0,392	0,95		4,39	232	444	89,2
<b>IKP 128</b>	0,100	0,242	0,41		1,90	230	416	79,0

Tabelle 8.5: relative Expressionsintensitäten von CBR1, relative Expressionsintensitäten pro Blot, normalisierte relative Expressionsintensitäten und spezifische Aktivität (bei 100 $\mu$ M), maximale Aktivität  $V_{\max}$  (pmol/(min\*mg)) und  $K_m$  ( $\mu$ M) je getestete Leberprobe. Fett markierte Proben sind im Datensatz 2 herausgenommen.

## **Teilveröffentlichungen der vorliegenden Arbeit:**

### **Publikation in Vorbereitung:**

Kassner N., Martin, H.J., Maser E., Penning, T.M., Wojnowski L. (2007):

CBR1 is the major Doxorubicin reductase in human liver.

### **Abstract:**

Kassner N., Martin, H.J., Maser E., Penning, T.M., Wojnowski L. (2007):

CBR1 is the major Doxorubicin reductase in human liver. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Of Pharmacol., Vol. 375, Supplement 1, March 2007.

## Lebenslauf

### **Persönliche Daten**

Name Nina Kassner  
Geburtsdatum, -ort 25.03.1977 in Göttingen  
Staatsangehörigkeit deutsch

### **Schulische Laufbahn**

1983 – 1987 Albani Schule Göttingen  
1987 – 1989 Lutherschule Göttingen  
1989 – 1996 Theodor-Heuss-Gymnasium  
Juni 1996 Abitur

### **Studium und Ausbildung**

1996 Beginn des Studiums der Chemie an der Georg-August-Universität Göttingen

1997 Wechsel zum Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen

Oktober 1999 Diplomvorprüfung in den Fächern Botanik, Mikrobiologie, physikalische Chemie und anorganische Chemie

Februar 2003 - November 2003 Diplomarbeit in der Abteilung „Biochemie der Pflanze“ an der biologischen Fakultät der Georg-August-Universität zu dem Thema „Vergleich des Aminosäuretransportes und der Stickstoffeffizienz bei Arabidopsis und Raps“ unter der Anleitung von PD Dr. Lohaus

November 2003 Studienabschluss Diplom Biologie mit den Schwerpunkten Biochemie (Hauptfach), Mikrobiologie und Pharmakologie

2003 - 2004 Betreuung verschiedener Praktika und Symposien als studentische/wissenschaftliche Hilfskraft an der biologischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen

Dezember 2003 - Juli 2004

Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung „Biochemie der Pflanze“ an der biologischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen

August 2004

Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation im Studienfach Pharmakologie an der medizinischen Fakultät der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz