

# **Dynamische Modellierung und Simulation des Arzneimittelmetabolismus in humanen Leberzellen: Identifizierbarkeit, Robustheit und inter-individuelle Variabilität**

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der  
Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von  
**Joachim Bucher**  
aus Geislingen an der Steige

Vorsitzender:	Prof. Dr.-Ing. Ralf Takors
Hauptberichter:	Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. Matthias Reuss
Mitberichter:	Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Elmar Heinzle
Tag der mündlichen Prüfung:	15.12.2011

Institut für Bioverfahrenstechnik der Universität Stuttgart

2011



*„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“ (Isaac Newton, 1643-1727)*



# Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung</b> .....	<b>I</b>
<b>Liste der Abkürzungen und Symbole</b> .....	<b>III</b>
Abkürzungen .....	III
Symbole .....	IV
Griechische Symbole.....	V
Indizes.....	V
<b>Summary</b> .....	<b>VII</b>
Context .....	VII
Background.....	VII
Objective.....	X
Experimental cooperation.....	XII
Conclusion and outlook.....	XIII
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Kontext .....	1
1.2 Hintergrund.....	3
1.3 Zielsetzung.....	7
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
2.1 Experimentelle Zusammenarbeit.....	13
2.2 Material.....	15
2.2.1 Arzneimittel.....	15
2.2.2 Medien und Chemikalien .....	15
2.2.3 Cytochrom-P450-Monooxygenasen und UDP-Glucuronosyl-Transferasen .....	15
2.2.4 Primäre humane Hepatozyten und Lebermikrosomen .....	16
2.3 Experimentelle Methoden.....	16
2.3.1 Quantifizierung von CYP und UGT Protein-Konzentrationen .....	16
2.3.2 CYP2C19 Enzym-Aktivitätsmessung .....	18
2.3.3 Initialraten-Experimente an rekombinanten CYPs und an humanen Lebermikrosomen zur Untersuchung des DT- und PF-Metabolismus.....	18
2.3.4 Zeitreihen-Experiment an primären humanen Hepatozyten zur Untersuchung des AS-Metabolismus .....	19
2.3.5 Quantifizierung der Metabolit-Konzentrationen von DT und PF .....	21
2.3.6 Quantifizierung der Metabolit-Konzentrationen von AS.....	21
2.4 Methoden der Modellierung und Modell-Verifikation.....	22
2.4.1 Dynamische Modellierung .....	22
2.4.2 Topologische Netzwerkanalyse.....	24
2.4.3 Parameteridentifikation und Optimierungsalgorithmus .....	25
2.4.4 Lokale Analyse der Parametersensitivitäten und -identifizierbarkeit .....	27
2.4.5 Globale Analyse der Parametersensitivitäten und -identifizierbarkeit.....	31
2.4.6 Dynamische Analyse der Variabilität des Arzneimittelmetabolismus aufgrund individueller CYP- und UGT-Proteinlevel .....	33
<b>3 Initialratenansatz an humanen Lebermikrosomen</b> .....	<b>35</b>

3.1 Einleitung.....	35
3.2 Identifikation der Netzwerkstruktur .....	36
3.3 Topologische Analyse der Modellstruktur .....	42
3.4 Dynamische Modellierung .....	45
3.5 Modell-Verifikation.....	46
3.5.1 Parameteridentifikation der apparenten Einzelreaktionen .....	46
3.5.2 Parameteridentifikation der Isoenzym-Struktur in Phase I .....	49
3.6 Dynamische Analyse der Variabilität des DT- und PF-Metabolismus aufgrund individueller CYP-Proteinlevel .....	63
3.6.1 Inter-individuelle Variabilität der CYP-Isoenzym-Konzentrationen an humanen Lebermikrosomen .....	63
3.6.2 Dynamische Simulation des Phase I-Metabolismus .....	64
3.6.3 Einfluss des Phase II-Metabolismus .....	75
3.7 Globale Sensitivitätsanalyse und Identifizierbarkeit .....	76
3.8 Diskussion .....	78
<b>4 Zeitreihen-Ansatz an primären humanen Hepatozyten .....</b>	<b>83</b>
4.1 Einleitung.....	83
4.2 Identifikation der Netzwerkstruktur .....	84
4.3 Dynamische Modellierung .....	87
4.4 Modell-Verifikation.....	89
4.4.1 Modellstruktur in primären humanen Hepatozyten .....	89
4.4.2 Zeitreihen-/Stimulus-Response-Messungen an primären humanen Hepatozyten.....	91
4.4.3 Parameterschätzung.....	91
4.4.4 Parametersensitivität und lokale Identifizierbarkeit.....	92
4.4.5 Modellreduktion .....	96
4.4.6 Analyse der Konzentrations-Zeitprofile.....	100
4.4.7 Zeitreihen-/Stimulus-Response-Messungen an primären humanen Hepatozyten: Untersuchung der Proteinkonzentration von CYP3A4.....	105
4.4.8 Simultane Modellverifikation an individuellen AS-Detoxifikationsprofilen...	106
4.5 Topologische Analyse der Modellstruktur .....	113
4.6 Globale Sensitivitätsanalyse und Identifizierbarkeit .....	114
4.7 Dynamische Analyse der Variabilität des AT-Metabolismus aufgrund individueller CYP-Proteinlevel .....	116
4.8 Diskussion .....	120
<b>5 Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>123</b>
<b>Literatur .....</b>	<b>131</b>
<b>Anhang A: Modellierung .....</b>	<b>143</b>
A.1. Kinetik der Umsetzung von alternativen Substraten zu alternativen Produkten an Cytochrom-P450-Monooxygenasen .....	143
A.2. Kinetik der unspezifischen Makromolekül-Bindung von AS in Hepatozyten.	145
<b>Anhang B: Experimentelle Daten .....</b>	<b>147</b>
B.1. Initialratenbestimmungen an Lebermikrosomen.....	147
B.2. Zeitreihen-Experimente an primären humanen Hepatozyten.....	148
<b>Erklärung .....</b>	<b>153</b>

# Danksagung

Mein größter Dank richtet sich an meinen Doktorvater Prof. Matthias Reuss für die umfassende Betreuung meiner Doktorarbeit. Die ausführlichen und intensiven Diskussionen im wissenschaftlichen Bereich, die konstruktive Kritik, sowie die stets motivierende Unterstützung habe ich an Prof. Reuss sehr geschätzt. Des Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Elmar Heinzle für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme der Mitberichterstattung. Gegenüber Prof. Ralf Takors möchte ich meinen Dank aussprechen, da er mir ermöglichte, meine Dissertation am IBVT abschließen zu können.

Weiter bedanke ich mich bei allen Kooperationspartnern im Verbundprojekt Stuttgart für die Zusammenarbeit. Dabei möchte ich die Projektpartner am Institut für Klinische Pharmakologie (IKP), Stuttgart, und am Medizinischen Proteomcenter (MPC), Bochum bezüglich der Zusammenarbeit in der experimentellen Datenerfassung besonders hervorheben. Mein Dank richtet sich am IKP an Dr. Tanja Saussele, Stephan Riedmaier und Prof. Ulrich M. Zanger, für die wertvollen Diskussionen, die experimentellen Versuche an Mikrosomen, die analytischen Metabolitmessungen, die Bereitstellung einer umfangreichen Auswahl an individuellen CYP- und UGT-Proteindaten in Lebermikrosomen und die Durchführung von Western-Blot-Analysen zur Proteinmessung an primären Hepatozyten. Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. Elmar Langenfeld, Dr. Anke Schnabel und Prof. Kathrin Marcus am MPC für die Etablierung der quantitativen Messmethode zur Bestimmung von CYP- und UGT-Proteindaten und die Messung an primären Hepatozytenproben bedanken. Weiterer Dank geht an Dr. Lothar Terfloth, CCC Erlangen, sowie an Prof. Jürgen Pleiss, ITB Stuttgart, für weitere aufschlussreiche Informationen und Anregungen. Am Institut für Bioverfahrenstechnik (IBVT) möchte ich Gaby Vacun besonderen Dank aussprechen, die das Zellkulturlabor etabliert und mich in den Versuchen an primären Hepatozyten sowie in der Probenaufbereitung wertvoll unterstützt hat. Schließlich geht mein Dank auch an die Plattform Zellbiologie im Netzwerk Hepatosys an PD Dr. Wolfgang E. Thasler (München), PD Dr. Thomas Weiss (München) und Prof. Dr. Andreas K. Nüssler (Berlin, München) für die Isolation und Bereitstellung von primären humanen Hepatozyten. Für die Förderung dieser Arbeit im Rahmen des Projektes „Systembiologie – Systeme des Lebens“ durch den BMBF bin ich sehr dankbar.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Kollegen am IBVT für die schöne gemeinsame Zeit. Neben den wissenschaftlichen Diskussionen und Anregungen möchte ich dabei auch die

gemeinsamen Aktivitäten in der Freizeit und die im Sommer sehr sportliche Kaffeepause am Nachmittag hervorheben. Insbesondere den direkten Kollegen im Verbundprojekt am IBVT, Prem Kumar Murugan und Klaus Maier, möchte ich für die langjährige tolle Zusammenarbeit und für die wertvollen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche Dank aussprechen. An Prem richtet sich meine Wertschätzung nicht nur aufgrund der gemeinsamen langjährigen Zeit als Bürokollegen, sondern auch aufgrund der daraus entstandenen guten Freundschaft. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Alexej Lapin und Holger Perfahl für die Hilfe in numerischen Fragestellungen bedanken. Mein Dank geht auch an Timo Hardiman für die tolle Zusammenarbeit in der Systemadministration am IBVT.

Des Weiteren richtet sich mein Dank an Kerstin Falkner-Tränkle für die Projektkoordination und die wichtige Unterstützung im Verbundprojekt Stuttgart, und an Renate Moser und Ulrich Peckmann in der Institutsverwaltung am IBVT für die Hilfestellung in organisatorischen und personellen Belangen.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern, bei meinen Geschwistern und besonders bei meiner Ehefrau Katrin mehr als herzlichst bedanken. Mit ihrer moralischen Unterstützung und den aufbauenden Gesprächen, was mir in schwierigen und anstrengenden Zeiten sehr geholfen hat, haben sie indirekt zum erfolgreichen Abschluss dieser Doktorarbeit beigetragen.



## Liste der Abkürzungen und Symbole

### Abkürzungen

1A2	CYP1A2
1A3	UGT1A3
1B1	OATP1B1
2B1	OATP2B1
2B4	UGT2B4
2B6	CYP2B6
2B7	UGT2B7
2C9	CYP2C9
2C19	CYP2C19
2D6	CYP2D6
3A4	CYP3A4
Abb.	Abbildung
arg	Argument
AS	Atorvastatin(-Säure)
ASL	Atorvastatin-Lakton
ASOH	Hydroxy-Atorvastatin-Säureformen (para- und ortho-)
ASpOH	para-hydroxy-Atorvastatin-Säure
ASoOH	ortho-hydroxy-Atorvastatin-Säure
ASLOH	Hydroxy-Atorvastatin-Lakton(para- und ortho-)
ASLpOH	para-hydroxy-Atorvastatin-Lakton
ASLoOH	ortho-hydroxy-Atorvastatin-Lakton
AUC	<i>Area under the curve</i> (Kurvenintegralfläche)
CR	Chemische Reaktion
CYP	Cytochrom-P450-Monooxygenase
DMPS	Durchschnittliche Multiparametersensitivität (Globale Sensitivitätsanalyse)
DPF	N-Desalkyl-Propafenon
DT	Dextromethorphan
DX	Dextrorphan
DXG	Dextrorphan-Glucuronid
EFM	Elementarer Flussmodus
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FIM	Fisher-Informations-Matrix
HM	Hydroxy-Morphinan
HPF	5-Hydroxy-Propafenon
HPFG	5-Hydroxy-Propafenon-Glucuronid
IBVT	Institut für Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart
IKP	Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart
ISO	Vollständiges Isoenzym-Modell
IVIVE	In-vitro-in-vivo-Extrapolationen
LHS	<i>Latin Hypercube Sampling</i> (Zufallsverfahren)
MCS	Minimaler Cut-Set
MDR	<i>multidrug resistance protein</i>

## Liste der Abkürzungen und Symbole

---

MM	3-Methoxymorphinan
MPC	Medizinisches Proteom Center, Ruhr-Universität Bochum
MPS	Multiparametersensitivität (Globale Sensitivitätsanalyse)
MRP	<i>multidrug resistance-related protein</i>
OATP	<i>organic anion transport protein</i>
PF	Propafenon
PFG	Propafenon-Glucuronid
PON	Paraoxanase
rec	rekombinant (Enzym)
rel. s.d.	Relative Standardabweichung (bezogen auf Mittelwert)
RED	Reduziertes Modell (Masterenzym-Modell)
s.d.	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TPV	Totale Parameter-Variation
UDP	Uridin-Diphosphat
UGT	UDP-Glucuronosyl-Transferase
var.	Varianz

## Symbole

$A$	Oberfläche
$c$	Konzentration
$C$	Schätzfehler-Kovarianzmatrix (Inverse der Fisher-Informations-Matrix)
$C^*$	Normalisierte Schätzfehler-Kovarianzmatrix
$cond$	Konditionszahl einer Matrix
$Cov$	Kovarianzmatrix der Messfehler
$Cor_{kl}$	$kl$ -tes Element der Parameter-Korrelationsmatrix
$Cov_{kl}$	$kl$ -tes Element der Parameter-Kovarianzmatrix
$d$	Dicke (einer Zellmembran)
$D_j$	Diffusionskoeffizient des Metaboliten $j$
$diag$	Diagonalmatrix
$E_{s,k}$	Schätzfehler
$fu$	<i>fraction unbound</i>
$F$	Netzwerk-Fragilitäts-Koeffizient
$F_i$	Fragilität der Einzelreaktion $q_i$ in einem Netzwerk
$FV_a$	Akzeptable Frequenzveteilung (Kolmogorov-Smirnov-Statistik)
$FV_{ia}$	Inakzeptable Frequenzveteilung (Kolmogorov-Smirnov-Statistik)
<b>FIM</b>	Fisher-Informations-Matrix
<b>FIM*</b>	Normalisierte Fisher-Informations-Matrix
$k$	Ratenkonstante
$k_{cat}$	katalytische Aktivität
$K_I$	Inhibierungskonstante
$K_M$	Affinitätskonstante (Michaelis-Menten)
$MCS_i$	Durchschnittliche MCS-Größe der Einzelreaktion $q_i$ .
$\mathbf{Q}(t_n)$	Gewichtungsmatrix
$p$	Parameter
$\bar{p}_l$	Mittelwert des Parameters $l$ über mehrere Parametersets (aus Optimierung)
$\mathbf{p}$	Parametervektor
$P$	Permeabilitätskoeffizient (Diffusion)

---

$q$	Anzahl aller Einzelreaktionen in einem Netzwerk
$q_i$	Bezeichnung für die <i>ite</i> Einzelreaktion in der topologischen Analyse
$r$	Reaktionsrate
$\tilde{r}$	Lineare Approximation der Initialrate
$r_{max}$	Maximale Reaktionsrate (eines Enzyms)
$R_{kl}$	$kl$ -tes Element der Schätzfehler-Korrelationsmatrix
$R_{TPV}$	Robustheit-Koeffizient (gegenüber der Totalen Parameter Variation (TPV))
$rcond$	Reziproke Konditionszahl (einer Matrix)
$s^c$	Standardabweichung bei Konzentrationen
$s^r$	Standardabweichung bei Initialraten
$S_{i,l,n}$	Parameter-Sensitivitätskoeffizient
$S$	Parametersensitivitätsmatrix
$t$	Zeitpunkt
$TPV$	Totale Parameter-Variation
$Var_{kk}$	$k$ -tes Element des Parameter-Varianzvektors
$V$	Volumen
$y$	Zustandsvariable
$\mathbf{y}$	Vektor der Zustandsvariablen
$\#$	Nummer

## Griechische Symbole

$\Delta$	Differenz
$\varepsilon$	Fehlertoleranz
$\Theta$	Optimierungskriterium/Zielwertfunktion
$\kappa$	Ratenkonstante der apparenten Transportkinetik
$\lambda$	Eigen-Wert
$v_{max,rec}$	Spezifische Maximalrate eines rekombinanten Enzyms
$\Phi$	Eigen-Vektor
$\varphi$	Länge des Eigen-Vektors
$\sigma_p$	Relativer Parameterfehler

## Indizes

$0$	Initialzustand (Zeitpunkt 0)/Nominalzustand (Parameter)
$b$	intrazellulär an Makromoleküle gebunden
B-Ox	beta-Oxidation
<i>calc/c</i>	berechnet
<i>cells</i>	Zellen
<i>comp</i>	Kompartiment
<i>diff</i>	Diffusion
<i>dis</i>	Dissoziation
$e$	Enzym $e$
<i>ex</i>	extrazellulär (Metabolitkonzentration)/Export (Transportrate)
<i>half</i>	Halbwert
$i$	Allgemeiner Index
$I$	Inhibitor
<i>il</i>	Individuelle Leber

## Liste der Abkürzungen und Symbole

---

<i>in</i>	intrazellulär
<i>im</i>	Import
<i>j</i>	Metabolit <i>j</i>
<i>J</i>	Gesamtanzahl Metabolite
<i>k</i>	Parameter <i>k</i>
<i>K</i>	Gesamtanzahl der Parameter <i>k</i>
<i>l</i>	Parameter <i>l</i>
<i>L</i>	Gesamtanzahl der Parameter <i>l</i>
max	Maximum
<i>meas/m</i>	gemessen
<i>min</i>	Minimum
<i>n</i>	Zeitpunkt
<i>norm</i>	normalisiert
<i>N</i>	Gesamtanzahl Zeitpunkte
<i>opt</i>	Optimiert (Parameter)
<i>P</i>	Produkt
<i>reference</i>	Experimentelles Referenzsystem
<i>S</i>	Substrat

## Summary

### Context

This work was conducted in the framework of the national BMBF-network-project “Systembiologie – Systeme des Lebens“ as part of the competence-network „Hepatosys“ in the network Stuttgart „Detoxification“ at the Institute for Biochemical Engineering.

The network Stuttgart was part of the competence-network “Hepatosys” (<http://www.hepatosys.de>) since the beginning of the funding in the year 2004. The network “Hepatosys” was composed of four networks and two platforms, and dedicated itself to the systems biology framed analysis of the biological processes in hepatocytes. Main focus in the network Stuttgart was laid on the analysis of detoxification of xenobiotics, especially drugs, in hepatocytes, both in fundamental experimental observations and in the development of computational modeling approaches for the purpose of quantitative predictions. At the state of the second funding phase, from 2007 to 2009, the network Stuttgart consisted of eleven research subprojects, SP1 to SP11, which dealt with different subjects in experimental investigations and in modeling approaches, and of three central subprojects, Z1 to Z3, responsible for organizational task in the project coordination, cell culturing and delivery, and in the central data management.

The tasks in the subproject SP5 comprised the mathematical modeling and dynamic analysis of gene regulation of drug degradation, which was part of the work of my colleague Prem Kumar Murugan, and of drug metabolism in hepatocytes, which was part of my doctoral thesis and will be described detailed in the following.

### Background

The efficiency in the current drug research and development is very low, when judged on the ratio between the number of potential active agents and the number of drugs released to the market. This inefficiency can be explained by the fact, that more than half of the possible drug leads fail the clinical studies [1], which in turn can be lead back on major toxic or low pharmacokinetic properties [2, 3]. Therefore, for humans dangerous properties have to be revealed as soon as possible in the pharmaceutical drug research. Investigations on drug detoxification in the body play an important role, because drugs can develop toxic properties, if they are not metabolized and eliminated efficiently from the body. The liver contributes the most to drug metabolism, since detoxification enzymes, like Cytochrom-P450-

## Summary

---

monooxygenase (**CYPs**) and UDP-glucuronosyltransferases (**UGTs**), are expressed abundantly in the liver cells hepatocytes.

The drug metabolism in the liver is distinguished classically into phase-I- and phase-II-reactions [4, 5]. Phase-I-reactions are generally characterized as functionalization reactions, because terminal groups, like -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH or -COOH, are implemented or removed, which increases the hydrophilicity of the compound. The most dominant contribution to Phase-I-catalyzed reactions is provided by CYPs, which are localized in every organ, but are most abundant with the highest activity in the liver, and are present in a great number of isoenzymes in diverse families and subfamilies [6]. CYP3A- and CYP2C-subfamilies have the biggest portions in humans with 30% and 20% of the total hepatic CYP amount, respectively. Conditional on genetic differences and polymorphism, CYP enzymes show a very high inter-individual variability in their expression level [7-10]. Moreover, CYPs show a very low specificity towards substrates [11], which is very significant for CYP3A4, because this enzyme contributes to the degradation of 50% of so far investigated drugs and other xenobiotics [12].

Furthermore, phase-II-reactions, which are characterized as conjugation reactions, are very important to drug metabolism in hepatocytes. Hereby, larger molecules from the endogenous metabolism, like glucuronic acid or sulfuric acid are bound to the drug to increase the hydrophilicity again or to inactivate potent toxic phase-I-metabolites and other compounds [13]. Therefore, phase II is often considered to be the main detoxification step, which often follows up phase I, but also can occur without preceding phase I. Most prominent phase-II-enzymes are glucuronic acids transferring UGTs, from which seven isoenzymes are considered to be important for the drug metabolism in liver [14]. The most important phase-II-enzymes in the protection against oxygen radicals is glutathione-S-transferase (GST), which eliminates dangerous radicals by binding them to the sulfur atom of glutathione.

Additionally, the transport contributes essentially to drug elimination in the import into and the export out of the hepatocytes, which is therefore referred to as phase-III [15]. The excretion of phase-I and -II-metabolites out of the body occurs either via the kidneys in the urine or via the intestine in the feces. In the first case metabolites are exported back into the blood plasma, in the second case they are exported into the bile canaliculi. Drugs are imported from the blood into the hepatocytes per the enzyme group of organic anion transport proteins (**OATPs**) and exported from the hepatocytes into the blood or the bile canaliculi per the big group of ATP-binding transport cassette transporters (ABC) [16]. The most prominent proteins of the last group in the liver are the multidrug resistance proteins (**MDRs**), to whom

---

also P-glycoprotein (PGP) belongs to, and the multidrug resistance related proteins (**MRPs**). Besides these active transport systems, passive diffusion plays an important role in the drug elimination, especially in the case of lipophilic drugs [17].

The robustness, which has a systems theoretical background, is a major property of the detoxification system and guarantees, that the functionality of a system can be maintained against internal and external perturbations [18, 19]. This is a property of several biological systems [20-25] and is very likely caused by evolution, since robustness is a feature to seek for survival. Therefore, evolution led to redundant functionalities, modular constructed networks and variable mutations [18], to be able to adapt continuously to changes in environmental circumstances. The modularity of drug metabolism, which can be structured in phase I, II and III, and the redundancy of the great number of unspecific isoenzymes guarantee, that this chemical immune system can maintain functionality against diverse impacts like changing drug administration or dose, low pharmacokinetics of a certain isoenzyme, genetic deficiencies by polymorphisms or disease, or drastic inhibition effects by other compounds.

On the one hand, the variability of the individual enzymatic phenotype in the detoxification system is the result of the evolution directed development. On the other hand, this variability is also caused by individual factors, like sex, age, nutrition, gene defects, and other biological effects. Eventually, this variability must not get into conflict with the therapeutic window of the drug, which sets the borders for the drug metabolisms: The drug must not be degraded too fast, otherwise it will lose its efficacy in the body, and the drug must not be degraded too slowly, otherwise it might cause severe side effects or leads to death caused by dangerous toxicity. Therefore, this therapeutic window is limited individually by efficacy and toxicity. Totally, the inter-individual variability necessitates a comprehensive and diversified population-statistics based risk assessment of toxicity in the pharmacological research.

In the last decades intensified computational technologies and high-throughput-datasets were used, to deepen the knowledge about detoxification of drugs, and to improve *in-silico* based predictions. The application of systems biology approaches promises a great progress, since systems biology attempts to describe processes and interactions in its entity of metabolic reaction pathways, signal transduction and gene regulation on all different levels from the molecules to the cell to the organ in a quantitative way [26-28]. Current activities in computation and model based investigations are for example in the field of

- 1.) describing quantitative structure activity relationships (QSAR) of detoxification enzymes [29-34], transport proteins [35] and receptors [35-37]. Further important

## Summary

---

aspects are physicochemical properties of substances, like solubility and permeability, which are deduced from the molecule structure [38-41].

- 2.) modeling of *in-vivo*-kinetics based on metabolic data from recombinant enzymes, hepatic microsomes and human hepatocytes for the prediction of *in-vivo*-processes (IVIVE) [42].
- 3.) physiologically based pharmacokinetic modeling (PBPK) [43-47], which includes the physiological, anatomical and chemical aspects of adsorption, distribution, metabolism and elimination (ADME) [48-51] in a multi-scale multi-compartment model of the whole body [52].

Next to these mathematical complex model simulations different efforts were forced in the computer supported modeling, where on the basis of high-throughput-data from drug-stimulus-response- or -time-series-approaches information on the level of the cell, tissue, organ or whole organisms is generated.

## Objective

A critical assessment of hitherto existing approaches in the modeling of drug metabolism in hepatocytes shows, that there is a high necessity of detailed and high quality network-models with focus on the dynamic processes in liver cells, which enable reliable predictions of drug metabolism. Therefore, the modeling has to exceed the description of single reaction kinetics, has to consider the inter-individual-variability of the detoxification system, has to lay a main focus in the model development on the estimation of parameter sensitivities and optional model reduction procedure, and include several other aspects. Besides the problem of parameter identifiability potential parameter correlations play an important role, which are often observable in biological systems.

Another main focus in the investigation of detoxification metabolism has to be set on the distinct variability of the enzymatic phenotype. These individual differences have a strong influence on the drug metabolism in the liver and therefore should be considered in the prediction of toxicity. For example, this inter-individual variability could lead to the circumstance that declared detoxification pathways, which are observed in activity measurements on recombinant enzymes, are not distinct in certain individuals. In the dynamic analysis of toxicity this variability should be considered by the implementation of protein data distributions of a significant statistical part of the population.

The importance of the inter-individual variability was already discussed detailed by Rostami-Hodjegan and Tucker [42] in the context of IVIVE. A great progress was made by



---

this group in the strategy, which enables simulation of drug degradation distributions based on a virtual liver population. The main idea in this approach is the picturing of the inter-individual variability in the estimation of individual  $r_{max}/K_M$  values, based on investigations on recombinant enzymes, individual liver microsomes and primary or cryoconserved hepatocytes. This promising approach can be improved further by the differentiation of  $r_{max}$  and  $K_M$ . This concept, which is a part of this doctoral work, allows the high quality implementation of proteomics and the prospective connection to the gene regulatory network, which is also responsible for variations in the expression level of enzymes, transporters and receptors [53].

The drug metabolism in the liver is generally described mathematically in a set of ordinary differential equations (ODE), where the time-dependent change of drug substrate and metabolites is effected by corresponding reactions and transport steps. The enzymatic reaction steps of drug metabolism in phase I and II are usually described by Michaelis-Menten- and derived kinetics. In contrast to typical single reaction kinetics, CYP-isoenzymes should be considered as catalyzers for the simultaneous drug metabolism of different substrates, which occurs very probably in the liver in the case of administration of several drugs or the degradation of several metabolites of a drug. Therefore, the kinetics of alternative substrate degradation to alternative products is derived and used in this work, which is a very simple assumption of the degradation kinetic, but reflects the competition of different substrates at the CYP-isoenzymes as well as the synthesis of different products per drug. The actively mediated transport mechanisms are classically described in Michaelis-Menten-kinetic, where on the assumption of low concentrations under *in-vivo* conditions or relatively low concentrations in comparison to the  $K_M$ -value of contributing transport proteins in *in-vitro*-examinations, a first-order kinetic can be applied [54]. In the case of very lipophilic compounds, passive diffusion might play an important role, since the lipid double membrane is a very weak barrier against lipophilic compounds, and therefore allows for a good permeability.

The model identification based on experimental metabolite-data can be performed in an initial rate or in a time-series approach. Initial rate approaches are appropriate for the investigation of single reaction kinetics and capture the initial degradation of substrate or the initial synthesis of the product. The differential equation system is therefore approximated by a difference system, which demands the examination in short time span with linear concentration change. Hereby, the identification of a drug metabolism model with several reactions necessitates a high experimental effort, especially to picture all kinetics of

## Summary

---

contributing isoenzymes and further possible inhibition mechanisms of metabolites. Therefore, in case of larger networks, the method of model identification per time-course approach is preferred, which has the advantage of the reflection of the entire dynamic situation during detoxification. In this approach the differential equations are integrated numerically and the model parameters are identified simultaneously by the fit of model predicted concentration-time-profiles to experimentally observed time-series data in a local or global parameter estimation algorithm. The advantage of this time-series determination is the comparably low experimental effort, because the metabolite concentrations are collected simultaneously at each time-point. The disadvantage is that reaction kinetics have to be established *a-priori*. Time-series approaches are therefore appropriate for relatively large networks and have been applied successfully in previous studies on the identification of large-scale networks of central carbon metabolism, for example *S.cerevisiae* [55, 56], *E.coli* [57, 58], or hepatocytes [59, 60]. In this work, both initial rate determination on hepatic microsomes and time-series determination on primary human hepatocytes are presented.

This work, which concentrates on the dynamic analysis of drug metabolism in hepatocytes, sets the focus on the modeling of this network in phases I, II and III, in the model identification on basis of experimental data on the analysis of parameter identifiability, which is associated with the robustness of the system, and on the prediction of individual drug degradation on the basis of individual CYP and UGT proteome data.

## Experimental cooperation

In the experimental field of this work, close co-operations existed both with work groups in the platform “Cell biology” in the “Hepatosys” network in the supply with primary human hepatocytes and with Subprojects SP3 and SP8 in the network Stuttgart “Detoxification” (see chapter 1.1) in the planning, design and conduction of experiments and the exploitation of data essential for modeling. The basis of the experimental work are the hepatocytes, which were provided by the working groups Weiss (Laboratory Regensburg), Thasler (Laboratory Munich) and Nüssler (Laboratory Berlin) of the platform “Cell biology”. In the working group of Uli Zanger at the Dr. Margarete Fischer-Bosch Institute of Clinical Pharmacology (IKP, Stuttgart) human hepatocytes were used long-time for the establishment of a liver data bank. This liver bank consists of a large number of individual liver samples (N>300), which have been used at IKP for the investigation of molecular biologic and biochemical properties of drug metabolizing enzymes, as well as their variability in population.

In the context of the cooperation within the network Stuttgart “Detoxification” (see **chapter 1.1**) of subproject SP3 (working group Uli Zanger, IKP) with SP5 (working group

---

Matthias Reuss, IBVT) experiments with the model drugs dextromethorphan (**DT**) and propafenone (**PF**) were designed together in an initial rate approach on human microsomes of one individual of the liver bank, conducted by Tanja Saubele in SP3 (IKP), and the gained data was used for the modeling in the first part of this work (see **chapter 3**). Furthermore, protein concentrations of CYP- and UGT-enzymes were determined on a statistically significant subset of individuals of the liver bank (N=150, composition made by Uli Zanger) by Tanja Saubele and Stephan Riedmaier in subproject SP3 (IKP) and provided for the model simulation and analysis of inter-individual variability in this work. In subproject SP5 (IBVT) primary human hepatocytes were used for the time-series experiments with the model drug atorvastatin (**AS**) in this work. After delivery from the “Cell biology” groups, and the cultivation by Gaby Vacun in subproject Z2 (IBVT), the time-series experiments with the stimulus of the drug were conducted by myself under assistance of Gaby Vacun and samples were prepared for quantitative metabolite and protein determinations (see **chapter 4**). The quantification of metabolite concentrations and of UGT1A3-protein concentrations in these samples of primary human hepatocytes was conducted by the colleagues Saussele and Riedmaier in subproject SP3 (IKP), and the absolute quantification of CYP3A4- and UGT1A1-protein concentrations was performed by Elmar Langenfeld and Anke Schnabel in subproject SP8 (working group Katrin Marcus, MPC Bochum).

## Conclusion and outlook

The investigation on drug metabolism in this work showed, that the modeling and simulation of metabolism and transport mechanisms in liver cells are essential elements in the prediction of toxicity of drugs. Important roles are played by quantitative determination of model parameters as well as by qualitative judgment of parameter identifiability, comprising sensitivities and correlations. Only a high quality modeling enables the prediction of pharmacokinetic properties of the drug in the liver, and further, the prognosis of the inter-individual extent and the statistical analysis in population.

Due to the fact, that the metabolism of drugs in liver cells is catalyzed by an enzyme system, which can be structured modularly in phase I and phase II, and that this enzyme system consists of a great number of isoenzymes, this network marks a relatively robust system. This result could be shown both in the topological structure analysis on the basis of elementary flux modes as well as in the global analysis of parameter sensitivities. Moreover, caused by a variety of evolutionary, biological, nutritional and environmental factors, a high inter-individual variability is existent in this system, which displays a compensating fragility and which individually might lead to toxicity due to slow degradation or inactivity due to fast

## Summary

---

degradation and elimination. Consequently, the detailed modeling of the isoenzyme system and the individual characteristic plays an important role, which was considered in this work. The decoding of the reaction kinetics and the differentiation between  $r_{max}$  and  $K_M$  enable the implementation of patient specific data in these parameters, and following, the investigation of the individual extent of metabolism. In this work, this individual aspect was investigated on the basis of statistically significant samples of CYP- and UGT-protein data. This study showed that the isoenzyme system exhibits clear differences in the prediction compared to a reduced model structure with the master enzymes in phase I only, and that this reduced model structure could lead to wrong predictions.

However, this study also showed that this isoenzyme system is hardly identifiable on the basis of experimental data from hepatic microsomes, because the parameter estimation in different parallel initial conditions leads to varying parameter sets, and that the system inherits insensitive and non-identifiable parameters. Even if the variability in the estimated parameters reflect the variability in the enzymes, this obvious insensitivity in the parameters did not lead to a reliable prediction of the inter-individual variability of drug metabolism in hepatocytes. The identifiability of the isoenzyme system can be improved, when  $K_M$ -parameters are not estimated but given *a-priori*. However, the parameter estimation showed that again only few isoenzymes suffice to describe the experimental data, but the whole isoenzyme structure is not necessary.

Therefore, the model identification on an individual charge of liver microsomes only allows the observation of the isoenzymes, which are distinctly expressed and active, and the identification of several isoenzymes, when they can be resolved experimentally, which means, that they have different  $K_M$ -parameters. Thus, the model simulation on an individual, which has a certain isoenzyme with a relatively high expression and activity, but could not be identified in the reference microsomes, meaning vanishing  $r_{max}$  corresponding to a very low expression, leads to a wrong prediction of drug metabolism in the named individual. A further problem in the investigation of drug metabolism on human hepatic microsomes is due to the fact, that the kinetic of potential several isoenzymes cannot be distinguished easily from the potential kinetic of a single enzyme with several catalytic centers.

Consequently, the results of this work show, that the detailed investigation of reaction kinetics on recombinant isoenzymes is more promising and meaningful than on liver microsomes, in the case, that several isoenzymes catalyze the degradation of parent drug to each product. Thus, the model identification can be liberated from the limits of the enzyme set-up in the reference system and from the non-resolvable superimposed contribution of

---

several isoenzymes. Under the application of high-throughput-systems the complex reaction kinetics at CYP-enzymes could be resolved further and the approach of alternative substrate degradation to alternative products might be transferred to allosteric enzymes with more complex reaction mechanisms [61] in the future.

In the first section of this work, the modeling of drug metabolism based on human microsomes and recombinant isoenzymes was an essential preliminary step in the investigation, but reflects an isolated point of view, because the transport is not considered. Transport steps, however, play an important role in the elimination and the excretion of drugs out of the liver cells, and thus out of the body. Therefore, transport mechanisms were considered in the second part of this work. The model identification based on experimental data from primary human hepatocytes shows in similar way to the model verification on microsomes insensitive and linear correlating parameters, mainly in the transport steps, which can very probably be led back to the constraints of the experimental observation. A possibility of model reduction on the basis of a local parameter sensitivity analysis could be depicted successfully in this work, which directed to sensitive parameters and thus would permit reliable model predictions. However, the model verification should be complemented in the future by the implementation of additional data from investigation on recombinant transport systems. Thus, the kinetics of transport steps of contributing proteins could be identified separately, and further be distinguished from passive diffusion, which might be important to lipophilic compounds. Due to the fact, that the prediction of inter-individual variability is dependent on quantitative protein data, the further improvement of quantitative analytics of CYP- and UGT-proteins and the corresponding development of methods for the transport proteins, OATP, MDR and MRP, has to be continued.

Because the effort of experimental validation increases unproportionally high with the complexity of the system, computational simulations of association and dissociation of drugs at the active site of enzyme on the molecular level plays an important role in the future. Efforts in this direction were made in the subprojects SP1 and SP2 (network Stuttgart “Detoxification“, **see chapter 1.1**) in the prediction of reaction pathways and enzyme partners on the basis of the physicochemical properties of the substances of interest. A possible improvement of these methods to the prediction of mechanistic model parameters, like enzyme activity ( $k_{cat}$ ) and enzyme affinity ( $K_M$ ), and their distribution in population would also enable the consideration of putative inter-individual variability of these parameters [62, 63], which is very likely caused by the widely known polymorphisms. The distributions could

## Summary

---

be implemented into the dynamic analysis via derived relative-activity-factor-(RAF)-approaches [42, 64] and stochastic-deterministic modeling approaches.

Finally the modeling and dynamic analysis of drug metabolism must not stay on this level of isolated point of view, which means separated from the other processes in the liver cells. In the second funding phase, the investigation in the network Stuttgart “Detoxification” on statin substrates displayed the tight connection of drug metabolism, central carbon metabolism and gene regulation. Besides the supply of cofactors and -metabolites the central carbon metabolism plays an important role in the interaction of xenobiotics and endogenous compounds in common metabolic pathways under normal and dysfunctional conditions. Furthermore, pharmacokinetic and pharmacodynamics of Statins is located in the same cellular compartment, the liver cells. Additionally, statins are known to induce the gene regulation of their degradation enzymes and transport proteins, after binding to nuclear receptors and interaction with transcription factors. Therefore, future efforts should be laid in the coupling of the drug metabolism module with the module of central carbon metabolism, worked out by Klaus Maier in subproject SP7, and with the module of gene regulation, worked out by Prem K. Murugan in subproject SP5 (network Stuttgart “Detoxification“, see **chapter 1.1**), which would enable the holistic simulation of drug metabolism in context to all other processes in the cell under diverse functional and dysfunctional conditions.

A further potential of this modeling is the implementation in multi-scale multi-compartment models, derived with the approach of physiologically based pharmacokinetic modeling (PBPK) for example in software environments like PK-Sim [47]. Thereby, holistic simulations under simultaneous consideration of the systemic process in the body, would allow the investigation of the influence of other individual factors, like blood flow or fat contingent of the body, and of the influence of the central metabolism in other organs, like intestine and stomach. In this frame, the inter-individual *in-silico*-prediction could be improved and a further progress in the development of individualized medicine could be arrived.

Parts of this work will be published in the research article “A Systems Biology Approach to Dynamic Modeling and Inter-Subject Variability of Statin Pharmacokinetics in Human Hepatocytes” (authors: Joachim Bucher, Stephan Riedmaier, Anke Schnabel, Katrin Marcus, Gabriele Vacun, Thomas S. Weiss, Wolfgang E. Thasler, Andreas K. Nüssler, Ulrich M Zanger, Matthias Reuss) in the journal BMC Systems Biology (status: editorially accepted).

# 1 Einleitung

## 1.1 Kontext

Diese Arbeit wurde im Rahmen des nationalen BMBF-Verbundprojektes „Systembiologie – Systeme des Lebens“ als Teilprojekt des Kompetenznetzwerkes „Hepatosys“ im Netzwerk Stuttgart „Detoxifikation“ am Institut für Bioverfahrenstechnik (**IBVT**) gefördert.

Das Netzwerk Stuttgart war seit Anfang der Förderphase im Jahr 2004 Teil des Kompetenznetzwerkes „Hepatosys“ (<http://www.hepatosys.de>), das sich aus insgesamt vier Netzwerken und zwei Plattformen zusammensetzte, und sich die systembiologische Untersuchung der Vorgänge in Leberzellen zum Ziel gesetzt hatte. Der Schwerpunkt im Netzwerk Stuttgart lag in der Analyse der Detoxifikation von Fremdstoffen, insbesondere Arzneimittel, in Leberzellen, sowohl in fundierten experimentellen Untersuchungen als auch in der Entwicklung von computergestützten Modellierungsansätzen zur quantitativen Prädiktion. Das Netzwerk Stuttgart gliederte sich zum Stand der zweiten Förderphase, von 2007 bis 2009, in elf inhaltliche Teilprojekte, SP1 bis SP11, die verschiedene Themen in der experimentellen Untersuchung und in der Modellierung bearbeiteten, sowie in drei zentrale Teilprojekten, Z1 bis Z3, die für organisatorische Aufgaben in der Projektkoordination, Zellkultivierung und im internen Datenmanagement verantwortlich waren (**Abb. 1**).

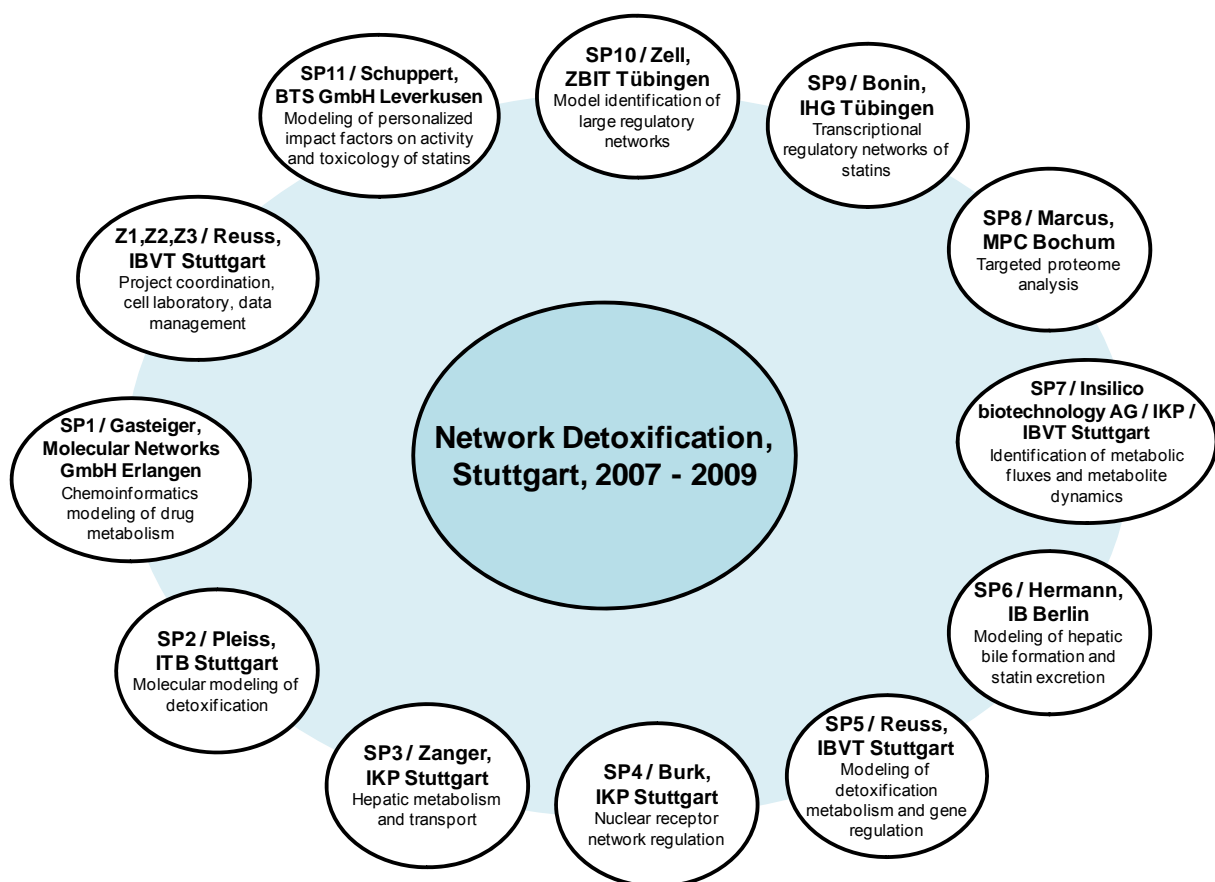
Im Rahmen dieser Arbeit bestanden insbesondere sehr enge Kooperationen mit folgenden Teilprojekten des Netzwerks:

- 1.) Mit dem Teilprojekt SP3 (Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie, **IKP**): Planung, Durchführung und Analyse von experimentellen Untersuchungen des Arzneimittelmetabolismus. Die Versuche zum Abbaumetabolismus an Lebermikrosomen, die quantitative Messung der Metabolite an Lebermikrosomen und primären Hepatozyten, die Bestimmung der UGT-Proteine wurden von Mitarbeitern des Projektleiters Prof. Dr. U. Zanger durchgeführt. Außerdem wurden CYP- und UGT-Proteindaten einer umfangreichen Datenbank an Lebermikrosomen für dynamische Simulationen zur Verfügung gestellt.
- 2.) Mit dem Teilprojekt SP8 (Medizinisches Proteom Center, **MPC**): Durchführung und Analyse von CYP3A4- und UGT1A1-Proteinkonzentrationen an primären

Hepatozyten. Quantitative CYP3A4- und UGT1A1-Proteinbestimmungen wurden von Mitarbeitern der Projektleiterin Prof. Dr. K. Marcus durchgeführt.

3.) Mit dem Teilprojekt SP7 (Insilico biotechnology AG) in der Adaption eines geeigneten globalen Parameterschätzverfahrens zur Modellidentifikation und in der Bereitstellung des Software-Tools *Insilico discovery*.

Weitere Kooperationen bestanden in der Identifikation der am Abbaumetabolismus beteiligten CYP-Isoenzyme mit SP1 und SP2, in dem Transfer des Detoxifikationsmodells der Statine für Simulationen an Ganzkörper-skalierten Multikompartment-Modellen mit SP11, und in der Kultivierung und in den Experimenten an primären humanen Hepatozyten mit Z2.



**Abb. 1:** Struktur der Teilprojekte im Netzwerk Stuttgart „Detoxifikation“ im Kompetenznetzwerk „Hepatosys“, Teil der BMBF-Förderinitiative „Systembiologie – Systeme des Lebens“, in der zweiten Förderphase (2007-2009).

Die Aufgaben im Teilprojekt SP5 umfassten die mathematische Modellierung und dynamische Analyse des Arzneimittelmetabolismus, was Bestandteil dieser Arbeit war und in dieser schriftlichen Ausarbeitung im folgenden detailliert beschrieben wird, und der Genregulation des Arzneimittelabbaus, was Bestandteil der Arbeit von meinem Kollegen Prem Kumar Murugan im SP5 war.



---

## 1.2 Hintergrund

Die Effizienz in der heutigen Arzneimittelforschung und -entwicklung ist in Bezug auf das Verhältnis zwischen der Anzahl entdeckter potentieller Wirkstoffe und der Anzahl der auf dem Markt erscheinenden Arzneimittel sehr gering. Diese Ineffizienz ist darauf zurückzuführen, dass mehr als die Hälfte aller möglichen Arzneimittelkandidaten in den klinischen Studien durchfallen [1], was wiederum zu einem großen Teil auf erhebliche toxische oder geringe pharmakokinetische Eigenschaften zurückzuführen ist [2, 3]. Daher müssen für den Menschen potentiell gefährliche Eigenschaften von Arzneimittelkandidaten so früh wie möglich in der pharmazeutischen Arzneimittelforschung aufgedeckt werden.

Untersuchungen zur Detoxifikation von Arzneimitteln im Körper spielen dabei eine wesentliche Rolle, da Arzneimittel toxische Eigenschaften entwickeln können, wenn sie vom Körper nicht effizient genug abgebaut oder ausgeschieden werden. Den größten Beitrag zur Detoxifikation liefert die Leber, da die Leberzellen Detoxifikationsenzyme, wie Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYPs) oder UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT), in großer Menge exprimieren.

Der Arzneimittelmetabolismus in der Leber wird klassischerweise unterschieden in Phase I und Phase II-Reaktionen [4, 5]. Die Phase I Reaktionen werden generell als Funktionalisierungsreaktionen charakterisiert, da funktionelle Endgruppen, wie -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH oder -COOH eingeführt oder freigesetzt werden, was zur Erhöhung der Hydrophilität führt. Dadurch kann aber auch die chemische Reaktivität der Substanz erhöht werden, was bedeutet, dass das Arzneimittel durch die Phase I erst zu pharmakologisch aktiven Metaboliten umgewandelt wird, was als Bioaktivierung bezeichnet wird, oder zu reaktiven Zwischenstufen mit deutlich höherer Toxizität führt und gefährliche Hepatotoxizität verursachen kann [15, 65].

Den größten Beitrag zu den Phase I katalysierenden Reaktionen liefern die CYPs, die in allen Organen vorkommen aber die höchste Aktivität in der Leber aufzeigen, und in großer Zahl an Isoformen in diversen Familien und Subfamilien vertreten sind [6]. Den größten Anteil bilden im Menschen die CYP3A- und CYP2C-Subfamilien mit 30% beziehungsweise 20% der gesamten hepatischen CYP-Menge [7]. Die CYP-Enzymgruppe weist bedingt durch genetische Unterschiede und Polymorphismen sowie durch individuelle Unterschiede in der Regulation der Expression eine hohe inter-individuelle Variabilität im Expressionslevel [7, 8] auf. Bei CYP3A4 wird von einer 5-37-fachen [8, 9], bei CYP2D6 von einer über 50-fachen [8] und bei CYP2B6 sogar von einer bis zu 100-fachen Variabilität [10] berichtet. Des

## Kapitel 1 Einleitung

---

Weiteren weisen die CYP-Enzyme eine mangelnde Spezifität gegenüber potentiellen Liganden auf [11]. Am signifikantesten zeigt sich dies bei CYP3A4, da es am Abbau von 50% aller bislang untersuchten Arzneimittel und anderen Fremdstoffen beteiligt ist [12].

Ein weiterer Punkt, der in der Toxizität von Arzneimitteln eine besondere Rolle spielt, ist der oxidative Stress durch Sauerstoffradikale, wie Superoxidradikale, Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid, die in den Phase I Oxidationsreaktionen gebildet werden. Zwar werden diese toxischen Stoffe auch in der Atmungskette gebildet, und die Zellen haben diverse Schutzmechanismen, um diese Stoffe effizient zu entgiften, jedoch könnten unter erhöhter und langandauernder Medikation diese Sauerstoffradikale schädlichen Einfluss haben und zur Bildung von Krebs führen.

Daher sind die Phase II-Reaktionen, die als Konjugationsreaktionen charakterisiert werden, von großer Bedeutung. In diesen Reaktionen werden größere Molekülgruppen aus dem endogenen Metabolismus, wie Glucuronsäure oder Schwefelsäure, übertragen, damit die Hydrophilität weiter erhöht wird und potentiell toxische Stoffe inaktiviert werden [13]. Die Phase II wird deshalb oft als eigentlicher Detoxifikationsschritt nachfolgend zu der Phase I angesehen, kann aber auch in einigen Fällen ohne vorhergehende Phase I stattfinden. Die prominentesten Phase-II-Enzyme sind die Glucuronsäure übertragenden UGTs, von welchen sieben Enzyme als wichtig für den Arzneimittelmetabolismus in der Leber gelten [14]. Als wichtigstes Enzym im Schutz gegen Sauerstoffradikale wird außerdem das Phase-II-Enzym Glutathion-S-Transferase (GST) eingeschätzt, das gefährliche Radikale über eine Bindung an das Schwefelatom von Glutathion abfängt.

Einen weiteren essentiellen Bestandteil der Detoxifikation bildet schließlich der Transport von Arzneimitteln in die und aus den Hepatozyten, was auch als Phase III bezeichnet wird [15]. Die Ausscheidung der Phase-I- und Phase-II-Metabolite aus dem Körper erfolgt generell auf zwei Wegen, entweder über die Nieren im Urin oder über den Darm im Stuhlgang. Im ersten Fall werden hydrophile Stoffe aus den Leberzellen in das Blut zurück und im zweiten Fall in die Gallengänge transportiert. Die aus dem Blut in die Leber transportierenden Enzyme zählen zu der Gruppe der *organic anion transport proteins* (**OATP**) und die aus der Leber in die Gallengänge oder zurück ins Blut transportierende Proteine zu der großen Gruppe der *ATP-binding transport cassette transporters* (**ABC**) [16]. Prominenteste Vertreter der letztgenannten Gruppe sind in der Leber die *multidrug resistance proteins* (**MDR**), wozu auch das P-Glykoprotein (PGP) zählt, und das *multidrug resistance related protein* (**MRP**). Neben diesen aktiven Transportschritten spielt auch die passive Diffusion eine potentielle

Rolle in den Transportmechanismen von Arzneimitteln, was bei lipophilen Arzneimitteln als relativ bedeutender Faktor eingeschätzt wird [17].

Eine sehr umfangreiche und wertvolle Studie zu Transportvorgängen wurde von Bartolomé et al. an mit den für das gewählte Modells substrat wichtigen Transportern transfizierten und polarisierten MDCKII-Zellen durchgeführt [54]. In diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass in der Modellierung neben den bekannten wichtigen Transportproteinen weitere basolaterale und apikale Transportvorgänge berücksichtigt werden müssen, um die experimentellen Daten in ausreichender Qualität beschreiben zu können, was auf weitere wahrscheinlich beteiligte Transportproteine zurückgeführt wurde. Damit wird klar, dass die Transportvorgänge eine wichtige Rolle in der Elimination von Arzneimitteln spielen, aber auch, dass diese wiederum ein komplexes und sehr wahrscheinlich redundantes und inter-individuell variables System darstellen.

Eine bedeutende Eigenschaft des Arzneimittelmetabolismus in der Leber stellt die Robustheit der Detoxifikation dar. Die Robustheit, die einen systemtheoretischen Hintergrund hat, gewährleistet, dass die Funktionalität eines bestimmten Systems unter allen Umständen, das heißt gegenüber internen und externen Störungen, aufrecht erhalten werden kann [18, 19]. Dies ist eine Eigenschaft vieler biologischer Systeme [20-25] und hat sehr wahrscheinlich evolutionsbedingten Hintergrund, da Robustheit ein anzustrebender Zustand zum Überleben ist, und führte daher zu redundanten Funktionalitäten, modular aufgebauten Systemen und variablen Mutationen [18], um sich permanent verändernden äußeren Umständen anpassen zu können. Dass die Leber robuste Eigenschaften bezüglich des Fremdstoffabbaus aufweist, zeigt sich in beeindruckender Weise darin, dass sie in der Lage ist, tagtäglich tausende endogene Schadstoffe abzubauen, inklusive neuer synthetischer Stoffe wie Arzneimittel, die sie vorher noch nie in der Entwicklungsgeschichte „kennengelernt“ hat. Die Modularität des in Phase I, II und III strukturierbaren Fremdstoffmetabolismus und die Redundanz durch die hohe Zahl an unspezifischen Isoformen der CYPs und UGTs gewährleisten dabei, dass dieses chemische Immunsystem aufgrund diverser Einflussfaktoren wie wechselnde Medikation oder Dosierung, geringe Aktivität eines bestimmten Isoenzym, genetische Defizite durch Polymorphismen oder Krankheiten oder drastische Inhibierungseffekte durch andere Stoffe nicht zusammenbricht.

Die Variabilität des individuellen enzymatischen Phänotyps ist einerseits neben der Modularität und Redundanz im Detoxifikationssystem das Ergebnis der evolutionsbedingten Entwicklung, die es dem Menschen in der Evolutionsgeschichte ermöglichte, sich ständig neuen äußeren Umständen anzupassen und erfolgreich weiterzuentwickeln. Andererseits ist

diese Variabilität aber auch bedingt durch individuelle Faktoren, wie Alter, Geschlecht, Ernährungsweise, medizinische Geschichte, Gendefekte und andere biologische Einflüsse. Ein bekanntes Beispiel zur äußeren Beeinflussung des Detoxifikationssystems in der Leber durch Nährstoffe beziehungsweise Kräuter stellt die Induktion von CYP3A4 und PGP durch Substanzen im Johanniskraut dar [66]. Letztendlich bedeutet diese Variabilität, dass potentielle Arzneimittel zum einen nicht zu schnell abgebaut oder ausgeschieden werden dürfen, damit sie ihre Wirksamkeit im Körper entfalten können, zum anderen aber in keinem Individuum schwerwiegende Nebenwirkungen verursachen und erst recht nicht zu Todesfällen aufgrund Toxizität führen dürfen. Damit ergibt sich für Arzneimittel ein gewisses therapeutisches Fenster, das in der Zeitdauer individuell durch Wirksamkeit und Toxizität begrenzt wird. Diese inter-individuelle Variabilität erfordert eine sehr umfangreiche und populationsstatistisch breit gefächerte Risikoabschätzung der Toxizität in der pharmakologischen Forschung.

In den letzten Jahrzehnten wurden verstärkt computerbasierte Technologien und Hochdurchsatz-Datenmengen eingesetzt, um das Verständnis über die Detoxifikation von Arzneimitteln zu vertiefen, und die *in-silico* basierten Vorhersagen zu verbessern. Die Anwendung von systembiologischen Ansätzen verspricht dabei einen großen Fortschritt, da die Systembiologie versucht, Vorgänge und Wechselwirkungen in der Gesamtheit der metabolischen Reaktionswege und der regulatorischen Netzwerke auf allen verschiedenen Ebenen von den Molekülen, der Zelle, den Geweben bis hin zu den Organen zu beschreiben und diese quantitativ zu erfassen [26-28]. Dabei ist die Zeit ein wichtiger Faktor in der Systembiologie, da nicht statische eingefrorene Zustände untersucht werden wie zum Beispiel in klassischen molekularbiologischen Untersuchungen, sondern die zeitlichen Veränderungen der Komponenten und Vorgänge (dynamisches Verhalten) berücksichtigt werden.

Gegenwärtige Aktivitäten in der Computer- und Modell-basierten Untersuchung der Detoxifikation liegen zum Beispiel im Bereich

- 1) der Beschreibung von quantitativen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (*quantitative structure activity relationships*, QSAR). Dabei werden Methoden entwickelt, um auf Basis der Struktur von Molekülen die Wechselwirkung mit den wichtigsten Klassen von Proteinen, wie zum Beispiel Detoxifikationsenzyme [29-34], Transportproteine [35] und Rezeptoren [35-37], vorherzusagen. Weitere wichtige Gesichtspunkte sind die physikochemischen Eigenschaften von Substanzen, wie Löslichkeit und Permeabilität, die von der Molekularstruktur abgeleitet werden [38-41].

- 2) der Modellierung von *in-vitro*-Kinetiken auf Basis von metabolischen Daten an rekombinanten CYPs, Lebermikrosomen und Hepatozyten zur Vorhersage der *in-vivo*-Vorgänge (IVIVE) [42].
- 3) der physiologisch-basierten pharmakokinetischen Modellierung (*physiologically based pharmacokinetics*, PBPK) [43-47], die die physiologischen, anatomischen und chemischen Aspekte von ADME (*adsorption, distribution, metabolism, and elimination*) [48-51] in einem Multikompartment-Model des Körpers [52] berücksichtigt. Schon in 1970er Jahren wurden dazu kompartimentierte Modellierungsansätze zur Untersuchung der Elimination eines Arzneimittels über die Leber in Abhängigkeit von der Blutzirkulation erfolgreich entwickelt [67-70].

Neben diesen mathematisch komplexen Modellsimulationen werden auch verschiedenste Anstrengungen in der computergestützten Modellierung vorangetrieben, die auf Basis von großen Datenmengen aus Arzneimittel-Response-Experimenten Informationen auf der Ebene der Zelle, eines Gewebes, eines Organs oder sogar eines vollständigen Organismus generieren.

### 1.3 Zielsetzung

Eine kritische Bewertung bisheriger Ansätze in der Modellierung des Arzneimittelmetabolismus in Leberzellen zeigt auf, dass eine große Notwendigkeit besteht, detaillierte und qualitativ hochwertige Netzwerk-Modelle mit Fokus auf die dynamischen Vorgänge in Leberzellen zu erstellen, um zu verlässlichen Prädiktionen des Fremdstoffmetabolismus zu gelangen. Daher muss die Modellierung über die Erfassung der Kinetik von Einzelreaktionen hinausgehen, muss die inter-individuelle Variabilität des Detoxifikationssystems wiedergeben können, muss in der Modellevaluierung einen Schwerpunkt in die Erfassung von Parametersensitivitäten und eventuell resultierende Modellreduktion legen, und viele weitere Aspekte berücksichtigen. Die Bedeutung der Modellparametrierung wurde schon 1995 von Andersen im Bereich der PBPK-Modellierung zur Risikoanalyse der Toxizität diskutiert [43]. Neben dem Problem der Parameteridentifizierbarkeit spielen vor allem auch Korrelationen zwischen einzelnen Parametern eine große Rolle, die in biologischen Systemen häufig zu beobachten sind.

Ein weiteres Hauptaugenmerk bei der Untersuchung der Detoxifikation muss auf die ausgeprägten Unterschiede in den enzymatischen Phänotypen gerichtet sein. Diese individuellen Unterschiede haben einen großen Einfluss auf die Vorgänge der Detoxifikation

in der Leber und sollten daher in der Prädiktion der Toxizität mit berücksichtigt werden. Zum Beispiel können diese inter-individuellen Unterschiede dazu führen, dass deklarierte Abbauwege, die in Aktivitätsmessungen an rekombinanten CYPs bestimmt wurden, individuell nicht ausgeprägt sind. Diesem Sachverhalt ist unter anderem in der Anwendung der individualisierten Patientenbehandlung Rechnung zu tragen. In der dynamischen Analyse der Toxizität sollte diese Variabilität basierend auf quantitativen Proteindaten eines statistisch signifikanten Teils der Population berücksichtigt werden.

Die klassische Pharmakokinetik setzt in der kinetischen Beschreibung des Fremdstoffmetabolismus den Schwerpunkt in die Verwendung der *Clearance* ( $CL$ ) einer bestimmten Substanz [71], und geht dabei oft von einer Kinetik erster Ordnung aus,  $CL = r_{max}/K_M$  (mit maximale Rate  $r_{max}$  und Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$ ), da angenommen wird, dass die intrazelluläre Arzneimittelkonzentration sehr selten  $K_M$  überschreitet [72]. Der Vorteil dieser Beschreibung liegt darin, dass für die Ermittlung *in-vitro* unter der Bedingung, dass die Substratkonzentration viel kleiner als  $K_M$  ist, nur ein experimenteller Konzentrationspunkt nötig wäre [73]. Die Modellierung der Arzneimittel-Elimination durch die Leber wurde kürzlich in einer umfangreichen pharmakokinetischen Untersuchung in einem Multi-Kompartiment-Ansatz von Paine et al. durchgeführt [74]. Allerdings wurde hier wiederum  $CL$  als Parameter eingeführt und keine Differenzierung zwischen  $r_{max}$  und  $K_M$  vorgenommen, und des Weiteren auf die detaillierte kinetische Beschreibung der Metabolitbildung innerhalb der Leberzellen nicht eingegangen, sondern nur der Substratabbau berücksichtigt.

Diese vereinfachende Modellierung und Annahmen des Arzneimittelmetabolismus sind aus systembiologischer Sichtweise nicht ausreichend, um eine qualitativ hochwertige Prädiktion unter Berücksichtigung der inter-individuellen Variabilität zu erreichen. Um die Implementierung der inter-individuellen Variabilität zu ermöglichen, sind eine differenzierte Berücksichtigung der Metabolitbildung, der verschiedenen beteiligten Isoenzyme und die Unterscheidung zwischen  $r_{max}$  und  $K_M$ , sowie eine Untersuchung an humanen Leberzellen oder Zellfraktionen unumgänglich.

Die Bedeutung der inter-individuellen Variabilität wurde schon ausführlich von Rostami-Hodjegan und Tucker [42] im Zusammenhang mit IVIVE- (*in-vitro in-vivo* Extrapolation) Ansätzen erörtert. Ein sehr bedeutender Fortschritt wurde von dieser Gruppe in einer Strategie erreicht, welche Simulationen der Arzneimittelverteilung basierend auf einer virtuellen Leberpopulation erlaubt. Die grundlegende Idee in diesem Ansatz steckt in der Abbildung der inter-individuellen Variabilität in der Schätzung der individuellen  $r_{max}/K_M$ -Werte, basierend

auf Untersuchungen an individuellen menschlichen Lebermikrosomen, primären oder kryokonservierten Hepatozyten und rekombinanten Enzymsystemen. Dieser vielversprechende Ansatz könnte weiter verbessert werden, wenn die Auftrennung dieser beiden Parameter,  $r_{max}$  und  $K_M$ , weiter berücksichtigt wird. Dieses Konzept, welches ein Teil dieser Arbeit darstellt, wird mit dem Hintergrund verfolgt, dass dadurch die Implementierung von Proteomdaten und die zukünftige Verbindung mit dem regulatorischen Netzwerk, welches für die Variationen im Expressionslevel von Enzymen, Transportern und auch Rezeptoren verantwortlich ist, in einem qualitativ hohen Level ermöglicht wird [53].

Der Arzneimittelmetabolismus in der Leber wird, sofern die dynamische Modellierung adressiert wird, generell mathematisch in einem System gewöhnlicher Differentialgleichungen beschrieben, in dem die zeitliche Änderung des Arzneimittelsubstrates und der Metabolite durch entsprechende Reaktionsschritte und Transportvorgänge berücksichtigt wird. Die enzymatischen Reaktionsschritte im Metabolismus von Arzneimitteln in der Phase I und Phase II wird in pharmakokinetischen Untersuchungen üblicherweise in Michaelis-Menten- und abgeleiteten Kinetiken angesetzt. Umfangreiche Identifikationen von Reaktionskinetiken wurden in den letzten Jahrzehnten an rekombinanten CYP-Isoenzymen, hauptsächlich an CYP3A4, mit diversen Substraten durchgeführt. In einigen Untersuchungen wurde erörtert, dass CYPs sehr komplexe allosterische Enzyme mit mehreren Bindungsstellen und katalytischen Zentren darstellen und daher verschiedene homotrope und heterotrope Eigenschaften gegenüber Arzneimittelsubstraten aufweisen können [61, 75, 76]. Allerdings stellen diese reaktionskinetischen Modelle Systeme dar, in denen die Zahl der zu identifizierenden Parameter mit dem Grad der Komplexität stark ansteigt, und deshalb die Sensitivität der Parameter potentiell abnimmt. Daher sind solche Systeme nur mit einem enormen experimentellen Aufwand identifizierbar.

Des Weiteren berücksichtigen bisherige Untersuchungen nur den Abbau eines einzelnen Substrates, oder den Einfluss eines weiteren Substrates nur als Inhibitor an einer modulatorischen Effektorbindungsstelle. Kaum werden CYP-Isoenzyme jedoch als Katalysatoren für den simultanen Fremdstoffabbau von verschiedenen Substraten berücksichtigt, was in Leberzellen in dem wahrscheinlichen Fall der Medikation von mehreren Arzneimitteln auftreten dürfte. Eine weitere mögliche Situation tritt auch bei der Medikation eines einzelnen Arzneimittels auf, wenn das entsprechende Substrat im Körper zu einer weiteren Substratform umgewandelt wird, und beide Substrate an einem CYP-Isoenzym um den Abbau konkurrieren. Ein Beispiel für letztgenannte Situation wäre die

## Kapitel 1 Einleitung

---

Präsenz von Säure- und Laktonform von Statinen im Körper, die beide über CYP-Isoenzyme abgebaut werden. Daher wird in dieser Arbeit die Kinetik des alternativen Substratabbaus zu alternativen Produkten entwickelt und verwendet, die zwar eine recht einfache Annahme der Abbaukinetik darstellt, aber die simultane Konkurrenz von alternativen Substraten an CYP-Isoenzymen sowie die Bildung alternativer Produkte abbilden kann.

Bei den Transportmechanismen werden die aktiven enzymatisch katalysierten Transportmechanismen klassischerweise in einer Michaelis-Menten-Kinetik beschrieben, wobei in pharmakokinetischen Beschreibungen bei der Annahme relativ geringer Konzentrationen der Stoffe unter *in-vivo*-Bedingungen und der Voraussetzung relativ geringer Konzentrationen im Vergleich zum  $K_M$ -Wert der beteiligten Proteine in *in-vitro*-Untersuchungen eine Kinetik erster Ordnung angesetzt werden kann [54]. Bei stark lipophilen Stoffen können weitere Transportvorgänge wie passive Diffusion eine große Bedeutung haben, da die Lipiddoppelmembran der Zelle nur eine geringe Barriere für lipophile Stoffe darstellt und damit eine gute Permeabilität ermöglicht. Daher ist die Berücksichtigung von sowohl aktiven als auch passiven Transportmechanismen in der Modellierung in dieser Arbeit essentiell.

Die Modellidentifikation an experimentellen Metabolit-Daten kann entweder in einem Initialratenansatz oder einem Zeitreihenansatz durchgeführt werden. Initialratenansätze sind für die Untersuchung von Einzelreaktionskinetiken geeignet und erfassen den initialen Abbau des Substrates oder die initiale Synthese des Abbauproduktes. Das entsprechende Differentialgleichungssystem wird dabei in einem Differentialquotienten approximiert. Voraussetzung für die Initialratenbestimmung ist daher eine lineare Konzentrationsänderung über der Zeit, was die Untersuchung in sehr kurzen Zeitdauern im Minuten-Bereich bedingt. Damit ist aber auch leicht ersichtlich, dass die vollständige Identifikation eines Netzwerkes an Abbaureaktionen im Arzneimittelmetabolismus einen hohen experimentellen Aufwand bedeutet, um nicht nur die Einzelreaktionen über diverse Isoenzyme zu erfassen, sondern auch um weitere potentielle Inhibierungseffekte der Substrate oder Produkte identifizieren zu können. Daher wird bei größeren Netzwerken des Metabolismus, der Regulation oder der Signaltransduktion die Methode der Modellidentifikation über Zeitreihenansätze bevorzugt. Bei diesem Ansatz werden die Differentialgleichungssysteme numerisch integriert und die Modellparameter simultan durch die Anpassung der Modellvorhersage der Konzentrationsprofile an experimentelle Zeitreihendaten durch entsprechende lokale oder globale Parameterschätzverfahren bestimmt. Vorteile dieser Zeitreihenbestimmung liegen in dem vergleichsweise geringeren experimentellen Aufwand, da alle Metabolitkonzentrationen



pro Zeitpunkt simultan erfasst werden. Nachteil der Zeitreihenbestimmung ist der, dass die Reaktionskinetiken a-priori bekannt sein müssen. Die Zeitreihenbestimmung eignet sich folglich für relativ große Reaktionsnetzwerke und wurde unter anderem schon erfolgreich in der Identifikation von großskaligen Netzwerken des Zentralkohlenstoffwechsels, zum Beispiel in *S.cerevisiae* [55, 56], *E.coli* [57, 58] oder Hepatozyten [59, 60], eingesetzt. In dieser Arbeit werden beide Ansätze, Initialratenbestimmung an Lebermikrosomen und Zeitreihenbestimmung an primären humanen Hepatozyten, in der Modellidentifikation des Arzneimittelmetabolismus vorgestellt.

Diese Arbeit, die sich auf die dynamischen Analyse des Arzneimittelmetabolismus in Leberzellen konzentriert, setzt folglich den Fokus auf die Modellierung dieses metabolischen Netzwerkes in Phase I, II und III, in der Modellverifikation auf Basis von experimentellen Daten auf die Untersuchung der Parameteridentifizierbarkeit, die mit der Robustheit dieses Systems zusammenhängt, sowie auf die Vorhersage des individuellen Arzneimittelabbaus auf Basis von individuellen CYP- und UGT-Proteomdaten.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Experimentelle Zusammenarbeit

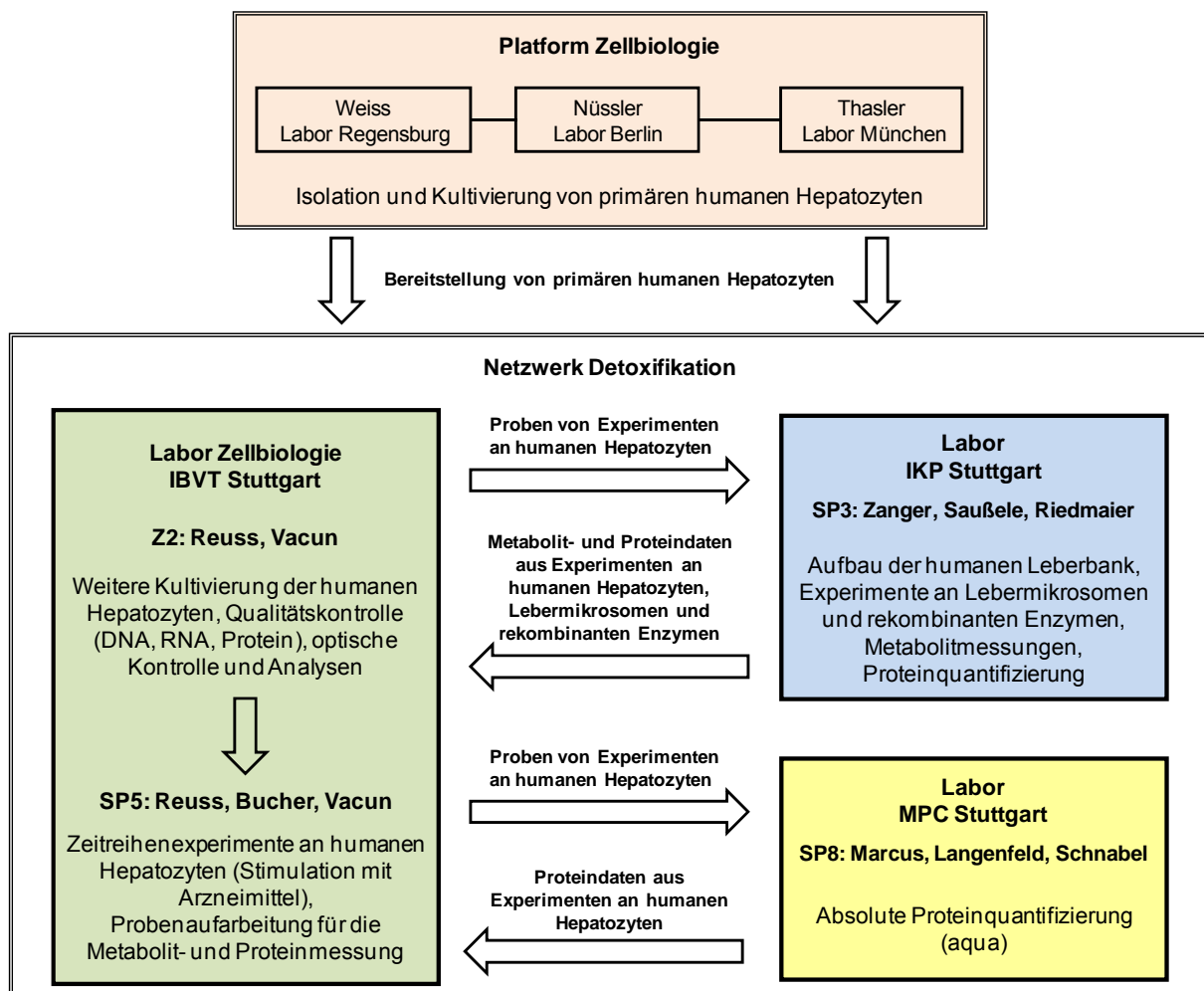
Im experimentellen Bereich dieser Arbeit bestanden enge Kooperationen sowohl mit Arbeitsgruppen in der Plattform Zellbiologie in der Bereitstellung der primären humanen Hepatozyten als auch mit den Teilprojekten SP3 und SP8 im Netzwerk Stuttgart „Detoxifikation“ in der Planung, Gestaltung und Ausführung der Versuche und der Gewinnung der für die Modellierung essentiellen Daten (**Abb. 2**). Grundlage für die experimentellen Versuche bilden die primären humanen Hepatozyten, die für Forschungszwecke von den Arbeitsgruppen Weiss (Labor Regensburg), Thasler (Labor München) und Nüssler (Labor Berlin) der Plattform Zellbiologie zur Verfügung gestellt wurden.

In der Arbeitsgruppe Zanger am IKP Stuttgart wurden in früherer Kooperation zu den Arbeitsgruppen Weiss, Thasler und Nüssler humane Hepatozyten zum Aufbau einer Leberdatenbank verwendet. Diese humane Leberbank besteht aus einer umfangreichen Anzahl an individuellen Leberproben ( $N > 300$ ), die am IKP unter anderem für die Untersuchung der molekularbiologischen und biochemischen Eigenschaften der Arzneimittelabbauenden Enzyme sowie deren Variabilität in der Population eingesetzt werden.

Im Rahmen der Kooperation im Netzwerk Stuttgart von Teilprojekt SP3 (Arbeitsgruppe Zanger, IKP, Stuttgart) (**Abb. 2** blau) mit SP5 (Arbeitsgruppe Reuss, IBVT, Stuttgart) (**Abb. 2** grün) wurden an Lebermikrosomenproben eines Individuums, das in der Leberbank erfasst ist, die Experimente mit den Arzneimitteln Dextromethorphan (**DT**) und Propafenon (**PF**) im Initialratenansatz gemeinsam konzipiert, von der Kollegin Saussele im Teilprojekt SP3 durchgeführt und die experimentell gewonnenen Daten für die Modellierung im ersten Teil dieser Arbeit von mir verwendet (siehe **Kapitel 3**). Des Weiteren wurden die Proteinkonzentrationen von CYP- und UGT-Enzymen in einer statistisch signifikanten Teilmenge an Individuen der humanen Leberbank ( $N=150$ , Zusammenstellung von Uli Zanger) von den Projektmitarbeitern im Teilprojekt SP3 (IKP), Saussele und Riedmaier, experimentell erfasst und für die Modellsimulationen und Analyse der inter-individuellen Variabilität in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

## Kapitel 2 Material und Methoden

Im Teilprojekt SP5 (IBVT) (**Abb. 2** grün) wurden primäre humane Hepatozyten aus den Arbeitsgruppen Weiss, Thasler und Nüssler der Plattform Zellbiologie (**Abb. 2** rot) für die Zeitreihenexperimente mit dem Arzneimittel Atorvastatin (AS) in dieser Arbeit eingesetzt. Nach der Weiterkultivierung der primären Hepatozyten im Teilprojekt Z2 durch Gaby Vacun wurden von mir mit Unterstützung von Gaby Vacun Zeitreihenexperimente durch Stimulus mit dem Arzneimittel (AS) durchgeführt und Proben für die quantitative Metabolit- und Proteinbestimmung aufgearbeitet (siehe **Kapitel 4**). Die Quantifizierung der Metabolitkonzentrationen und der UGT1A3-Proteinkonzentration in Proben von primären Hepatozyten wurde im Teilprojekt SP3 (IKP) (**Abb. 2** blau) von den Projektmitarbeitern Saussele und Riedmaier durchgeführt und die absolute Quantifizierung der CYP3A4- und UGT1A1-Proteinkonzentrationen im Teilprojekt SP8 (Arbeitsgruppe Marcus, MPC Bochum) (**Abb. 2** gelb) von den Projektmitarbeitern Elmar Langenfeld und Anke Schnabel.



**Abb. 2:** Schema der experimentellen Zusammenarbeit des Teilprojektes SP5 (grün) mit den Teilprojekten SP3 (blau) und SP8 (gelb) im Netzwerk Stuttgart „Detoxifikation“ und mit den Arbeitsgruppen Weiss, Thasler und Nüssler der Plattform Zellbiologie (rot).

---

## 2.2 Material<sup>1</sup>

### 2.2.1 Arzneimittel

Propafenon (**PF**) und seine Metabolite wurden von Knoll (Ludwigshafen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Dextromethorphan (**DT**) wurde von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) erworben. DT-Metabolite und stabil markierte Isotope wurden nach Heinkele et al. [77] hergestellt. Atorvastatin-Säure (**AS**), und Atorvastatin-Metabolite, sowie die deuterierten Standards wurden bei Toronto Research Chemicals Inc. Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Canada) bestellt.

### 2.2.2 Medien und Chemikalien

Williams Medium E (WME) mit Phenolrot und stabilem L-Glutamin (P04-29150), sowie Williams Medium E (WME) ohne Phenolrot und ohne L-Glutamin (P04-29510) und stabiles L-Glutamin sind von Pan-Biotech-GmbH (Aidenbach, Deutschland). Penicillin/Streptomycin, ITS-X und Insuman Rapid sind von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). Fötale Kälber-Serum wurde von Biochrom KG (Berlin, Deutschland) bezogen. Kälber-Serum-Albumin (BSA) und Dimethyl Sulfoxid (DMSO) wurden von Sigma-Aldrich Chemicals (Taufkirchen, Deutschland) erworben. Dexta Inject ist von Jenapharm (Jena, Deutschland). PBS ist von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) und Complete Mini, EDTA-frei ist von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland). NaP, Sucrose und LiChrosolv wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland), Acetonitril von Roth (Karlsruhe), und Ameisensäure von Fluka bezogen. NADP<sup>+</sup> wurde bei Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bestellt. Glucose-6-Phosphat wurde von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase von Calbiochem (Schwalbach, Deutschland) erworben. Alle anderen Chemikalien hatten analytischen Gütegrad.

### 2.2.3 Cytochrom-P450-Monooxygenasen und UDP-Glucuronosyl-Transferasen

Rekombinante CYPs co-exprimiert mit NADPH-P450 Oxidoreductase in Insektenzellen (supersomes<sup>TM</sup>) und UDP-Glucuronosyl-Transferasen (UGT) wurden von BD Biosciences

---

<sup>1</sup>Die Beschreibung der am IKP und MPC für die Experimente verwendeten Materialien wurden von den Kollegen Tanja Sauße, Stephan Riedmaier und Anke Schnabel verfasst und diesem Abschnitt der Arbeit hinzugefügt.

(Woburn, MA, USA) und UGT1A3 monoklonaler Mäuse-Antikörper (ab57400) von Abcam (Cambridge, England) bezogen.

### 2.2.4 Primäre humane Hepatozyten und Lebermikrosomen

Das für die Isolierung der primären humanen Hepatozyten benötigte Lebergewebe wurde aus Patienten bei einer partiellen Hepatektomie, da heißt einer operativen Entfernung eines Teils der Leber, gewonnen. Die experimentelle Prozedur wurde gemäß den Richtlinien der karitativen staatskontrollierten Stiftung HTCR (*Human Tissue and Cell Research*), Regensburg, Deutschland, und den Richtlinien für die Leberresektion von Patienten mit primären oder sekundären Lebertumoren, Technische Universität München, MRI, München, Deutschland, durchgeführt. Die Verwendung von humanen Hepatozyten für Forschungszwecke wurde durch die lokalen ethischen Kommissionen der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland, und der Charité, Humboldt Universität Berlin, Deutschland, geprüft [78, 79], und das schriftliche Einverständnis jedes Patienten wurde erhalten.

Die primären humanen Hepatozyten wurden in den Laboratorien in Regensburg, Arbeitsgruppe PD Dr. rer. nat. Thomas Weiss, in München, Arbeitsgruppe PD Dr. Wolfgang E. Thasler, und in Berlin, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Andreas K. Nüssler, aus dem Lebergewebe isoliert, vorkultiviert und im Rahmen der Kooperation der Plattform Zellbiologie mit dem Netzwerk Stuttgart „Detoxifikation“ im „Hepatosys“-Projekt dankenswerterweise für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt.

## 2.3 Experimentelle Methoden<sup>2</sup>

### 2.3.1 Quantifizierung von CYP und UGT Protein-Konzentrationen

Die Protein-Quantifizierung von CYP1A2 [80], CYP2B6 [81], CYP2C9 [82], CYP2D6 [83] und CYP3A4 [84] in humanen Lebermikrosomen wurde per Immunoblotting durchgeführt.

Die Protein-Quantifizierung von UGT1A3 in den lyophilisierten Proben der humanen Hepatozyten sowie in humanen Lebermikrosomen wurde per Immunoblotting mit einem monoklonalen Mäuse-Antikörper (UGT1A3 ab57400, Abcam, Cambridge, England) durchgeführt [85].

---

<sup>2</sup>Die Beschreibung der am IKP und MPC für die Experimente eingesetzten Methoden wurden von den Kollegen Tanja Saußebe, Stephan Riedmaier und Anke Schnabel verfasst und diesem Abschnitt der Arbeit hinzugefügt.

Die Protein-Quantifizierung von CYP3A4 in den lyophilisierten Proben der humanen Hepatozyten wurde per AQUA durchgeführt. Dazu wurden die lyophilisierten Proben per Ultraschallbehandlung (10 min, *bath sonicator*, Sonorex TK52H, Schalltec, Moerfelden-Walldorf, Deutschland) unter Einsatz von Glasperlen (1,5-2 mm, Merck, Darmstadt, Deutschland) in einem Puffer mit 1 mM EDTA, 1 M DTT, 10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl, Complete Mini-Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim, Deutschland) weiter aufgeschlossen und anschließend homogenisiert (Wheaton, USA). In dem CYP3A4 Quantifizierungs-Ansatz wurden drei synthetische, Isotopen-markierte Peptide (<sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N Aminosäure) als interner Standard verwendet. Die synthetischen Peptide wurden von Sigma-Genosys (Haverhill, UK) bezogen und stellen Sequenz-Analoge zu proteotypischen Peptiden von CYP3A4 dar, welche bei Verdauungsprozessen entstehen. Nach der Fällung mit Azeton und Lösung der Proteine in 8 M Harnstoff, wurde eine bestimmte Menge an internen Standard-Peptiden hinzugegeben. Die Proben wurden mit 5 mM DTT reduziert und mit 15 mM Iodacetamid in 50 mM Ammoniumbicarbonat alkyliert. Danach wurden die Proben mit Trypsin (Promega, Mannheim, Deutschland) bei 42 °C für 4 h bei einem Verhältnis Enzym/Substrat von 1:10 verdaut. Die Effizienz wurde per SDS-PAGE und Silbermarkierung kontrolliert. Die bei der Verdauung entstandenen Peptide wurden per C18 OMIX® Tips (Varian, Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und über ein Nanoliter-Flow Ultimate HPLC System (Dionex, Idstein, Deutschland) aufgetrennt. Nach der Injektion von 15 µl wurden die Peptide in der Vorsäule (0,3 mm I.D. x 5 mm PepMap™, Dionex) für 6 min bei einer Flussrate von 30 µl/min in 0,1% TFA entsalzt. Danach wurden die Peptide in die Trennsäule überführt und bei einem linearen Gradienten der mobilen Phase (A: 0,1% Ameisensäure, B: 84% Acetonitril/0,1% Ameisensäure) von 5% B zu 35% B über 35 min mit einer Flussrate von 290 nl/min aufgetrennt. Der Effluent wurde in die Nanospray-II-Einheit eines 4000QTrapMass Spektrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) eingeleitet. Die MS wurde auf ein *multiple reaction monitoring* (MRM) Experiment [86] eingestellt, das einen zwei zu drei Ausgangs- zu Produkt-Ionen Übergang der jeweiligen internen Standard-Peptide und die entsprechenden Übergänge der nativen Peptide von CYP3A4 enthält. Die folgenden Parameter wurden eingestellt: *ion spray voltage*, 3÷4 kV; *interface heater*, 150 °C; *declustering potential*, 50 V; *collision energy, peptide specific*; *entrance potential*, 10 V; *collision cell exit potential*, 10 V. Die Auswertung der MS-Daten erfolgte anhand der Chromatogramme per MultiQuant™ Software (Applied Biosystems) und der CYP3A4-Proteingehalt wurde aus dem Flächenverhältnis von internem Standard-Peptid zu nativem Peptid berechnet.

Die Umrechnung der CYP3A4 und UGT1A3 Protein-Konzentrationen der primären humanen Hepatozyten von bezogen auf Gesamtprotein zu bezogen auf mikrosomales Protein wurde unter Verwendung des Verhältnisses durchgeführt, das an individuellen humanen Leberhomogenaten und entsprechenden aufgereinigten Mikrosomenfraktionen per Bradford-Test [87] bestimmt wurde.

### 2.3.2 CYP2C19 Enzym-Aktivitätsmessung

Die 4'-Hydroxylierung von S-Mephenytoin an humanen Lebermikrosomen wurde wie in einer früheren Untersuchung beschrieben mit einer S-Mephenytoin-Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  und einer Inkubationsdauer von 30 min durchgeführt [80].

### 2.3.3 Initialraten-Experimente an rekombinanten CYPs und an humanen Lebermikrosomen zur Untersuchung des DT- und PF-Metabolismus

#### 2.3.3.1 DT-Metabolismus in Phase I

Der DT-Metabolismus wurde an rekombinanten CYPs (5 pmol) und an humanen Lebermikrosomen (100  $\mu\text{g}$ ) in 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 (Endvolumen 100  $\mu\text{l}$ ) mit verschiedenen Initialkonzentrationen von DT gemessen.

Nach der Äquilibrierung der Reaktionsmischung bei 37 °C für 3 min, wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  an 10-fach konzentriertem NADPH-Regenerationssystem (Endkonzentrationen: 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 4 mM Glucose-6-Phosphat, 0,5 mM  $\text{NADP}^+$ , und 4 U/ml Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase) gestartet. Nach 30 min Inkubationszeit für die rekombinanten CYPs, beziehungsweise 10 min Inkubationszeit für die humanen Lebermikrosomen wurden die Reaktionen durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  1 N HCL abgestoppt. Nach Zugabe des internen Standards wurden die Proben gemischt und bei 16000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand entnommen. Kalibrierlösungen wurden auf dieselbe Art und Weise vorbereitet.

#### 2.3.3.2 PF-Metabolismus in Phase I

Der PF-Metabolismus wurde an rekombinanten CYPs (5 pmol) und an humanen Lebermikrosomen (100  $\mu\text{g}$ ) in 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer bei pH 7,4 (Endvolumen 100  $\mu\text{l}$ ) mit verschiedenen Initialkonzentrationen von PF gemessen.

Nach der Äquilibrierung der Reaktionsmischung bei 37 °C für 3 min, wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  an 10-fach konzentriertem NADPH-



Regenerationssystem (Endkonzentrationen: 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM Glucose-6-Phosphat, 0,5 mM NADP<sup>+</sup>, und 4 U/ml Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase) gestartet. Nach 30 min Inkubationszeit für die rekombinanten CYPs, beziehungsweise 10 min Inkubationszeit für die humanen Lebermikrosomen wurden die Reaktionen durch Zugabe von 100 µl an Acetonitril abgestoppt. Nach Zugabe des internen Standards und 80 ml H<sub>2</sub>O, wurden die Proben gemischt und bei 16000g für 5 min zentrifugiert und der Überstand entnommen. Kalibrierlösungen wurden auf die gleiche Art und Weise vorbereitet.

### 2.3.3.3 DT- und PF-Metabolismus in Phase II

Die Inkubationen zur Analyse der Phase II-Metabolite wurden ähnlich wie zur Phase I durchgeführt. Rekombinante UGTs (25 µg) beziehungsweise humane Lebermikrosomen (50 µg) wurden in 0,1M Natriumphosphat-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> bei pH 7,4 (Endvolumen: 100 µl) inkubiert. Nach der Äquilibrierung der Reaktionsmischung bei 37 °C für 3 min wurden die Enzym-Reaktionen durch Zugabe von 10 µl UDPGA (100 mM) gestartet. Nach 20 min beziehungsweise 10 min wurden die Reaktionen wie oben beschrieben abgestoppt und die Proben weiter aufgearbeitet.

### 2.3.3.4 Simultaner Fremdstoffmetabolismus von DT und PF

Der Ansatz wurde wie oben beschrieben in einem Endvolumen von 200 µl durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Enzymreaktionen durch Zugabe von 100 µl Acetonitril abgestoppt.

Für die DT Analyse wurden 100 µl an Probe mit 10 µl internem Standard versetzt und für die PF-Analyse wurden 100 µl an Probe mit 10 µl internem Standard und 80 µL Wasser versetzt. Anschließend wurden die Proben bei 16000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand entnommen. Kalibrierlösungen wurden auf dieselbe Art und Weise vorbereitet.

### 2.3.4 Zeitreihen-Experiment an primären humanen Hepatozyten zur Untersuchung des AS-Metabolismus

Die primären Hepatozyten (siehe **Abschnitte 2.2.4** und **2.1**) wurden auf Collagen-beschichteten 6-Well Platten zu einer Zelldichte von 1,5 Millionen Zellen pro Well ausgesät. Nach einer Ruhephase über Nacht wurden die Zellen transportiert. Danach wurde das Medium gegen serum-freies Medium, angereichert mit BSA (0,1% (v/v)), Penicillin/Streptomycin (100 U/ml), stabilem L-Glutamin (2 mM), Dexamethason Dihydrogenphosphat (0,025% (v/v)) und ITS-X (5 mg Insulin, 3,35 µg Natrium-Selenit, 2,75

## Kapitel 2 Material und Methoden

---

mg Transferrin und 1 mg Ethanolamin), im weiteren SFM genannt, unter sterilen Bedingungen ausgetauscht und die Zellen im auf 37 °C beheizten Brutschank unter einer 95%/5% Luft-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre in einer Ruhephase über Nacht kultiviert.

Zur Untersuchung des Fremdstoffmetabolismus von AS wurde das Zellmedium entfernt und die Inkubation in SFM, angereichert mit der entsprechenden Start-Konzentration an AS, 0,1% (v/v) BSA und 0,1% DMSO, sowie die Kultivierung im auf 37 °C beheizten Brutschank unter einer 95%/5% Luft-CO<sub>2</sub>-Atmosphäre gestartet.

Zu vorgewählten Zeitpunkten nach Inkubationsstart wurden jeweils drei Wells zur Aufbereitung der Proben für die Messung extra- und intrazellulärer Metabolite verwendet. Dazu wurde das SFM zur Messung der extrazellulären Metabolite abgenommen und in Eppendorf Cups gefüllt, die jeweils mit 50 µl 1M Ameisensäure vorbereitet waren, und bei -20 °C eingefroren. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit auf 4 °C gekühltem PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 500 µl auf 4 °C vorgekühltem BSA-freiem SFM, angereichert mit 0,1% DMSO und titriert auf circa pH 4,5, wurden die Zellen abgekratzt und die Suspension in Eppendorf Cups überführt. Der Zellaufschluss wurde durch einen Einfrier/Auftau-Zyklus in flüssigem Stickstoff und einem auf 37 °C vorgeheiztem Wärmebad, sowie der anschließenden Ultraschallbehandlung bei 4 °C durchgeführt. Die aufgeschlossene Zellsuspension wurde dann für 5 min bei 4 °C und 15000 g zentrifugiert und der Überstand zur Messung der intrazellulären Metabolite in Eppendorf Cups dekantiert und bei -20 °C eingefroren.

Des Weiteren wurden Wells zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen aufgearbeitet. Dazu wurde das Zellmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit auf 4 °C gekühltem PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 500 µl auf 4 °C vorgekühltem PBS, versetzt mit Complete Mini EDTA-frei (eine Tablette auf 10 mL Puffer) wurden die Zellen abgekratzt und in Eppendorf Cups überführt. Die Zellsuspension wurde für 5min bei 4 °C und 500 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in 150 µl NaPP-Puffer (0,1 M, pH 7,4), versetzt mit 250 mM Sucrose und Complete Mini EDTA-frei (eine Tablette auf 10 mL Puffer), per Ultraschall bei 4 °C behandelt und die Zellsuspension anschließend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Anschließend wurden die Suspensionen über Nacht lyophilisiert und bei -20 °C eingefroren. Diese Proben wurden weiter für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration, sowie der Proteinkonzentration von CYP3A4 und UGT1A3 aufgearbeitet.

Weitere zwei Wells wurden zur Bestimmung der Zellzahl vorbereitet. Dazu wurden die Zellen mit einer 3:1 Mischung Methanol/Eisessig für jeweils circa 10 min zuerst bei 37 °C

und dann bei 4 °C zur Fixierung behandelt. Danach wurden die Zellkerne durch 15 min Inkubation mit Meyers Hämalaun (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) markiert und die Zellen anschließend mit Wasser abgespült und luft-getrocknet. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung fotografiert und die markierten Zellkerne in jeweils 10 verschiedenen digitalen Bildern (*ImageJ Image Processing and Analysis Program*) pro well ausgezählt.

### 2.3.5 Quantifizierung der Metabolit-Konzentrationen von DT und PF

Die Überstände wurden direkt in das HPLC System eingespritzt. Die Metabolite wurden per HPLC aufgetrennt und per MS/MS-Analyse unter Verwendung der analogen deuterierten Standards von DT (2[H]3-Hydroxymorphinan (40 pmol), 2[H]3-Dextrorphan (40 pmol), 2[H]2-Methoxymorphinan (40 pmol), 2[H]3-Dextrorphan-glucuronid (40 pmol), 2[H]3-Dextromethorphan (200 pmol)) und PF (50 pmol [2H5]-Propafenon, 50 pmol [2H7]-5-Hydroxypropafenon, 50 pmol [2H7]-Propafenon-glucuronid) bestimmt. Dazu wurde ein HPLC-System (HP1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) und ein Esquire HCT Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) verwendet.

Zur Bestimmung der DT-Metabolite wurde eine Synergi polar RP 80A Säule (150x2 mm, 4 µm Partikelgröße, Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) verwendet und die Eluierung mit einem Gradienten von 84% Essigsäure (1%)/Wasser und 16% Essigsäure (1%)/Acetonitril zu 64%/36% in 18 min gefahren.

Zur Bestimmung der PF-Metabolite wurde eine Reprosil-Pur 120-ODS3 Säule (50x2 mm, 5 µm Partikelgröße, Trentec Analystechnik, Gerlingen, Deutschland) verwendet. Die Eluierung wurde mit einem Gradienten 70% 12 mmol/l Ammonium-Acetat und 30% Acetonitril zu 20%/80% in 7,1 min gefahren.

### 2.3.6 Quantifizierung der Metabolit-Konzentrationen von AS

400 µl der extrazellulären Mediumsproben wurden zur Bestimmung von extrazellulärem AS 1:5 in SFM, circa pH 4,5, versetzt mit 0,1% DMSO, verdünnt. Jeweils 100 µl des verdünnten und unverdünnten extrazellulären Mediums, sowie jeweils 100 µl der intrazellulären Probenaufbereitung wurden mit 10 µl an deuterierten Standardmetaboliten versetzt. Jeweils 10 µl der Kalibrations- und Qualitätslösungen wurden in 90 µl SFM, circa pH 4,5, versetzt mit 0,1% DMSO, zur Bestimmung der extrazellulären Metabolite, und in 90 µl BSA-freiem SFM, circa pH 4,5, versetzt mit 0,1% DMSO, zur Bestimmung der

intrazellulären Metabolite, vermengt, und die Kalibrations und Qualitätslösungen jeweils mit 10  $\mu$ l an deuterierten Standardmetaboliten versetzt.

Atorvastatin Säure (AS), Atorvastatin Lakton (ASL), und die jeweiligen para-hydroxy- (ASpOH) und ortho-hydroxy-Metabolite (ASoOH, ASLoOH) wurden per LC-MS-MS Analyse unter Verwendung der analogen deuterierten Standards bestimmt [85]. Die Auftrennung per HPLC wurde bei 30 °C in einer XBridge Shield RP18 Säule (2,1 x 50 mm, 3,5  $\mu$ m, Waters) unter Verwendung einer mobilen Phase bestehend aus (A) 1 mM Ameisensäure und (B) Acetonitril bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min durchgeführt. Dabei wurde folgender Gradient gefahren: 63% A für 4 min, lineare Abnahme von A auf 60% innerhalb 9min, lineare Abnahme von A auf 55% innerhalb 2,5 min, stationär bei 55% A für 1 min, und schließlich lineare Zunahme von A auf 63% in 0,2 min. Die Gleichgewichtseinstellung der Säule erfolgte in 20 min. Die MS-MS-Analyse wurde an einem Esquire HCT Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland), gekoppelt an ein HPLC 1100-System (Agilent, Waldbronn, Deutschland), bestehend aus der binären Pumpe G1312A, dem Entgaser G1379A, dem Probennehmer G1367A und dem Säulenthermostat G1330B, durchgeführt. Der Ionisierung-Modus war Electrospray (ESI) mit positiver Polarität, der Massenbereich-Modus war Ultrascan, und Stickstoffgas wurde beim Trocknen und Zerstäuben verwendet. Die folgenden Parameter wurden eingestellt: *nebulizer* 45 psi, *dry gas* 10 l/min, *dry temperature* 300 °C, *capillary* 4100 V, *scan range* 200-600 m/z.

Die Vorstufen- und Produkt-Ionen (m/z) der Analyten und internen Standards waren jeweils: AS (559 und 440,2; 466,2), [ $^2\text{H}_5$ ]AS (564 und 445,2; 471,2), ASL (541,2 und 448,2), [ $^2\text{H}_5$ ]ASL (546,2 und 453,2), ASpOH (575 und 440,2; 466,2), [ $^2\text{H}_5$ ]ASpOH (580 und 445,2; 471,2), ASLpOH (557 und 448,4), [ $^2\text{H}_5$ ]ASLpOH (562 und 448,4), ASoOH (575 und 466,4), [ $^2\text{H}_5$ ]ASoOH (580 und 471,2), ASLoOH (557 und 448,4), [ $^2\text{H}_5$ ]ASLoOH (562 und 448,4).

## 2.4 Methoden der Modellierung und Modell-Verifikation

### 2.4.1 Dynamische Modellierung

Das mathematische Modell basiert auf einem System gewöhnlicher Differentialgleichungen,

$$\frac{d(c_j V_{comp})}{dt} = \sum_i v_{ij} r_i = f(\mathbf{c}, \mathbf{p}) , \quad (2.1)$$

in dem die Veränderung der Metabolit-Konzentration  $c_j$  in dem Kompartiment  $comp$  mit dem Volumen  $V_{comp}$  durch enzymatische oder chemische Reaktionen und durch Transportschritte  $r_j$  bewirkt wird, welche weiterhin durch Funktionen  $f$  der Konzentrationen  $\mathbf{c}$  und der Parameter  $\mathbf{p}$  abgebildet werden. Wird weiterhin berücksichtigt, dass die im Fremdstoffmetabolismus beteiligten Enzyme relativ unspezifisch sind und den Abbau von verschiedenen Substraten zu mehreren Produkten katalysieren, beziehungsweise ein bestimmtes Substrat von mehreren Enzymen abgebaut und durch verschiedene Transportschritte transportiert wird, kann Gleichung (2.1) angesetzt werden zu

$$\frac{d(c_j V_{comp})}{dt} = \sum_e v_{ej} r_{e,j} = f(\mathbf{c}, \mathbf{p}) \quad , \quad (2.2)$$

bei der die Umsetzung  $r_{ej}$  über verschiedene katalysierende Enzyme  $e$  oder Transportschritte  $r_{e,j}$  berücksichtigt wird.

Die Reaktionskinetik von Enzymen  $e$ , die die Umwandlung nur eines Substrats  $S_j$  zu nur einem Produkt  $P_j$  katalysieren, wird als irreversible Michaelis-Menten-Kinetik angesetzt:

$$r_{e,j} = r_{\max,e,j} \frac{c_{S_j}}{K_{M,e,S_j \rightarrow P_j} + c_{S_j}} \quad . \quad (2.3)$$

Die Reaktionskinetik von Enzymen, welche die Umwandlung mehrerer Substrate zu mehreren verschiedenen Produkten katalysiert, wird als kompetitive Hemmung durch alternative Substrate in der Umwandlung zu alternativen Produkten beschrieben

$$r_{e,S_1 \rightarrow P_1} = r_{\max,e,S_1 \rightarrow P_1} \frac{\frac{c_{S_1}}{K_{M,e,S_1 \rightarrow P_1}}}{1 + \sum_{j=1}^J \frac{c_{S_1}}{K_{M,e,S_1 \rightarrow P_j}} + \sum_{l=1}^L \frac{c_{S_2}}{K_{M,e,S_2 \rightarrow P_l}}} \quad . \quad (2.4)$$

Veranschaulicht ist hier das Beispiel der Umsatzrate des Substrates  $S_1$  zu dem Produkt  $P_1$  am Enzym  $e$ , welche durch die Umwandlung des Substrates  $S_1$  zu den alternativen Produkten  $P_j$ , sowie durch die Umwandlung des alternativen Substrates  $S_2$  zu den alternativen Produkten  $P_l$  gehemmt wird (Herleitung siehe Anhang A). Im Gegensatz zu einer kompetitiven Inhibierung,

$$r_{e,S_1 \rightarrow P_1} = r_{\max,e,S_1 \rightarrow P_1} \frac{\frac{c_{S_1}}{K_{M,e,S_1 \rightarrow P_1}}}{1 + \frac{c_{S_1}}{K_{M,e,S_1 \rightarrow P_1}} + \frac{c_I}{K_{I,e}}} \quad , \quad (2.5)$$

bei der ein bestimmter Inhibitor I reversibel an das Enzym bindet und die Umwandlung des Substrates  $S_1$  am aktiven Zentrum blockiert, ist im Ansatz der Gleichung (2.4) der hemmende Metabolit ein konkurrierendes Substrat, das ebenfalls abgebaut wird. Weiter berücksichtigt dieser Ansatz die Konkurrenz in der Umwandlung eines Substrates zu alternativen Produkten, wenn das Substrat-Molekül an verschiedenen Positionen durch dasselbe Enzym umgewandelt werden kann.

Die mathematische Modellierung (Gleichung (2.2)) wird in den entsprechenden Optimierungs- und Simulationsprogrammen implementiert, welche in FORTRAN-Sprache geschrieben sind. Die entsprechenden dynamischen SBML-Modelle werden außerdem in *JDesigner2* (Version 2.147, *Systems Biology Workbench*, Computational Systems Biology, University of Washington) erstellt. Die numerische Integration der Differentialgleichungen in Gleichung (2.1) wird mit dem differential-algebraischen Gleichungslöser *LIMEX* (Version 4.2B1, Konrad-Zuse-Zentrum für Informationstechnik, Berlin, Deutschland) [88] durchgeführt.

### 2.4.2 Topologische Netzwerkanalyse

Die stöchiometrischen Modelle wurden mit dem Softwaretool *Insilico Discovery* (Insilico Biotechnology AG, Stuttgart, Deutschland) erstellt und auf funktionale Konsistenz kontrolliert, das heißt, es wurden die Elementbilanzen und Ladungsbilanzen überprüft. Für die weiteren strukturellen Analysen wurden die Modelle in das Programm *CellNetAnalyzer* [89, 90] transferiert. Um die strukturelle Robustheit des Systems zu beschreiben, wurden *elementary flux modes* (EFM), *minimal cut-sets* (MCS) und die Netzwerkfragilität  $F$  bestimmt. EFM beschreiben minimale Sets an Reaktionspfaden in einem Modellsystem, die unter Steady-State-Bedingungen unter Beachtung von Irreversibilitätsbedingungen möglich sind [91, 92]. Minimal sind diese Sets unter dem Aspekt, dass der Ausfall oder die Wegnahme einer einzigen Reaktion keine Steady-State-Flussverteilung mehr zulassen würde. Dementsprechend bezeichnen MCS Gruppen an bestimmten Reaktionen, bei deren Ausfall im System kein EFM in Bezug auf eine bestimmte Zielfunktion mehr möglich sind [93]. Weiter kann aus der Analyse der MCS noch die Fragilität  $F_i$  für jede Einzelreaktion  $q_i$  nach

$$F_i = \frac{1}{MCS_i}. \quad (2.6)$$

aus dem Kehrwert der  $MCS_i$ , welche die durchschnittliche MCS-Größe aller MCS darstellt, in denen die Einzelreaktion  $q_i$  beteiligt ist, abgeleitet werden. Der Netzwerk-Fragilitäts-Koeffizient  $F$  wird dann per

$$\mathbf{F} = \frac{\sum_i^q F_i}{q}. \quad (2.7)$$

als Mittelwert der Fragilität  $F_i$  jeder Einzelreaktion  $q_i$  [93] über alle Reaktionen  $q$  berechnet.

Folglich sind die Anzahl der EFM, die durchschnittliche MCS-Größe und der Netzwerk-Fragilitäts-Koeffizient  $\mathbf{F}$  Indikatoren für die Robustheit des Netzwerkes in Bezug auf eine bestimmte Funktionalität. Je größer die Anzahl der EFM, je größer die durchschnittliche MCS-Größe und je niedriger der Fragilitäts-Koeffizient  $\mathbf{F}$ , desto größer ist die Robustheit des Systems.

### 2.4.3 Parameteridentifikation und Optimierungsalgorithmus

#### 2.4.3.1 Experimentelle Modellverifikation mithilfe des Zeitreihenansatzes

Der Optimierungsalgorithmus basiert auf einer evolutionären Anpassungsstrategie, welche per *JavaEva* (Wilhelm-Schickard-Institut für Informatik, Zentrum für Bioinformatik, Eberhard Karls Universität Tübingen, Deutschland)[94] implementiert ist. Die Optimierungen werden mit einem MVA (*main vector adaption*) Mutationsoperator [95] durchgeführt. Der Optimierungsalgorithmus schätzt die Parameter  $\mathbf{p}$  basierend auf dem Optimierungskriterium

$$\Theta = \min_{\mathbf{p}} \sum_{n=1}^N \sum_{j=1}^J \left( \frac{c_{j,n}^{calc} - c_{j,n}^{meas}}{s_j^c} \right)^2, \quad (2.8)$$

bei dem die Summe der Differenz zwischen berechneter (*calc*) und gemessener (*meas*) Konzentration, geteilt durch die gemessene Standardabweichung  $s_j^c$  des jeweiligen gemessenen Konzentrationswertes, quadriert und summiert über alle Metabolite  $J$  und alle experimentellen Zeitpunkte  $N$  ein Minimum erreichen soll.

#### 2.4.3.2 Experimentelle Modellverifikation im Initialratenansatz

Die Experimente an humanen Lebermikrosomen werden in einem Initialratenansatz durchgeführt. In diesem Fall können die Differentialgleichungen in Gleichung (2.2) durch einen Differenzenquotienten,

$$\frac{dc_{P_j}}{dt} \approx \frac{\Delta c_{P_j}}{\Delta t} = \frac{c_{P_j}(t_1)}{t_1} = \tilde{r}_j, \quad (2.9)$$

approximiert werden, in denen die Konzentration des Produktes  $P_j$  zu den Zeitpunkten  $t_l$  durch die Zeit  $t_l$  geteilt wird. Die Reaktionskinetiken in Gleichung (2.4) und Gleichung (2.5) können dann in den kinetischen Ansätzen

$$\tilde{r}_{e,j} = r_{\max,e,j} \frac{c_{S_j}^0}{K_{M,e,S_j \rightarrow P_j} + c_{S_j}^0} \quad (2.10)$$

und

$$\tilde{r}_{e,j} = r_{\max,e,j} \frac{\frac{c_{S_1}^0}{K_{M,e,S_1 \rightarrow P_j}}}{1 + \sum_{j=1}^J \frac{c_{S_1}^0}{K_{M,e,S_1 \rightarrow P_j}} + \sum_{l=1}^L \frac{c_{S_2}^0}{K_{M,e,S_2 \rightarrow P_l}}} \quad (2.11)$$

abgebildet werden. Hier finden die Initialraten  $\tilde{r}_{e,j}$  und die Initialkonzentrationen  $c_{S_j}^0$ ,  $c_{S_1}^0$  und  $c_{S_2}^0$  Verwendung.

Die Optimierungen werden mit einem MVA (*main vector adaption*) Mutationsoperator [95] durchgeführt. Der Optimierungsalgorithmus schätzt die Parameter  $r_{\max,e}$  und  $K_{M,e}$  in den Gleichungen (2.10) und (2.11) basierend auf dem abgewandelten Optimierungskriterium

$$\Theta = \min_{\mathbf{p}} \sum_{n=1}^N \sum_{j=1}^J \left( \frac{\tilde{r}_{j,n}^{calc} - \tilde{r}_{j,n}^{meas}}{s_j^r} \right)^2. \quad (2.12)$$

Im Vergleich zu dem Optimierungskriterium in Gleichung (2.8), der auf Basis des Zeitreihenansatzes die Abweichung in den Zustandsvariablen argumentiert, soll in diesem Optimierungskriterium die Differenz zwischen berechneter und gemessener Initialrate der Produktbildung, geteilt durch die Standardabweichung  $s_j^r$  der jeweiligen gemessenen Initialrate, quadriert und summiert über alle Produkte J und alle Initialdatensets N, ein Minimum erreichen. Bei Durchführung von  $I$  unabhängigen Optimierungsläufen mit verschiedenen Startparametern erhält man  $I$  verschiedene optimierte Parametersets,

$$\mathbf{p}_i^{opt} = [p_{i,1}, p_{i,2}, \dots, p_{i,K}] \quad \text{mit } K = \text{Anzahl der Parameter, } i=1 \div I. \quad (2.13)$$

Damit kann der empirische Korrelationskoeffizient nach Pearson [96],  $Cor_{kl}$ , zwischen dem Parameter  $p_k$  und dem Parameter  $p_l$  über den Ansatz

$$Cor_{kl} = \frac{Cov_{kl}}{\sqrt{Var_{kk} \cdot Var_{ll}}} = \frac{\sum_i (p_{k,i} - \bar{p}_k) \cdot (p_{l,i} - \bar{p}_l)}{\sqrt{\sum_i (p_{k,i} - \bar{p}_k)^2 \cdot \sum_i (p_{l,i} - \bar{p}_l)^2}}, \quad Cor_{kl} = 1; k=l \quad (2.14)$$



aus den Varianzen  $Var_{kk/ll}$  und den Kovarianzen  $Cov_{kl}$  der Parameter  $p_k$  und  $p_l$  über den einzelnen Parametersets  $I$  bestimmt werden.

## 2.4.4 Lokale Analyse der Parametersensitivitäten und -identifizierbarkeit

### 2.4.4.1 Fisher-Informations-Matrix

Die lokale Identifizierbarkeit der optimierten Parameter wird auf Basis der Fisher-Informations-Matrix (FIM) abgeschätzt [97-103],

$$\mathbf{FIM} = \sum_{n=1}^N \left( \frac{\partial \mathbf{y}(t_n, \mathbf{p})}{\partial \mathbf{p}} \right)^T \mathbf{Q}(t_n) \left( \frac{\partial \mathbf{y}(t_n, \mathbf{p})}{\partial \mathbf{p}} \right), \quad (2.15)$$

welche die Sensitivitätsmatrix

$$\mathbf{S}_n = \frac{\partial \mathbf{y}(t_n, \mathbf{p})}{\partial \mathbf{p}} \quad (2.16)$$

und die Gewichtungsmatrix  $\mathbf{Q}(t_n)$  an den jeweiligen experimentellen Zeitpunkten  $t_n$  verknüpft. Die Sensitivitätsmatrix  $\mathbf{S}_n$  beinhaltet die Ableitungen erster Ordnung der Zustandsvariablen (die Konzentrationen an den jeweiligen Zeitpunkten) nach den Modellparametern. Die Gewichtungsmatrix  $\mathbf{Q}(t_n)$  wird normalerweise als die Inverse der Messfehler-Kovarianz-Matrix nach

$$\mathbf{Q}(t_n) = \{\mathbf{Cov}(t_n)\}^{-1} \quad (2.17)$$

gewählt. Die Messfehler-Kovarianz-Matrix stellt dabei eine Diagonalmatrix mit den Kehrwerten der Messfehler-Varianzen der Zustandsgrößen zu dem Zeitpunkt  $t_n$  als Diagonalelemente dar.

Basierend auf der **FIM** wird die sogenannte „Top-Down-Klassifizierung“ angewendet, welche die Parameter identifiziert, die hohe Schätzfehler verursachen. Dazu wird die **FIM** mit der Diagonalmatrix der nominalen Parameterwerte nach

$$\mathbf{FIM}^* = \mathit{diag}(\mathbf{p})^T \cdot \mathbf{FIM} \cdot \mathit{diag}(\mathbf{p}). \quad (2.18)$$

normalisiert. Da die **FIM** die Inverse der Parameter-Schätzfehler-Kovarianz-Matrix des bestmöglichen linearen Schätzers (BLUE= *best linear unbiased estimators*) [102]

$$\mathbf{C} = \mathbf{FIM}^{-1}, \quad (2.19)$$

präsentiert, kann die Inverse der normalisierten Fisher-Informations-Matrix  $\mathbf{FIM}^*$  als die normalisierte Schätzfehler-Kovarianz-Matrix

$$\mathbf{C}^* = (\mathbf{FIM}^*)^{-1}, \quad (2.20)$$

definiert werden, welche die Abschätzung der unteren Grenze für die relativen Parameterfehler [104]

$$\sigma_{p_j}^2 \geq ((\mathbf{FIM}^*)^{-1})_{jj}. \quad (2.21)$$

nach der Cramer-Rao Ungleichheit [99, 100, 103] ermöglicht.

Weiterhin können Informationen über Parameter-Korrelationen aus der Korrelationsmatrix

$$R_{kl} = \frac{C_{kl}^*}{\sqrt{C_{kk}^* \cdot C_{ll}^*}}, \quad R_{kl} = 1; k = l \quad (2.22)$$

extrahiert werden, welche die Korrelationskoeffizienten zwischen den  $i$ -ten und  $j$ -ten Parametern enthält [102]. Die Korrelationsmatrix zeigt stark korrelierende Parameter auf, bei denen eine Veränderung des einen Parameters eine Veränderung in den Zustandsvariablen bewirken würde, welche durch eine entsprechende Veränderung des anderen Parameters kompensiert werden kann.

Außerdem kann die reziproke Konditionszahl der  $\mathbf{FIM}^*$  (Gleichung (2.18)),

$$rcond(\mathbf{FIM}^*) = \frac{\lambda_{\min}}{\lambda_{\max}}, \quad (2.23)$$

bestimmt werden, welche definiert ist als das Verhältnis des minimalen Eigenwertes zum maximalen Eigenwert der  $\mathbf{FIM}^*$  [102, 103]. Die Konditionszahl kennzeichnet, wie die  $\mathbf{FIM}^*$  konditioniert ist. Wenn die  $\mathbf{FIM}^*$  gut konditioniert sprich gut identifizierbar ist, dann ist  $rcond(\mathbf{FIM}^*)$  nahe 1 und wenn die  $\mathbf{FIM}^*$  schlecht konditioniert sprich schlecht identifizierbar ist, dann ist  $rcond(\mathbf{FIM}^*)$  nahe 0.

Zusätzlich zu der Abschätzung der  $\mathbf{FIM}^*$  werden separat noch die normalisierten Sensitivitätskoeffizienten gemäß

$$S_{j,l,n}^{norm} = \frac{\partial y_j(t_n)}{\partial p_l} \frac{p_l}{y_j} \quad (2.24)$$

an gleichmäßig über die experimentelle Zeitdauer verteilten Zeitpunkten berechnet und die absoluten Werte über alle Zeitpunkte  $n$  und alle Zustandsvariablen  $j$  aufsummiert, und man erhält die normalisierte Parametersensitivität des Parameters  $l$ ,

$$S_l^{norm} = \sum_j \sum_n |S_{j,l,n}^{norm}|. \quad (2.25)$$

Die  $\mathbf{FIM}$  und die normalisierten Parametersensitivitäten werden in einem hierfür selbst entwickelten FORTRAN-Programm berechnet und zur weiteren Auswertung, wie oben

beschrieben, in das Programmpaket MATLAB übertragen. Die reziproke Konditionszahl wird in MATLAB über die LAPACK-Funktion „rcond“ berechnet.

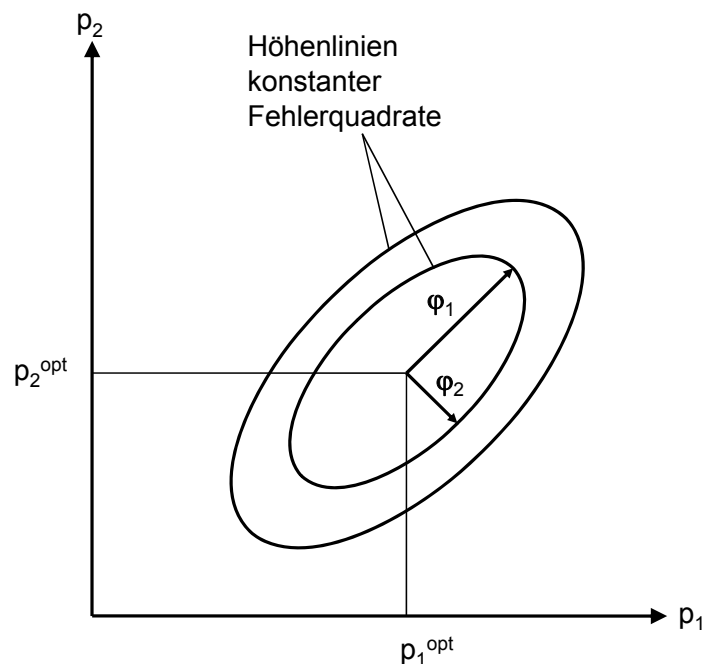
In der vorliegenden Arbeit werden die Sensitivitäten nicht analytisch berechnet, sondern über einen zentralisierten Differenzenquotienten

$$S_{j,l} = \frac{\partial y_j(t_n)}{\partial p_l} \approx \frac{y_j(p + \Delta p) - y_j(p - \Delta p)}{2 \cdot \Delta p_l} \quad (2.26)$$

angenähert, bei dem die Veränderung in der Zustandsvariablen durch eine kleine Störung  $\Delta p_l$  des Parameters  $p_l$  bewirkt wird.

#### 2.4.4.2 Top-Down-Klassifizierung der Fisher-Informations-Matrix

Die Identifikationsgüte wird in der Top-Down-Klassifizierung anhand der Eigenwerte der **FIM**<sup>\*</sup> bestimmt [105, 106] wie im folgenden genauer dargestellt ist. Zur Verdeutlichung wird zunächst als Beispiel der vereinfachte Fall mit zwei Parametern betrachtet (**Abb. 3**).



**Abb. 3:** Geometrische Darstellung der Eigenvektoren der Fisher-Informationsmatrix am Beispiel von zwei Parameter  $p_1$  und  $p_2$  [106].

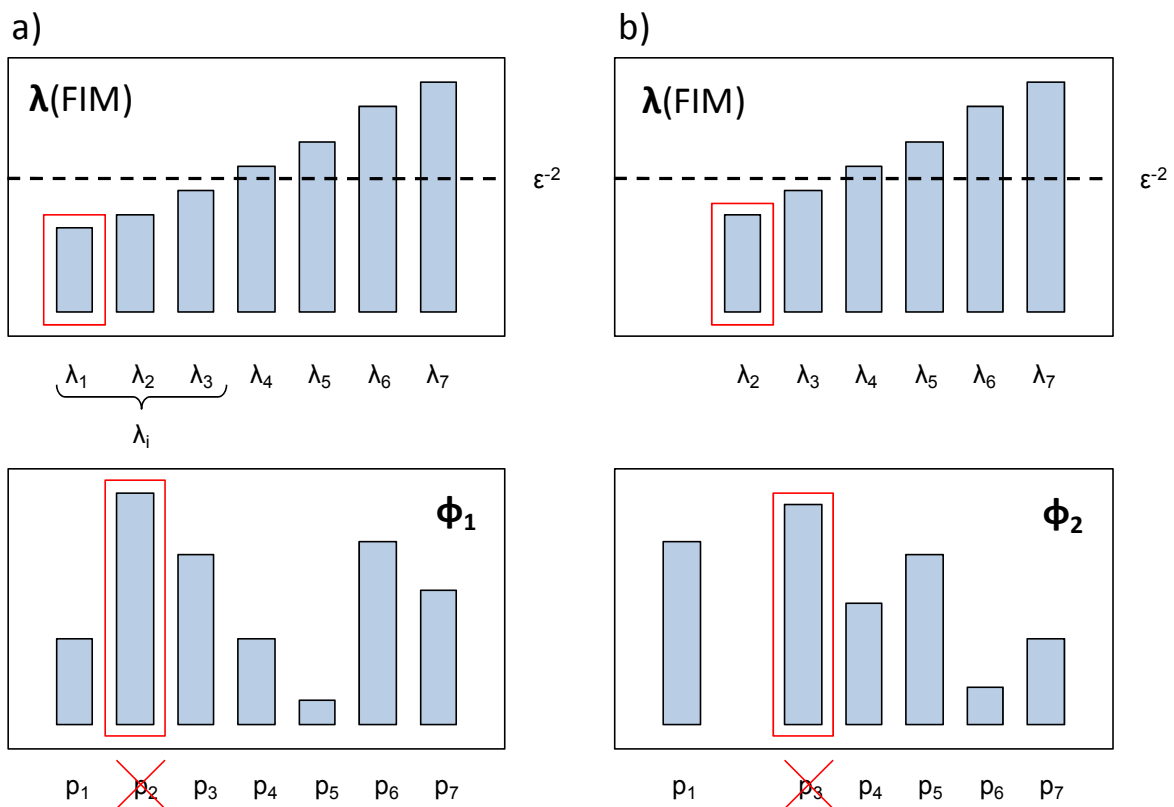
Hier lassen sich die Linien konstanter Fehlerquadrate als Ellipsen in einem  $p_1$ - $p_2$ -Diagramm darstellen. Die Eigenvektoren  $\Phi_1$  und  $\Phi_2$  beschreiben die Lage der Hauptachsen, während deren Längen  $\varphi_1$  und  $\varphi_2$  umgekehrt proportional zu der Quadratwurzel der korrespondierenden Eigenwerte  $\lambda_k$  sind und dem Schätzfehler  $E_{s,k}$ , mit

$$E_{s,k} = \sqrt{\left(\frac{1}{\lambda_k}\right)}, \quad (2.27)$$

des jeweiligen Parameters  $k$  entsprechen. Es ist offensichtlich, dass ein möglichst steiler Funktionsverlauf der Höhenlinien anzustreben ist, so dass die geschätzten Parameter möglichst nahe der wahren Parameter  $\mathbf{p}_{\text{opt}}$  liegen [106]. Übertragen auf ein Modellsystem mit mehreren Parametern  $p_l$  ( $l=1..L$ ), sollte für die größte Halbachse mit dem geringsten  $\lambda_k=\lambda_{\min}$  gelten, dass der maximale Schätzfehler gemäß

$$E_{s,\max} = \sqrt{\left(\frac{1}{\lambda_{\min}}\right)} \quad (2.28)$$

möglichst klein wird.



**Abb. 4:** Top-Down-Klassifikation: Berechnung der Eigenwerte  $\lambda$  und Eigenvektoren  $\Phi$  der **FIM\*** und Bestimmung der identifizierbaren und nicht-identifizierbaren Parameter bei vorgegebener Toleranz des Schätzfehlers  $\varepsilon$  im ersten Eliminationsschritt (Linke Spalte a) und im zweiten Eliminationsschritt (rechte Spalte b)). Im Beispiel sind  $p_2$  und  $p_3$  nicht identifizierbar.

Wird nun für den Schätzfehler  $E_{s,k}$  eine obere Fehlertoleranz  $\varepsilon$  festgelegt, so wird deutlich, dass bestimmte Eigenwerte  $\lambda_i \in \lambda_k$  das Kriterium aus Gleichung (2.27) nach

$$\varepsilon \geq \sqrt{\left(\frac{1}{\lambda_k}\right)} \quad (2.29)$$

nicht erfüllen. Dementsprechend werden die den Eigenwerten  $\lambda_i$  zugehörigen Eigenvektoren  $\Phi_i$  genauer betrachtet, beginnend mit dem kleinsten Eigenwert. Die größte Eigenvektorkomponente  $\Phi_{i,l}$  wird identifiziert (**Abb. 4a**). Die den Eigenvektorkomponenten  $\Phi_{i,l}$  korrespondierenden Parameter  $p_l$  können folglich als nicht-identifizierbar in dem nominalen Parameterset  $\mathbf{p}^0$  gekennzeichnet und in allen Eigenvektoren gestrichen werden. Diese Prozedur wird nun entsprechend am nächstgrößeren Eigenwert durchgeführt (**Abb. 4b**), bis alle Eigenwerte  $\lambda_i \in \lambda_k$  eliminiert sind. Auf diese Weise können die innerhalb der Fehlertoleranz  $\varepsilon$  identifizierbaren Parameter und die nicht-identifizierbaren Parameter charakterisiert werden.

### 2.4.5 Globale Analyse der Parametersensitivitäten und -identifizierbarkeit

Die globale Sensitivitätsanalyse umfasst die Analyse der Multiparametersensitivitäten (MPS) [107, 108] und der Robustheit [21, 109-111] und wurde mit dem Softwaretool *SBML-SAT* [112] durchgeführt. Die Analyse der MPS und der Robustheit stützt sich jeweils auf die zufällige Generierung von Parameterwerten nach der Methode des *Latin Hypercube Sampling* (LHS) [113], welches ein abgewandeltes Monte-Carlo-Verfahren darstellt. Im mehrdimensionalen Raum führt dieses Verfahren in zuverlässiger Weise zu einer plausiblen Verteilung an zufälligen Parameterwerten. Dabei wird folgendes Verfahren [108] angewandt:

1. Teile den Bereich eines Parameterwertes eines Parameter  $p_1$  in  $n_1$  verschiedene Intervalle mit gleichmäßiger Wahrscheinlichkeit.
2. Wähle zufällig einen Parameterwert in jedem Intervall.
3. Kombiniere die  $n_1$  Werte von  $p_1$  paarweise mit den  $n_2$  Werten von  $p_2$ .
4. Kombiniere die  $n_1$ - $n_2$ -Paare mit den  $n_3$  Werten von  $p_3$  und so weiter.

Im zweidimensionalen Raum, das heißt bei zwei Parametern, kann das LHS als Verteilung in einem Quadrat mit gleichmäßigem Gitternetz verbildlicht werden (**Abb. 5** links).

In der Analyse der MPS wird als Zielfunktionswert das Fehlerquadrat des Modell-Outputs  $f$  je Zustandsvariable  $j$ , zwischen dem nominalen Parameterset „0“, und dem nach LHS-Methode zufällig generierten Parametersets „ $i$ “ berechnet [107, 108]:

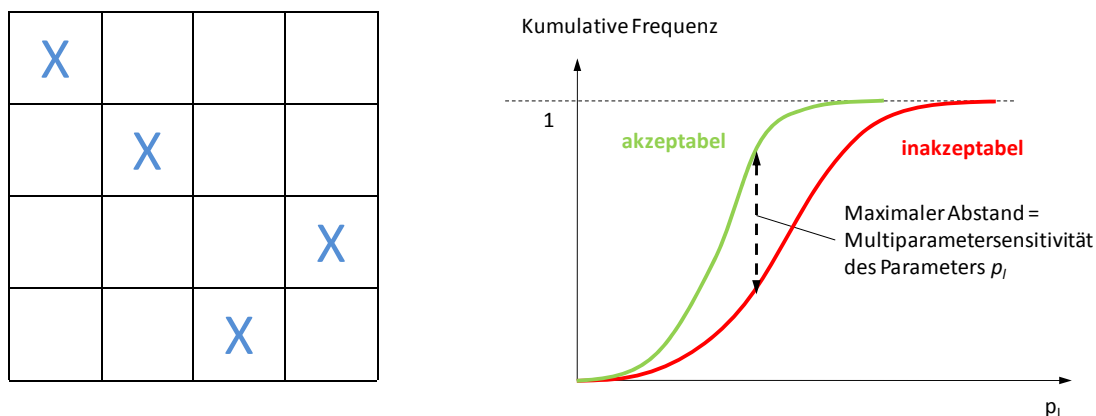
$$\Theta_{j,i} = (f_{j,0} - f_{j,i})^2 \quad (2.30)$$

Dann werden die Zielfunktionswerte für jedes Parameterset  $i$  mit dem durchschnittlichen Zielfunktionswert aller Parametersets verglichen. Liegt der Zielfunktionswert eines Parametersets unter dem durchschnittlichen, so wird dieses Parameterset als „akzeptabel“ charakterisiert, wenn nicht, dann als „inakzeptabel“. Danach wird für jeden Modellparameter

$p_l$  die kumulative Frequenzverteilung jeweils in der Menge der akzeptablen und inakzeptablen Parametersets erstellt. Eine kumulative Frequenzverteilung beschreibt im Allgemeinen die Frequenz des Erscheinens eines bestimmten Wertes unterhalb eines Referenzwertes (**Abb. 5** rechts). Gemäß der Kolmogorov-Smirnov-Statistik berechnet sich dann die MPS einer Zustandsvariable  $j$  gegenüber dem Parameter  $l$  aus dem maximalen Abstand (Supremum, „sup“) der kumulativen Frequenzverteilungen der akzeptablen,  $FV_{a,l,j}$ , und der inakzeptablen Parameterwerte,  $FV_{ia,l,j}$  [108]:

$$MPS_{l,j} = \sup |FV_{a,l,j} - FV_{ia,l,j}|, \quad (2.31)$$

Aufgrund der kumulativen Beschreibung, 0 bis 100%, kann die MPS eines Parameters Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei je höher der Wert ist, desto größer die Sensitivität und damit die relative Bedeutung des entsprechenden Parameters für das Model.



**Abb. 5: Links:** Beispiel für ein *latin hypercube sampling* (LHS) im zwei-dimensionalen Raum. Das Gitternetz unterteilt den Parameterbereich in verschiedene Intervalle. Durch die Bedingung, dass ein Parameterwert eines jeden Intervalls in allen Kombinationen, das heißt in jeder Zeile und in jeder Spalte, nur einmal auftauchen darf, wird eine zuverlässige Zufallsverteilung erzielt. **Rechts:** Beispiel für die Bestimmung der Multiparametersensitivität (MPS). Gemäß der Kolmogorov-Smirnov-Statistik entspricht der MPS des Parameters  $p_l$  der maximale Abstand zwischen der kumulativen Frequenzverteilung der akzeptablen (grün) und inakzeptablen (rot) Menge an Werten für einen zufälligen Parameter  $p_l$  der. Beispiele für berechnete kumulative Frequenzverteilungen finden sich in [107].

Die Robustheit beschreibt die Eigenschaft eines Systems, eine bestimmte Funktionalität gegenüber internen und externen Störungen aufrechterhalten zu können. [18, 110]. In einem System metabolischer Reaktionen wird die Robustheit oft gegenüber Störungen der Parameter analysiert. Die Störungen in den Parametern werden in einem Ansatz nach [109] über die Totale Parameter-Variation (TPV),

$$TPV_i = \sum_{l=1}^L \left| \log_{10} \left( \frac{p_{l,i}}{p_{l,0}} \right) \right| \quad (2.32)$$

mit den nominalen Parametern  $p_{l,0}$ , mit den nach LHS zufällig generierten Parametern  $p_{l,i}$  und der Gesamtanzahl  $L$  an Parametern im Model, quantifiziert [21, 109, 111]

Die Robustheit der Zustandsgröße  $j$ ,  $R_{TPV,j}$ , gegenüber diesen Störungen,  $TPV_i$ , wird dann gemäß

$$R_{TPV,j} = \frac{-\sum_{l=1}^L \left| \log_{10} \left( \frac{f_{j,l}}{f_{j,0}} \right) \right|}{L} \quad (2.33)$$

mit dem Modell-Output der Zustandsvariablen  $j$  für  $L$  zufällig generierte Parametersets,  $f_{j,l}$ , und für den nominalen Parameterset,  $f_0$ , quantifiziert [112]. Der Robustheit-Koeffizient  $R_{TPV,j}$  hat folglich einen negativen Wert, wobei je näher zu 0 desto höher die Robustheit der Zustandsvariablen.

In der Multiparametersensitivitäts- und Robustheitsanalyse werden als Model-Output  $f_j$  jeweils die Integralfläche der Zustandsvariablen  $j$  über der Zeit betrachtet.

#### 2.4.6 Dynamische Analyse der Variabilität des Arzneimittelmetabolismus aufgrund individueller CYP- und UGT-Proteinlevel

Für die Vorhersage des Fremdstoffabbaus unter Berücksichtigung der inter-individuellen Variabilität der CYP- und UGT1A3-Proteinlevel, werden Proteinkonzentrationsdaten dieser Enzyme aus einer Stichprobenmenge an 150 Lebermikrosomenproben der humanen Leberbank (siehe **Abschnitt 2.1**) in den dynamischen Simulationen implementiert. Die Proteinkonzentrationsdaten der Enzyme CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4 und UGT1A3 werden in einen Ansatz der relativen Menge transformiert, um die entsprechenden maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten,

$$r_{\max,il,j}^e = r_{\max,Referenz,j}^e \cdot \frac{c_{il}^e}{c_{Referenz}^e}, \quad (2.34)$$

abschätzen zu können. In diesem Transformationsansatz präsentieren  $r_{\max}^e$  die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten des entsprechenden Enzyms  $e$  zum Produkt  $P_j$  und  $c^e$  die Enzymkonzentration jeweils in der individuellen Leber,  $il$ , und in der Referenzleber der experimentellen Untersuchung und Parameterschätzung, „Referenz“.

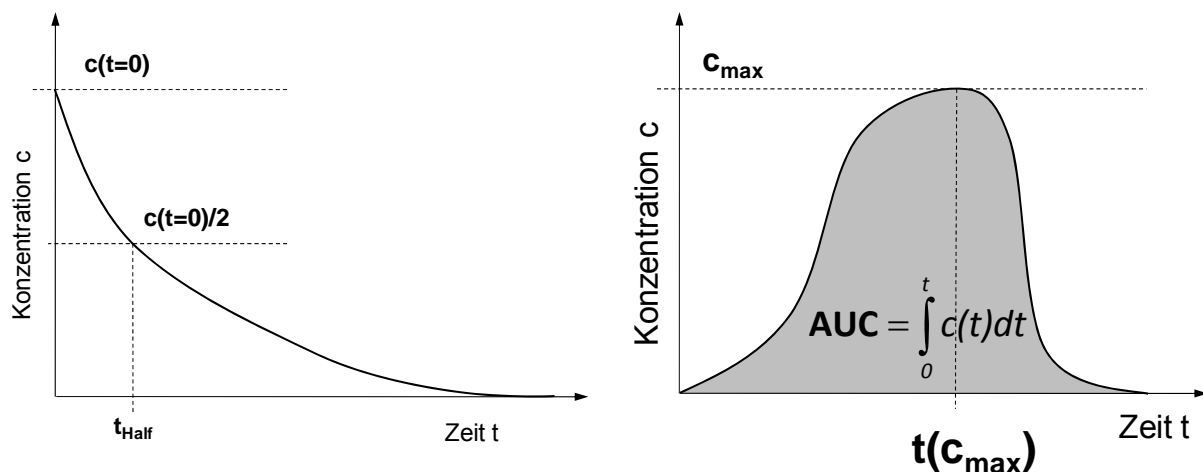
Da Proteinkonzentrationen von CYP2C19 nicht gemessen werden können, wird die Enzymaktivität des Enzyms CYP2C19 bezüglich eines bestimmten Indikatorsubstrats verwendet. S-Mephenytoin wurde als Indikatorsubstrat für die CYP2C19-Phänotypisierung identifiziert, da es ausschließlich über CYP2C19 hydroxyliert wird [114]. In Anlehnung an

den Ansatz des relativen Aktivitätsfaktors („relative activity factor“, RAF) [64] lassen sich die individuellen maximalen Reaktionsraten folglich in einem ähnlichen Ansatz wie in Gleichung (2.34),

$$r_{\max,j}^{CYP2C19} = r_{\max,reference}^{CYP2C19} \cdot \frac{v_{j,S\text{-Mephenytoin}}^{CYP2C19}}{v_{reference,S\text{-Mephenytoin}}^{CYP2C19}}, \quad (2.35)$$

auf Basis der Mephenytoin-Aktivität  $v_{j,S\text{-Mephenytoin}}^{CYP2C19}$  an individuellen Lebermikrosomen abschätzen.

An den entsprechenden Simulationsprofilen werden die Halbwertszeit ( $t_{Half}$ ), die Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC), maximale Konzentration ( $c_{max}$ ), oder der Zeitpunkt der maximalen Konzentration ( $t(c_{max})$ ) ermittelt (**Abb. 6**). AUC wird per Approximation von Trapezflächen an gleichmäßig über die Simulationsdauer verteilten Zeitpunkten abgeschätzt. Die entsprechenden Verteilungen werden über Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen in MATLAB beschrieben.



**Abb. 6:** Beispiel für die Halbwertszeit  $t_{Half}$  (links), und für die *Area under the curve* (AUC), die Integralfäche unter einer Kurve über der Zeit, für die Maximalkonzentration  $c_{max}$  und für den Zeitpunkt der Maximal-Konzentration  $t(c_{max})$  (rechts).



## 3 Initialratenansatz an humanen Lebermikrosomen

### 3.1 Einleitung

In diesem Teil der Arbeit wurde der Arzneimittelmetabolismus mithilfe von humanen Lebermikrosomenproben der Leberbank des IKP (siehe **Abschnitt 2.1**) untersucht

Da die Lebermikrosomen aus dem endoplasmatischen Retikulum der Leberzellen gewonnen werden, enthalten diese die für den Fremdstoffmetabolismus wichtigsten Enzymsysteme, wie CYPs und UGTs. Daher wurden Lebermikrosomen in der Pharmakologie weit verbreitet als *in-vitro*-System verwendet [115], um in einer einfachen Handhabung möglichst umfangreich Untersuchungen des Fremdstoffmetabolismus in einem Subsystem isoliert von anderen Prozessen der Leberzelle untersuchen zu können [116].

Der wesentliche Vorteil in der Untersuchung an Lebermikrosomen besteht in der Möglichkeit, diese einzufrieren und damit auf Vorrat halten zu können. Weiter können damit Untersuchungen wiederholt und reproduziert und somit bei Bedarf experimentelle Ansätze verbessert werden. Der wesentliche Nachteil der mikrosomalen Untersuchung liegt darin, dass diese Zellfraktion durch Enzymdegradation und -deaktivierung bei physiologischer Temperatur (37 °C) instabile Eigenschaften aufweist, und damit der experimentell mögliche Untersuchungszeitraum wesentlich eingeschränkt ist. Daher werden Experimente an Mikrosomen zur Untersuchung des Metabolismus meistens in einem Initialratenansatz durchgeführt. Das heißt in einem relativ kurzen Zeitraum, in dem die Initialrate in zeitlich linearer Abhängigkeit zur Initialkonzentration steht, wird die initiale Rate der Bildung des Abbauproduktes bestimmt und in einen funktionalen Zusammenhang zur Initialkonzentration gesetzt.

Als Modellsubstrate werden in dieser Arbeit Dextromethorphan (**DT**), ein Husten-Arzneimittel, und Propafenon (**PF**), ein Arzneimittel gegen Herzrhythmusstörungen, gewählt, da diese Fremdstoffe schon ausführlich in früheren Studien eingesetzt wurden, weil die Hauptabbauwege im Metabolismus in der Leber bekannt sind und weil Standardmetabolite zur analytischen Quantifizierung zur Verfügung standen.

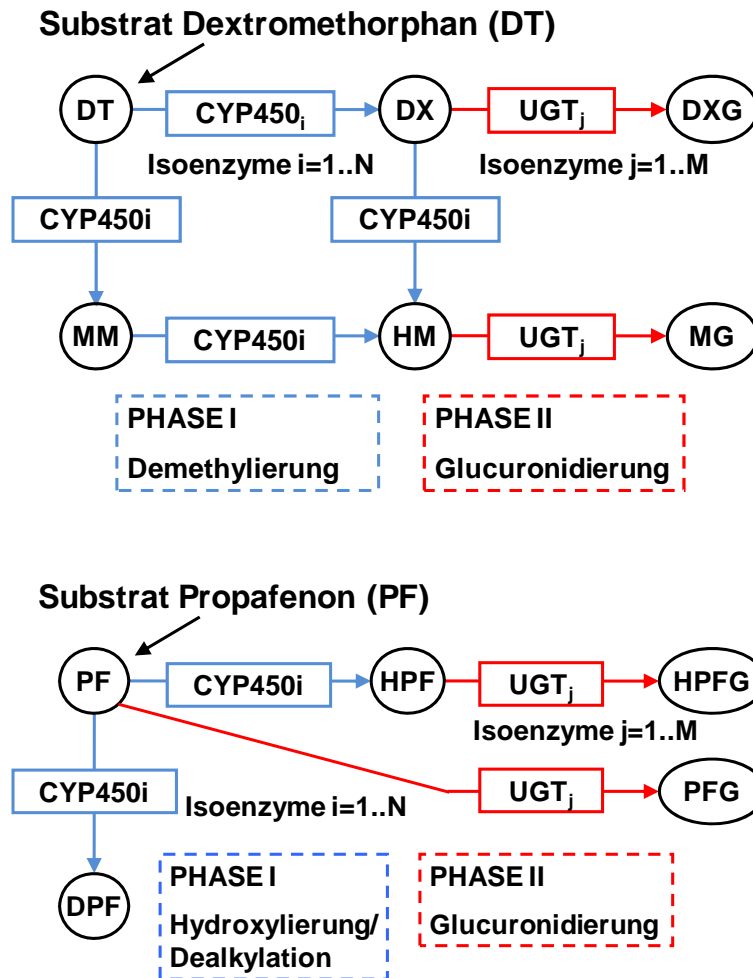
### 3.2 Identifikation der Netzwerkstruktur

DT wird in der Phase I durch CYP450 Isoenzyme per O-Demethylierung zu Dextrorphan (DX) und per N-Demethylierung zu 3-Methoxymorphinan (MM) umgewandelt. Weiter werden DX beziehungsweise MM durch eine N-Demethylierung beziehungsweise O-Demethylierung abgebaut zu dem zweifach demethylierten Metaboliten 3-Hydroxymorphinan (HM) [117-122]. DX und HM werden in der Phase II durch UGT-Enzyme per Glucuronidierung an der in Phase I durch Demethylierung gebildeten Hydroxy-Gruppe weiter abgebaut zu Dextrorphan-Glucuronid (DXG) und 3-Hydroxymorphinan-Glucuronid (MG) [118, 122] (**Abb. 7** oben).

Zur Identifikation der an der Demethylierung von DT in der Phase I beteiligten CYP-Isoenzyme wurden 2  $\mu$ M und 20  $\mu$ M DT mit den rekombinanten Isoenzymen CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2B6+b5, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1+b5, CYP3A4, 3A4+b5 inkubiert und die Produktbildung von DX und MM bei diesen Substratkonzentrationen bestimmt (**Abb. 8**). Aufgrund der Ergebnisse wurden folgende Isoenzyme in der Phase I identifiziert, die am Abbau von DT beteiligt sind: CYP2D6, CYP2C19 und CYP2C9 am Abbau von DT zu DX, CYP2B6, CYP3A4 und CYP2C19 am Abbau von DT zu MM. Die am Abbau der Metabolite DT und MM zu jeweils HM beteiligten Isoenzyme in der Phase I wurden aus einer früheren Untersuchung an rekombinanten CYPs als jeweils CYP3A4 und CYP2D6 übernommen [123].

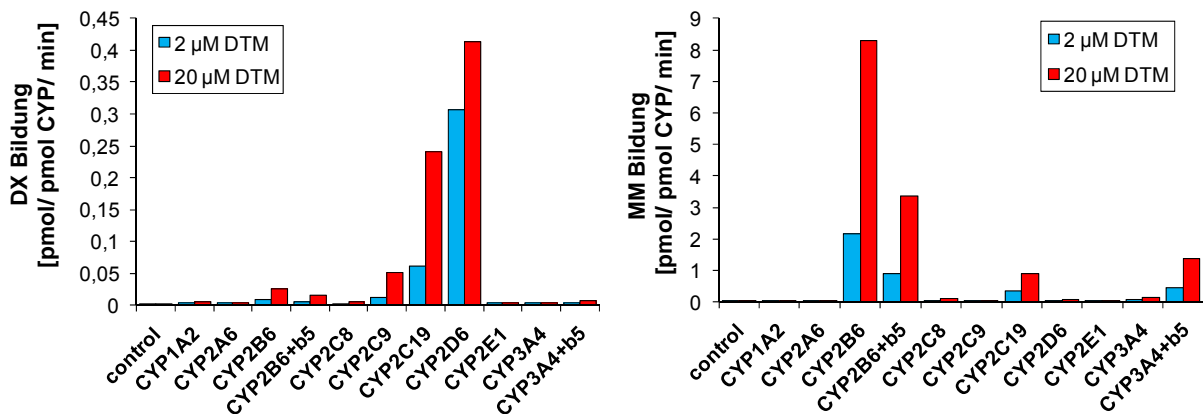
Zur Identifikation der an der Glucuronidierung von DX in der Phase II beteiligten UGT-Isoenzyme wurden 100  $\mu$ M und 10 mM DX mit den rekombinanten Isoenzymen UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B4 und UGT2B7 inkubiert und die DXG-Bildung bei diesen Substratkonzentrationen bestimmt (**Abb. 9**). Daraus konnten die Isoenzyme UGT1A3, UGT2B4 und UGT2B7 identifiziert werden, die an der Glucuronidierung von DX zu DXG in der Phase II beteiligt sind.

PF wird in der Phase I durch CYP450 Isoenzyme per Hydroxylierung zu 5-Hydroxy-Propafenon (HPF) und per Desalkylierung zu N-Desalkyl-Propafenon (DPF) umgewandelt [124-127]. Da PF als S- und R-Enantiomer existiert, werden entsprechende S- und R-Enantiomere der Metabolite gebildet. Die Enantiomere wurden in dieser Untersuchung jedoch nicht unterschieden. In der Phase II werden PF und HPF durch UGT-Enzyme per Glucuronidierung an den Hydroxygruppen abgebaut zu Propafenon-Glucuronid (PFG) und 5-Hydroxy-Propafenon-Glucuronid (HPFG) [128, 129] (**Abb. 7** unten).

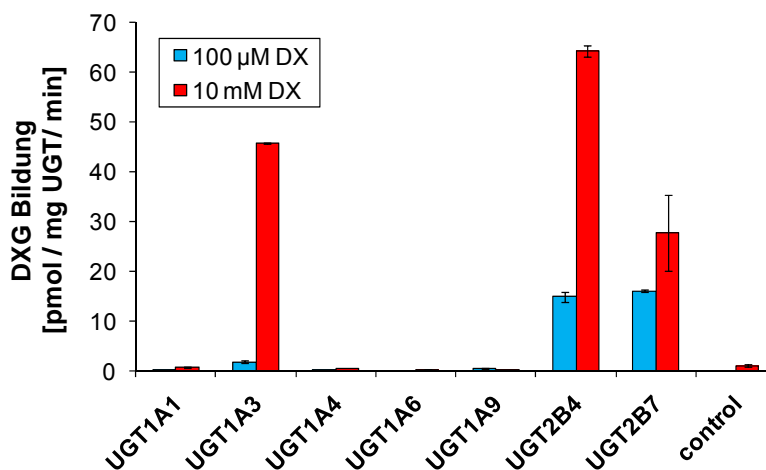


**Abb. 7:** Reaktionsschema des DT-Metabolismus und PF-Metabolismus in humanen Leberzellen in Phase I und II. Bei DT (oben) werden in Phase I (blau) Demethylierungs-Reaktionen zu den Metaboliten DX, MM und HM und in Phase II (rot) Glucuronidierungs-Reaktionen zu DXG und MG von jeweils verschiedenen Isoenzymen katalysiert. Bei PF (unten) werden in Phase I (blau) Hydroxylierungs- beziehungsweise Dealkylierungs-Reaktionen zu den Metaboliten HPF beziehungsweise DPF und in Phase II (rot) Glucuronidierungs-Reaktionen zu den Metaboliten HPFG und PFG von jeweils verschiedenen Isoenzymen katalysiert.

Zur Identifikation der am Abbau von PF in der Phase I beteiligten Isoenzyme wurden 5  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  PPF mit den rekombinanten Isoenzymen CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2B6+b5, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1+b5, CYP3A4, 3A4+b5 inkubiert und die Produktbildung von HPF und DPF bei diesen Substratkonzentrationen bestimmt (**Abb. 10**). Daraus wurden folgende Isoenzyme in der Phase I identifiziert, die am Abbau von PF beteiligt sind: CYP2D6, CYP1A2 und CYP2C19 am Abbau von PF zu HPF und CYP2C19, CYP3A4, CYP1A2 und CYP2B6 am Abbau von PF zu DPF.

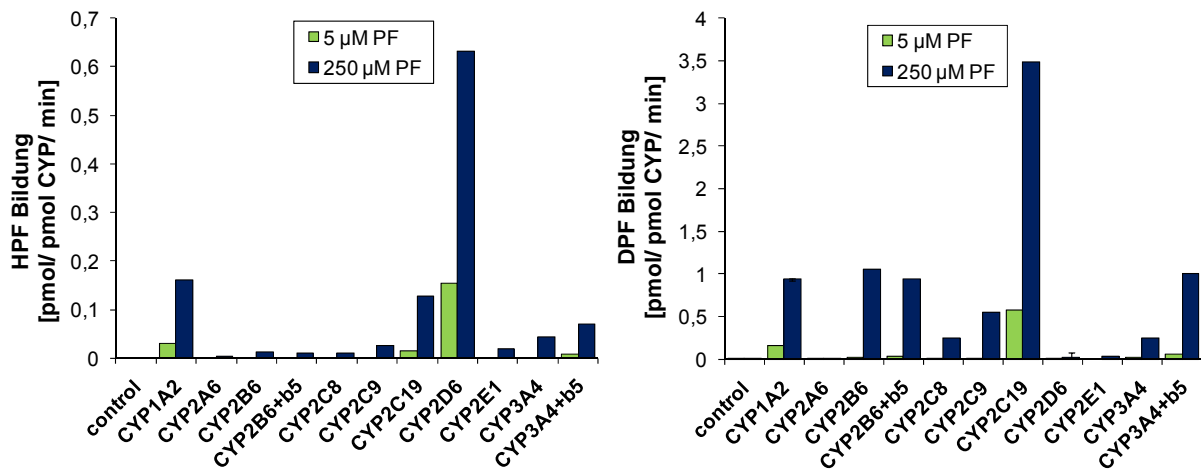


**Abb. 8:** Bestimmung der Produktbildungsrate von DX(links) und MM(rechts) an rekombinanten CYP450 Enzymen zur Identifikation der am Abbau von DT in der Phase I beteiligten Isoenzyme. DX- und MM-Bildung bei 2 µM und 20 µM DT.

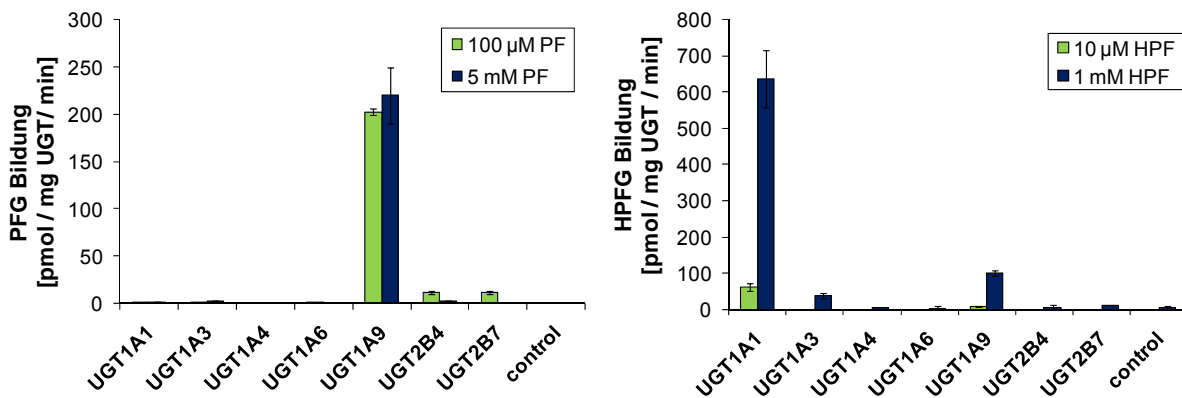


**Abb. 9:** Bestimmung der Produktbildungsrate von DXG an rekombinanten UGT Enzymen zur Identifikation der am Abbau von DX in der Phase II beteiligten Isoenzyme. Produktbildungen bei 100 µM und 10 mM DX.

Zur Identifikation der an der Glucuronidierung von PF bzw. HPF in der Phase II beteiligten UGT-Isoenzyme wurden 100 µM und 5 mM PF bzw. HPF mit den rekombinanten Isoenzymen UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT2B4 und UGT2B7 inkubiert und die PFG- bzw. HPFG-Bildung bei diesen Substratkonzentrationen bestimmt (**Abb. 11**). Daraus konnten die Isoenzyme UGT1A9 bzw. UGT1A1 identifiziert werden, die an der Glucuronidierung von PF zu PFG bzw. von HPF zu HPFG in der Phase II beteiligt sind.



**Abb. 10:** Bestimmung der Produktbildungsrate von HPF (links) und DPF (rechts) an rekombinanten CYP450 Enzymen zur Identifikation der am Abbau von PF in der Phase I beteiligten Isoenzyme. HPF- und DPF-Bildung bei 5 µM und 250 µM PF.



**Abb. 11:** Bestimmung der Produktbildungsrate von PFG (links) und HPFG (rechts) an rekombinanten UGT Enzymen zur Identifikation der am Abbau von PF und HPF in der Phase II beteiligten Isoenzyme. PFG- und HPFG-Bildung bei 100 µM und 5 mM PF bzw. HPF.

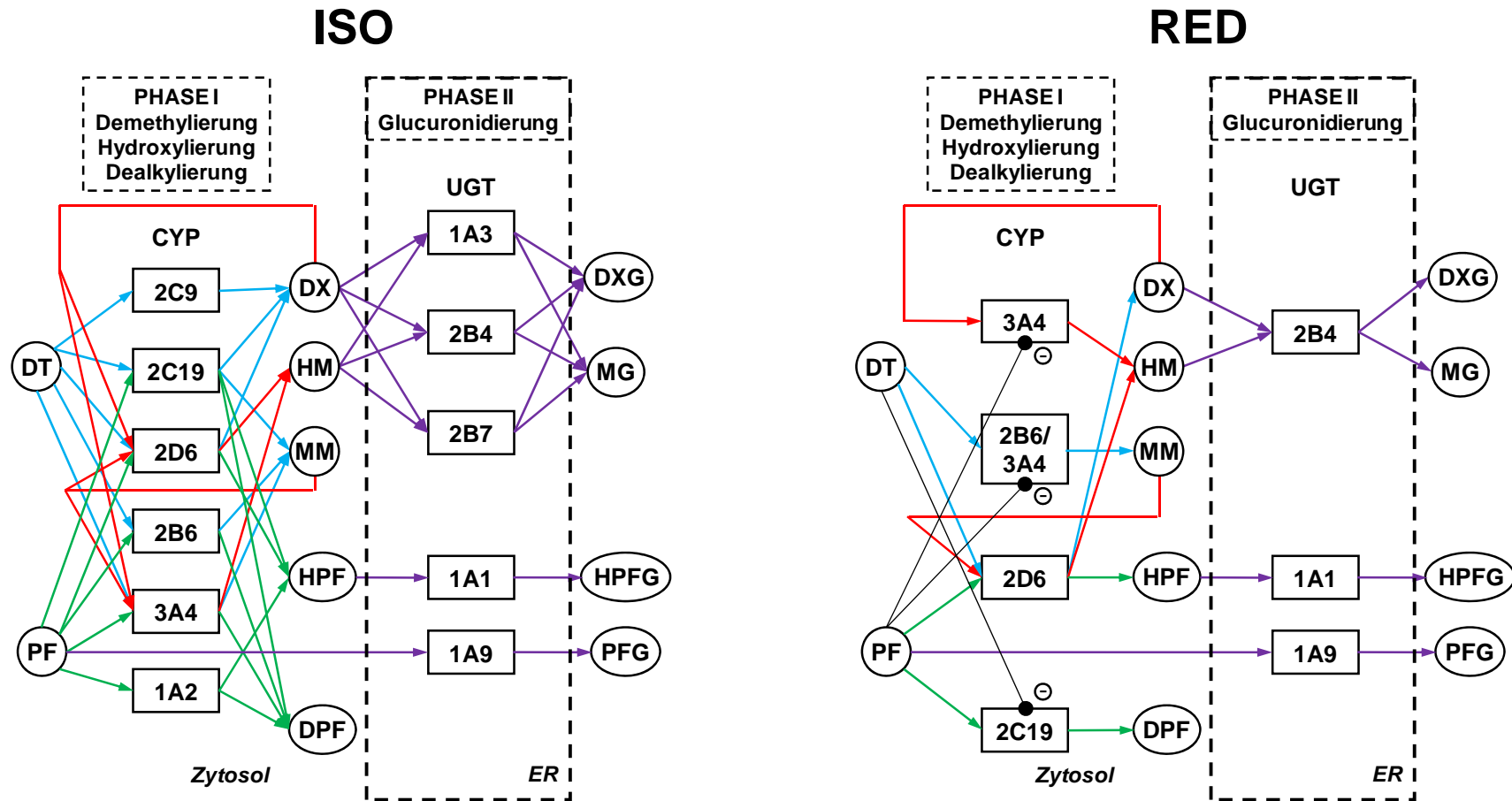
Die Transportvorgänge von DT und PF in humanen Hepatozyten wurden bisher noch nicht genauer untersucht, das heißt die beteiligten Enzyme und kinetischen Parameter wurden bisher noch nicht identifiziert. In dieser Arbeit wird nicht detaillierter auf die Transportvorgänge von DT und PF eingegangen, da die Modellierung und Modellverifikation an rekombinanten Enzymen und Lebermikrosomen untersucht wird.

Das Schema des Fremdstoffmetabolismus von DT und PF mit den als beteiligt identifizierten CYP- und UGT-Isoenzymen in humanen Hepatozyten ist in **Abb. 12** (links) zusammengefasst.

In pharmakologischen Untersuchungen wird der Fremdstoffmetabolismus eines Arzneimittels oft auf Master-Enzyme reduziert, die in Aktivitätsmessungen die höchste Aktivität, in Aktivitäts-Proteinkonzentrations-Korrelationen die beste Übereinstimmung oder die höchsten Konzentrationswerte in humanen Hepatozyten aufweisen. Für den Abbau von DT werden in der Literatur CYP2D6 als Masterenzym im Abbau von DT zu DX und im

Abbau von MM zu HM, und CYP3A4 als Masterenzym im Abbau von DT zu MM und im Abbau von DX zu HM definiert [117-122]. Diese Reduktion wurde jedoch auf Basis des Mittelwerts der Konzentrationswerte über einer Stichprobenmenge durchgeführt, und damit CYP3A4 und nicht CYP2B6 als Masterenzym definiert, da CYP3A4 mit 30% den höchsten Anteil des gesamten CYP-Gehalts in mikrosomalem Protein ausmacht, CYP2B6 jedoch nur 0,2% [8, 130]. Durch diese Reduktion auf den Mittelwert einer Verteilung gehen jedoch wertvolle Informationen zum einen über die Streuung der Werte und damit die Variabilität in der Stichprobe und zum anderen über die individuelle CYP450-Komposition verloren. Der Fremdstoffmetabolismus in Leberzellen darf nämlich nicht als das Ergebnis der Aktion von einzelnen Masterenzymen angesehen werden, sondern muss vielmehr als das orchestrale Zusammenspiel der verschiedenen Einzelenzymen angesehen werden, die wiederum individuell unterschiedlich in der Konzentration ausgeprägt sind.

In dieser Arbeit sollte daher der individuelle Charakter des Fremdstoffmetabolismus herausgehoben werden. Zum Beispiel zeigte sich in der Untersuchung der Enzymaktivität (**Abb. 8**), dass CYP2B6 eine höhere Aktivität bezüglich des Abbaus von DT zu MM aufweist als CYP3A4, was konsistent mit den Ergebnissen von Aming Yu und Robert L Haining [123] ist. Weiter wurde bei CYP2B6 eine höhere inter-individuelle Variabilität der Isoenzym-Menge in der Leber, Faktor 100, als bei CYP3A4, Faktor 5-37, nachgewiesen [8-10]. Aus diesem Grund könnte es individuell zutreffen, dass CYP2B6 bei einer relativ hohen Konzentration in der Leber einen sehr hohen Beitrag zu dem Abbau von DT zu MM liefert. In diesem Fall würde die Reduktion des Metabolismus auf das scheinbare Masterenzym CYP3A4 in der Modellierung zu einer schwerwiegenden Fehlvorhersage durch die dynamische Simulation führen. Um diese Unterschiede herauszuarbeiten, werden im nachfolgenden Teil der Arbeit in der Modellierung und dynamischen Analyse das vollständige Modell (**ISO**) mit den in Phase I und II am Abbau von DT beziehungsweise PF beteiligten CYP- und UGT-Isoenzymen (**Abb. 12**, links) verglichen mit einem reduzierten Modell (**RED**), das pro Reaktionsschritt nur das jeweilige Masterenzym mit der größten Aktivität enthält (**Abb. 12**, rechts). Bei DT wird das RED-Modell folglich noch in zwei Varianten bezüglich des Abbaus nach MM unterschieden, einer, die CYP2B6 als Masterenzym (**RED2B6**) enthält, und einer, die CYP3A4 als Masterenzym (**RED3A4**) enthält. Bei PF wird nur eine reduzierte Modellvariante untersucht (**RED**).



**Abb. 12** Strukturelles Schema des DT und PF-Fremdstoffmetabolismus mit beteiligten CYP-Isoenzymen in Phase I-Metabolismus und UGT-Isoenzyme in Phase-II-Metabolismus. Links: vollständiges Isoenzym-Modell (**ISO**). Rechts: reduziertes Modell mit Masterenzymen pro Reaktionsschritt (**RED**); Modellvarianten im Abbau von DT zu MM: CYP2B6 (**RED2B6**) und CYP3A4 (**RED3A4**). Reaktionspfade des DT-Abbaus und des PF-Abbaus sind gegliedert in Phase I (DT: blau und rot, PF: grün) und in Phase II (jeweils violett)

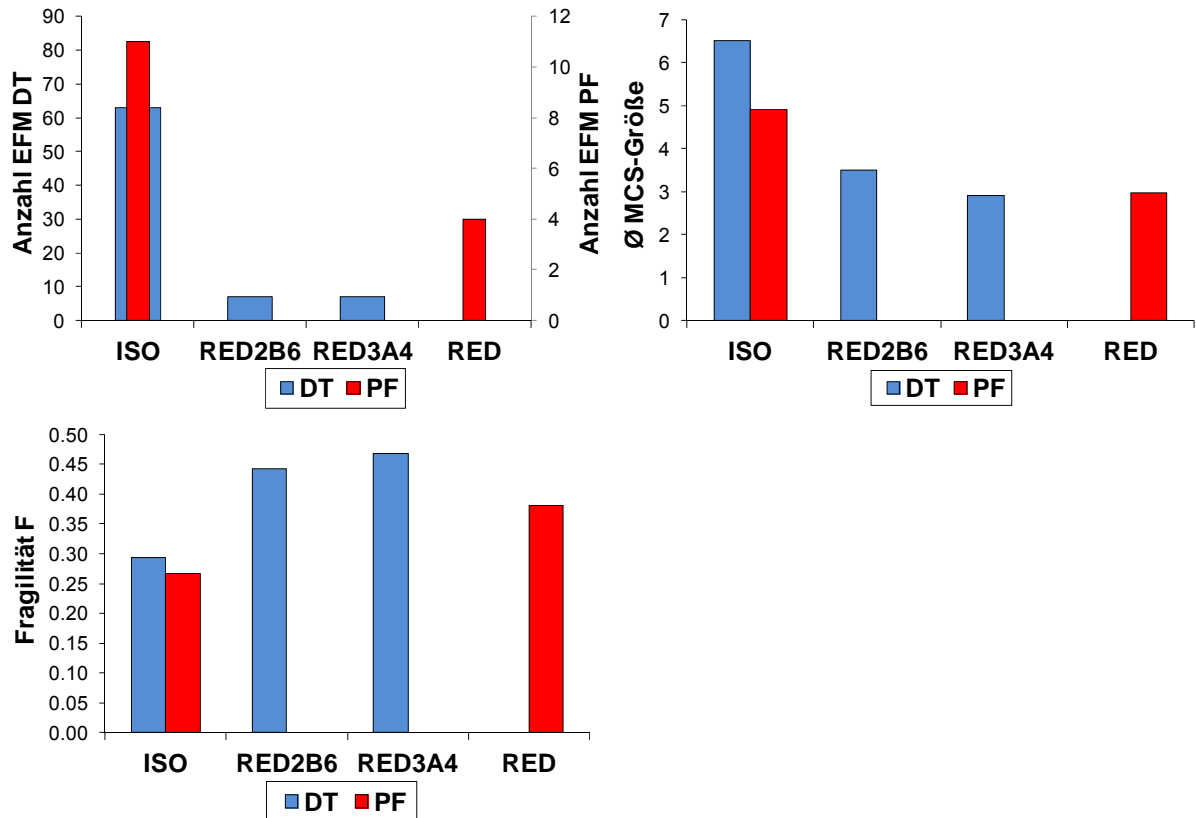
### 3.3 Topologische Analyse der Modellstruktur

Zur Untersuchung der topologischen Eigenschaften des Fremdstoffmetabolismus von DT und PF werden die Modelle auf EFMs, MCS und Fragilität F (siehe **Abschnitt 2.4.2**) untersucht. Dabei wird jeweils das vollständige ISO-Modell mit der reduzierten Modellvariante, RED2B6 und RED3A4 bei DT beziehungsweise RED bei PF, verglichen. Die Funktionalität des Systems ist der Abbau des Arzneimittels DT beziehungsweise PF, daher wurden EFM nicht berücksichtigt, die die Phase I-Metabolite (DX, MM, HM, HPF, DPF) als Substrate verwenden.

In den Ergebnissen zeigt sich, dass das ISO-Modell jeweils eine höhere Anzahl der EFM, eine höhere durchschnittliche MCS-Größe und eine niedrigere Fragilität als das jeweilige RED-Modell aufweist (**Abb. 13**), wobei die Unterschiede zwischen den beiden RED-Modellen bei DT gering sind. Weiter wird damit auch deutlich, dass die Anzahl der EFM und die durchschnittliche MCS-Größe im ISO- und in den RED-Modellen für DT jeweils größer sind als für PF, die Fragilität für DT im ISO- beziehungsweise in den RED-Modellen jedoch auch größer ist als für PF.

Schließlich wurden in verschiedenen Szenarien die Auswirkungen eines Knock-outs eines bestimmten CYP-Enzyms auf die Funktionalität des Systems betrachtet. Diese Knock-outs stellen entweder die fehlende Expression eines bestimmten Enzyms bei sogenannten *Poor Metabolizern* („Schlechten Verwertern“) dar, oder den Extremfall einer totalen Inhibition durch andere endogene oder exogene Effektoren, wie zum Beispiel Cimetidine an CYP2D6 [131], Chlopidogrel und Ticlopidin an CYP2B6 [132], und Omezaprol, (+)-N-3-Benzyl-Nirvanol oder (-)-N-3-Benzyl-Phenobarbital an CYP2C19 [133, 134]. Andere Knock-Out-Phänomene könnten zum Beispiel dysfunktionale Allele von CYP-Enzymen beinhalten, wie es für CYP2D6 berichtet wurde [135]. Zur Untersuchung der Auswirkung wurden die EFM gelöscht, in denen das jeweilige CYP-Enzyme beteiligt ist, und MCS und Fragilität an den restlichen EFM bestimmt und auf die entsprechenden Werte des vollständigen Modells normalisiert wird (**Abb. 14**). Die Ergebnisse dieser Knockout-Analyse werden im Folgenden beispielhaft nur am ISO- und am RED2B6- (Bezeichnung für DT) beziehungsweise RED-Modell (Bezeichnung für PF) erläutert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Knock-outs in den RED2B6-Modellen von DT und PF eine größere Auswirkung haben als in den entsprechenden ISO-Modellen.

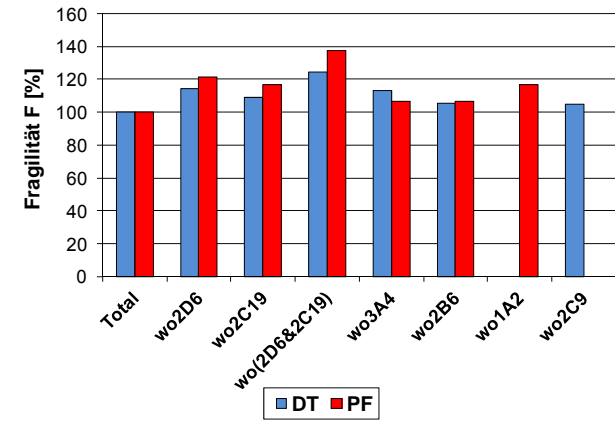
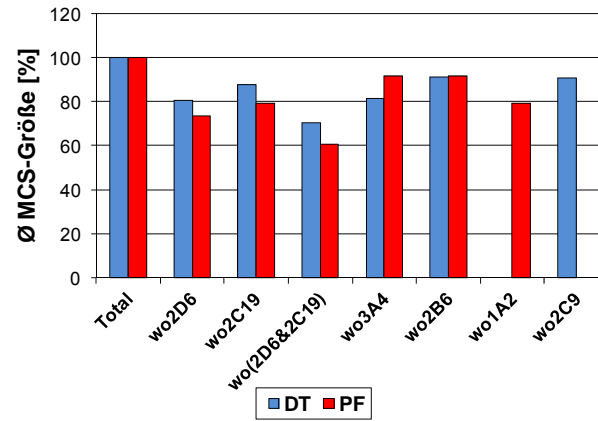
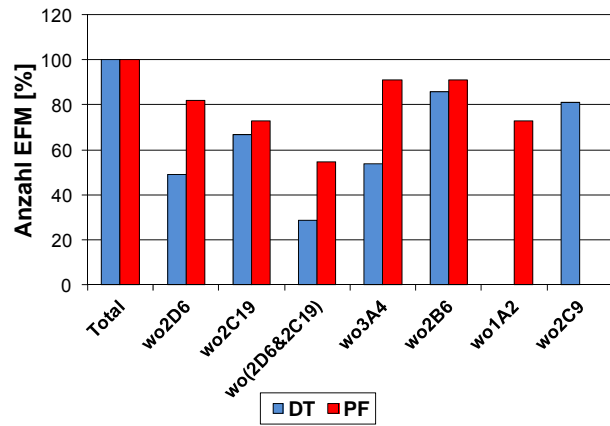




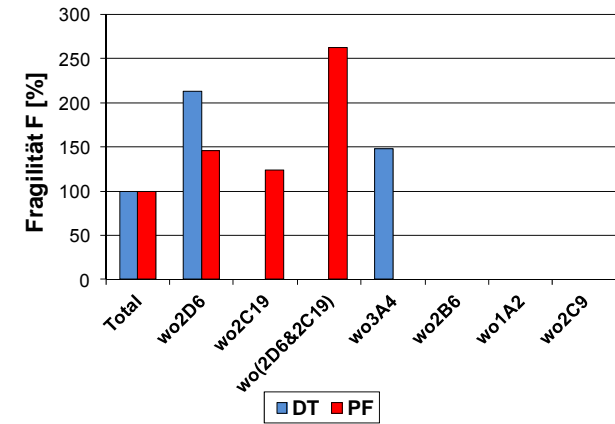
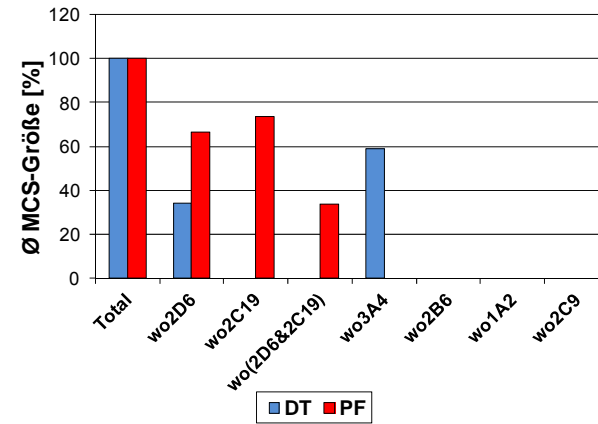
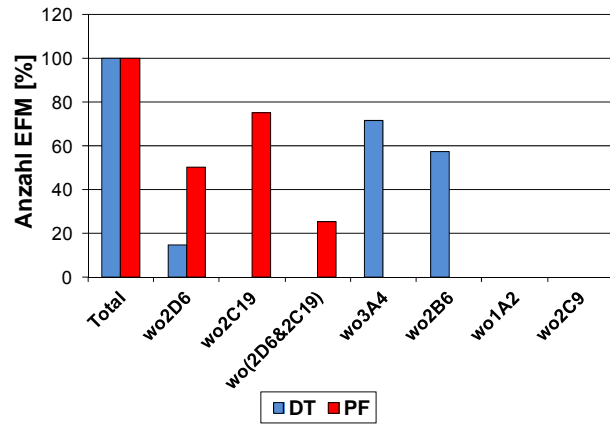
**Abb. 13:** Vergleich der Anzahl der EFM (links oben), der durchschnittlichen MCS-Größe (rechts oben) und der Fragilität (links unten) zwischen dem Isoenzym-Modell (ISO) und den reduzierten Modellen, RED2B6 und RED3A4, bei DT (blau) und RED bei PF (rot).

Für DT ergibt sich eine große Veränderung durch den Knock-Out von CYP2D6, jedoch hat dies im RED2B6-Modell größere Auswirkungen als im ISO-Modell. Die Zahl der EFM wird im ISO-Modell nur auf 49%, im RED2B6-Modell jedoch auf 14% reduziert. Die durchschnittliche MCS-Größe wird nur auf 81% im ISO-Modell, jedoch auf 29% im RED2B6-Modell reduziert. Die Fragilität erhöht sich entsprechend auf 109% im ISO-Modell und auf 226% im RED2B6-Modell. Die Auswirkungen sind im RED2B6-Modell deshalb so stark, da durch den CYP2D6-Knockout keine EFM in der Phase II mehr möglich sind und somit die Funktionalität der Glucuronidierung zusammenbricht. Es verbleibt nur ein EFM mit der N-Demethylierung von DT zu MM. Die größte Auswirkung auf das ISO-Modell von DT hat der gleichzeitige Knock-out von CYP2D6 und CYP2C19, da die EFM beziehungsweise die durchschnittliche MCS-Größe auf 29% beziehungsweise 70% gesenkt werden, und die Fragilität auf 124% erhöht wird. Dieser doppelte Knock-Out hat daher immer noch geringere Auswirkungen als der einzelne Knock-out von nur CYP2D6 im RED2B6-Modell.

## ISO



## RED2B6 (DT) bzw. RED (PF)



**Abb. 14:** Auswirkungen von verschiedenen CYP-Isoenzym-Knockouts („wo“) auf die Anzahl der EFM (links), der durchschnittlichen MCS-Größe (Mitte) und der Fragilität (rechts) im Isoenzym-Modell (ISO, oben) und im reduzierten Modell (RED, unten) für DT (blau) und PF (rot) im Vergleich zum vollständigen Modell („Total“). Normierung jeweils auf die Werte des vollständigen Modells („Total“)

Für PF hat der doppelte Knock-out von CYP2D6 und CYP2C19 die größten Veränderungen im ISO- und im RED-Modell, jedoch mit größeren Auswirkungen im RED-Modell. Die Zahl der EFM beziehungsweise die durchschnittliche MCS-Größe wird im ISO-Modell auf 54% beziehungsweise 61%, im RED-Modell jedoch auf 25% beziehungsweise 34% reduziert. Die Fragilität erhöht sich auf 138% im ISO-Modell, jedoch auf 263% im RED-Modell. Die Auswirkungen sind deshalb so stark im RED-Modell, da hier keine EFM in der Phase I mehr möglich sind. Es verbleibt nur ein einziger EFM über die direkte Glucuronidierung von PF, die Funktionalität der Phase I bricht zusammen.

Insgesamt wird durch den Vergleich der Isoenzym-Modelle mit den entsprechenden reduzierten Modellvarianten und durch die Analyse von potentiellen Isoenzym-Knockouts sehr deutlich, dass die redundante Isoenzymstruktur eine strukturelle Robustheit garantiert, die einen Schutz gegen den potentiellen Ausfall oder Dysfunktionalität von einzelnen Isoenzymen darstellt.

### 3.4 Dynamische Modellierung

Das Modell des Fremdstoffmetabolismus von DT und PF wurde mathematisch mit gewöhnlichen Differentialgleichungen beschrieben

$$\frac{dc_j}{dt} = \sum_e v_{e,j} r_{e,j} = f(\mathbf{c}, \mathbf{p}, t) \quad (3.1)$$

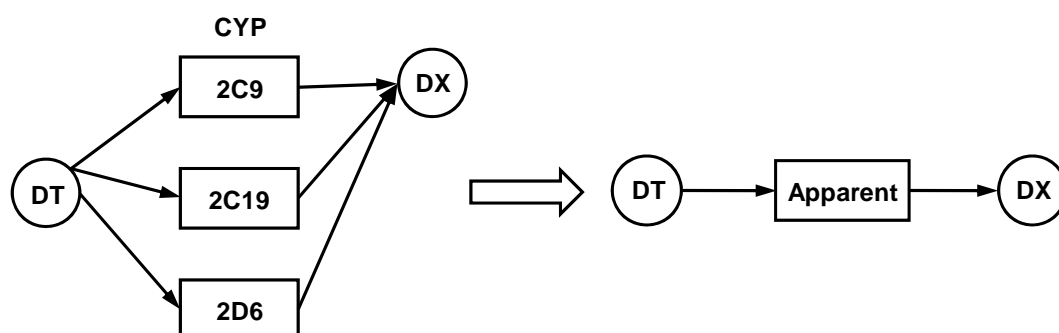
bei der die Umsetzung über verschiedene katalysierende Enzyme  $e$  berücksichtigt wird. Dabei wird im Vergleich zu (2.1) das Volumen mit den Reaktionsraten zusammengefasst, da nur ein Kompartiment, das Medium, berücksichtigt wird. Die Reaktionskinetik von Enzymen, die die Umwandlung nur eines Substrats  $S_j$  zu nur einem Produkt  $P_j$  katalysieren, wird als Michaelis-Menten-Kinetik (Gleichung (2.3)) angesetzt. Die Reaktionskinetik von Enzymen, welche die Umwandlung mehrerer Substrate zu mehreren verschiedenen Produkten katalysiert, wird als kompetitive Konkurrenz durch alternative Substrate in der Umwandlung zu alternativen Produkten beschrieben (Gleichung (2.4)).

## 3.5 Modell-Verifikation

### 3.5.1 Parameteridentifikation der apparenten Einzelreaktionen

Die Experimente zur Untersuchung des Fremdstoffmetabolismus von PF und DT wurden in einem Initialratenansatz (Gleichung (2.9)) ausgelegt. Dazu wurden verschiedene Initialkonzentrationen der Einzelsubstrate, DT und PF, an humanen Lebermikrosomen eines Individuums mit einem NADP(H)-regenerierenden System co-inkubiert, um die Initialraten der Phase-I-Reaktionen zu bestimmen (Anhang B **Tab. B.1**). Weiter wurden verschiedene Initialkonzentrationen der jeweiligen Phase-I-Metabolite an humanen Lebermikrosomen mit UDP-Glucuronid co-inkubiert, um die Initialraten der Phase II-Reaktionen zu bestimmen (Anhang B **Tab. B.2**). Die gegenseitige Beeinflussung des DT- und PF-Abbaus in der Phase I wurde durch Doppelsubstrat-Bestimmungen, das heißt die gleichzeitige Inkubation beider Substrate an Lebermikrosomen in einem Ansatz in jeweils verschiedenen Konzentrationen, untersucht (Anhang B **Tab. B.3**).

Die Initialraten der Einzelsubstratmessung wurden in *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc., USA) importiert und die apparenten  $r_{max}$ - und  $K_M$ -Werte einer Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt (**Tab. 1**). Apparent bedeutet in diesem Kontext, dass die Isoenzymstruktur (**Abb. 12**, links) im Abbau von einem Substrat zu einem Produkt zunächst jeweils als Superposition zu einer apparenten Einzelreaktion betrachtet wird (**Abb. 15**).



**Abb. 15:** Superposition der Isoenzymstruktur zur apparenten Einzelreaktion am Beispiel des Abbaus von DT zu DX (siehe ISO-Modell in Abb. 12 links)

Die Anpassungen bilden die Initialraten bis auf die der HPF-Bildung sehr gut ab (**Abb. 16**). Bei HPF liegen in den Messdaten (**Abb. 16**, 2. Reihe links) wahrscheinlich durch Messfehler verursachte Ausreißer in den Initialraten vor. Die apparenten  $r_{max}$ - und  $K_M$ -Werte in der Phase I zeigen, dass bei DT der Abbau zu MM wahrscheinlich den Hauptweg der Detoxifikation von DT darstellt, da bei MM im Vergleich zu DX der größere  $r_{max}$ - und der niedrigere  $K_M$ -Wert vorliegt. Bei PF hingegen deuten die  $r_{max}$  und  $K_M$  in der Phase I darauf hin, dass bei

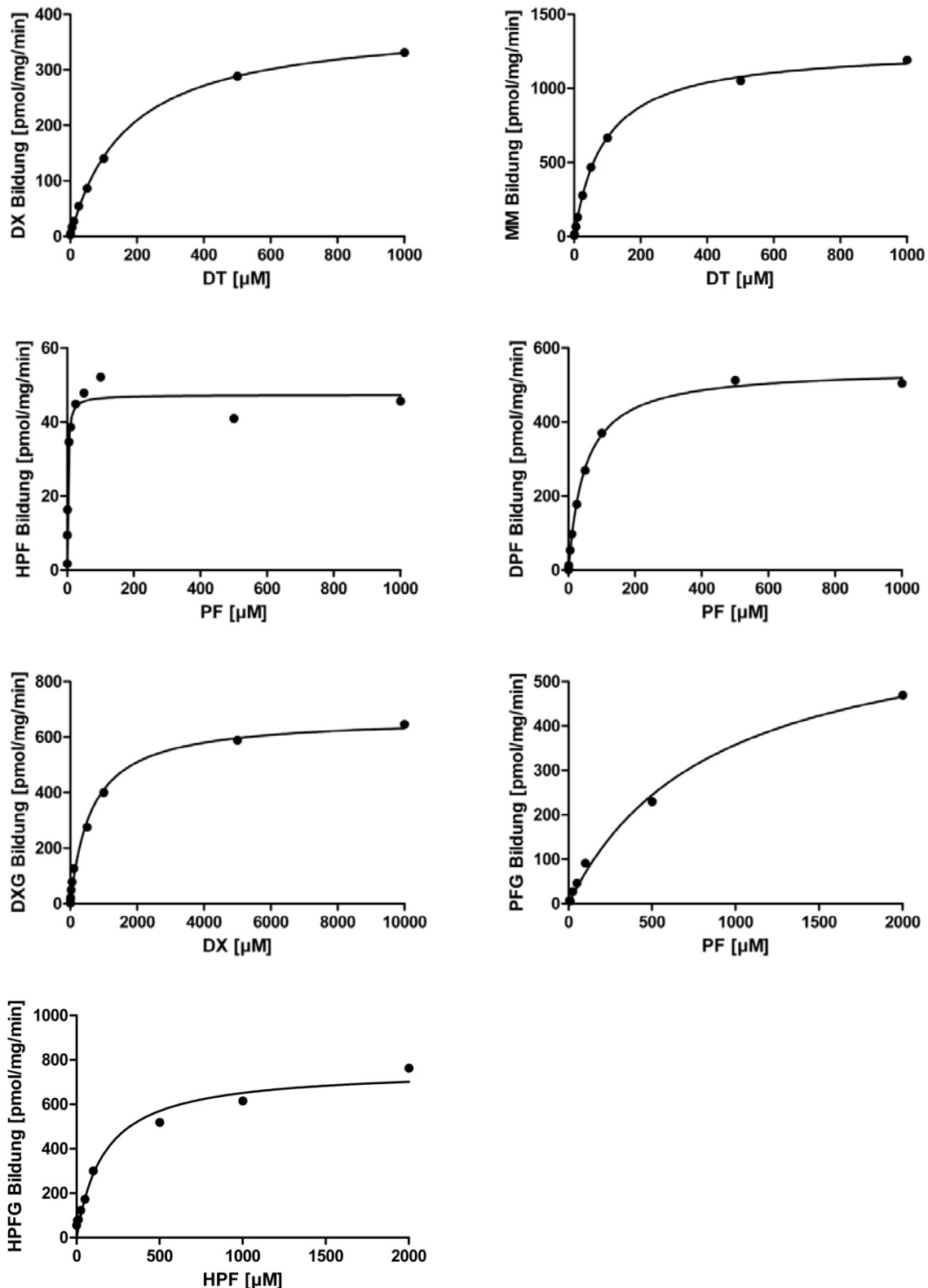
niedrigeren Konzentrationen an PF, ( $< 5 \mu\text{M}$ ), der Abbau zu HPF wahrscheinlich den Hauptweg der Detoxifikation darstellt, da bei HPF im Vergleich zu DPF ein 50-fach geringerer  $K_M$ -Wert vorliegt, während bei höheren Konzentrationen ( $> 5 \mu\text{M}$ ) der Abbau zu DPF wahrscheinlich den Hauptweg darstellt, da bei DPF im Vergleich zu HPF ein 10-fach höherer  $r_{max}$ -Wert vorliegt. Da bei den Initialkonzentrationen Werte gewählt wurden, die mit bis zu  $1000 \mu\text{M}$  deutlich über den geschätzten  $K_M$ -Parameter liegen, mindestens 5-fach-größer sollte als Kriterium angesehen werden, ist eine lineare Korrelation zwischen den apparenten Parametern,  $r_{max}$  und  $K_M$  eher unwahrscheinlich.

In der Phase II zeigen die Anpassungen, dass die apparenten  $r_{max}$  der UGT-katalysierten Bildungen von DXG, PFG und HPFG im Vergleich zur Phase I bis auf die MM-Bildung höhere Werte aufweisen. Die  $K_M$ -Werte der Bildung von DXG und PFG sind deutlich größer als die  $K_M$ -Werte der Phase I. Dies könnte darauf hindeuten, dass im Fremdstoffmetabolismus von DT und PF die Phase I-Reaktionen schneller ablaufen als die Phase II-Reaktionen, die Phase II katalysierenden Enzyme hingegen Bedeutung bekommen, wenn es zur Akkumulation der Phase I-Metabolite in der Zelle kommt.

Natürlich darf diese Betrachtungsweise des Arzneimittelmetabolismus nicht auf der Ebene der apparenten Einzelreaktionen, die jeweils durch die Superposition mehrerer Isoenzyme definiert ist, verbleiben. Da die inter-individuelle Variabilität dieser Isoenzyme nur in der kompletten Aufschlüsselung der einzelnen Isoenzyme pro Reaktionsschritt berücksichtigt werden kann und damit die Prädiktion des individuellen Metabolismus ermöglicht, muss das vollständige Isoenzym-Netzwerk (**Abb. 12**) identifiziert werden, wie in dieser Arbeit ausführlich erläutert wird.

**Tab. 1:** Apparente  $r_{max}$ - und  $K_M$ -Werte der Anpassung einer Michaelis-Menten-Kinetik an die Initialratendaten aus der Einzelsubstrat-Bestimmung an humanen Lebermikrosomen (Daten im Anhang B Tab. B.1 und Tab. B.2)

Substrat	Produkt	$r_{max}$ [pmol/mg/min]	95% Konfidenz- Intervall	$K_M$ [ $\mu\text{mol/l}$ ]	95% Konfidenz- Intervall
DT	DX	386 ±6	373 bis 399	169 ±8	151 bis 187
DT	MM	1273 ±15	1236 bis 1309	90 ±4	81 bis 99
PF	HPF	47 ±2	44 bis 51	2 ±0	1 bis 3
PF	DPF	545 ±8	528 bis 563	49 ±3	43 bis 55
DX	DXG	673 ±19	629 bis 716	638 ±71	478 bis 798
PF	PFG	666 ±44	553 bis 779	861 ±137	509 bis 1213
HPF	HPFG	760 ±46	650 bis 869	166 ±39	74 bis 259



**Abb. 16:** Initialratendaten der Inkubation an humanen Lebermikrosomen und jeweils Anpassung an eine apparente Michaelis-Menten-Kinetik (GraphPad-Prism). Phase I: Bildung von DX und MM aus DT und Bildung von HPF und DPF aus PF (1.+2.Reihe). Phase II: Bildung von DXG aus DX, Bildung von PFG aus PF und Bildung von HPFG aus HPF (3.+4. Reihe). Netzwerk siehe Abb. 12 rechts.

### 3.5.2 Parameteridentifikation der Isoenzym-Struktur in Phase I

#### 3.5.2.1 Identifikation der $r_{max}$ - und $K_M$ -Parameter

Im Folgenden werden das vollständige Isoenzym-Modell (ISO, **Abb. 12** links) und das reduzierte Modell, das nur das jeweilige Masterenzym pro Reaktionsschritt enthält (RED, **Abb. 12** rechts), betrachtet. Für die Identifikation der Parameter im RED-Modell spielt die Unterscheidung bei DT in RED2B6 und RED3A4 keine Rolle, da die reduzierte Modellstruktur diese Information a-priori nicht enthält. Diese Unterscheidung wird erst in der dynamischen Simulation und Prädiktion der inter-individuellen Variabilität bei Implementierung individueller Proteindaten notwendig. Daher wird diese Unterscheidung später wieder aufgegriffen (siehe **Abschnitt 3.6**), im folgenden Abschnitt wird jedoch nur ein reduziertes Modell (**RED**) betrachtet.

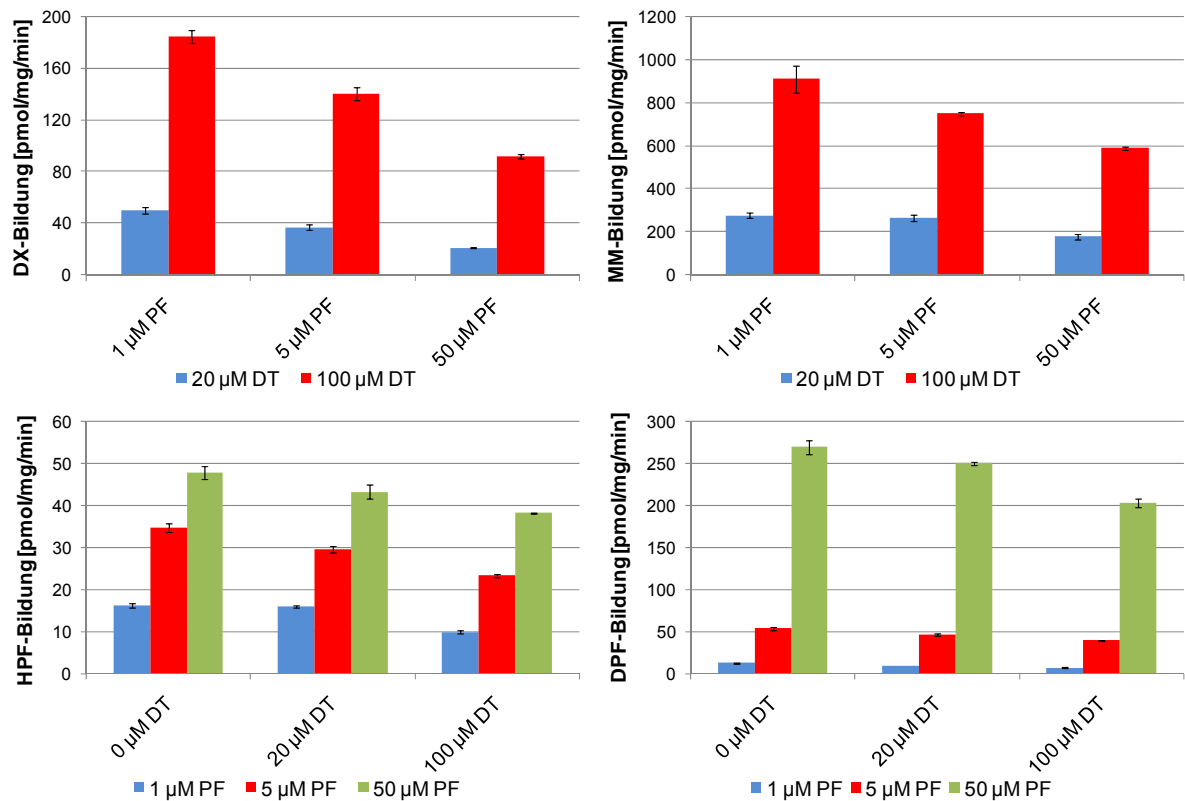
Zur Modellverifikation des ISO-Modells und des RED-Modells in der Phase I im Abbau von DT zu DX und MM und im Abbau von PF zu HPF und DPF wurden wiederum die Initialraten der Einzelsubstratmessung (Anhang B **Tab. 1**) und des Weiteren Initialraten von Doppelsubstratmessungen (**Abb. 17**, Anhang B **Tab. 3**) verwendet.

Werden die Initialraten in den Doppelsubstrat-Bestimmungen betrachtet (**Abb. 17**), so fällt auf, dass die Metabolit-Bildung eines Substrates durch steigende Konzentrationen des alternativen Substrates gehemmt wird. Die Initialbildungsraten von DX werden im Vergleich zu MM durch das alternative Substrat PF stärker gehemmt, da die Bildung von DX bei 50  $\mu\text{M}$  PF auf unter 50% zurück geht im Vergleich zu 1  $\mu\text{M}$  PF, bei MM allerdings auf circa 65% (**Abb. 17**, oben links und rechts). Die Initialbildungsraten von HPF und DPF werden durch das alternative Substrat DT gleich stark beeinflusst mit Rückgang auf 80% bei 50  $\mu\text{M}$  PF und 100  $\mu\text{M}$  PF und Rückgang auf 60% bei 1  $\mu\text{M}$  PF im Vergleich von 0 zu 100  $\mu\text{M}$  DT (**Abb. 17**, unten links und rechts). Dadurch wird auch sichtbar, dass die Beeinflussung in der Metabolitbildung bei DT durch das alternative Substrat PF trotz der höheren Initialkonzentrationen von DT größer ist als vice versa.

Die Grundlage für die Modellidentifikation bilden die Initialraten (Gleichung (2.9)) und die kinetischen Ansätze für die Initialraten (Gleichung (2.10) und Gleichung (2.11)). Das gesamte mathematische Modell ist in **Tab. 2** als Differentialgleichungssystem aufgeführt. Für die jeweils zweiten Demethylierungsschritte von DX zu HM und von MM zu HM standen keine experimentellen Initialratendaten zur Verfügung, deshalb werden diese Schritte in der Modellidentifikation nicht betrachtet. Die Doppelsubstratmessungen dienen in der Modellidentifikation der Kopplung des Arzneimittelmetabolismus von DT und PF in der

## Kapitel 3 Initialratenansatz an humanen Lebermikrosomen

Konkurrenz an den Isoenzymen und sollen damit die Identifizierbarkeit der Modellparameter im ISO-Modell erhöhen. Diese Kopplung zeigt sich anschaulich in der Bedeutung der  $K_M$ -Parameter: Dieser Parameter dient nicht nur als Affinitätsparameter im Abbau eines Substrates zu einem Produkt, sondern auch als Wettbewerbsparameter im Nenner der Abbauraten des jeweils konkurrierenden Substrates, zum Beispiel bei CYP3A4.



**Abb. 17:** Initialraten der Metabolitbildung in den Doppelsubstratmessungen (DT und PF): DX- und MM-Bildung bei 20 μM und 100 μM DT und ansteigender PF-Konzentration (oben). HPF- und DPF-Bildung bei 1 μM, 5 μM und 50 μM PF und ansteigender DT-Konzentration (unten) (Daten im Anhang B Tab. B.3).

Im RED-Modell wird für CYP2D6 ebenso eine Kinetik der Konkurrenz der alternativen Substrate DT und PF angenommen. Da PF inhibierend auf den CYP2B6/3A4-katalysierten DT-Abbau zu MM wirkt (**Abb. 17** oben rechts), und DT inhibierend auf den CYP2C19-katalysierten PF-Abbau zu DPF (**Abb. 17** unten rechts), das RED-Modell jedoch keine Konkurrenz durch alternative Substrate bei diesen Abbauwegen enthält, werden für CYP2B6/3A4 und CYP2C19 jeweils Kinetiken kompetitiver Inhibierung (Gleichung (2.5)) angenommen.



## Kapitel 3 Initialratenansatz an humanen Lebermikrosomen

**Tab. 2:** Differentialgleichungssystem des Metabolismus der Substrate DT und PF zu den Metaboliten DX, MM und HPF, DPF in der Phase I im ISO- und im RED-Modell. An diesen Modellen werden die kinetischen Parameter in Abschnitt 3.5.2 auf Basis von experimentellen Initialraten identifiziert.

ISO-Modell	RED-Modell
$\frac{dc_{DX}}{dt} = +r_{\max,2C9,DX} \frac{\frac{c_{DT}}{K_{M,2C9,DX}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,2C9,DX}}}$ $+ r_{\max,2C19,DX} \frac{\frac{c_{DT}}{K_{M,2C19,DX}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,2C19,DX}} + \frac{c_{DT}}{K_{M,2C19,MM}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2C19,HPF}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2C19,DPF}}}$ $+ r_{\max,2D6,DX} \frac{\frac{c_{DT}}{K_{M,2D6,DX}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,2D6,DX}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2D6,HPF}}}$	$\frac{dc_{DX}}{dt} = +r_{\max,2D6,DX} \frac{\frac{c_{DT}}{K_{M,2D6,DX}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,2D6,DX}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2D6,HPF}}}$
$\frac{dc_{MM}}{dt} = +r_{\max,2B6,MM} \frac{\frac{c_{DT}}{K_{M,2B6,MM}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,2B6,MM}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2B6,DPF}}}$ $+ r_{\max,2C19,MM} \frac{\frac{c_{DT}}{K_{M,2C19,MM}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,2C19,DX}} + \frac{c_{DT}}{K_{M,2C19,MM}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2C19,HPF}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2C19,DPF}}}$ $+ r_{\max,3A4,MM} \frac{\frac{c_{DT}}{K_{M,3A4,MM}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,3A4,MM}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,3A4,DPF}}}$	$\frac{dc_{MM}}{dt} = +r_{\max,2B6/3A4,MM} \frac{\frac{c_{DT}}{K_{M,2B6,MM}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,2B6,MM}} + \frac{c_{PF}}{K_{1,PF}}}$
$\frac{dc_{HPF}}{dt} = +r_{\max,1A2,HPF} \frac{\frac{c_{PF}}{K_{M,1A2,HPF}}}{1 + \frac{c_{PF}}{K_{M,1A2,HPF}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,1A2,DPF}}}$ $+ r_{\max,2C19,HPF} \frac{\frac{c_{PF}}{K_{M,2C19,HPF}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,2C19,DX}} + \frac{c_{DT}}{K_{M,2C19,MM}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2C19,HPF}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2C19,DPF}}}$ $+ r_{\max,2D6,HPF} \frac{\frac{c_{PF}}{K_{M,2D6,HPF}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,2D6,DX}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2D6,HPF}}}$	$\frac{dc_{HPF}}{dt} = +r_{\max,2D6,HPF} \frac{\frac{c_{PF}}{K_{M,2D6,HPF}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,2D6,DX}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2D6,HPF}}}$
$\frac{dc_{DPF}}{dt} = +r_{\max,1A2,DPF} \frac{\frac{c_{PF}}{K_{M,1A2,DPF}}}{1 + \frac{c_{PF}}{K_{M,1A2,HPF}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,1A2,DPF}}}$ $+ r_{\max,2B6,DPF} \frac{\frac{c_{PF}}{K_{M,2B6,DPF}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,2B6,MM}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2B6,DPF}}}$ $+ r_{\max,2C19,DPF} \frac{\frac{c_{PF}}{K_{M,2C19,DPF}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,2C19,DX}} + \frac{c_{DT}}{K_{M,2C19,MM}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2C19,HPF}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2C19,DPF}}}$ $+ r_{\max,3A4,DPF} \frac{\frac{c_{PF}}{K_{M,3A4,DPF}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,3A4,MM}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,3A4,DPF}}}$	$\frac{dc_{HPF}}{dt} = +r_{\max,2C19,DPF} \frac{\frac{c_{PF}}{K_{M,2C19,DPF}}}{1 + \frac{c_{PF}}{K_{M,2C19,DPF}} + \frac{c_{DT}}{K_{1,DT}}}$
$\frac{dc_{DT}}{dt} = -\frac{dc_{DX}}{dt} - \frac{dc_{MM}}{dt}$	$\frac{dc_{DT}}{dt} = -\frac{dc_{DX}}{dt} - \frac{dc_{MM}}{dt}$
$\frac{dc_{PF}}{dt} = -\frac{dc_{HPF}}{dt} - \frac{dc_{DPF}}{dt}$	$\frac{dc_{PF}}{dt} = -\frac{dc_{HPF}}{dt} - \frac{dc_{DPF}}{dt}$

In der Modellanpassung werden jeweils 10 Optimierungen mit jeweils verschiedenen Startwerten für die Modellparameter sowie mit jeweils verschiedenen Parametern des Mutationsgenerators in *JavaEva* [94] durchgeführt und die Parameter von *JavaEva* anhand des Optimierungskriteriums in Gleichung (2.12) geschätzt. Aus den Doppelsubstratbestimmungen (Anhang B **Tab. B.3**) können für die Initialraten gemittelte relative Standardabweichungen von 4% für DX, 5% für MM, 2% für HPF und 3% für DPF abgeschätzt werden. Mit diesen relativen Standardabweichungen werden für die Initialraten in den Einzel- und Doppelsubstratbestimmungen jeweils die Standardabweichungen  $s'_j$  im Optimierungskriterium, Gleichung (2.12), berechnet.

Die Güte der Anpassung lässt sich anhand der *Scatter-Plots* der berechneten über den gemessenen Initialraten pro Metabolit im ISO- (**Abb. 18**) und im RED-Modell (**Abb. 19**) beurteilen. Es ist deutlich, dass die Anpassung bei beiden Modellen in den Metaboliten MM, HPF und DPF zufriedenstellend ist, aber die Anpassung für DX im RED-Modell im Vergleich zum ISO-Modell relativ schlecht. Bei der Anpassung an HPF zeigt sich eine starke Streuung der gemessenen Raten zwischen 40 und 50 pmol/mg/min, welche vermutlich durch die bereits vermuteten Messfehler in der Einzelsubstratmessung zustande kommt. Weiter zeigt sich bei DX und MM jeweils eine Initialrate aus den Doppelsubstratbestimmungen, die relativ schlecht angepasst wurde. Die Funktionswerte der Anpassungen an das ISO-Modell zeigen zum einen mit 4% eine gewisse Variabilität über die einzelnen Parametersets (**Tab. 3**), zum anderen aber, dass die Anpassung trotz hoher Parametervariabilität in jedem Optimierungsset sehr gut ist. Der Parameterset #7 ist der Set mit dem minimalsten Funktionswert, zeigt jedoch keine Beteiligung von CYP2C19 in der Umsetzung von DT zu MM, von PF zu HPF oder DPF, keine Beteiligung von CYP2B6 in der Umsetzung von DT zu MM, und keine Beteiligung von CYP1A2 in der Umsetzung von PF zu DPF.

Die Parameter der Anpassung an das ISO-Modell zeigen eine hohe Variabilität über die verschiedenen Parametersets (**Tab. 3** und **Tab. 4**). Die über alle Parameter gemittelte relative Standardabweichung der einzelnen Parameter in den Parametersets liegt bei 104%. Im Vergleich zwischen den  $r_{max}$ - und  $K_M$ -Parametern zeigt sich weiterhin, dass die gemittelte relative Standardabweichung über alle Parametersets der  $r_{max}$ -Parameter bei 122% und die der  $K_M$ -Parameter bei 86% liegt. Das liegt daran, dass in den einzelnen Sets bestimmte  $r_{max}$ -Parameter in der Optimierung gegen Null geschätzt werden, während derselbe Parameter in einem anderen Set einen relativ hohen Wert hat. Zum Beispiel werden für die CYP2C19-katalysierte Bildung von MM aus DT und von DPF aus PF die  $r_{max}$ -Parameter in allen Sets gegen Null geschätzt. Die im Vergleich geringere Variabilität der  $K_M$ -Parameter kommt

wahrscheinlich daher, dass die  $K_M$  in den einzelnen Kinetiken der Enzyme für alternativen Substratabbau (Gleichung. (2.4)) die Kopplung zwischen den Einzelmodellen von DT und PF darstellen, was hier am Beispiel der Reaktionsrate des Substratabbaus von DT zu DX an CYP2D6 mit Konkurrenz des alternativen Substratabbaus von PF zu HPF,

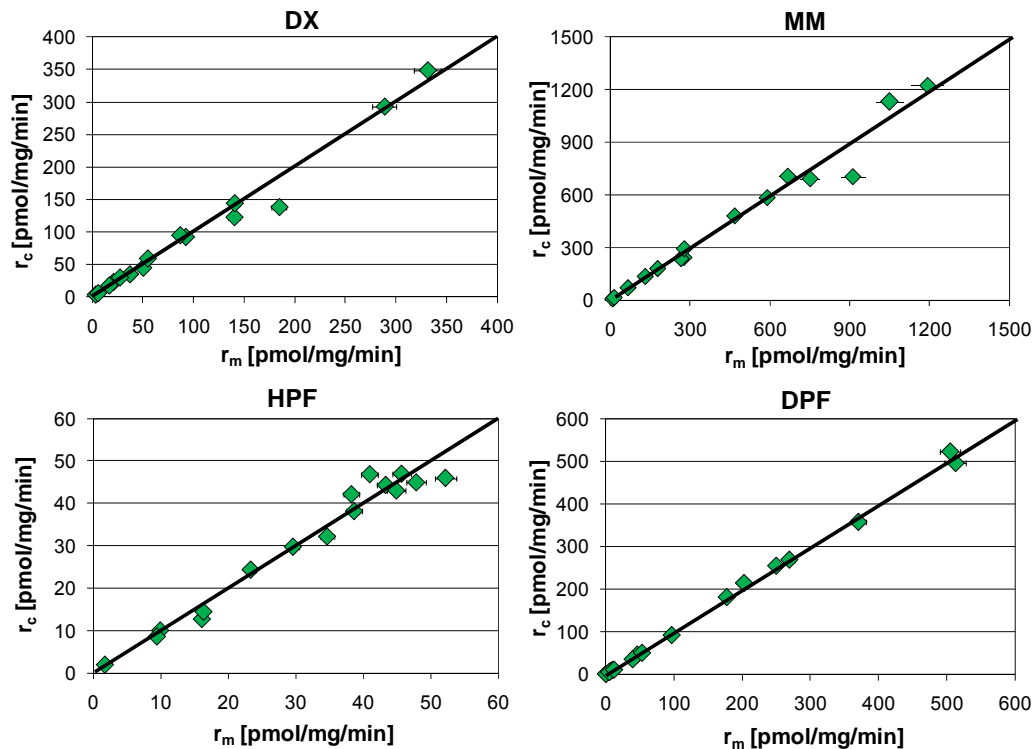
$$r_{2D6,DT \rightarrow DX} = r_{\max,2D6,DT \rightarrow DX} \frac{\frac{c_{DT}}{K_{M,2D6,DT \rightarrow DX}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,2D6,DT \rightarrow DX}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2D6,PF \rightarrow HPF}}}, \quad (3.2)$$

und vice versa der Reaktionsrate des Substratabbaus von PF zu HPF an CYP2D6 mit Konkurrenz des alternativen Substratabbaus von DT zu DX,

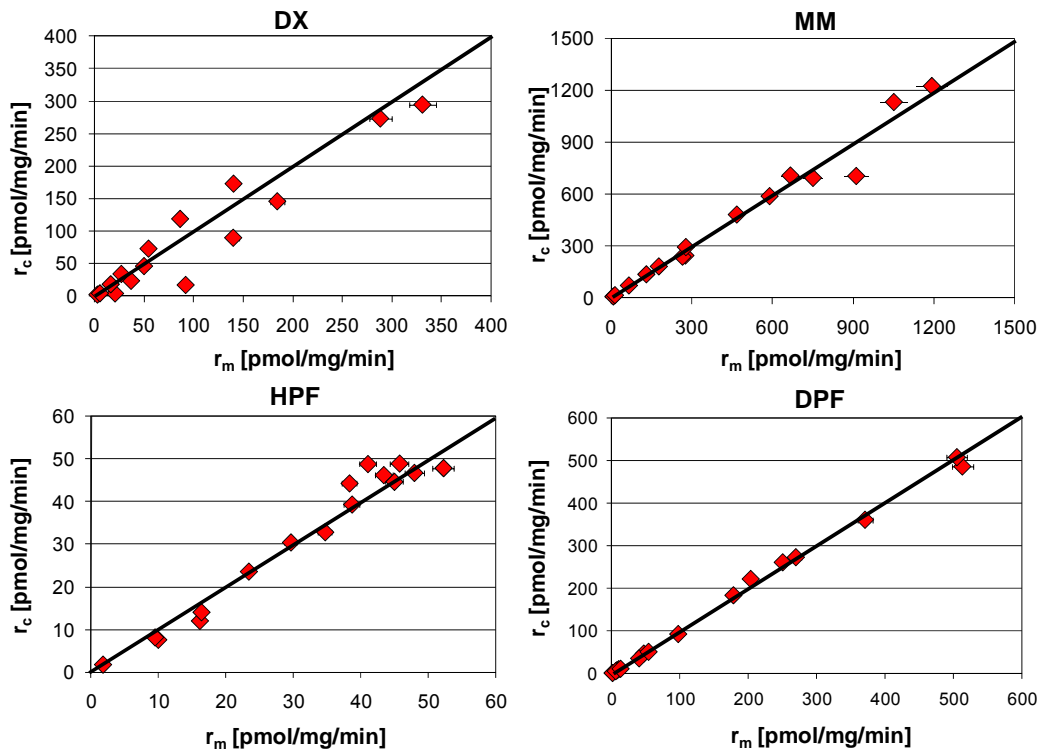
$$r_{2D6,PF \rightarrow HPF} = r_{\max,2D6,PF \rightarrow HPF} \frac{\frac{c_{PF}}{K_{M,2D6,PF \rightarrow HPF}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,2D6,DT \rightarrow DX}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,2D6,PF \rightarrow HPF}}}, \quad (3.3)$$

deutlich wird. Im Gegensatz zu den  $K_M$ - erscheinen die  $r_{\max}$ -Parameter nur individuell in den Reaktionsraten (Gleichung (3.2) und (3.3)) des jeweiligen Abbaus. Wenn die Aktivität eines bestimmten Enzyms in Bezug auf die Umsetzung eines Substrates zu einem Produkt nicht nachgewiesen werden kann, da der entsprechende  $r_{\max}$ -Parameter gegen Null geschätzt wurde, besteht jedoch durch den  $K_M$ -Parameter in der Kinetik des alternativen Substratabbaus weiterhin die Konkurrenz dieses Substrates auf den Abbau des anderen Substrates. Der alternative Substratabbau wird in diesem Grenzfall zu einer kompetitiven Inhibition. Zum Beispiel weist CYP2D6 im Parameterset #3 wegen des relativ hohen  $r_{\max}$ -Wertes einen signifikanten Beitrag zum DT nach DX-Abbau auf, jedoch durch einen sehr hohen  $K_M$ -Wert einen geringen Beitrag zur Hemmung des PF-Abbaus. Im Parameterset #2 zeigt CYP2D6 wegen des sehr geringen  $r_{\max}$ -Wertes einen verschwindend geringen Beitrag zum DT nach DX-Abbau, durch den sehr geringen  $K_M$ -Wert aber einen hohen Beitrag zur Hemmung im Abbau von PF nach HPF (Gleichung (3.3)).

Im Abbau von DT nach MM beziehungsweise im Abbau von PF zu HPF oder DPF ergibt sich auch der Fall, dass  $r_{\max}$  durch einen niedrigen Wert und  $K_M$  durch einen sehr hohen Wert einen verschwindenden Beitrag zur Hemmung im alternativen Substratabbau aufweisen. Beispielsweise zeigt sich dies an CYP2C19 im Abbau von DT nach MM in Parameterset #4, und an CYP1A2 im Abbau von PF zu HPF in Parameterset #2 und an CYP2B6 im Abbau von PF zu DPF in Parameterset #4. In diesen Fällen spielt das entsprechende Isoenzym keine Rolle im Fremdstoffabbau des entsprechenden Substrates und das Substrat keine Rolle in Bezug auf die Konkurrenz zum alternativen Substrat an dem entsprechenden Enzym.



**Abb. 18:** Scatterplot der Anpassung der Initialraten (Anhang B Tab. B.1 und Tab. B.3) an den DT-Abbau zu MM und DX (oben) und an den PF-Abbau zu HPF und DPF (unten) im ISO-Modell, exemplarisch für das Parameterset mit dem besten Zielfunktionswert. Auftragung der berechneten Raten ( $r_c$ ) über den gemessenen Raten ( $r_m$ ).



**Abb. 19:** Scatterplot der Anpassung der Initialraten (Anhang B Tab. 1 und Tab. 3) an den DT-Abbau zu MM und DX (oben) und an den PF-Abbau zu HPF und DPF (unten) im RED-Modell, exemplarisch für das Parameterset mit dem besten Zielfunktionswert. Auftragung der berechneten Raten ( $r_c$ ) über den gemessenen Raten ( $r_m$ ).

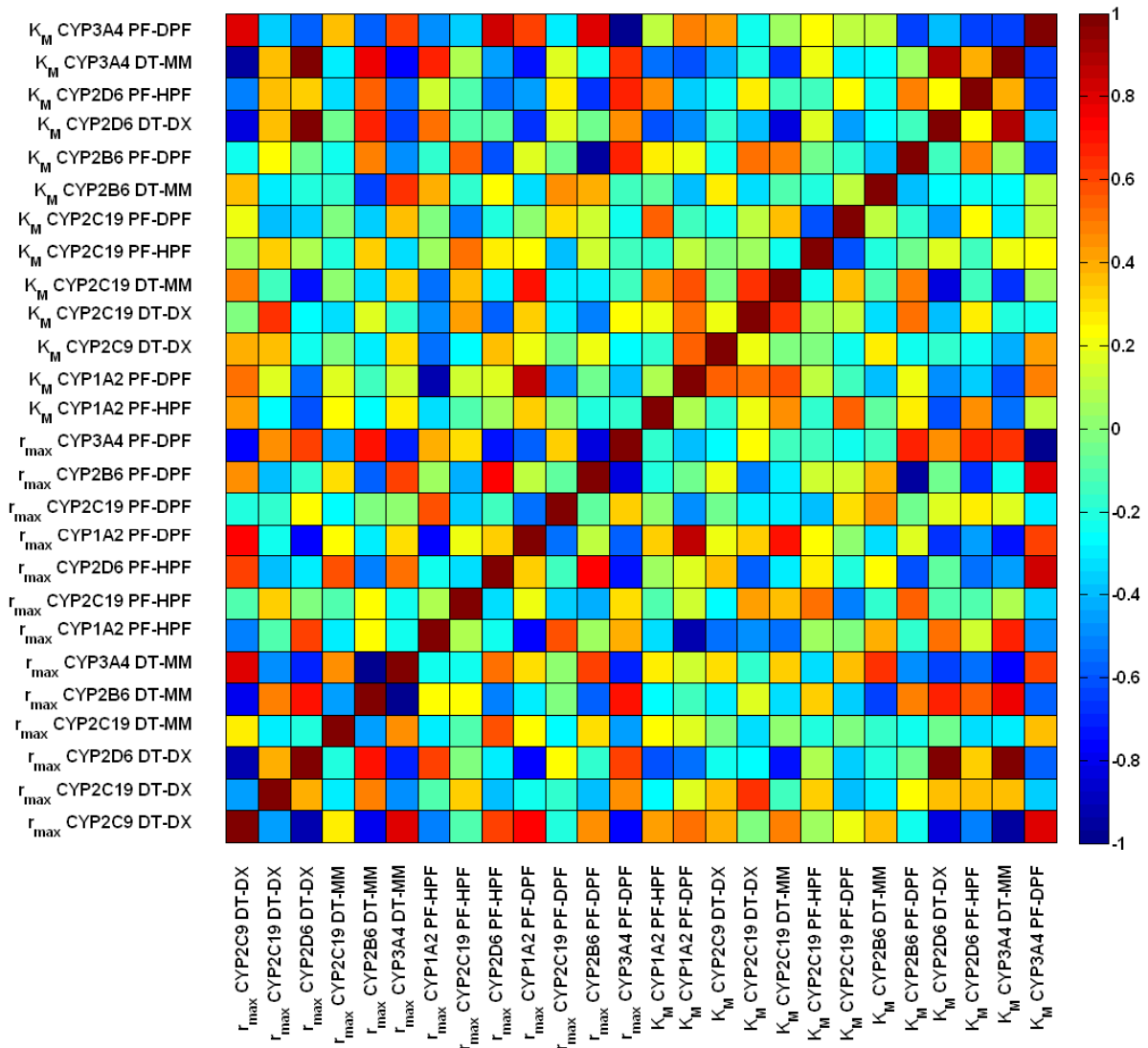
Die Parameter der Anpassung an das RED-Modell (**Tab. 5**) und die Zielfunktionswerte zeigen dahingegen eine verschwindend geringe Variabilität zwischen den einzelnen Parametersets, was zeigt, dass die Anpassung in allen 10 Optimierungsläufen zu einer vergleichbaren Lösung führt. Der Funktionswert der Anpassung ist ca. 4-fach so hoch wie in der Anpassung an das ISO-Modell, was die schlechtere Anpassung an die Initialraten nochmal verdeutlicht.

Zusammenfassend zeigen sich im ISO-Modell zwar große Abweichungen aber bestimmte Korrelationen zwischen den Parametern in den einzelnen Parametersets. Um diese Parameterkorrelationen genauer aufzuklären, unter anderem ob auch lineare Abhängigkeiten zwischen korrespondierenden  $r_{max}$ - und  $K_M$ -Parameter auftreten, wird im Folgenden eine Korrelationsanalyse durchgeführt.

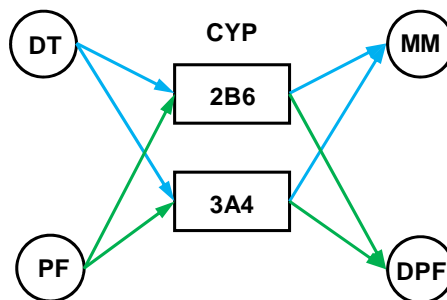
### *Identifikation der Parameterkorrelationen im ISO Modell*

Zur Untersuchung der Parameterkorrelation im ISO-Modell über die 10 geschätzten Parametersets wurde die Parameter-Korrelationsmatrix nach Gleichung (2.14) bestimmt und grafisch dargestellt (**Abb. 20**).

Die dunklen Farbtöne stellen hohe Korrelationskoeffizienten dar und deuten auf die Präsenz vieler hoher linearer Korrelationen im System hin. Weiter zeigt sich, dass 29 von 325 Korrelationskoeffizienten größer als absolut 0,7 sind. Von diesen 29 Korrelationen sind 12 Korrelationen zwischen  $r_{max}$ -Parametern, was direkt die Redundanz der Isoenzyme verdeutlicht, 2 Korrelationen zwischen  $K_M$ -Parametern, und 15 zwischen  $r_{max}$ - und  $K_M$ -Parametern. Ein hoher Korrelationskoeffizient zwischen  $r_{max}$  und  $K_M$ , dies bedeutet eine Reaktion erster Ordnung mit  $k = r_{max}/K_M$ , zeigt sich jeweils im Abbau von DT zu DX bei CYP2C19 und CYP2D6, im Abbau von DT zu MM an CYP2B6 und CYP3A4, im Abbau von PF zu HPF an CYP1A2, im Abbau von PF zu DPF an CYP2B6 und CYP3A4. Im Abbau von DT und PF an CYP2B6 und CYP3A4 tauchen jedoch jeweils negative Korrelationskoeffizienten zwischen  $r_{max}$  und  $K_M$  auf, was auf den ersten Blick nicht erklärbar erscheint. Dies liegt aber daran, dass diese Isoenzyme, CYP2B6 und CYP3A4, jeweils nur im Abbau von DT zu MM und im Abbau von PF zu DPF auftauchen, und in den anderen Abbauwegen zu DX beziehungsweise HPF nicht beteiligt sind. Daher ergibt sich bei diesen Isoenzymen eine direkte symmetrische Redundanz (**Abb. 21**), was ein deutliches Kennzeichen für hohe Korrelationen in den entsprechenden Parametern darstellt.



**Abb. 20:** Korrelationskoeffizienten der Parameter im gekoppelten DT- und PF-ISO-Modell. Dunkle warme Farbtöne symbolisieren hohe positiv-korrelierende Parameter, dunkle kalte Farbtöne hohe negativ-korrelierende Parameter (siehe Farbskala).



**Abb. 21:** Symmetrische Redundanz der CYP-Enzyme 2B6 und 3A4 im Abbau von DT zu MM und im Abbau von PF zu DPF

Wie oben beschrieben (siehe **Abschnitt 3.5.2.1**), wird in den Parametersets jeweils ein Isoenzym in der Schätzung durch Zufall „favorisiert“. Wenn zum Beispiel CYP3A4 auf dem Abbauweg von DT zu DX favorisiert wird, also der entsprechende  $r_{max}$ -Parameter relativ hoch liegt und damit über dem Mittelwert über alle Parametersets, dann wird der  $K_M$ -Parameter

ungefähr zum Wert des apparenten  $K_M$ -Parameter der Einzelkinetik (**Tab. 1**) geschätzt. Wenn aber CYP3A4 nicht favorisiert wird, sondern CYP2B6, entsprechend der  $r_{max}$ -Parameter relativ gering ist und damit unter dem Mittelwert über alle Parametersets, dann wird gleichzeitig der  $K_M$ -Parameter sehr hoch geschätzt und damit die kompetitive Wirkung des Substrates DT an CYP3A4 im Abbau von PF zu DPF verringert. Im ersten Fall, CYP3A4 wird favorisiert, liegt somit  $r_{max}$  über dem Mittelwert und  $K_M$  unter dem Mittelwert und im letzten Fall, CYP3A4 wird nicht favorisiert, liegt somit  $r_{max}$  unter dem Mittelwert und  $K_M$  über dem Mittelwert, also genau umgekehrt. In beiden Fällen ergibt sich folglich im Korrelationskoeffizienten (Gleichung (2.14)) ein negativer Betrag im Zähler und somit ein negativer Korrelationskoeffizient. Andere hohe Korrelationskoeffizienten zwischen  $r_{max}$ -und  $K_M$ -Parameter unterschiedlicher Enzyme und beider Substrate lassen sich wahrscheinlich ähnlich durch die gegenseitige Konkurrenz und Redundanz der Isoenzyme erklären.

Folglich liegt die Ursache hohen Korrelationskoeffizienten wahrscheinlich in einer linearen Abhängigkeit von  $r_{max}$ -und  $K_M$ -Parameter im Abbau eines Substrates an einem Enzym, was eine Reaktion erster Ordnung bedeutet, aber mehr noch in der Struktur des Systems, der Redundanz der Isoenzyme und der Kinetik der gegenseitigen Konkurrenz der alternativen Substrate.

**Tab. 3:** Werte der  $r_{max}$ -Parameter aus der Anpassung der Initialraten (Anhang B Tab. B.1 und Tab. B.3) an den DT-Abbau zu MM und DX und an den PF-Abbau zu HPF und DPF im Isoenzym-Modell (ISO, Abb. 12. Links)

Parameter-set	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	Mittelwert	s.d.	rel. s.d.
Funktionswert	420	454	412	419	413	417	388	412	442	417	420	17	4
CYP2C9 DT-DX	283	252	0	275	0	281	349	0	356	0	180	158	88
CYP2C19 DT-DX	238	321	18	208	68	10	4	743	216	907	273	313	115
CYP2D6 DT-DX	10	4	399	10	398	126	87	398	107	415	195	183	94
CYP2C19 DT-MM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CYP2B6 DT-MM	511	930	1335	851	1331	310	0	1337	1042	1289	894	477	53
CYP3A4 DT-MM	817	399	0	466	0	1022	1332	0	300	41	438	476	109
CYP1A2 PF-HPF	0	0	506	0	837	0	637	710	0	36	273	354	130
CYP2C19 PF-HPF	48	48	13	750	12	0	0	688	36	18	161	295	183
CYP2D6 PF-HPF	0	0	0	0	0	46	28	0	46	0	12	20	167
CYP1A2 PF-DPF	409	238	0	514	0	296	0	0	479	0	194	219	113
CYP2C19 PF-DPF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CYP2B6 PF-DPF	356	1	173	3	147	358	401	184	376	91	209	154	74
CYP3A4 PF-DPF	0	352	383	347	406	0	153	374	0	452	247	187	76

Dargestellt sind jeweils die  $r_{max}$ -Parameterwerte [ $\text{pmol min}^{-1} \text{mg}$ ] und der Funktionswert des Optimierungskriteriums aus 10 Optimierungsläufen mit verschiedenen Initialparametern (Seed, Startparameter) in *JavaEva*, sowie Mittelwert, Standardabweichung (s.d.) und relative Standardabweichung (rel. s.d.).



**Tab. 4:** Werte der  $K_M$ -Parameter aus der Anpassung der Initialraten (Anhang B Tab. B.1 und Tab. B.3) an den DT-Abbau zu MM und DX und an den PF-Abbau zu HPF und DPF im Isoenzym-Modell (ISO, Abb. 12. Links).

Parameter-set	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	Mittelwert	s.d.	rel. s.d.
Funktionswert	420	454	412	419	413	417	388	412	442	417	420	17	4
CYP1A2 PF-HPF	68021	188403	32373	59654	53203	96430	53291	45170	53023	2323	65189	49508	76
CYP1A2 PF-DPF	80254	45051	2466	96682	2377	56204	1663	2404	86606	70183	44389	39043	88
CYP2C9 DT-DX	247139	236219	123489	236508	112607	244121	334410	135881	356070	448936	247538	108633	44
CYP2C19 DT-DX	234409	216842	3858	201375	14971	1979	708	162742	48061	200840	108579	102199	94
CYP2C19 DT-MM	267527	203501	8989	323555	3260	69082	38340	2697	3387	3208	92355	124159	134
CYP2C19 PF-HPF	2232	2222	2258	35280	2221	1025	489	124443	126837	3151	30016	51467	171
CYP2C19 PF-DPF	80225	67896	28280	2321	49757	32859	39658	2154	2405	7315	31287	28390	91
CYP2B6 DT-MM	87338	90916	88450	92090	88168	81830	248625	88785	82313	86511	103503	51095	49
CYP2B6 PF-DPF	57940	171631	111715	205087	115085	59355	40310	107191	65893	114019	104823	52389	50
CYP2D6 DT-DX	2138	657	203377	1984	203151	116438	46042	201104	110663	223716	110927	93100	84
CYP2D6 PF-HPF	1059	114434	51083	930	51044	2158	2886	50369	2139	54242	33034	37853	115
CYP3A4 DT-MM	87409	81852	260586	79417	245896	90882	88543	270068	113820	213549	153202	82933	54
CYP3A4 PF-DPF	143543	58898	39278	58256	40539	151381	112135	39125	194202	42855	88021	57492	65

Dargestellt sind jeweils die  $K_M$ -Parameterwerte [pmol ml<sup>-1</sup>] und der Funktionswert des Optimierungskriteriums aus 10 Optimierungsläufen mit verschiedenen Initialparametern (Seed, Startparameter) in *JavaEva*, sowie Mittelwert, Standardabweichung (s.d.) und relative Standardabweichung (rel. s.d.).

**Tab. 5:** Parameterwerte aus der Anpassung der Initialraten (Anhang B Tab. B.1 und Tab. B.3) an den DT-Abbau zu MM und DX und an den PF-Abbau zu HPF und DPF im RED-Modell.

Parameter-set	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	Mittelwert	s.d.	rel. s.d.
<b>Funktionswert</b>	1848	1848	1848	1848	1848	1848	1848	1848	1848	1848	1848	0	0
<i>r<sub>max</sub></i>													
<b>CYP2D6 DT-DX</b>	319	319	319	319	319	319	319	319	319	319	319	0	0
<b>CYP3A4 DT-MM</b>	1331	1331	1331	1331	1331	1331	1331	1331	1331	1331	1331	0	0
<b>CYP2D6 PF-HPF</b>	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	49	0	0
<b>CYP2C19 PF-DPF</b>	531	531	531	531	531	531	531	531	531	531	531	0	0
<i>K<sub>M</sub></i>													
<b>CYP2D6 DT-DX</b>	84993	84993	84993	84993	84993	84993	84993	84993	84993	84993	84993	0	0
<b>CYP3A4 DT-MM</b>	88484	88483	88484	88484	88484	88482	88483	88491	88486	88479	88484	3	0
<b>CYP2D6 PF-HPF</b>	2460	2460	2460	2460	2460	2460	2460	2460	2460	2460	2460	0	0
<b>CYP2C19 PF-DPF</b>	47423	47422	47420	47420	47420	47420	47422	47420	47420	47424	47421	2	0
<i>K<sub>I</sub></i>													
<b>PF Inh. DT-&gt;MM</b>	115289	115286	115325	115280	115271	115244	115304	115554	115342	114984	115288	130	0
<b>DT Inh. PF-&gt;DPF</b>	211290	211270	211147	211138	211122	211166	211240	211166	211134	211344	211202	74	0

Dargestellt sind jeweils die Parameterwerte,  $r_{max}$  [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}$ ],  $K_M$  und  $K_I$  [ $\mu\text{mol ml}^{-1}$ ], und der Funktionswert des Optimierungskriteriums aus 10 Optimierungsläufen mit verschiedenen Initialparametern (Seed, Startparameter) in *JavaEva*, sowie Mittelwert, Standardabweichung (s.d.) und relative Standardabweichung (rel. s.d.).

3.5.2.2 Identifikation der  $r_{max}$ - Parameter bei Vorgabe der  $K_M$ -Parameter

Da die Variabilität der Parameter in der Anpassung der Initialraten im ISO-Modell so hoch ist, und die Parameterkorrelationen zwischen verschiedenen  $r_{max}$ - und  $K_M$ -Parametern die Redundanz im Isoenzymssystem und die damit verbundene Problematik in der Identifizierbarkeit der Parameter verdeutlichen, wurde eine Identifikation des DT-ISO-Modells an die Initialraten der Einzelsubstratmessung des Abbaus von DT zu DX und MM wiederholt, bei der nur die  $r_{max}$ -Parameter geschätzt werden, während die entsprechenden  $K_M$ -Parameter aus Messungen an rekombinanten CYP-Isoenzym-Systemen vorgegeben werden. Diese Identifikationsvariante kann nur am Beispiel des DT-Metabolismus durchgeführt werden, da hier aus Literatur  $K_M$ -Parameter für die einzelnen CYP-Isoenzyme im Abbau von DT zu MM und DX entnommen werden können [123](**Tab. 6**), während für den PF-Abbau die  $K_M$ -Werte für die beteiligten CYP-Isoenzyme nicht bekannt sind.

**Tab. 6:**  $K_M$ -Parameter des DT-Abbaus zu DX und MM in der Phase I

Umwandlung	Enzym	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]
DT->DX	CYP2C9	222
DT->DX	CYP2C19	219
DT->DX	CYP2D6	3,7
DT->MM	CYP2B6	105
DT->MM	CYP2C19	237
DT->MM	CYP3A4	232

Aufgelistet sind die  $K_M$ -Parameterwerte des DT-Abbaus zu DX und MM, die an rekombinanten CYP-Isoenzym-Systemen bestimmt wurden [123].

Die identifizierten Parametersets (**Tab. 7**) zeigen, dass die  $r_{max}$ -Parameter in allen 10 Optimierungen zu gleichen Werten angepasst wurden, und der gleiche Funktionswert des Optimierungskriteriums (Gleichung (2.12)) erreicht wurde. Im Abbau von DT zu DX wurden CYP2C9 und CYP2D6, und im Abbau von DT zu MM nur CYP2B6 mit Parameterwerten angepasst, während die anderen CYP-Isoenzyme zu Null geschätzt wurden. Dass die Parameterschätzung in dem Abbau von DT zu DX zu zwei identifizierten Enzymen führt, liegt daran, dass die Initialraten der DX-Bildung in der Lineweaver-Burk-Darstellung eine Beteiligung von zwei Isoenzymen andeuten (**Abb. 22**, links) und die Isoenzyme CYP2C9 und CYP2D6 stark unterschiedliche  $K_M$ -Werte aufweisen. Allerdings wird CYP2C19 nicht identifiziert. Bei der Parameterschätzung in dem Abbau von DT zu MM wird nur ein Isoenzym identifiziert, nämlich CYP2B6, das einen niedrigeren  $K_M$ -Wert aufweist als die beiden anderen Isoenzyme CYP3A4 und CYP2C19, der anscheinend besser die

## Kapitel 3 Initialratenansatz an humanen Lebermikrosomen

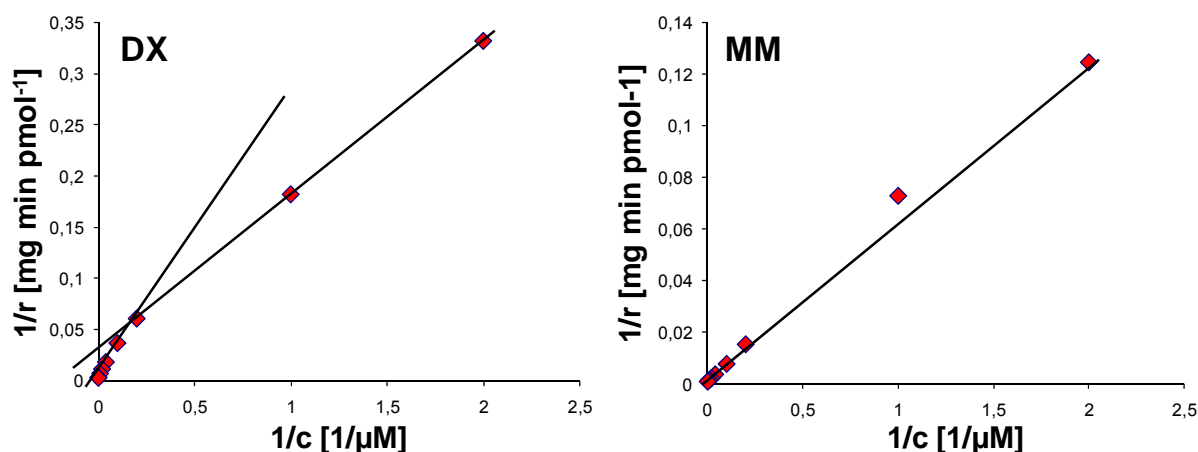
Initialratendaten zu beschreiben vermag. Außerdem deutet die Lineweaver-Burk-Darstellung der Initialraten der MM-Bildung nicht auf die Beteiligung mehrerer Enzyme hin (**Abb. 22**, rechts). Die verschwindend geringe Variabilität in den Parameterwerten bei Vorgabe von  $K_M$ -Werten, bekräftigt die Argumentation, dass in der Anpassung an die Initialraten im ISO-Modell mit Optimierung sowohl der  $r_{max}$ - und  $K_M$ -Parameter es zu Problemen in der Identifizierbarkeit kommt.

**Tab. 7:** Werte der  $r_{max}$ -Parameter aus der Anpassung der Initialraten (Anhang B Tab. 1 und Tab. 3) an den DT-Abbau zu MM und DX im ISO-Modell mit vorgegebenen  $K_M$ -Werten.

Parameter set	CYP2C9 DT-DX	CYP2C19 DT-DX	CYP2D6 DT-DX	CYP2C19 DT-MM	CYP2B6 DT-MM	CYP3A4 DT-MM
$r_{max}$	387±0	0	17±0	0	1420±0	0
$K_M$	222	219	3,700	237	105	232

Dargestellt sind die  $r_{max}$ -Parameterwerte [ $\text{pmol min}^{-1} \text{mg}$ ] in Mittelwert und Standardabweichung nach 10 Optimierungsläufen mit verschiedenen Initialparametern (Seed, Startparameter) in *JavaEva*, sowie die vorgegebenen  $K_M$  [ $\mu\text{M}$ ] (Tab. 6). Alle 10 Optimierungsläufe führten zum gleichen Zielfunktionswert.

Der Vergleich der bei der Vorgabe der  $K_M$ -Werte identifizierten Isoenzyme, CYP2C9, CYP2D6 und CYP2B6, mit den im reduzierten Modell verwendeten Masterenzymen (siehe **Abb. 12** rechts) zeigt zwei Unterschiede: 1.) Im Vergleich zum RED2B6-Modell wurde hier im Abbau von DT zu DX zusätzlich nur CYP2C9 identifiziert. 2.) An dieser individuellen Charge an Lebermikrosomen wurde hier im Gegensatz zum RED3A4-Modell CYP2B6 als Masterenzym identifiziert, was vermutlich auf die sehr hohe Expression dieses Isoenzym in diesem Individuum zurückzuführen ist.



**Abb. 22:** Lineweaver-Burk-Darstellung der Initialratendaten der Produktbildung von DX (links) und MM (rechts) aus DT.

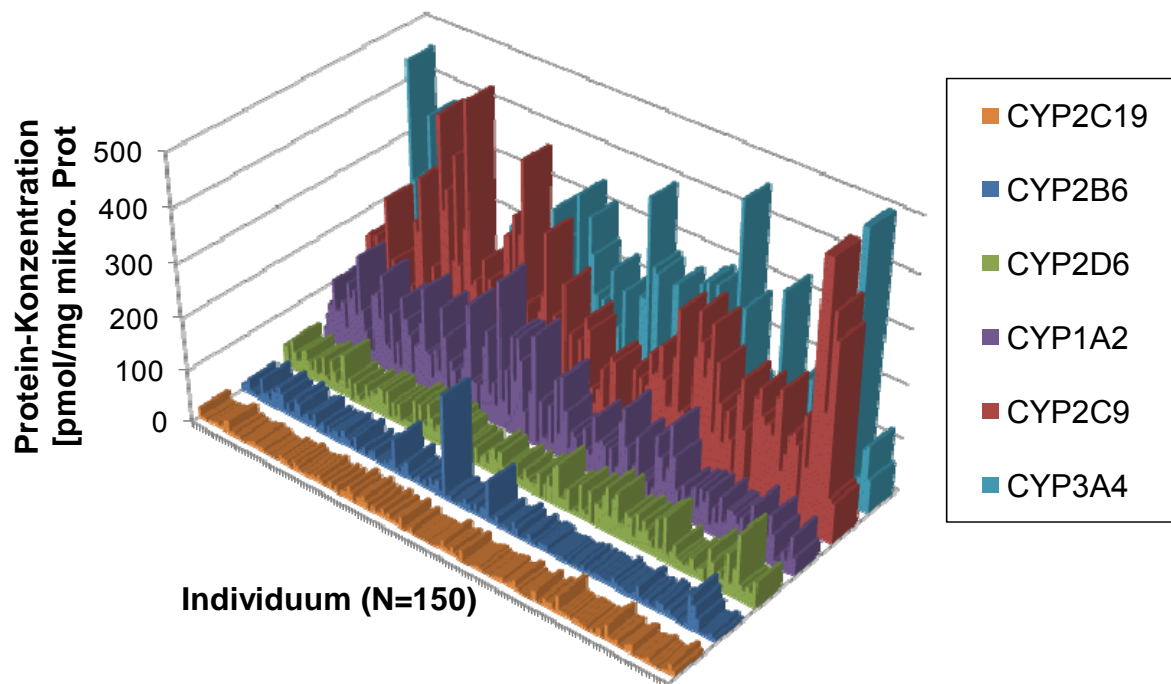
Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die komplexe Struktur des Arzneimittelmetabolismus, das heißt die Redundanz der Isoenzyme, aber auch ähnliche kinetische Eigenschaften der Isoenzyme gegenüber einem bestimmten Substrat,

wahrscheinlich bedingt durch strukturelle Ähnlichkeit, zur Nicht-identifizierbarkeit der Modellparameter führt. Diese Redundanz der Isoenzyme beruht bis hierher nur auf der Information aus der experimentellen Untersuchung an rekombinanten CYP-Enzymen (siehe **Abschnitt 3.2**), enthält also nicht die Information der tatsächlichen individuellen Bedeutung der Redundanz der Isoenzyme. Dieser Frage, spielt die Isoenzymstruktur individuell eine entscheidende Rolle, oder handelt sich nur um eine theoretische aber nicht funktionale Isoenzymstruktur, wie diese Auswertung vermuten lässt, kann nur durch eine Analyse einer größeren Menge an individuellen Abbauprofilen unter Berücksichtigung der individuellen CYP-Expressionslevel beantwortet werden. Diese Analyse wird im Folgenden basierend auf dynamischen Modellsimulationen mit Implementierung individueller humaner CYP-Proteindaten durchgeführt.

### 3.6 Dynamische Analyse der Variabilität des DT- und PF-Metabolismus aufgrund individueller CYP-Proteinlevel

#### 3.6.1 Inter-individuelle Variabilität der CYP-Isoenzym-Konzentrationen an humanen Lebermikrosomen

Die dynamischen Simulationen wurden am ISO-Modell und am RED-Modell unter Berücksichtigung der inter-individuellen Variabilität der Expressionslevel der beteiligten CYP-Isoenzyme durchgeführt. Dazu wurden CYP-Isoenzym-Proteinkonzentrationen aus 150 Lebermikrosomenproben (**Abb. 23**) (siehe **Abschnitte 2.2.4** und **2.1**) verwendet. Diese Stichprobe an individuellen Lebermikrosomen veranschaulicht die hohe Variabilität im CYP-Protein-Expressionslevel: Die relative Standardabweichung der approximierten Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen bezogen auf den Mittelwert beträgt 271%, 259%, 245%, 226%, 223% beziehungsweise 190% für CYP2B6, CYP3A4, CYP2C19, CYP1A2, CYP2D6 beziehungsweise CYP2C9. Weiter zeigen die approximierten Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen, dass die Mittelwerte 188, 160, 88, 41, 15 und 9 pmol pro mg mikrosomales Protein für CYP2C9, CYP3A4, CYP1A2, CYP2D6, CYP2B6 und CYP2C19 betragen.



**Abb. 23:** CYP-Proteinkonzentrationen in individuellen Lebermikrosomenproben (N=150) einer umfangreichen Leberbank (IKP, Stuttgart)(siehe Abschnitte 2.2.4 und 2.1). Die CYP-Konzentrationen sind in pmol CYP pro mg mikrosomales Protein dargestellt.

### 3.6.2 Dynamische Simulation des Phase I-Metabolismus

Die Proteindaten dieser Stichprobe an Leberproben werden in die dynamische Analyse nach dem Ansatz der relativen Verfügbarkeit (Gleichung (2.34) und Gleichung (2.35)) implementiert und die Verteilungen der individuellen Detoxifikationsprofile statistisch untersucht. Da die Funktionalität des Fremdstoffmetabolismus durch den Abbau von DT und PF definiert ist, werden die Verteilungen dieser Substrate auf die Halbwertszeit ( $t_{\text{Half}}$ ) des Abbaus untersucht. Die dynamischen Simulationen wurden bei einer Konzentration von  $10000 \text{ pmol ml}^{-1}$  für DT beziehungsweise PF und einer angenommenen Mikrosomenproteinkonzentration von  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  durchgeführt.

In den Modellsimulationen werden die zweite Demethylierung von jeweils DX und MM zu HM an CYP-Isoenzymen im ISO- und RED-Modell berücksichtigt. Da diese Reaktionsschritte nicht experimentell an Mikrosomen im Initialratenansatz identifiziert wurden, werden die maximalen Reaktionsraten in den individuellen Mikrosomen per

$$r_{\text{max},il,j}^e = v_{\text{max},rec,j}^e \cdot c_{il}^e \quad (3.4)$$

aus den an rekombinanten CYP-Enzymen bestimmten spezifischen maximalen Reaktionsraten  $v_{\text{max},rec,j}^e$  [123] und der CYP-Enzymkonzentration  $c_{il}^e$  in den Mikrosomen der individuellen Leber  $il$  für das Isoenzym  $e$  geschätzt und zusammen mit den an rekombinanten

CYP-Enzymen bestimmten  $K_M$ -Werten [123] (**Tab. 8**) in die Reaktionskinetiken der Simulationsmodelle implementiert, das heißt das mathematische Modell (**Tab. 2**) entsprechend ergänzt.

**Tab. 8:** CYP-Isoenzym-spezifische Parameter der HM-Bildung im DT-Metabolismus in rekombinanten Systemen.

Umwandlung	Enzym	$v_{\max,rec}$ [pmol/pmol CYP/min]	$K_M$ [µM]
DX->HM	CYP2D6	10,5	2640
MM->HM	CYP2D6	4,3	5
DX->HM	CYP3A4	2,6	724
MM->HM	CYP3A4	0,13	49,6

Spezifische  $v_{\max,rec}$ - und  $K_M$ -Werte der HM-Bildung aus DX und MM an CYP2D6 und CYP3A4 [123].

Beispielhaft ergibt sich durch die Berücksichtigung des Abbaus von jeweils DX und MM zu HM im ISO-Modell die Kinetik der Konkurrenz durch alternativen Substratabbau ((2.4)) an CYP3A4 die Produktbildungsrate von DX aus DT zu

$$r_{3A4,DT \rightarrow DX} = r_{\max,3A4,DT \rightarrow DX} \frac{\frac{c_{DT}}{K_{M,3A4,DT \rightarrow DX}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,3A4,DT \rightarrow DX}} + \frac{c_{DX}}{K_{M,3A4,DX \rightarrow HM}} + \frac{c_{PF}}{K_{M,3A4,PF \rightarrow DPF}}} \quad (3.5)$$

Bei dem RED-Modell wird weiterhin unterschieden zwischen 1) einem RED-Modell, das auf dem Abbauweg von DT zu MM das Masterenzym CYP2B6 enthält (RED2B6) (**Abb. 24** links), wie es in dieser Arbeit in der Messung der Produktbildungsrate an rekombinanten CYP-Enzymen (**Abb. 8**) identifiziert wurde, und 2) einem RED-Modell, das auf dem Abbauweg von DT zu MM das Masterenzym CYP3A4 enthält (RED3A4) (**Abb. 24** rechts), wie es in früheren Studien postuliert wurde [117, 121, 123] (siehe **Abschnitt 3.2**).

Folglich tritt im RED3A4-Modell sowohl Konkurrenz durch die alternativen Substrate DT (im Abbau zu MM) und DX (im Abbau zu HM) als auch kompetitive Hemmung durch PF an CYP3A4 auf, deshalb wird der Ansatz alternativer Substratumwandlung (Gleichung (2.4)) mit der kompetitiven Inhibierung (Gleichung (2.5)) gekoppelt, was im folgenden beispielhaften Ansatz der Produktbildungsrate von DX aus DT an CYP3A4 dokumentiert wird:

$$r_{3A4,DT \rightarrow DX} = r_{\max,3A4,DT \rightarrow DX} \frac{\frac{c_{DT}}{K_{M,3A4,DT \rightarrow DX}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,3A4,DT \rightarrow DX}} + \frac{c_{DX}}{K_{M,3A4,DX \rightarrow HM}} + \frac{c_{PF}}{K_{I,3A4,PF}}} \quad (3.6)$$

## Kapitel 3 Initialratenansatz an humanen Lebermikrosomen

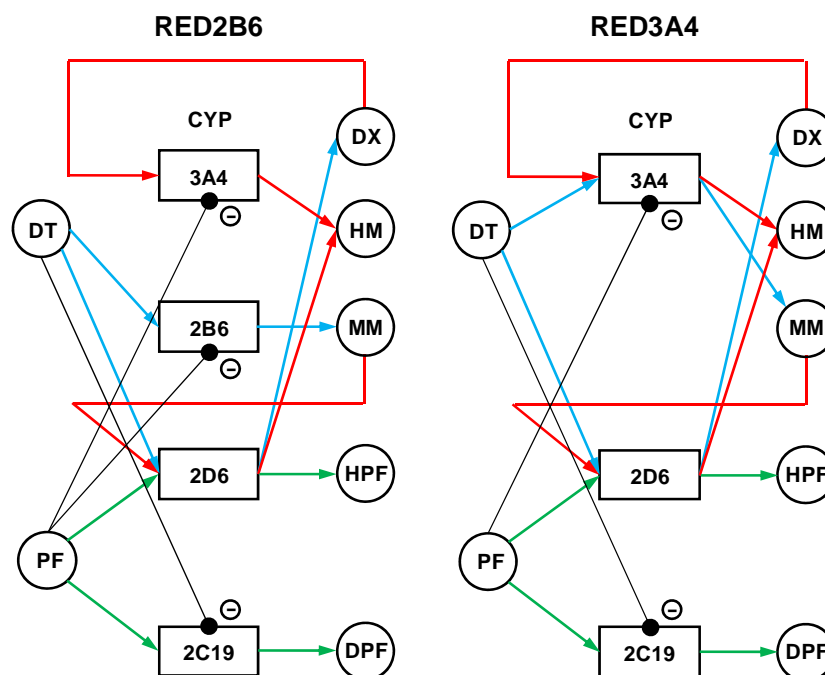
Im RED2B6-Modell wird daher an CYP2B6 im Abbau von DT zu MM eine Kinetik kompetitiver Inhibierung durch PF (siehe Gleichung (2.5)) implementiert, und ebenso für CYP3A4 im Abbau von DX zu HM angenommen, resultierend in

$$r_{2B6,DT \rightarrow MM} = r_{\max,2B6,DT \rightarrow MM} \frac{\frac{c_{DT}}{K_{M,2B6,DT \rightarrow MM}}}{1 + \frac{c_{DT}}{K_{M,2B6,DT \rightarrow MM}} + \frac{c_{PF}}{K_{I,PF}}} \quad (3.7)$$

für die Produktbildungsrate von MM aus DT an CYP2B6 und

$$r_{3A4,DX \rightarrow HM} = r_{\max,3A4,DX \rightarrow HM} \frac{\frac{c_{DX}}{K_{M,3A4,DX \rightarrow HM}}}{1 + \frac{c_{DX}}{K_{M,3A4,DX \rightarrow HM}} + \frac{c_{PF}}{K_{I,PF}}} \quad (3.8)$$

für die Produktbildungsrate von HM aus DX an CYP3A4. Für die kompetitive Hemmung durch PF wird für CYP2B6 beziehungsweise CYP3A4 der gleiche Inhibitionsparameter  $K_{I,PF}$  aus der Parameteridentifikation des RED-Modells an Initialraten angenommen (siehe **Abschnitt 2.1.5**).



**Abb. 24:** Die in den dynamischen Simulationen verwendeten reduzierten Modelle mit jeweils dem Masterenzym pro Reaktionsschritt und mit den jeweils zweiten Demethylierungsschritten im Abbau von DX beziehungsweise MM zu HM. Links RED2B6-Modell: CYP2B6 als Masterenzym im Abbau von DT zu MM. Rechts RED3A4-Modell: CYP3A4 als Masterenzym im Abbau von DT zu MM. (siehe auch Gesamtmodell Abb. 12 rechts)

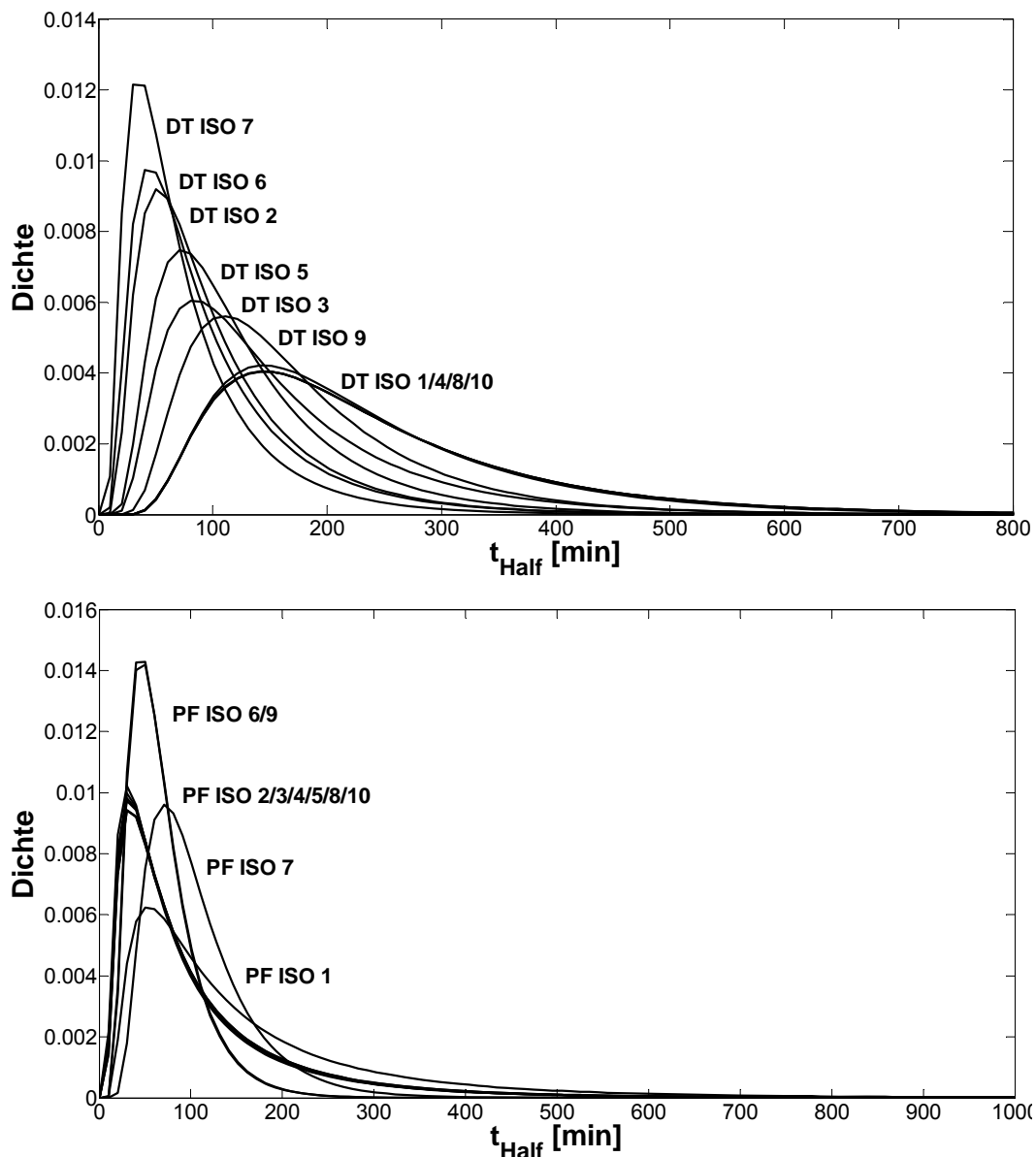


### 3.6.2.1 Simulationen mit identifizierten $r_{max}$ - und $K_M$ -Parametern

Dazu werden die in der Modellverifikation identifizierten  $r_{max}$ - und  $K_M$ -Parameter für den Abbau von DT zu MM und DX und den Abbau von PF zu HPF und DPF in der Phase I (siehe **Abschnitt 3.5.2.1**, **Tab. 3** bis **Tab. 5**) verwendet und die maximalen Reaktionsraten der individuellen Lebern per Ansatz der relativen Menge nach Gleichung (2.34) und (2.35) abgeschätzt.

Die dynamischen Simulationen wurden zuerst am ISO-Modell mit allen zehn Parametersets aus der Modellverifikation an Initialraten (**Tab. 3** und **Tab. 4**) durchgeführt (**Abb. 25**). Dabei zeigt sich, dass die unterschiedlichen Parametersets zu unterschiedlichen Verteilungen führen, bei DT stärker ausgeprägt als bei PF.

Beim Vergleich der Profile für DT (**Abb. 25**, oben) mit den Parametersets (**Tab. 3** und **Tab. 4**) wird klar, dass die Verlagerung der Profile von niedrigen Halbwertszeiten zu höheren Halbwertszeiten von Parameterset zu Parameterset auf den Einfluss der hohen Variabilität der Parameter aller CYP-Isoenzyme im DT-Abbau zurückzuführen ist und es zu kompensierenden Effekten kommt. Des Weiteren werden die Maximalraten-Parameter bestimmter Enzyme alternativ in einigen Parametersets oder in allen Sets gegen Null geschätzt. Die Parametersets mit hohem Parameterwert  $r_{max}$  für CYP2B6 führen im Vergleich zu einem hohen Wert für CYP3A4 zu einer Verschiebung der Verteilung zu höheren Halbwertszeiten, da der Proteingehalt von CYP2B6 in den Mikrosomen der Referenzleber, an denen die Metabolitdaten gemessen wurden, in der Verteilung der CYP2B6-Proteinwerte über alle Lebermikrosomen der Datenbank den höchsten Wert aufweist und weit außerhalb der Standardabweichung liegt, während der CYP3A4-Proteingehalt der Referenzleber in der Verteilung über alle Lebermikrosomen in der Nähe des Mittelwerts der Verteilung liegt. Eine genauere Aufschlüsselung, welches der anderen CYP-Enzyme respektive welcher Parameter welchen Einfluss auf die Verlagerung der Halbwertszeiten von Parameterset zu Parameterset hat, ist jedoch nicht möglich.



**Abb. 25:** Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen (Inverse Gauß-) der Halbwertszeit-( $t_{\text{Half}}$ )-Verteilungen des individuellen DT-Abbaus (oben) und PF-Abbaus (unten). Die Verteilungen wurden in den dynamischen Simulationen am ISO-Modell durch Implementierung individueller CYP-Isoenzym-Proteindaten und für jeden der in der Modellverifizierung an Initialraten identifizierten 10 Parametersets („ISO“ 1-10) generiert (Tab. 3 und Tab. 4).

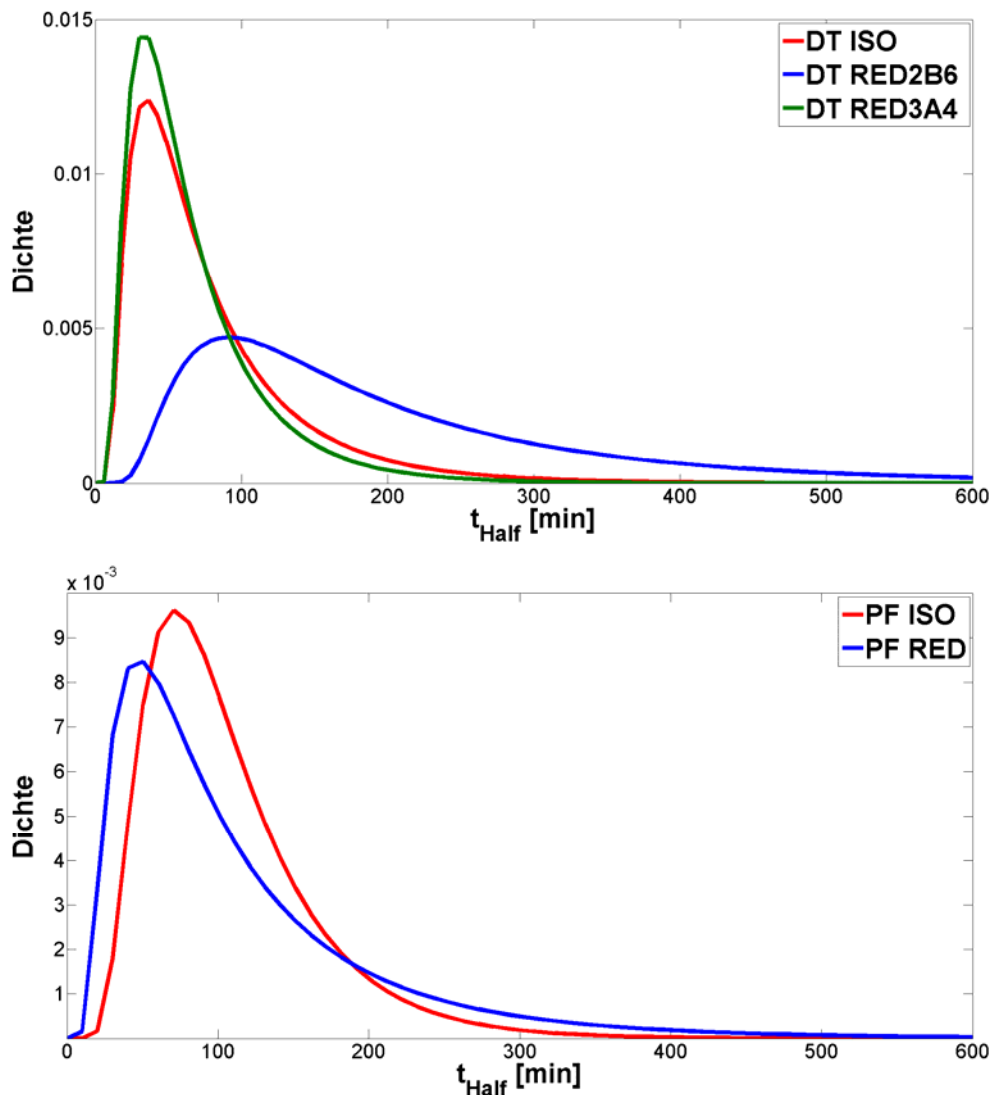
Bei dem PF-Metabolismus (**Abb. 25**, unten) korrelieren die Maximalraten  $r_{\text{max}}$  für den CYP3A4-katalysierten Abbau von PF zu DPF (**Tab. 3**) mit der relativen Lage der Verteilungen, da die Parameterset #2,3,4,5,8 und #10 zum gleichen Verteilungsprofil mit Mittelwert bei einer relativ kurzen Halbwertszeit führen, während die Verteilung der anderen Parametersets mit geringerer oder verschwindender Maximalrate im CYP3A4-katalysierten Abbau von PF zu DPF zu einer Verteilung mit abweichender Lage führen. Eine genauere Aufschlüsselung ist jedoch nicht möglich.

Wegen dieser Variabilität der Verteilungen aufgrund nicht-identifizierbarer Parameter werden im Weiteren exemplarisch nur die Verteilungen an dem jeweiligen Parameterset mit

dem besten Funktionswert der Modellverifikation an Initialraten im ISO-Modell (**Tab. 3** und **Tab. 4**, Parameterset #7) untersucht und mit den beiden RED-Modell-Varianten, RED2B6 und RED3A4, verglichen. Die Halbwertszeit-Verteilungen für das ISO-Modell und die beiden RED-Modell-Varianten, RED2B6 und RED3A4, wurden mit Wahrscheinlichkeitsdichtefunktionen angepasst (**Abb. 26**) und ausgewertet (**Tab. 9**).

Für DT liegt der Mittelwert der Verteilung im ISO-Modell bei 79 min und ist damit größer als im RED3A4-Modell mit 67 min, aber geringer als im RED2B6-Modell mit 208 min. DT hat im ISO-Modell mit 78% eine größere relative Standardabweichung im Vergleich zum RED3A4-Modell mit 71%, aber eine identische wie im RED2B6-Modell. Die Verteilungen für DT zeigen im Schaubild (**Abb. 26** oben) keinen signifikanten Unterschied zwischen dem ISO-Modell und dem RED-Modell mit CYP3A4. Das RED-Modell mit CYP2B6 zeigt dagegen eine deutliche Verschiebung im Mittelwert zu höheren Halbwertszeiten. Das ISO-Modell und RED3A4-Modell eine ähnliche Verteilung aufweisen, liegt daran, dass im zugrunde liegenden Parameterset #7 der Anpassung des ISO-Modells an die experimentellen Daten nur der Parameter  $r_{max}$  für CYP3A4 mit einem signifikanten Beitrag geschätzt, der Parameter  $r_{max}$  für CYP2B6 jedoch mit einem verschwindend geringen Wert identifiziert wurde. Im PF-Abbau liegen die Halbwertszeiten im Mittelwert bei 107 min im ISO-Modell beziehungsweise 116 min im RED-Modell. Die Verteilungen für PF zeigen in den Schaubildern (**Abb. 26** oben) eine leichte Verschiebung der Verteilung des RED-Modells zu niedrigeren Verweilzeiten im Vergleich zum ISO-Modell. Die Unterschiede in den absoluten Standardabweichungen machen sich grafisch nicht bemerkbar.

Insgesamt sind also die Unterschiede zwischen dem ISO-Modell und dem RED3A4-Modell beziehungsweise RED-Modell bei DT beziehungsweise PF nicht stark ausgeprägt. Nur bei DT im RED2B6-Modell zeigen sich sichtbare Unterschiede im Vergleich zum ISO-Modell mit einer Verschiebung im Mittelwert der Verteilung zu deutlich höheren Halbwertszeiten.



**Abb. 26:** Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen (Inverse Gauß-) der Halbwertszeit-(tHalf)-Verteilungen des individuellen DT(oben)- und PF(unten)-Abbaus In Phase I. Dargestellt sind die angepassten Funktionen der Verteilungen für ISO-Modell(rot) und RED-Modell. Bei DT werden im Abbau von DT zu MM die RED-Modelle mit Masterenzym CYP2B6 (blau), RED2B6, und mit Masterenzym CYP3A4 (grün), RED3A4, unterschieden. In Tab. 9 sind die Kennwerte der Verteilungen aufgelistet.

**Tab. 9:** Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen der Halbwertszeit-Verteilungen des individuellen DT- und PF-Abbaus im Phase I ISO- und RED-Modell (CYP2B6 und CYP3A4) (**Abb. 26**).

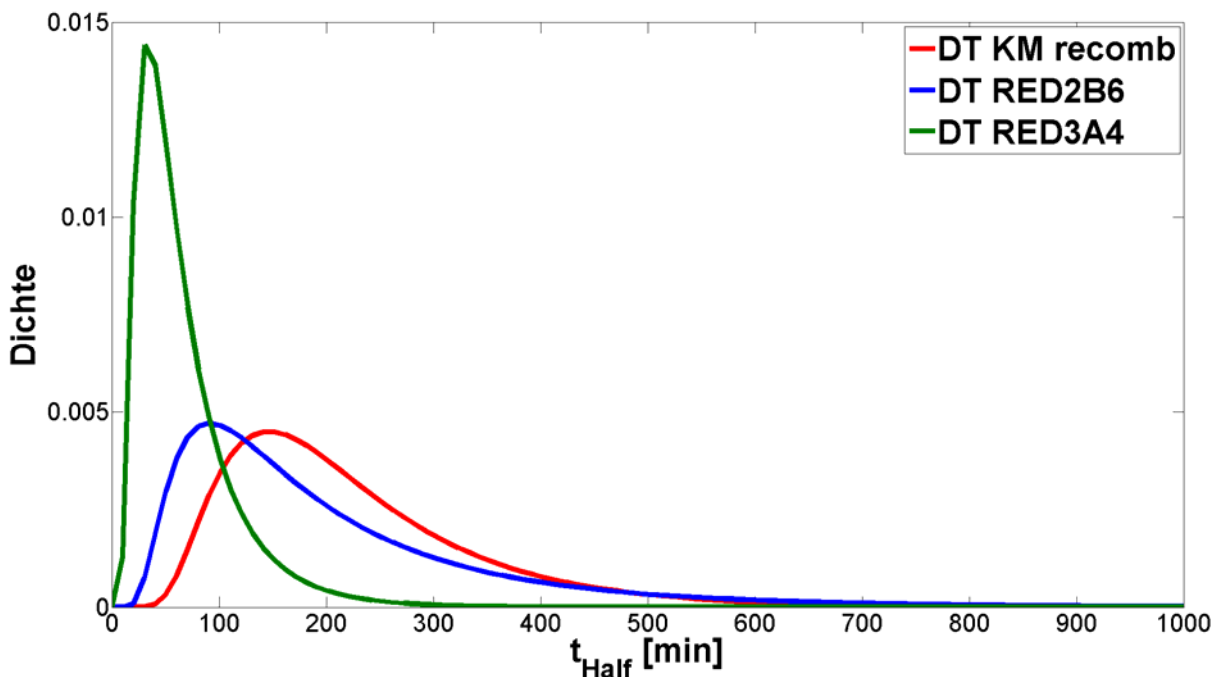
Modell	Mittelwert [min]	var. [min <sup>2</sup> ]	s.d. [min]	rel. s.d [%]
DT				
ISO	79	3737	61	78
RED2B6	208	26269	162	78
RED3A4	67	2221	47	71
PF				
ISO	107	3196	57	53
RED	116	9362	97	83

Dargestellt sind jeweils die Kennwerte der Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktion (Inverse Gauß-) in Mittelwert, Varianz (var.), Standardabweichung (s.d.) und relative Standardabweichung (rel. s.d.).

3.6.2.2 Simulation mit vorgegebenen  $K_M$ - und identifizierten  $r_{max}$ -Parametern

Da die Modellsimulation je nach Parameterset zu unterschiedlichen Verteilungen führt, und damit eine Modellprädiktion nicht verlässlich ist, wurde die Modellsimulation auf Basis des ISO-Modells durchgeführt, an dem die  $r_{max}$ -Parameter bei Vorgabe der  $K_M$ -Parameter identifiziert wurden (**Tab. 6** und **Tab. 7**, siehe **Abschnitt 3.5.2.2**). Diese Simulationsvariante kann nur am Beispiel des DT-Metabolismus aufgezeigt werden, da hier aus Literatur  $K_M$ -Parameter für die einzelnen CYP-Isoenzyme für den DT-Abbau bekannt sind, nicht aber für den PF-Abbau.

Die entsprechenden Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen, die an die Verteilungen der Halbwertszeiten des DT-Abbaus, angepasst wurden, sind zusammen mit den Verteilungen der Modellsimulationen an den RED-Modellen (siehe **Abschnitt 3.6.2.1**) in **Abb. 27** dargestellt und die Kennwerte der Funktionen in **Tab. 10** zusammengefasst.



**Abb. 27:** Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen (Inverse Gauß-) der Halbwertszeit- ( $t_{Half}$ ) -Verteilungen des individuellen DT-Abbaus. Dargestellt sind die angepassten Funktionen der Verteilungen für ISO-Modell („DT KM recomb“, rot) und RED-Modell mit Masterenzym CYP2B6 (blau) oder mit Masterenzym CYP3A4 (grün) im Abbau von DT zu MM.

Die Dichte-Funktion zeigt im Vergleich zu der Dichte-Funktion im ISO-Modell, in dem  $r_{max}$ - und  $K_M$ -Parameter identifiziert wurden (**Abb. 26**, links oben), eine deutliche Verschiebung zu höheren Halbwertszeiten. Der Mittelwert der Dichte-Funktion liegt nun statt bei 79 min (**Tab. 9**) bei 226 min. Die Verteilung des ISO-Modells ist entsprechend nicht mehr der Verteilung des RED3A4-Modells ähnlich sondern der Verteilung des RED2B6-Modells.

Der große Unterschied in der Simulation zwischen diesen beiden Identifizierungsvarianten,  $K_M$ -Parameter identifiziert (siehe **Abschnitt 3.5.2.1**) und  $K_M$ -Parameter vorgegeben (siehe **Abschnitt 3.5.2.2**), liegt darin, dass der den Simulationen zugrunde liegende Parametersatz im Modell mit  $r_{max}$ - und  $K_M$ -Identifikation (**Tab. 3** und **Tab. 4**, #7) keine Beteiligung des CYP2B6-Enzyms aber eine große Beteiligung des CYP3A4-Enzyms aufweist, daher ist der Kurvenverlauf dem des RED3A4-Modells ähnlich, während im Modell mit  $K_M$ -Vorgabe CYP3A4 nicht zum Abbau von DT zu MM beiträgt (**Tab. 5**), sondern nur CYP2B6, daher ist hier der Kurvenverlauf dem des CYP2B6-Modells ähnlich.

**Tab. 10:** Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen der Halbwertszeit-Verteilungen des individuellen DT-Abbaus im Phase I ISO-Modell, bei dem  $K_M$ -Parameter vorgegeben und  $r_{max}$ -Parameter identifiziert wurden, sowie in den RED-Modellen, 2B6 und 3A4 (Abb. 27).

Modell	Mittelwert [min]	var. [min <sup>2</sup> ]	s.d. [min]	rel. s.d. [%]
DT				
ISO	226	15292	124	55
RED2B6	208	26269	162	78
RED3A4	67	2221	47	71

Dargestellt sind jeweils die Kennwerte der Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktion (Inverse Gauß-) in Mittelwert, Varianz (var.), Standardabweichung (s.d.) und relative Standardabweichung (rel. s.d.).

### 3.6.2.3 Simulation der Phase I mit $r_{max}$ - und $K_M$ -Parametern aus rekombinanten Systemen

Alternativ zu der dynamischen Analyse mit Parametern, die aus Initialratenbestimmungen an individuellen Lebermikrosomen bestimmt wurden, entweder vollständige Identifikation (siehe **Abschnitte 3.5.2.1** und **3.6.2.1**) oder Identifikation von  $r_{max}$  bei Vorgabe von  $K_M$  (siehe **Abschnitte 3.5.2.2** und **3.6.2.2**), können die dynamischen Simulationen an dem Phase-I- ISO-Modell und an den Phase-I-RED2B6- und -RED3A4-Modellen (siehe **Abschnitt 3.6.1**) des DT-Fremdstoffmetabolismus vollständig mit vorgegebenen  $r_{max}$ - und  $K_M$ -Parametern durchgeführt werden. Dazu werden die CYP-Isoenzym spezifischen  $r_{max}$ -Parameter nach Gleichung (3.4) aus den spezifischen maximalen Reaktionsraten  $v_{max,rec,j}^e$  [123] und der CYP-Enzymkonzentration  $c_{il}^e$  der individuellen Leber  $il$  für alle Reaktionsraten im ISO-Modell beziehungsweise in beiden RED-Modellen abgeschätzt und zusammen mit den Isoenzym-spezifischen  $K_M$ -Parametern (**Tab. 11**) in die Reaktionsraten implementiert.

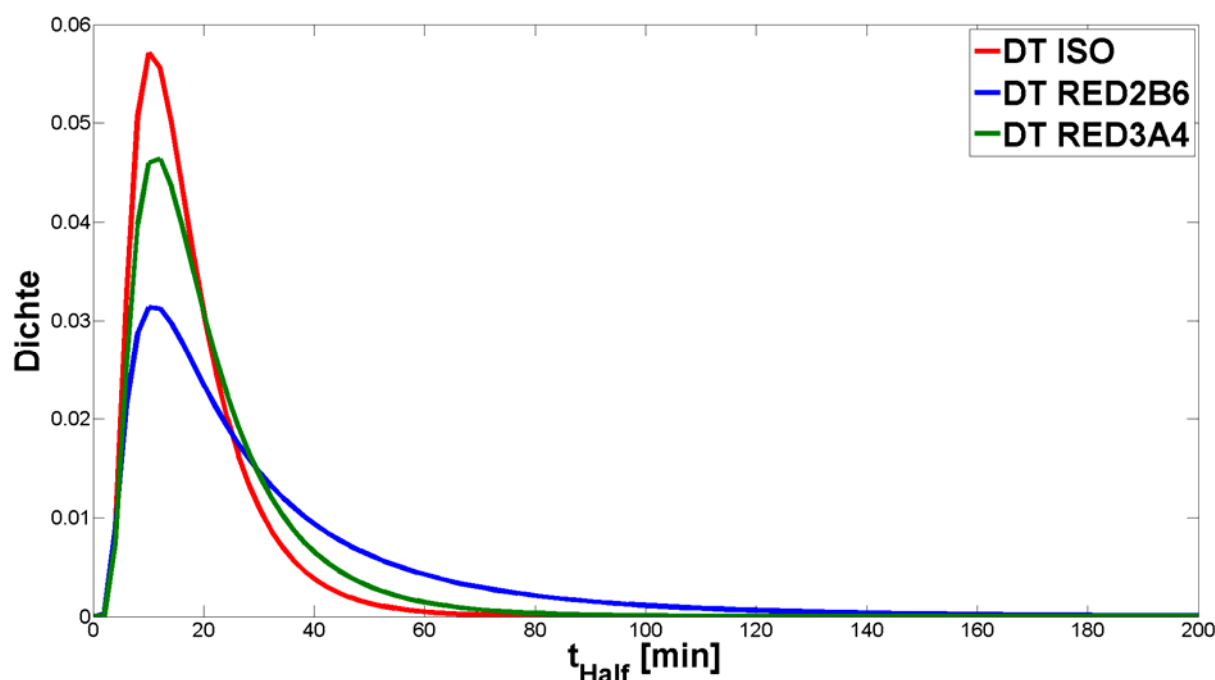
Für die entsprechenden individuellen Detoxifikationsprofile werden wiederum die Verteilungen der Halbwertszeiten des Abbaus von DT erstellt und mit entsprechenden Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen angepasst (**Abb. 28** und **Tab. 12**).

**Tab. 11:** CYP-Isoenzym-spezifische Parameter für den DT-Fremdstoffmetabolismus in rekombinanten Systemen.

Reaktion	Enzym	$v_{\max,rec}$ [pmol/pmol CYP/min]	$K_M$ [ $\mu$ M]
DX-Bildung			
aus DT	CYP2C9	3,4	222
aus DT	CYP2C19	1,3	219
aus DT	CYP2D6	11,9	3,7
MM-Bildung			
aus DT	CYP2C19	1,9	237
aus DT	CYP2B6	29,9	105
aus DT	CYP3A4	21,3	232
HM-Bildung			
aus DX	CYP2D6	10,5	2640
aus MM	CYP2D6	4,3	5
aus DX	CYP3A4	2,6	724
aus MM	CYP3A4	0,13	49,6

Spezifische  $v_{\max}$ - und  $K_M$ -Werte der CYP-Isoenzyme 2B6, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4 in der DX-Bildung aus DT, der MM-Bildung aus DT und der HM-Bildung aus DX und MM [123].

Der Mittelwert der Verteilung des ISO-Modells, 17 min, ist niedriger als der Mittelwert im RED2B6- beziehungsweise RED3A4-Modell, 33 min beziehungsweise 21 min. Genauso ist die relative Standardabweichung im ISO-Modell, 59%, niedriger als im RED2B6-Modell, 95%, beziehungsweise im RED3A4-Modell, 66% (**Tab. 12**). In den Verteilungsprofilen zeigt sich (**Abb. 28**) eine leichte Verzerrung zu höheren Halbwertszeiten, im Fall des RED2B6-Modells etwas stärker ausgeprägt als im RED3A4-Modell. Dass die Profile dennoch sehr eng beieinander liegen, ist auf die hohen Proteinkonzentrationen von CYP3A4 und CYP2D6 in der CYP-Proteinkonzentrationsverteilung (**Abb. 23**) sowie auf den relativ geringen  $K_M$ -Parameterwert von CYP2D6 (**Tab. 11**) zurückzuführen, die damit im Isoenzym-Modell ebenso zu einem dominanten Beitrag von CYP2D6 und CYP3A4 und einem geringen Einfluss der restlichen Isoenzyme führen. CYP2B6 hat zwar in der Verteilung einen um den Faktor 10 geringeren Mittelwert, aber einen um den Faktor 2 geringeren  $K_M$ -Parameterwert. Folglich können die für den DT-Abbau bedeutendsten Isoenzyme in absteigender Reihenfolge mit CYP2D6, CYP3A4, CYP2B6 und CYP2C9 benannt werden. Die stärkere Verzerrung des RED2B6-Profiles zu höheren Halbwertszeiten liegt weiter wahrscheinlich daran, dass bei vier Individuen mit kombiniert niedrigen Proteinwerten von CYP2B6 und CYP2D6 (**Abb. 23**) Halbwertszeiten von über 200 min auftreten.



**Abb. 28:** Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen (Inverse Gauß-) der Halbwertszeit- $(t_{\text{Half}})$ -Verteilungen des individuellen DT-Abbaus in der dynamischen Simulation basierend auf  $r_{\text{max}}$ - und  $K_M$ -Parameter aus rekombinanten Systemen. Dargestellt sind die angepassten Funktionen der Verteilungen für ISO-Modell (rot) und RED-Modell mit Masterenzym CYP2B6 (blau) oder mit Masterenzym CYP3A4 (grün) im Abbau von DT zu MM.

**Tab. 12:** Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen der Halbwertszeit-Verteilungen des individuellen DT-Abbaus im ISO- und RED-Modell (CYP2B6 und CYP3A4) (Abb. 28), basierend auf Parametern aus rekombinanten Systemen (Tab. 11).

Modell	Mittelwert [min]	var. [ $\text{min}^2$ ]	s.d. [min]	rel. s.d. [%]
<b>DT</b>				
ISO	17	104	10	59
RED2B6	33	979	31	95
RED3A4	21	189	14	66

Dargestellt sind jeweils die Kennwerte der Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktion (Inverse Gauß-) in Mittelwert, Varianz (var.), Standardabweichung (s.d.) und relative Standardabweichung (rel. s.d.).

Insgesamt zeigen sich folglich Verschiebungen der Verteilungen zu höheren Halbwertszeiten in den RED-Modellen im Vergleich zum ISO-Modell. Diese Verschiebung ist jedoch nicht stark ausgeprägt, da hohe Halbwertszeiten nur dann auftreten, wenn kombiniert geringe Mengen an beiden Masterenzymen, CYP2D6 und CYP2B6, beziehungsweise CYP2D6 und CYP3A4, in der Leber exprimiert sind, was anscheinend recht selten ist.



### 3.6.3 Einfluss des Phase II-Metabolismus

Die Untersuchung der Variabilität im Abbau von DT und PF wurde bisher nur in Bezug auf die inter-individuelle Variabilität in den CYP-Expressionslevels der Phase I untersucht, und die Phase II vernachlässigt. Bei DT sollte sich jedoch die Phase II-Glucuronidierung von DX zu DXG indirekt auf Phase I auswirken, da die DX-Konzentrationen durch den kinetischen Ansatz der Konkurrenz durch alternativen Substratabbau (Gleichung (2.4)) ihren Einfluss auf den Abbau von DT hat. Bei PF wirkt sich die Glucuronidierung jedoch direkt auf PF aus, da PF ohne vorangehende Phase I-Reaktion direkt in Phase II zu PFG glucuronidiert werden kann (**Abb. 12**). Folglich wurden die dynamischen Modelle (siehe **Abschnitt 3.6.1.1**) durch Implementierung der Phase II-Glucuronidierung von DX und PF erweitert.

Da für die DX-Glucuronidierung an UGT1A3, 2B4 und 2B7 keine kinetischen Parameter und für UGT1A9, UGT2B4 und UGT2B7 keine individuellen Proteindaten zur Verfügung standen, wurden die kinetischen Parameter der apparenten Einzelreaktion aus der Initialraten-Bestimmung (**Tab. 1**) in die vollständig identifizierten ISO- und RED-Modelle (siehe **Abschnitt 3.5.2.1**) eingesetzt. Folglich besteht im dynamischen Modell kein Unterschied in der Phase II zwischen ISO- und RED-Modell. Die dynamische Simulationen wurden unter Berücksichtigung der individuellen CYP-Expressionsdaten wiederholt, an die generierten Verteilungen der Halbwertszeiten entsprechende Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen angepasst und die Kennwerte analysiert (**Tab. 13**).

**Tab. 13:** Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen der Halbwertszeit-Verteilungen des individuellen DT- und PF-Abbaus in den um Phase II erweiterten ISO- und RED-Modellen (CYP2B6 und CYP3A4).

Modell	Mittelwert [min]	var. [min <sup>2</sup> ]	s.d. [min]	rel. s.d. [%]
<b>DT</b>				
ISO	79	3735	61	78
RED2B6	208	26269	162	78
RED3A4	67	2221	47	71
<b>PF</b>				
ISO	93	1797	42	46
RED	90	3263	57	64

Dargestellt sind jeweils die Kennwerte der Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktion (Inverse Gauß-) in Mittelwert, Varianz (var.), Standardabweichung (s.d.) und relative Standardabweichung (rel. s.d.).

Im DT-Abbau führt die Erweiterung der Modelle, ISO und RED, um die Phase II-Glucuronidierung (**Tab. 13**) zu keiner Veränderung in Mittelwert und Varianz der Verteilung im Vergleich zu den entsprechenden Modellen mit nur Phase I (**Tab. 9**). Für PF ergibt sich im Vergleich zu den Modellen mit nur Phase I (**Tab. 9**) jeweils eine deutliche Verschiebung des

Mittelwerts der Verteilung zu kürzeren Halbwertszeiten (**Tab. 13**), da PF direkt zu PFG glucuronidiert wird.

Insgesamt zeigen die dynamischen Simulationen, dass die Glucuronidierung auf die Verteilung der Abbauprofile der Substrate einen großen Einfluss hat, wenn wie bei PF eine direkte Phase-II-Glucuronidierung ohne vorherige Phase-I-Reaktion stattfinden kann. Daher sollten zukünftige Arbeiten zur Verbesserung der Vorhersage des individuellen Fremdstoffmetabolismus die inter-individuelle Variabilität der Phase-II-UGT-Enzyme in den dynamischen Simulationen ebenfalls berücksichtigen. Dies war zum Zeitpunkt der Arbeit nicht möglich, da keine Proteinkonzentrationsdaten aller beteiligten UGT-Isoenzyme zur Verfügung standen.

### 3.7 Globale Sensitivitätsanalyse und Identifizierbarkeit

Die globale Identifizierbarkeit der Parameter des Fremdstoffmetabolismus in Phase I und II wird anhand der dynamischen Analyse der Multi-Parameter-Sensitivitäten (Gleichung (2.31)) und der Robustheit (Gleichung (2.33)) des Systems am ISO-Modell und an den RED-Modellen beurteilt (siehe **Abschnitte 3.6.2.1** und **3.6.3**). Dazu wird der gekoppelte Substratabbau von DT und PF bei einer Initialkonzentration von jeweils  $10000 \text{ pmol ml}^{-1}$  und einer angenommenen Mikrosomenproteinkonzentration von  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  über einen Zeitraum von 600 min betrachtet. In der Berechnung werden jeweils 10000 Simulationen durchgeführt und die Zustandsvariablen an 600 äquidistanten Zeitpunkten, das bedeutet nach jeder Minute, ermittelt. Für das ISO-Modell sowie für die RED-Modellvarianten, RED2B6 und RED3A4, werden die Multiparametersensitivitäten (MPS) als auch die Robustheit-Koeffizienten ( $R_{TPV}$ ) ermittelt (siehe **Abschnitt 2.4.5**). Die MPS werden pro Parameter über alle Metabolite aufsummiert und als Mittelwert die durchschnittliche Multiparametersensitivität (DMPS) berechnet. Als nominale Referenzparameter werden wie in der dynamischen Simulation die Parameter aus der Modellverifikation an Initialraten in Phase I im ISO-Modell (**Tab. 3** und **Tab. 4**, Parameterset #7) und im RED-Modell (**Tab. 5**), die Parameterwerte für die Demethylierung zu HM (**Tab. 8**), sowie die in der Phase II-Glucuronidierung von DX und PF identifizierten apparenten Parameterwerte (**Tab. 1**) verwendet. Dementsprechend werden die  $r_{max}$ -Parameter in einem Bereich von 0,01 bis  $1500 \text{ (pmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1})$  und die  $K_M$ -Parameter in einem Bereich von 100 bis  $1000000 \text{ (pmol ml}^{-1})$  begrenzt. Bei der HM-Bildung von DX an CYP2D6 wird der  $K_M$ -Parameter in einem Bereich zwischen 100 und  $3000000 \text{ (pmol ml}^{-1})$  begrenzt. Damit die Ergebnisse der Analyse am ISO-Modell und an den RED-Modellen

vergleichbar sind, werden die Parameter in den RED-Modellen in den gleichen Bereichen begrenzt.

Für das ISO-Modell ergibt sich eine DMPS von 0,6, für das RED2B6-Modell eine DMPS von 0,9 und für das RED3A4-Modell eine DMPS von 1,0. Werden die DMPS einzeln für die  $r_{max}$ - und  $K_M$ -Parameter betrachtet, dann fällt auf, dass die  $r_{max}$ -Parameter in allen Modellen eine höhere DMPS haben als die  $K_M$ -Parameter. Die DMPS der  $r_{max}$ -Parameter betragen 0,8, 1,4 beziehungsweise 1,4, und die DMPS der  $K_M$ -Parameter 0,5, 0,7 beziehungsweise 0,6 im ISO-, im RED2B6 beziehungsweise RED3A4-Modell. Der Grund liegt darin, dass in dem großen globalen Bereich der Parametervariation sowohl Kinetiken erster Ordnung ( $K_M \gg c_S$ ),

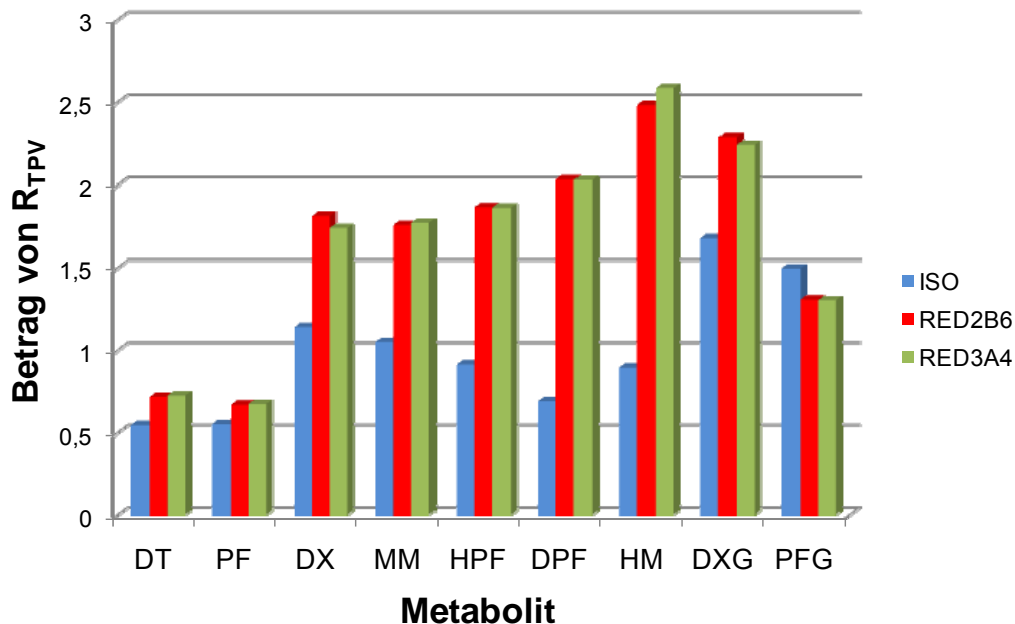
$r \approx r_{max} \cdot \frac{c_S}{K_M}$ , als auch nullter Ordnung ( $K_M \gg c_S$ ),  $r \approx r_{max}$ , auftreten (beispielhaft an

Michaelis-Menten-Kinetik gezeigt). In beiden angenäherten Kinetiken hat somit  $r_{max}$  potentiell eine Sensitivität, während  $K_M$  potentiell nur in der Kinetik erster Ordnung eine Sensitivität aufzeigt. Damit wird klar, dass die  $r_{max}$ -Parameter bezüglich des gesamten Bereichs der Parametervariation gegenüber den  $K_M$ -Parametern eine höhere Sensitivität im Modell aufweisen.

Die Robustheit-Koeffizienten der einzelnen Metabolite im ISO- und in den RED-Modellen sind in **Abb. 29** dargestellt. Wie zu erkennen ist, sind die Robustheit-Koeffizienten im ISO-Modell bis auf PFG bei allen anderen Metaboliten wesentlich geringer als die entsprechenden Koeffizienten in den RED-Modellen während zwischen RED2B6 und RED3A4 kaum Unterschiede bestehen. Der größte Unterschied zwischen den Robustheit-Koeffizienten liegt mit einem Verhältnis des Wertes im RED-Modell zu dem entsprechenden Wert im ISO-Modell von 294% bei DPF und der niedrigste mit einem Verhältnis von 120% beziehungsweise 87% bei PFG. Der durchschnittliche Wert der Robustheit-Koeffizienten beträgt 1,0 im ISO-Modell und 1,7 in den RED-Modellen. Die Ausnahme in der Robustheit bei dem Metabolit PFG zwischen ISO- und RED-Modell ist nicht erklärbar, da in der Phase II kein Unterschied zwischen ISO- und RED-Modell besteht (siehe **Abschnitt 3.6.3**). Folglich muss die Ursache in den Phase-I-Parameter liegen, deren Änderungen sich in beiden Modellen unterschiedlich auf das Substrat PF auswirken. Weiter ist dies jedoch nicht aufschlüsselbar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die RED-Modelle eine höhere globale Sensitivität aufweisen. Die Ursache liegt darin, dass das RED-Modell nicht die Redundanz der CYP-Isoenzyme wie im ISO-Modell aufweist, und sich damit Veränderungen oder Störungen in den Parametern stärker auf die Zustandsvariablen, sprich die

Metabolitkonzentrationen auswirken. Im ISO-Modell hingegen wirkt die Redundanz der CYP-Isoenzyme als Puffer für Variationen in den Parametern, die Veränderungen werden durch die Redundanz kompensiert. Die Robustheit lässt sich entsprechend vice-versa erklären: die Redundanz der CYP-Isoenzyme macht das ISO-Modell robuster gegen Variationen in den Parametern, zum Beispiel  $r_{max}$  aufgrund individueller Proteinkonzentrationen, während die RED-Modelle anfälliger sind.



**Abb. 29:** Robustheit-Koeffizienten der Metabolite des DT- und PF-Abbaus im ISO- und im RED3A4-Modell. Die Robustheit-Koeffizienten ( $R_{TPV}$ ) der einzelnen Metabolite wurden in der globalen Sensitivitätsanalyse am ISO- (blau) und am RED3A4-Modell (rot) ermittelt.

### 3.8 Diskussion

Der Fremdstoffmetabolismus von DT und PF zeigt im Phase I und Phase II-Metabolismus die Beteiligung von mehreren CYP- und UGT-Isoenzymen (**Abb. 8**, **Abb. 9**, **Abb. 10** und **Abb. 11**). Diese Isoenzym-Struktur führt zu einer höheren Robustheit in der Aufrechterhaltung des Arzneimittelabbaus im Vergleich zu einem Metabolismus, der nur auf einem Masterenzym je Reaktionsschritt beruht (**Abb. 13**), und Defizite im Metabolismus, wie zum Beispiel die sehr geringe Expression von CYP2D6 und CYP2C19 bei *Poor Metabolizern*, hat im Isoenzym-Modell eine geringere Auswirkung als im entsprechenden reduzierten Modell (**Abb. 14**).

Die Modellidentifikation an Initialratendaten, in Einzelsubstratbestimmung und in simultaner Doppeltsubstratbestimmung, führt jedoch zu Problemen in der Identifizierbarkeit

der Parameter der CYP-Isoenzyme in der Phase I. Aufgrund der Isoenzym-Struktur und der damit verbundenen Redundanz ergibt sich in der auf Optimierungsalgorithmen basierenden Schätzung eine hohe Variabilität der  $r_{max}$ - und  $K_M$ -Parameter (**Tab. 3** und **Tab. 4**). Für die  $r_{max}$ -Parameter ergibt sich jedoch eine höhere Variabilität als für die  $K_M$ -Parameter, da zur Beschreibung der Initialratendaten (**Abb. 18** und **Abb. 19**) nicht alle Isoenzyme pro Reaktionsschritt benötigt werden, und weil die  $r_{max}$ -Parameter nur individuell für den jeweiligen Reaktionsschritt und das jeweilige Isoenzym sind, während die  $K_M$ -Parameter in der Reaktionskinetik der kompetitiven Hemmung durch alternativen Substratabbau jeweils in der Reaktionskinetik beider Substrate als Wettbewerbsparameter auftaucht. Auch die Korrelationsmatrix der Parameter (**Abb. 20**) verdeutlicht durch hohe Korrelationskoeffizienten die Bedeutung dieser Redundanz der Isoenzyme für den Arzneimittelabbau. Diese Variabilität der Parameter, die sich auch in wechselnder Favorisierung bestimmter Isoenzyme ausdrückt, zum Beispiel bei CYP2B6 und CYP3A4, ist eine eindeutige Charaktereigenschaft von robusten Systemen [21, 24]. Dass dieses Isoenzym-System eine höhere Robustheit aufweist jedoch eine geringere Parametersensitivität im Vergleich zum reduzierten Modell, zeigt sich sehr deutlich in der globalen Sensitivitätsanalyse (**Abb. 29**).

Diese mangelnde Identifizierbarkeit der Parameter erlaubt jedoch nur bedingt eine Vorhersage der individuellen Arzneimittelabbauprofile, die in dieser Arbeit anhand der Halbwertszeit der Substrate charakterisiert wurde, da diese Variabilität bei Berücksichtigung der individuellen CYP-Proteinlevel nicht zu eindeutigen Vorhersagen der Verteilungen führt (**Abb. 25**). Diese Vorhersage kann weiterhin zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen im Vergleich zu einem auf Masterenzymen basierenden System führen (**Abb. 26**). Im Fremdstoffmetabolismus von DT wird auf dem Abbauweg von DT zu MM CYP3A4 als hauptsächlich beitragendes Enzym, also Masterenzym diskutiert [117-123]. Individuell könnte aber CYP2B6 eine größere Beteiligung zukommen, wenn es im Vergleich zu CYP3A4 sehr hoch in Leberzellen exprimiert ist. In diesem Fall, CYP2B6 als Masterenzym, würden die individuellen Vorhersagen unterschiedliche Ergebnisse im Vergleich zur Simulation mit CYP3A4 als Masterenzym zur Folge haben, und eine Vorhersage auf Basis des CYP3A4-Masterenzym zu fatalen Fehlern in der pharmakologischen Bewertung im Rahmen der Entwicklung eines Arzneimittels führen.

Die Modellierung auf Basis der kompletten Isoenzymstruktur ist unumgänglich, da diese auch solche Sonderfälle berücksichtigen kann. Dieser Sonderfall könnte vielleicht nur in 1:10000 Fällen vorkommen, im Rahmen einer pharmakologischen Arzneimittelentwicklung

wäre aber ein solches scheinbar geringes Verhältnis schon fatal, wenn die zeitliche Retention im Körper durch diese falsche Abschätzung des Abbaus vorhergesagt wird. Im besten Fall könnte eine falsche zeitliche Vorhersage bei bestimmten Patienten zu einem zu schnellen Abbau des Arzneimittels in der Leber und damit der Wirkungslosigkeit des Arzneimittels führen. Im schlimmeren Fall jedoch, wenn wie hier im Beispiel CYP2B6 zu einer Verschiebung der Halbwertszeit zu höheren Zeiten führt, könnte ein Arzneimittel aufgrund zu langer Retention im Körper toxische Effekte hervorrufen, und damit zur Schädigung des Patienten und im schlimmsten Fall zum Tode führen. Dann wäre zum Beispiel ein Sonderfall von 1:10000 nicht mehr gering, wenn das Medikament von 1.000.000 Patienten eingenommen werden und damit zu 100 Todesfällen führen würde. Das wäre neben der menschlichen Katastrophe auch das wirtschaftliche Ende des Unternehmens, das dieses Medikament vertreibt.

Insgesamt ist es auch schwer vorstellbar, dass ein Arzneimittel in der menschlichen Population und individuell nur von einem Isoenzym abgebaut wird, da eine relativ hohe Zahl an verschiedenen CYP-Isoenzymen im Menschen exprimiert wird [6], inter-individuell eine hohe Variabilität der CYP-Isoenzym-Expressionslevel zu beobachten ist (**Abb. 23**), und die CYP-Isoenzyme aufgrund ihrer Struktur eine hohe Flexibilität und damit geringe Spezifität bezüglich potentieller Liganden aufweist, wie kürzlich für CYP3A4 berichtet wurde [11]. Dabei weist der Mensch eine im Vergleich zu anderen Säugetieren geringere Anzahl an verschiedenen CYP-Isoenzymen auf [136], die Anzahl in Maus und Ratte, besonders in der Subfamilie C und D [6], ist deutlich größer.

Die Parameterinsensitivität in diesem Isoenzym-Modell ist folglich ein Ausdruck der Redundanz der Isoenzyme und ein Ausdruck für die Robustheit des Systems [21, 24, 137], die damit verbundene mangelnde Identifizierbarkeit führt jedoch zu nicht eindeutigen Vorhersagen. Zu einer Verbesserung der Identifizierbarkeit könnten eine höhere Auflösung der Initialkonzentrationen, gerade im Bereich der nullten Ordnung, und eine Erhöhung der Anzahl der Initialkonzentration bei der Doppelsubstratbestimmung führen. Genauso könnte die Verwendung eines dritten Substrates mit einer von den beiden anderen Substraten variierenden Überlappung in den CYP-Isoenzymen in der experimentellen Untersuchung von Initialratendaten zu einer Verbesserung in der modellbasierten Parameteridentifikation führen. In beiden Fällen würde aber daraus eine Explosion des experimentellen Aufwandes folgen.

Hinzu kommt, dass sich in dieser Arbeit die experimentelle Untersuchung und die Modellidentifikation auf die ersten Reaktionsschritte in der Phase I konzentrierten, die direkt zum Abbau des Substrates DT beziehungsweise PF führen. Um die Vorhersage des

individuellen Fremdstoffmetabolismus auf die nachfolgenden Metabolite zu erweitern, müssten bei DT folglich noch die zweiten Demethylierungsschritte zu HM in ähnlicher Weise experimentell an Lebermikrosomen in Einzelsubstrat- und Doppeltsubstratmessung erfasst werden. Hierzu wäre aber, wie in den Reaktionskinetiken (Gleichung (3.5)) ersichtlich ist, ein höherer experimenteller Aufwand zur Untersuchung der gegenseitigen Konkurrenz in Form von Doppeltsubstratmessungen der Kombinationen MM und DT, DT und DX, PF und MM et cetera nötig.

Die Parameteridentifikation in dieser Arbeit konnte verbessert werden, wenn die CYP-Isoenzym spezifischen  $K_M$ -Parameter (**Tab. 8**) in der Modellierung vorgegeben werden, in diesem Fall aus der Untersuchung an einem rekombinanten System. Die Ergebnisse sind eindeutig, zeigen aber, dass zur Beschreibung der Initialratendaten nicht alle sondern nur einzelne Isoenzyme, CYP2D6, 2C9 und 2B6, beitragen (**Tab. 7**), andere Isoenzyme jedoch keine Beteiligung aufweisen. Beim Abbau von DT zu DX zeigte sich in den Initialraten in der Lineweaver-Burk-Darstellung ein biphasisches Profil (**Abb. 22** links), deshalb konnten in der Identifikation mit vorgegebenen  $K_M$ -Parametern CYP2C9 mit einem relativ hohen und CYP2D6 mit einem relativ niedrigen  $K_M$ -Wert (**Tab. 5**) als beteiligte Isoenzyme identifiziert werden. Aus diesen Überlegungen ergeben sich als Schlussfolgerung weitere Nachteile der Untersuchung an Lebermikrosomen:

1.) Wenn die Initialratendaten an individuellen Lebermikrosomen keine Beteiligung von mehreren CYP-Isoenzymen aufweisen, da die  $K_M$ -Parameter von mehreren Isoenzymen im gleichen Bereich liegen – im Fremdstoffmetabolismus von DT sind das CYP2C19 und CYP2C9 im Abbau zu DX und CYP3A4 und CYP2C19 im Abbau zu MM (**Tab. 11**) – dann ist die Identifikation aller potentiell beteiligten Isoenzyme, die in Aktivitätsmessungen an rekombinanten Systemen identifiziert wurden, per-se nicht möglich.

2.) Wenn nur wenige CYP-Isoenzyme in einem hohen Expressionslevel in den Lebermikrosomen ausgeprägt sind, dann ist die Identifikation aller potentiell beteiligten Isoenzyme wiederum nicht möglich. Die Modellverifikation ist folglich sehr von der Wahl der individuellen Leber in der experimentellen Untersuchung abhängig. Der optimale Fall wäre, eine individuelle Leber zu verwenden, die alle zum Fremdstoffabbau beitragenden Isoenzyme in hohem Konzentrationslevel exprimiert hat. Dieser Fall ist aber unwahrscheinlich, da die Isoenzyme wie schon beschrieben eine hohe inter-individuelle Variabilität aufweisen, und damit unwahrscheinlich in gleich hohem und gleichwertig aktivem Level vorliegen, und da es aus energetischen Gesichtspunkten einen nicht vertretbaren Aufwand für die Leber bedeuten würde, alle Isoenzyme konstitutiv in hohem Level zu exprimieren.

3.) Ein ähnliches biphasisches Profil wie in der Untersuchung an humanen Lebermikrosomen würde sich auch ergeben, wenn nur ein Isoenzym beteiligt ist, das eine Struktur mit zwei katalytischen Zentren aufweist, wovon das eine Zentrum einen niedrigen und das andere einen hohen  $K_M$ -Wert aufweist. Dies wurde schon in einer früheren Untersuchung des DT-Abbaus an Mikrosomen erörtert, in der das biphasische Verhalten als die Aktivität eines einzelnen Enzyms mit mehreren katalytischen Zentren interpretiert wurde [138]. Eine Unterscheidung zwischen der Beteiligung mehrerer Isoenzyme mit jeweils einem katalytischen Zentrum und der Beteiligung eines einzelnen Isoenzym mit mehreren katalytischen Zentren ist somit auf Basis der Identifikation an Mikrosomen nicht möglich, ist jedoch für die individuelle Modellprädiktion von essentieller Natur.

Zusammenfassend stellen Mikrosomen ein experimentelles System dar, das für die Identifikation der komplexen Kinetik im CYP-Isoenzymssystem des Arzneimittelmetabolismus in der Leber nur bedingt geeignet ist.

Die dritte und beste Alternative, das Isoenzym-Modell zu parametrisieren, wäre die, alle Parameter,  $r_{max}$ - und  $K_M$ , aus Untersuchungen an rekombinanten Systemen vorzugeben (**Tab. 11**), womit sich folgende Vorteile ergeben:

1.) Die experimentellen Untersuchungen werden von der individuellen Ausprägung der untersuchten Lebermikrosomen entkoppelt, und die Bedeutung der einzelnen Isoenzyme kann durch die Modellvorhersage auf Basis von Isoenzym-Konzentrationsdaten detailliert herausgearbeitet werden. Die Modellvorhersage basierend auf Parametern an rekombinanten Isoenzymen ergab in dieser Arbeit, dass im Fremdstoffmetabolismus von DT die dominant beitragenden Isoenzyme CYP2D6 und CYP3A4 sind. Der Vergleich mit der Vorhersage an humanen Lebermikrosomen zeigte aber, dass individuell auch CYP2B6 und CYP2C9 einen essentiellen Beitrag zum Abbaumetabolismus liefern können.

2.) Bei der experimentellen Untersuchung an rekombinanten Isoenzymen kann der Nachweis einer multikatalytischen Enzymstruktur oder von modulatorischen Effekten (Inhibierung/Aktivierung) erbracht werden, worauf in Zukunft stärker fokussiert werden sollte. Entsprechend könnte eine Modellerweiterung der Reaktionskinetik des alternativen Substratabbaus zum Beispiel an mehreren katalytischen Zentren [61] oder mit zusätzlichen inhibitorischen Mechanismen [139] angestrebt werden. Dies würde jedoch mit einer deutlichen Erhöhung der Zahl der zu identifizierbaren Parameter einhergehen, und damit eine sehr umfangreiche experimentelle Observation erfordern, um die Parameter mit einer zufriedenstellenden Sensitivität bestimmen zu können.



## 4 Zeitreihen-Ansatz an primären humanen Hepatozyten

### 4.1 Einleitung

Die Untersuchung an humanen Lebermikrosomen bietet die Möglichkeit der isolierten Betrachtung des Fremdstoffmetabolismus, wobei jedoch bedingt durch die Probleme der Langzeitstabilität dieses mikrosomalen Enzymsystems nur eine Betrachtung in einem kurzen Zeitraum möglich ist. Diese isolierte Betrachtungsweise ist dahingehend vorteilhaft, um ganz bestimmte Teilaspekte des Fremdstoffabbaus, wie zum Beispiel des Metabolismus, getrennt von anderen Einflüssen in der Leberzelle betrachten zu können. In der Untersuchung des Fremdstoffmetabolismus an DT und PF war dies ein erster Schritt, um Erfahrungen über den Fremdstoffmetabolismus gewinnen zu können.

Allerdings kann nur dann ein im Sinne der Systembiologie möglichst ganzheitliches und realistisches Bild des Fremdstoffmetabolismus gewonnen werden, wenn andere Einflüsse und Vorgänge in der Zelle nicht ausgeschlossen, sondern im experimentellen System und in der Modellierung berücksichtigt werden. Im Fremdstoffmetabolismus hat der Transport der Fremdstoffe sowohl aus den Blutgefäßen in die Leberzelle als auch aus der Zelle in die Gallengänge entscheidenden Einfluss auf den Fremdstoffmetabolismus und damit den zeitlichen Verlauf des Fremdstoffabbaus. Allerdings würde die Verringerung des metabolischen Abbaus eines bestimmten Arzneimittels, zum Beispiel durch Inhibition oder geringe Expressionslevel der beteiligten CYP-Isoenzyme, für sich allein noch nicht zur toxischen Gefährdung oder zu Nebenwirkungen aufgrund zu hoher Konzentration im Körper führen, sofern dieses Arzneimittel relativ schnell im Körper über Transportprozesse aus dem Blut in die Leber aufgenommen und relativ schnell in die Gallengänge ausgeschieden wird.

Daher müssen diese Transportvorgänge in der Analyse des Fremdstoffmetabolismus mit berücksichtigt werden. Diese Möglichkeit bieten die Mikrosomen nicht, da sie nur eine Zellfraktion darstellen, sondern nur vollständige Leberzellen, bei denen die Transportprozesse über die Zellmembran mit den intrazellulären Reaktionen verknüpft sind [140]. Daher werden in pharmakologischen *in-vitro* Untersuchungen oft primäre Hepatozyten verwendet, die im Rahmen eines operativen Eingriffs an einem Patienten oder aus Säugetieren isoliert werden.

Der zweite Vorteil der primären Hepatozyten liegt darin, dass die experimentelle Untersuchung in einem viel längeren Zeitraum, als bei Mikrosomen ermöglicht wird. Bei entsprechender Kultivierung in Platten ist ein Einsatz über mehrere Tage möglich. Folglich ermöglicht dies die Durchführung von Zeitreihen-Stimulus-Response-Ansätzen, wie sie erfolgreich in vielen früheren Studien an biologischen Systemen, zum Beispiel an Hefe [141, 142], angewendet wurden. Während der Initialratenansatz, wie in Kapitel 3 gezeigt, nur die experimentelle Untersuchung einzelner Reaktionsschritte erlaubt, und ein metabolisches Modell daher sukzessive von Reaktion zu Reaktion aufgebaut werden muss, werden im Zeitreihen-Stimulus-Response-Ansatz alle Vorgänge in der Zelle simultan erfasst, was nicht nur die Beobachtung von gegenseitigen Wechselwirkungen ermöglicht, sondern auch eine Verringerung des experimentellen Aufwandes bedeutet. Damit stellen primäre Hepatozyten das experimentelle System dar, das den Leberzellen *in-vivo* am nächsten steht [143].

Vor dem Hintergrund der verbesserten Aussagekraft wurden im zweiten Teil der Arbeit experimentelle Untersuchungen zum Arzneimittelmetabolismus an primären humanen Hepatozyten und die Modellierung in einem Zeitreihen-Stimulus-Response-Ansatz durchgeführt. Als Modellsubstrat wurde AS gewählt. Generell werden Statine in der Medizin eingesetzt, um den Cholesterolllevel im Blut zu senken, und damit dem Risiko des Herzinfarkts oder Schlaganfalls vorzubeugen. Die pharmakodynamische Wirkung liegt in der Inhibition der HMGCoA-Reduktase in der Leber, was die Synthese von gefährlichem LDL-Cholesteroll senkt [144] und die Aufnahme aus dem Blut stimuliert. Damit liegen Arzneimittelabbau und -wirkort von AS im gleichen zellulären Kompartiment der Leberzelle, was in der direkten Überlagerung von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik nicht nur ein sehr kompliziertes sondern in systembiologischer Sichtweise auch ein sehr interessantes System darstellt.

### 4.2 Identifikation der Netzwerkstruktur

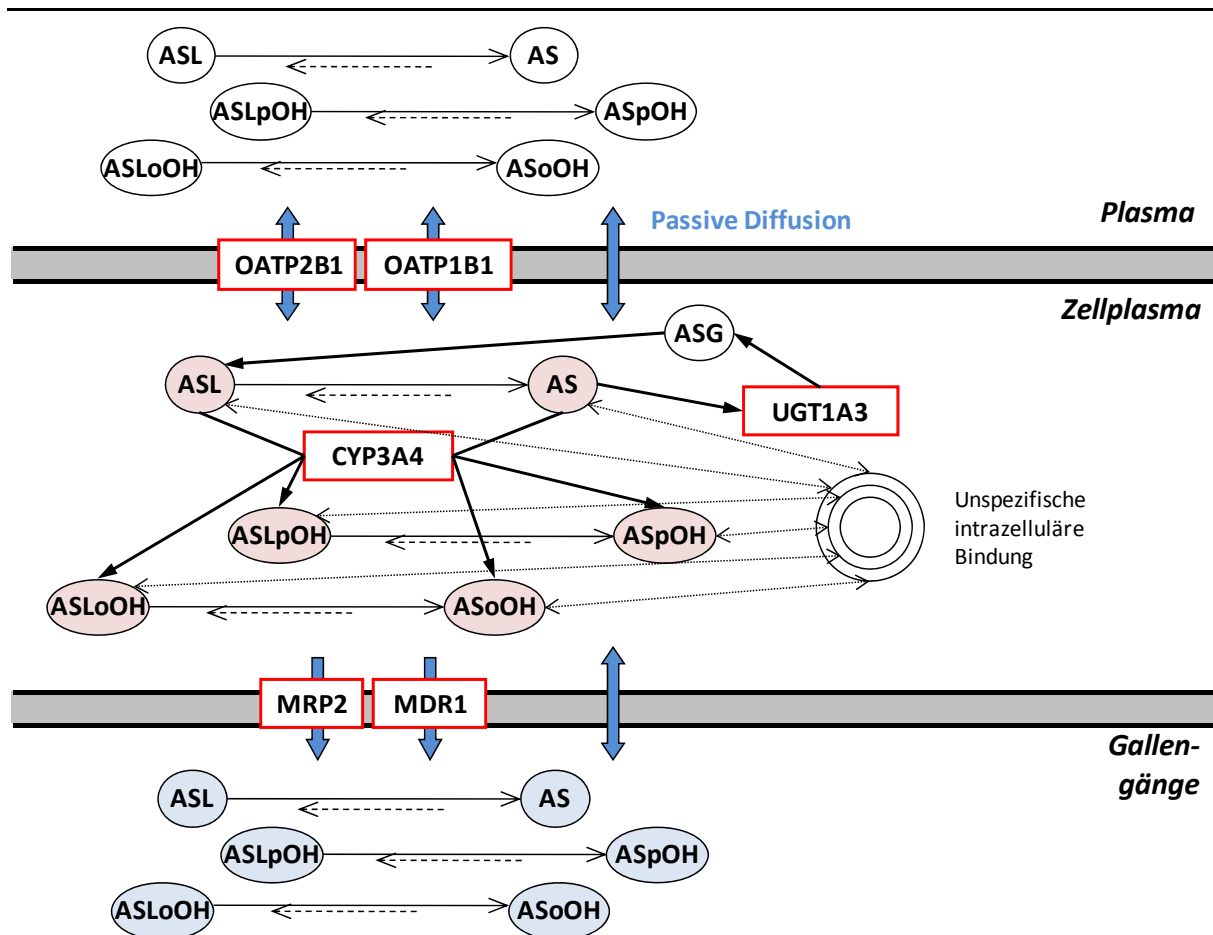
Auf der Grundlage der im Schrifttum vorhandenen Informationen kann das in **Abb. 30** dargestellte Reaktionsnetzwerk des AS-Fremdstoffmetabolismus postuliert werden, das im Folgenden näher erläutert wird. Atorvastatin existiert in zwei Formen, einer relativ hydrophilen Hydroxy-Säure (AS) und einem relativ lipophilen Lakton (ASL). Die Laktonisierung der Säureform AS erfolgt enzymatisch über ein instabiles Zwischenprodukt, und wird von verschiedenen UDP-Glucuronosyl-Transferasen (UGT) katalysiert. Beteiligte UGT Isoenzyme sind UGT1A1 und UGT1A3 [145, 146], jedoch zeigen neueste

Untersuchungen, dass UGT1A3 sehr viel stärker an der AS-Laktonisierung beteiligt ist, und dass UGT1A1 nur eine untergeordnete Rolle einnimmt [85]. Des Weiteren findet eine reversible chemische Umwandlung zwischen AS und ASL statt [147]. Unter physiologischen Bedingungen bei pH 7,4 ist jedoch nur die Hydrolyse der Laktonform ASL ausgeprägt, die chemische Laktonisierung ist unter diesen Bedingungen nicht nachweisbar und kann daher vernachlässigt werden.

AS und ASL werden in humanen Hepatozyten enzymatisch durch CYP3A4 katalysiert [148]. Die Produkte sind die para- und ortho-hydroxy-Metabolite, ASpOH und ASoOH, beziehungsweise ASLpOH und ASLoOH [149, 150]. Andere Untersuchungen zeigen, dass auch CYP2C8 und CYP3A5 AS hydroxylieren können, aber diese spielen eher eine untergeordnete Rolle und können vernachlässigt werden [150-152]. Die Lakton-Metabolite ASLpOH und ASLoOH hydrolysieren wiederum chemisch zu den jeweiligen Säure-Metabolite, ASpOH und ASoOH [150]. Wie die UGT katalysierte Laktonisierung von AS wurde auch die enzymatische Laktonisierung der Hydroxy-Metabolite schon vorgeschlagen [146], jedoch konnte diese enzymatische Umsetzung noch nicht experimentell verifiziert werden. Bisherige Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass die Lakton-Hydrolyse von Statinen auch von verschiedenen Paraoxanase-Enzymen (PON) katalysiert werden kann, und dass PON1 in der Leber exprimiert wird [153-157].

Es gibt zahlreiche Hinweise, die zeigen, dass lipophile Arzneimittel eine große Affinität aufweisen, unspezifisch an Makromoleküle wie Proteine zu binden. Viele Untersuchungen widmeten sich ausführlich der Modellierung dieser unspezifischen Bindung im intrazellulären und extrazellulären Raum, sowie an Oberflächen von Zellen [158-160].

AS wird über verschiedene *organic anion transport polypeptide* (OATP) Transporter vom Plasma in die Zelle aufgenommen und frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass OATP1B1 und OATP2B1 zum AS-Import beitragen [161, 162], welche beide in menschlichen Leberzellen exprimiert werden [16, 163]. OATP1B3 wird auch als beteiligtes Peptid im Arzneimittel-Transport angenommen [162], da es hohe Genexpression-Levels in der Leber aufweist [164], jedoch wurde die Bedeutung für den AS-Transport bisher noch nicht kinetisch nachgewiesen. Außerdem sind auch OATP1B2 und OATP1A4 am Transport von AS beteiligt [165], jedoch wurden diese bisher noch nicht in der menschlichen Leber nachgewiesen.



**Abb. 30:** Strukturelles Schema des Fremdstoffmetabolismus von AS in humanen Hepatozyten.

Gemäß der vorliegenden Untersuchungen wird der OATP-Transport als eine bidirektionale erleichterte Diffusion beschrieben, also unabhängig von ATP, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Protonengradient, aber mit einer möglichen Beteiligung von reduziertem Glutathion [166, 167]. Jedoch haben weitere experimentelle Untersuchungen an Rattenhepatozyten gezeigt, dass die intrazellulären Konzentrationen von Pitavastatin und anderen Komponenten höher sind als außerhalb der Zelle [160, 168, 169]. Dies hat zur Folge, dass der Import-Vorgang eher als aktiv katalysierter Transportschritt statt einer erleichterten Diffusion angesetzt werden sollte.

Bislang ist nicht bekannt, ob diese OATPs auch am Transport der Säuremetabolite, ASpOH und ASoOH beteiligt sind. Es kann aber durchaus angenommen werden, dass diese Metabolite ebenfalls aktiv über diese Proteine in die Zelle importiert werden. Weiter ist nichts über den aktiven Transport der AS-Laktonformen bekannt. Die Annahme scheint aber berechtigt, dass dieselben OATP Transporter für den aktiven Import der Laktone vom Plasma in die Zellen verantwortlich sind.

Der aktive Export von AS und ASL aus der Zelle in die Gallengänge findet wahrscheinlich über ATP-abhängige *multidrug resistance 1* (MDR1)- und *multidrug resistance related protein 2* (MRP2)-Transporter statt [165, 170, 171]. Des weiteren zeigen

Transportuntersuchungen an MDR1 und MRP2, dass Statine inhibitorische Eigenschaften gegenüber anderen Substraten aufweisen [172-174], was auf eine kompetitive Wirkung im Transport an diesen Proteinen hindeutet. Außerdem wird auch berichtet dass die Transporter MRP1, MRP3 und MRP6 als Exporter von organischen Säuren aus den Hepatozyten ins Blut verantwortlich sind [175], über die Beteiligung am Transport von AS ist jedoch nichts bekannt.

Die passive Diffusion von AS durch die Zellmembran spielt wahrscheinlich auch eine Rolle bei dem Übergang von AS aus dem Plasma in die Zelle, beziehungsweise aus der Zelle in die Gallengänge. Da aber die Säureformen von AS relativ hydrophil sind, und die Laktonformen relativ lipophil, kann angenommen werden, dass die passive Diffusion eine größere Bedeutung für die Laktonformen spielt, während aktiver Transport eher für die Säureformen entscheidend ist [17].

### 4.3 Dynamische Modellierung

Das mathematische Modell wird durch ein System von gewöhnlichen Differentialgleichungen, Gleichung (2.2), beschrieben. Das extrazelluläre Volumen  $V_{comp}^m$  entspricht dem Volumen des extrazellulären Mediums. Das intrazelluläre Volumen  $V_{comp}^c$  entspricht dem Gesamtvolumen aller Zellen und berechnet sich aus der bestimmten Zellzahl multipliziert mit dem Volumen einer Hepatozyte, welches mit einem Durchmesser von 30  $\mu\text{M}$  [176] und der Annahme einer Kugelform auf 14,1 pL abgeschätzt werden kann.

Entsprechende Reaktionskinetiken sind für die CYP3A4-Hydroxylierung, die UGT1A3-Laktonisierung, die chemische und enzymatische Lakton-Hydrolyse sowie die intrazelluläre unspezifische Bindung im Modell implementiert.

Frühere Untersuchungen konnten Inhibierungskinetiken der CYP3A4 Hydroxylierung von AS an humanen Mikrosomen nachweisen [151]. Diese zeigt jedoch erst ab 100  $\mu\text{M}$  größere Auswirkungen, also einer sehr hohen Konzentration, die innerhalb der Hepatozyte eher unwahrscheinlich ist. In der Modellbildung wurde weiterhin der Ansatz einer Konkurrenz der alternativen Substrate AS und ASL in der Umwandlung zu alternativen Produkten in der CYP3A4-Kinetik gewählt (Gleichung (2.4)) (Herleitung siehe Anhang A.1). Für die Umsetzung von AS zu ASpOH an CYP3A4 gilt demzufolge:

$$r_{3A4,ASpOH} = \frac{r_{\max,3A4,ASpOH} \frac{c_{AS}}{K_{M,3A4,ASpOH}}}{1 + \frac{c_{AS}}{K_{M,3A4,ASpOH}} + \frac{c_{AS}}{K_{M,3A4,ASoOH}} + \frac{c_{ASL}}{K_{M,3A4,ASLpOH}} + \frac{c_{ASL}}{K_{M,3A4,ASLoOH}}} \quad (4.1)$$

Die Laktonisierung von AS wird enzymatisch durch UGT1A3 katalysiert und ist als Substrat-Inhibierungs-Kinetik implementiert [145],

$$r_{1A3,AS} = \frac{r_{\max,1A3,AS} \cdot c_{AS}}{K_{M,1A3,AS} + c_{AS} + \frac{(c_{AS})^2}{K_{I,1A3,AS}}} \quad (4.2)$$

Die Lakton-Metabolite werden entweder chemisch und enzymatisch über PON zu den jeweiligen Säuremetaboliten hydrolysiert und sind im Modell jeweils als Kinetiken erster Ordnung angesetzt,

$$r_{CR/PON,j} = k_{CR/PON,j} \cdot c_j \quad (4.3)$$

Die unspezifische Bindung der intrazellulären Metabolite an Makromoleküle wird über folgende Kinetik

$$r_j = k_{dis} \left( \left( \frac{1}{fu_j^{in}} - 1 \right) c_j^{in} - c_j^b \right) \quad (4.4)$$

implementiert, mit den Dissoziationskoeffizienten  $k_j^{dis}$  und dem intrazellulären *fraction unbound*

$$fu_j^{in} = \frac{c_{j,eq}^{in}}{c_{j,eq}^{in} + c_{j,eq}^b} \quad (4.5)$$

welcher das Verhältnis zwischen intrazellulär freier Konzentration  $c_j^{in}$  zu der Summe aus intrazellulär freier und gebundener Konzentration,  $c_j^{in}$  und  $c_j^b$ , im Equilibrium beschreibt (Herleitung siehe Anhang A.2). Da die intrazellulär gebundene Konzentration nicht gemessen werden kann, wird der *fraction unbound*,  $fu_j$ , als Parameter gesetzt, der in der Prozedur der Parameteroptimierung geschätzt wird.

Die Transportschritte umfassen sowohl den aktiven Import und Export als auch passive Diffusion der Metabolite. Aktive Transportschritte von AS werden als Michaelis-Menten-Kinetik angesetzt:

$$r_{im/ex,AS} = \frac{r_{\max,im/ex,AS} \cdot c_{AS}}{K_{M,im/ex,AS} + c_{AS}} \quad (4.6)$$

Dagegen wird für den aktiven Transport der restlichen Komponenten jeweils als Kinetik erster Ordnung angenommen:

$$r_{im/ex,j} = k_{im/ex,j} \cdot c_j \quad (4.7)$$

Neben dem aktiven Transport passieren die Metabolite auch durch passive Diffusion die Zellmembran. Die passive Diffusion wird im Modell durch den einfachen Ansatz

$$r_{diff,j} = \frac{D_j}{d} \cdot A_{cells} \cdot (c_j^{ex} - c_j^{in}) = P_j \cdot (c_j^{ex} - c_j^{in}) \quad (4.8)$$

beschrieben [177], bei dem die Diffusion über den Konzentrationsgradienten zwischen Zelläußerem und -innerem,  $(c_j^{ex} - c_j^{in})$ , und über die Zellmembran mit der Dicke  $d$ , durch alle Zellen mit der totalen Oberfläche  $A_{cells}$ , und dem Diffusionskoeffizienten  $D_j$  beschrieben, aber in dieser Modellierung in dem Permeabilitätskoeffizienten  $P_j$  zusammengefasst wird.

### 4.4 Modell-Verifikation

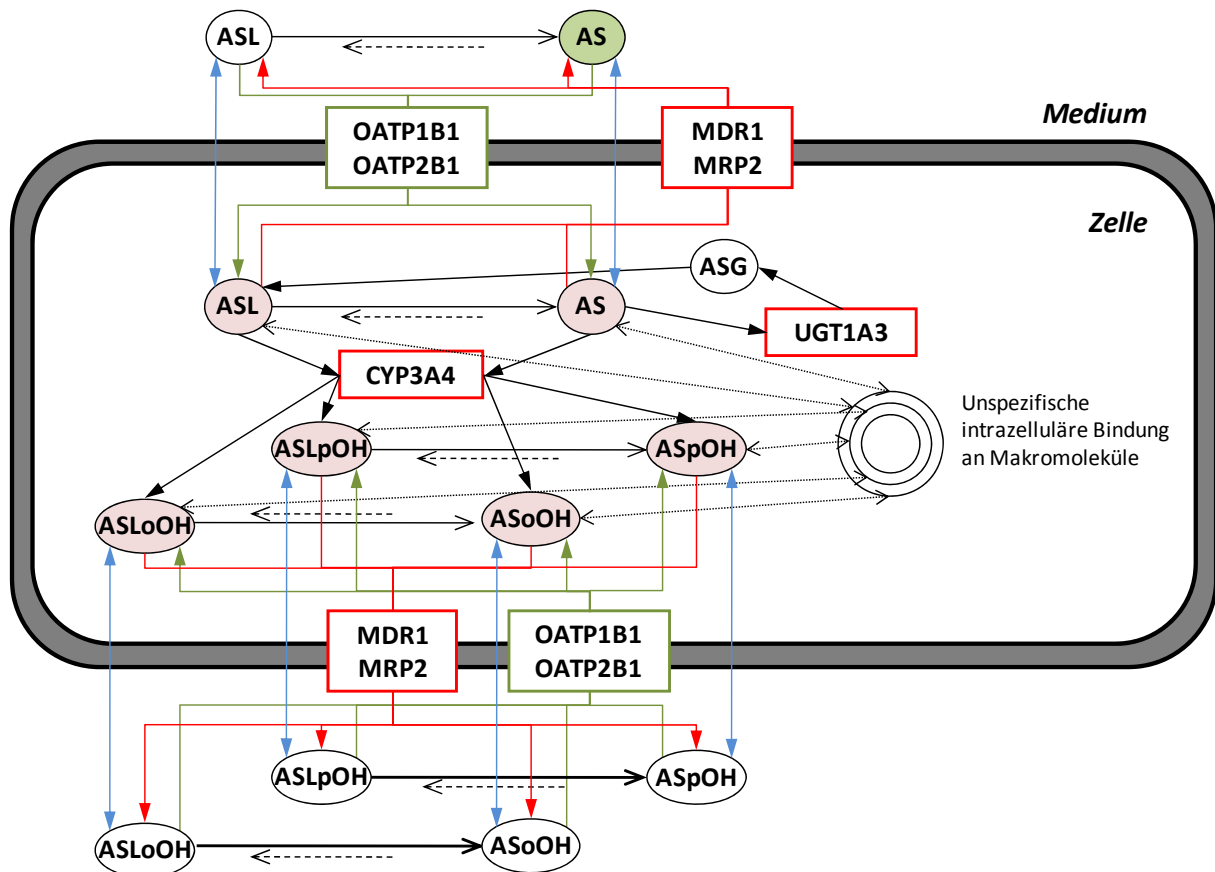
Die Model-Verifikation wird auf Basis quantitativer Messdaten extra- und intrazellulärer AS-Metabolite aus einem Zeitreihen-Stimulus-Response-Experiment durchgeführt. Bei der Analyse wird insbesondere auf die Problematik der Parametersensitivitäten und -korrelationen eingegangen, um im Hinblick auf die Auswertung der inter-individuellen Variabilität qualitativ hochwertige Modellvorhersagen zu ermöglichen.

Die Modell-Verifikation wird dazu zuerst auf Basis von primären Hepatozyten einer Charge von einem einzelnen Individuum durchgeführt, um die Parameteridentifizierbarkeit zu erörtern. In einem zweiten nachfolgenden Schritt wird dann die Modellverifikation auf mehrere Individuen erweitert, um den Sachverhalt der inter-individuellen Variabilität zu untersuchen.

#### 4.4.1 Modellstruktur in primären humanen Hepatozyten

Die Modellstruktur des Fremdstoffmetabolismus von AS in primären humanen Hepatozyten ist in **Abb. 31** dargestellt. AS und ASL und die entsprechenden Metabolite werden aktiv über OATP1B1 und OATP2B1 importiert und über MDR1 und MRP2 exportiert. Des Weiteren diffundieren die Metabolite passiv durch die Zellmembran. In den Hepatozyten werden AS und ASL über CYP3A4-Hydroxylierung zu den entsprechenden Metaboliten, ASpOH und ASoOH, ASLpOH und ASLoOH abgebaut. AS wird außerdem

über UGT1A3 zu ASL umgewandelt. Die Laktone, ASL, ASLpOH und ASLoOH, hydrolysieren entweder chemisch zu den entsprechenden Säuren, AS, ASpOH und ASoOH, außerhalb oder innerhalb der Zelle, oder werden über vermutlich PON in den Hepatozyten enzymatisch hydrolysiert.



**Abb. 31:** Strukturelles Schema des vollständigen Modells des AS-Fremdstoffmetabolismus in primären humanen Hepatozyten. AS (grün) ist das in den experimentellen Untersuchungen eingesetzte Substrat.

Weiter wird die unspezifische Bindung von AS an Makromoleküle wie Proteine innerhalb der Hepatozyten berücksichtigt. Die unspezifische Bindung im Medium wird im Bezug auf das experimentelle Set-up nicht berücksichtigt, da die Kalibrier- und Qualitätsproben der LC-MS-Messung in dem gleichen Medium angesetzt werden, das im experimentellen Versuch verwendet wird. Weiter ergibt sich aus der Messung der totalen Proteinmenge und der Bestimmung des gesamten Zellvolumen eine intrazelluläre Proteinkonzentration von ca. 30 g/l. Dahingegen enthält das Medium als einzige Protein-Komponente Albumin in einer Konzentration von 0.1% (v/v), entsprechend 1 g/l. Folglich kann angenommen werden, dass die intrazelluläre Proteinkonzentration viel größer ist als die im Medium. Deshalb wird die unspezifische Bindung nur innerhalb der Hepatozyten berücksichtigt.

In Bezug auf die experimentelle Untersuchung an isolierten primären humanen Hepatozyten ist es schwer, zwischen Transportern zu unterscheiden, die entweder in die



Gallengänge oder zurück in die Blutgefäße exportieren. Weiter kann die bidirektionale Funktionalität von OATP1B1 und OATP2B1 nicht von dem Export der Transporter MDR1 und MRP2 unterschieden werden. Der Grund liegt darin, dass das experimentelle System der primären Hepatozyten nicht die Kompartimente außerhalb der Leberzelle, wie Blutgefäße und Gallengänge, nachbilden kann, da sich nur das Kulturmedium außerhalb der Zellen befindet. Deshalb werden in diesem Modellierungsansatz nur jeweils ein irreversibler Transportschritt je Export und Import sowie die passive Diffusion je Metabolit berücksichtigt, ähnlich zu anderen mechanistischen Transportstudien [168, 169]. Des Weiteren wird im Model nicht zwischen verschiedenen OATP-Proteinen und nicht zwischen MDR1 und MRP2 unterschieden. Nur für AS werden unterschiedliche Transportschritte für OATP1B1 und OATP2B1 im Model implementiert, da für diese Transporter unterschiedliche Substrat-Affinitäten in früheren Studien identifiziert wurden [161, 162].

### 4.4.2 Zeitreihen-/Stimulus-Response-Messungen an primären humanen Hepatozyten

Die Zeitreihen-Konzentrationswerte der Metabolite bei der Inkubation primärer Hepatozyten des Individuums 1 mit AS, die die dynamische Antwort der Metabolite auf diesen Stimuli durch AS beschreiben, sind in Anhang B **Tab. B.4** zusammengefasst. Zu jedem Zeitpunkt wurde die Wiederfindung berechnet, welche auf der Materialbilanz basiert und als das Verhältnis der Summe der intra- und extrazellulären Metabolite zum jeweiligen Zeitpunkt zur Initialmenge an AS zum Zeitpunkt Null definiert ist. Diese sollte folglich zu jedem Zeitpunkt zu 100% schließen. Die Wiederfindung zum Zeitpunkt 30 min zeigt, dass die Materialbilanz zu ungefähr 100% schließt. Die Wiederfindung nimmt aber von Zeitpunkt zu Zeitpunkt kontinuierlich ab, was auf einen zunehmenden Verlust an Metaboliten schließen lässt. Dies wiederum kann wahrscheinlich mit der angenommenen unspezifischen Bindung erklärt werden, die gleichermaßen wie die Akkumulation der freien Metabolite innerhalb der Hepatozyten zu einer Akkumulation der gebundenen Metabolite führt.

### 4.4.3 Parameterschätzung

Die Parameterschätzung wurde wiederum mit Hilfe des evolutionären Algorithmus *JavaEva* [94] durchgeführt, und die nominalen Parameterwerte der Reaktionen, der Transportschritte und der passiven Diffusion in den Gleichungen (4.1) bis (4.8) entsprechend dem Optimierungskriterium in Gleichung (2.8) geschätzt, welches die Differenz zwischen

experimentell ermitteltem Wert und Modellsimulation zu minimieren hat. In der Optimierungsprozedur wurden bestimmte Parameter, die entweder in früheren Untersuchungen identifiziert oder aus diesen angenommen werden können, fest vorgegeben (**Tab. 14**). Der Affinitätskoeffizienten  $K_M$  der CYP3A4-Hydroxylierung und die Affinitätskoeffizienten  $K_M$  der AS-Transporter, OATP1B1 und OATP2B1 wurden auf  $K_M$ -Werte festgelegt, die jeweils an rekombinanten Enzymen bestimmt wurden [150, 161, 162], und  $K_M$  und  $K_I$  der UGT-Laktonisierung wurden auf Werte festgelegt, welche an humanen Lebermikrosomen identifiziert wurden. Die Reaktionsrate der spontanen Hydrolyse von ASL,  $k_{CR}$ , wurde aus experimentellen Untersuchungen [147] abgeschätzt und auch für die Hydrolyse der Laktonmetabolite, ASLpOH und ASLoOH, angenommen. Der Dissoziationskoeffizient  $k_{dis}$  der unspezifischen Bindung wurde auf einen Wert festgelegt, der in einer früheren Studie über die Modellierung der Proteinbindung [168] Verwendung fand.

**Tab. 14:** Literaturwerte für Parameter im AS-Fremdstoffmetabolismus.

Parameter	Wert	Einheiten	Literatur
$K_{M,3A4,ASpOH}$	25600	pmol/ml	[150]
$K_{M,3A4,ASoOH}$	29700	pmol/ml	[150]
$K_{M,3A4,ASLpOH}$	1400	pmol/ml	[150]
$K_{M,3A4,ASLoOH}$	3900	pmol/ml	[150]
$K_{M,1B1,AS}$	18900	pmol/ml	[162]
$K_{M,2B1,AS}$	200	pmol/ml	[161]
$K_{M,1A3,AS}$	12000	pmol/ml	[145]
$K_{I,1A3,AS}$	75000	pmol/ml	[145]
$k_{CR}$	0,0025	1/min	[147]
$k_{dis}$	600	1/min	[168]

In der Optimierungsprozedur werden die oben aufgelisteten Parameter, die aus der gekennzeichneten Literatur entnommen werden können, fest vorgegeben.

#### 4.4.4 Parametersensitivität und lokale Identifizierbarkeit

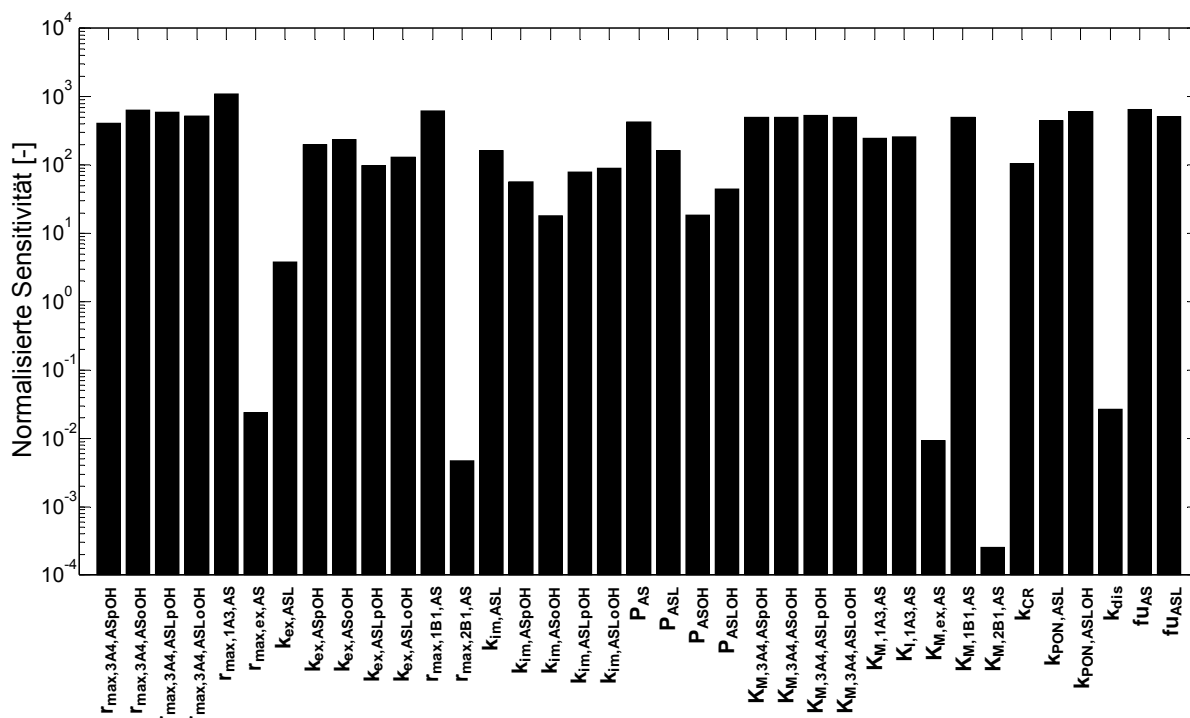
Während das Modell eine präzise Zusammenfassung der Realität beziehungsweise Stand des Wissens darstellt, da jede der angenommenen Reaktionen und Transportschritte auf experimentellen Untersuchungen begründet werden kann, wirft es jedoch zwei fundamentale Probleme in der Parameterschätzung auf: Sensitivität und Korrelationen zwischen Parametern. Beides muss sorgfältig untersucht werden, um gewährleisten zu können, dass die Parameter auf Basis der zugrunde-liegenden Daten angemessen identifiziert werden können, und damit die Glaubwürdigkeit des Modells zu stärken.

Um ein quantitatives Maß für die Parameterqualität zu erhalten, wurden Kriterien, die auf der normalisierten Fisher-Informations-Matrix (**FIM\***) (Gleichung (2.18)) basieren, sowie die

normalisierte Parametersensitivitäten (Gleichung (2.25)) berechnet. Die  $\mathbf{FIM}^*$  präsentiert den Informationsgehalt der zugrundeliegenden experimentellen Daten, und abgeleitete Kriterien, wie die relativen Parameterfehler (Gleichung (2.21)), die Parameter-Korrelationsmatrix (Gleichung (2.22)), die reziproke Konditionszahl (Gleichung (2.23)) und die Top-Down-Klassifikation [105], beschreiben die lokale Identifizierbarkeit der Parameter.

Die normalisierten Parametersensitivitäten in Gleichung (2.25) und  $\mathbf{FIM}$ -Parametersensitivitäten in Gleichung (2.16) wurden mit einem Differenzenquotienten in Gleichung (2.26) mit einem geringen Störfaktor  $\Delta p_l$  jedes Parameters  $p_l$  von 0,1% angenähert. Die normalisierten Parametersensitivitäten (**Abb. 32**) zeigen, dass der maximale Ratenkoeffizient  $r_{max,1A3,AS}$  der UGT1A3-Laktonisierung mit einer normalisierten Sensitivität von 1090,0 den höchsten Einfluss auf den Fremdstoffmetabolismus hat, während der Affinitätsparameter des OATP2B1-Imports,  $K_{M,ex,AS}$ , mit einer normalisierten Sensitivität von  $2,6e-4$  den niedrigsten Einfluss auf den Fremdstoffmetabolismus hat. Insgesamt haben fünf Parameter,  $r_{max,ex,AS}$ ,  $r_{max,2B1,AS}$ ,  $K_{M,ex,AS}$ ,  $K_{M,2B1,AS}$  und  $k_{dis}$ , eine sehr geringe lokale Sensitivität. Die anderen Parameter haben einen vergleichsweise hohen Einfluss auf den Fremdstoffmetabolismus. Die Sensitivitäten der einzelnen Parameter genauer betrachtet, haben jedoch die Parameter der CYP3A4-Hydroxylierung und der UGT1A3-Laktonisierung höhere normalisierte Sensitivitäten, im Durchschnitt 525, im Vergleich zu den Parametern des aktiven Transport und der passiven Diffusion, im Durchschnitt 142.

Die Berechnung der  $\mathbf{FIM}^*$  resultiert in einer positiv-definiten Matrix, deshalb kann sie als informativ charakterisiert werden [101]. In der Top-Down-Klassifikation (siehe **Abschnitt 2.4.4.2**), wird als Grenzwert des Schätzfehlers 10% festgelegt und dementsprechend konnten 15 von 37 Parametern als identifizierbar charakterisiert werden. Diese Zahl ist sehr klein, was zeigt, dass das vorliegende Detoxifikation-Netzwerk kaum identifizierbar ist. Die reziproke Konditionszahl der  $\mathbf{FIM}^*$  (Gleichung (2.23)) beträgt  $6,6e-17$  und ist geringer als die relative Gleitkomma-Genauigkeit ( $2,2e-16$ ). Damit kennzeichnet die reziproke Konditionszahl eine sehr schlecht skalierte  $\mathbf{FIM}^*$ . Das wiederum weist auf nicht-identifizierbare Parameter in der  $\mathbf{FIM}^*$  hin, und führt sehr wahrscheinlich zu schwerwiegenden Rundungsfehlern in der Kovarianzmatrix, der Inversen der  $\mathbf{FIM}^*$ . Deshalb sollten die Schätzungen der relativen Parameterfehler und die Identifikation der Parameterkorrelationen nur mit Vorsicht interpretiert werden.

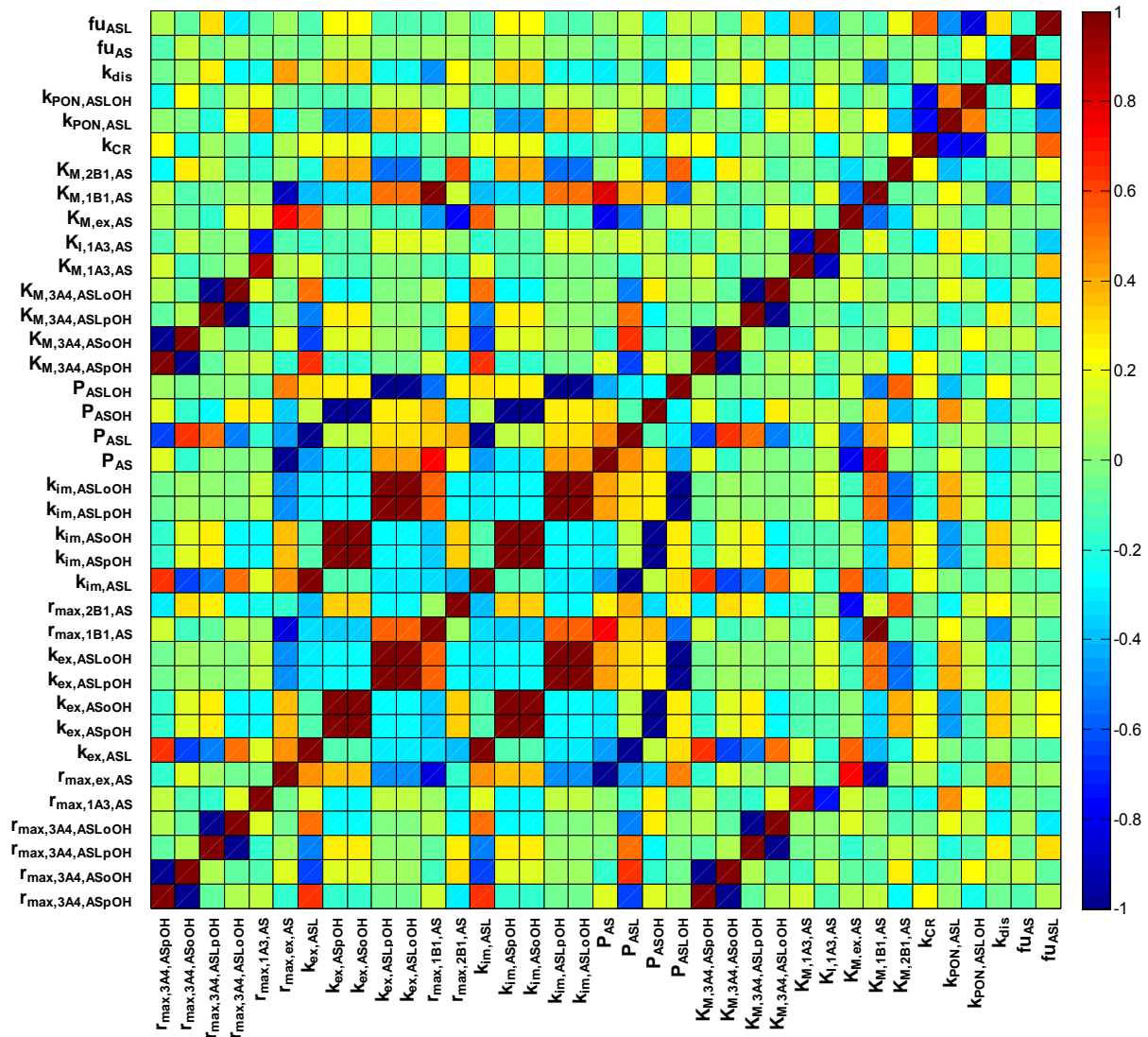


**Abb. 32:** Normalisierte Parametersensitivitäten des vollständigen Modells des AS Fremdstoffmetabolismus. Die dargestellten normalisierten Parametersensitivitäten beinhalten sowohl die in der Optimierung geschätzten als auch vorgegebenen Parameter. Hohe Werte kennzeichnen eine hohe Sensitivität des entsprechenden Parameters, und niedrige Werte kennzeichnen, dass der entsprechende Parameter nicht sensitiv ist.

Die Korrelationsmatrix (Gleichung (2.22)) (**Abb. 33**), welche die Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen Parametern enthält, zeigt auf, dass 50 Parameter jeweils einen Korrelationskoeffizienten größer als absolut 0,7 aufweisen und damit stark korrelieren. Des Weiteren sind 36 Korrelationskoeffizienten sogar größer als absolut 0,99 und verdeutlichen damit, dass schwerwiegende Identifikationsprobleme vorliegen.

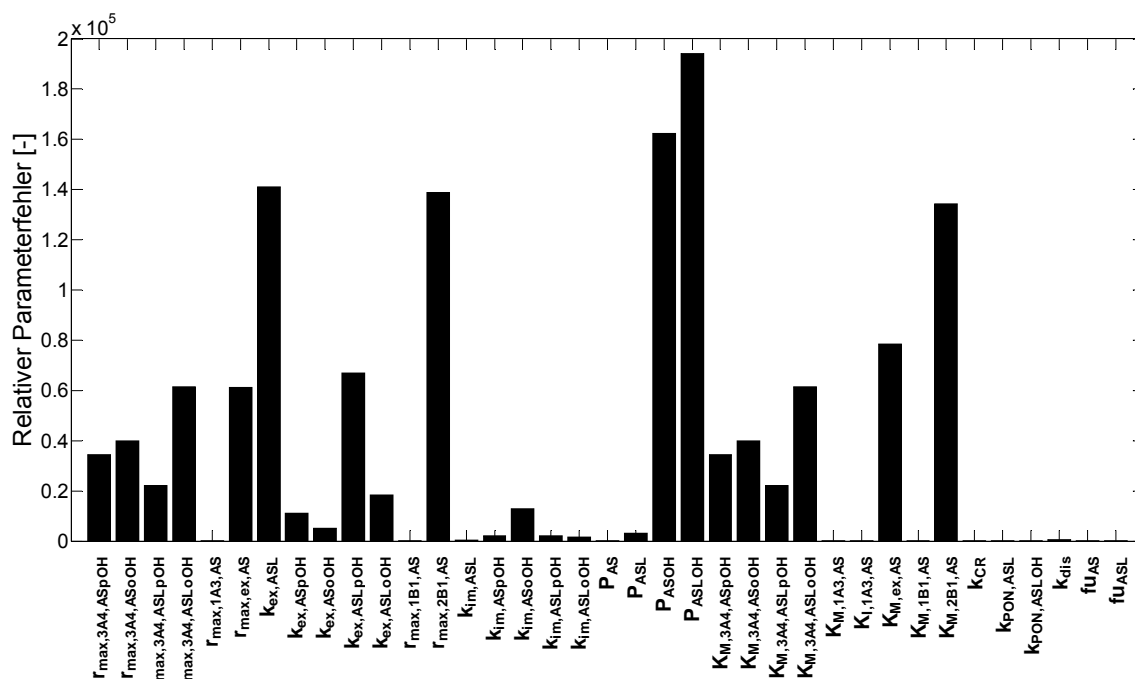
Die relativen Parameterfehler werden an der Inversen der  $\mathbf{FIM}^*$  nach Gleichung (2.21) abgeschätzt. In diesem Fall des vollständigen Modells ergeben sich enorm hohe Parameterfehler, im Durchschnitt 3648700% über alle Parameter mit einer Bandbreite von minimal 5% bis maximal 1,94e7% (**Abb. 34**). Nur 5 der 37 Parameter haben einen relativen Parameterfehler unter 100%.

Die zusammenfassende Bewertung der Ergebnisse der Identifizierbarkeitsanalyse führt zu dem Schluss, dass das gewählte Modell im Bereich der experimentellen gegebenen Konzentrationen wegen massiven Problemen bezüglich Parametersensitivitäten und -korrelationen nicht identifiziert werden kann.



**Abb. 33:** Korrelationsmatrix der Parameter des vollständigen Modells des AS Fremdstoffmetabolismus. Die Korrelationsmatrix ist als Pseudo-Farben-Plot der Parameter des vollständigen Modells gegen die Parameter selbst dargestellt, und beinhaltet die einzelnen Korrelationskoeffizienten zwischen jeweils zwei Parametern. Dunkelblaue und dunkelrote Farben kennzeichnen jeweils Parameter mit hohen negativen und positiven linearen Abhängigkeiten.

Die bisherige Identifizierbarkeitsanalyse hat jedoch alle Parameter berücksichtigt, die in der Optimierung entweder geschätzt oder fest vorgegeben wurden. Die in der Optimierung fest vorgegebenen Parameter sollten aber als a priori identifiziert charakterisiert und nicht in der Identifizierbarkeitsanalyse berücksichtigt werden. Werden die oben beschriebenen Schritte wiederholt und die fest vorgegebenen Parameter nicht berücksichtigt, so ist die **FIM\*** immer noch schlecht skaliert mit einer reziproken Konditionszahl von  $3,08e-16$ . Die Korrelationsmatrix enthält 23 Koeffizienten mit Werten größer als 0,99. Die relativen Parameterfehler betragen im Durchschnitt 1839600%, der niedrigste Wert beträgt 3% und der höchste Wert  $1,2e7\%$ , und nur 11 von 27 Parametern haben Werte unter 100%.

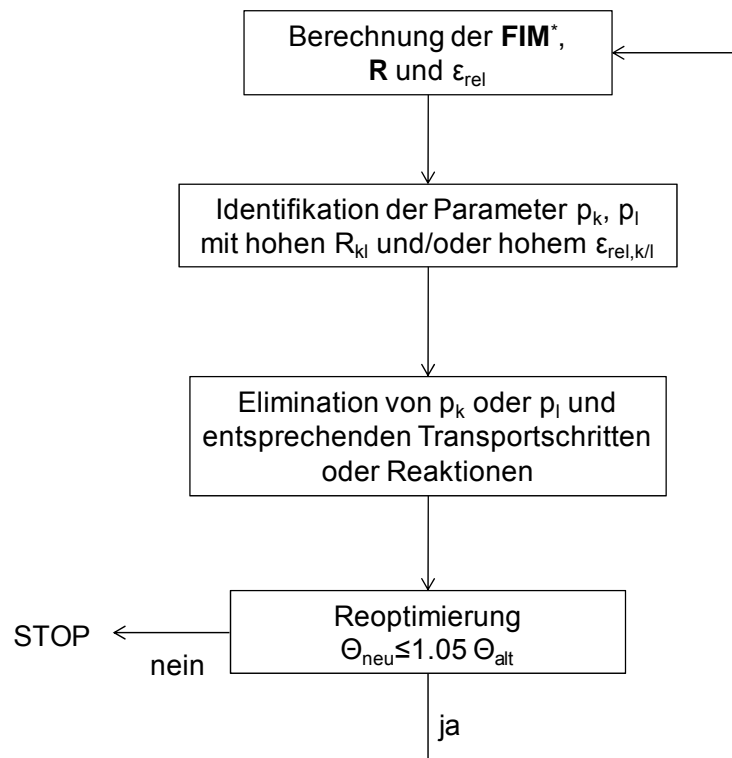


**Abb. 34:** Relative Parameterfehler des vollständigen Modells des AS Fremdstoffmetabolismus. Die relativen Parameterfehler wurden auf Basis der  $FIM^*$  des vollständigen Modells des AS Fremdstoffmetabolismus ermittelt, und beinhaltet Parameter, welche in der Optimierung geschätzt und fest vorgegeben wurden. Hohe Werte kennzeichnen nicht-identifizierbare Parameter.

#### 4.4.5 Modellreduktion

Das oben beschriebene Problem der Identifizierbarkeit wirft die Frage auf, ob die Identifizierbarkeit durch eine drastische Modellreduktion verbessert werden kann. Als erstes werden Parameter mit sehr niedrigen normalisierten Sensitivitäten und zugehörige Transportschritte aus dem Modell entfernt. Das bedeutet, dass der Export und der OATP2B1-Import von AS aus dem Modell eliminiert werden. Als zweites werden in einer iterativen Prozedur der Modellreduktion (**Abb. 35**) die Parameter mit hohen relative Parameterfehlern und Korrelationen und entsprechende Transport- oder Reaktionsschritte aus dem Modell eliminiert, eine neue Optimierung wird durchgeführt und die neuen relativen Parameterfehler und Korrelationsmatrix werden auf Basis der  $FIM^*$  geschätzt.

In dieser Prozedur konnten die Permeabilitätskoeffizienten  $P_{ASLOH}$  und  $P_{ASOH}$ , der Koeffizient des aktiven Exports von ASL,  $k_{ex,ASL}$ , und der Koeffizient des aktiven Imports von ASoOH,  $k_{im,ASoOH}$ , im Modell eliminiert werden. Weitere Modellreduktionsvarianten, wie zum Beispiel die Elimination des aktiven Imports von ASL führten zu einer Verschlechterung des Funktionswerts des Optimierungskriteriums und einer nicht mehr zufriedenstellenden Anpassung in der Optimierung. Das auf diese Weise erzielte reduzierte Modell ist in **Abb. 36** dargestellt.



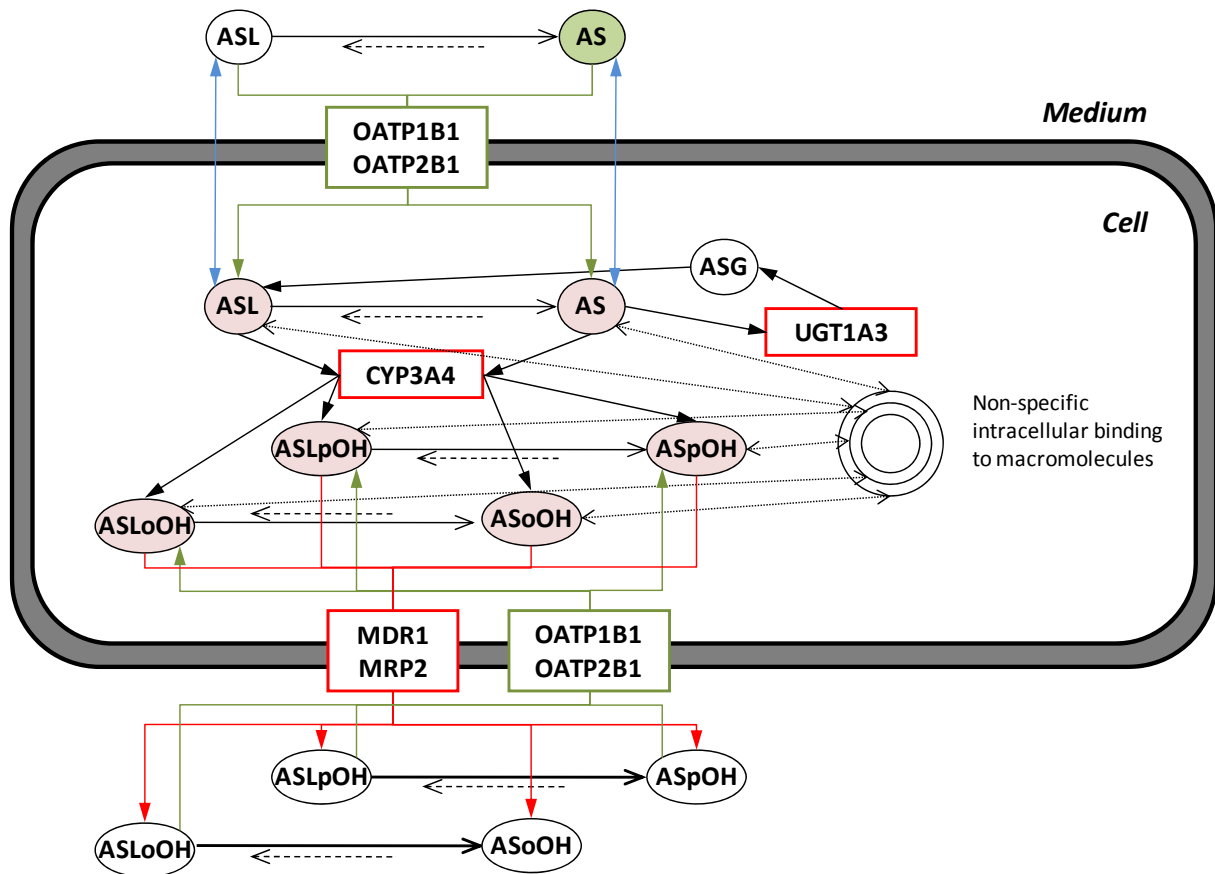
**Abb. 35:** Prozedur der Modellreduktion anhand der relativen Parameterfehler und -korrelationen in der  $\mathbf{FIM}^*$ -basierten lokalen Identifizierbarkeitsanalyse. Auf Basis der  $\mathbf{FIM}^*$  werden iterativ die Parameter identifiziert, die hohe relative Parameterfehler und hohe Korrelationen aufweisen. Dann werden einzelne Parameter und entsprechende Transport- oder Reaktionsschritte eliminiert. Die Elimination wird in einer erneuten Optimierung überprüft. Weicht der neue Funktionswert der Optimierung (Gleichung (2.8)) unter einem bestimmten Grenzwert von dem vorherigen Funktionswert ab, dann ist die Elimination gerechtfertigt, und ein neuer Modellreduktionzyklus beginnt.

Insgesamt wurden in der lokalen Sensitivitätsanalyse sieben Parameter,  $r_{max,ex,AS}$ ,  $r_{max,2B1,AS}$ ,  $K_{M,ex,AS}$ ,  $K_{M,2B1,AS}$ ,  $P_{ASLOH}$ ,  $P_{ASOH}$ ,  $k_{ex,ASL}$ , und  $k_{im,ASoOH}$ , und die entsprechenden Transportschritte eliminiert. Das reduzierte Modell des Fremdstoffmetabolismus von AS in primären humane Hepatozyten enthält 15 identifizierbare Parameter von 20 Parametern in der Top-Down-Klassifikation der  $\mathbf{FIM}^*$ , welche eine reziproke Konditionszahl von  $2,84e-05$  aufweist. Damit konnte die Konditionszahl der  $\mathbf{FIM}^*$  um einen Faktor größer als  $10e10$  verbessert werden, was zeigt, dass die  $\mathbf{FIM}^*$  des reduzierten Modells viel besser skaliert ist, als die  $\mathbf{FIM}^*$  des vollständigen Modells.

Die Korrelationsmatrix des reduzierten Modells (**Abb. 37**) zeigt jedoch, dass immer noch 27 Korrelationskoeffizienten größer als absolut 0,7 sind, was wahrscheinlich auf die verbleibenden parallelen Transportschritte, Import und Export, und auch auf den Parallelweg der CYP3A4-Hydroxylierung von AS und ASL, der UGT1A3-Laktonisierung von AS zu ASL und die Hydrolyse der Lakton-Metabolite zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zum vollständigen Modell konnten die relativen Parameterfehler des reduzierten Modells (**Abb. 38**) durch die oben beschriebene Modellreduktion stark verbessert

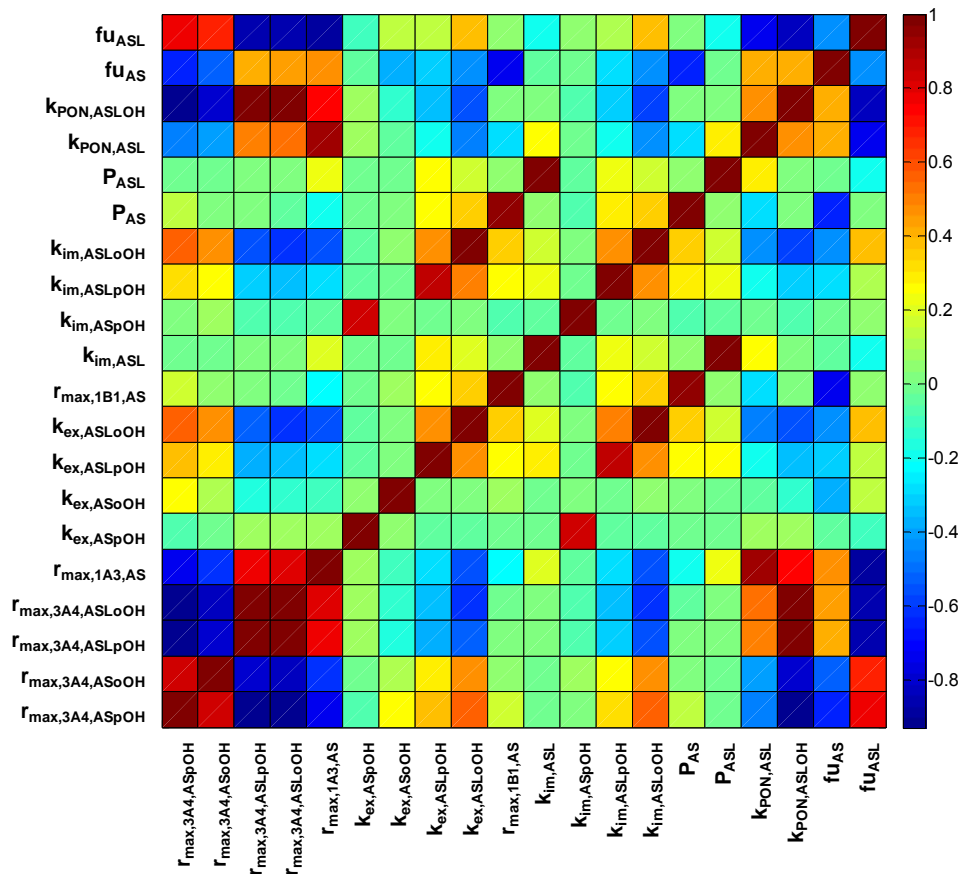
werden. Der maximale relative Parameterfehler beträgt 35% für den Parameter  $k_{im,ASL}$ , dem Ratenkoeffizienten des ASL-Imports, und der minimale beträgt 2% für den Parameter  $k_{ex,ASoOH}$ , dem Ratenkoeffizienten des ASoOH-Exports.



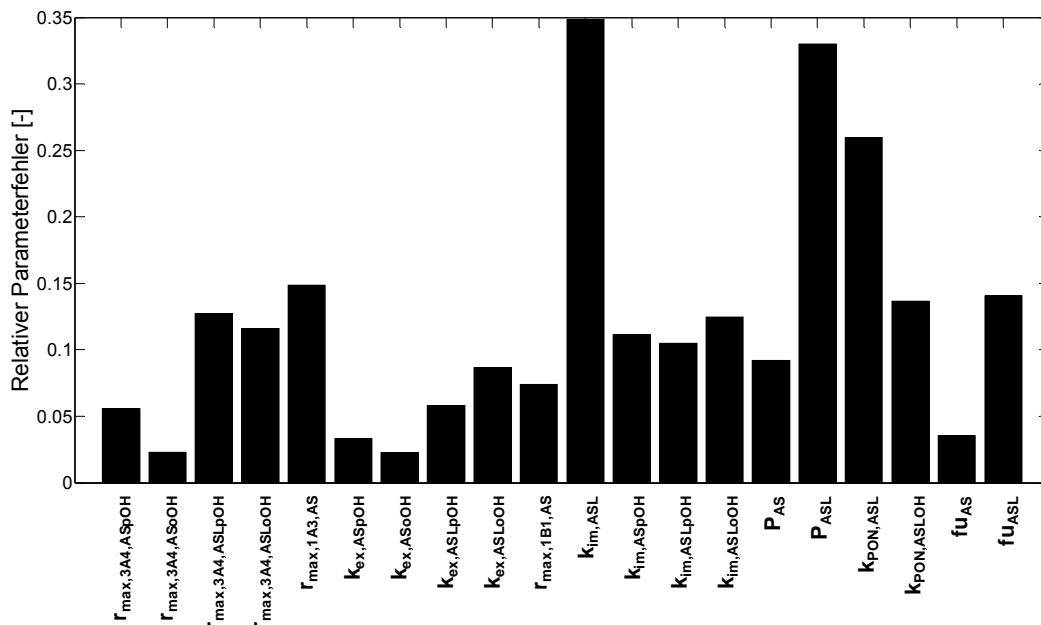
**Abb. 36:** Struktur des reduzierten Modells des AS-Fremdstoffmetabolismus in primären humanen Hepatozyten. Das Schema präsentiert das finale Modell nach dem Prozess der Modellreduktion des vollständigen Modells (**Abb. 31**). Die Parameter  $r_{max,ex,AS}$ ,  $r_{max,2B1,AS}$ ,  $K_{M,ex,AS}$ ,  $K_{M,2B1,AS}$ ,  $P_{ASLoH}$ ,  $P_{ASoH}$ ,  $k_{ex,ASL}$ , und  $k_{im,ASoOH}$  und die entsprechenden Transportschritte, der aktive Export von AS, der OATP2B1-Import von AS, die passive Diffusion der Säure- und Laktonmetabolite, der Export von AS und der Import von ASoOH, wurden aus dem vollständigen Modell eliminiert, was in dem finalen Modell resultiert.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass die beschriebene Modellreduktion eine drastische Verbesserung in der lokalen Identifizierbarkeit der verbleibenden Parameter des reduzierten Modells bewirkt, was sich in einer Verbesserung der Konditionszahl der **FIM\***, der relativen Parameterfehler und der Parameterkorrelationen ausdrückt. Wichtig für die dynamische Simulationen ist weiterhin, dass in der Top-Down-Klassifikation die Maximalraten-Koeffizienten der CYP3A4-Hydroxylierung von AS und ASL und der UGT1A3 katalysierten Laktonisierung von AS zu ASL als identifizierbar charakterisiert werden kann. Die verifizierten Parameter nach der Prozedur der Modellreduktion sind in **Tab. 15** zusammengefasst mit nominalem Wert und relativem Parameterfehler aus der FIM-basierten Identifizierbarkeitsanalyse.





**Abb. 37:** Korrelationsmatrix des finalen Modells des AS-Fremdstoffmetabolismus. Die Korrelationsmatrix ist als Pseudo-Farben-Plot der Parameter des finalen Modells gegen die Parameter selbst dargestellt, und beinhaltet die einzelnen Korrelationskoeffizienten zwischen jeweils zwei Parametern. Dunkelblaue und dunkelrote Farben kennzeichnen jeweils Parameter mit hohen negativen und positiven linearen Abhängigkeiten.



**Abb. 38:** Relative Parameterfehler des reduzierten Modells des AS-Fremdstoffmetabolismus. Die relativen Parameterfehler wurden auf Basis der **FIM\*** des reduzierten Modells ermittelt. Je niedriger der Parameterfehler ist, desto genauer konnte der entsprechende Parameter in der Optimierung geschätzt werden.

**Tab. 15:** Verifizierte Parameter des reduzierten Modells des Fremdstoffmetabolismus von AS in primären humanen Hepatozyten des Individuums 1.

Parameter	Wert	Rel. Fehler [%]	Einheit
$r_{\max,3A4,ASpOH}$	1108	5,5	$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$
$r_{\max,3A4,ASoOH}$	3345	2,3	$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$
$r_{\max,3A4,ASLpOH}$	1228	12,7	$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$
$r_{\max,3A4,ASLoOH}$	2755	11,6	$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$
$r_{\max,1A3,AS}$	956	14,8	$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$
$k_{\text{ex},ASpOH}$	0,81	3,3	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$k_{\text{ex},ASoOH}$	1,63	2,2	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$k_{\text{ex},ASLpOH}$	0,85	5,8	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$k_{\text{ex},ASLoOH}$	2,5	8,6	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$r_{\max,1B1,AS}$	461	7,4	$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$
$k_{\text{im},ASL}$	109	34,8	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$k_{\text{im},ASpOH}$	4,1	11,1	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$k_{\text{im},ASLpOH}$	21,4	10,4	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$k_{\text{im},ASLoOH}$	12,3	12,4	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$P_{AS}$	2,4	9,1	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$P_{ASL}$	9,7	33,0	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$k_{\text{PON},ASL}$	308	25,9	$\cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$
$k_{\text{PON},ASLoH}$	280	13,6	$\cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$
$f_{U_{AS}}$	0,22	3,5	-
$f_{U_{ASL}}$	0,22	14,0	-

Parameter sind aufgelistet mit nominalen Werten aus der Optimierung und relativen Parameterfehlern aus der FIM-basierten Identifikationsanalyse des finalen Modells in den angegebenen Einheiten.

#### 4.4.6 Analyse der Konzentrations-Zeitprofile

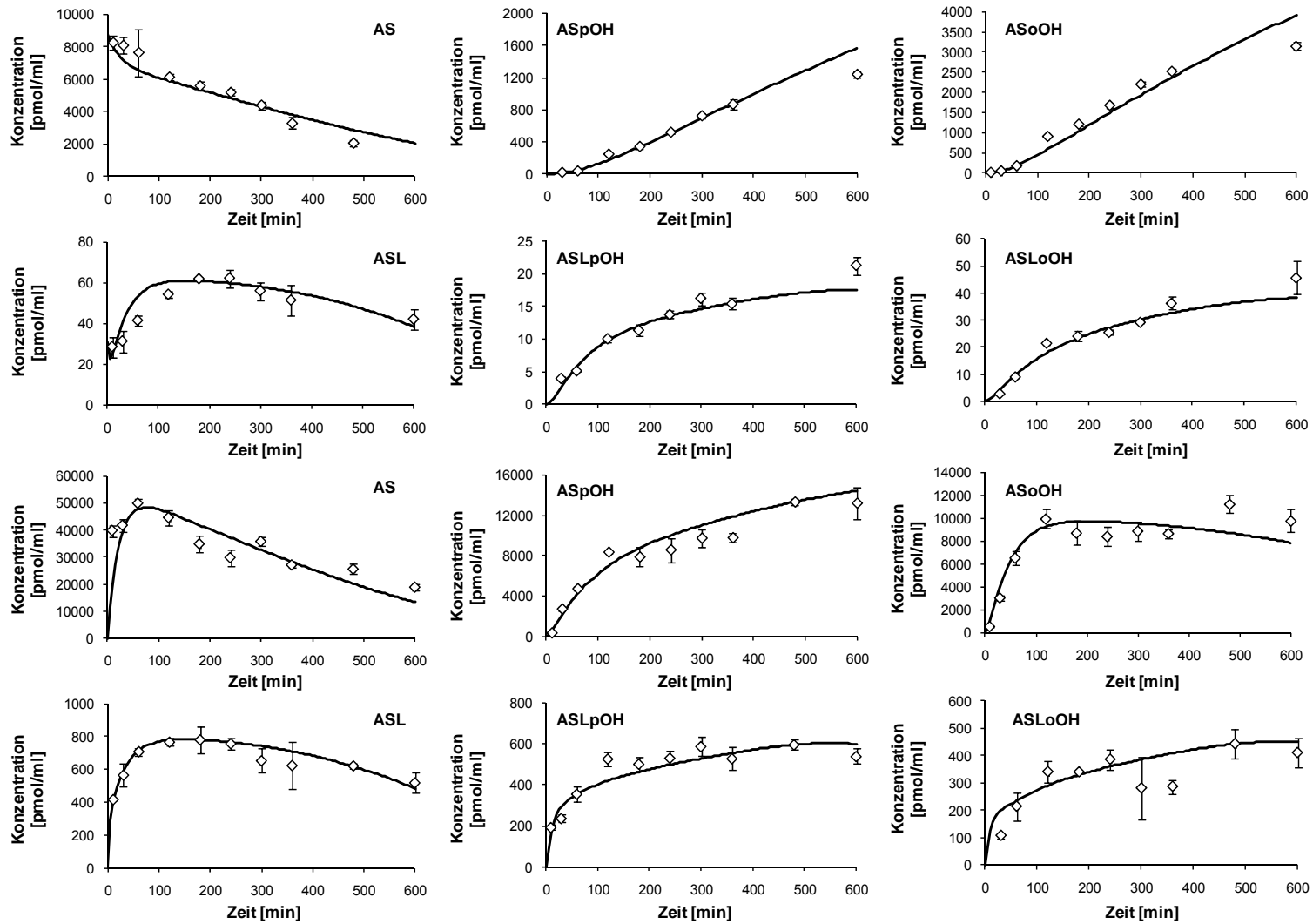
Die simulierten Konzentrations-Zeitprofile, die auf dem finalen aus der Modellreduktion erhaltenem Modell und den verifizierten Modellparametern basieren, sind zusammen mit den experimentellen Konzentrationen (Anhang B **Tab.4**). in **Abb. 39** und **Abb. 40** dargestellt. Im Folgenden werden die Integralfläche unter dem Konzentrationsprofil (*Area under the curve*, *AUC*) und die Maximalkonzentration  $c_{\max}$  (siehe **Abschnitt 2.4.6**) in dem Zeitbereich von 0 bis 600 min komponentenweise analysiert.

Sowohl AS als auch ASL werden durch CYP3A4-Hydroxylierung zu den entsprechenden para- und ortho-hydroxy-Metabolite, ASpOH und ASoOH, ASLpOH und ASLoOH, abgebaut. Die Säuremetabolite, ASpOH und ASoOH zeigen jedoch höhere intrazelluläre Konzentrationen als die Laktonmetabolite, ASLpOH und ASLoOH. Das  $AUC_{0-600\text{min}}$ -Verhältnis von intrazellulärer Säureform zu Laktonform beträgt 20 im Fall der para-hydroxy-Metabolite, ASpOH und ASLpOH, und 24 im Fall der ortho-hydroxy-Metabolite, ASoOH und ASLoOH. Gleichmaßen sind auch die extrazellulären Konzentrationen der Säuremetabolite größer als die der Laktonmetabolite. Das  $AUC_{0-600\text{min}}$ -Verhältnis von

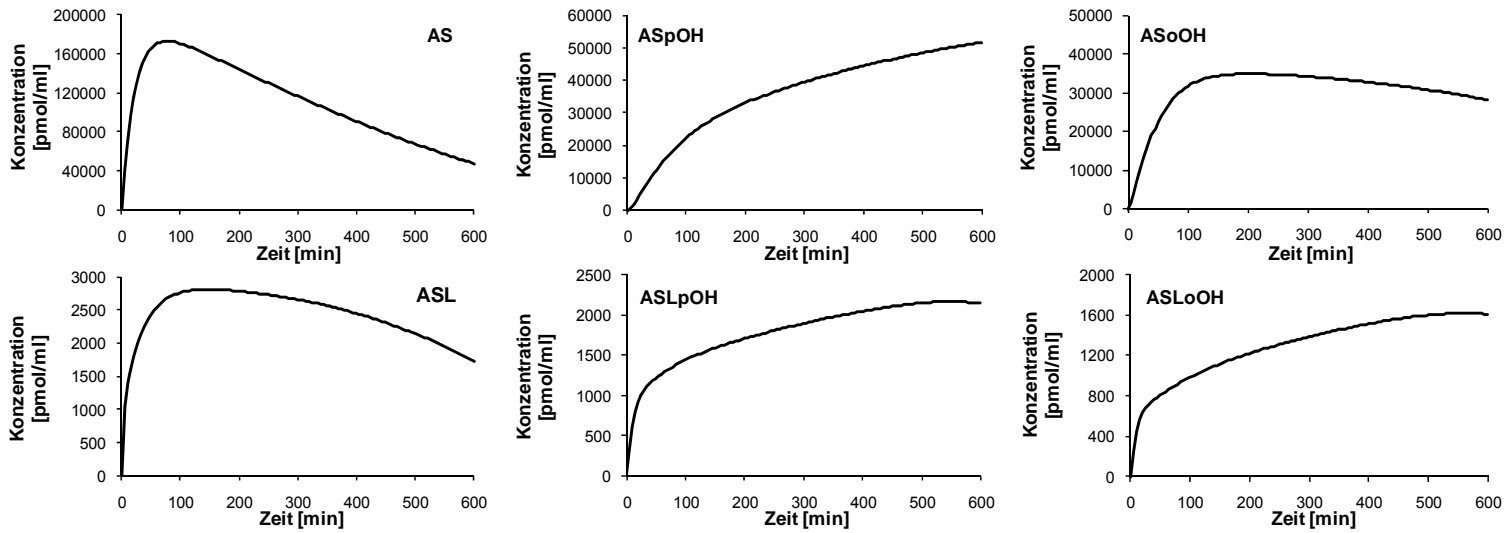
extrazellulärer Säureform zu Laktonform beträgt 54 im Fall der para-hydroxy-Metabolite, ASpOH und ASLpOH, und 71 im Fall der ortho-hydroxy-Metabolite, ASoOH und ASLoOH.

Weiterhin zeigen die Profile, dass die Metabolite eine höhere Konzentration im intrazellulären Raum haben, als außerhalb der Zelle. Das Verhältnis von intrazellulärer  $AUC_{0-600min}$  zu extrazellulärer  $AUC_{0-600min}$  beträgt minimal 4,5 im Fall ASoOH und maximal 38 im Fall von ASLpOH. Gleichmaßen beträgt das Verhältnis zwischen intrazellulärem  $c_{max}$  zu extrazellulärem  $c_{max}$  minimal 2,5 bei ASoOH und maximal 35 bei ASLpOH.

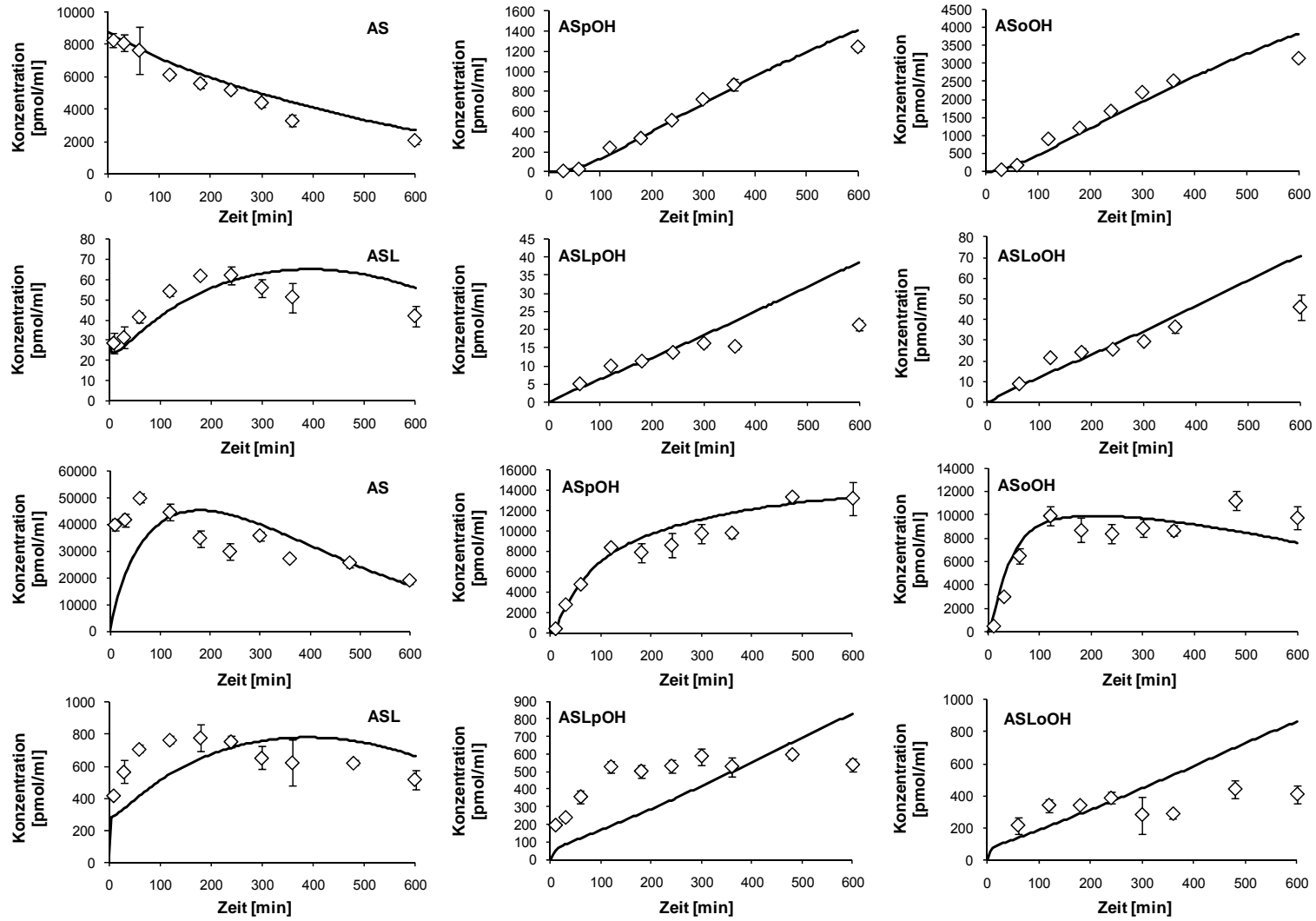
Dass die enzymatische Hydrolysierung der Laktonformen (PON) von Bedeutung ist, wird deutlich, wenn die Optimierung an einer Modellvariante durchgeführt wird, die nur die chemische aber nicht die enzymatischen Hydrolyse-Reaktionen enthält. Der Vergleich der simulierten Konzentrationsprofile mit den gemessenen Konzentrationswerten (**Abb. 41**) zeigt, dass intrazelluläres AS, ASL, ASLpOH und ASLoOH relativ schlecht durch das Modell abgebildet werden können. Daraus folgt, dass die enzymatische Lakton-Hydrolyse einen größeren Einfluss als die chemische hat, und für den AS-Fremdstoffmetabolismus vermutlich eine wichtige Rolle spielt. Dieser Sachverhalt ist als Hinweis darauf zu werten, dass trotz der nach wie vor vorhandenen Parameterkorrelationen im reduzierten Modell deutliche Aussagen bezüglich der Struktur des Modells möglich sind.



**Abb. 39:** Modellverifikation an primären Hepatozyten, Individuum 1. Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen (Raute) und die Modellsimulationen (Linie) der AS-Komponenten im Medium (obere zwei Reihen) und in den primären Hepatozyten (untere zwei Reihen). Erste und dritte Reihe: AS, ASpOH und ASoOH. Zweite und vierte Reihe: ASL, ASLpOH und ASLoOH.



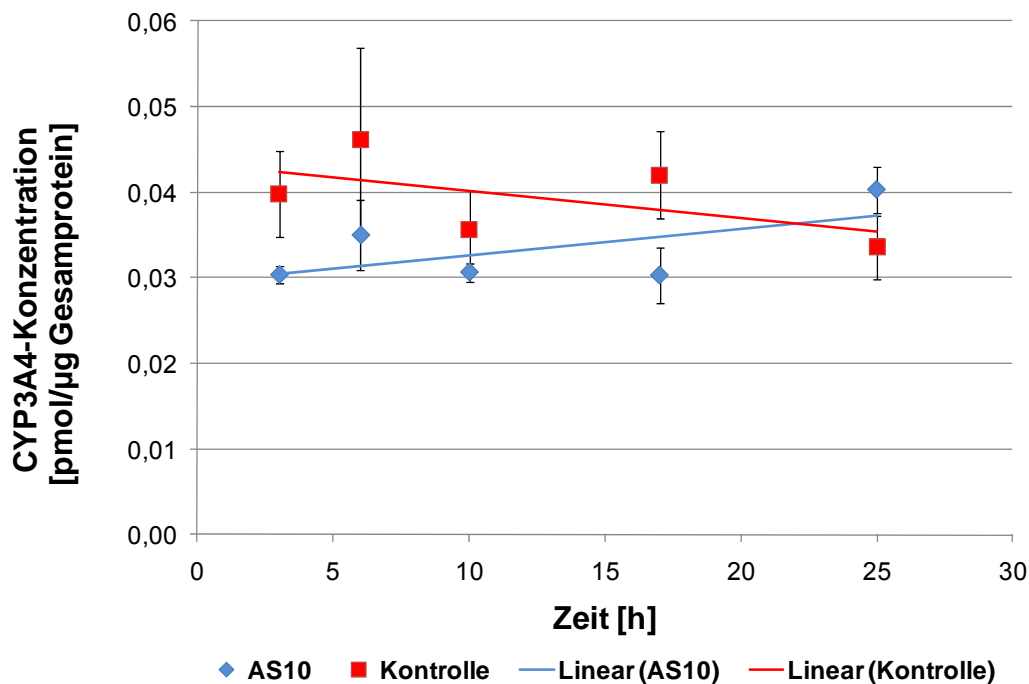
**Abb. 40:** Modellverifikation an primären Hepatozyten, Individuum 1. Dargestellt sind die Modellsimulationen (Linie) der gebundenen Säure-Komponenten AS, ASpOH und ASoOH (obere Reihe) und der gebundenen Laktone-Komponenten ASL, ASLpOH und ASLoOH (untere Reihe). Die Simulationsprofile ergeben sich auf Basis der Bindungsrate (Gleichung (4.4)) aus der numerischen Integration der Differentialgleichungen der gebundenen Metabolite.



**Abb. 41:** Verifikation eines Modells ohne enzymatische Laktone-Hydrolyse, Individuum 1. Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen (Raute) und die Modellsimulationen (Linie) der AS-Komponenten im Medium (obere zwei Reihen) und in den primären Hepatozyten (untere zwei Reihen). Erste und dritte Reihe: AS, ASpOH und ASoOH. Zweite und vierte Reihe: ASL, ASLpOH und ASLoOH.

#### 4.4.7 Zeitreihen-/Stimulus-Response-Messungen an primären humanen Hepatozyten: Untersuchung der Proteinkonzentration von CYP3A4

Die bisher beschriebene Modellverifikation geht von einer konstanten Enzymkonzentration von CYP3A4 in dem Zeitraum der experimentellen Untersuchung aus. Jedoch geht aus bisherigen Studien hervor, dass Statine die CYP3A- beziehungsweise CYP3A4-Expression induzieren [178-181]. Deshalb wurde an primären humanen Hepatozyten ein Stimulus-Response-Experiment mit 10  $\mu\text{M}$  AS mit Quantifizierung der CYP3A4-Proteinkonzentration (siehe **Abschnitt 2.2.1**) an definierten Zeitpunkten durchgeführt, um die Auswirkungen der AS-Induktion auf den CYP3A4-Enzymlevel abschätzen zu können. Dazu wurde die Inkubation mit AS auch mit einer Kontrolle ohne AS verglichen (**Abb. 42**).



**Abb. 42:** CYP3A4-Proteinkonzentration in einem Stimulus-Response-Versuch. Dargestellt sind die CYP3A4-Konzentrationen in primären humanen Hepatozyten über der Zeit nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  AS (blaue Raute) und Kontrolle ohne Inkubation mit AS (rote Rechtecke), sowie die Trendlinien für die AS-Inkubation (blaue Linie) und die Kontrolle (rote Linie). Die Kontrollprobe zum Zeitpunkt Null konnte nicht ausgewertet werden.

Die CYP3A4-Proteinkonzentrationen der Inkubation mit AS zeigen im Trend eine geringe Zunahme über der Zeit zwischen 3 h und 25 h, während die CYP3A4-Proteinkonzentrationen der Kontrolle im Trend eine geringe Abnahme über der Zeit aufweisen. Aus diesen Daten lässt sich eine Zunahme der CYP3A4-Proteinkonzentration nach Inkubation mit AS von 24% und eine Abnahme der CYP3A4-Proteinkonzentration in der Kontrolle von -17% im Zeitraum zwischen 0 h und 25 h abschätzen. Entsprechend betragen die Zunahme 9% und die Abnahme

-8% in dem Zeitraum zwischen 0 h und 10 h. Diese Beobachtung der Induktion von CYP3A4 durch AS und der Degradation korreliert mit den Ergebnissen einer weiteren Studie, in der Aktivitätsmessungen der wichtigsten CYP-Isoenzyme in primären humanen Hepatozyten nach Inkubation mit AS durchgeführt wurden [152].

Die Werte zeigen insgesamt, dass im Zeitraum zwischen 0 h und 25 h nur eine leichte Zunahme der CYP3A4-Konzentration durch AS-Induktion beziehungsweise eine leichte Abnahme durch Degradation zu beobachten ist. Da die experimentelle Beobachtung in dieser Arbeit in einem Zeitraum bis maximal 20h liegt, kann der Einfluss der CYP3A4-Induktion vernachlässigt werden. Damit wird im Folgenden die gemessene CYP3A4-Enzymkonzentration in den primären Hepatozyten als konstant angenommen.

### 4.4.8 Simultane Modellverifikation an individuellen AS-Detoxifikationsprofilen

Der Prozess der Modell-Verifizierung wurde bislang an einem einzelnen Experiment an primären humanen Hepatozyten eines Individuums 1 aufgezeigt. Im Folgenden wird daher noch untersucht, ob das Modell auch verschiedene individuelle Detoxifikationsprofile, unter Berücksichtigung der inter-individuellen Variabilität, nicht nur der  $r_{max}$ -Parameter der Phase I- und Phase II-Reaktionen, sondern auch der Transport-Parameter, wiedergeben kann. Daher wird die Modell-Verifikation basierend auf den AS Zeitreihen-Daten an mehreren individuellen primären Hepatozyten, Individuum 1 und zwei zusätzlichen Individuen 2 und 3, simultan durchgeführt. Dafür werden die Parameter  $r_{max}$  der CYP3A4-Hydroxylierung und der UGT1A3-Lakonisierung für Individuum 2 und 3 nach dem Ansatz der relativen Verfügbarkeit (Gleichung (2.34)) aus den Referenzwerten für  $r_{max}$  des Individuums 1 aus der Einzelanpassung und Proteinkonzentrationen (**Tab. 16**) vorhergesagt.

**Tab. 16:** Protein-Konzentrationen von CYP3A4 und UGT1A3 in primären Hepatozyten.

Individuum	CYP3A4 [pmol ml <sup>-1</sup> ]	UGT1A3 [-]
1	1027 ±107 (n=2)	1,00
2	611 ±120 (n=4)	0,29
3	755 ±193 (n=2)	0,10

Die Proteinkonzentrationen wurden aus der totalen CYP3A4- und UGT1A3-Menge geteilt durch das totale intrazelluläre Volumen der Hepatozyten pro well berechnet. CYP3A4 Werte sind aufgelistet in Mittelwert und Standardabweichung in den Einheiten pmol pro ml intrazelluläres Volumen. Die relativen UGT1A3-Proteinkonzentrationen wurden auf Individuum 1 normalisiert.

Bezüglich des Transports hat die bisherige Modellreduktion gezeigt, dass die Kinetik erster Ordnung des aktiven Imports über OATP1B1 gegenüber der Kinetik nullter Ordnung des Imports über OATP2B1 zu bevorzugen ist, und dass die Kinetik erster Ordnung des aktiven



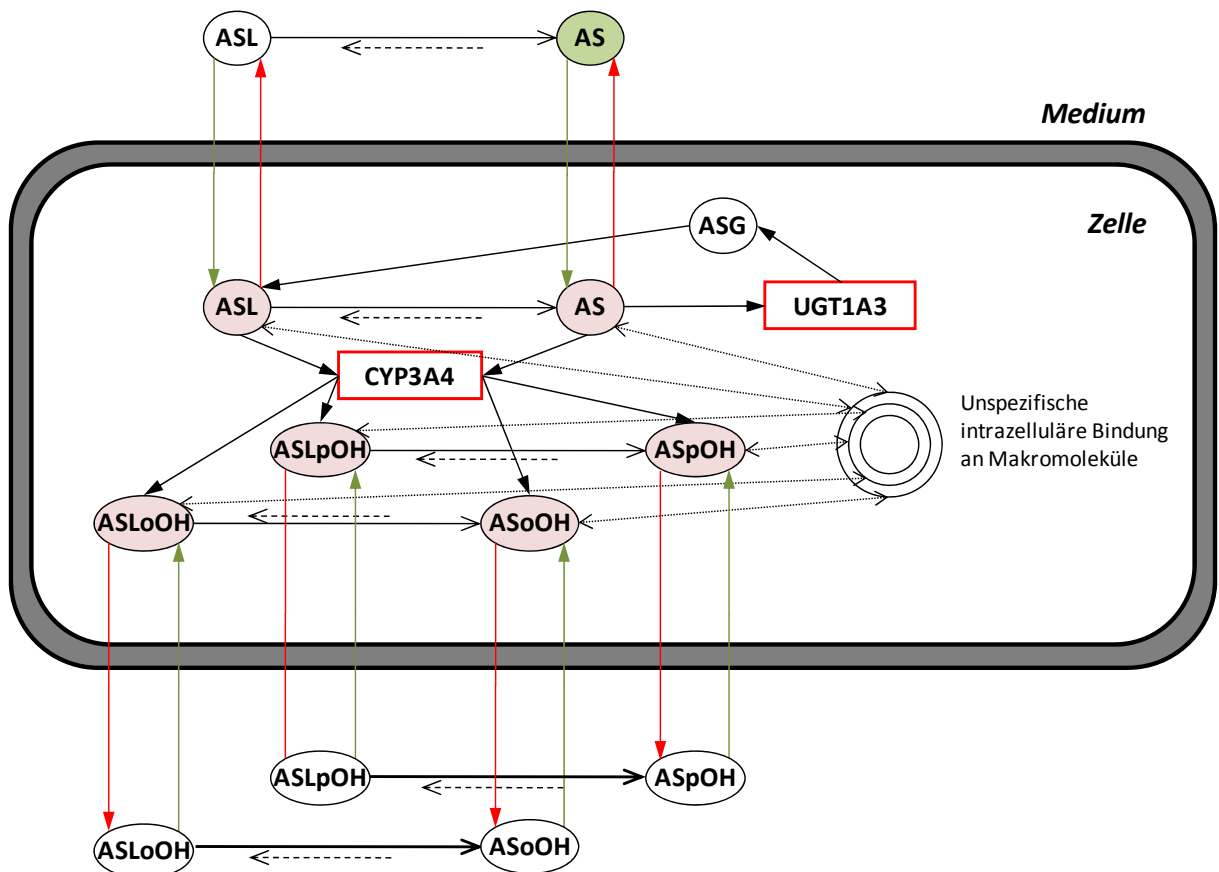
Transports nicht von der passiven Diffusion unterschieden werden kann. Daher werden im Folgenden der aktive Transport und die passive Diffusion zur apparenten Transportkinetik des Imports,

$$r_{im,j} = k_{im,j} \cdot c_j^{ex} + P_j \cdot c_j^{ex} = \kappa_{im,j} \cdot c_j^{ex} , \quad (4.9)$$

und des Exports,

$$r_{ex,j} = k_{ex,j} \cdot c_j^{in} + P_j \cdot c_j^{in} = \kappa_{ex,j} \cdot c_j^{in} , \quad (4.10)$$

zusammengefasst. Die Transportraten werden durch das Produkt der apparenten Ratenkonstante  $\kappa_{im/ex}$  des Imports beziehungsweise des Exports und der extra-beziehungsweise intrazellulären Konzentration  $c_j^{ex/in}$  beschrieben (**Abb. 43**).



**Abb. 43:** Modellstruktur in der simultanen Modellverifikation an individuelle AS-Metabolitkonzentrationen. Im Vergleich zum vollständigen Modell (Abb. 31) enthält dieses Modell als Resultat der Parametersensitivitätsanalyse und der Modellreduktion gelumpete apparente Transportschritte, das heißt jeweils eine Import- und eine Exportrate pro Metabolit.

Die Modellverifikation wird an Zeitreihen-Daten der Individuen 1, 2 und 3 (Anhang B **Tab. B.4**, **Tab. B.5** und **Tab. B.6**) simultan durchgeführt. Das bedeutet, dass die Modellidentifikation beziehungsweise die Parameterschätzung für alle Individuen gleichzeitig

durchgeführt wird, wobei die gesamte Zielwertfunktion als die Summe der Zielwertfunktionen (Gleichung (2.8)) für die einzelnen Individuen  $i$  formuliert ist:

$$\Theta = \min_{\mathbf{p}} \sum_{i=1}^I \sum_{n=1}^N \sum_{j=1}^J \left( \frac{c_{j,n}^{calc} - c_{j,n}^{meas}}{s_j^c} \right)^2 . \quad (4.11)$$

In der Optimierung werden wiederum Parameter aus der Literatur (**Tab. 14**) fest vorgegeben. Die in der Einzelanpassung an Individuum 1 identifizierten Werte für den *fraction unbound* (**Tab. 15**),  $fu_j$ , werden übernommen. Des Weiteren werden die nach dem Ansatz der relativen Verfügbarkeit geschätzten individuellen Maximalraten  $r_{max}$  für die Enzyme CYP3A4 und UGT1A3 (**Tab. 17**) zunächst fest vorgegeben. In der Optimierung werden die apparenten Ratenkonstanten  $\kappa$  der Transportschritte und die Ratenkonstanten der PON-Hydrolyse für die einzelnen Individuen unterschiedlich geschätzt.

**Tab. 17:** Die individuellen Maximalraten  $r_{max}$  der Enzyme CYP3A4 und UGT1A3.

Parameter	Individuum 1	Individuum 2	Individuum 3	Einheit
$\Gamma_{max,3A4,ASpOH}$	1108	660	814	$\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$
$\Gamma_{max,3A4,ASoOH}$	3345	1991	2459	$\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$
$\Gamma_{max,3A4,ASLpOH}$	1228	731	903	$\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$
$\Gamma_{max,3A4,ASLoOH}$	2756	1640	2026	$\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$
$\Gamma_{max,1A3,AS}$	957	281	92	$\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$

Die Parameter sind aufgelistet für die Individuen 1,2 und 3 mit den Werten, die nach dem Ansatz der relativen Verfügbarkeit geschätzt wurden.

Die Modellvorhersage passt zufriedenstellend zu den experimentellen Daten im Fall des Individuums 2 (**Abb. 44**). Bei Individuum 3 ergeben sich jedoch größere Unterschiede zwischen Modellvorhersage und experimentellen Daten, insbesondere bei den intrazellulären Metaboliten ASL, ASpOH und ASoOH (**Abb. 45**, durchgezogene Linie).

Eine Erklärung liefert die Hypothese, dass der Abbau von AS durch Beta-Oxidation, der bisher als unwesentlich eingeschätzt wurde, eine größere Bedeutung hat. Die Beta-Oxidation an der Heptansäure-Seitenkette ist ein typischer Transformationsschritt für Statine, spielt aber für den Abbau in menschlichen Zellen wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle [182]. Jedoch zeigt die Beta-Oxidation eine hohe Aktivität in menschlichen Leberzellen im Fall einer Erkrankung an *Diabetes mellitus* Typ 2 – diese Krankheit wurde für Individuum 3 diagnostiziert, da die Beta-Oxidation in diesem Fall für die Versorgung mit ATP für die Gluconeogenese verantwortlich ist [183, 184]. Damit könnte die Beta-Oxidation bedeutend zu dem AS-Metabolismus beitragen. Um diese Hypothese zu testen, wurden entsprechende Abbaureaktionen mit den Säureformen als Substrate im Modell im intrazellulären Raum implementiert.

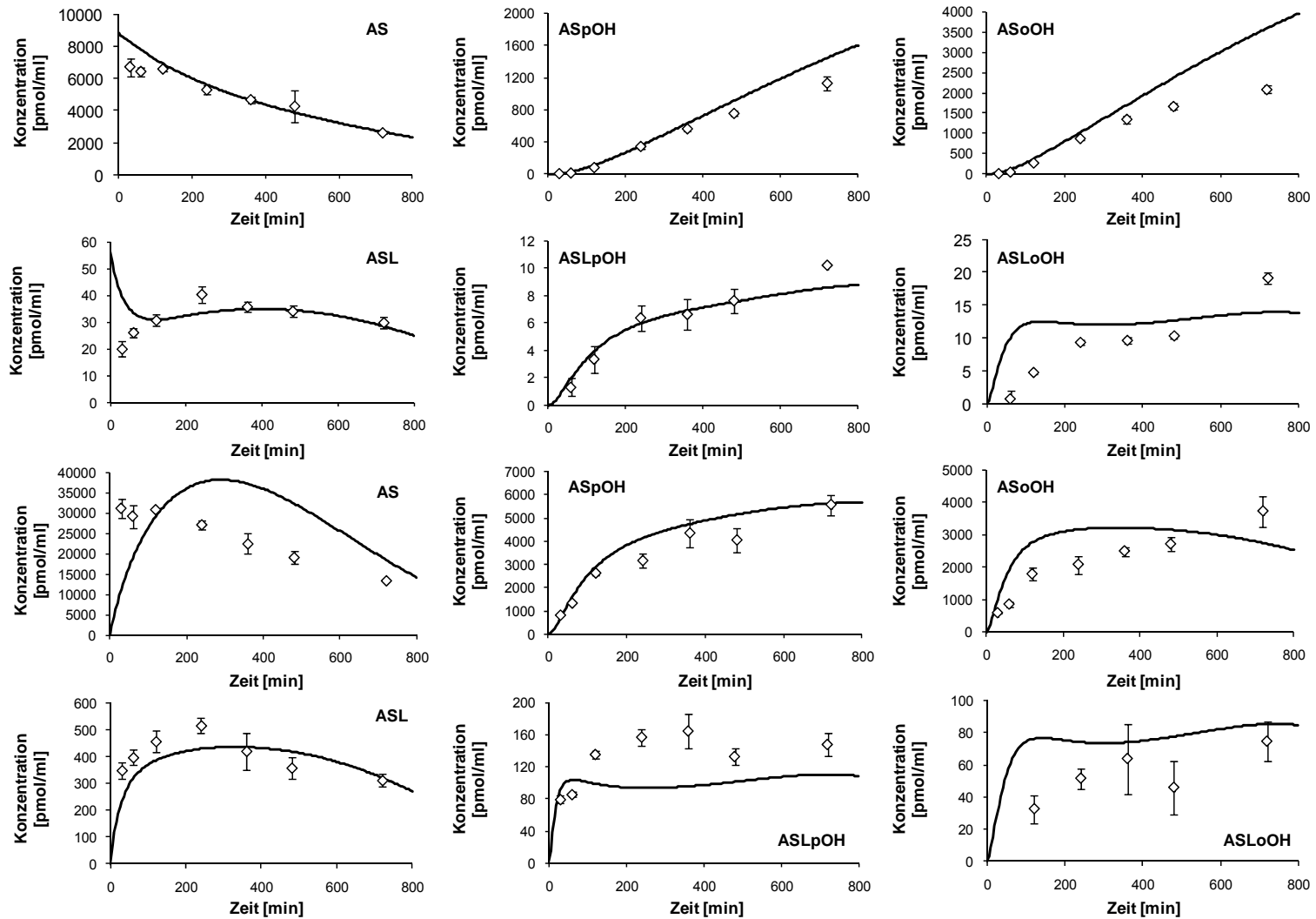
Eine weitere Hypothese liegt in der Annahme, dass die CYP3A4- und UGT1A3-Proteinkonzentrationen von Individuum 3, die in der Schätzung der entsprechenden Maximalratenparameter  $r_{max}$  über den Ansatz der relativen Verfügbarkeit (Gleichung (2.34)) verwendet werden, fehlerbehaftet sind. Dies beruht auf der Beobachtung, dass die relativen Standardabweichungen der Messung (**Tab. 16**) relativ hoch sind. Da die Parameter  $r_{max}$  von CYP3A4 und UGT1A3 relativ hohe lokale Sensitivitäten aufweisen (**Abb. 32**) führt eine Veränderung im Proteinkonzentrationswert zu einer starken Veränderung in den Simulationsprofilen. Daher werden in einer weiteren Optimierungsprozedur die CYP3A4-Proteinwerte in einem Intervall von Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (**Tab. 16**) und entsprechend die UGT1A3-Proteinwerte mit einer angenommenen Standardabweichung von 30% zur Optimierung frei gegeben. Besonders bei den intrazellulären Metaboliten AS und ASL ergeben sich nun Verbesserungen in der Modellvorhersage (**Abb. 45**, gestrichelte Linie). Jedoch liegen immer noch größere Unterschiede bei den intrazellulären Metaboliten ASL und ASoOH und dem extrazellulären ASpOH vor. Diese nach wie vor beobachteten Abweichungen bei Individuum 3 lassen vermuten, dass im Zusammenhang mit *Diabetes melitus* weitere, bislang unbekannte Effekte eine Rolle spielen.

Die Modellparameter für die Individuen 1, 2 und 3 sind in **Tab. 18** zusammengefasst. Die Maximalraten  $r_{max}$  der Enzyme CYP3A4 und UGT1A3 verdeutlichen die Variabilität der zugrundeliegenden Enzymkonzentrationen. Die Transportkonstanten  $\kappa$  weisen ebenso relativ stark unterschiedliche Werte auf, deuten folglich auf eine inter-individuelle Variabilität der beteiligten Transportproteine hin. Die Ratenkonstanten  $\kappa$  des ASLoOH-Imports und -Exports bei Individuum 2 und des ASL-Imports und -Exports bei Individuum 3 sind aber wesentlich höher als die anderen entsprechenden Import- und Export-Parameter, was wiederum auf eine starke lineare Abhängigkeiten dieser Parameter hindeutet.

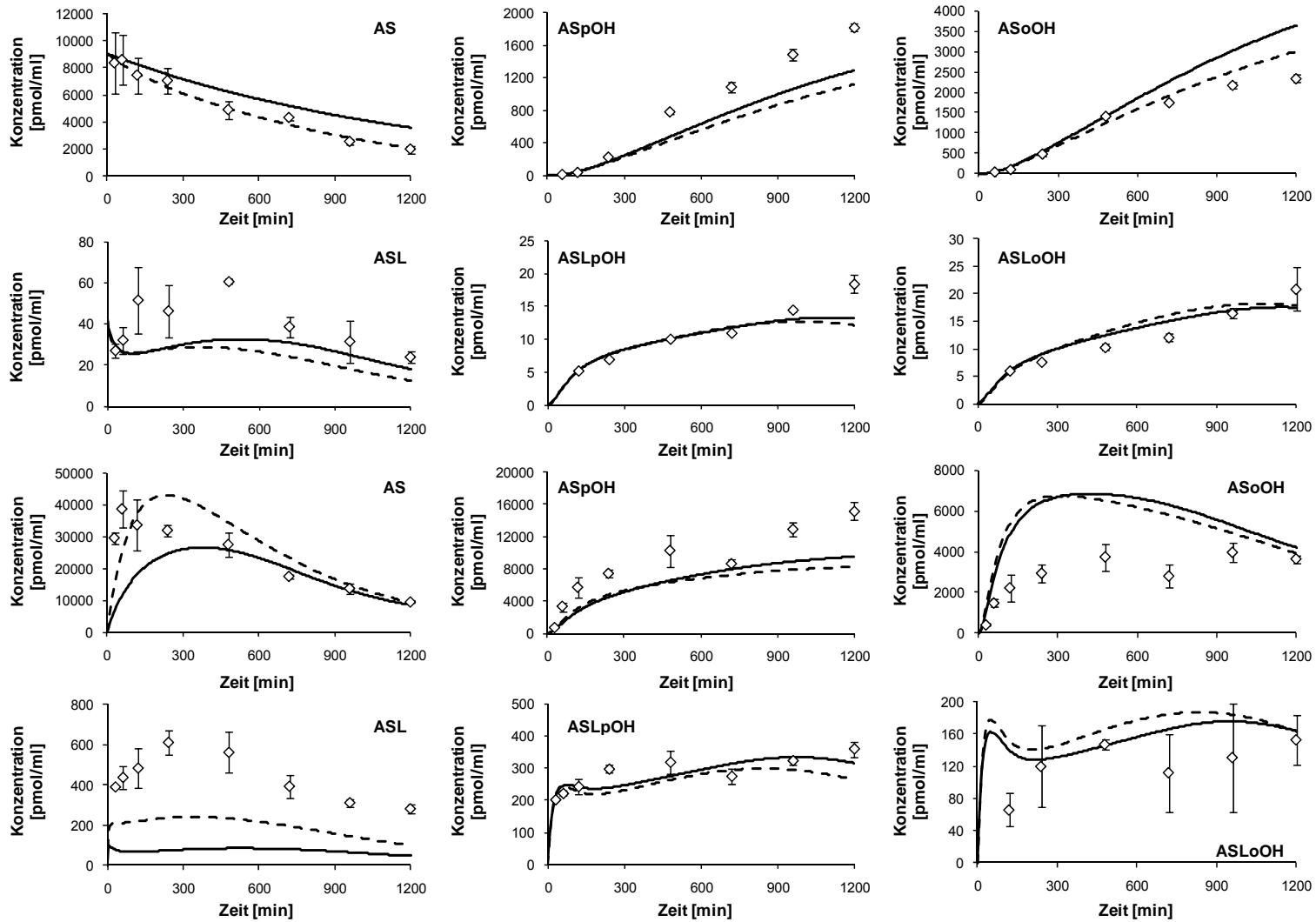
**Tab. 18:** Modellparameter des AS-Metabolismus der Individuen 1, 2 und 3.

Parameter	Individuum 1	Individuum 2	Individuum 3	Einheit
$\Gamma_{\max,3A4,ASpOH}$	1108	660	606	$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$
$\Gamma_{\max,3A4,ASoOH}$	3345	1991	1830	$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$
$\Gamma_{\max,3A4,ASLpOH}$	1228	731	672	$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$
$\Gamma_{\max,3A4,ASLoOH}$	2756	1640	1508	$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$
$\Gamma_{\max,1A3,AS}$	957	281	120	$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$
$K_{PON,ASL}$	308	99,2	0,00	$10^{-3}\text{ min}^{-1}$
$K_{PON,ASLoH}$	280	545	82,9	$10^{-3}\text{ min}^{-1}$
$K_{ex,AS}$	2,17	0,16	0,17	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$K_{ex,ASL}$	21,8	2,48	10,5	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$K_{ex,ASpOH}$	0,80	1,25	0,52	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$K_{ex,ASoOH}$	1,60	3,62	0,91	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$K_{ex,ASLpOH}$	1,13	1,01	0,59	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$K_{ex,ASLoOH}$	2,67	86,3	0,77	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$K_{im,AS}$	20,3	4,42	3,45	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$K_{im,ASL}$	275	25,8	82,7	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$K_{im,ASpOH}$	3,96	2,01	2,53	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$K_{im,ASoOH}$	0,39	0,22	0,00	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$K_{ex,ASLpOH}$	34	7,24	8,59	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$K_{im,ASLoOH}$	26	529	2,43	$\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$
$K_{B-Ox,AS}$			15,0	$10^{-3}\text{ min}^{-1}$
$K_{B-Ox,ASOH}$			0,00	$10^{-3}\text{ min}^{-1}$

Die Parameter sind aufgelistet für die Individuen 1,2 und 3 mit den Parameterwerten in den genannten Einheiten. Die ersten fünf Zeilen enthalten die individuellen Maximalraten der Enzyme CYP3A4 und UGT1A3. Für Individuum 1 wurden die Maximalraten aus der Einzelanpassung übernommen, für Individuum 2 und 3 nach der relativen Verfügbarkeit bestimmt und vorgegeben. Für Individuum 3 wurden die Maximalraten innerhalb der Standardabweichung der gemessenen Proteinkonzentrationen zur Schätzung frei gegeben. Die Transportparameter sowie die Parameter der PON-Hydrolyse in den Zeilen 6-19 wurden in der Optimierung individuell, das heißt für die Individuen 1,2 und 3 unterschiedlich, frei gegeben. Zusätzliche Beta-Oxidations-Reaktionen (B-Ox) an den Säureformen wurden nur im Modell des Individuums 3 berücksichtigt, auf Basis eines vermuteten höheren Einfluss bei der vorliegenden Erkrankung an *Diabetes melitus*.



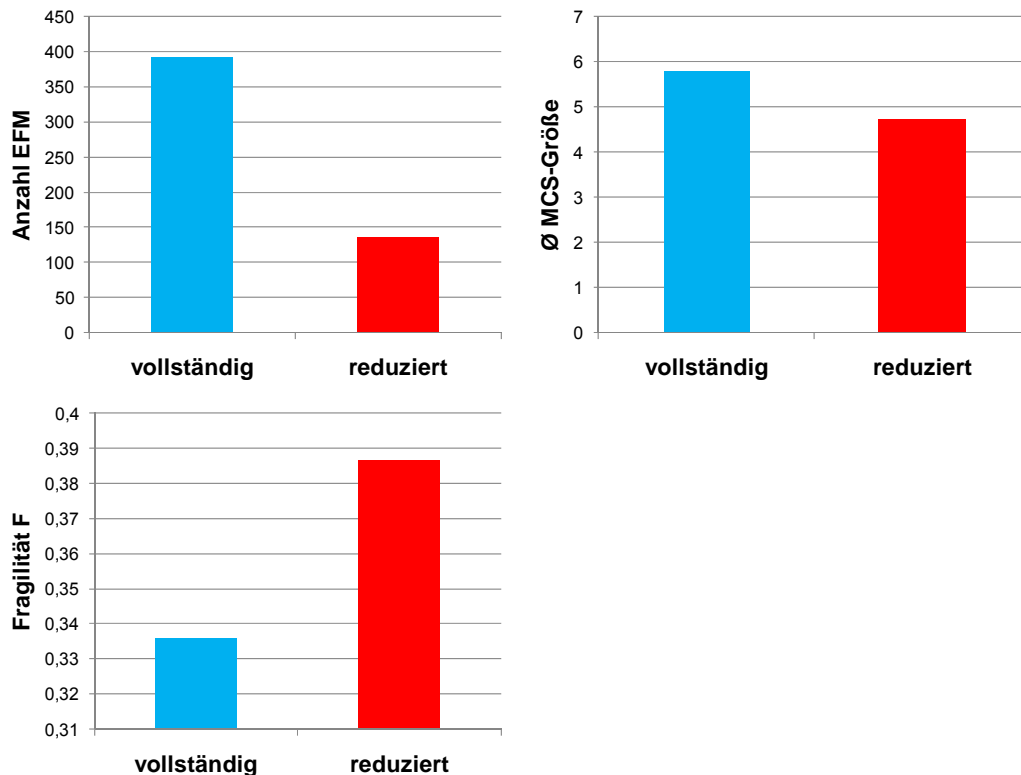
**Abb. 44:** Modellverifikation an primären Hepatozyten, Individuum 2. Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen (Raute) und die Modellsimulationen (Linie) der AS-Komponenten im Medium (obere zwei Reihen) und in den primären Hepatozyten (untere zwei Reihen). Erste und dritte Reihe: AS, ASpOH und ASoOH. Zweite und vierte Reihe: ASL, ASLpOH und ASLoOH.



**Abb. 45:** Modellverifikation an primären Hepatozyten, Individuum 3. Dargestellt sind die gemessenen Konzentrationen (Raute) und die Modellsimulationen (durchgezogene und gestrichelte Linie) der AS-Komponenten im Medium (obere zwei Reihen) und in den primären Hepatozyten (untere zwei Reihen). Erste und dritte Reihe: AS, ASpOH und ASoOH. Zweite und vierte Reihe: ASL, ASLpOH und ASLoOH.

## 4.5 Topologische Analyse der Modellstruktur

Das vollständige Modell (**Abb. 30**) und das in der Modellverifikation erzielte reduzierte Modell (**Abb. 36**) des Fremdstoffmetabolismus von AS werden in der strukturellen Analyse auf EFM, MCS und die Fragilität F untersucht (**Abb. 46**). Dabei werden EFM für den Abbau von AS und ASL berücksichtigt.



**Abb. 46:** Strukturelle Analyse des Fremdstoffmetabolismus von AS. Die Anzahl der EFM, der durchschnittlichen MCS-Größe und der Fragilität F werden verglichen zwischen dem vollständigen Modell und dem in der Modellverifikation erzielten reduzierten Modell des Fremdstoffmetabolismus von AS.

Die Anzahl der EFM beträgt 392 beziehungsweise 136, die durchschnittliche MCS-Größe 5,8 beziehungsweise 4,7 und die Fragilität F 0,34 beziehungsweise 0,39 im vollständigen Modell beziehungsweise im reduzierten Modell. In beiden Modellen sind die CYP3A4-Hydroxylierungen essentielle Transformer, das heißt CYP3A4 taucht in jedem EFM auf. Des Weiteren sind Sauerstoff, NADP und NADPH essentielle Komponenten, da die entsprechenden Transformer für den Import und Export aus dem Modell essentiell sind. Der Import der hydroxylierten Metabolite, ASpOH und ASoOH, ASLpOH und ASLoOH, taucht in beiden Modellen in keinem EFM auf. Das ist damit erklärbar, dass die Funktionalität des

AS- und ASL-Abbaus und damit die „Richtung“ der EFM vorgegeben ist, somit nur der Export nicht aber der Import dieser Metabolite in den EFM verwendet wird.

### 4.6 Globale Sensitivitätsanalyse und Identifizierbarkeit

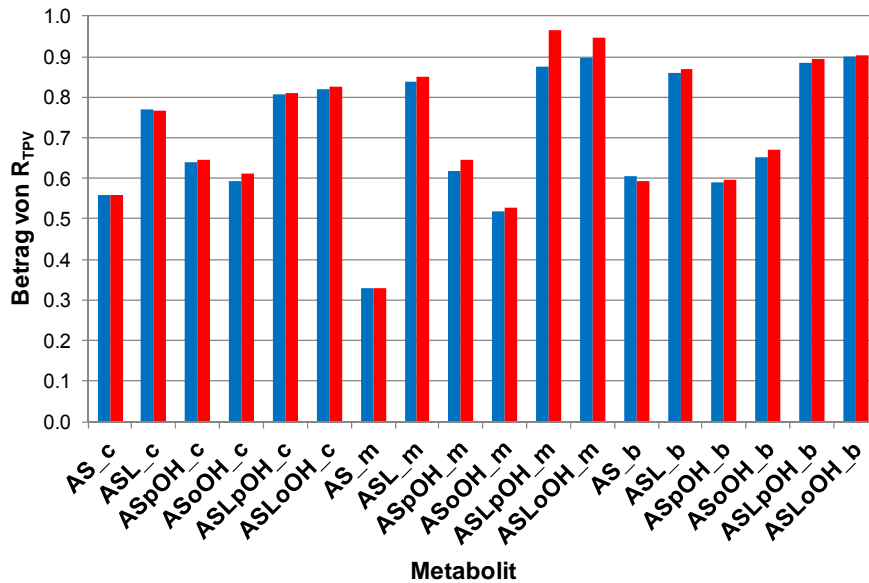
Sowohl das vollständige Modell (**Abb. 30**) als auch das in der Modellverifikation erzielte reduzierte Modell (**Abb. 36**) des Fremdstoffmetabolismus von AS werden in der globalen Sensitivitätsanalyse auf Multi-Parameter-Sensitivitäten und der Robustheit untersucht (siehe **Abschnitt 2.3.5**). Die Parameter werden jeweils in einem Bereich vom 0,1- bis 10-fachen des nominalen Parameterwertes zufällig generiert, die fraction-unbound(*fu*)-Parameter werden im Bereich zwischen 0,01 und 1 variiert, die in der Optimierung vorgegebenen Parameter (**Tab. 14**) werden jedoch fixiert. Für beide Modelle werden die Multiparametersensitivitäten (MPS) als auch die Robustheit-Koeffizienten ( $R_{TPV}$ ) auf Basis der Integralfläche der Zustandsvariablen ermittelt. Die MPS werden pro Parameter über alle Metabolite aufsummiert und als Mittelwert die durchschnittliche Multiparametersensitivität (DMPS) berechnet.

Die DMPS des vollständigen Modells beträgt 1,7 und die des reduzierten Modells 2,2. Damit ist das reduzierte Modell sensitiver gegenüber Variabilität in den Parametern als das vollständige Modell. Auffallend ist außerdem, dass die DMPS der Parameter der Reaktion in beiden Modellen größer ist als die der Transporter. Die DMPS der Parameter der Reaktionen beträgt 3,22 beziehungsweise 3,28 und die DMPS der Parameter der Transporter 1,03 beziehungsweise 1,34 im vollständigen beziehungsweise reduzierten Modell. Es ist offensichtlich, dass die Unterschiede der Sensitivitäten hauptsächlich aus den Transport-Parametern resultieren, da die Modellreduktion durch Elimination von Transport-Parametern erzielt wurde. Damit ist das reduzierte Modell sowohl auf lokaler (siehe Abschnitt 4.4.4) als auch globaler Ebene sensitiver als das vollständige Modell.

Die Analyse der Robustheit zeigt jedoch kaum Unterschiede in den Robustheitskoeffizienten  $R_{TPV}$  zwischen vollständigem und reduziertem Modell (**Abb. 47**). Der durchschnittliche Robustheitskoeffizient  $R_{TPV}$  beträgt im vollständigen Modell 0,71 und im reduzierten Modell 0,72. Damit ist die Robustheit im vollständigen Modell nur geringfügig größer als im reduzierten Modell. Dieses Ergebnis unterscheidet sich folglich auch von dem Ergebnis der globalen Analyse des DT- und PF-Metabolismus (siehe **Abschnitt 3.7** und **Abb. 29**), bei dem ein großer Unterschied zwischen vollständigem und reduziertem Modell beobachtbar ist. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Modellreduktion im AS-



Metabolismus nur wenige Parameter-Eliminationen (8 von 37) beinhaltete und die Parametervariation in einem relativ kleinen Bereich (Faktor 0,1 und 10) durchgeführt wurde.

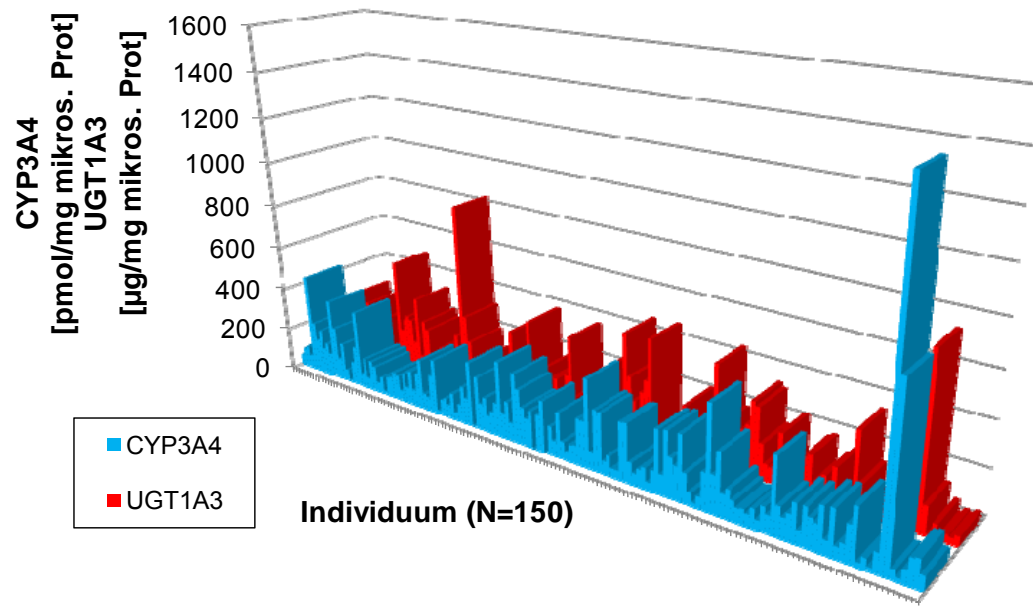


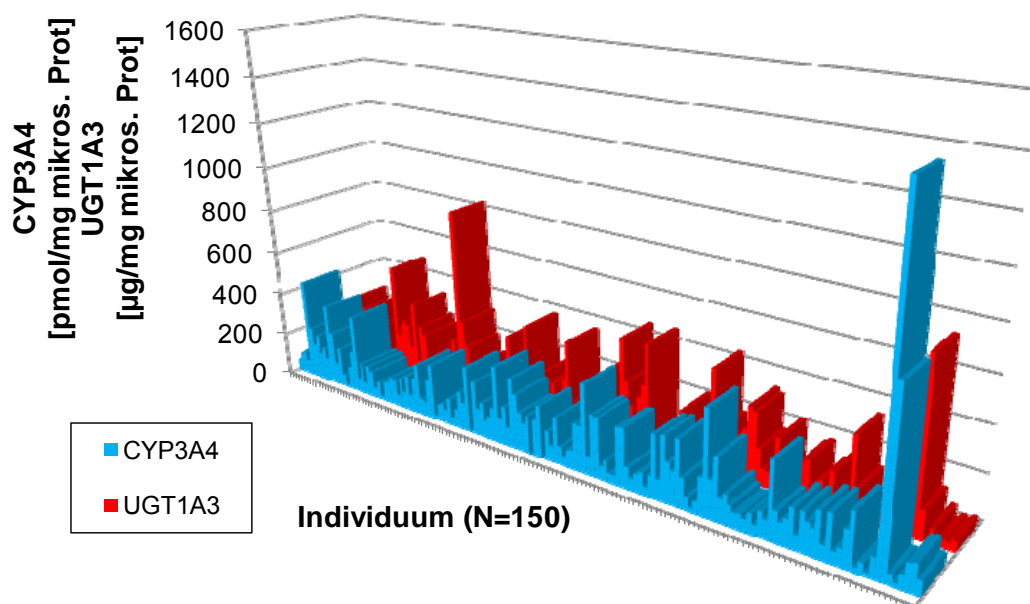
**Abb. 47:** Robustheit-Koeffizienten der Metabolite des AS-Abbaus. Die Robustheit-Koeffizienten ( $R_{TPV}$ ) der einzelnen Metabolite in der Zelle (Index c) und im Medium (Index m) wurden in der globalen Sensitivitätsanalyse am vollständigen (blau) und reduzierten Modell (rot) ermittelt.

Bei der detaillierten Robustheitsanalyse fällt allerdings auf, dass die Robustheitskoeffizienten der Säureformen von AS, AS, ASpOH und ASoOH geringer sind als die der Laktonformen, ASL, ASLpOH und ASLoOH, sowohl im Medium als auch in der Zelle. Der über alle Säureformen gemittelte Robustheitskoeffizient  $R_{TPV}$  beträgt 0,57 beziehungsweise 0,58 und der über alle Laktonformen gemittelte Robustheitskoeffizient 0,85 beziehungsweise 0,87, im vollständigen beziehungsweise im reduzierten Modell. Das bedeutet, dass die Säureformen robuster gegenüber Variabilität in den Parametern als die Laktonformen sind, wobei die genaue Ursache unklar ist.

Zusammenfassend ist also erkennbar, dass die Modellreduktion zu einer Verbesserung nicht nur der lokalen sondern auch der globalen Parametersensitivität führt. Im Bereich der Stabilitätsanalyse wurde von Heinrich und Schuster [185] postuliert, dass ein System, das auf lokaler Ebene instabil ist, auch auf globaler Ebene nicht stabil sein kann (Theorem 2A, Seite 41). Eventuell könnte diese Hypothese auch auf den Bereich der Sensitivitätsanalyse übertragen werden: Ein System, das auf lokaler Ebene geringere Parametersensitivitäten im Vergleich zu einem Referenzmodell (hier das reduzierte Modell) aufweist, muss auf globaler Ebene ebenso geringere Sensitivitäten im Vergleich zum Referenzmodell aufweisen. Diese Hypothese müsste jedoch in Zukunft noch mathematisch bewiesen werden.

## 4.7 Dynamische Analyse der Variabilität des AT-Metabolismus aufgrund individueller CYP-Proteinlevel

Basierend auf den finalen Modellparametern, die in der simultanen Modellanpassung geschätzt wurden, wird der Einfluss der inter-individuellen Variabilität im Expressionslevel der Enzyme CYP3A4 und UGT1A3 untersucht, indem die Protein-Konzentrationsdaten aus 150 individuellen Lebermikrosomenproben (**Abb. 48**) in die dynamische Simulationen über den Ansatz der relative Menge (Gleichung (2.34)) implementiert werden. Die entsprechenden angepassten Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen sind in  abgebildet.



**Abb. 48:** CYP3A4- und UGT1A3- Proteinkonzentrationen in individuellen Lebermikrosomenproben (N=150) der Leberbank (IKP, Stuttgart, siehe Abschnitt 2.1). Konzentrationen sind in pmol CYP3A4 beziehungsweise µg UGT1A3 pro mg mikrosomales Protein dargestellt. Die UGT1A3-Proteinkonzentrationen stellen nur zueinander relative Messwerte dar. Die absoluten UGT1A3-Konzentrationen sind nicht messbar, da es keinen analytischen Standard gibt.

Das wichtigste Ergebnis dieser dynamischen Analyse betrifft die Frage, wie die Detoxifikationsprofile der intrazellulären Metabolite AS, ASpOH und ASoOH durch die Variabilität der Enzyme beeinflusst wird, da diese Metabolite in der Leber das Target, die HMGCoA-Reduktase, inhibieren, und somit die pharmakologisch aktiven Metabolite darstellen. Daher wurden AUC,  $c_{\max}$  und  $t(c_{\max})$  der Konzentrations-Zeitprofile von jeweils AS allein beziehungsweise der Summe der Konzentrationen von AS, ASpOH und ASoOH, für die CYP3A4- und UGT1A3-Konzentrationen jeder Leberprobe über eine Zeitdauer von 1200 min simuliert, und die Verteilungen über alle Leberproben ermittelt. Schließlich wurden

geeignete Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen an die jeweiligen Verteilungen angepasst (**Abb. 50**). Die Kennwerte der Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen sind in **Tab. 19** aufgelistet.

Offensichtlich gibt es Unterschiede zwischen der Betrachtung von AS allein und der Summe der Metabolite AS, ASpOH und ASoOH. Die Verteilungen von  $AUC$ ,  $c_{max}$  und  $t(c_{max})$  haben niedrigere Mittelwerte für AS allein als für alle Säureformen, AS, ASpOH und ASoOH, zusammen. Der Mittelwert der AUC-Verteilung beträgt 75051 ( $\text{pmol ml}^{-1} \text{ min}$ ) für AS und 203617 ( $\text{pmol ml}^{-1} \text{ min}$ ) für AS, ASpOH und ASoOH zusammen. Genauso ist  $c_{max}$  kleiner für AS allein, 201 ( $\text{pmol ml}^{-1}$ ), als für AS, ASpOH, und ASoOH zusammen, 366 ( $\text{pmol ml}^{-1}$ ).

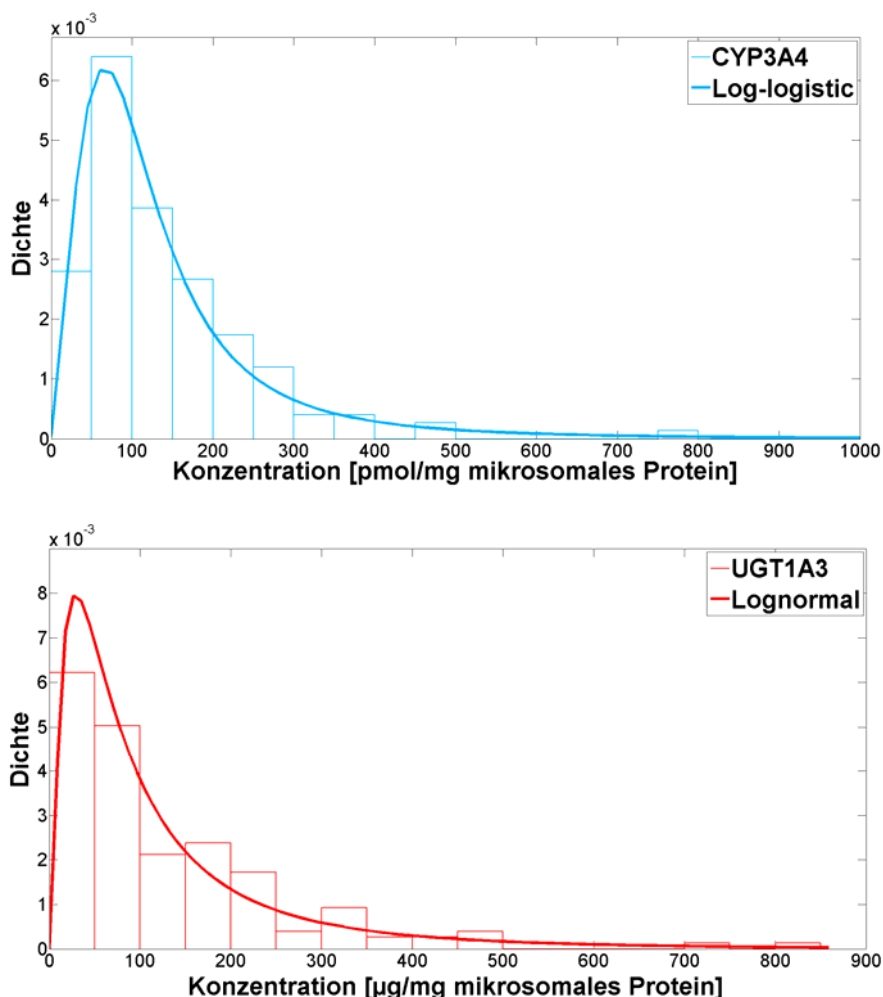
Des Weiteren ergibt sich die maximale Konzentration zu einem früheren Zeitpunkt  $t(c_{max})$ , 48 min für AS im Gegensatz zu 100 min für AS, ASpOH, und ASoOH zusammen. Diese Ergebnisse sind recht einleuchtend, da ASpOH und ASoOH die hydroxylierten Produkte von AS sind und diese Metabolite einzeln zu späteren Zeitpunkten ihre maximale Konzentration aufweisen, folglich in der Gesamtheit aller Säureformen erstens die maximale Konzentration natürlich höher ist, und zweitens der Zeitpunkt im Vergleich zu AS allein zu höheren Zeiten verschoben wird.

Außerdem zeigen die Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen eine relativ enge Verteilung in Bezug auf die relative Standardabweichung, wenn sie mit den zugrunde-liegenden Verteilungen der CYP3A4 und UGT1A3- Proteindaten verglichen werden. Die Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen der CYP3A4 und UGT1A3-Verteilungen (**Abb. 49**) haben relative Standardabweichungen von 259% und 137%, und sind somit höher als die relativen Standardabweichungen der  $AUC$ -,  $c_{max}$ - und  $t(c_{max})$ -Verteilungen, die bis auf die AUC-Verteilung von AS (123%) geringer als 50% sind.

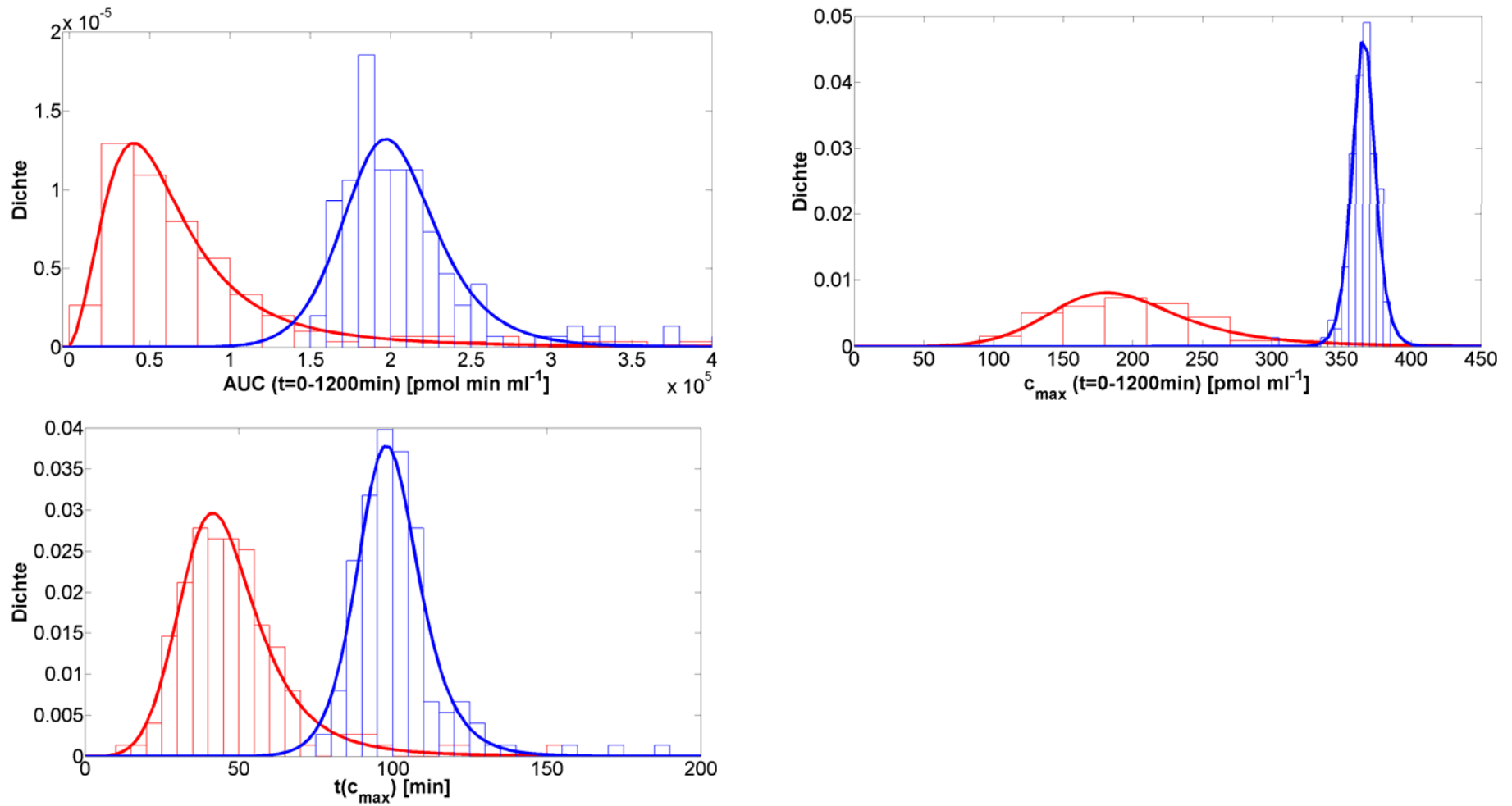
**Tab. 19:** Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen der Verteilungen des individuellen AS-Abbaus (**Abb. 50**).

	Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktion	Mittelwert [min]	s.d. [min]	rel. s.d. [%]
<b>AUC [pmol ml<sup>-1</sup>*min]</b>				
AS	Log-logistic	75051	92038	123
AS+ASpOH+ASoOH	Log-logistic	203617	35775	18
<b>c<sub>max</sub> [pmol ml<sup>-1</sup>]</b>				
AS	Log-logistic	201	64	32
AS+ASpOH+ASoOH	Log-logistic	366	10	3
<b>t(c<sub>max</sub>) [min]</b>				
AS	Log-logistic	48	18	39
AS+ASpOH+ASoOH	Log-logistic	100	12	12

Dargestellt sind jeweils die Kennwerte der Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktion der *AUC*-, *c<sub>max</sub>*- und *t(c<sub>max</sub>)*-Verteilung (Log-logistic) in Mittelwert, Standardabweichung (s.d.) und relative Standardabweichung (rel. s.d.).



**Abb. 49:** Verteilungen der CYP3A4- und UGT1A3-Proteinkonzentrationen in humanen Lebermikrosomen. Dargestellt sind die Verteilungen sowie angepasste Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen (oben CYP3A4: Log-logistic; unten UGT1A3: Lognormal) der CYP3A4- und UGT1A3-Proteinkonzentrationen in 150 Lebermikrosomenproben der Leberbank (IKP, Stuttgart, siehe Abschnitt 2.1 und Abb. 48).



**Abb. 50:** Verteilungen der inter-individuellen Variabilität der Abbauprofile im AS-Fremdstoffmetabolismus. Dargestellt sind die AUC- (oben links),  $c_{\max}$ - (oben rechts) und  $t(c_{\max})$ - (unten links) Verteilungen (Balken) sowie die angepassten Wahrscheinlichkeitsdichte-Funktionen (Linie) der intrazellulären Simulationsprofile von AS (rot) und der Summe von AS, ASpOH und ASoOH (blau). Die Verteilungen wurden in der dynamischen Simulation durch Implementierung der CYP3A4- und UGT1A3- Proteinkonzentrationen individueller Lebermikrosomen ( $n=150$ ) vorhergesagt.

### 4.8 Diskussion

Die mechanistische Modellierung des Fremdstoffmetabolismus hat einen wichtigen Vorteil gegenüber der traditionellen pharmakologischen Modellierung. Die Unterscheidung zwischen Metabolismus und Elimination innerhalb der Zelle und die detaillierte Beschreibung der metabolischen Netzwerkstruktur erlaubt die Beschreibung der involvierten Reaktionskinetiken und Transportschritte. Deshalb wurden in der Modellierung des AS-Metabolismus zwischen den einzelnen Abbaumetaboliten, den Säure- und Laktonformen, im intra- und extrazellulären Raum unterschieden, sowie entsprechende Reaktionskinetiken und Transportmechanismen berücksichtigt.

Die experimentellen Ergebnisse im Stimulus-Response-Zeitreihenansatz zeigen, dass die Beobachtungen grundsätzlich geeignet sind, den AS-Metabolismus in humanen Hepatozyten zu verfolgen. Allerdings sind die experimentellen Untersuchungen an primären Hepatozyten durch die analytische Nachweisgrenze der Metabolite in der Wahl der Initialkonzentration an AS stark eingeschränkt. Deshalb wurde eine Initialkonzentration von AS im Medium von ungefähr 10  $\mu\text{M}$  gewählt, die im Vergleich zu *in-vivo*-Plasmakonzentration relativ hoch ist. Nur unter diesen Bedingungen konnten aber die Säure- und Laktonmetabolite in den intra- und extrazellulären Proben gemessen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die intrazellulären Konzentrationen des Initialsubstrates AS größer sind als die extrazellulären, was bekräftigt, dass der OATP vermittelte Transport einen aktiven Transportschritt darstellt und nicht einen erleichterten Diffusionsmechanismus [166, 167]. Im Gegensatz zu Metabolit-Konzentrationen, die im Plasma in klinischen Studien nachgewiesen wurden [162, 186, 187], sind die Konzentrationswerte der Säureformen der Hydroxy-Abbaumetabolite größer als der entsprechenden Laktonformen im Medium. Die Ergebnisse können jedoch nicht direkt verglichen werden, erstens, weil in dieser Arbeit *in-vitro*-Untersuchungen an isolierten primären Hepatozyten durchgeführt wurden, und zweitens, weil eine relativ hohe Initialkonzentration an AS von 10  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu Plasmakonzentrationen von weniger als 200  $\text{pmol ml}^{-1}$  angesetzt wurde.

Weiter kann in den experimentellen Ergebnissen gezeigt werden, dass die Wiederfindung der Metabolite, also die Summe der Metabolitmenge im Vergleich zur Initialmenge an AS über der Zeit abnimmt. Dies bekräftigt die Beteiligung der unspezifischen Bindung von AS-Metaboliten im intrazellulären Raum, wie es in früheren Studien schon geschätzt wurde [74], könnte aber auch zum Teil durch unspezifische Bindung der Metabolite an die

Kollagenschicht der 6-well-Platten verursacht werden, insbesondere der lipophilen Laktonmetabolite, ASL, ASLpOH und ASLoOH. Dies konnte aber wegen dem erforderlichen Waschschrift vor der Aufbereitung der intrazellulären Proben in diesem experimentellen Setup nicht untersucht werden.

Die Identifikation der Modellparameter konnte erfolgreich durchgeführt werden, da die Modellsimulationen zufriedenstellend an die experimentellen Daten angepasst wurden. Zur Kontrolle der lokalen Parametersensitivität und -identifizierbarkeit wurde eine Analyse auf Basis der **FIM**\* durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass das vollständige Modell des AS-Metabolismus bezüglich der Transportparameter nicht identifizierbar ist. Daher wurde eine Modellreduktion durchgeführt, wobei nicht-identifizierbare Transportschritte, sichtbar an geringen Parametersensitivitäten, hohen Parameterfehlern und -korrelationen, entsprechend im Modell eliminiert wurden. Folglich zeigen globale Sensitivitätsanalysen sowie topologische Untersuchungen am vollständigen und am reduzierten Modell, dass diese Modellreduktion zur Verschlechterung der Robustheit des Modells, aber zur Verbesserung der Sensitivität der restlichen Transportparameter führt.

Dieses Resultat bedeutet nicht zwangsläufig, dass die eliminierten Transportschritte in humanen Hepatozyten nicht ausgeprägt sind, sondern weisen darauf hin, dass diese nicht von den verbleibenden Transportschritten in der Modellverifikation unterschieden werden können. Die verbleibenden Transportschritte reichen aus, um die wahrscheinlich überlagernde Beteiligung verschiedener Transportschritte *in-vivo* darzustellen. Um die Beteiligung verschiedener Transportmechanismen in Zukunft besser auflösen zu können, sollten zusätzliche Information aus Transportuntersuchungen an rekombinanten Systemen, ähnlich zu früheren Untersuchungen [54, 188], im Modell implementiert werden. Diese Untersuchungen könnten die isolierte Identifizierung und Unterscheidung von apikalen und basolateralen Transportproteinen ermöglichen. Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Transportidentifizierbarkeit wäre die Vorgabe der Permeabilitätskoeffizienten mit Schätzwerten, die auf Basis von untersuchten Korrelationen zwischen LogP-Wert und Permeabilitätskoeffizienten [40] gewonnen werden können. Die dazu durchgeführten Untersuchungen lieferten jedoch keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

Unter den gegebenen Umständen war daher eine Modellreduktion die bislang beste Alternative. Das reduzierte Modell beinhaltet aber immer einige verbleibende Unsicherheiten in der Identifizierbarkeit, was sich in hohen Korrelationskoeffizienten in den verbleibenden Transportschritten aber auch in einigen Reaktionsschritten zeigt. Eine weitere Modellunsicherheit betrifft die Modellierung der Bindung an Makromoleküle. In der

Modellierung wurde angenommen, dass der Parameter der Bindungskinetik, *fraction unbound*, für alle Säure- beziehungsweise Laktonmetabolite jeweils gleich ist. Es ist zu vermuten, dass die Modellerweiterung durch individuelle Ansätze für die einzelnen Komponenten erneut zu Identifikationsproblemen führt. Offenbar reichen die verfügbaren Daten zu einer weiteren Verbesserung des Modells nicht aus. Wie oben erwähnt ist die Wahl der Initialkonzentration, das heißt die extrazelluläre AS-Konzentration zum Zeitpunkt null, an die Nachweisbarkeit der Metabolite gebunden. Weiter ist die Anzahl der experimentellen Zeitpunkte an die zur Verfügung stehende Anzahl an primären Hepatozyten gebunden, die im operativen Eingriff isoliert werden kann. Hinzu kommt, dass das experimentelle Set-up die Kompartimentierung in Plasma und Gallengänge nicht nachstellt, da außerhalb der primären Zellen nur das Kompartiment des Mediums besteht. Nicht zuletzt sind eine Wiederholbarkeit des Experiments und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse durch den individuellen Charakter der menschlichen Hepatozyten aufgrund verschiedener genetischer und medizinischer Hintergründe nicht gegeben.

Die simultane Modellidentifikation basierend auf primären Hepatozyten verschiedener Individuen veranschaulichte den individuellen Charakter des Arzneimittelmetabolismus in der Leber. Außerdem zeigte sie die inter-individuelle Variabilität der Ratenparameter, nicht nur der Phase I und Phase II Enzyme, sondern auch der Transportenzyme. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass der AS-Metabolismus durch den Abbau per Beta-Oxidation und andere bislang unbekannte Effekte in Patienten, die an Diabetes mellitus Typ 2 leiden, beeinflusst wird.

Der individuelle Charakter des Fremdstoffmetabolismus wurde in dieser Arbeit detaillierter bezüglich der inter-individuellen Variabilität des Expressionslevels der CYP3A4- und UGT1A3-Proteine untersucht. Dazu wurden dynamische Analysen an dem verifizierten Modell durchgeführt, indem ein umfangreicher Satz an humanen Proteinkonzentrationswerten aus einer Leberdatenbank in den Simulationen implementiert wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Variabilität den Fremdstoffmetabolismus stark beeinflusst und veranschaulichen somit den individuellen Charakter des AS-Abbaus. Dies deutet folglich auch auf den individuellen Charakter der Pharmakodynamik von AS an seinem Wirkort, der HMGCoA-Reduktase, hin. Um eine bessere Prädiktion zu erreichen, sollten die Analysen jedoch auch die Variabilität der Transport-Enzyme mit einschließen, indem quantitative Konzentrationswerte der Transport-Proteine in ähnlicher Weise implementiert werden. Die hierfür notwendigen Daten sind jedoch zurzeit nicht verfügbar.



## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Untersuchung des Fremdstoffmetabolismus in dieser Arbeit hat aufgezeigt, dass die Modellierung und Simulation des Metabolismus und der Transportvorgänge in Leberzellen einen wichtigen Bestandteil zur Vorhersage der Toxizität von Arzneimitteln darstellen. Dabei spielen die quantitative Bestimmung der Modellparameter und die qualitative Beurteilung in Form von Identifizierbarkeit und Sensitivität der Parameter eine entscheidende Rolle. Nur eine qualitativ hochwertige Modellierung ermöglicht die Prädiktion der pharmakokinetischen Eigenschaften der Arzneimittel in der Leber und weiter die Vorhersage der inter-individuellen Ausprägungen und eine statistische Analyse in der Population.

Da der Metabolismus von Arzneimitteln in Leberzellen in einem modular in Phase I und Phase II strukturierten Enzymsystem katalysiert wird, und dieses Enzymsystem durch eine große Zahl an verschiedenen Isoenzymen gekennzeichnet ist, stellt dieses Netzwerk ein relativ robustes System dar. Dieses Ergebnis konnte sowohl anhand der topologischen Strukturanalyse auf Basis von Elementaren Flussmoden als auch anhand einer globalen Analyse der Parametersensitivitäten gezeigt werden. Andererseits ist aber durch verschiedene evolutionäre, biologische, nährungs- und umweltbedingte Faktoren eine hohe inter-individuelle Variabilität in diesem Enzymsystem existent, die eine kompensierende Fragilität darstellt und die individuell entweder zu erhöhter Toxizität durch geringen Abbau in der Leber oder zu Wirkungslosigkeit durch zu schnellen Abbau oder Ausscheidung führen könnte. Daher kommt der Berücksichtigung der detaillierten Isoenzym-Struktur und individuellen Ausprägung in der Modellierung eine besondere Bedeutung zu. Die Aufschlüsselung der Reaktionskinetiken und Unterscheidung zwischen  $r_{max}$  und  $K_M$  ermöglicht weiterhin die Implementierung individueller Patientendaten in diesen Parametern und damit die Untersuchung der individuellen Ausprägung des Metabolismus, wie es in dieser Arbeit in der statistischen Auswertung einer Stichprobenmenge an humanen CYP- und UGT-Proteindaten verfolgt wurde.

Diese Studie konnte zeigen, dass die Isoenzym-Modellierung deutliche Unterschiede in der Prädiktion im Vergleich zu einer reduzierten Darstellung mit Masterenzymen des Phase-I-CYP-Systems aufweist, und dass diese reduzierte Modellierungsweise unter Umständen zu falschen Prädiktionen führen könnte. Allerdings zeigte die Modellverifikation, dass diese Isoenzym-Struktur auf Basis von experimentellen Daten an Mikrosomen kaum identifizierbar ist, da die Schätzung der Parameter in mehreren parallelen Ansätzen zu unterschiedlichen

Parametersätzen führt, und das System somit insensitive und nicht-identifizierbare Parameter aufweist. Auch wenn die Variabilität der geschätzten Parameter in der Modellverifikation die inter-individuelle Variabilität der Enzyme verbildlicht, führte die offensichtliche Insensitivität der Parameter zu keiner verlässlichen Prädiktion der inter-individuellen Variabilität des Abbaumetabolismus in Leberzellen.

Die Identifizierbarkeit eines Isoenzym-Systems kann verbessert werden, wenn die  $K_M$ -Parameter nicht geschätzt, sondern aus der Untersuchung an rekombinanten CYP-Isoenzym-Systemen vorgegeben werden. Jedoch zeigte die Parameterschätzung, dass wiederum nur einzelne Isoenzyme ausreichen, um die experimentellen Daten beschreiben zu können, jedoch nicht die gesamte Isoenzymstruktur benötigt wird. Daher erlaubt die Modellidentifikation an einer individuellen Charge an Lebermikrosomen nur die Beobachtung der Isoenzyme, die in diesem Individuum signifikant exprimiert sind, und die Identifizierbarkeit von mehreren Isoenzymen nur dann, wenn diese in der experimentellen Untersuchung aufgelöst werden können, das heißt stark unterschiedliche  $K_M$ -Parameter aufweisen. Daher würde eine Modellsimulation des Abbaus in Individuen mit Isoenzymen, die eine hohe Expression und Aktivität aufweisen, aber nicht in der Modellverifikation am Referenzindividuum erfasst werden können, wiederum zu falschen und nicht-zulässigen Modellvorhersagen führen. Eine weitere Problematik in der Untersuchung des Arzneimittelmetabolismus an humanen Lebermikrosomen liegt darin, dass die Kinetik von potentiell mehreren Isoenzymen nicht von der potentiellen Kinetik eines einzelnen Enzyms mit mehreren katalytischen Zentren unterschieden werden kann.

Folglich zeigt das Ergebnis dieser Arbeit, dass die detaillierte Untersuchung der Reaktionskinetik an rekombinanten Isoenzym-Systemen vielversprechender und aussagekräftiger ist als an Lebermikrosomen, wenn der Metabolismus eines Arzneimittels von mehreren beteiligten Isoenzymen katalysiert wird. Damit kann die Modellidentifikation von der Beschränkung der enzymatischen Ausstattung des experimentellen Referenzsystems und der Problematik der nicht auflösbaren überlagernden Beteiligung mehrerer Isoenzyme entkoppelt werden. Unter dem damit notwendigen Einsatz von High-Throughput-Systemen lässt sich damit die komplexe Reaktionskinetik an CYP-Enzymen weiter aufschlüsseln und der in dieser Arbeit gewählte Ansatz des alternativen Substratabbaus zu alternativen Produkten auf allosterische Enzyme mit komplexeren Reaktionsmechanismen [61] übertragen.

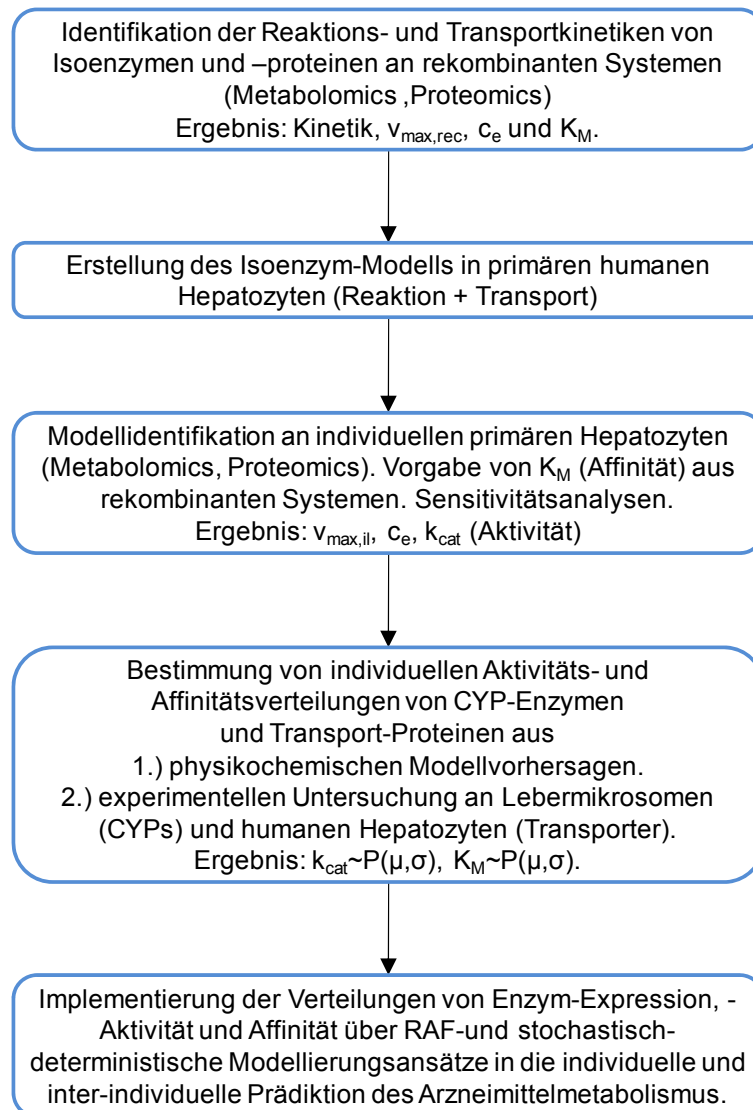
Da der Aufwand der experimentellen Validierung mit der Komplexität dieses Systems jedoch unverhältnismäßig stark zunimmt, kommt auch der computergestützten Simulation der

Bindungs- und Umsetzungsvorgänge von Arzneimitteln an den aktiven Zentren der Enzyme auf Molekularebene, und der Vorhersage der metabolischen Reaktionen und Enzympartnern auf Basis der physikochemischen Eigenschaften der Substanzen, wie sie in den Teilprojekten SP1 und SP2 im Rahmen der „Hepatosys“-Förderinitiative im Netzwerk Stuttgart „Detoxifikation“ angestrengt wurden, in Zukunft stärkere Bedeutung zu. Eine Weiterentwicklung dieser Methoden zur quantitativen Schätzung mechanistischer Modellparameter, wie zum Beispiel  $K_M$  oder  $k_{cat}$ , ist wünschenswert. Dies würde auch die Untersuchung der bekannten Enzym-Polymorphismen ermöglichen, die wahrscheinlich zur inter-individuellen Variabilität der Enzymaktivität ( $k_{cat}$ ) [62] und -affinität ( $K_M$ ) [63] führt. Die Implementierung dieser Verteilungen in die dynamische Modellprädiktion könnte dann vermutlich über erweiterte „*relative-activity-factor-(RAF)*“-Ansätze [42, 64] und stochastisch-deterministische Modellierungsansätze durchgeführt werden.

Der im ersten Teil der Arbeit ausführlich beschriebene Ansatz einer Modellierung an humanen Mikrosomen oder rekombinanten Isoenzymen ist für die Untersuchung des Metabolismus als erster Schritt zwar essentiell, stellt aber eine isolierte Betrachtungsweise dar, bei der die Transportvorgänge nicht berücksichtigt werden. Der Transport spielt jedoch eine entscheidende Rolle in der Elimination und der Ausscheidung der Arzneimittel aus den Leberzellen und damit aus dem Körper, daher wurden die Transportvorgänge im zweiten Teil der Arbeit in der Modellierung berücksichtigt.

Die Modellverifikation an primären humanen Hepatozyten zeigte in ähnlicher Weise zu der Isoenzym-Modellierung und Verifikation an Mikrosomen insensitive und linear korrelierende Transportparameter. In dieser Arbeit konnte eine Möglichkeit der Modellreduktion auf Basis einer lokalen Parametersensitivitätsanalyse erfolgreich aufgezeigt werden, was zu sensitiven Parametern führt und damit verlässliche Modellprädiktionen zulassen würde. Allerdings sollte die Modellverifikation in Zukunft durch die Implementierung von experimentellen Daten und Parametern aus Untersuchungen an rekombinanten Transportsystemen ergänzt werden. Damit können die Kinetiken der beteiligten Proteine in den Transportvorgängen isoliert identifiziert werden, und weiter von dem Einfluss der passiven Diffusion, was gerade bei lipophilen Substanzen bedeutend sein kann, unterschieden werden. Dies könnte dann zu einer weiteren Modellverbesserung führen. Da die Prädiktion der inter-individuellen Variabilität von quantitativen Proteindaten abhängig ist, kommt der Weiterentwicklung der quantitativen Analytik der CYP- und UGT-Proteine und die Entwicklung entsprechender quantitativer Methoden für Transportproteine, OATP, MDR1 und MRP2, eine weitere wesentliche Rolle in zukünftigen Untersuchungen zu.

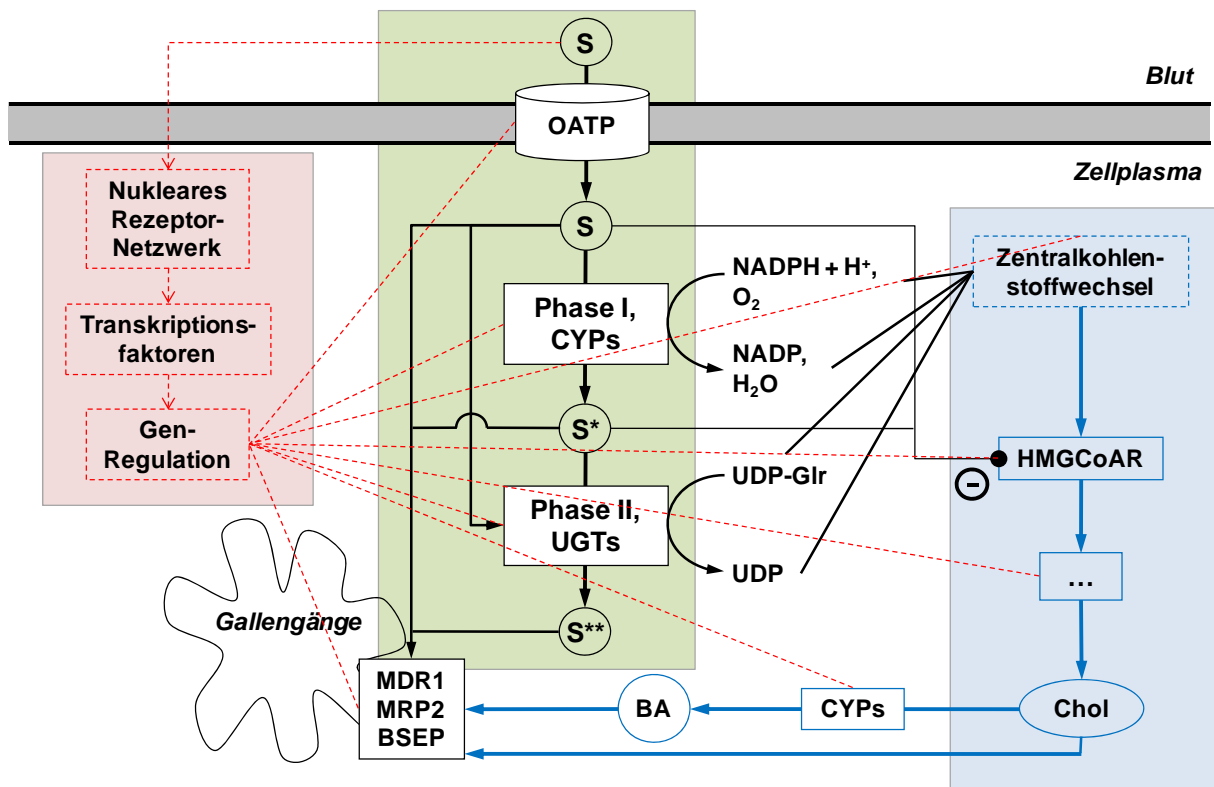
In Zusammenfassung der vorangegangenen Abschnitte ist das in **Abb. 51** schematisierte mögliche Verfahren zur qualitativ hochwertigen Modellprädiktion des individuellen Arzneimittelmetabolismus und der inter-individuellen Variabilität aufgezeigt.



**Abb. 51:** Mögliche Vorgehensweise in der Modellierung zur Prädiktion des individuellen Arzneimittelmetabolismus und der inter-individuellen Variabilität

Schließlich darf die Modellierung und dynamische Analyse des Fremdstoffmetabolismus nicht auf der isolierten Betrachtungsweise, das heißt entkoppelt von den anderen Vorgängen in der Zelle, stehen bleiben. In der zweiten Förderphase zeigte sich im Netzwerk Detoxifikation in den Untersuchungen mit dem Modellsubstrat AS die enge Verknüpfung von Arzneimittelmetabolismus mit Zentralkohlenstoffwechsel und Genregulation (**Abb. 52**). Neben der Rolle des Zentralkohlenstoffwechsels als Lieferant von essentiellen Reduktionsäquivalenten, Cofaktoren und Energiemetaboliten kommt vor allem der Wechselwirkung von Arzneimitteln und endogenen Substanzen in gemeinsamen metabolischen Reaktionspfaden, unter funktionalen und dysfunktionalen Bedingungen, eine

große Bedeutung zu. Des Weiteren finden sowohl Pharmakokinetik, also der Abbau, als auch Pharmakodynamik, die medizinische Wirkung auf molekularer Ebene, dieses Substrats in dem gleichen zellulären Kompartiment der Leberzelle statt. Außerdem ist weithin bekannt, dass Statine selbst die Genregulation der am Metabolismus und Transport beteiligten Enzyme durch Bindung an nukleare Rezeptoren und der Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren induzieren können.

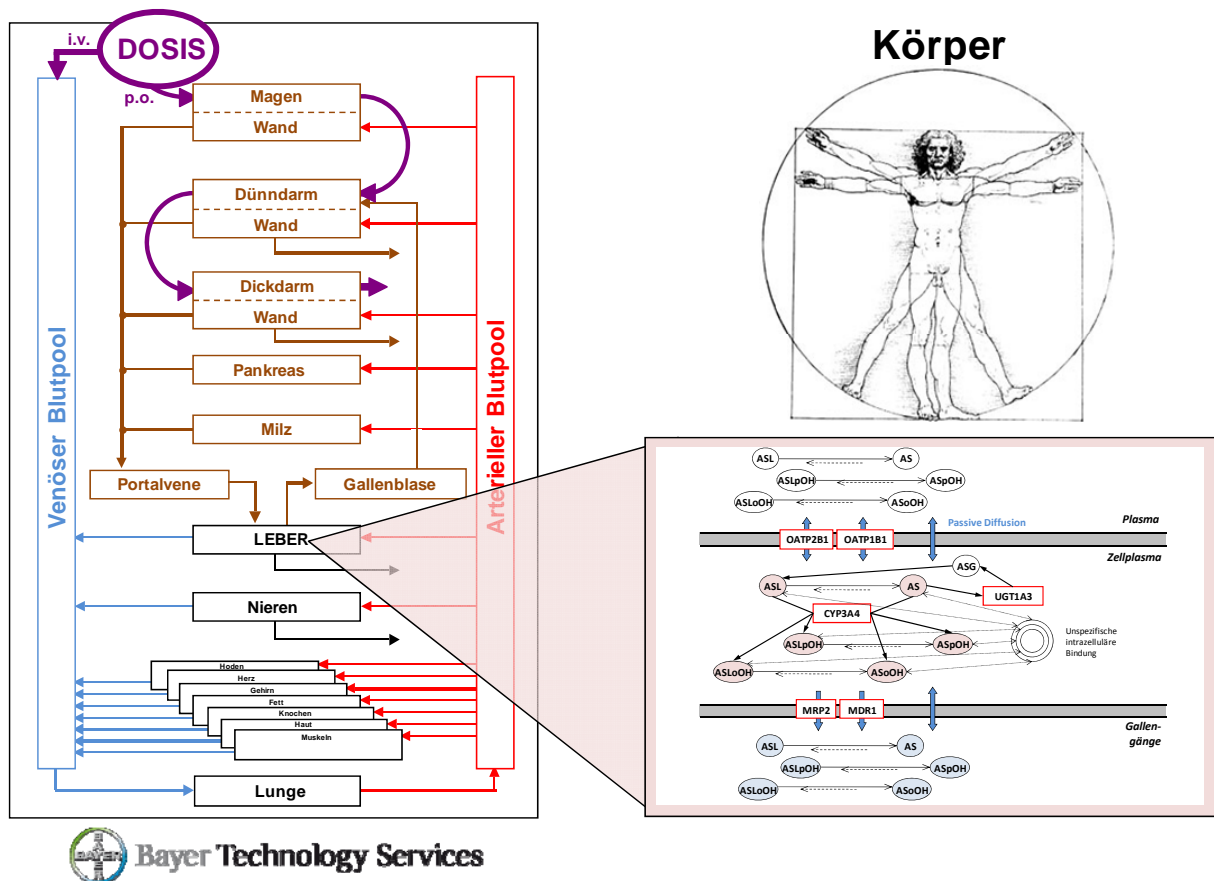


**Abb. 52:** Zusammenhang zwischen Arzneimittelmetabolismus, Zentralkohlenstoffwechsel und Genregulation in humanen Hepatozyten am Beispiel der Statine. Im Arzneimittelmetabolismus (grün gekennzeichnet) werden die Statine aus dem Blut aufgenommen, in zwei Phasen metabolisiert und in die Gallengänge ausgeschieden. Im Zentralkohlenstoffwechsel (blau gekennzeichnet) inhibieren Statine die HMGCoA-Reduktase und verringern somit die Cholesterol-Synthese. Damit sind Pharmakokinetik und -dynamik im gleichen zellulären Kompartiment lokalisiert. Der Zentralkohlenstoffwechsel dient der Versorgung des Statin-Abbaumetabolismus mit Cofaktoren und -metaboliten. Statine binden im genregulatorischen Netzwerk (rot gekennzeichnet) an nukleare Rezeptoren, leiten die Signaltransduktion an Transkriptionsfaktoren ein, und induzieren somit die Genregulation verschiedener Proteine und Enzyme in der Zelle. Ein Beispiel ist die Induktion der eigenen Abbauenzyme, CYP3A4, durch Statine.

Daher muss in Zukunft die ganzheitliche computergestützte Modellierung und Analyse des Arzneimittelmetabolismus im Zusammenspiel mit der Genregulation und dem Zentralkohlenstoffwechsel stärker hervorgehoben werden. In einer Kopplung dieses Moduls des Arzneimittelmetabolismus mit dem Modul der Genregulation, ausgearbeitet von Prem Kumar Murugan im Teilprojekt SP5, und mit dem Modul des Zentralkohlenstoffwechsels, ausgearbeitet von Klaus Maier im Teilprojekt SP7 (Netzwerk Stuttgart Detoxifikation, siehe

**Abschnitt 1.1**), könnten damit die Auswirkungen der Induktion der Genexpression und der Einfluss des Zentralkohlenstoffwechsels auf den Arzneimittelabbau und vice versa, insbesondere auch unter Stoffwechselstörungen, genauer analysiert werden.

Ein weiteres zukünftiges Potential liegt in der Implementierung des Detoxifikations-Moduls in Ganzkörper-skalierte Multikompartment-Modelle, die nach dem Ansatz der physiologisch-basierten pharmakokinetischen Modellierung (PBPK) erstellt wurden, in entsprechenden Softwareumgebungen wie zum Beispiel PK-Sim [47] (**Abb. 53**).



**Abb. 53:** Integration des Moduls des Statin-Metabolismus in primären Hepatozyten in ein Ganzkörper-Multikompartimentmodell. Der Statin-Metabolismus (rechts unten) könnte in ein Ganzkörpermodell (Proportionsstudie „Der vitruvianische Mensch“, 1492, Lizenz Wikimedia Commons, rechts oben,) im PBPK-Ansatz (*physiologically-based pharmacokinetics*) in einer Softwareumgebung wie PK-Sim (Modellschema wurde von Bayer Technology Services GmbH, Leverkusen, zur Verfügung gestellt; links) implementiert werden.

Damit würden holistische Simulationen unter gleichzeitiger Berücksichtigung der systemischen Vorgänge im Körper die Untersuchung der Auswirkung anderer individueller Faktoren, wie zum Beispiel der Fettanteil im Körper oder Blutzirkulation, und des Einflusses der Pharmakokinetik in anderen Organen, wie Magen und Darm, ermöglichen. In diesem Kontext könnte damit die inter-individuelle *in-silico*-Prädiktion verbessert und ein weiter Fortschritt in der Entwicklung der personalisierten Medizin erreicht werden.

Teile dieser Arbeit wurden in dem *Research Article* “A Systems Biology Approach to Dynamic Modeling and Inter-Subject Variability of Statin Pharmacokinetics in Human Hepatocytes” (Autoren: Joachim Bucher, Stephan Riedmaier, Anke Schnabel, Katrin Marcus, Gabriele Vacun, Thomas S. Weiss, Wolfgang E. Thasler, Andreas K. Nüssler, Ulrich M Zanger, Matthias Reuss) in dem Journal *BMC Systems Biology* 2011, **5**:66, veröffentlicht.





---

## Literatur

1. Bugrim A, Nikolskaya T, Nikolsky Y: **Early prediction of drug metabolism and toxicity: systems biology approach and modeling.** *Drug Discovery Today* 2004, **9**:127-135.
2. Huisinga W, Telgmann R, Wulkow M: **The virtual laboratory approach to pharmacokinetics: design principles and concepts.** *Drug Discovery Today* 2006, **11**:800-805.
3. van de Waterbeemd H, Gifford E: **ADMET in silico modelling: Towards prediction paradise?** *Nature Reviews Drug Discovery* 2003, **2**:192-204.
4. Kuntz E, Kuntz H-D: *Hepatology: Principles and Practice.* Heidelberg: Springer-Verlag; 2002.
5. Yan Z, Caldwell GW: **Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery.** *Curr Top Med Chem* 2001, **1**:403-425.
6. Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R: **Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction.** *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2006, **2**:875-894.
7. Lin JH, Lu AYH: **Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2001, **41**:535-567.
8. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP: **Interindividual Variations in Human Liver Cytochrome-P-450 Enzymes Involved in the Oxidation of Drugs, Carcinogens and Toxic-Chemicals - Studies with Liver-Microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1994, **270**:414-423.
9. Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Bacchi CE, Marsh CL, Mcvicar JP, Barr DM, Perkins JD, Carithers RL: **Use of Midazolam as a Human Cytochrome-P450-3a Probe .2. Characterization of Interindividual and Intraindividual Hepatic Cyp3a Variability after Liver-Transplantation.** *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1994, **271**:557-566.
10. Lang T, Klein K, Fischer J, Nussler AK, Neuhaus P, Hofmann U, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM: **Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver.** *Pharmacogenetics* 2001, **11**:399-415.
11. Ekroos M, Sjogren T: **Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:13682-13687.
12. Dorne JL, Walton K, Renwick AG: **Human variability in CYP3A4 metabolism and CYP3A4-related uncertainty factors for risk assessment.** *Food Chem Toxicol* 2003, **41**:201-224.
13. Kaefenstein H: **Forensic relevance of glucuronidation in phase-II-metabolism of alcohols and drugs.** *Leg Med (Tokyo)* 2009, **11 Suppl 1**:S22-26.
14. Miners JO, Knights KM, Houston JB, Mackenzie PI: **In vitro-in vivo correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans: pitfalls and promises.** *Biochem Pharmacol* 2006, **71**:1531-1539.
15. Pachkoria K, Lucena MI, Molokhia M, Cueto R, Carballo AS, Carvajal A, Andrade RJ: **Genetic and molecular factors in drug-induced liver injury: a review.** *Curr Drug Saf* 2007, **2**:97-112.

16. Nishimura M, Naito S: **Tissue-specific mRNA expression profiles of human ATP-binding cassette and solute carrier transporter superfamilies.** *Drug Metab Pharmacokinet* 2005, **20**:452-477.
17. Hamelin BA, Turgeon J: **Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors.** *Trends in Pharmacological Sciences* 1998, **19**:26-37.
18. Kitano H: **Biological robustness.** *Nat Rev Genet* 2004, **5**:826-837.
19. Stelling J, Sauer U, Szallasi Z, Doyle FJ, 3rd, Doyle J: **Robustness of cellular functions.** *Cell* 2004, **118**:675-685.
20. Barkai N, Alon U, Leibler S: **Robust amplification in adaptive signal transduction networks.** *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iv Physique Astrophysique* 2001, **2**:871-877.
21. Barkai N, Leibler S: **Robustness in simple biochemical networks.** *Nature* 1997, **387**:913-917.
22. Draghi JA, Parsons TL, Wagner GP, Plotkin JB: **Mutational robustness can facilitate adaptation.** *Nature* 2010, **463**:353-355.
23. Grimbs S, Selbig J, Bulik S, Holzhutter HG, Steuer R: **The stability and robustness of metabolic states: identifying stabilizing sites in metabolic networks.** *Mol Syst Biol* 2007, **3**:146.
24. Ma L, Iglesias PA: **Quantifying robustness of biochemical network models.** *BMC Bioinformatics* 2002, **3**:38.
25. Stelling J, Gilles ED, Doyle FJ, 3rd: **Robustness properties of circadian clock architectures.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:13210-13215.
26. Cornish-Bowden A: **Putting the systems back into systems biology.** *Perspectives in Biology and Medicine* 2006, **49**:475-489.
27. Kitano H: **Systems biology: a brief overview.** *Science* 2002, **295**:1662-1664.
28. Spivey A: **Systems biology - The big picture.** *Environmental Health Perspectives* 2004, **112**:A938-A943.
29. de Groot MJ, Ekins S: **Pharmacophore modeling of cytochromes P450.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, **54**:367-383.
30. Gasteiger J, Reitz M, Han YQ, Sacher O: **Analyzing biochemical pathways using neural networks and genetic algorithms.** *Australian Journal of Chemistry* 2006, **59**:854-858.
31. Korolev D, Balakin KV, Nikolsky Y, Kirillov E, Ivanenkov YA, Savchuk NP, Ivashchenko AA, Nikolskaya T: **Modeling of human cytochrome P450-mediated drug metabolism using unsupervised machine learning approach.** *Journal of Medicinal Chemistry* 2003, **46**:3631-3643.
32. Lewis DFV, Ioannides C, Parke DV: **An improved and updated version of the compact procedure for the evaluation of P450-mediated chemical activation.** *Drug Metabolism Reviews* 1998, **30**:709-737.
33. Lewis DFV, Ioannides C, Parke DV: **Further evaluation of COMPACT, the molecular orbital approach for the prospective safety evaluation of chemicals.** *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 1998, **412**:41-54.
34. Terfloth L, Bienfait B, Gasteiger J: **Ligand-based models for the isoform specificity of cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 substrates.** *Journal of Chemical Information and Modeling* 2007, **47**:1688-1701.
35. Zhang EY, Phelps MA, Cheng C, Ekins S, Swaan PW: **Modeling of active transport systems.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002, **54**:329-354.
36. Ekins S, Erickson JA: **A pharmacophore for human pregnane X receptor ligands.** *Drug Metabolism and Disposition* 2002, **30**:96-99.

37. Ekins S, Mirny L, Schuetz EG: **A ligand-based approach to understanding selectivity of nuclear hormone receptors PXR, CAR, FXR, LXR alpha, and LXR beta.** *Pharmaceutical Research* 2002, **19**:1788-1800.
38. Hou TJ, Wang JM, Li YY: **ADME evaluation in drug discovery. 8. The prediction of human intestinal absorption by a support vector machine.** *Journal of Chemical Information and Modeling* 2007, **47**:2408-2415.
39. Hou TJ, Wang JM, Zhang W, Xu XJ: **ADME evaluation in drug discovery. 6. Can oral bioavailability in humans be effectively predicted by simple molecular property-based rules?** *Journal of Chemical Information and Modeling* 2007, **47**:460-463.
40. Hou TJ, Zhang W, Xia K, Qiao XB, Xu XJ: **ADME evaluation in drug discovery. 5. Correlation of Caco-2 permeation with simple molecular properties.** *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 2004, **44**:1585-1600.
41. Leonard JT, Roy K: **On selection of training and test sets for the development of predictive QSAR models.** *Qsar & Combinatorial Science* 2006, **25**:235-251.
42. Rostami-Hodjegan A, Tucker GT: **Simulation and prediction of in vivo drug metabolism in human populations from in vitro data.** *Nature Reviews Drug Discovery* 2007, **6**:140-148.
43. Andersen ME: **Development of Physiologically-Based Pharmacokinetic and Physiologically-Based Pharmacodynamic Models for Applications in Toxicology and Risk Assessment.** *Toxicology Letters* 1995, **79**:35-44.
44. Gerlowski LE, Jain RK: **Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling - Principles and Applications.** *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1983, **72**:1103-1127.
45. Reddy M, Yang RS, Andersen ME, Clewell I, H. J.: *Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling.* John Wiley & Sons; 2005.
46. Thompson CM, Sonawane B, Barton HA, DeWoskin RS, Lipscomb JC, Schlosser P, Chiu WA, Krishnan K: **Approaches for applications of physiologically based pharmacokinetic models in risk assessment.** *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* 2008, **11**:519-547.
47. Willmann S, Lippert J, Sevestre M, Solodenko J, Fois F, Schmitt W: **PK-Sim®: a physiologically based pharmacokinetic 'whole-body' model.** *Biosilico* 2003, **1**.
48. Balani SK, Miwa GT, Gan LS, Wu JT, Lee FW: **Strategy of utilizing in vitro and in vivo ADME tools for lead optimization and drug candidate selection.** *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2005, **5**:1033-1038.
49. Boobis A, Gundert-Remy U, Kremers P, Macheras P, Pelkonen O: **In silico prediction of ADME and pharmacokinetics. Report of an expert meeting organised by COST B15.** *Eur J Pharm Sci* 2002, **17**:183-193.
50. Hop CECA, Cole MJ, Davidson RE, Duignan DB, Federico J, Janiszewski JS, Jenkins K, Krueger S, Lebowitz R, Liston TE, Mitchell W, Snyder M, Steyn SJ, Soglia JR, Taylor C, Troutman MD, Umland J, West M, Whalen KM, Zelesky V, Zhao SX: **High Throughput ADME Screening: Practical Considerations, Impact on the Portfolio and Enabler of In Silico ADME Models.** *Current Drug Metabolism* 2008, **9**:847-853.
51. Singh SS: **Preclinical pharmacokinetics: An approach towards safer and efficacious drugs.** *Current Drug Metabolism* 2006, **7**:165-182.
52. Nestorov I: **Whole-body physiologically based pharmacokinetic models.** *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2007, **3**:235-249.
53. Aggarwal K, Lee KH: **Functional genomics and proteomics as a foundation for systems biology.** *Brief Funct Genomic Proteomic* 2003, **2**:175-184.

54. Bartholome K, Rius M, Letschert K, Keller D, Timmer J, Keppler D: **Data-based mathematical modeling of vectorial transport across double-transfected polarized cells.** *Drug Metab Dispos* 2007, **35**:1476-1481.
55. Rizzi M, Baltes M, Theobald U, Reuss M: **In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. Mathematical model.** *Biotechnol Bioeng* 1997, **55**:592-608.
56. Theobald U, Mailinger W, Baltes M, Rizzi M, Reuss M: **In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae* : I. Experimental observations.** *Biotechnol Bioeng* 1997, **55**:305-316.
57. Schaub J, Mauch K, Reuss M: **Metabolic flux analysis in *Escherichia coli* by integrating isotopic dynamic and isotopic stationary <sup>13</sup>C labeling data.** *Biotechnol Bioeng* 2008, **99**:1170-1185.
58. Schaub J, Reuss M: **In vivo dynamics of glycolysis in *Escherichia coli* shows need for growth-rate dependent metabolome analysis.** *Biotechnol Prog* 2008, **24**:1402-1407.
59. Hofmann U, Maier K, Niebel A, Vacun G, Reuss M, Mauch K: **Identification of metabolic fluxes in hepatic cells from transient <sup>13</sup>C-labeling experiments: Part I. Experimental observations.** *Biotechnol Bioeng* 2008, **100**:344-354.
60. Maier K, Hofmann U, Reuss M, Mauch K: **Identification of metabolic fluxes in hepatic cells from transient <sup>13</sup>C-labeling experiments: Part II. Flux estimation.** *Biotechnol Bioeng* 2008, **100**:355-370.
61. Shou M, Lin Y, Lu P, Tang C, Mei Q, Cui D, Tang W, Ngui JS, Lin CC, Singh R, Wong BK, Yergey JA, Lin JH, Pearson PG, Baillie TA, Rodrigues AD, Rushmore TH: **Enzyme kinetics of cytochrome P450-mediated reactions.** *Curr Drug Metab* 2001, **2**:17-36.
62. Rodriguez-Antona C, Donato MT, Pareja E, Gomez-Lechon MJ, Castell JV: **Cytochrome P-450 mRNA expression in human liver and its relationship with enzyme activity.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001, **393**:308-315.
63. Sy SK, Ciaccia A, Li W, Roberts EA, Okey A, Kalow W, Tang BK: **Modeling of human hepatic CYP3A4 enzyme kinetics, protein, and mRNA indicates deviation from log-normal distribution in CYP3A4 gene expression.** *Eur J Clin Pharmacol* 2002, **58**:357-365.
64. Venkatakrishnan K, von Moltke LL, Court MH, Harmatz JS, Crespi CL, Greenblatt DJ: **Comparison between cytochrome P450 (CYP) content and relative activity approaches to scaling from cDNA-expressed CYPs to human liver microsomes: ratios of accessory proteins as sources of discrepancies between the approaches.** *Drug Metab Dispos* 2000, **28**:1493-1504.
65. Andrade RJ, Robles M, Ulzurrun E, Lucena MI: **Drug-induced liver injury: insights from genetic studies.** *Pharmacogenomics* 2009, **10**:1467-1487.
66. Zhou SF, Lai X: **An update on clinical drug interactions with the herbal antidepressant *St. John's wort*.** *Curr Drug Metab* 2008, **9**:394-409.
67. Pang KS, Rowland M: **Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a "well-stirred" model and a "parallel tube" model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance.** *J Pharmacokinet Biopharm* 1977, **5**:625-653.
68. Pang KS, Rowland M: **Hepatic clearance of drugs. III. Additional experimental evidence supporting the "well-stirred" model, using metabolite (MEGX) generated from lidocaine under varying hepatic blood flow rates and linear conditions in the perfused rat liver in situ preparation.** *J Pharmacokinet Biopharm* 1977, **5**:681-699.

- 
69. Pang KS, Rowland M: **Hepatic clearance of drugs. II. Experimental evidence for acceptance of the "well-stirred" model over the "parallel tube" model using lidocaine in the perfused rat liver in situ preparation.** *J Pharmacokinetic Biopharm* 1977, **5**:655-680.
70. Wilkinson GR, Shand DG: **Commentary: a physiological approach to hepatic drug clearance.** *Clin Pharmacol Ther* 1975, **18**:377-390.
71. Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Nakajima Y, Sugiyama Y: **Quantitative prediction of in vivo drug clearance and drug interactions from in vitro data on metabolism, together with binding and transport.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998, **38**:461-499.
72. Miners JO, Smith PA, Sorich MJ, McKinnon RA, Mackenzie PI: **Predicting human drug glucuronidation parameters: application of in vitro and in silico modeling approaches.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004, **44**:1-25.
73. Houston JB, Kenworthy KE: **In vitro-in vivo scaling of CYP kinetic data not consistent with the classical Michaelis-Menten model.** *Drug Metab Dispos* 2000, **28**:246-254.
74. Paine SW, Parker AJ, Gardiner P, Webborn PJH, Riley RJ: **Prediction of the pharmacokinetics of atorvastatin, cerivastatin, and indomethacin using kinetic models applied to isolated rat hepatocytes.** *Drug Metabolism and Disposition* 2008, **36**:1365-1374.
75. Atkins WM: **Non-Michaelis-Menten kinetics in cytochrome P450-catalyzed reactions.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005, **45**:291-310.
76. Galetin A, Clarke SE, Houston JB: **Quinidine and haloperidol as modifiers of CYP3A4 activity: multisite kinetic model approach.** *Drug Metab Dispos* 2002, **30**:1512-1522.
77. Heinkele G, Schanzle G, Murdter TE: **Synthesis of [H-2(3)]-dextromethorphan and its major urinary metabolites [H-2(3)]-dextrorphan and [H-2(3)]-dextrorphan-beta-glucuronide.** *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* 2002, **45**:1153-1158.
78. Thasler WE, Weiss TS, Schillhorn K, Stoll PT, Irrgang B, Jauch KW: **Charitable State-Controlled Foundation Human Tissue and Cell Research: Ethic and Legal Aspects in the Supply of Surgically Removed Human Tissue For Research in the Academic and Commercial Sector in Germany.** *Cell Tissue Bank* 2003, **4**:49-56.
79. Andreas K, Nussler, Natascha C, Nussler, Vera Merk, Marc Brulport, Wiebke Schormann, Ping Yao, Hengstler JG: **The Holy grail of hepatocyte culturing and therapeutic use. .** In *Strategies in Regenerative Medicine*. Edited by Santin M. New York: Springer; 2008
80. Saussele T, Burk O, Bliedernicht JK, Klein K, Nussler A, Nussler N, Hengstler JG, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM: **Selective induction of human hepatic cytochromes P450 2B6 and 3A4 by metamizole.** *Clin Pharmacol Ther* 2007, **82**:265-274.
81. Lang T, Klein K, Richter T, Zibat A, Kerb R, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM: **Multiple novel nonsynonymous CYP2B6 gene polymorphisms in Caucasians: demonstration of phenotypic null alleles.** *J Pharmacol Exp Ther* 2004, **311**:34-43.
82. Coller JK, Krebsfaenger N, Klein K, Endrizzi K, Wolbold R, Lang T, Nussler A, Neuhaus P, Zanger UM, Eichelbaum M, Murdter TE: **The influence of CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genotypes on the formation of the potent antioestrogen Z-4-hydroxy-tamoxifen in human liver.** *Br J Clin Pharmacol* 2002, **54**:157-167.
83. Zanger UM, Fischer J, Raimundo S, Stuken T, Evert BO, Schwab M, Eichelbaum M: **Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6.** *Pharmacogenetics* 2001, **11**:573-585.

84. Wolbold R, Klein K, Burk O, Nussler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM: **Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver.** *Hepatology* 2003, **38**:978-988.
85. Riedmaier S, Klein K, Hofmann U, Keskitalo JE, Neuvonen PJ, Schwab M, Niemi M, Zanger UM: **UDP-glucuronosyltransferase (UGT) polymorphisms affect atorvastatin lactonization in vitro and in vivo.** *Clin Pharmacol Ther* 2009, **87**:65-73.
86. Langenfeld E, Zanger UM, Jung K, Meyer HE, Marcus K: **Mass spectrometry-based absolute quantification of microsomal cytochrome P450 2D6 in human liver.** *Proteomics* 2009, **9**:2313-2323.
87. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
88. Deuffhard P, Hairer E, Zugck J: **One-Step and Extrapolation Methods for Differential-Algebraic Systems.** *Numerische Mathematik* 1987, **51**:501-516.
89. Klamt S, Saez-Rodriguez J, Gilles ED: **Structural and functional analysis of cellular networks with CellNetAnalyzer.** *BMC Syst Biol* 2007, **1**:2.
90. Klamt S, Stelling J, Ginkel M, Gilles ED: **FluxAnalyzer: exploring structure, pathways, and flux distributions in metabolic networks on interactive flux maps.** *Bioinformatics* 2003, **19**:261-269.
91. Schuster S, Fell DA, Dandekar T: **A general definition of metabolic pathways useful for systematic organization and analysis of complex metabolic networks.** *Nature Biotechnology* 2000, **18**:326-332.
92. Schuster S, Kholodenko BN, Westerhoff HV: **Cellular information transfer regarded from a stoichiometry and control analysis perspective.** *Biosystems* 2000, **55**:73-81.
93. Klamt S, Gilles ED: **Minimal cut sets in biochemical reaction networks.** *Bioinformatics* 2004, **20**:226-234.
94. Streichert F, Ulmer H: **A Java based framework for Evolutionary Algorithms.** Tübingen: Wilhelm-Shickhard-Institut für Informatik (WSI), Centre for Bioinformatics Tübingen (ZBIT), Eberhard-Karls-University Tübingen, Germany; 2005.
95. Poland J, Zell A: **Main Vector Adaptation: A CMA Variant with Linear Time and Space Complexity.** In *Proceedings of the Genetic and Evolutionary Computation Conference (GECCO-2001); Washington, D.C., USA.* 2001: 312-317.
96. Bronstein IN, Semendjajew KA, Musiol G, Mühlig H: *Taschenbuch der Mathematik.* 5. Auflage edn. Frankfurt am Main: Harri Deutsch; 2001.
97. Baltes M, Schneider R, Sturm C, Reuss M: **Optimal Experimental-Design for Parameter-Estimation in Unstructured Growth-Models.** *Biotechnology Progress* 1994, **10**:480-488.
98. Faller D, Klingmüller U, Timmer J: **Simulation methods for optimal experimental design in systems biology.** *Simulation-Transactions of the Society for Modeling and Simulation International* 2003, **79**:717-725.
99. Joshi M, Seidel-Morgenstern A, Kremling A: **Exploiting the bootstrap method for quantifying parameter confidence intervals in dynamical systems.** *Metabolic Engineering* 2006, **8**:447-455.
100. Ljung L: *Sytem Identification: Theory for the User.* New Jersey: Prentice Hall; 1999.
101. Munack A: **Optimization of Sampling.** In *Biotechnology - A Multi-Volume Comprehensive Treatise. Volume 4.* 2nd edition. Edited by Rehm HJ, Reed G, Schügerl K. Weinheim, New York: VCH; 1991: 251-264

102. Rodriguez-Fernandez M, Mendes P, Banga JR: **A hybrid approach for efficient and robust parameter estimation in biochemical pathways.** *Biosystems* 2006, **83**:248-265.
103. Zak DE, Gonye GE, Schwaber JS, Doyle FJ: **Importance of input perturbations and stochastic gene expression in the reverse engineering of genetic regulatory networks: Insights from an identifiability analysis of an in silico network.** *Genome Research* 2003, **13**:2396-2405.
104. Rojas CR, Welsh JS, Goodwin GC, Feuer A: **Robust optimal experiment design for system identification.** *Automatica* 2007, **43**:993-1008.
105. Schneider R, Posten C, Munack A: **Application of linear balance equations in an online observation system for fermentation processes.** In *5th International Conference on Computer Applications in Fermentation Technology; Keystone, Colorado*. Edited by Karim MN, Stephanopoulos G. Pergamon Press; 1992: 319-322.
106. Baltes M: **Entwurf eines metabolisch strukturierten Modells zur dynamischen Simulation des Katabolismus von *Saccharomyces cerevisiae*.** In *Fortschrittberichte VDI*, vol. Reihe 17: Biotechnik. Düsseldorf: VDI Verlag GmbH; 1996.
107. Cho KH, Shin SY, Kolch W, Wolkenhauer O: **Experimental design in systems biology, based on parameter sensitivity analysis using a Monte Carlo method: A case study for the TNF alpha-mediated NF-kappa B signal transduction pathway.** *Simulation-Transactions of the Society for Modeling and Simulation International* 2003, **79**:726-739.
108. Zi ZK, Cho KH, Sung MH, Xia XF, Zheng JS, Sun ZR: **In silico identification of the key components and steps in IFN-gamma induced JAK-STAT signaling pathway.** *Febs Letters* 2005, **579**:1101-1108.
109. Bluthgen N, Herzog H: **How robust are switches in intracellular signaling cascades?** *Journal of Theoretical Biology* 2003, **225**:293-300.
110. Kitano H: **Towards a theory of biological robustness.** *Molecular Systems Biology* 2007, **3**:-
111. Zi ZK, Sun ZR: **Robustness analysis of the IFN-gamma induced JAK-STAT signaling pathway.** *Journal of Computer Science and Technology* 2005, **20**:491-495.
112. Zi ZK, Zheng YA, Rundell AE, Klipp E: **SBML-SAT: a systems biology markup language (SBML) based sensitivity analysis tool.** *Bmc Bioinformatics* 2008, **9**:-
113. McKay MD, Beckman RJ, Conover WJ: **Comparison of 3 Methods for Selecting Values of Input Variables in the Analysis of Output from a Computer Code.** *Technometrics* 1979, **21**:239-245.
114. Tamminga WJ, Wemer J, Oosterhuis B, Wieling J, Touw DJ, de Zeeuw RA, de Leij LF, Jonkman JH: **Mephenytoin as a probe for CYP2C19 phenotyping: effect of sample storage, intra-individual reproducibility and occurrence of adverse events.** *Br J Clin Pharmacol* 2001, **51**:471-474.
115. Asha S, Vidyavathi M: **Role of Human Liver Microsomes in In Vitro Metabolism of Drugs-A Review.** *Appl Biochem Biotechnol* 2009.
116. Venkatakrishnan K, Von Moltke LL, Greenblatt DJ: **Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models.** *J Clin Pharmacol* 2001, **41**:1149-1179.
117. Di Marco MP, Edwards DJ, Wainer IW, Ducharme MP: **The effect of grapefruit juice and seville orange juice on the pharmacokinetics of dextromethorphan: The role of gut CYP3A and P-glycoprotein.** *Life Sciences* 2002, **71**:1149-1160.
118. Duche JC, Querol-Ferrer V, Barre J, Mesangeau M, Tillement JP: **Dextromethorphan O-demethylation and dextrorphan glucuronidation in a French population.** *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1993, **31**:392-398.

119. Gorski JC, Jones DR, Wrighton SA, Hall SD: **Characterization of dextromethorphan N-demethylation by human liver microsomes. Contribution of the cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily.** *Biochem Pharmacol* 1994, **48**:173-182.
120. Jacqz-Aigrain E, Funck-Brentano C, Cresteil T: **CYP2D6- and CYP3A-dependent metabolism of dextromethorphan in humans.** *Pharmacogenetics* 1993, **3**:197-204.
121. Jones DR, Gorski JC, Haehner BD, O'Mara EM, Jr., Hall SD: **Determination of cytochrome P450 3A4/5 activity in vivo with dextromethorphan N-demethylation.** *Clin Pharmacol Ther* 1996, **60**:374-384.
122. Lutz U, Volkel W, Lutz RW, Lutz WK: **LC-MS/MS analysis of dextromethorphan metabolism in human saliva and urine to determine the phenotype for CYP2D6 activity and the variability in N-demethylation and glucuronidation.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2004, **369**:R155-R155.
123. Yu A, Haining RL: **Comparative contribution to dextromethorphan metabolism by cytochrome P450 isoforms in vitro: can dextromethorphan be used as a dual probe for both CYP2D6 and CYP3A activities?** *Drug Metab Dispos* 2001, **29**:1514-1520.
124. Afshar M, Thormann W: **Validated capillary electrophoresis assay for the simultaneous enantioselective determination of propafenone and its major metabolites in biological samples.** *Electrophoresis* 2006, **27**:1517-1525.
125. Anzenbacherova E, Anzenbacher P, Svoboda Z, Ulrichova J, Kvetina J, Zoulova J, Perlik F, Martinkova J: **Minipig as a model for drug metabolism in man: Comparison of in vitro and in vivo metabolism of propafenone.** *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2003, **147**:155-159.
126. Botsch S, Gautier JC, Beaune P, Eichelbaum M, Kroemer HK: **Identification and characterization of the cytochrome P450 enzymes involved in N-dealkylation of propafenone: molecular base for interaction potential and variable disposition of active metabolites.** *Mol Pharmacol* 1993, **43**:120-126.
127. Dilger K, Greiner B, Fromm MF, Hofmann U, Kroemer HK, Eichelbaum M: **Consequences of rifampicin treatment on propafenone disposition in extensive and poor metabolizers of CYP2D6.** *Pharmacogenetics* 1999, **9**:551-559.
128. Chen X, Zhong D, Blume H: **Stereoselective pharmacokinetics of propafenone and its major metabolites in healthy Chinese volunteers.** *Eur J Pharm Sci* 2000, **10**:11-16.
129. Hofmann U, Pecia M, Heinkele G, Dilger K, Kroemer HK, Eichelbaum M: **Determination of propafenone and its phase I and phase II metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry.** *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000, **748**:113-123.
130. McGinnity DF, Parker AJ, Soars M, Riley RJ: **Automated definition of the enzymology of drug oxidation by the major human drug metabolizing cytochrome P450s.** *Drug Metab Dispos* 2000, **28**:1327-1334.
131. Bellward GD, Madeira ML, Levine M, Chang TKH, Mirfazaelian A: **Effect of cimetidine on dextromethorphan O-demethylase activity of human liver microsomes and recombinant CYP2D6.** *Drug Metabolism Reviews* 2004, **36**:274-274.
132. Richter T, Murdter TE, Heinkele G, Pleiss J, Tatzel S, Schwab M, Eichelbaum M, Zanger UM: **Potent mechanism-based inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine.** *J Pharmacol Exp Ther* 2004, **308**:189-197.
133. Furuta S, Kamada E, Suzuki T, Sugimoto T, Kawabata Y, Shinozaki Y, Sano H: **Inhibition of drug metabolism in human liver microsomes by nizatidine, cimetidine and omeprazole.** *Xenobiotica* 2001, **31**:1-10.



134. Suzuki H, Kneller MB, Haining RL, Trager WF, Rettie AE: **(+)-N-3-Benzyl-nirvanol and (-)-N-3-benzyl-phenobarbital: new potent and selective in vitro inhibitors of CYP2C19.** *Drug Metab Dispos* 2002, **30**:235-239.
135. Klein K, Tatzel S, Raimundo S, Saussele T, Hustert E, Pleiss J, Eichelbaum MF, Zanger UM: **A natural variant of the heme-binding signature (R441C) resulting in complete loss of function of CYP2D6.** *Drug Metab Dispos* 2007.
136. Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SMG, Maltais LJ, Wain HM, Nebert DW: **Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants.** *Pharmacogenetics* 2004, **14**:1-18.
137. Gutenkunst RN, Waterfall JJ, Casey FP, Brown KS, Myers CR, Sethna JP: **Universally sloppy parameter sensitivities in systems biology models.** *Plos Computational Biology* 2007, **3**:1871-1878.
138. Witherow LE, Houston JB: **Sigmoidal kinetics of CYP3A substrates: an approach for scaling dextromethorphan metabolism in hepatic microsomes and isolated hepatocytes to predict in vivo clearance in rat.** *J Pharmacol Exp Ther* 1999, **290**:58-65.
139. Andersen ME, Gargas ML, Clewell HJ, Severyn KM: **Quantitative-Evaluation of the Metabolic Interactions between Trichloroethylene and 1,1-Dichloroethylene In vivo Using Gas Uptake Methods.** *Toxicology and Applied Pharmacology* 1987, **89**:149-157.
140. Li AP: **Human hepatocytes: Isolation, cryopreservation and applications in drug development.** *Chemico-Biological Interactions* 2007, **168**:16-29.
141. Costenoble R, Muller D, Barl T, van Gulik WM, van Winden WA, Reuss M, Heijnen JJ: **(13)C-Labeled metabolic flux analysis of a fed-batch culture of elutriated *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEMS Yeast Res* 2007.
142. Muller D, Exler S, Aguilera-Vazquez L, Guerrero-Martin E, Reuss M: **Cyclic AMP mediates the cell cycle dynamics of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Yeast* 2003, **20**:351-367.
143. Gomez-Lechon MJ, Donato MT, Castell JV, Jover R: **Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man.** *Curr Drug Metab* 2004, **5**:443-462.
144. Quion JA, Jones PH: **Clinical pharmacokinetics of pravastatin.** *Clin Pharmacokinet* 1994, **27**:94-103.
145. Goosen TC, Bauman JN, Davis JA, Yu C, Hurst SI, Williams JA, Loi CM: **Atorvastatin glucuronidation is minimally and nonselectively inhibited by the fibrates gemfibrozil, fenofibrate, and fenofibric acid.** *Drug Metab Dispos* 2007, **35**:1315-1324.
146. Prueksaritanont T, Subramanian R, Fang X, Ma B, Qiu Y, Lin JH, Pearson PG, Baillie TA: **Glucuronidation of statins in animals and humans: a novel mechanism of statin lactonization.** *Drug Metab Dispos* 2002, **30**:505-512.
147. Kearney AS, Crawford LF, Mehta SC, Radebaugh GW: **The interconversion kinetics, equilibrium, and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981.** *Pharm Res* 1993, **10**:1461-1465.
148. Fujino H, Saito T, Tsunenari Y, Kojima J, Sakaeda T: **Metabolic properties of the acid and lactone forms of HMG-CoA reductase inhibitors.** *Xenobiotica* 2004, **34**:961-971.
149. Christians U, Jacobsen W, Floren LC: **Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: are the statins mechanistically similar?** *Pharmacol Ther* 1998, **80**:1-34.

150. Jacobsen W, Kuhn B, Soldner A, Kirchner G, Sewing KF, Kollman PA, Benet LZ, Christians U: **Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin.** *Drug Metab Dispos* 2000, **28**:1369-1378.
151. Park JE, Kim KB, Bae SK, Moon BS, Liu KH, Shin JG: **Contribution of cytochrome P450 3A4 and 3A5 to the metabolism of atorvastatin.** *Xenobiotica* 2008, **38**:1240-1251.
152. Feidt DM, Klein K, Hofmann U, Riedmaier S, Knobloch D, Thasler WE, Weiss TS, Schwab M, Zanger UM: **Profiling induction of cytochrome p450 enzyme activity by statins using a new liquid chromatography-tandem mass spectrometry cocktail assay in human hepatocytes.** *Drug Metab Dispos* 2010, **38**:1589-1597.
153. Aviram M, Rosenblat M: **Paraoxonases (PON1, PON2, PON3) analyses in vitro and in vivo in relation to cardiovascular diseases.** *Methods Mol Biol* 2008, **477**:259-276.
154. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN: **Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation.** *J Biol Chem* 2000, **275**:33435-33442.
155. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN: **Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities.** *J Lipid Res* 2005, **46**:1239-1247.
156. Gouedard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y: **Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins.** *Mol Pharmacol* 2003, **63**:945-956.
157. Khersonsky O, Tawfik DS: **Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON1 suggest that its native activity is lactonase.** *Biochemistry* 2005, **44**:6371-6382.
158. Austin RP, Barton P, Mohamed S, Riley RJ: **The binding of drugs to hepatocytes and its relationship to physicochemical properties.** *Drug Metab Dispos* 2005, **33**:419-425.
159. Hallifax D, Houston JB: **Uptake and intracellular binding of lipophilic amine drugs by isolated rat hepatocytes and implications for prediction of in vivo metabolic clearance.** *Drug Metab Dispos* 2006, **34**:1829-1836.
160. Kilford PJ, Gertz M, Houston JB, Galetin A: **Hepatocellular binding of drugs: Correction for unbound fraction in hepatocyte incubations using microsomal binding or drug lipophilicity data.** *Drug Metabolism and Disposition* 2008, **36**:1194-1197.
161. Grube M, Kock K, Oswald S, Draber K, Meissner K, Eckel L, Bohm M, Felix SB, Vogelgesang S, Jedlitschky G, Siegmund W, Warzok R, Kroemer HK: **Organic anion transporting polypeptide 2B1 is a high-affinity transporter for atorvastatin and is expressed in the human heart.** *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2006, **80**:607-620.
162. Lau YY, Huang Y, Frassetto L, Benet LZ: **effect of OATP1B transporter inhibition on the pharmacokinetics of atorvastatin in healthy volunteers.** *Clin Pharmacol Ther* 2007, **81**:194-204.
163. Knauer MJ, Urquhart BL, Meyer zu Schwabedissen HE, Schwarz UI, Lemke CJ, Leake BF, Kim RB, Tirona RG: **Human skeletal muscle drug transporters determine local exposure and toxicity of statins.** *Circ Res* 2010, **106**:297-306.
164. Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell AL, Karlsson J: **Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines.** *Drug Metabolism and Disposition* 2007, **35**:1333-1340.

165. Lau YY, Okochi H, Huang Y, Benet LZ: **Multiple transporters affect the disposition of atorvastatin and its two active hydroxy metabolites: application of in vitro and ex situ systems.** *J Pharmacol Exp Ther* 2006, **316**:762-771.
166. Li L, Lee TK, Meier PJ, Ballatori N: **Identification of glutathione as a driving force and leukotriene C4 as a substrate for oatp1, the hepatic sinusoidal organic solute transporter.** *J Biol Chem* 1998, **273**:16184-16191.
167. Mahagita C, Grassl SM, Piyachaturawat P, Ballatori N: **Human organic anion transporter 1B1 and 1B3 function as bidirectional carriers and do not mediate GSH-bile acid cotransport.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007, **293**:G271-278.
168. Baker M, Parton T: **Kinetic determinants of hepatic clearance: plasma protein binding and hepatic uptake.** *Xenobiotica* 2007, **37**:1110-1134.
169. Poirier A, Lave T, Portmann R, Brun ME, Senner F, Kansy M, Grimm HP, Funk C: **Design, Data Analysis, and Simulation of in Vitro Drug Transport Kinetic Experiments Using a Mechanistic in Vitro Model.** *Drug Metabolism and Disposition* 2008, **36**:2434-2444.
170. Bogman K, Peyer AK, Torok M, Kusters E, Drewe J: **HMG-CoA reductase inhibitors and P-glycoprotein modulation.** *Br J Pharmacol* 2001, **132**:1183-1192.
171. Wu X, Whitfield LR, Stewart BH: **Atorvastatin transport in the Caco-2 cell model: contributions of P-glycoprotein and the proton-monocarboxylic acid co-transporter.** *Pharm Res* 2000, **17**:209-215.
172. Chen C, Mireles RJ, Campbell SD, Lin J, Mills JB, Xu JJ, Smolarek TA: **Differential interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase inhibitors with ABCB1, ABCC2, and OATP1B1.** *Drug Metab Dispos* 2005, **33**:537-546.
173. Hochman JH, Pudvah N, Qiu J, Yamazaki M, Tang C, Lin JH, Prueksaritanont T: **Interactions of human P-glycoprotein with simvastatin, simvastatin acid, and atorvastatin.** *Pharm Res* 2004, **21**:1686-1691.
174. Sakaeda T, Fujino H, Komoto C, Kakumoto M, Jin JS, Iwaki K, Nishiguchi K, Nakamura T, Okamura N, Okumura K: **Effects of acid and lactone forms of eight HMG-CoA reductase inhibitors on CYP-mediated metabolism and MDR1-mediated transport.** *Pharmaceutical Research* 2006, **23**:506-512.
175. Chandra P, Brouwer KLR: **The complexities of hepatic drug transport: Current knowledge and emerging concepts.** *Pharmaceutical Research* 2004, **21**:719-735.
176. Schwartlander R, Schmid J, Brandenburg B, Katenz E, Wolfgang F, Vondran R, Pless G, Cheng XD, Pascher A, Neuhaus P, Sauer IM: **Continuously microscopically observed and process-controlled cell culture within the SlideReactor: Proof of a new concept for cell characterization.** *Tissue Engineering* 2007, **13**:187-196.
177. Stein WD: *Transport and Diffusion across Cell Membranes.* New York: Academic Press, Inc.; 1986.
178. Willrich MA, Hirata MH, Hirata RD: **Statin regulation of CYP3A4 and CYP3A5 expression.** *Pharmacogenomics* 2009, **10**:1017-1024.
179. Trubetsky O, Marks B, Zielinski T, Yueh MF, Raucy J: **A simultaneous assessment of CYP3A4 metabolism and induction in the DPX-2 cell line.** *Aaps J* 2005, **7**:E6-13.
180. El-Sankary W, Gibson GG, Ayrton A, Plant N: **Use of a reporter gene assay to predict and rank the potency and efficacy of CYP3A4 inducers.** *Drug Metab Dispos* 2001, **29**:1499-1504.
181. Kocarek TA, Dahn MS, Cai H, Strom SC, Mercer-Haines NA: **Regulation of CYP2B6 and CYP3A expression by hydroxymethylglutaryl coenzyme A inhibitors in primary cultured human hepatocytes.** *Drug Metab Dispos* 2002, **30**:1400-1405.

182. Prueksaritanont T, Ma B, Fang X, Subramanian R, Yu J, Lin JH: **beta-Oxidation of simvastatin in mouse liver preparations.** *Drug Metab Dispos* 2001, **29**:1251-1255.
183. Deng WJ, Nie S, Dai J, Wu JR, Zeng R: **Proteome, phosphoproteome, and hydroxyproteome of liver mitochondria in diabetic rats at early pathogenic stages.** *Mol Cell Proteomics* 2010, **9**:100-116.
184. Motawi TM, Hashem RM, Rashed LA, El-Razek SM: **Comparative study between the effect of the peroxisome proliferator activated receptor-alpha ligands fenofibrate and n-3 polyunsaturated fatty acids on activation of 5'-AMP-activated protein kinase-alpha1 in high-fat fed rats.** *J Pharm Pharmacol* 2009, **61**:1339-1346.
185. Heinrich R, Schuster S: *The Regulation of Cellular Systems.* 2nd edn. Berlin: Springer; 1996.
186. Kantola T, Kivisto KT, Neuvonen PJ: **Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin.** *Clin Pharmacol Ther* 1998, **64**:58-65.
187. Lins RL, Matthys KE, Verpooten GA, Peeters PC, Dratwa M, Stolear JC, Lameire NH: **Pharmacokinetics of atorvastatin and its metabolites after single and multiple dosing in hypercholesterolaemic haemodialysis patients.** *Nephrol Dial Transplant* 2003, **18**:967-976.
188. Cui YH, Konig J, Keppler D: **Vectorial transport by double-transfected cells expressing the human uptake transporter SLC21A8 and the apical export pump ABCC2.** *Molecular Pharmacology* 2001, **60**:934-943.

## Anhang A: Modellierung

### A.1. Kinetik der Umsetzung von alternativen Substraten zu alternativen Produkten an Cytochrom-P450-Monooxygenasen

Im folgenden wird die Herleitung der Cytochrom-P450-Monooxygenasen(CYP)-Kinetik der Umsetzung von alternativen Substraten zu alternative Produkten beispielhaft an zwei alternativen Substraten und jeweils zwei alternativen Produkten beschrieben (**Abb. A.4.8**)

Unter der Gleichgewichtsannahme kann die die Massenbilanz für das CYP-Enzym (E) formuliert werden als

$$c_{E,t} = c_E + c_{(S_1E)_1} + c_{(S_1E)_2} + c_{(S_2E)_1} + c_{(S_2E)_2} , \quad (\text{A.1})$$

bei der die totale Konzentration an Enzym E sich aus der Summe der Konzentrationen an freiem Enzym E und der Menge der verschiedenen Enzym-Substrat-Komplexe ergibt.

Die Bildungsrate des Produktes P<sub>1</sub> ergibt sich nach

$$r_{E,P_1} = k_{+2,S_1,1} \cdot c_{(S_1E)_1} \quad (\text{A.2})$$

aus dem Produkt der katalytischen Ratenkonstante,  $k_{+2,S_1,1}$ , und der Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes,  $c_{(S_1E)_1}$ . Werden linke Seite und rechte Seite der Gleichung (A.2) durch Gleichung (A.1) geteilt, folgt

$$\frac{r_{E,P_1}}{c_{E,t}} = \frac{k_{+2,S_1,1} \cdot c_{(S_1E)_1}}{c_E + c_{(S_1E)_1} + c_{(S_1E)_2} + c_{(S_2E)_3} + c_{(S_2E)_4}} \quad (\text{A.3})$$

Die Enzym-Substrat-Komplexe in Gleichung (A.3) können unter der Annahme einer schnellen Gleichgewichtseinstellung durch die Gleichgewichts-Konstanten des Substrat-Enzym-Komplexes (S<sub>1</sub>E)<sub>1</sub>

$$K_{M,E,P_1} = \frac{k_{-1,S_1,1} + k_{+2,S_1,1}}{k_{+1,S_1,1}} = \frac{c_{S_1} \cdot c_E}{c_{(S_1E)_1}} , \quad (\text{A.4})$$

des Substrat-Enzym-Komplexes (S<sub>1</sub>E)<sub>2</sub>,

$$K_{M,E,P_2} = \frac{k_{-1,S_1,2} + k_{+2,S_1,2}}{k_{+1,S_1,2}} = \frac{c_{S_1} \cdot c_E}{c_{(S_1E)_2}} , \quad (\text{A.5})$$

des Substrat-Enzym-Komplexes (S<sub>2</sub>E)<sub>3</sub>,

$$K_{M,E,P_3} = \frac{k_{-1,S2,3} + k_{+2,S2,3}}{k_{+1,S2,3}} = \frac{c_{S_2} \cdot c_E}{c_{(S_2E)_3}}, \quad (\text{A.6})$$

und des Substrat-Enzym-Komplexes (S<sub>2</sub>E)<sub>4</sub>,

$$K_{M,E,P_4} = \frac{k_{-1,S2,4} + k_{+2,S2,4}}{k_{+1,S2,4}} = \frac{c_{S_2} \cdot c_E}{c_{(S_2E)_4}}. \quad (\text{A.7})$$

weiter aufgeschlüsselt werden. Gleichungen (A.4), (A.5), (A.6) und (A.7) in Gleichung (A.3) eingesetzt, ergibt

$$\frac{r_{E,P_1}}{c_{E,t}} = \frac{k_{+2,S1,1} \cdot \frac{c_{S_1} \cdot c_E}{K_{M,E,P_1}}}{c_E + \frac{c_{S_1} \cdot c_E}{K_{M,E,P_1}} + \frac{c_{S_1} \cdot c_E}{K_{M,E,P_2}} + \frac{c_{S_2} \cdot c_E}{K_{M,E,P_3}} + \frac{c_{S_2} \cdot c_E}{K_{M,E,P_4}}}. \quad (\text{A.8})$$

Die Maximalrate der Bildung des Produktes P<sub>1</sub> wird erreicht, wenn die totale Menge an Enzym E in der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes (S<sub>1</sub>E)<sub>1</sub> beteiligt ist, und ergibt folglich

$$r_{\max,E,P_1} = k_{+2,S1,1} \cdot c_{E,t}. \quad (\text{A.9})$$

Die Maximalrate in Gleichung (A.8) in Gleichung (A.7) eingesetzt führt zu der Bildungsrate

$$r_{E,P_1} = \frac{r_{\max,E,P_1} \cdot \frac{c_{S_1}}{K_{M,E,P_1}}}{1 + \frac{c_{S_1}}{K_{M,E,P_1}} + \frac{c_{S_1}}{K_{M,E,P_2}} + \frac{c_{S_2}}{K_{M,E,P_3}} + \frac{c_{S_2}}{K_{M,E,P_4}}}, \quad (\text{A.10})$$

welche die Bildungsrate des Produktes P<sub>1</sub> beschreibt. Der Ausdruck im Nenner,

$$D = 1 + \frac{c_{S_1}}{K_{M,E,P_1}} + \frac{c_{S_1}}{K_{M,E,P_2}} + \frac{c_{S_2}}{K_{M,E,P_3}} + \frac{c_{S_2}}{K_{M,E,P_4}}, \quad (\text{A.11})$$

verdeutlicht dabei die kompetitive Hemmung durch die alternative katalysierten Umwandlungen. Ähnlich können die Reaktionskinetiken der Produktbildung von P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub> und P<sub>4</sub> formuliert werden zu

$$r_{3A4,P_2} = \frac{r_{\max,E,P_2} \cdot \frac{c_{S_1}}{K_{M,E,P_2}}}{D}, \quad (\text{A.12})$$

$$r_{E,P_3} = \frac{r_{\max,E,P_3} \cdot \frac{c_{S_2}}{K_{M,E,P_3}}}{D} \text{ und} \quad (\text{A.13})$$

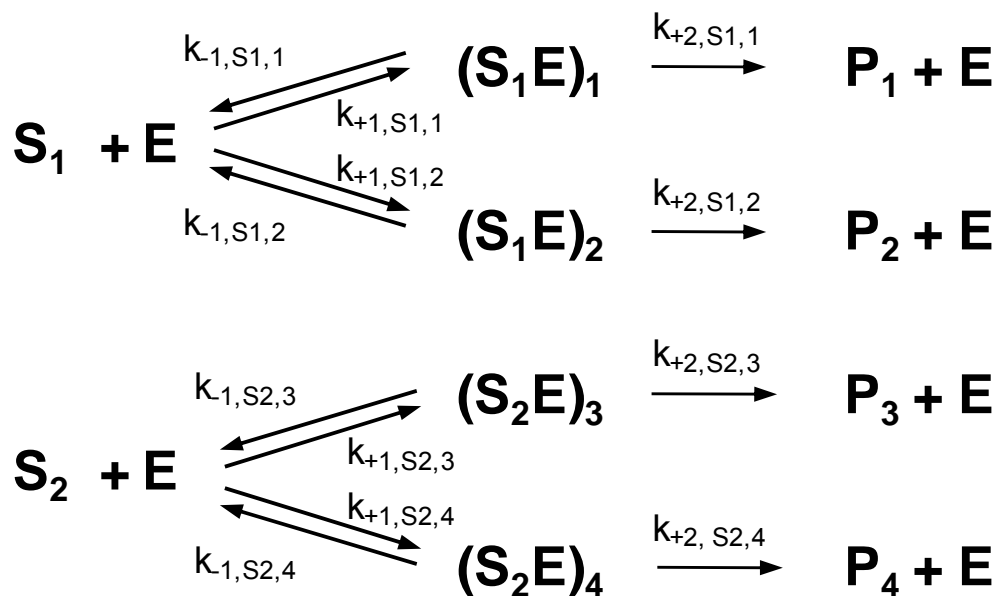
$$r_{E,P_4} = \frac{r_{\max,E,P_4} \cdot \frac{c_{S_2}}{K_{M,E,P_4}}}{D} \quad (\text{A.14})$$

Die Rate des Abbaus des Substrates  $S_1$  ergibt sich folglich zu

$$r_{E,S_1} = -\frac{r_{\max,E,P_1} \cdot \frac{c_{S_1}}{K_{M,E,P_1}}}{D} - \frac{r_{\max,E,P_2} \cdot \frac{c_{S_1}}{K_{M,E,P_2}}}{D}, \quad (\text{A.15})$$

und die Rate des Abbaus des Substrates  $S_2$  zu

$$r_{E,S_2} = -\frac{r_{\max,E,S_2} \cdot \frac{c_{S_2}}{K_{M,E,P_3}}}{D} - \frac{r_{\max,E,S_2} \cdot \frac{c_{S_2}}{K_{M,E,P_4}}}{D}. \quad (\text{A.16})$$



**Abb. A.4.8:** Reaktionsschema der CYP-Kinetik in der Umwandlung von zwei alternativen Substraten,  $S_1$  und  $S_2$ , zu jeweils zwei alternativen Produkten,  $P_1$  und  $P_2$ ,  $P_3$  und  $P_4$  für den Fall eines katalytischen Zentrums. Es wird angenommen, dass sich Enzym, Substrat und Enzym-Substrat-Komplex jeweils im Gleichgewicht befinden.

## A.2. Kinetik der unspezifischen Makromolekül-Bindung von AS in Hepatozyten

Atorvastatin-Säure (AS) und -Lakton (ASL) und die entsprechenden para- und ortho-Hydroxy-Metabolite (ASpOH und ASoOH, ASLpOH und ASLoOH) binden im Körper unspezifisch und reversibel an Makromoleküle, wie zum Beispiel Proteine. Die Rate der unspezifischen Bindung an Makromoleküle innerhalb der Hepatozyten kann formuliert werden zu

$$r_{bind,j} = k_{as} \cdot c_{Ma} \cdot c_j^{in} - k_{dis} \cdot c_{Ma,j} \cdot \quad (A.17)$$

als Differenz der Assoziation (as), gebildet aus dem Produkt der Ratenkonstante, der Makromolekülkonzentration  $c_{Ma}$ , und der freien Konzentration  $c_j^c$ , und der Dissoziation, gebildet als aus dem Produkt der Ratenkonstante und Makromolekül-Atorvastatin-Komplex  $c_{Ma,j}$ . Wird die Makromolekül-Konzentration  $c_{Ma,j}$  durch die Konzentration des gebundenen Atorvastatin  $c_j^b$  ersetzt, und die Makromolekül-Konzentration innerhalb der Zelle als konstant angenommen, dann kann Gleichung (A.17) formuliert werden zu

$$r_{bind,j} = k_{as} \cdot c_j^{in} - k_{dis} \cdot c_j^b \cdot \quad (A.18)$$

Weiterhin wird angenommen, dass die Assoziation und die Dissoziation im Vergleich zu Transport und Reaktionskinetiken sehr schnell stattfinden und sich im Gleichgewicht mit der Konstanten

$$K_B = \frac{k_{dis}}{k_{as}} = \frac{c_{j,eq}^{in}}{c_{j,eq}^b} \quad (A.19)$$

befinden. Das Verhältnis von intrazellulär freier zur Summe aus intrazellulär freier und gebundener Konzentration,  $c_j^{in}$  und  $c_j^b$ , wird üblicherweise als „fraction unbound“ ( $fu_j$ )

$$fu_j = \frac{c_{j,eq}^{in}}{c_{j,eq}^{in} + c_{j,eq}^b} \quad (A.20)$$

definiert. Damit ergibt sich durch Einsetzen von Gleichung (A.20) in Gleichung (A.19)

$$\frac{k_{dis}}{k_{as}} = \frac{c_j^{in}}{c_j^b} = \frac{fu_j}{1 - fu_j} \cdot \quad (A.21)$$

Wird  $k_{as}$  in Gleichung (A.15) durch die umformulierte Gleichung (A.21)

$$k_{as} = k_{dis} \frac{1 - fu_j}{fu_j} \cdot \quad (A.22)$$

ersetzt, folgt schließlich die Rate

$$r_{bind,j} = k_{dis} \frac{1 - fu_j}{fu_j} \cdot c_j^{in} - k_{dis} \cdot c_j^b = k_{dis} \cdot \left( \left( \frac{1}{fu_j} - 1 \right) \cdot c_j^{in} - c_j^b \right) \cdot \quad (A.23)$$

welche die Kinetik für die unspezifische Bindung von Atorvastatin innerhalb der Zelle beschreibt, die in der Modellierung verwendet wird. Die Kinetik ist eingeschränkt durch die Bedingung  $0 < fu_j < 1$ , wobei ein Wert nahe 0 eine sehr hohe Bindungsaffinität und ein Wert nahe 1 eine sehr niedrige Bindungsaffinität kennzeichnet.



## Anhang B: Experimentelle Daten

### B.1. Initialratenbestimmungen an Lebermikrosomen

**Tab. B.1:** Gemessene Initialraten bei bestimmten Initialkonzentrationen an DT und PF in Einzelsubstratbestimmungen in der Phase I an humanen Lebermikrosomen.

Konz. [pmol/ml]	Initialrate [pmol/mg/min]		Konz. [pmol/ml]	Initialrate [pmol/mg/min]	
DT	DX	MM	PF	HPF	DPF
500	3,0	8,0	100	1,7	1,0
1000	5,5	13,8	500	9,4	5,7
5000	16,5	65,6	1000	16,3	12,8
10000	27,1	130,2	5000	34,6	53,8
25000	54,5	277,2	10000	38,6	97,1
50000	86,5	466,4	25000	44,9	177,7
100000	140,4	665,9	50000	47,8	269,2
500000	288,5	1050,4	100000	52,2	370,3
1000000	331,1	1191,5	500000	41,0	512,6
			1000000	45,7	504,6

**Tab. B.2:** Gemessene Initialraten bei bestimmten Initialkonzentrationen an DX, PF und HPF in Einzelsubstratbestimmungen in der Phase II an humanen Lebermikrosomen. (n.b.: nicht bestimmbar)

Konz. [pmol/ml]	Initialrate [pmol/mg/min]	Konz. [pmol/ml]	Initialrate [pmol/mg/min]	Konz. [pmol/ml]	Initialrate [pmol/mg/min]
DX	DXG	PF	PFG	HPF	HPFG
100	n.b.	100	n.b.	100	n.b.
500	2,1	500	n.b.	500	n.b.
1000	2,3	1000	n.b.	1000	55,5
5000	12,8	5000	7,2	5000	77,0
10000	21,4	10000	6,2	10000	81,4
25000	49,4	25000	27,1	25000	123,0
50000	78,3	50000	46,3	50000	172,9
100000	126,9	100000	91,0	100000	300,4
500000	275,7	500000	229,6	500000	518,7
1000000	400,3	2000000	469,4	1000000	615,7
5000000	589,0			2000000	763,1
10000000	646,6				

**Tab. B.3:** Gemessene Initialraten bei verschiedenen Initialkonzentrationen von DT und PF in Doppelsubstratbestimmungen in der Phase I an humanen Lebermikrosomen (Mittelwert  $\pm$  s.d., n=2)

Initialkonzentration [pmol/ml]		Initialraten [pmol/mg/min]							
DT	PF	DX		MM		HPF		DPF	
20000	1000	50,0	$\pm 2,0$	275,8	$\pm 13,8$	16,1	$\pm 0,5$	9,9	$\pm 0,3$
20000	5000	36,9	$\pm 1,5$	264,7	$\pm 13,2$	29,6	$\pm 0,9$	46,7	$\pm 1,4$
20000	50000	20,8	$\pm 0,8$	176,9	$\pm 8,8$	43,3	$\pm 1,3$	250,0	$\pm 7,5$
100000	1000	184,6	$\pm 7,4$	910,4	$\pm 45,5$	9,9	$\pm 0,3$	7,3	$\pm 0,2$
100000	5000	140,1	$\pm 5,6$	750,0	$\pm 37,5$	23,3	$\pm 0,7$	40,0	$\pm 1,2$
100000	50000	92,0	$\pm 3,7$	588,5	$\pm 29,4$	38,2	$\pm 1,1$	203,0	$\pm 6,1$

## B.2. Zeitreihen-Experimente an primären humanen Hepatozyten

**Tab. B.4:** Konzentrationen der Atorvastatin-Metabolite im Zeitreihenexperiment an primären humanen Hepatozyten, Individuum 1.

	AS	ASL	ASpOH	ASoOH	ASLpOH	ASLoOH	
Zeit [min]	Extrazelluläre Konzentration [pmol ml <sup>-1</sup> ]						Wiederfindung [%]
0	8797,1	30,5	0	0	0	0	
10	8258,3 ±405,1	28,5 ±4,9	n.b. n.b.	3,3 ±0,2	n.b. n.b.	n.b. n.b.	97,6
30	8086,6 ±518,3	31,3 ±5,3	11,0 ±0,5	41,0 ±0,9	4,0 ±0,1	2,8 0,3	96,8
60	7648,4 ±1473,8	41,4 ±2,6	29,8 ±3,3	167,4 ±17,5	5,2 ±0,1	9,0 ±0,2	94,8
120	6132,4 ±171,2	54,1 ±1,8	241,6 ±7,5	899,9 ±19,1	10,1 ±0,5	21,5 ±0,4	88,8
180	5592,2 ±254,3	61,7 ±0,6	337,1 ±19,7	1205,0 ±37,8	11,4 ±0,8	24,1 ±1,9	86,5
240	5190,3 ±189,3	62,0 ±4,6	516,2 ±11,9	1675,5 ±63,5	13,7 ±0,6	25,5 ±0,9	89,0
300	4404,2 ±230,1	55,9 ±4,4	723,4 ±30,2	2201,0 ±66,3	16,2 ±1,0	29,3 ±0,4	89,0
360	3285,1 ±352,2	51,3 ±7,3	868,4 ±61,0	2523,1 ±76,3	15,4 ±0,9	36,3 ±2,4	80,8
480	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	
600	2073,0 ±184,9	42,0 ±4,9	1245,7 ±38,2	3146,5 ±91,1	21,2 ±1,4	45,8 ±6,2	78,2
Zeit [min]	Intrazelluläre Konzentration [pmol ml <sup>-1</sup> ]						
10	39727,4 ±2185,2	418,6 ±9,7	379,7 ±18,4	516,1 ±78,1	194,1 ±11,1	n.b. n.b.	
30	41668,0 ±2317,2	566,8 ±72,0	2740,9 ±167,4	3029,1 ±186,8	237,9 ±18,7	107,0 ±8,0	
60	49772,4 ±1749,1	709,0 ±23,5	4737,3 ±233,1	6526,6 ±657,6	356,6 ±38,4	213,7 ±49,7	
120	44509,8 ±2992,8	766,6 ±25,4	8344,8 ±177,9	9949,9 ±834,8	527,6 ±34,1	340,5 ±39,4	
180	34790,4 ±3072,2	780,7 ±83,4	7872,6 ±964,4	8711,4 ±1062,5	502,5 ±35,1	339,5 ±6,2	
240	29716,1 ±3144,4	757,2 ±34,4	8576,3 ±1190,3	8411,1 ±861,5	531,8 ±34,1	385,8 ±35,4	
300	35702,4 ±1663,2	654,0 ±71,6	9728,0 ±931,4	8887,3 ±809,0	588,1 ±47,4	280,8 ±115,7	
360	27020,0 ±909,3	625,0 ±142,6	9767,9 ±439,4	8665,5 ±394,5	529,4 ±53,4	286,6 ±26,3	
480	25491,5 ±1835,9	622,7 ±13,9	13298,5 ±309,4	11235,2 ±787,7	596,5 ±25,7	442,7 ±53,8	
600	18839,0 ±1056,5	520,2 ±60,1	13176,6 ±1601,2	9775,0 ±987,2	539,7 ±38,1	410,3 ±54,1	

Extrazelluläre (oberer Teil) und intrazelluläre (unterer Teil) Konzentrationen von AS und ASL, sowie der entsprechenden para- und ortho-Hydroxy-Metabolite, ASpOH und ASoOH, ASLpOH und ASLoOH, zu definierten Zeitpunkten (Mittelwert ±Standardabweichung, n=3, n.b.: nicht bestimmbar, n.u.: nicht untersucht). Die Wiederfindung berechnet sich aus der Materialbilanz als das Verhältnis der Summe der extra- und intrazellulären Metabolite zum jeweiligen Zeitpunkt zur Initialmenge von AS zum Zeitpunkt Null.

**Tab. B.5:** Konzentrationen der Atorvastatin-Metabolite im Zeitreihenexperiment an primären humanen Hepatozyten, Individuum 2.

	AS	ASL	ASpOH	ASoOH	ASLpOH	ASLoOH
Zeit [min]	Extrazelluläre Konzentration [pmol ml <sup>-1</sup> ]					
0	8803,3 ±785,4	56,1 ±5,1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
30	6709,7 ±536,9	20,0 ±2,8	2,1 ±0,4	10,5 ±1,8	n.b.	n.b.
60	6416,5 ±297,9	26,2 ±1,5	10,0 ±0,9	47,7 ±1,5	1,3 ±0,4	n.b.
120	6571,1 ±133,0	30,7 ±2,2	77,7 ±8,9	272,5 ±10,8	3,4 ±0,7	4,8 ±0,2
240	5284,9 ±288,6	40,4 ±3,2	341,9 ±29,8	875,2 ±23,6	6,4 ±1,0	9,4 ±0,4
360	4676,7 ±175,7	35,8 ±2,0	561,9 ±25,0	1348,3 ±94,3	6,6 ±1,0	9,7 ±0,4
480	4271,2 ±968,2	34,1 ±1,9	754,1 ±36,0	1666,4 ±75,0	7,6 ±1,1	10,4 ±0,3
720	2626,6 ±65,5	29,9 ±2,1	1131,7 ±82,2	2082,3 ±93,1	10,2 ±0,9	19,2 ±0,9
Zeit [min]	Intrazelluläre Konzentration [pmol ml <sup>-1</sup> ]					
30	31162,9 ±2469,3	350,3 ±29,7	837,1 ±19,4	592,4 ±13,0	79,7 ±4,8	n.b.
60	29251,8 ±2815,3	398,6 ±29,8	1350,6 ±16,6	857,0 ±80,2	86,0 ±2,8	n.b.
120	30829,5 ±98,1	459,0 ±39,0	2634,3 ±72,7	1784,9 ±190,6	135,7 ±5,1	32,4 ±8,8
240	27117,8 ±1142,2	518,2 ±28,4	3165,4 ±282,0	2077,5 ±272,3	157,1 ±10,0	51,5 ±6,4
360	22432,9 ±2525,3	422,5 ±68,6	4342,4 ±599,7	2489,7 ±142,0	164,7 ±21,8	63,8 ±21,8
480	19098,5 ±1589,6	359,7 ±40,6	4045,3 ±522,4	2704,5 ±210,9	133,1 ±9,8	45,8 ±16,7
720	13392,5 ±347,0	313,1 ±22,5	5554,6 ±463,9	3716,2 ±459,9	148,1 ±14,6	74,5 ±12,2

Extrazelluläre (oberer Teil) und intrazelluläre (unterer Teil) Konzentrationen von AS und ASL, sowie der entsprechenden para- und ortho-Hydroxy-Metabolite, ASpOH und ASoOH, ASLpOH und ASLoOH, zu definierten Zeitpunkten (Mittelwert ±Standardabweichung, n=3, n.b.: nicht bestimmbar).

**Tab. B.6:** Konzentrationen der Atorvastatin-Metabolite im Zeitreihenexperiment an primären humanen Hepatozyten, Individuum 3.

	AS	ASL	ASpOH	ASoOH	ASLpOH	ASLoOH
Zeit [min]	Extrazelluläre Konzentration [pmol ml <sup>-1</sup> ]					
0	9041,0 ±195,5	27,8 ±2,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
30	8344,6 ±2257,8	27,0 ±3,4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
60	8580,2 ±1810,9	32,1 ±6,7	10,8 ±0,2	28,7 ±0,9	n.b.	n.b.
120	7439,3 ±1331,9	51,6 ±16,0	36,9 ±2,9	90,4 ±13,3	5,2 ±0,1	6,0 ±0,3
240	7035,6 ±949,8	46,3 ±12,7	224,7 ±18,2	475,3 ±33,9	7,0 ±0,2	7,6 ±0,6
480	4884,2 ±652,5	60,6 ±1,2	780,7 ±26,4	1412,3 ±25,4	10,1 ±0,3	10,3 ±0,8
720	4301,0 ±153,6	38,7 ±5,0	1087,5 ±63,0	1747,6 ±40,2	11,0 ±1,3	12,1 ±0,8
960	2530,3 ±153,2	31,4 ±10,2	1485,6 ±69,7	2179,2 ±76,0	14,5 ±2,9	16,5 ±3,9
1200	1968,0 ±262,9	23,8 ±2,7	1815,7 ±46,9	2344,2 ±87,5	18,5 ±0,7	20,9 ±0,9
Zeit [min]	Intrazelluläre Konzentration [pmol ml <sup>-1</sup> ]					
30	29613,3 ±1767,5	389,8 ±5,6	663,0 ±19,3	433,5 ±70,6	203,3 ±3,0	n.b.
60	38633,4 ±5714,4	437,2 ±55,1	3316,3 ±536,8	1492,3 ±169,8	222,6 ±6,7	n.b.
120	33630,5 ±7944,7	483,7 ±97,1	5683,9 ±1294,6	2227,9 ±640,3	243,9 ±24,8	65,9 ±20,5
240	31980,2 ±1907,7	611,9 ±58,6	7413,0 ±462,1	2935,0 ±462,1	297,5 ±11,4	119,9 ±50,9
480	27551,1 ±3830,0	562,1 ±101,0	10260,4 ±2006,2	3724,9 ±630,7	318,7 ±34,5	147,2 ±7,0
720	17601,2 ±591,4	393,0 ±57,1	8615,2 ±590,5	2797,6 ±576,7	275,4 ±23,5	112,1 ±48,1
960	13855,9 ±1555,3	311,3 ±17,0	12896,4 ±875,7	3946,7 ±466,6	323,5 ±12,3	130,9 ±67,3
1200	9622,1 ±403,5	280,9 ±23,4	15129,2 ±1102,4	3628,3 ±166,4	359,8 ±23,6	152,8 ±30,8

Extrazelluläre (oberer Teil) und intrazelluläre (unterer Teil) Konzentrationen von AS und ASL, sowie der entsprechenden para- und ortho-Hydroxy-Metabolite, ASpOH und ASoOH, ASLpOH und ASLoOH, zu definierten Zeitpunkten (Mittelwert ±Standardabweichung, n=3, n.b.: nicht bestimmbar)



---

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation, abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln und der Zusammenarbeit mit den jeweils namentlich aufgeführten Personen, selbständig verfasst habe.

Datum \_\_\_\_\_ Unterschrift \_\_\_\_\_