

Aus der Klinik für Pädiatrie  
mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Auf dem Weg zur personalisierten Pharmakokinetik:  
Analyse der Interaktionen und Polymorphismen  
von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen  
zur Optimierung der Medikation  
und exemplarische Anwendung in der Polychemotherapie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Claudia Maria Preißner

aus Berlin

Datum der Promotion: 04.09.2015

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	5
1.1	Pharmakokinetik als wichtiger Ansatzpunkt für die personalisierte Medizin .....	5
1.2	Polymorphe Enzymfamilie Cytochrom P450 .....	8
1.3	Chemotherapie als Beispiel für Cocktailloptimierung .....	9
1.4	Zielsetzung .....	10
2	Methodik .....	11
2.1	Textmining als wichtige Methode der biomedizinischen Forschung .....	11
2.2	Manuelle Validierung zur Qualitätssicherung .....	11
2.3	Varianten der Enzymfamilie CYP P450 und das '1.000 Genom Projekt' .....	13
2.4	Analyse der Expression in verschiedenen Geweben .....	13
3	Ergebnisse .....	15
3.1	Web-Interface zur Nutzung der Interaktionsdatenbank und Datenanalyse .....	15
3.2	Bedeutung von CYP-Polymorphismen für die personalisierte Therapie .....	18
3.3	Expressionsunterschiede von CYPs in verschiedenen Geweben .....	19
3.4	Optimierung in der Chemotherapie .....	20
4	Diskussion .....	22
4.1	Web-Interface zur interaktiven Optimierung von Medikamentencocktails .....	22
4.2	Häufigkeiten von CYP SNPs und deren Bedeutung für die Therapiewirksamkeit .....	23
4.3	Bedeutung der Expressionsunterschiede im Kontext aktueller Literatur .....	24
4.4	Ausblick .....	25
5	Literaturverzeichnis .....	26
6	Anteilerklärung .....	29
7	Eidesstattliche Versicherung .....	30
8	Druckexemplare der ausgewählten Publikationen .....	31
8.1	The Transformer database: biotransformation of xenobiotics .....	31
8.2	Polymorphic Cytochrome P450 Enzymes (CYPs) and Their Role in Personalized Therapy .....	36
8.3	Drug Cocktail Optimization in Chemotherapy of Cancer .....	47
9	Lebenslauf .....	54
10	Vollständige Publikationsliste .....	55
11	Danksagung .....	56

## **Zusammenfassung**

Mehr als die Hälfte aller über 50-Jährigen nehmen täglich fünf oder mehr Medikamente ein. Die für die Verstoffwechslung von Medikamenten verantwortlichen Enzyme weisen eine stark überlappende Substratspezifität auf und sind somit in ihrer Effektivität anfällig für Polypharmazie. Die Enzymaktivität wird weiterhin auch durch Medikamente beeinflusst, die die Enzyme inhibieren oder induzieren. Interindividuell ist das Ansprechen auf Medikamente ebenfalls sehr verschieden. Ein wichtiger Grund hierfür ist die unterschiedliche Aktivität der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme, da diese genetisch sehr polymorph sind. Insgesamt bedingen Polypharmazie, die einhergehenden Medikamenteninteraktionen und Polymorphismen von Enzymen starke Variationen von Medikamentenwirkspiegeln und bedingen somit Ineffektivität und Toxizität. Ziel dieser Arbeit war es, diese Faktoren zu untersuchen und die Ergebnisse in einer Datenbank zu integrieren, die auf diesen Informationen basierende Therapieoptimierungen ermöglicht.

Um die in der Literatur weit verstreuten Erkenntnisse zu Interaktionen der einzelnen Enzyme und Transporter und der funktionellen Charakterisierung ihrer genetischen Varianten und deren Häufigkeit in verschiedenen Ethnien bündeln zu können, war ein automatisierter Textminingansatz erforderlich. Es wurde nach Interaktionen zwischen ca. 2.800 Medikamenten und über 6.000 fremdstoffmetabolisierenden Enzymen, darunter Cytochrom P450-Enzyme (CYPs), Phase II-Enzyme und Transporter (und jeweils deren Synonymen) mit ca. 100 Prädikaten wie „hemmen, induzieren, metabolisieren“ etc. in über 21 Millionen Artikeln in PubMed gesucht. Dies entspricht weit mehr als einer Milliarde Einzelsuchen. Insgesamt wurden 22.000 Artikel mit den gewünschten Schlüsselwortkombinationen gefunden. Diese potenziellen Beziehungen wurden anschließend manuell validiert und die verifizierten Interaktionen in die *Transformer* Datenbank integriert.

Zu den über 2.800 Medikamenten wurden mehr als 4.000 Interaktionen mit Phase I-Enzymen, mehr als 400 mit Phase II-Enzymen und mehr als 1.100 mit Transportern ermittelt. Diese Ergebnisse wurden in der Datenbank *Transformer* online zur Verfügung gestellt, die ohne Anmeldung und kostenlos zugänglich ist: <http://bioinformatics.charite.de/transformer>. Um den Nutzern eine gezielte Suche nach Interaktionen zwischen mehreren Medikamenten zu ermöglichen, wurde ein *Web-Tool* entwickelt, inklusive eines Interaktionsnetzwerk-Tools.

In einem nächsten Schritt wurden die Auswirkungen sowie die Häufigkeiten von CYP-Polymorphismen in Kaukasiern und anderen Ethnien ermittelt, um eine Liste von klinisch relevanten Polymorphismen zu erstellen. Des Weiteren wurden Expressionsunterschiede von CYPs in verschiedenen Geweben dargestellt.

Die Wichtigkeit der Berücksichtigung von CYP-Interaktionen in der Verstoffwechslung von Medikamenten wurde an Hand von Chemotherapieprotokollen verdeutlicht. Dazu wurden 91 Behandlungsprotokolle auf Medikamentenwechselwirkungen analysiert und Optimierungsvorschläge aufgezeigt. Eine klinische Studie über die Behandlung von Kindern mit einem Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie wird derzeit auf medikamentöse CYP-Interaktionen und ihren Einfluss auf die Mortalität hin untersucht.

Weitere klinische Studien – sowohl retrospektiv als auch prospektiv – sollten die vorgelegten theoretischen Analysen in Zukunft untermauern, um Wirksamkeit zu verbessern und Nebenwirkungen zu vermeiden.

### **Abstract**

More than half of the people aged 50 years or older are administered at least five drugs daily. The enzymes, which are responsible for the drug metabolism, have overlapping substrate specificities. Therefore, these enzymes are susceptible to polypharmacy. Additionally, drugs often inhibit enzymes or induce their expression. At a given prescribed dose, the actual effective drug level differs considerably between patients. One important reason for this is that the enzymatic activity varies due to genetic variability, leading to phenotypes such as poor and extensive metabolisers. Thus, the use of multiple drugs, drug-drug interactions and polymorphisms of the enzymes result in unexpected drug levels leading to ineffective therapy and increased toxicity. The aim of this project was to analyse these factors and integrate the results in a database, in order to enable evidence-based optimisation of the pharmacotherapy.

An automatic textmining was developed to find relations between drugs, enzymes, transporters, genetic variants and their frequency in different ethnicities. More than 21 Millions of abstracts in PubMed were searched for interactions between 2,800 drugs and more than 6,000 enzymes, including cytochrome P450 enzymes (CYPs), phase II-enzymes and transporter, with over 100 predicates like: “inhibit, induce, metabolise” etc. were sought in. A total of more than one billion of queries were performed. Altogether, more than 22,000 scientific publications matched the search criteria. The potential relations therein had to be validated manually before they were integrated into the *Transformer* database.

For the 2,800 drugs about 4,000 interactions with CYPs, 400 with phase II-enzymes and 1,100 interactions with transporters were determined. The results were compiled and made available online without registration or payment at: <http://bioinformatics.charite.de/transformer>. To enable



interactive drug-cocktail optimisation a web-tool including network visualisations was developed.

In a next step, the frequencies and effects of CYP polymorphisms in Caucasians and other ethnicities were analysed to create a list of relevant polymorphisms. Additionally, expression differences of CYPs in different tissues were analysed and visualised.

The importance of considering CYP interactions with regard to metabolism of drugs was shown for chemotherapeutic drug cocktails. To this end, 91 treatment protocols were investigated for potential metabolic interactions and alterations were suggested to improve efficacy and safety in pharmacotherapy. A clinical study on the treatment of children with relapses of acute lymphoblastic leukemia is currently being analysed for CYP drug-interactions and their influence on survival rates.

Further clinical studies - both retrospective and prospective – should be performed to underpin the theoretical analyses presented here to improve efficacy and reduce toxicity.

## 1 Einleitung

### 1.1 Pharmakokinetik als wichtiger Ansatzpunkt für die personalisierte Medizin

Die interindividuellen Unterschiede in der Pharmakokinetik stellen im klinischen Alltag ein häufiges Problem dar [1]. Die Pharmakokinetik beschäftigt sich mit dem Einfluss des Organismus auf Medikamente in Abhängigkeit von der Zeit; wohingegen die Pharmakodynamik die Wirkung der Medikamente auf den Organismus behandelt. Im Organismus werden die Medikamente resorbiert, verteilt, verstoffwechselt und ausgeschieden. Dies sind mehrstufige, komplexe Prozesse, die zum großen Teil durch polymorphe, fremdstoffmetabolisierende Enzyme gewährleistet werden. Die Vorhersage des individuellen Wirkspiegels wird zusätzlich durch die stetig steigende, gleichzeitige Einnahme verschiedener Medikamente erschwert [2]. Annähernd die Hälfte der über 50-Jährigen nimmt fünf oder mehr Medikamente täglich ein [3]. Ab einer Einnahme von fünf oder mehr Medikamenten spricht man von Polypharmazie, die einen bekannten Risikofaktor für Morbidität und Mortalität darstellt [4].

Viele aktuelle Ansätze der pharmakologischen Medizin greifen an den sogenannten *Targets* an, stellen also pharmakodynamische Prozesse in den Vordergrund. Dabei wird nicht berücksichtigt, dass viele Medikamente von denselben Enzymen verstoffwechselt werden und diese Enzyme zusätzlich sehr polymorph sind. Dies ist jedoch relevant, um die Erkrankung individuell angepasst behandeln zu können.

Um Medikamentenwechselwirkungen vorhersagen zu können, müssen alle Schritte der Pharmakokinetik sowie die Polymorphismen der relevanten Enzyme berücksichtigt werden. Die verschiedenen Teilbereiche, die in der Pharmakokinetik untersucht werden, können in Form der Abkürzung ADME (Aufnahme, Distribution, Metabolismus, Exkretion) vereinfacht zusammengefasst werden [6].

#### 1.1.1 Absorption - Aufnahme in die Blutbahn

Die orale Aufnahme von Medikamenten in die Blutbahn geschieht durch passive Diffusion, Carrier-vermittelte Diffusion, aktiven Transport und Phagozytose [7]. Das Wissen um die Auslastung, die Inhibition und die Induktion von transmembranösen Transportern ist bisher weit verstreut über viele wissenschaftliche Arbeiten und so im klinischen Alltag nicht verwendbar.

#### 1.1.2 Distribution – Verteilung im Organismus

Um die Verteilung von Medikamenten im gesamten Organismus abschätzen zu können, ist es wichtig, die chemischen Eigenschaften der Medikamente zu kennen (Lipophilie, Hydrophilie,

Bindungsvermögen an Proteinen etc.) sowie die Durchblutung und die Permeabilität der Membranen zu berücksichtigen.

### **1.1.3 Metabolismus – Stoffwechsel**

Die Verstoffwechslung der Medikamente findet hauptsächlich in der Leber über die Phase I- und Phase II-Enzyme und teilweise über die Aktivierung von Prodrugs statt.

In der Phase I-Modifikation werden reaktive und polare Gruppen in Substanzen durch Oxidation, Reduktion, Hydroxylierung, Zyklisierung und andere Reaktionen eingeführt [8]. Die CYPs sind für ungefähr 80% der gesamten Medikamentenverstoffwechslung verantwortlich [9]. Es wurden 57 humane CYPs identifiziert, die in 18 Familien und 43 Subfamilien eingeteilt werden [10]. Insbesondere die Familien 1, 2 und 3 sind für den Abbau von Medikamenten verantwortlich. Die meisten CYPs metabolisieren mehr als ein Medikament und umgekehrt kann ein Medikament durch mehrere verschiedene CYPs verstoffwechselt werden. Manche Medikamente inhibieren die Aktivität eines CYPs und andere induzieren die Biosynthese eines CYPs. Die Kenntnis über diese Interaktionen ist notwendig, um Medikamentenkombinationen wählen zu können, die sich in ihrer Effektivität gegenseitig nicht beeinträchtigen [11].

Phase II-Enzyme sorgen für eine bessere Elimination durch eine Erhöhung der Wasserlöslichkeit mittels Konjugation. Dies wird durch die enzymatische Kopplung zwischen Metabolit und funktionellen Gruppen, wie Glutathion, Glucuronsäure, Acetate, Sulfate oder Glyzin erreicht [12], um dann über die Galle oder den Harn ausgeschieden zu werden. Die wichtigsten Phase II-Enzyme sind Glutathion-S-Transferasen, Uridine-Diphosphate-Glucuronosyltransferasen (UGTs), N-Acetyltransferasen, Sulfotransferasen (SULTs), Methyltransferasen und Acetyl-CoA-Enzyme [13]. Es sind 33 UGT Familien bekannt, die ähnlich wie die CYPs klassifiziert werden. Für die Verstoffwechslung der Medikamente sind die UGT Familien 1 und 2 am wichtigsten [14]. Auch diese Enzyme können inhibiert und induziert werden.

Prodrugs sind pharmakologisch inaktive Substanzen, die erst durch chemische Umwandlung ihre vollständige Wirkung entfalten können. Die Vorteile bestehen in einer besseren Bioverfügbarkeit bei gleichzeitig verringerten Nebenwirkungen und höherer Selektivität [15]. In der chemotherapeutischen Behandlung wird dieser Umstand genutzt, indem zytotoxische Medikamente erst von Tumorzellen aktiviert werden und somit die körpereigenen Zellen schonen [16]. Prodrugs können durch Photobestrahlung [17], pH-Wert-Veränderungen [18] oder Enzyme [19], wie zum Beispiel den Cytochrom P450-Enzymen (CYPs) [20] aktiviert werden. Cyclophosphamid, Ifosfamid, Tamoxifen und Procarbazin sind Prodrugs, die erst von CYPs in einer Phase I-Reaktion

aktiviert werden müssen. Polymorphismen in den CYPs können entweder zu verminderter Aktivierung oder zu beschleunigtem Abbau führen [21].

Diese Schritte der Verstoffwechslung von Fremdstoffen sind in der Abbildung 1 schematisch dargestellt. Beispielsweise wird Codein eingenommen und durch CYP 2D6 zum aktiven Morphin demethyliert. Morphin wird von einem ATP-Bindungs-Cassette-Transporter (ABC-Transporter) in die Zelle transportiert. In der Zelle gibt es dann verschiedene Möglichkeiten der Transformation. Im Beispiel wird Morphin durch CYP 2C8, 2D6 oder 3A4 (Phase I) metabolisiert. In der Phase II wird Morphin hauptsächlich von UGT 2B7 in Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid umgewandelt.

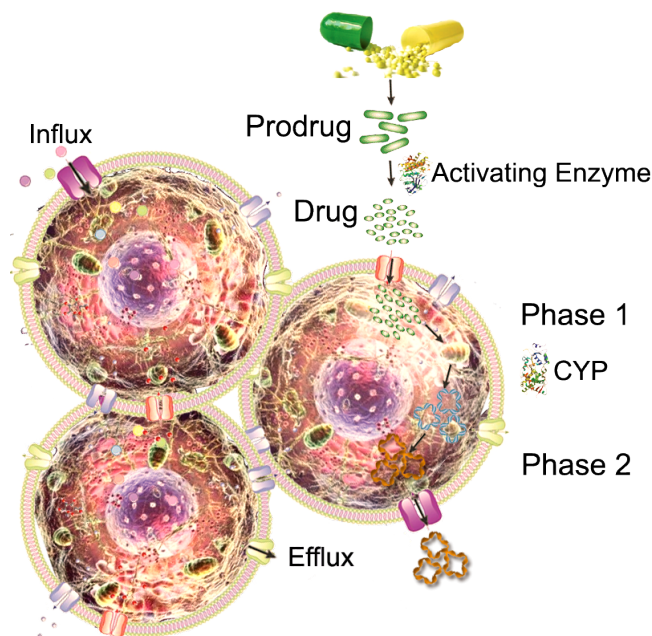


Abbildung 1: **Schematische Darstellung der Medikamentenverstoffwechslung**

Oben rechts ist die orale Aufnahme eines Prodrugs symbolisiert, welches von einem Enzym aktiviert und über Transporter in die Zelle aufgenommen wird. In der Zelle durchläuft der aktive Metabolit Phase I- und Phase II-Reaktionen bis er wieder ausgeschieden werden kann.

#### 1.1.4 Exkretion – Ausscheidung

Bei der Exkretion eines Arzneistoffes ist neben der hepatischen bzw. biliären, auch die renale Ausscheidung zu berücksichtigen. Der  $Q_0$  Wert eines Medikaments gibt den Anteil der extrarenalen Ausscheidung an. Werte kleiner als 0,3 bedeuten, dass das Medikament größtenteils (> 0,7) unverändert renal ausgeschieden wird. Dies spielt bei Patienten mit Niereninsuffizienz

eine wichtige Rolle, da diese Medikamente in niedrigeren Dosierungen verabreicht oder sogar abgesetzt werden müssen, um Toxizitäten zu vermeiden. Dabei spielen Enzym-Interaktionen eine geringere Rolle.

## 1.2 Polymorphe Enzymfamilie Cytochrom P450

Spear et al. fanden heraus, dass die meisten Medikamente ihre gewünschte Wirkung nur bei einem Bruchteil der Patienten erreichen [22]. So liegt die Effektivität der verabreichten Medikamente bei Erkrankungen wie Alzheimer nur bei 30%, Inkontinenz 40%, Migräne (akut) 52%, Migräne (prophylaktisch) 50%, Arrhythmie 60%, Tumore 25%, Hepatitis C 47%. Einer der Gründe für das unterschiedliche Ansprechen auf die Medikamente ist die individuell unterschiedliche Ausprägung der Enzyme und deren Aktivität. Diese sind vor allem über Einzel-nukleotid-Polymorphismen (SNPs) in der für das Enzym kodierenden Region zu erklären. Fortschritte in der genetischen Forschung ermöglichen eine kostengünstige Identifizierung von SNPs [10]. Ein SNP ist ein einzelner Basenpaaraustausch, der zu einem Aminosäureaustausch führen kann (nicht-synonymer SNP). Durch einen solchen Austausch kann es weiterhin zur Aktivitätsveränderung des entsprechenden Enzyms kommen.

Die Aktivität des Enzymstoffwechsels wird pharmakologisch in sehr schwach (poor), schwach (intermediate), normal (wildtype), schnell (extensive/rapid) und sehr schnell (ultrarapid) unterteilt [23]. Diese Phänotypen können Dosissteigerung oder Dosisreduzierung erfordern. Die *SuperCYP* Datenbank beinhaltet ca. 1.200 Allel-Varianten von sämtlichen CYPs [24], jedoch ohne Informationen über die Häufigkeit der Allele (in verschiedenen Ethnien) und nur unvollständige Angaben über die Enzymaktivitätseffekte.

Die Häufigkeit der SNPs zwischen verschiedenen Ethnien schwankt teilweise extrem. Beispielsweise kommt die Allelvarianz CYP 3A7 \*2 (26041C>G) bei ca. acht Prozent der Kaukasier, 28% der Chinesen und 62% der Afrikaner vor [25]. Die klinische Relevanz der CYP SNP wurde in diversen Studien belegt, insbesondere um Medikamenten-assoziierte Todesfälle zu verhindern [26], [27], [28], [29], [30].

Die Vanderbilt Universität in Nashville, USA, genotypisiert alle Patienten mit einem entsprechendem Risiko-Profil (kardiovaskuläre Risiken, Transplantationspatienten, etc.) auf Allelvarianten der folgenden Gene:

- CYP 2C19: Bei *intermediate* oder *poor metabolizer* wird das Prodrug Clopidogrel im Falle eines Herzinfarkts nicht schnell genug aktiviert. Stattdessen sollten die bereits aktiven Medikamente wie Prasugrel oder Ticagrelor gegeben werden.
- CYP 2C9, um Warfarin (Coumadin) gleich zu Beginn richtig dosieren zu können.

- CYP 3A5: Bei normalen bis starken Metabolisierern muss die Dosis von Tacrolimus erhöht werden, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern.
- SCL\*5 ist ein schwacher Metabolisierer von Simvastatin. Darum sollte bei diesen Patienten gleich mit einem anderen Statin begonnen werden, um Nebenwirkungen wie Myopathie und Rhabdomyolyse zu vermeiden.
- Thiopurin-Methyltransferase (TPMT), um die potenziell myelotoxische Wirkung von Thiopurin (Purinethol, Imuran, Tabloid) zu verhindern.

Die Vanderbilt Universität gibt an, dass es sich auch aus ökonomischer Hinsicht lohnt, diese SNPs zu untersuchen [31], da potenzielle Folgeerkrankungen so vermieden werden können. Um solche Probleme aufdecken zu können, ist es wichtig, die Häufigkeiten der SNPs in verschiedenen Ethnien zu kennen.

### 1.3 Chemotherapie als Beispiel für Cocktailloptimierung

Weltweit erkranken jährlich mehr als 200.000 Kinder unter 15 Jahren an malignen Tumoren [32]. Aufgrund standardisierter Protokolle stellen Chemotherapien einen guten Ausgangspunkt für Studien zur Optimierung von Medikamentencocktails dar. Zusätzlich sind die Nebenwirkungen der Medikamente gravierend, teilweise sogar tödlich. Zytostatika sowie antiinflammatorische Medikamente führen zu Schäden der stark proliferierenden Gewebe, insbesondere blutbildender Zellen im Knochenmark, Haarfollikel, Nägel und Schleimhäute [33] sowie zu Schäden der Knochen, der Hormondrüsen und des Herzens [34]. Weitere Spätfolgen sind Leber- und Nierenschäden, Schwerhörigkeit, Lungenfibrose, neurologische Schäden und Neumalignome [35]. Um Unter- und Überdosierungen vermeiden zu können, bedarf es einer exakten Kenntnis des Zusammenwirkens der Medikamente.

Therapien von Leukämien und Lymphomen sind für SNP-Analysen bzw. retrospektive Vergleichsstudien besonders geeignet, u.a. weil die überwiegende Anzahl der Kinder und Jugendlichen ausschließlich medikamentös behandelt werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Leukämiearten erheblich. Die akute myeloische Leukämie (AML) hat mit 61% die niedrigste 5-Jahre-Überlebensrate und Hodgkin-Lymphome mit 96% die höchste [36], [37]. Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) hat inzwischen eine Langzeit-Überlebensrate von fast 80% [38]. Allerdings erleiden 20% ein Rezidiv, von denen ca. 55% versterben [39]. Egbelakin et al. berichten über schwere Neurotoxizität durch eine Vincristin-Behandlung bei Kindern mit ALL. Als Ursache konnte eine geringere Aktivität von CYP 3A5 (poor metabolizer) gefunden werden, weswegen Vincristin im Plasma akkumuliert [40].

#### 1.4 Zielsetzung

Die Überlappungen in der Substratspezifität von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen, deren große Anzahl von SNPs sowie die ethnischen Unterschiede der SNP-Frequenzen gestalten die Vorhersage von phänotypischen Reaktionen auf Medikamente schwierig. Um für jeden Patienten aufeinander abgestimmte Medikamente und eine individuell angepasste Dosis auswählen zu können, bedarf es umfangreichen Wissens zu allen erwähnten Faktoren. Aus diesem Grund sollten in dieser Dissertation folgende Fragen bearbeitet werden:

1. Welche Wechselwirkungen wurden in der gesamten wissenschaftlichen Literatur zwischen Medikamenten und fremdstoffmetabolisierenden Enzymen beschrieben? Welche Medikamente beeinflussen sich potenziell also gegenseitig?
2. Bei welchen Medikamenten handelt es sich um Prodrugs und welche müssen erst von Enzymen aktiviert werden, um ihre Wirkung zu entfalten?
3. Welche Polymorphismen von den Enzymen sind von größter Bedeutung für die Verstoffwechslung von Medikamenten? Welche SNPs kommen in Kaukasiern bzw. in anderen Ethnien am häufigsten vor? Welche Enzyme verstoffwechseln die meisten Medikamente und haben somit den größten Einfluss auf die Medikamentenmetabolisierung?
4. In welchen Organen bzw. Geweben werden CYPs in welchem Verhältnis exprimiert?
5. Können konkrete Optimierungsvorschläge am Beispiel der Polychemotherapie gemacht werden, um Wechselwirkungen zwischen mehreren Medikamenten zu vermeiden?

Ziel der Arbeit war die Schaffung einer theoretischen Grundlage für klinische Studien, die zu personalisierten Dosisanpassungen beitragen sollen. Somit könnten wirkungslose und toxische Medikamentenspiegel vermieden werden. Um die Wechselwirkungen von verschiedenen, gleichzeitig applizierten Medikamenten unter Berücksichtigung der verstoffwechselnden Enzyme unkompliziert abfragen zu können, sollten sämtliche Interaktionen mit Referenz in einer Datenbank integriert sowie ein Medikamenten-Enzym-Interaktions-Tool (*Cocktail-Tool*) entwickelt werden.

Darüber hinaus sollte eine Analyse zu Expressionsunterschieden in verschiedenen Geweben stattfinden. Dadurch sollte herausgefunden werden, ob und inwiefern die CYPs im Körper heterogen verteilt sind. Auf diese Weise könnten Schlussfolgerungen auf die Funktion seltenerer CYPs möglich sein, eventuell sogar Ansätze für die Entwicklung neuer Medikamente.

## 2 Methodik

### 2.1 Textmining als wichtige Methode der biomedizinischen Forschung

Textmining stellt eine systematische Literaturrecherche dar, mit der in dieser Arbeit potenzielle Interaktionen aufgefunden wurden. Die unüberschaubare Menge an Informationen macht das Textmining zur einzigen Möglichkeit sämtliche Informationen zuverlässig aufzufinden und ständig aktuell halten zu können. Dieses Verfahren wurde bei allen drei Publikationen angewandt. Dabei wurden die Zusammenfassungen (*Abstracts*) aller in PubMed/Medline veröffentlichten wissenschaftlichen Artikel (über 21.000.000, Stand von September 2013) automatisch nach spezifischen Schlüsselwörtern bzw. Kombinationen durchsucht und so nach relevanten Artikeln gefiltert. Im Fall dieser Dissertation waren dies 2.802 Wirkstoffnamen und deren Synonyme, die Enzymnamen und deren Synonyme sowie ca. 100 Prädikate (Interaktionsbegriffe) wie „*inhibit, degrade, increase, induce*“ etc. Die Enzymnamen umfassen 57 CYPs, sechs Phase II-Enzymgruppen und 411 Transporter, davon 49 ABC-Transporter und 362 SLC-Transporter (englisch: *solute carrier transporter*). Das entspricht über einer Million Einzelsuchen in PubMed.

Diese Publikationen wurden von dem NCBI FTP Server in XML-Format heruntergeladen und in der Programmbibliothek *Lucene* ([lucene.apache.org](http://lucene.apache.org)) katalogisiert. Um in dieser Bibliothek dynamisch Beziehungen abzufragen, wurde mit Hilfe von *LingPipe* (<http://alias-i.com/lingpipe>) ein Java-Programm entwickelt.

Es wurden potenzielle Beziehungen in ca. 22.500 Zusammenfassungen gefunden. Diese Textmining Treffer wurden in einer SQL-Datei ausgegeben. Um die falsch-positive Trefferrate zu verringern, wurde ein Score aus folgenden Variablen berechnet: Abstand zwischen den Schlüsselwörtern (z. B. Medikament und Enzym), Häufigkeit der Schlagworte in der Zusammenfassung, Reihenfolge der Schlagworte, Position in der Zusammenfassung sowie Titel und Vorkommen von Negationstermen. Durch diesen Score wurden die gefundenen 22.500 Zusammenfassungen auf ca. 12.500 relevante reduziert.

### 2.2 Manuelle Validierung zur Qualitätssicherung

Das kombinierte Auftreten dieser Schlüsselworte in der Zusammenfassung bzw. in einem Satz garantiert noch keine Interaktion. Deswegen wurden die Textmining Treffer manuell „validiert“ (in der englischen Literatur wird diesbezüglich von *'manual curation'* gesprochen). Dazu wurden die Zusammenfassungen oder, falls nötig, der Volltext gelesen, um entscheiden zu können, ob tatsächlich eine Interaktion zu dem gefundenen CYP existiert und um dem Wirkstoff gegebene



nenfalls die Attribute „Substrat“, „Inhibitor“ oder „Induktor“ zuzuordnen. Die Abbildung 2 zeigt das entwickelte Validierungsprogramm am Beispiel eines Transporter-Textminings. Die vorgeschlagene Beziehung kann mit „wahr“ (*true*) bestätigt, oder als negative Beziehung mit „falsch“ (*false*) negiert werden. Wenn mindestens drei Mal die gleiche Interaktion validiert wurde, gilt diese als gesichert und wurde in die Datenbank *Transformer* integriert.

Score	PMID	Sentence	TRUE	FALSE	NOT SURE
100	19440975	ABCB1, also known as MDR1/P-glycoprotein, can transport cortisol and aldosterone.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
100	18598736	Among the antiparkinsonian drugs tested, levodopa, bromocriptine, pergolide and pramipexole were ABCB1 substrates.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
100	15371980	CONCLUSIONS: Aside from induction of CYP3A4, carbamazepine acts as an inducer of intestinal MDR1 mRNA, MRP2 mRNA, and MRP2 protein content.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

back to home      Scientist 1      SAVE

Abbildung 2: Validierung der Textmining Ergebnisse

Validierungsprogramm mit exemplarischen Ergebnissen eines Transporter-Textminings mit den Spalten Score, PubMedID, Relationsatz und Checkboxen für die Validierung (wahr, falsch, unsicher). Die Transporter sind in blau, die Relation in orange und die Medikamente in rot hervorgehoben. Wissenschaftler 1 (*Scientist 1*) liest den Relationsatz, evtl. die Zusammenfassung des Artikels (*Abstract*) und falls nötig den Volltext, um die vorgeschlagene Beziehung zu validieren.

Bei der Suche nach Häufigkeiten von SNPs in Kaukasiern wurde nach Allel-Veränderungen und rs-Nummern auf Grundlage der Allel Nomenklatur Website ([www.cypalleles.ki.se/](http://www.cypalleles.ki.se/)) gesucht (Stand von Juli 2013) [41]. Diese wurden in Beziehung zu Wörtern wie: “*frequency, caucasians, population, effect*” gesucht. Aufgrund der Tatsache, dass die Frequenzen häufig nur in den Volltexten der Publikationen stehen und nicht in den Zusammenfassungen, gestaltete sich die automatisierte Suche hiernach schwierig. Daten zu Frequenzen konnten nur in Arbeiten gefunden werden, deren Zusammenfassung bereits einen Hinweis auf solche Informationen gab. Folglich schloss sich eine manuelle Volltextanalyse in entsprechenden Publikationen an.

### **2.3 Varianten der Enzymfamilie CYP P450 und das ‚1.000 Genom Projekt‘**

In dem *1.000 Genom Projekt* ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)) wurde die DNA von 1.092 Individuen aus 14 verschiedenen Populationen sequenziert [42]. Dabei wurden insgesamt 38 Millionen SNPs und fast 1,5 Millionen kurze und lange Insertionen und Deletionen gefunden. Bei der großen Anzahl von Polymorphismen stellt sich die Frage, welche hiervon bedeutsam für die personalisierte Medizin sind. Bedeutsam sind zunächst diejenigen Polymorphismen, die einerseits einen Effekt auf die Enzymaktivität haben und andererseits häufig (>1%) in der breiten Bevölkerung auftreten.

Das Browser-Tool ([browser.1000genomes.org](http://browser.1000genomes.org)) ermöglicht die Suche nach SNPs in sämtlichen Genen. In dieser Arbeit wurde nach nicht-synonymen SNPs in allen verfügbaren CYP-Genen (45) mit einer Frequenz von über einem Prozent in allen 14 verschiedenen Ethnien gesucht.

### **2.4 Analyse der Expression in verschiedenen Geweben**

CYPs werden nicht nur in der Leber exprimiert, sondern in fast allen Geweben und zwar in jeweils unterschiedlichem Ausmaß. Somit spiegeln die CYPs oft die funktionellen und molekularen Aufgaben der jeweiligen Organe wider. Die Expressionsraten der CYPs in Geweben könnten aufschlussreiche Hinweise über deren Stoffwechsel liefern.

Um CYP mRNA Expressionsdaten in unterschiedlichen Organen untersuchen zu können, wurde in der Datenbank *Gene Expression Omnibus* (GEO) ([ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://ncbi.nlm.nih.gov/geo)) nach einem geeigneten Expressionsdatensatz gesucht. In der vorliegenden Arbeit wurden die Affymetrix Daten der Serie GSE3526 ausgewählt [43]. In dieser Studie von Roth et al. wurden zehn *post mortem* Spender (fünf weibliche, fünf männliche) biopsiert. Die Spender litten an keinen chronischen Krankheiten und starben aufgrund eines plötzlichen Ereignisses. Jedem Spender wurden 65 Biopsien aus 41 verschiedenen Geweben entnommen, insgesamt 353. Roth et al. verwendeten das Human Genome Array (U133 Plus 2.0) mit 84 Sonden, um u.a. die Expressionsspiegel von 40

verschiedenen CYPs (inklusive deren Isoformen) zu messen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Daten von Roth et al. zunächst normiert und kondensiert. Anschließend wurde mit Hilfe des Programms Genesis [44] eine 'Heatmap' (farbkodierte Eigenschaftskarte) generiert (siehe Abbildung 3). Um die Expressionswerte miteinander vergleichen zu können, wurde die relative Expression (Z-Score) kalkuliert. Dabei wurde das Genexpressionsniveau eines Gewebes abzüglich des mittleren Genexpressionsniveaus aller Regionen ermittelt und durch die Standardabweichung dividiert. Um die Gewebsunterschiede deutlicher zu machen, wurde die Leber separat ausgewertet. Die Ergebnisse der Expressionsunterschiede sind in einer Körperkarte in der eigenen Publikation zusammenfassend veranschaulicht [45]. Alle Expressionsniveaus, die mindestens zwei Standardabweichungen über oder unter dem Mittelwert lagen, wurden integriert. Die Intensität der Farben spiegelt die Höhe der Expression wider.

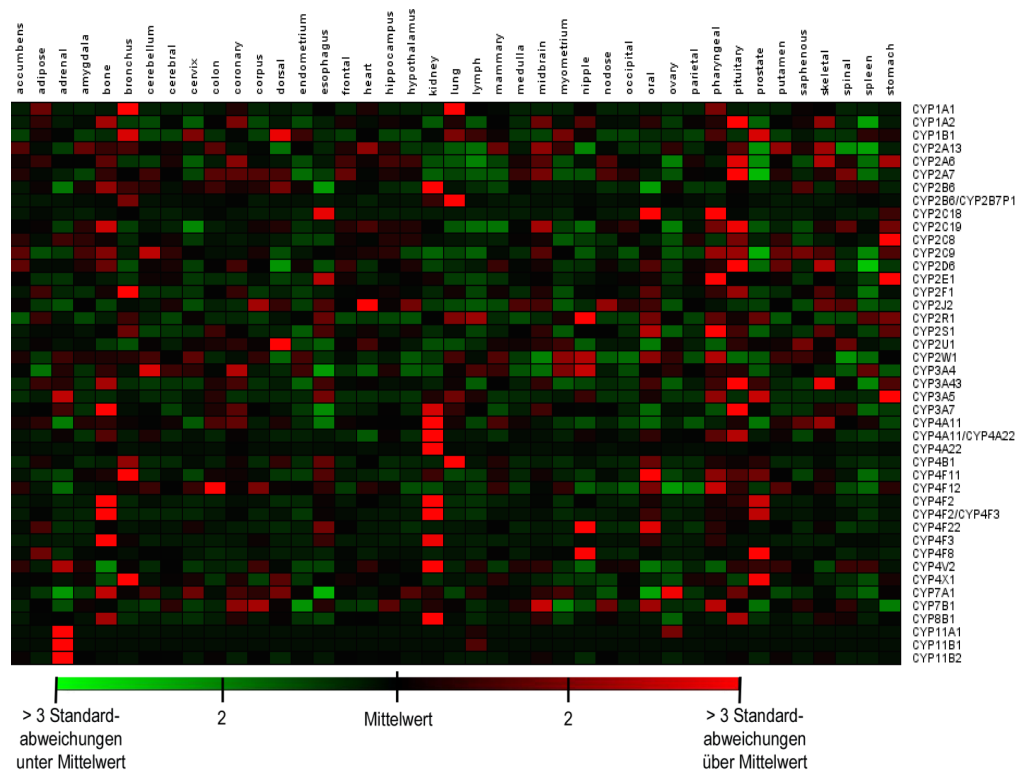


Abbildung 3: Heatmap (farbkodierte Eigenschaftskarte) der mRNA-Expressionsanalyse von 40 CYP-Isoformen in 41 humanen Gewebearten [45]

Die Abbildung zeigt die Verteilung der CYP-Expressionen in 41 verschiedenen Geweben. Die Expressionsniveaus lagen in einem Bereich +/- 3 Standardabweichungen vom Mittelwert und sind auf Basis der abgebildeten Farbskala visualisiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Web-Interface zur Nutzung der Interaktionsdatenbank und Datenanalyse

Die positiv validierten Interaktionen zwischen ca. 2.800 Medikamenten und fast 6.000 verschiedenen Enzymen wurden in die Datenbank ‘*Transformer*’ integriert. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Interaktionen mit den jeweiligen Enzymen. Die Daten sind auf der Website <http://bioinformatics.charite.de/transformer> ohne Anmeldung öffentlich zugänglich. Zu jeder Interaktion findet man die entsprechende Referenz, überwiegend in PubMed-ID angegeben mit direktem Link zur Publikation.

---

<b>Medikamente</b>	>	<b>2.800</b>
davon Prodrugs		125
davon Nahrungsmittel		150
<b>Phase I-Interaktionen</b>	>	<b>4.000</b>
<b>Phase II-Interaktionen</b>	>	<b>400</b>
<b>Transporter Interaktionen</b>	>	<b>1.100</b>
<b>Referenzen</b>	>	<b>100.500</b>

---

Tabelle 1: **Statistik der Datenbank *Transformer***

Anzahl der enthaltenen Medikamente und deren Interaktionen mit den fremdstoffmetabolisierenden Enzymen der Phase I, Phase II und der Transporter sowie deren Referenzen

Zu sämtlichen Medikamenten wurden alle Enzyminteraktionen inklusive Referenzen sowie Indikationen (via ATC-Code), sämtliche Synonyme, die chemischen Strukturformeln (2D-Strukturen) und viele weitere physikalische und chemische Eigenschaften in die Datenbank *Transformer* integriert. Zu 789 verschiedenen Medikamenten konnten außerdem Halbwertszeiten und zu 760 Medikamenten  $Q_0$ -Werte in *Transformer* ergänzt werden. Zu den 125 gefundenen Prodrugs findet man darüber hinaus die Art der Aktivierungsreaktion, sowie das aktivierende Enzym (falls vorhanden) und den aktiven Metaboliten. Der Aktivierungsmechanismus wurde mit chemischen Strukturformeln visualisiert.

Um die Kompatibilität verschiedener, gleichzeitig verabreichter Medikamente beurteilen zu können, wurde im Rahmen dieser Disseratation das sogenannte ‘*Cocktail-Tool*’ entwickelt. In

diesem *Cocktail-Tool* können Interaktionen zwischen über 2.800 Medikamenten zueinander und zu über 6.000 fremdstoffmetabolisierenden Enzymen abgefragt werden. Es wird eine dynamische Ergebnistabelle angezeigt, in der interaktiv je nach Indikation nach Alternativen gesucht werden kann (siehe exemplarisch Abbildung 4). Jede Interaktion ist mit der entsprechenden PubMed-Referenz verlinkt. Die Interaktionen zwischen den ausgewählten Medikamenten können auch in einem Interaktionsnetzwerk (rot umrandet in Abbildung 4) in Form einer Java Anwendung dargestellt und interaktiv erweitert werden. Zielproteine (Targets) und verstoffwechselnde Enzyme der Medikamente können auf diese Weise leicht überblickt werden. Zusätzlich kann man auf jedes Enzym klicken und gelangt so zu Details, inklusive 3D-Struktur und allen interagierenden Medikamenten.

Die Indikation des Medikaments kann mit Hilfe des ATC-Codes ausgewählt werden. Der **ATC-Code** ist das WHO-Klassifikationssystem für Medikamente, nach **Anatomischen, Therapeutischen und Chemischen** Kriterien. Allerdings haben viele Medikamente mehr als einen ATC-Code, weil sie für mehrere Indikationen eingesetzt werden. Acetylsalicylsäure (ASS) wird beispielsweise als Schmerzmittel (ATC-Code: N02BA), zur prophylaktischen und therapeutischen Blutverdünnung (B01AC) sowie für die lokale Anwendung (A01AD) eingesetzt. Nach Auswahl der gewünschten Indikation über den ATC-Code, ist es möglich nach therapeutisch sinnvollen Alternativen zu suchen. Diese Auswahl an Ausweichmedikamenten stellt keine klinische Empfehlung dar, sondern lediglich theoretische Ansätze für eine Therapieoptimierung hinsichtlich des Metabolismus, die durch den Kliniker von Fall zu Fall abgewogen werden müssen.

**A**

Type in a Drug Name (e.g. Omeprazole and Metoprolol)

Valproi

Cocktail

Select a drug from the results below

Acide valproique  
Acido valproico  
Acidum valproicum  
Valproic acid

Clarithromycin  
Hydrocodone  
Valproic acid

Repeat step 1 and 2

Get Interactions

**B**

display network

HWZ

Q0

Phase I (CYPs)

3A4

Phase II

Transporter

ACETYSALICYLIC ACID  
STOMATOLOGY  
ANTITHROMBOTIC AGENTS  
ANALGESICS  
REMOVE ALL ALTERNATIVES

Alternativen über den ATC-Code

ATC-Baum

ATC-Tree

- A - Alimentary Tract And Metabolism (420)
- B - Blood And Blood Forming Organs (144)
- B01 ANTITHROMBOTIC AGENTS**
  - B02 ANTIHEMORRHAGICS (14)
  - B03 ANTANEMIC PREPARATIONS (28)
  - B05 BLOOD SUBSTITUTES AND PERFUSIO
  - B06 OTHER HEMATOLOGICAL AGENTS (3)
- C - Cardiovascular System (392)
- D - Dermatologicals (303)
- G - Genito Urinary System And Sex Hormones (17)
- H - Systemic Hormonal Preparations, Excl. Sex Ho
- J - Antinfectives For Systemic Use (302)
- L - Antineoplastic And Immunomodulating Agents
- M - Musculo-skeletal System (171)
- N - Nervous System (506)
- P - Antiparasitic Products, Insecticides And Repel
- R - Respiratory System (279)
- S - Sensory Organs (211)
- V - Various (182)

Stilpnip-Prin  
Trentham  
Epidiurante  
cupabacryl  
Dip-jididomoy

Abbildung 4: *Cocktail-Tool der Transformer Datenbank* [46]

Auf der linken Seite in der ersten Zeile stehen angeschragt die Medikamente des ursprünglich eingegebenen Cocktails. In der ersten Spalte stehen die Enzyme der Phase I, Phase II und die Transporter. Falls eine Interaktion zwischen einem Medikament und einem Enzym in der Datenbank existiert, wird in der entsprechenden Zelle eine Abkürzung angezeigt: für Substrat (S), Inhibitor (Inh), Induktor (Ind) oder ein Ausrufezeichen (!) für potenzielle Interaktionen mit Nahrungsmitteln oder Heilkräutern. Wenn zwei Medikamenten-Interaktionen orange, vier rot, fünf oder mehr dunkelrot. Mögliche Ausweichmedikamente erhält man interaktiv, wenn man die Indikation des Medikaments via ATC-Code auswählt.

### 3.2 Bedeutung von CYP-Polymorphismen für die personalisierte Therapie

In dieser Dissertation wurden 199 nicht-synonyme SNPs gefunden, die in mindestens einem Prozent der 14 verschiedenen Ethnien im *1.000 Genom Projekt* vorkommen (browser.1000genomes.org; Stand: Oktober 2013). Diese 199 nicht-synonymen SNPs wurden mit Hilfe des Webdienstes *PolyPhen* auf die Wahrscheinlichkeit der Aktivitätsveränderung des jeweiligen CYPs untersucht. Die *PolyPhen* Vorhersage wird mittels strukturbasierter und vergleichender Betrachtungen vorgenommen und hat eine Trefferquote von ca. 70% [47]. *PolyPhen* prognostizierte bei 72 von den 199 SNPs eine Aktivitätsveränderung in dem entsprechenden CYP. In der Tabelle 2 sind alle SNPs dargestellt, die als zusätzliches Kriterium auch in Kaukasiern vorkamen und bei denen eine Enzymaktivitätsveränderung durch *PolyPhen* vorhergesagt wurde (siehe auch ausführliche Tabelle 2 in eigener Publikation [45]).

CYP	ID	Gene	Amino Acid	MAF (Abw)	Caucasian frequency
CYP 2A13	rs202058359	238G>A	V80M	4.8	0.4
CYP 2A7	rs3869579	778C>T	R260C	49.1	60.3
CYP 2B6	rs8192709	64C>T	R22C	5.3	3.6-9.5
CYP 2C8	rs1058930	792C>G	I264M	2.6	3.2-6.6
	rs11572103	805A>T	I269F	3.9	0.0-0.6
CYP 2C18	rs2281891	1154C>T	T385M	19.6	8.1 - 16.7
CYP 2C9	rs2256871	752A>G	H251R	2.6	0.0-0.8
CYP 2D6	rs1058172	941G>A	R314H	7.0	13.0
	rs59421388	859G>A	V287M	2.9	0.0-3.2
	rs1065852	100C>T	P34S	25.5	23.1
CYP 2E1	rs6413419	535G>A	V179I	6.7	0.8 - 2.2
CYP 2S1	rs34971233	1397C>T	P466L	2.0	0.0 - 3.3
CYP 3A43	rs680055	1018C>G	P340A	12.0	5.0-7.5
CYP 4A11	rs1126743	1374C>G	I458M	41.3	36.2
CYP 4A22	rs113777592	553G>T	V185F	28.1	20.5
	rs2056900	388G>A	G130S	29.3	18.3-21.3
	rs4926600	1525C>T	L509F	12.8	8.1
	rs61736431	1154C>T	P385L	1.1	3.5
CYP 4B1	rs2297809	1123C>T	R375C	19.2	14.2-22.5
	rs4646487	517C>T	R173W	15.4	9.7-15.0
CYP 4F11	rs1060463	1271G>A	R424Q	49.4	38.5 - 45.5
CYP 4F12	rs16995378	47C>T	T16M	6.8	84.2 - 100
	rs57578760	808G>C	V270L	1.1	3.4 - 8.3
CYP 4F2	rs2074900	515C>T	Thr172I	25.5	26.6-35.7
	rs2108622	1297G>A	V433M	21.5	23.2-30.3
	rs3093153	554G>T	G185V	3.9	4.3-9.8
CYP 5A1	rs3093200	1555C>A	L519M	6.0	5.5-8.9
	rs13306050	1372C>T	R458C	2.1	0.0-0.4
	rs13306052	679G>A	V227M	1.4	0.0-1.4
	rs6952940	544C>T	P182S	1.5	1.9-4.1

Tabelle 2: Liste von 30 nicht-synonymen CYP-SNPs mit prognostiziertem Enzymaktivitätsverlust

Die aufgelisteten SNPs traten im *1.000 Genom Projekt* in über einem Prozent der Bevölkerung auf. In der Spalte 3 wird der Gen-Abschnitt mit dem jeweiligen Basenpaaraustausch (C=Cytosin,

G=Guanin, T=Thymin und A=Adenosin) benannt. Spalte 4 zeigt den resultierenden Aminosäureaustausch. Der Effekt auf die Aktivität des jeweiligen CYPs wurde von *PolyPhen* von diesen 30 SNPs als vermindert prognostiziert.

Um nun CYP-Mutationen zu sammeln, die potenziell eine klinische Auswirkung auf die Medikamentenverstoffwechslung haben, wurde die Suche fokussiert. Es wurde also nur noch nach Mutationen gesucht, die zu mindestens einem Prozent bei Kaukasiern auftreten und die in Studien eine Auswirkung auf die Enzymaktivität gezeigt haben. Zu diesem Zweck wurde eine automatisierte und manuelle Literaturrecherche durchgeführt. Die gesetzten Kriterien wurden von insgesamt 34 verschiedenen Allelen erfüllt (siehe Tabelle 1 in eigener Publikation [45]). Die meisten Allele, insgesamt zehn, wurden für das Gen CYP 2D6 gefunden; sechs für CYP 2B6. Dieses Verhältnis passt zu den Zahlen der SNPs in der SuperCYP Datenbank: 114 SNPs in CYP 2D6 und 57 in CYP 2B6 (siehe Abbildung 4 in [45]).

Diese Tabelle mit 34 Allelen stellt eine Grundlage für klinische Studien dar, um Polymorphismen von Enzymen, die relevant für die Medikamentenverstoffwechslung sein können, individuell aufzuspüren, um somit Unter- und Überdosierungen von Medikamenten vermeiden zu können. In solchen Medikamentenstudien müssten nicht alle 57 CYPs untersucht werden, da viele CYPs keine oder nur eine geringe Rolle in der Medikamentenverstoffwechslung spielen. Um die wichtigsten CYPs zu detektieren, wurde die Anzahl der Medikamente, die ein CYP metabolisiert, in der SuperCYP Datenbank analysiert (siehe Abbildung 5 in [45]). Dabei zeigte sich, dass zwölf CYPs für 93% der Medikamentenreaktionen verantwortlich sind. Folgende fünf CYPs metabolisieren 60% der Reaktionen: CYP 3A4, 2C9, 1A2, 2C19 und 2D6. Diese fünf CYPs haben wahrscheinlich den größten Einfluss auf das individuelle Ansprechen auf Medikamente. CYP 2A6 und 2B6 weisen zwar ebenfalls viele häufige Allel-Varianten auf, metabolisieren aber nur verhältnismäßig wenige Medikamente, sodass der Einfluss als geringer eingeschätzt werden kann.

### **3.3 Expressionsunterschiede von CYPs in verschiedenen Geweben**

In den Affymetrix Daten der Serie GSE3526 [43] konnte in 21 von 41 Geweben eine heterogene Verteilung der CYP Expression gefunden werden: die mRNA Expressionsspiegel unterschieden sich in mindestens einem Gewebe um mindestens zwei Standardabweichungen im Vergleich zur durchschnittlichen Expression. Exemplarisch werden im Folgenden einige signifikante Expressionsunterschiede in den verschiedenen Geweben aufgeführt.



Die Nebennierenrinde zeigte, verglichen mit der durchschnittlichen Expression, eine 6-fach erhöhte Expression von CYP 11A1, 11B1 und 11B2. Diese CYPs sind für Steroid- und Aldosteronsynthese verantwortlich und wurden auch in keinem anderen Gewebe vermehrt exprimiert.

Die Niere hat außergewöhnlich hohe Expressionsspiegel für die CYP Familie 4 (6-fach erhöhtes CYP 4A22 und 4-fach in CYP 4V2, 4F2 und 4A11), die unter anderem für den Arachidonsäuremetabolismus verantwortlich sind. Dies passt dazu, dass die Niere Prostaglandin synthetisiert, um die Durchblutung zu fördern [48]. Forschung zur lokalen Induktion der CYP Familie 4 in der Niere könnte sich also lohnen. CYP 8B1 ist ebenfalls an der Prostaglandinsynthese beteiligt und wies in unserer Analyse eine 5-fach erhöhte Expression in der Niere auf. Der Expressionsspiegel von CYP 2B6 war in der Niere 5-fach erhöht; CYP 2B6 ist für den Metabolisierung von Xenobiotika (z. B. Cyclophosphamid und Ifosfamid) verantwortlich.

Dass die Milz 2-fach höhere CYP 2C9- und 2D6-Expressionsniveaus aufweist, könnte darauf hindeuten, dass auch sie am Medikamentenmetabolisierung teilnimmt. Das gleiche gilt für das 5-fach erhöhte CYP 2C8 im Lungengewebe und CYP 2F1 in den Bronchien.

Die Prostata zeigte eine 5-fach höhere Expression von CYP 4F8. Dies könnte ein Ansatz für die Entwicklung eines Prodrugs darstellen, welches nur von CYP 4F8 aktiviert wird, um so Nebenwirkungen im restlichen Körper vermeiden zu können. Interessanterweise wird CYP 2C18 nur von der Mundhöhle, dem Pharynx und dem Ösophagus vermehrt exprimiert.

Die Expressionsspiegel, die von der durchschnittlichen Expression abwichen, wurden in einer schematischen Körperkarte (Abbildung 1 in [45]) veranschaulicht. Mit dieser neuartigen Körperkarte bekommt man einen guten Überblick über die lokale Diversität der CYP-Expression.

### **3.4 Optimierung in der Chemotherapie**

Aus über 100 Chemotherapieprotokollen aus dem Blauen Buch [49] wurden über 500 Medikamente extrahiert. Nach diesen Medikamenten wurden mittels Textmining in sämtlichen PubMed Zusammenfassungen bezüglich Interaktionen mit CYPs gesucht. Es erwies sich, dass die anti-neoplastischen Medikamente überwiegend von folgenden drei CYPs metabolisiert werden: CYP 3A4, 2D6 und 2C9. Insbesondere CYP 2D6 und 2C9 sind hochpolymorph und darum sind hier die größten inter-individuellen Unterschiede im Medikamentenmetabolismus zu erwarten.

Es wurden 91 standardisierte Behandlungsprotokolle auf CYP-Medikamenten-Interaktion untersucht und mögliche Alternativen in dem Webtool <http://bioinformatics.charite.de/supercyp/chemotherapy/> zusammengestellt. Die 91 Protokolle beinhalten die Behandlung folgender maligner Tumore im Kindesalter (unter 15 Jahren): ALL, AML, Weichteilsarkom, Osteosarkom, Nephroblastom und Neuroblastom.

Seit 2002 läuft an der Charité Campus Virchow Klinikum eine randomisierte, kontrollierte, klinische Studie, die 143 Kinder mit einem ALL-Rezidiv eingeschlossen hat, die alle gemäß des ALL REZ BFM Therapieschemas (von der Berlin-Frankfurt-Münster-Arbeitsgruppe) behandelt wurden [50]. Von allen eingeschlossenen Patienten wurde regelmäßig im Verlauf der Therapie Blutplasma eingefroren. Zur Ergänzung der vorliegenden Dissertation fand eine Analyse von CYP SNPs dieser Patienten statt. Diese Ergebnisse wurden noch nicht veröffentlicht, sollen aber hier kurz vorgestellt werden. Im Rahmen einer Kooperation mit ATLAS Biolabs Berlin wurden 143 DNA-Proben auf ca. 50 CYP SNPs untersucht. Es konnten 18 CYP SNPs mit einer deutlich erhöhten Mortalität (>25%) der Kinder assoziiert werden. Die meisten der 18 gefundenen SNPs betrafen die Gene von CYP 2B6. Dies könnte durch den Umstand erklärt werden, dass die in der ALL-Therapie eingesetzten Prodrugs Ifosfamid und Cyclophosphamid nicht von CYP 2B6 aktiviert werden konnten. Laut Kirchheiner et al. tragen ca. 25% der Kaukasier homo- oder heterozygot das Allel CYP 2B6 \*6 (n=121), welches zu einer verringerten Proteinexpression führt (15415060 ?). Leider gab es keine Plasmaproben, die kurz nach der Cocktail-Applikation entnommen wurden und zur Validierung der fehlenden Aktivierung hätten herangezogen werden können. Aktuell findet in Kooperation mit der Vanderbilt Universität eine Validierung dieser Daten statt. Diese Studie ist ein Beispiel für die Relevanz der personalisierten Medizin. Solche Studien sollten vermehrt durchgeführt werden, um Patienten vor toxischen oder wirkungslosen Therapien bewahren zu können.

## 4 Diskussion

### 4.1 Web-Interface zur interaktiven Optimierung von Medikamentencocktails

Interaktionen zwischen Medikamenten und Enzymen werden meist nur speziell für einen Wirkstoff gesucht. Daher sind die Informationen zu Medikamenteninteraktionen weit über die wissenschaftliche Literatur verstreut. Die Interaktionen sind jedoch gerade dann relevant wenn mehrere Medikamente verschrieben werden. Die in dieser Dissertation entwickelte, über das Internet frei zugängliche Datenbank *Transformer* schließt diese Lücke, indem sie sämtliche Informationen bündelt und nutzerfreundlich zur Verfügung stellt.

Die über 100.000 Interaktionen zwischen den humanen CYPs und ca. 2.800 Wirkstoffen untereinander sind ein Alleinstellungsmerkmal der Datenbank *Transformer*. Die Datenbank ermöglicht es dem Nutzer, schnell umfassende Informationen zu einem beliebigen Medikamentencocktail zu erhalten. Zusätzlich kann er sich interaktiv je nach Indikation des Medikaments Ausweichmedikamente vorschlagen lassen. Es wurden Halbwertszeiten in *Transformer* integriert, um tendenziell lange Halbwertszeiten zu bevorzugen bzw. um potenziell ungenügende oder toxische Wirkspiegel leichter identifizieren zu können. Des Weiteren konnte zu fast allen Medikamenten die Strukturformeln ergänzt werden. Darin können funktionelle Gruppen, Polarität und Fettlöslichkeit abgelesen werden. Zusätzlich wurden  $Q_0$ -Werte zu vielen Medikamenten ergänzt, um die renale Exkretion berücksichtigen zu können bzw. um bei Nierenstörungen gegebenenfalls auf andere Medikamente ausweichen zu können.

Das Medical Center der Universität Maryland hat unter folgendem Link <http://umm.edu/health/medical/drug-interaction-tool> (Stand: August 2014) ein Webtool entwickelt, das im Ansatz dem *Cocktail-Tool* von *Transformer* ähnelt. Dieses Medikamenten-Interaktionstool beinhaltet bedeutend weniger Interaktionen und keine alternativen Medikamente. Des Weiteren wurden nur Interaktionen mit CYPs nicht jedoch mit Phase II-Enzymen oder Transportern berücksichtigt.

In der Tabelle 3 sind die Unterschiede zwischen der Datenbank *Transformer* und vier anderen Datenbanken zusammengestellt [24], [52], [53], [54]. Jede Datenbank hat andere Schwerpunkte, aber keine andere deckt alle drei Phasen der Biotransformation vollständig ab. Insbesondere die große Anzahl an Interaktionen zwischen den Medikamenten untereinander hebt *Transformer* von allen bestehenden Datenbanken ab. Die direkten Verlinkungen zu den entsprechenden Referenzen sind ebenfalls einzigartig und eröffnen eine transparente, Evidenz-basierte Grundlage für klinische Studien.

	Transformer	SuperCYP	DrugBank	KEGG	HMDB
Medikamente	2.802	1.170	7.685	1.198	1,157
Prodrugs	+	-	+	-	-
Phase I	+	+	k.A.	+	k.A.
Phase II	+	-	k.A.	k.A.	k.A.
Transporter	+	-	+	k.A.	+
Medikamenten-Interaktionen	100.000	2.785	20.266	14.441	22.139
Referenzen zu Interaktionen	+	+	-	-	-

Tabelle 3: **Transformer Datenbank im Vergleich zu den anderen Datenbanken**  
 SuperCYP [24], DrugBank 4.0 [52], KEGG [53], Human Metabolome Database (HMDB) Version 3.6 [54]; k.A.: keine Angabe, +: vorhanden, -: nicht vorhanden (Stand: Juni 2014)

#### 4.2 Häufigkeiten von CYP SNPs und deren Bedeutung für die Therapiewirksamkeit

Unterschiedliche Phänotypen bei der Verstoffwechslung von Medikamenten können durch CYP SNPs erklärt werden. Insbesondere werden Biomarker zur Vorhersage des Ansprechens auf die Therapie bei Medikamenten benötigt, die schwere Nebenwirkungen verursachen sowie Medikamente, die ihren Effekt erst Wochen bis Monate später zeigen, um unwirksame Therapien vermeiden zu können. Gesammelte Informationen zu den Häufigkeiten der CYP SNPs sind rar. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Studien zusammengeführt, um somit einen Überblick über die häufigsten Varianten von CYPs zu gewinnen.

McGraw et al. haben verschiedene Studien zu den Frequenzen der CYPs 1A2, 2C8/9/19, 2D6 und 3A4/5 in verschiedenen Ethnien zusammengefasst [10]. Diese CYPs wurden aufgrund der höchsten Anzahl an zu verstoffwechselnden Medikamenten ausgewählt. Leider bietet die Arbeit keinen Überblick über alle CYPs in Form einer umfassenden Tabelle. Die Prozentzahlen der Allelhäufigkeiten bei Kaukasiern stimmen mit der vorliegenden Arbeit ungefähr überein, mit Ausnahme des Allels CYP 1A2 \*1F; McGraw et al. gaben eine Häufigkeit bei Kaukasiern von 68% an, während in der vorliegenden Arbeit nur 33% ermittelt wurden.

In der vorliegenden Dissertation wurden für CYP 2D6 zehn Allele gefunden, die in mindestens einem Prozent der Kaukasier vorkommen und die zu einer verminderten Enzymaktivität und

damit verlangsamten Metabolisierung führen. Das Allel CYP 2D6 \*4 hat sogar eine Häufigkeit von 20,7% bei Kaukasiern und ist mit einem verlangsamten Stoffwechsel assoziiert [55]. Zhou et al. haben ebenfalls einige Studien zusammengefasst und ermittelten, dass 5-14% der Kaukasier einen Polymorphismus im Gen für CYP 2D6 mit verminderter Enzymaktivität haben [1].

CYP 2D6 ist u.a. wichtig für die Verstoffwechselung bestimmter Antidepressiva, Antipsychotika und Betablocker, die demnach bei ca. 5-14% der kaukasischen Patienten zu Beginn zu hoch dosiert werden. Dies kann ohne Genotypisierung zu einer schwierigen Einstellung der Therapie führen und Hospitalisierungen verlängern [56].

Ingelman-Sundberg et al. haben CYP 2A6, 2B6, 2C9, 2C19 und 2D6 in absteigender Folge als die CYPs mit den meisten Polymorphismen benannt [57]. Diese Reihenfolge deckt sich mit den Analysen der eigenen Arbeit [45] mit Ausnahme des CYPs 2D6, das in dieser Arbeit die meisten SNPs zeigte (114), während es bei Ingelman-Sundberg et al. erst an fünfter Stelle steht. Diese Diskrepanz könnte dadurch erklärt werden, dass Ingelman-Sundberg et al. nicht nur SNPs, sondern auch Deletionen, Insertionen, Kopienzahlvariationen (engl: copy number variants) berücksichtigt haben. Gegen diese Erklärung spricht jedoch, dass SNPs im Allgemeinen 90% der genetischen Varianten des menschlichen Genoms darstellen.

### **4.3 Bedeutung der Expressionsunterschiede im Kontext aktueller Literatur**

Die Expressionsanalyse dieser Dissertation belegt eine heterogene Verteilung der CYPs im Körper. Das Wissen um diese Verteilung der CYPs könnte helfen, Prodrugs zu entwickeln, die erst in Organen mit hohem Expressionsniveau eines bestimmten CYP aktiviert werden und lokal ihre stärkste Wirkung entfalten. Beispielsweise wird das Zytostatikum Cyclophosphamid u.a. von CYP 2B6 aktiviert [58], welches verstärkt in der Niere exprimiert wird. Dies kann zu hohen Konzentrationen des aktiven Cyclophosphamids in diesem Organ führen und erklärt möglicherweise die gute Wirksamkeit bei z. B. Lupus Glomerulonephritis [59]. Ifosfamid wird häufig in der Chemotherapie verabreicht und wird ebenfalls v.a. von CYP 2B6 aktiviert. Eine bekannte Komplikation besteht in einem akuten Nierenversagen, die teilweise zur irreversiblen Nephropathie führt [60]. Möglicherweise werden diese Komplikationen ebenfalls durch die hohe Expression des CYPs 2B6 in den Nieren begünstigt.

Unter Umständen könnte man durch Hemmung oder Aktivierung der Enzyme neue Targets für Medikamente entdecken. Zum anderen kann die verschiedene Verteilung der CYPs auch unerwünschte Medikamentenwirkungen in bestimmten Organen bedingen. Gleichwohl bedarf es klinischer Studien, um das Wissen um die Expressionsniveaus nutzen zu können.

Diese Dissertation untermauert und ergänzt die Arbeit von Bièche et al. [61], die 23 CYP mRNAs in 22 verschiedenen Geweben untersucht haben. Beispielsweise fanden Bièche et al. CYP 2F1 in Lunge und Trachea erhöht exprimiert. Die vorliegende Arbeit bestätigte dies in den Bronchien, nicht jedoch in der Lunge.

#### 4.4 Ausblick

In der Interaktionsanalyse für die Datenbank *Transformer* wurden ausschließlich qualitative Interaktionen ermittelt, wie Induktor, Inhibitor und Substrat. Quantitative Daten, beispielsweise wie stark oder schwach eine Inhibition ausfällt bzw. bei welcher Dosierung, wie schnell sie stattfindet oder die Reversibilität der Hemmung wurden nicht systematisch ermittelt. *Transformer* weist auf theoretische Wechselwirkungen hin und zeigt Alternativen auf, die bisher klinisch nicht überprüft wurden. Klinische Studien sollten nun folgen, um eine Evidenz für klinisches Handeln zu schaffen. Dafür wäre ein einheitliches, elektronisches Krankenaktensystem ideal, in dem es möglich wäre, das Ansprechen auf Medikamente zu erfassen. In diesem System könnten auch gleichzeitig andere Einflüsse wie weitere Medikamente, Alter, Geschlecht, Gewicht, chronische Krankheiten, Organfunktionen und falls vorhanden Gen-Varianten vermerkt und berücksichtigt werden. Vermehrte Nebenwirkungen oder Wirkungslosigkeit könnten nach Korrektur für andere Einflussfaktoren als Medikamenteninteraktionen gewertet werden. Mit so einem System wären sowohl retrospektive als auch prospektive Studien zu Medikamenteninteraktionen mit großen Fallzahlen möglich. Ziel solcher Studien wäre es, Dosierungen zu Datenbanken wie *Transformer* hinzuzufügen, bei denen eine klinische Wechselwirkung erwartet werden kann und somit klinisch relevante Wechselwirkungen anzeigen zu können. Bereits in Arbeit ist die Integration von Neben- und Wechselwirkungen aus Beipackzetteln sämtlicher Medikamente in *Transformer*, um den klinischen Nutzen der Datenbank zu erweitern.

Bisher werden in Privatkliniken in den USA SNP-Analysen nur für den Stoffwechsel von Medikamenten mit schweren Nebenwirkungen oder enger therapeutischer Breite durchgeführt [31]. In der neuen „postgenomischen Ära“ werden GeneChips und Genotypisierungen immer preisgünstiger und zunehmende Zahlen von SNP-Analysen auch in der Patientenbehandlung möglich sein. Dementsprechend wird es immer wichtiger, individuelle Unterschiede in der Medikamentenverstoffwechslung aufzudecken, um Grundlagen für routinemäßige Genotypisierungen sowie eine personalisierte Therapie zu schaffen.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Zhou, S.F., J.P. Liu, and B. Chowbay, *Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact*. Drug Metab Rev, 2009. **41**(2): p. 89-295.
2. Sato, I. and M. Akazawa, *Polypharmacy and adverse drug reactions in Japanese elderly taking antihypertensives: a retrospective database study*. Drug Healthc Patient Saf. **5**: p. 143-50.
3. Morgan, T.K., et al., *A national census of medicines use: a 24-hour snapshot of Australians aged 50 years and older*. Med J Aust. **196**(1): p. 50-3.
4. Hajjar, E.R., A.C. Cafiero, and J.T. Hanlon, *Polypharmacy in elderly patients*. Am J Geriatr Pharmacother, 2007. **5**(4): p. 345-51.
5. Leendertse, A.J., et al., *Frequency of and risk factors for preventable medication-related hospital admissions in the Netherlands*. Arch Intern Med, 2008. **168**(17): p. 1890-6.
6. Fan, J. and I.A. de Lannoy, *Pharmacokinetics*. Biochem Pharmacol. **87**(1): p. 93-120.
7. Reddy, L.H. and D. Bazile, *Drug delivery design for intravenous route with integrated physicochemistry, pharmacokinetics and pharmacodynamics: illustration with the case of taxane therapeutics*. Adv Drug Deliv Rev. **71**: p. 34-57.
8. McLean, K.J., et al., *Biodiversity of cytochrome P450 redox systems*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 4): p. 796-801.
9. Guengerich, F.P., *Cytochrome p450 and chemical toxicology*. Chem Res Toxicol, 2008. **21**(1): p. 70-83.
10. McGraw, J. and D. Waller, *Cytochrome P450 variations in different ethnic populations*. Expert Opin Drug Metab Toxicol. **8**(3): p. 371-82.
11. Flockhart, D.A. and J.R. Oesterheld, *Cytochrome P450-mediated drug interactions*. Child Adolesc Psychiatr Clin N Am, 2000. **9**(1): p. 43-76.
12. Liston, H.L., J.S. Markowitz, and C.L. DeVane, *Drug glucuronidation in clinical psychopharmacology*. J Clin Psychopharmacol, 2001. **21**(5): p. 500-15.
13. Schulte, S. and W. Stoffel, *Ceramide UDPgalactosyltransferase from myelinating rat brain: purification, cloning, and expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10265-9.
14. Bock, K.W. and C. Kohle, *UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects*. Methods Enzymol, 2005. **400**: p. 57-75.
15. Tanabe, K., et al., *Reductive activation of 5-fluorodeoxyuridine prodrug possessing azide methyl group by hypoxic X-irradiation*. Bioorg Med Chem Lett. **22**(4): p. 1682-5.
16. Guengerich, F.P. and T. Shimada, *Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes*. Mutat Res, 1998. **400**(1-2): p. 201-13.
17. Dorman, G. and G.D. Prestwich, *Using photolabile ligands in drug discovery and development*. Trends Biotechnol, 2000. **18**(2): p. 64-77.
18. Simplicio, A.L., J.M. Clancy, and J.F. Gilmer, *Beta-aminoketones as prodrugs with pH-controlled activation*. Int J Pharm, 2007. **336**(2): p. 208-14.
19. Topf, N., et al., *Regional 'pro-drug' gene therapy: intravenous administration of an adenoviral vector expressing the E. coli cytosine deaminase gene and systemic administration of 5-fluorocytosine suppresses growth of hepatic metastasis of colon carcinoma*. Gene Ther, 1998. **5**(4): p. 507-13.
20. Huttunen, K.M., et al., *Cytochrome P450-activated prodrugs: targeted drug delivery*. Curr Med Chem, 2008. **15**(23): p. 2346-65.
21. Deenen, M.J., et al., *Part 2: pharmacogenetic variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism*. Oncologist. **16**(6): p. 820-34.
22. Spear, B.B., M. Heath-Chiozzi, and J. Huff, *Clinical application of pharmacogenetics*. Trends Mol Med, 2001. **7**(5): p. 201-4.
23. van der Weide, J. and L.S. Steijns, *Cytochrome P450 enzyme system: genetic polymorphisms and impact on clinical pharmacology*. Ann Clin Biochem, 1999. **36** ( Pt 6): p. 722-9.
24. Preissner, S., et al., *SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions*. Nucleic Acids Res. **38**(Database issue): p. D237-43.

25. Rodriguez-Antona, C., et al., *Identification and phenotype characterization of two CYP3A haplotypes causing different enzymatic capacity in fetal livers*. Clin Pharmacol Ther, 2005. **77**(4): p. 259-70.
26. Patterson, L.H. and G.I. Murray, *Tumour cytochrome P450 and drug activation*. Curr Pharm Des, 2002. **8**(15): p. 1335-47.
27. Mehta, P.A. and S.M. Davies, *Pharmacogenetics of acute lymphoblastic leukemia*. Curr Opin Hematol, 2004. **11**(6): p. 434-8.
28. Morrow, P.K., et al., *Effect of CYP2D6 polymorphisms on breast cancer recurrence*. Cancer. **118**(5): p. 1221-7.
29. Potter, G.A., et al., *The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1*. Br J Cancer, 2002. **86**(5): p. 774-8.
30. Lund, B., et al., *Risk factors for treatment related mortality in childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Pediatr Blood Cancer. **56**(4): p. 551-9.
31. Pulley, J.M., et al., *Operational implementation of prospective genotyping for personalized medicine: the design of the Vanderbilt PREDICT project*. Clin Pharmacol Ther. **92**(1): p. 87-95.
32. Terracini, B., *Epidemiology of childhood cancer*. Environ Health. **10 Suppl 1**: p. S8.
33. Guillot, B., D. Bessis, and O. Dereure, *Mucocutaneous side effects of antineoplastic chemotherapy*. Expert Opin Drug Saf, 2004. **3**(6): p. 579-87.
34. Pein, F., et al., *[Cardiac toxicity of cancer treatment regimes in children and adolescents: physiopathology, clinical data and the paediatric oncologist's point of view]*. Bull Cancer, 2004. **91 Suppl 3**: p. 185-91.
35. Aleksa, K., et al., *Cytochrome P450 3A and 2B6 in the developing kidney: implications for ifosfamide nephrotoxicity*. Pediatr Nephrol, 2005. **20**(7): p. 872-85.
36. Statistics, S.C. *Childhood Cancer by Site Incidence, Survival and Mortality*. Review 1975-2007, Section 28 2011 01.10.2014]; Available from: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2011/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011/).
37. Bandopadhyay, P., et al., *Long-term outcome of 4,040 children diagnosed with pediatric low-grade gliomas: an analysis of the Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) database*. Pediatr Blood Cancer. **61**(7): p. 1173-9.
38. Inaba, H., M. Greaves, and C.G. Mullighan, *Acute lymphoblastic leukaemia*. Lancet. **381**(9881): p. 1943-55.
39. Ko, R.H., et al., *Outcome of patients treated for relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: a Therapeutic Advances in Childhood Leukemia Consortium study*. J Clin Oncol. **28**(4): p. 648-54.
40. Egbelakin, A., et al., *Increased risk of vincristine neurotoxicity associated with low CYP3A5 expression genotype in children with acute lymphoblastic leukemia*. Pediatr Blood Cancer. **56**(3): p. 361-7.
41. Sim, S.C. and M. Ingelman-Sundberg, *The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects*. Hum Genomics. **4**(4): p. 278-81.
42. Abecasis, G.R., et al., *An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes*. Nature. **491**(7422): p. 56-65.
43. Roth, R.B., et al., *Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS*. Neurogenetics, 2006. **7**(2): p. 67-80.
44. Sturn, A., J. Quackenbush, and Z. Trajanoski, *Genesis: cluster analysis of microarray data*. Bioinformatics, 2002. **18**(1): p. 207-8.
45. Preissner, S.C., et al., *Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy*. PLoS One. **8**(12): p. e82562.
46. Hoffmann, M.F., et al., *The Transformer database: biotransformation of xenobiotics*. Nucleic Acids Res. **42**(Database issue): p. D1113-7.
47. Wang, L.L., Y. Li, and S.F. Zhou, *A bioinformatics approach for the phenotype prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human cytochromes P450*. Drug Metab Dispos, 2009. **37**(5): p. 977-91.
48. Nasrallah, R., R. Hassouneh, and R.L. Hebert, *Chronic kidney disease: targeting prostaglandin E2 receptors*. Am J Physiol Renal Physiol. **307**(3): p. F243-50.
49. Engelhardt MB, M.R., *Das Blaue Buch*2008: Springer. 200.



50. Eckert, C., et al., *Use of allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation based on minimal residual disease response improves outcomes for children with relapsed acute lymphoblastic leukemia in the intermediate-risk group.* J Clin Oncol, 2013. **31**(21): p. 2736-42.
51. Goh, B.C., et al., *An evaluation of the drug interaction potential of pazopanib, an oral vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, using a modified Cooperstown 5+1 cocktail in patients with advanced solid tumors.* Clin Pharmacol Ther. **88**(5): p. 652-9.
52. Law, V., et al., *DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism.* Nucleic Acids Res. **42**(Database issue): p. D1091-7.
53. Kanehisa, M., *The KEGG database.* Novartis Found Symp, 2002. **247**: p. 91-101; discussion 101-3, 119-28, 244-52.
54. Wishart, D.S., et al., *HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013.* Nucleic Acids Res. **41**(Database issue): p. D801-7.
55. Sachse, C., et al., *Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences.* Am J Hum Genet, 1997. **60**(2): p. 284-95.
56. Rasmussen, J.O., et al., *CYP2D6 gene test in psychiatric patients and healthy volunteers.* Scand J Clin Lab Invest, 2006. **66**(2): p. 129-36.
57. Ingelman-Sundberg, M., et al., *Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects.* Pharmacol Ther, 2007. **116**(3): p. 496-526.
58. Jounaidi, Y., et al., *Enhanced antitumor activity of P450 prodrug-based gene therapy using the low Km cyclophosphamide 4-hydroxylase P450 2B11.* Mol Cancer Ther, 2006. **5**(3): p. 541-55.
59. Steinberg, A.D. and J.L. Decker, *A double-blind controlled trial comparing cyclophosphamide, azathioprine and placebo in the treatment of lupus glomerulonephritis.* Arthritis Rheum, 1974. **17**(6): p. 923-37.
60. Akilesh, S., et al., *Chronic Ifosfamide toxicity: kidney pathology and pathophysiology.* Am J Kidney Dis, 2014. **63**(5): p. 843-50.
61. Bieche, I., et al., *Reverse transcriptase-PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues.* Pharmacogenet Genomics, 2007. **17**(9): p. 731-42.

## 6 Anteilserklärung

### Publikation 1

Sarah C. Preissner, Michael F. Hoffmann, Robert Preissner, Mathias Dunkel, Andreas Gewiess, Saskia Preissner, *Polymorphic Cytochrome P450 Enzymes (CYPs) and Their Role in Personalized Therapy*, PLOS ONE, 2013

Anteil: Beitrag im Einzelnen: Anteil bei der Entwicklung des Konzeptes, Analyse der bestehenden Datenbank auf Wichtigkeit der verschiedenen CYPs in der Verstoffwechslung von Medikamenten, Verbesserung des Textminings zur CYP SNP Frequenz-Suche in verschiedenen Ethnien, manuelle Überprüfung der Textminingergebnisse, manuelle Suche nach fehlenden Daten, Auswertung der ethnischen Unterschiede der CYP SNPs, Expressionsanalyse von Cytochrome P450, Visualisierung der Expressionsanalyse in einer Körperkarte, Verfassen der Publikation, Reviewprozess.

### Publikation 2

Michael F. Hoffmann, Sarah C. Preissner, Janette Nickel, Mathias Dunkel, Robert Preissner, Saskia Preissner, *The Transformer database: biotransformation of xenobiotics*, Nucleic Acids Research, 2014

Anteil: Beitrag im Einzelnen: Anteil bei der Entwicklung des Konzeptes, Erweiterung der bestehenden Medikamentenliste, insbesondere um Prodrugs, Zusammenstellung der Enzymlisten (v.a. Phase II- und Transportenzyme), Erstellen der Textminingbedingungen, manuelle Überprüfung der Textminingergebnisse, manuelle Recherche fehlender Daten, Datenbankaufbau und Erstellung der Website, Verfassen der Publikation, Reviewprozess.

### Publikation 3

Saskia Preissner, Mathias Dunkel, Michael F. Hoffmann, Sarah C. Preissner, Nikolai Genov, Wen Wei Rong, Robert Preissner, Karlheinz Seeger, *Drug Cocktail Optimization in Chemotherapy of Cancer*, PLOS ONE, 2012

Anteil: Beitrag im Einzelnen: Recherche von Chemomedikamenten und -Cocktails, Erstellen der Textminingbedingungen, manuelle Überprüfung der Textminingergebnisse, Entwicklung eines Online-Tools, Verfassen der Publikation.

## 7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sarah Preißner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Auf dem Weg zur personalisierten Pharmakokinetik: Analyse der Interaktionen und Polymorphismen von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen zur Optimierung der Medikation und exemplarischer Anwendung in der Polychemotherapie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

---

Unterschrift

# The Transformer database: biotransformation of xenobiotics

Michael F. Hoffmann, Sarah C. Preissner, Janette Nickel, Mathias Dunkel, Robert Preissner and Saskia Preissner\*

Structural Bioinformatics Group, Institute for Physiology & ECRC, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Lindenberger Weg 80, 13125 Berlin, Germany and Department of Operative and Preventive Dentistry, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Assmannshäuser Str. 4-6, 14197 Berlin, Germany

Received August 16, 2013; Revised November 7, 2013; Accepted November 9, 2013

## ABSTRACT

As the number of prescribed drugs is constantly rising, drug–drug interactions are an important issue. The simultaneous administration of several drugs can cause severe adverse effects based on interactions with the same metabolizing enzyme(s). The Transformer database (<http://bioinformatics.charite.de/transformer>) contains integrated information on the three phases of biotransformation (modification, conjugation and excretion) of 3000 drugs and >350 relevant food ingredients (e.g. grapefruit juice) and herbs, which are catalyzed by 400 proteins. A total of 100 000 interactions were found through text mining and manual validation. The 3D structures of 200 relevant proteins are included. The database enables users to search for drugs with a visual display of known interactions with phase I (Cytochrome P450) and phase II enzymes, transporters, food and herbs. For each interaction, PubMed references are given. To detect mutual impairments of drugs, the drug-cocktail tool displays interactions between selected drugs. By choosing the indication for a drug, the tool offers suggestions for alternative medications to avoid metabolic conflicts. Drug interactions can also be visualized in an interactive network view. Additionally, prodrugs, including their mechanisms of activation, and further information on enzymes of biotransformation, including 3D models, can be viewed.

## INTRODUCTION

The number of prescribed drugs is rising (1). A study revealed that 87.1% of people >50 years of age take at

least one drug per day, and 43.3% take >5 (2). Polypharmacy, which is defined as the regular use of five or more drugs, leads to an increased risk of adverse drug reactions (ADRs). The frequency of ADR is associated with the number of drugs prescribed (3). Among hospitalized patients, ADRs have an incidence of 6.7% and are the fifth commonest cause of death (4). One possible cause for ADR might be the individual variance of drug metabolism (5), and age-related changes make elderly patients more sensitive to ADRs (6). The information is widely scattered over the scientific literature. A knowledge base of xenobiotic metabolism and the effect of polymorphisms could prevent ADR and cases of death.

Xenobiotic metabolism and detoxification (especially for drugs) are separated into three different phases of reaction. Only a few xenobiotics are excreted unchanged in urine or feces without any metabolic degradation.

Phase I and phase II reactions convert compounds to more water-soluble and often less active derivatives to increase excretion. Thereby, phase I reflects the production of reactive groups through oxidation and is primarily managed by the Cytochrome P450 family (CYP) of enzymes (7). Subsequently, the reactive groups are used to conjugate small polar molecules (phase II) to increase the polarity. Six enzyme families that provide the detoxification and excretion of xenobiotics mainly realize the conjugation (8).

Transporters (phase III) play a crucial role in pharmacokinetics by enabling the migration of hydrophilic molecules, which cannot penetrate cellular membranes. Kell *et al.* showed that the majority of drugs enter cells through at least one transporter (9). Those proteins form a transmembrane channel lined with hydrophilic amino acid side chains spanning the lipid bilayer (10). Two major protein superfamilies are known: 49 ATP-binding cassette transporters (ABC) (11) and 362 solute carriers (SLC) (12). These are important for absorption, distribution and

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +49 30 450 562 675; Fax: +49 30 450 562 932; Email: [saskia.preissner@charite.de](mailto:saskia.preissner@charite.de)

The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as Joint First Authors.

© The Author(s) 2013. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

excretion of drugs (13) and are involved in a broad range of physiological processes (10).

Eukaryotic ABC transporters are predominantly exporters, which require energy released by ATP hydrolysis. One problem is multidrug resistance, which is caused by active transporters. Unfortunately, 40% of human tumors develop resistance to chemotherapeutics by overexpressing ABC proteins (14). The SLC transporters facilitate passive diffusion along the concentration gradient or use concentration gradients from other substrates as a symporter or antiporter (12).

Another issue related to drug metabolism and ADR is prodrugs. Prodrugs have to be converted to active drugs by metabolic conversion (15). In general, prodrugs are non-toxic and need to have their chemical structure changed to enable their inherent medical capability. However, problems in conversion can also lead to undesired side effects. For example, the antihistamine terfenadine is a potent hERG blocker as a prodrug and a slow conversion can cause cardiac toxicity (16).

Prodrugs can be activated by photo irradiation (17), a change in pH (18) and enzymes, such as esterases or CYPs (19,20). Many prodrugs are activated by hydrolysis with the aid of esterases or phosphatases. Thereby, gastric intestinal tolerance and pharmacokinetics can be improved, but the targeting of drugs to specific cells or tissues cannot. The activation of prodrugs by CYPs might be a better approach (21).

Not only can drugs participate in the alteration of drug metabolism but food and herbs also have a proven influence; e.g. furanocoumarins in grapefruit inhibit intestinal CYP3A4 and organic anion-transporting polypeptides 1A2 (22,23).

More than 350 ingredients in food and drink, such as broccoli, alcohol and char-grilled meat, as well as herbal medicine, such as St John's wort, are known to alter drug responses.

A comprehensive resource that combines scientific information on phase I and phase II enzymes, transporter enzymes, prodrugs, food and herbs could help to improve research in this field and prevent ADR.

## MATERIALS AND METHODS

### Text mining

We created a text mining approach using semantic web standards. To develop a specialized text mining pipeline, we first downloaded Medline/PubMed data from the NCBI FTP site in xml-format. Using the search engine library Apache Lucene (<http://lucene.apache.org>) and a tool kit for processing text with computational linguistics (<http://alias-i.com/lingpipe>), the data was indexed. The search engine comprises comprehensive lists of chemical compounds and drug names (24), metabolic enzymes (25) and transporters (26), including their various synonyms. Additionally, we added a list of common interaction terms, such as 'activate', 'inhibit', and 'metabolize'. The search engine, written in Java, dynamically queries the indexed data and produces a structured query language

(SQL) file containing the text mining hits. A query example is:

```
(DrugSynonym [TI] AND TransformerSynonym [TI]) OR
(DrugSynonym [abstract] AND TransformerSynonym [abstract]) OR
(DrugSynonym [abstract] AND InteractionTerm AND TransformerSynonym [abstract])
```

The positional distance between the different terms had to be restricted to reduce false-positive hits, when terms occurred far from each other in the abstract. The 22 500 records found were scored as rule-based. Duplicates were removed and a team of scientists manually processed 12427 articles found in PubMed. Further details about the text mining approach can be found on the Web site in the frequently asked questions (FAQs) section.

### Database

The database was designed as a relational database on a MySQL server. To allow chemical functionality, such as handling chemical data within MySQL, the MyChem package was included.

Information about ~3000 CYP drug interactions and 2000 polymorphisms were extracted from the SuperCYP database (27). SuperCYP is a database with a focus on human CYPs. However, there are many other important enzymes in the metabolism of xenobiotics, such as transporters or phase II enzymes.

## DATABASE FEATURES

Over 100 000 interactions were revealed. In the 12 427 articles found in PubMed, 769 drugs were attributed to those phase II enzymes that are involved in drug metabolism. Text mining was also performed for prodrugs, transporters and food. We found 125 prodrugs described in 890 PubMed articles together with their mechanism of activation, accompanying enzymes, chemical structure and identification numbers. Furthermore, ~500 drug-transporters and 150 food interactions were identified.

Additionally, ~200 3D structures were collected for transporters, CYPs and phase II enzymes.

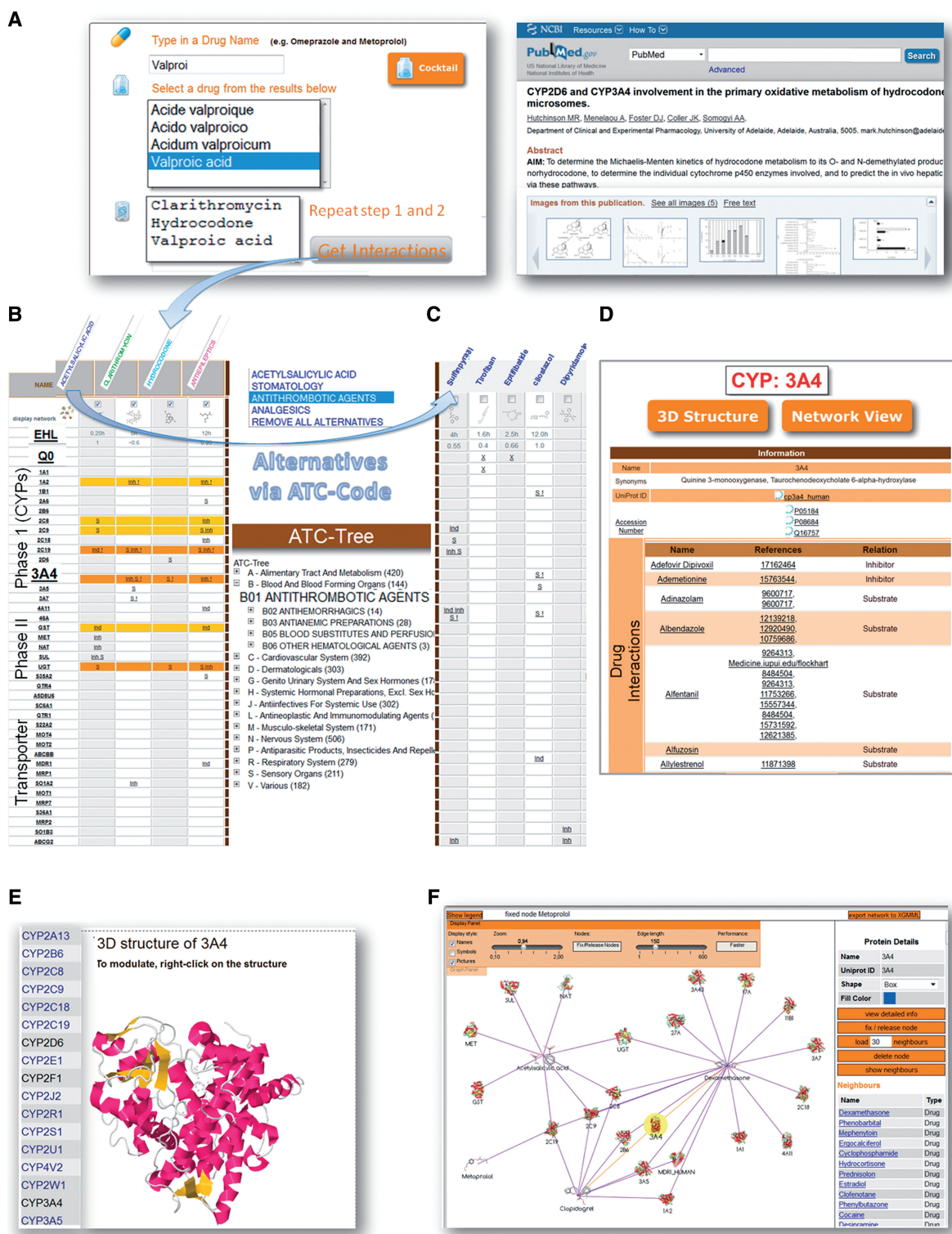
The database includes four main functionalities. To provide an overview of these, a comprehensive FAQs section was created, which is helpful for first-time users. Depending on the user's interest or needs (e.g. clinicians, researchers), different ways to browse the data were enabled.

### Prodrugs

Prodrugs can be identified directly by entering the name, PubChemID, CAS number or ATC code, as well as by choosing a mechanism of activation, such as ring opening or carboxylation.

### Drugs

To view the metabolism of particular drugs, users can search directly by entering the name, PubChemID or



**Figure 1.** Functionalities of the ‘Transformer database’. (A) Composition of a drug-cocktail. An example of a PubMed reference is shown. PubMed references can be viewed by clicking on ‘S’, ‘Inh’ or ‘Ind’ in the result table. (B) Clicking on ‘Get Interactions’ leads to a result table, which shows the interactions between the drugs. (C) By choosing the indications of the drugs via ATC-code the user receives specific alternatives. (D) By clicking on an enzyme (e.g. CYP3A4), detailed information on the enzyme, including drug interactions, are shown. (E) The 3D structures of all enzymes can be viewed (e.g. CYP3A4). (F) Network views are provided for each enzyme and compound.



CAS number. Based on the WHO classification system, which classifies drugs into different groups according to Anatomical site of action, Therapeutical effect and Chemical structure (ATC), a tree with all of the drugs contained in the database can be viewed in their ATC group.

### Cocktail

This tool enables users to see drug interactions of an individually composed drug cocktail (Figure 1A). If >1 drug interacts with the same enzyme, lines of the interaction table are shown in yellow, orange, red and dark red (Figure 1B). In the header of each column, the indication for the drugs can be chosen and the database will provide alternative drugs that are metabolized by different enzymes (Figure 1C). PubMed references are available by clicking on the interaction. Additionally, food interactions, as well as elimination half-life (EHL) times and  $Q_0$  values are displayed. A  $Q_0$  value (extrarenal excretion) of <0.3 is shown in green because those drugs are, to a large extent, excreted in the unchanged form. Clicking 'Display network' presents these interactions in a network view based on Cobweb (28).

### Biotransformation

To find drugs that are metabolized by specific phase I, phase II or transporter enzymes, users can perform a search by clicking on 'Biotransformation'. This page provides (homology modeled) 3D structures of all enzymes (Figure 1E). Furthermore, a list of interacting drugs can be viewed in a table (Figure 1D) or in a network view (Figure 1F).

### DATABASE USAGE

The following case illustrates the need to detect interactions with the help of the Transformer database. A five-year-old child died from a fatal opioid toxicity. She was inadvertently administered a high dose of hydrocodone (an antitussive drug) while suffering from a cold. Additionally, she was administered clarithromycin for an ear infection and valproic acid for seizures. The postmortem blood screen revealed an excessively high-hydrocodone level and, in contrast, barely measurable hydromorphone (biotransformation metabolite of hydrocodone) concentration (29). Hydrocodone is metabolized by CYP2D6, CYP3A4 and afterwards by UGT. There were three reasons for the low metabolism rate:

- (1) CYP-polymorphism: the child was found to be a CYP2D6 poor metabolizer,
- (2) inhibition of CYP3A4 by clarithromycin and
- (3) inhibition of UGT by valproic acid.

Figure 1B shows the Transformer database results for this drug combination. All interactions described in this case are displayed and colored because of enzyme overload. Nevertheless, parts of the available information of drug-enzyme interactions are experimental data and offer no evidence for drug interactions in humans and clinical work, although  $Q_0$  and elimination half-life times

could be relevant. The Transformer database, however, provides a platform for detecting mutual drug impairments and could help to appraise the drug response. The database is a comprehensive resource on drug enzyme/transporter interactions and could be a sound starting-point for further research.

The database will be updated yearly to add new drugs/compounds and interactions.

### AVAILABILITY

The Transformer database is publicly available via <http://bioinformatics.charite.de/transformer> and should be used under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 License.

### FUNDING

Funding for open access charge: SynSys (EU Framework 7) and DKTK (BMBF), BMBF Immunotox.

*Conflict of interest statement.* None declared.

### REFERENCES

1. Banerjee,A., Mbamalu,D., Ebrahimi,S., Khan,A.A. and Chan,T.F. (2011) The prevalence of polypharmacy in elderly attenders to an emergency department—a problem with a need for an effective solution. *Int. J. Emerg. Med.*, **4**, 22.
2. Morgan,T.K., Williamson,M., Pirotta,M., Stewart,K., Myers,S.P. and Barnes,J. (2012) A national census of medicines use: a 24-hour snapshot of Australians aged 50 years and older. *Med. J. Aust.*, **196**, 50–53.
3. Sato,I. and Akazawa,M. (2013) Polypharmacy and adverse drug reactions in Japanese elderly taking antihypertensives: a retrospective database study. *Drug Healthc. Patient Saf.*, **5**, 143–150.
4. Lazarou,J., Pomeranz,B.H. and Corey,P.N. (1998) Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*, **279**, 1200–1205.
5. Phillips,K.A., Veenstra,D.L., Oren,E., Lee,J.K. and Sadee,W. (2001) Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *JAMA*, **286**, 2270–2279.
6. Marusic,S., Bacic-Vrca,V., Obreli Neto,P.R., Franic,M., Erdeljic,V. and Gojo-Tomic,N. (2013) Actual drug-drug interactions in elderly patients discharged from internal medicine clinic: a prospective observational study. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **69**, 1717–1724.
7. Guengerich,F.P. (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 611–650.
8. Jakoby,W.B. and Ziegler,D.M. (1990) The enzymes of detoxication. *J. Biol. Chem.*, **265**, 20715–20718.
9. Kell,D.B., Dobson,P.D., Bilsland,E. and Oliver,S.G. (2013) The promiscuous binding of pharmaceutical drugs and their transporter-mediated uptake into cells: what we (need to) know and how we can do so. *Drug Discov. Today*, **18**, 218–239.
10. Yan,Q. (2003) Pharmacogenomics of membrane transporters an overview. *Methods Mol. Biol.*, **227**, 1–20.
11. Velamakanni,S., Wei,S.L., Janvilisri,T. and van Veen,H.W. (2007) ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles:a brief overview. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **39**, 465–471.
12. He,L., Vasiliou,K. and Nebert,D.W. (2009) Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Hum. Genomics*, **3**, 195–206.
13. Ishikawa,T., Tamura,A., Saito,H., Wakabayashi,K. and Nakagawa,H. (2005) Pharmacogenomics of the human ABC

- transporter ABCG2: from functional evaluation to drug molecular design. *Naturwissenschaften*, **92**, 451–463.
14. Landry, Y. and Gies, J.P. (2008) Drugs and their molecular targets: an updated overview. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **22**, 1–18.
  15. Albert, A. (1958) Chemical aspects of selective toxicity. *Nature*, **182**, 421–422.
  16. Yap, Y.G. and Camm, A.J. (2002) Potential cardiac toxicity of H1-antihistamines. *Clin. Allergy Immunol.*, **17**, 389–419.
  17. Dorman, G. and Prestwich, G.D. (2000) Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol.*, **18**, 64–77.
  18. Simplicio, A.L., Clancy, J.M. and Gilmer, J.F. (2007) Beta-aminoketones as prodrugs with pH-controlled activation. *Int. J. Pharm.*, **336**, 208–214.
  19. Huttunen, K.M., Mahonen, N., Raunio, H. and Rautio, J. (2008) Cytochrome P450-activated prodrugs: targeted drug delivery. *Curr. Med. Chem.*, **15**, 2346–2365.
  20. Topf, N., Worgall, S., Hackett, N.R. and Crystal, R.G. (1998) Regional 'pro-drug' gene therapy: intravenous administration of an adenoviral vector expressing the *E. coli* cytosine deaminase gene and systemic administration of 5-fluorocytosine suppresses growth of hepatic metastasis of colon carcinoma. *Gene Ther.*, **5**, 507–513.
  21. Ortiz de Montellano, P.R. (2013) Cytochrome P450-activated prodrugs. *Future Med. Chem.*, **5**, 213–228.
  22. Bressler, R. (2006) Grapefruit juice and drug interactions. Exploring mechanisms of this interaction and potential toxicity for certain drugs. *Geriatrics*, **61**, 12–18.
  23. Uno, T. and Yasui-Furukori, N. (2006) Effect of grapefruit juice in relation to human pharmacokinetic study. *Curr. Clin. Pharmacol.*, **1**, 157–161.
  24. Wang, Y., Xiao, J., Suzek, T.O., Zhang, J., Wang, J. and Bryant, S.H. (2009) PubChem: a public information system for analyzing bioactivities of small molecules. *Nucleic Acids Res.*, **37**, W623–W633.
  25. Sim, S.C. and Ingelman-Sundberg, M. (2010) The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum. Genomics*, **4**, 278–281.
  26. Saier, M.H. Jr, Yen, M.R., Noto, K., Tamang, D.G. and Elkan, C. (2009) The Transporter Classification Database: recent advances. *Nucleic Acids Res.*, **37**, D274–D278.
  27. Preissner, S., Kroll, K., Dunkel, M., Senger, C., Goldsobel, G., Kuzman, D., Guenther, S., Winnenburg, R., Schroeder, M. and Preissner, R. (2010) SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions. *Nucleic Acids Res.*, **38**, D237–D243.
  28. von Eichborn, J., Bourne, P.E. and Preissner, R. (2011) Cobweb: a Java applet for network exploration and visualisation. *Bioinformatics*, **27**, 1725–1726.
  29. Madadi, P., Hildebrandt, D., Gong, I.Y., Schwarz, U.I., Ciszowski, C., Ross, C.J., Sistonen, J., Carleton, B.C., Hayden, M.R., Lauwers, A.E. *et al.* (2010) Fatal hydrocodone overdose in a child: pharmacogenetics and drug interactions. *Pediatrics*, **126**, e986–e989.



# Polymorphic Cytochrome P450 Enzymes (CYPs) and Their Role in Personalized Therapy

Sarah C. Preissner<sup>1</sup>\*, Michael F. Hoffmann<sup>1</sup>\*, Robert Preissner<sup>1</sup>, Mathias Dunkel<sup>1</sup>, Andreas Gewiess<sup>2</sup>, Saskia Preissner<sup>1,3\*</sup>

**1** Charité Universitätsmedizin Berlin, ECRC - Structural Bioinformatics Group, Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), Berlin, Germany, **2** Institute for Laboratory Medicine, Berlin, Germany, **3** Charité Universitätsmedizin Berlin, Dental, Oral and Maxillary Medicine, CC3, Berlin, Germany

## Abstract

The cytochrome P450 (CYP) enzymes are major players in drug metabolism. More than 2,000 mutations have been described, and certain single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been shown to have a large impact on CYP activity. Therefore, CYPs play an important role in inter-individual drug response and their genetic variability should be factored into personalized medicine. To identify the most relevant polymorphisms in human CYPs, a text mining approach was used. We investigated their frequencies in different ethnic groups, the number of drugs that are metabolized by each CYP, the impact of CYP SNPs, as well as CYP expression patterns in different tissues. The most important polymorphic CYPs were found to be 1A2, 2D6, 2C9 and 2C19. Thirty-four common allele variants in Caucasians led to altered enzyme activity. To compare the relevant Caucasian SNPs with those of other ethnicities a search in 1,000 individual genomes was undertaken. We found 199 non-synonymous SNPs with frequencies over one percent in the 1,000 genomes, many of them not described so far. With knowledge of frequent mutations and their impact on CYP activities, it may be possible to predict patient response to certain drugs, as well as adverse side effects. With improved availability of genotyping, our data may provide a resource for an understanding of the effects of specific SNPs in CYPs, enabling the selection of a more personalized treatment regimen.

**Citation:** Preissner SC, Hoffmann MF, Preissner R, Dunkel M, Gewiess A, et al. (2013) Polymorphic Cytochrome P450 Enzymes (CYPs) and Their Role in Personalized Therapy. *PLoS ONE* 8(12): e82562. doi:10.1371/journal.pone.0082562

**Editor:** Daotai Nie, Southern Illinois University School of Medicine, United States of America

**Received:** July 22, 2013; **Accepted:** October 24, 2013; **Published:** December 10, 2013

**Copyright:** © 2013 Preissner et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by: BMBF ImmunoTox, European Union Seventh Framework Programme SYN SYS (Synaptic Systems: dissecting brain function in health and disease), DKTK. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: saskia.preissner@charite.de

☉ These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Inter-individual variability of drug response and drug clearance is a complex and common problem in clinical practice [1]. Overlapping substrate specificity of enzymes, a multitude of single nucleotide polymorphisms (SNPs) [2] and variations between ethnic groups [3] make prediction of phenotypic drug response difficult. To avoid treatment failure and unnecessary toxicity, tailoring dosages and drug-cocktails for each individual is essential [4].

Differences in drug response can be attributed to variability in DNA sequences of specific genes which's products are crucial for drug metabolism. For instance, SNPs in phase 1 enzymes, such as cytochrome P450 oxidases (CYPs) [3], phase 2 enzymes, such as Uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferase (UGTs) [5], and absorptive and efflux transporters, such as ATP-binding cassette transporters (ABC-transporters) [4], have been previously reported.

Characterization of these enzymes and the effects of minor allele variants on the metabolism of specific drugs have been described in the literature and have recently been compiled by our group into a comprehensive database called SuperCYP [6]. Phase I reactions include oxidation, reduction, hydrolysis and cyclization. Using oxygen and NADPH as a co-substrate, CYPs are the major enzymes responsible for catalyzing such reactions [7] and account for approximately 75% of total drug metabolism [8].

The Human Genome Project identified 57 human CYPs, which were classified into 18 families and 43 subfamilies based on sequence similarity [9]. CYP families 1, 2 and 3 are responsible for metabolism of drugs, xenobiotics and certain endogenous molecules [3] and hence are of particular relevance to this current study. Most CYPs metabolize more than one drug. Similarly, a drug is often metabolized by multiple CYPs. Drugs can also inhibit or induce CYP activity, either by directly interacting with the enzyme or altering its

expression. Characterization of these interactions is important to determine and predict compatible drug combinations [10]. Human CYPs are primarily membrane-associated proteins [11] that are ubiquitously expressed in most tissues. Highest expressions are generally found in liver tissue, but the distribution of particular CYPs varies [12], which indicates that the actual efficiency of a drug is likely to depend on CYP expression in the target tissue. There are significant inter-individual differences in enzyme activity leading to distinct phenotypes. For example the most frequent phenotype of CYP 2D6 is the extensive-metabolizer (78.8%), followed by intermediate- (12.1%), poor (7.6%) and ultra-rapid metabolizers (1.5%) [13].

In addition to drug catabolism, many CYPs are responsible for activation of prodrugs, such as cancer therapeutics [14] and antipsychotics [15]. Prodrugs are pharmacologically inactive compounds that require activation via metabolic conversion [16], allowing control of where, when and how much drug activity occurs [17]. This is particularly important for chemotherapeutic drugs, where the active drug ideally only acts on tumor cells in order to reduce toxic side effects [18]. Prodrugs can be activated by photo irradiation [19], change in pH [20] or enzymatically [21], for instance by CYPs [22]. Polymorphisms in CYPs can result in ineffective or aberrant activation of prodrugs [22], which can lead to toxicity [4]. Fortunately, advances in genetic research have made genotyping of a large number of patients possible, leading to identification of SNPs that alter expression or activity of drug metabolizing enzymes [3]. In this study we set out to determine the most frequent CYP polymorphisms having the highest impact on drug metabolism in Caucasians. This knowledge could facilitate the development of tests for efficient genotyping of patients thus leading to a better and more personalized treatment.

## Methods

### Text mining

Information on drug metabolism can be found in more than 100,000 PubMed articles, yet limited data is available regarding the frequencies of SNPs in human CYPs. To identify relevant articles, a specific search tool was developed for text mining literature using Apache Lucene™ (<http://lucene.apache.org>) as a search engine library and LingPipe (<http://alias-i.com/lingpipe>). Figure 1 summarizes the different methods used for the textmining approach. Complete Medline/PubMed data were downloaded from the NCBI FTP site in xml-format and then indexed. The indexed data was dynamically queried by a search engine written in Java that outputs an sql-file with the text mining hits, which served afterwards for manual validation. The search engine comprises several lists of synonyms for identifying entities, such as chemical compounds, biological targets, genes, cell types and polymorphisms, as well as interaction-related entities. If available, information on CYP polymorphism was extracted from the literature. Definitions and synonyms are included from UMLS® Metathesaurus®, that contains millions of biomedical and health related concepts,

their synonymous names, and their relationships. As an example, the query for CYP2C19 was like:

(Abstract: CYP2C19\\*\* OR Title: CYP2C19\\*\*) AND (Abstract: population OR Title: population) AND (Abstract: effect OR Title: effect) AND (Abstract: frequenc\* OR Title: frequenc\*).

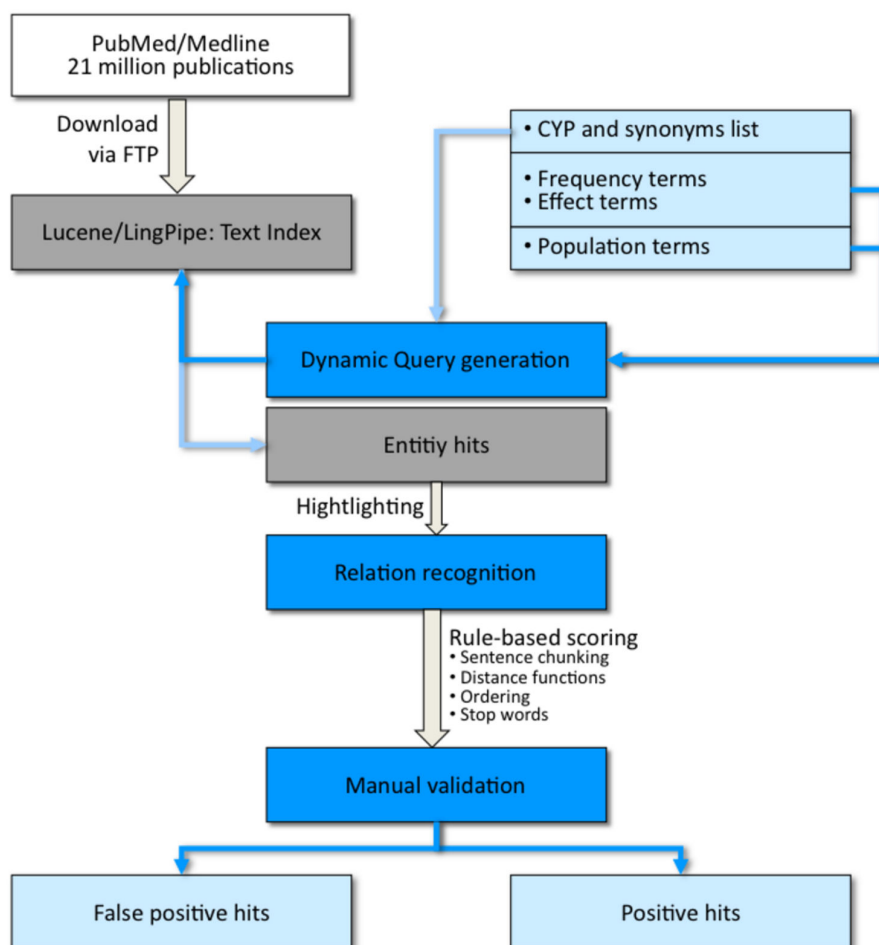
The term 'CYP2C19' was replaced through each human CYP and synonyms, as well as different ethnicity and outcome terms were used for 'population' and 'effect'. The positional distance between the different terms had to be restricted to reduce false positive hits, when terms occurred far from each other in the abstract. The records found were scored rule-based. The rules employed order, redundancy, distance, topic segmentation and sentence breaking for boundaries. For example, a distance  $\leq 7$  between the CYP and the ethnicity and  $\leq 6$  between the frequency and the CYP was given a score of 100. Greater distances and negative interaction words resulted in lower scores. Duplicates were removed and a team of scientists manually processed 1,037 papers found in PubMed for relevance to polymorphisms and their frequency in Caucasian populations. The team consisted of three medical scientists, with three years experience in validation of text mining results. During this time, they reviewed over 10,000 abstracts with the focus on CYPs. A weekly meeting took place to ensure and raise the quality of text mining and to discuss problems. The aim was to achieve a coherent review operation. The text mining validation tool is shown in Figure 2. CYP polymorphisms that occurred with a frequency of more than one percent in the Caucasian population were included in this study.

### Localization of SNPs in a 3D CYP model

The evolutionary conservation taken from a multiple sequence alignment of CYPs was projected onto the 3D structure using CYP 2D6 as template (PDB ID: 3TDA). Frequent SNPs in the four most polymorphic CYPs (1A2, 2C9, 2C19 and 2D6) were labeled in the 3D model. The number of mutations was used to determine the thickness of the ribbon (Figure 3).

### CYP SNPs and 1,000 Genomes

The 1,000 Genomes Project ([www.1000genomes.org](http://www.1000genomes.org)) is an international initiative designed to provide full genomic sequence information from an ethnically diverse population [23]. CYP SNPs in 1,092 individuals were extracted using the online data slicer from the 1,000 Genomes Project (<http://browser.1000genomes.org>). Frequency analysis focused on non-synonymous coding SNPs with a prevalence of one percent or higher in all genomes regardless of ethnicity. The search included the main 29 CYP alleles from "The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database" (<http://www.cypalleles.ki.se/>) [24]. In addition, 16 CYP alleles not listed in the CYP allele database due to very heterogeneous distributions were included. The 1,000 Genomes Database includes SNP effect predictions on CYPs, calculated by PolyPhen [25], which predicts possible functional alterations in human proteins after amino acid substitution based on physical and comparative considerations [26].



**Figure 1. Flow-chart of the methods used for the text mining approach.**

doi: 10.1371/journal.pone.0082562.g001

### Expression data

Affymetrix data was used to compare human CYP mRNA expression in 41 different types of tissue, further subcategorized into different regions of an organ, yielding a total of 65 tissue types. The series of datasets obtained from GEO (Gene Expression Omnibus, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) were originally generated from 10 post-mortem donors (5 females and 5 males), and represent normal human tissues (Series GSE3526) [27]. The 84 probe sets, which measure the expression level of CYPs were normalized and assigned to 40 types of CYPs. To display differences in expression, a heat-map was generated using Genesis software [28]. Relative expression was calculated as the intensity of the gene in the region minus the mean intensity of the gene in all regions then divided by the standard deviation. This heat-map served as data source for the CYP body map in which only two-fold decreased or increased values were considered.

Our work would not have been possible without the publicly available datasets mentioned above. We are grateful and honor the work of involved research groups.

### Results

#### Frequencies of SNPs in CYPs

Analysis of the SNPs identified by text mining, showed that SNPs predominantly occurred in 3 polymorphic CYPs (2D6, 2A6 and 2B6) regardless of ethnic group. Only frequencies of known nucleotide changes were assessed to identify the extent of SNPs in CYPs. Figure 4 displays 9 CYPs, including 2D6 (114 SNPs), 2A6 (68 SNPs) and 2B6 (57 SNPs), which showed the highest number of SNPs. For other CYPs, the number of known SNPs was less than 22. CYP 2D6 is a major polymorphic CYP and, as expected, was the greatest contributor of polymorphic alleles in Caucasians.

Count	Score	PMID	Sentence	TRUE	FALSE	NOT SURE	Comment
1	100	11014415	Because CYP2C19*2 is not able to explain 57% of poor metabolizers, other mutations (CYP2C19*4 to *8) might be present in North Indians.	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
2	100	10460072	Four individuals (1.0%) were predicted to be poor metabolizers (CYP2C19*2/*2), a significantly lower frequency compared to Middle European populations.	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	*2: 1.0%
3	100	18240905	Among the 250 AJ individuals, the CYP2C9*1, *2, *3 and *5 allele frequencies were 0.772, 0.140, 0.086 and 0.002, respectively, and the genotypes were distributed into extensive- (60.8%), intermediate- (32.8%) and poor- (6.4%) metabolizer	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	*1: 77.2%; *2: 1.4%
4	100	21410749	Differences between Spaniards and Mestizo Ecuadorians were detected in relation to the frequencies of the alleles linked to either absent enzyme activity, CYP2A6*4A (4 and 7.1%, respectively), or reduced CYP2A6 enzyme activity, CYP2A6*9A (6.4 and 10.3%, respectively).	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	*4A: 7.1% decrease

back to home Scientist 1

### Abstract

21410749

Differences between Spaniards and Ecuadorians in CYP2A6 allele frequencies: comparison with other populations. This study was designed to investigate the potential differences between Spaniards and Ecuadorian Mestizo people regarding CYP2A6\*1A, CYP2A6\*1B1, CYP2A6\*1x2A, CYP2A6\*9A, and CYP2A6\*4A variant alleles at the CYP2A6 gene and also to compare the observed frequencies with those previously reported in different ethnic groups. DNA from 234 Spaniard and 300 Ecuadorian subjects were analyzed by either PCR or PCR-restriction fragment length polymorphism. Differences between Spaniards and Mestizo Ecuadorians were detected in relation to the frequencies of the alleles linked to either absent enzyme activity, CYP2A6\*4A (4 and 7.1%, respectively), or reduced CYP2A6 enzyme activity, CYP2A6\*9A (6.4 and 10.3%, respectively). CYP2A6\*4A and CYP2A6\*9A frequencies in Ecuadorians were higher than those in Africans or Caucasian groups and lower than those in Asian. This study provides, for the first time, the result of the analysis of CYP2A6 allele frequency in a South American population and demonstrates the presence of ethnic differences...

[View Fulltext](#)

### Results

The CYP2A6 genotype frequencies among both Spaniards and Ecuadorians correspond to those predicted by the Hardy-Weinberg law ( $P > 0.05$ ).

The allele frequencies in Spaniards were not different ( $P > 0.05$ ) to those previously found in other Caucasian populations (Table 1), with the only exception being that of the CYP2A6\*4A allele associated with abolished enzyme activity. In this regard, although the CYP2A6\*4A prevalence in Spaniards (4%) was the same than that previously reported in a French Caucasian population [15], it was higher than that previously found among white Canadian people (1.2%) ( $P < 0.001$ ) [22]. In addition, the comparison of the CYP2A6\*4A frequencies between Spaniards and a Finnish population (1%) [23] shows a borderline significance level ( $P = 0.07$ ). On the other hand, CYP2A6\*4A frequency in this work was similar ( $P > 0.05$ ) to that observed in our previous study in 100 Spaniards [2].

**Table 1. Frequencies of CYP2A6 alleles (%) observed in this study compared with those found in other populations**

CYP2A6 allele	Population		Caucasian	Chinese	Japanese	African from Ghana
	Spaniard (this study)	Ecuadorian (this study)				
CYP2A6*1A	64.9 (468)	61.7 (600)	67.0 (626) [15]	27.2 (1192) [8]	16.4 (244) [17]	80.5 (420) [33]
CYP2A6*1B1	30.9 (468)	31.2 (600)	33.5 (1416) [25]	34.5 (1192) [8]	27.0 (368) [22]	11.9 (420) [33]
CYP2A6*4A	4.0 (468)	7.1 (600)	1 (200) [2]-1.2 (2336) [23]-4.0 (626) [15]	6.7 (224) [25]	24.2 (128) [25]	1.9 (420) [33]
CYP2A6*9A	6.4 (468)	10.3 (600)	7.1 (1856) [25]	15.6 (224) [25]	20.3 (128) [25]	5.7 (420) [33]
CYP2A6*1x2A	1.2 (468)	0.5 (600)	0.7 (2296) [23]-1.7 (692) [8]	0.4 (226) [25]	0.0 (124) [25]	n.d.

n.d., not determined. Figures in parenthesis represent number of alleles tested.

**Figure 2. Text mining validation tool.** The table shows the text mining validation tool with columns for score, PubMedID, relation sentence and checkboxes for the validation. The SNPs are highlighted in blue, frequencies in green, effects in orange and the ethnicities in red. ‘Scientist 1’ reads the abstract and, if necessary, has access to full text. Afterwards, the relation has to be validated as ‘true’, ‘false’ or ‘not sure’. If the relation is ‘true’, the relation is copied into the ‘comment’ field. These relations are copied into a new sql-file. If ‘Scientist 1’ activates the ‘not sure’ field, the relation has to be validated again by another scientist. doi: 10.1371/journal.pone.0082562.g002

### Allelic frequency in CYPs of Caucasians

The PubMed search yielded articles on 34 different CYP alleles with an occurrence greater than one percent in the Caucasian population (Table 1), which may be indicative of altered substrate metabolism. CYP 2D6 and 2B6 possessed the largest number of alleles with a known impact on metabolism in Caucasian population (11 and 6, respectively). Maximum allele frequencies in CYP 2D6 varied from 20.7% to 32.4%. When considering all 34 alleles, the most frequent alleles were CYP 3A5\*3C at 81.3% (decreased enzyme activity) followed by CYP 1A2\*1F at 33.3% (increased enzyme activity). Furthermore, the major alleles leading to increased metabolism were CYP 2A6\*1B (30.0%), 3A4\*1B (17.0%), 1A1\*2A (19.0%) and 2C19\*17 (18.0%). In contrast, decreased metabolism was attributed to 2D6\*2A (32.4%), 2D6\*4 (20.7%) and 2C9\*2 (16.0%). Carrying the 2A6\*4 allele (1.0%) leads to an inactive enzyme with no detectable substrate metabolism.

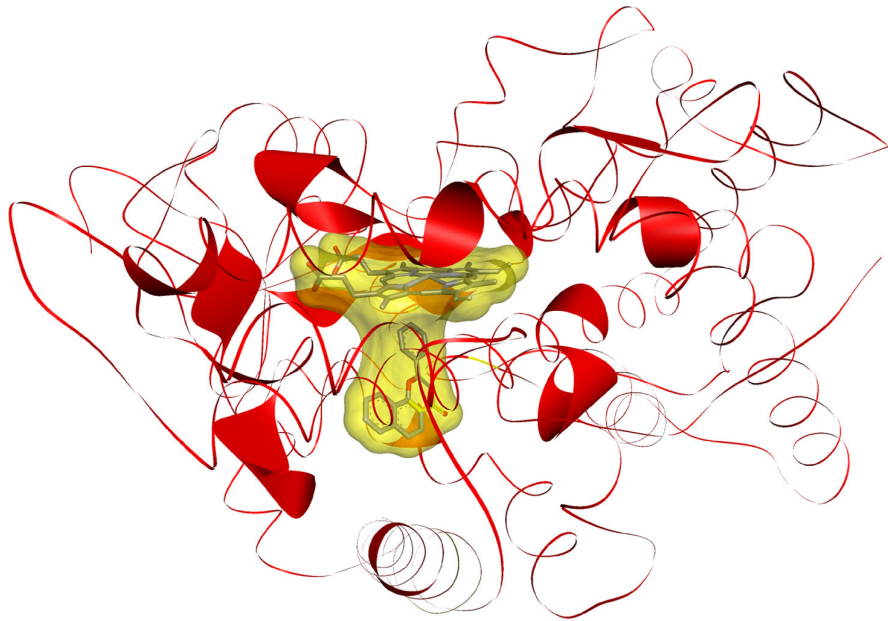
Comparison among different ethnic groups revealed that frequencies differed considerably and displayed a

heterogeneous distribution of CYP alleles. For instance, in Asian and African populations, CYP2A6\*2 possessed a frequency of 28.0% and 62.0%, respectively, whereas a frequency of 8.0% was observed in Caucasians. A more detailed table with additional information on CYP SNPs in Caucasians and other ethnic groups is available in Table S1.

### Major drug metabolizing CYPs

Not all 57 human CYPs are involved in drug metabolism. The primary CYPs responsible for drug metabolism were determined by first ranking the CYPs according to the total number of drug substrates (Figure 5). Twelve CYPs accounted for 93.0% of drug metabolism, regarding to the entire number of 1.839 known drug-metabolizing-reactions in the SuperCYP database. CYP 1A2, 2D6, 2C9 and 2C19 were responsible for nearly 40.0% of drug metabolism and including CYP 3A4 even for 60.0%.

Since the described four CYPs are highly polymorphic and commonly occur in Caucasians, further detailed analyses were



**Figure 3. 3D structure of a cytochrome with heme and a ligand with localization of frequent SNPs.** Frequent SNPs in the four most polymorphic CYPs (1A2, 2C9, 2C19 and 2D6) were labeled in this 3D model of CYP 2D6 (PDB ID: 3TDA). Therefore, the ribbon was enlarged in the appropriate positions. The binding-side (transparent, orange colored surface) contains an iron ion and a porphyrine ring (heme). Frequent mutations of CYPs at the binding-side occurred at the following positions: 67, 89, 107, 117, 118, 120, 125, 132, 151, 201, 227, 261, 325, 377, 382, 386, 410, 454, 456, 469 and 470.

doi: 10.1371/journal.pone.0082562.g003

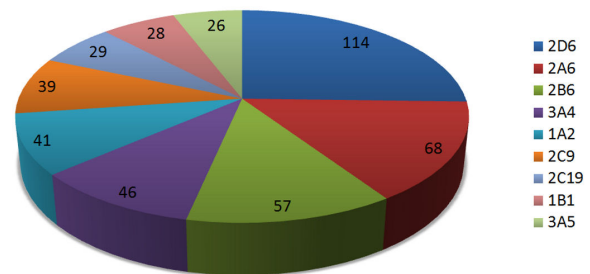
restricted to these four CYPs. On the overall CYP system, it is expected that these four CYPs would have the greatest impact on inter-individual variability of drug response. Although CYP 2A6 and 2B6 possess various relevant alleles in Caucasians, they do not cover a large range of drug interactions (51 and 74 substrates, respectively).

All SNPs in the four most polymorphic CYPs (1A2, 2C9, 2C19 and 2D6) influenced enzymatic activity due to localization in the substrate-binding cavity as shown in Figure 3.

**Expression data**

Because of high CYP expression levels in some tissues, an impact of CYP isoforms in particular tissues can be deduced. The work of Nishimura and colleagues demonstrated differences in CYP mRNA expression in various human tissues. For example, CYP 2F1, 4B1, 4F8, 11S, 11A, 11B1, 11B2, 19 and 24 are not expressed in the liver [29]. The current study confirmed these results and extended the findings, which are shown in Figure 6. Nishimura analyzed mRNA levels of 30 CYP isoforms in 11 tissue types. Similarly, the current study investigated the expression of 40 CYP isoforms in 41 tissue types. The liver was considered separately in the analysis in order to identify the differences between the other tissues. In 21 different tissues, a heterogeneous distribution of CYPs was observed. For instance, 39 different CYP isoforms showed higher mRNA expression in at least one or more tissue types. Significant differences were observed in the adrenal gland

**SNPs**



**Figure 4. Number of known SNPs per CYP.** The pie chart illustrates the number of known SNPs in different CYPs.

doi: 10.1371/journal.pone.0082562.g004

cortex, which possessed 6-fold higher expression of CYP 11A1, 11B1 and 11B2 (compared to the mean expression). Interestingly, no other tissue showed high levels of expression of these three CYPs. Large differential expression compared to other tissues was also observed in the kidneys, where a 6-fold increase in CYP 4A22, a 5-fold increase in CYP 8B1 and 4-fold increases in 4V2, 4F2, 4A11 and 2B6 were noted. In addition, 5-fold higher expression of CYP 2C8 was found in lung, CYP 4F8 in prostate, 4F3 in bone, 2F1 in bronchial tubes and 2C8 in



**Table 1.** CYP SNP frequencies in Caucasians.

CYP	Allele	Amino Acid	Caucasian (%)	Enzyme Activity	Test Drug	References (PMID)
1A1	*2A	I462V	19.0	increase	17 $\beta$ -estradiol	19514967
1A2	*1F	none	33.3	higher inducibility	Omeprazole	12534642 / 22299824
	*1D	none	4.82	decrease	Clozapine	12534642 / 20797314
2C9	*2	R144C	19.0% *1/*2 1.6% *2/*2 1.8 % *2/*3	decrease	Warfarin	15284536
	*3	I359L	9.0	decrease	Tolbutamide	11678789
2C19	*2	Splicing I331V defect	16.0	decrease	Clopidogrel	10460072
	*17	I331V	18.0	increase	Omeprazole	21247447
2D6	*3	N166D; 259 Frameshift	2.04	decrease	Debrisoquine	9012401
	*4	P34S; L91M; H94R; Splicing defect; S486T	20.7	decrease	Dextromethorphan	9012401
	*4D	P34S; Splicing defect; S486T	3.4	decrease	Bufuralol	11266079
	*4L	P34S; Splicing defect; S486T	4.5	decrease	Bufuralol	11266079
	*5	CYP2D6 deleted	4.1	no enzyme		9511177
	*6	118Frameshift	1.3	nonfunctional		9511177
	*7	H324P	1.0	decrease	Sparteine	9089660
	*9	K281del	2.0	decrease	Sparteine	9511177
	*10	P34S; S486T	8.0	decrease	Metoprolol	9511177 / 11505219
	*41	R296C; Splicing defect; S486T	8.0	decrease (expression)		15289790
2A6	*12	10 aa substitutions	2.9	decreased (expression)		16041240
	*1B	none	32.6	increase	Caffeine	22850738
	*2	L160H	2.3	decrease	Nicotine	11259354
	*4	CYP2A6 deleted	1.0	no enzyme		11259354
	*9	(TATA box)	7.1	decreased	Nicotine	15475735
3A4	*17	F189S	2.0	decrease	Testosterone	11714865
	*1B	none	17.0	increase (transcription)	Tacrolimus	12692107
	*2	S222P	2.7	decrease	Nifedipine	10668853
3A5	*3C	Splicing defect	81.3	decrease	Sirolimus	17162466
	*3k / *10	Splicing defect; F446S	2.0	decrease	Nifedipine	12893984
3A7	*2	T409R	8.0	increase	Dehydroepiandrosterone	15903124
2B6	*2	R22C	5.3	increase	Artemether	21746968 / 12242601
	*5	R487C	14.0	decrease	Nirvanol	11470993
	*4	K262R	5.0	increase	Bupropion	14515060
	*6	Q172H; K262R	25.2	decrease (expression)	Cyclophosphamide	14515060
	*7	Q172H; K262R; R487C	3.0	decrease	7-ethoxy-4-trifluoromethylcoumarin	12242601 / 14551287
	*22	none	3.0	increase (transcription)		15722458

Polymorphisms that are relevant for Caucasians are shown here with CYP, allele, amino acid and frequencies and their effect on enzyme activity. The test drug and the PubMed ID complete the table. A more detailed table including gene information and frequencies in other ethnic groups can be found in Table S1.

doi: 10.1371/journal.pone.0082562.t001

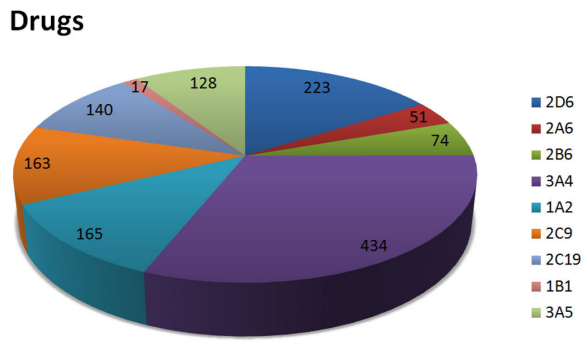
stomach. Furthermore, CYP 2C18 showed a high level distribution restricted to the oral cavity, pharynx and esophagus. Two-fold lower expression was detected for CYP 2A1 in the esophagus, 2A7 in the prostate, as well as 2C9 and 2D6 in the spleen.

### CYP SNPs and 1,000 Genomes

The current study identified 199 non-synonymous coding SNPs with frequencies greater than one percent (Table S2). Compared to the "Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Database" (<http://www.cypalleles.ki.se/>), we found several SNPs in 1,000 Genomes not related to alleles defined and named in the Database. To elucidate the

difference between the 'The Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature' and 1000genome data regarding new SNPs, we examined CYP2A6 exemplary. Table 2 summarizes SNPs most likely to alter enzyme activity [25]. It displays five SNPs, which can lead to an altered enzyme activity with frequencies between 1.4 and 5.1 %. Only I471T (rs5031016) is also contained in the CYP nomenclature and reflects the CYP2A6\*36 allele. New updates have to be done to map a comprehensive CYP SNP data source.

With the potential to alter drug metabolism, the 72 listed SNPs occurred in 24 CYPs. The most frequent SNPs were CYP 4A11 rs112743 (42.6%; highly expressed in kidney tissue), CYP 4F11 rs1060463 (49.5%; highly expressed in bronchus tissue) and CYP 2A7 rs3869579 (46.7%; highly



**Figure 5. Number of drugs metabolized per CYP.** The pie chart illustrates the number of drugs that can be metabolized by a specific CYP.

doi: 10.1371/journal.pone.0082562.g005

expressed in the pituitary gland but low in the prostate gland). Our study findings show that some CYPs are not only heterogeneously expressed, but also highly polymorphic.

## Discussion

### Genetic diversity and polymorphisms

Mutations in a CYP gene can lead to functional alterations, such as increased or decreased activity. If a mutant allele occurs at a frequency of at least one percent in a population, it is referred to as a pharmacogenetic polymorphism. Such polymorphisms can be discovered at the genotype level and/or the phenotype level based on altered function of the enzyme [30].

Individuals in a population can be stratified according to metabolic ratios of particular CYPs, which have great clinical relevance. For example, a CYP 2D6 poor metabolizer should not be administered codeine since the drug would have no effect. Conversely, a CYP 2D6 ultra-rapid metabolizer would likely suffer side effects from a normal dosage [31,32]. CYP 2D6 is a highly polymorphic CYP with at least 70 allelic variants [33] that can be categorized into four phenotypic classes. Overall CYP 2D6 expression in liver tissue is only approximately 2%, but hundreds of drugs are metabolized by this enzyme, including opiates, beta-blockers, anti-arrhythmics, tricyclic antidepressants, SSRIs, 5-HT<sub>3</sub>-antagonists and neuroleptics [34]. About 10% of the Caucasian population have difficulties in fully metabolizing these drugs [35], leading to harmful side effects [32,36]. Therefore, personalized prescriptions will become of great importance [37].

### Personalized medicine

Since 2009, the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) provides information on how genetic test results can be used to optimize drug therapy. The guidelines center on genes or on specific drugs. For some drugs, they also provide dosing guidelines for clinicians [38].

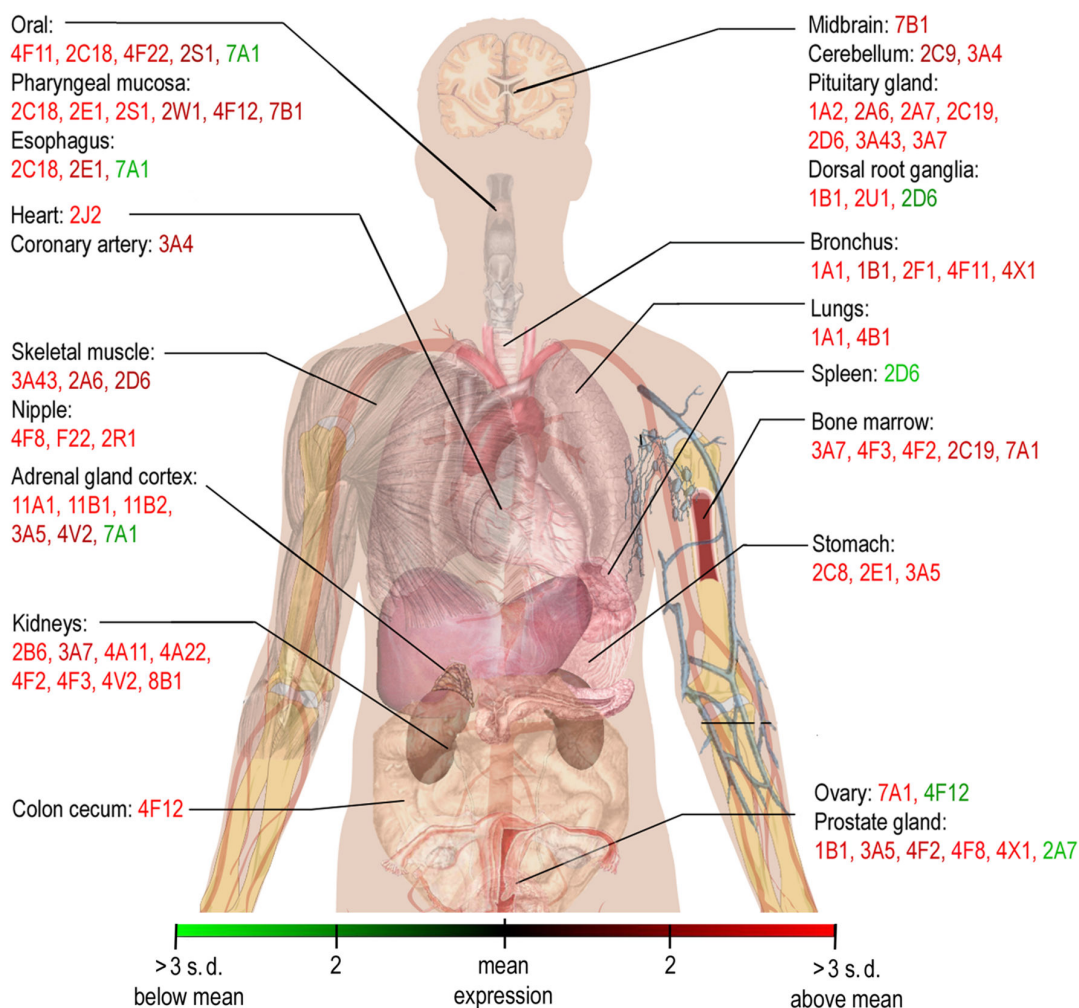
**Psychiatric drugs.** As most psychiatric drugs are metabolized by highly polymorphic CYP 2D6 and CYP 2C19, psychiatrists were first to propose the idea of CYP genotyping [39–41]. Three state hospitals in Kentucky recruited 4,532 psychiatric patients for genotyping of both CYPs with the help of DNA microarray technology.

Results from the current study were consistent with previous studies of allele frequency [35], demonstrating the importance of personalized prescription given that more than one tenth of patients are not likely to respond to standard treatment and suffer unwarranted toxicity. In the study performed by de Leon and colleagues, the dosage was adapted to the guidelines of Kirchheiner [15] for antipsychotics and antidepressants. The authors propose a numeric dosage adaptation system that reflects expression of CYP 2D6 and CYP 2C19.

**Cardiovascular drugs.** An important area of focus is stent implantation and/or inhibition of blood clots after an acute coronary syndrome (ACS) to prevent ischemic events. Therefore, antiplatelet agents are administered before and after percutaneous coronary intervention (PCI) to reduce the risk of ischemic events. Currently, the gold standard therapy is a combination of aspirin and clopidogrel [42,43]. Unfortunately, approximately 29% of people respond poorly to clopidogrel [44] and, therefore, have an increased risk for recurrent ischemic events after PCI [45]. Several different factors were discovered to contribute to the variability in clopidogrel response, including polymorphisms, impaired absorption or bioavailability, poor compliance and pre-existing conditions (increased body mass index, diabetes mellitus, ACS) [46]. In addition, clopidogrel is a prodrug that requires activation through the CYP system. The activated metabolite inhibits the ADP P2Y<sub>12</sub> receptor [47]. Polymorphisms causing loss of function in the CYP system are associated with poor drug response. Most notably, the CYP 2C19\*2 polymorphism was shown to lead to a 30% increased risk of major adverse cardiovascular events during treatment with clopidogrel [48–51]. Furthermore, the CYP 2B6\*5 and P2Y<sub>12</sub> polymorphisms are also associated with clopidogrel resistance [52]. In contrast, an enhanced response due to increased transcriptional activity occurs with the CYP 2C19\*17 polymorphism, leading to increased risk of bleeding during clopidogrel therapy [53,54].

The CYP3A4\*2 allele with a frequency of 2.7 % in Caucasian leads in vitro to reduced (six fold to nine fold) intrinsic clearance for nifedipine [55]. This could have a great influence on the tolerability of patients getting this dihydropyridine calcium channel blocker. Indications for nifedipine are widely distributed, e.g. Angina pectoris, Hypertonia, Achalasia and Raynaud's phenomenon, so the application is very common. An in vivo research regarding the alteration of nifedipine metabolism in CYP3A4\*2 patients should be done, to possibly prevent toxic and/or increased side effects.

Previous findings described above, emphasize the importance of CYP polymorphisms and alternatively metabolized drugs in clinical practice. Prediction of CYP activity may be helpful to assess drug response. For instance, the (13)C-pantoprazole breath test, which measures CYP 2C19 activity, can detect clopidogrel resistance [56] and support use



**Figure 6. Body map of cytochrome P450 enzyme expression.** A schematic map of the specific expression of different CYPs in human organs is presented. Expression values are relative to the mean expression in all organs. At least three-fold higher expression of a CYP in one organ is indicated by red text. At least three-fold lower expression is indicated by green text. A color spectrum for the expression values is illustrated in the provided scale. CYPs with average expression in one organ were not included.

doi: 10.1371/journal.pone.0082562.g006

of suitable drug alternatives like Ticagrelor (no activation required, metabolized via CYP 3A4).

#### Additional observed effects

Apart from altered drug metabolism, CYP polymorphisms were also potentially associated with neoplastic growth, adverse psychological behavior and other diseases. In women, polymorphisms in CYP 1A1 seemed to increase susceptibility to genital cancers [57,58]. Conversely, the CYP 2D6\*4 polymorphism has been shown to have a protective effect against breast cancer [59]. Furthermore, 2C19\*2, 2D6\*4, 2D6\*10 and 1A1\*2A have been associated with increased risk of head and neck squamous cell carcinoma [60].

In addition to the role that CYP polymorphisms play in pathological processes and susceptibility to certain diseases, recent genome-wide association studies (GWASs) have demonstrated an association between increased coffee consumption and SNPs rs2472297-T (located between CYP1A1 and CYP1A2) and rs6968865 (next to aryl hydrocarbon receptor) [61]. Huo et al. (2012) determined that certain SNPs are associated with increased susceptibility to schizophrenia [62], while Peñas-Lledó and colleagues found a positive association between the extent of active CYP 2D6 and frequency of suicide attempts, providing evidence that CYP diversity may need to be accounted for in clinical practice [63].



**Table 2.** Differentially expressed CYPs and their SNP frequencies.

CYP	ID	Mutation	Amino Acid	Global frequency (%)	CYP	ID	Mutation	Amino acid	Global frequency (%)
3A43	rs45450092	435G>T	M145I	1.5	2F1	rs144315434	1172T>C	L391P	5.4
	rs45621431	825G>A	M275I	2.3		rs146029724	1330A>C	M444L	6.5
	rs680055	1018C>G	P340A	13.4	2W1	rs61746347	557G>A	R186H	2.8
	rs78548296	389G>A	R130Q	1.0		rs117826462	547C>G	L183V	1.4
4A11	rs1126743	1374C>G	I458M	42.6	4F11	rs1060463	1271G>A	R424Q	49.5
	rs4926581	553G>T	V185F	28.1		rs148197835	538C>T	R180C	4.2
	rs61736429	1525C>T	L509F	2.1		rs57519667	436C>T	R146C	1.6
4A22	rs62618709	553G>T	V185F	1.1	2C18	rs115091705	431G>A	R144H	1.7
	rs112604161	181G>A	G61R	1.6		rs117111102	370C>T	R124W	1.4
	rs113777592	553G>T	V185F	29.6	rs2281891	1154C>T	T385M	19.3	
	rs2056900	388G>A	G130S	29.9	rs41286880	1004G>A	R335Q	2.5	
	rs4926600	1525C>T	L509F	12.9	rs79500998	1324C>T	R442C	1.0	
	rs61507155	311A>T	Y104F	6.6	7A1	rs8192875	1039G>A	D347N	1.6
4B1	rs61736431	1154C>T	P385L	1.2	4F12	rs16995378	47C>T	T16M	7.6
	rs12094024	986A>C	Y329S	2.2		rs57578760	808G>C	V270L	3.7
	rs2297809	1123C>T	R375C	18.3	11B1	rs76142062	88C>A	L30I	3.4
	rs4646487	517C>T	R173W	16.8		rs11775687	562C>T	P188S	5.7
rs59694031	1109G>C	C370S	4.0	rs9657020	593C>T	T198M	12.7		
4F2	rs2074900	515C>T	Thr172I	25.4	4F3	rs118159249	1420G>A	A474T	1.1
	rs2108622	1297G>A	V433M	20.9		2A7	rs111390860	988C>T	R330W
	rs3093153	554G>T	G185V	3.7	rs184466431	1301G>T	R434L	1.2	
	rs3093200	1555C>A	L519M	8.4	rs3869579	778C>T	R260C	46.7	
5A1	rs13306050	1372C>T	R458C	3.3	rs60711313	1259T>C	I420T	3.2	
	rs13306052	679GA	V227M	1.4	rs75152309	1106A>T	K369M	6.6	
	rs6952940	544C>T	P182S	2.4	rs78754793	244G>C	A82P	2.4	
2A6	rs5031017	1436G>T	G479V	1.4	2S1	rs34971233	1397C>T	P466L	1.1
	rs5031016	1412T>C	I471T	5.1		2E1	rs6413419	535G>A	V179I
	rs28399499	983T>C	I328T	2.3	rs28969387	1370A>T	H457L	6.3	
	rs8192709	64C>T	R22C	4.5	2C19	rs17884712	431G>A	R144H	1.4
	rs28399499	383T>C	I128T	2.3	8A1	rs5626	706C>T	R236C	3.7
2C8	rs11572103	805A>T	I269F	16.4	2D6	rs2982054	986G>A	R329H	31.2
	rs1058930	792C>G	I264M	4.1		rs1058172	941G>A	R314H	7.9
	rs11572103	805A>T	I269F	16.4		rs59421388	859G>A	V287M	5.3
2C9	rs28371686	1080C>G	D360E	2.3	rs1065852	100C>T	P34S	25.9	
	rs28371685	1003C>T	R335W	2.0	1A1	rs4646422	134GA	G45D	6.7
	rs2256871	752A>G	H251R	4.0		rs17861094	233T>C	I78Thr	8.3

Data was extracted from the 1,000 Genomes Project site (<http://www.1000genomes.org/>) [23]. A more detailed table can be found in the supplemental material. Possibly CYP-activity damaging SNPs are included in Table S2.

doi: 10.1371/journal.pone.0082562.t002

### Diversity of expression in human tissues

Variable expression of functionally distinct CYP isoforms across different tissue types indicates that certain isoforms play specific roles in a tissue-dependent manner. Figure 6 provides an illustrative overview of CYP expression in the human body. Such knowledge may be useful for development of new prodrugs activated by a specific CYP highly expressed in the preferentially targeted tissue, ultimately leading to increased bioavailability at the target site and reduced side effects. On the other hand, variable expression of CYPs in different tissues may adversely affect drug efficacy in some tissues. Such a case could occur if drugs undergo an inactivation through a

higher expressed CYP in their target tissues. Regardless, further clinical investigation is required.

Even polymorphic CYP isoforms show a heterogeneous tissue distribution. In particular, CYP 1A2, 2C19 and 2D6 are highly expressed in the pituitary gland. Furthermore, highest expression of CYP 2C9 was detected in the cerebellum, while greatest expression of 2D6 and 2B6 were found in skeletal muscle and kidneys. The influence of mutations in CYPs in particular organs remains to be determined and requires further investigation.

Differential distribution of CYPs may have an influence on specific side effects of drugs. For example, cyclophosphamide (CPA) therapy can lead to development of hyponatremia. CPA is a prodrug converted by CYP 2B6 into the active form [64].

The hyponatremia is the result of increased expression of aquaporins 1 and 7, which is induced by CPA [65]. CYP 2B6 has high expression in kidneys, indicating that a higher level of active CPA is likely to occur in the kidneys and lead to the undesirable side effect.

## Conclusions

In summary, the current study identified four major CYPs (1A2, 2D6, 2C9 and 2C19) and 34 polymorphic alleles with a significant impact on the drug metabolism in the Caucasian population. Once genomic testing becomes part of routine analysis, this data enables prediction of complications in drug therapy and development of a personalized treatment regimen, where drug dosages are based on an individual's specific CYP profile [6]. Ultimately, this approach may prevent treatment failures and avoid unnecessary side effects. Another interesting field could be the consideration of CYP polymorphisms in clinical trials. Potentially, it would decrease the failures if information of potential polymorphisms in different ethnic groups was included. Findings from the current study will be included in the SuperCYP database.

With the aim of assessing the effects of CYP polymorphisms on chemotherapy and establishing a cost efficient method to detect relevant CYP polymorphisms, a retrospective study in leukemia cells from pediatric patients is currently under way [66].

## References

- Zhou SF, Liu JP, Chowbay B (2009) Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev* 41: 89-295. doi:10.1080/03602530902843483. PubMed: 19514967.
- Raether W, Seidenath H, Loewe H (1978) Action of p-(4-amidino-phenoxy)-benzaldehyde-p-amidino-phenylhydrazone dihydrochloride on *Leishmania donovani* infections in the golden hamster. *Ann Trop Med Parasitol* 72: 543-547. PubMed: 216324.
- McGraw J, Waller D (2012) Cytochrome P450 variations in different ethnic populations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 8: 371-382. doi:10.1517/17425255.2012.657626. PubMed: 22288606.
- Deenen MJ, Cats A, Beijnen JH, Schellens JH (2011) pharmacogenetic variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism part 2. *Oncologist* 16: 820-834. doi:10.1634/theoncologist.2010-0259. PubMed: 21632461.
- Grover S, Kukreti R (2012) Functional Genetic Polymorphisms from Phase-II Drug Metabolizing. *Enzymes - CNS Neuroscience Ther* 18: 705-706. doi:10.1111/j.1755-5949.2012.00343.x.
- Preissner S, Kroll K, Dunkel M, Senger C, Goldsobel G et al. (2010) SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions. *Nucleic Acids Res* 38: D237-D243. doi:10.1093/nar/gkp970. PubMed: 19934256.
- McLean KJ, Sabri M, Marshall KR, Lawson RJ, Lewis DG et al. (2005) Biodiversity of cytochrome P450 redox systems. *Biochem Soc Trans* 33: 796-801. doi:10.1042/BST0330796. PubMed: 16042601.
- Guengerich FP (2008) Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 21: 70-83. doi:10.1021/tx700079z. PubMed: 18052394.
- Ingelman-Sundberg M (2005) The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicol Appl Pharmacol* 207: 52-56. doi:10.1016/j.taap.2005.01.030. PubMed: 15993453.
- Flockhart DA, Oesterheld JR (2000) Cytochrome P450-mediated drug interactions. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 9: 43-76. PubMed: 10674190.
- Berka K, Hendrychová T, Anzenbacher P, Otyepka M (2011) Membrane position of ibuprofen agrees with suggested access path entrance to cytochrome P450 2C9 active site. *J Phys Chem A* 115: 11248-11255. doi:10.1021/jp204488j. PubMed: 21744854.
- Culhane AC, Schwarzl T, Sultana R, Picard KC, Picard SC et al. (2010) GeneSigDB--a curated database of gene expression signatures. *Nucleic Acids Res* 38: D716-D725. doi:10.1093/nar/gkp1015. PubMed: 19934259.
- de Leon J, Susce MT, Johnson M, Hardin M, Maw L et al. (2009) DNA microarray technology in the clinical environment: the AmpliChip CYP450 test for CYP2D6 and CYP2C19 genotyping. *CNS Spectr* 14: 19-34. PubMed: 19169185.
- Patterson LH, McKeown SR, Robson T, Gallagher R, Raleigh SM et al. (1999) Antitumor prodrug development using cytochrome P450 (CYP) mediated activation. *Anticancer Drug Des* 14: 473-486. PubMed: 10834269.
- Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, Wong ML, Licinio J et al. (2004) Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry* 9: 442-473. doi:10.1038/sj.mp.4001494. PubMed: 15037866.
- Albert A (1958) Chemical aspects of selective toxicity. *Nature* 182: 421-422. doi:10.1038/182421a0. PubMed: 13577867.
- Tanabe K, Ishizaki J, Ando Y, Ito T, Nishimoto S (2012) Reductive activation of 5-fluorodeoxyuridine prodrug possessing azide methyl group by hypoxic X-irradiation. *Bioorg Med Chem Lett* 22: 1682-1685. doi:10.1016/j.bmcl.2011.12.106. PubMed: 22248856.
- Guengerich FP, Shimada T (1998) Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat Res* 400: 201-213. doi:10.1016/S0027-5107(98)00037-2. PubMed: 9685642.
- Dormán G, Prestwich GD (2000) Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends Biotechnol* 18: 64-77. doi:10.1016/S0167-7799(99)01402-X. PubMed: 10652511.
- Simplicio AL, Clancy JM, Gilmer JF (2007) Beta-aminoketones as prodrugs with pH-controlled activation. *Int J Pharm* 336: 208-214. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.11.055. PubMed: 17197138.
- Topf N, Worgall S, Hackett NR, Crystal RG (1998) Regional 'pro-drug' gene therapy: intravenous administration of an adenoviral vector expressing the *E. coli* cytosine deaminase gene and systemic administration of 5-fluorocytosine suppresses growth of hepatic metastasis of colon carcinoma. *Gene Ther* 5: 507-513. doi:10.1038/sj.gt.3300611. PubMed: 9614575.

## Supporting Information

**Table S1. Extended table of CYP SNP frequencies in Caucasians and other ethnics.** The table includes the content of Table 1 and further information (other ethnics and nucleotide changes) that have been extracted by text mining. (XLSX)

**Table S2. Extended table of differentially expressed CYPs and their SNP frequencies.** The extended table lists possibly CYP-activity damaging SNPs. CYP SNPs with frequencies (%) greater than one percent were included. The data was extracted from the 1,000 Genomes Project site (<http://www.1000genomes.org/>). (XLSX)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RP. Performed the experiments: SCP SP MFH AG. Analyzed the data: SCP SP MFH RP MD. Contributed reagents/materials/analysis tools: MD AG. Wrote the manuscript: SP RP SCP MFH.

22. Huttunen KM, Mähönen N, Raunio H, Rautio J (2008) Cytochrome P450-activated prodrugs: targeted drug delivery. *Curr Med Chem* 15: 2346-2365. doi:10.2174/092986708785909120. PubMed: 18855665.
23. Genomes Project C (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467: 1061-1073. doi:10.1038/nature09534. PubMed: 20981092.
24. Sim SC, Ingelman-Sundberg M (2010) The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Hum Genomics* 4: 278-281. doi:10.1186/1479-7364-4-4-278. PubMed: 20511141.
25. Ramensky V, Bork P, Sunyaev S (2002) Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 30: 3894-3900. doi:10.1093/nar/gkf493. PubMed: 12202775.
26. Worth CL, Preissner R, Blundell TL (2011) SDM—a server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction. *Nucleic Acids Res* 39: W215-W222. doi:10.1093/nar/gkr363. PubMed: 21593128.
27. Roth RB, Hevezi P, Lee J, Willhite D, Lechner SM et al. (2006) Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS. *Neurogenetics* 7: 67-80. doi:10.1007/s10048-006-0032-6. PubMed: 16572319.
28. Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z (2002) Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* 18: 207-208. doi:10.1093/bioinformatics/18.1.207. PubMed: 11836235.
29. Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S, Satoh T (2003) Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* 123: 369-375. doi:10.1248/yakushi.123.369. PubMed: 12772594.
30. Hasler JA (1999) Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 20: 12-25. 10575648.
31. Johnson M, Markham-Abadi C, Susce MT, Murray-Carmichael E, McCollum S et al. (2006) A poor metabolizer for cytochromes P450 2D6 and 2C19: a case report on antidepressant treatment. *CNS Spectr* 11: 757-760. PubMed: 17008819.
32. Laine K, Kytölä J, Bertilsson L (2004) Severe adverse effects in a newborn with two defective CYP2D6 alleles after exposure to paroxetine during late pregnancy. *Ther Drug Monit* 26: 685-687. doi:10.1097/00007691-200412000-00016. PubMed: 15570195.
33. Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C (2007) Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeconomic and clinical aspects. *Pharmacol Ther* 116: 496-526. doi:10.1016/j.pharmthera.2007.09.004. PubMed: 18001838.
34. de Leon J, Armstrong SC, Cozza KL (2006) Clinical guidelines for psychiatrists for the use of pharmacogenetic testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19. *Psychosomatics* 47: 75-85. doi:10.1176/appi.psy.47.1.75. PubMed: 16384813.
35. Bradford LD (2002) CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. *Pharmacogenomics* 3: 229-243. doi:10.1517/14622416.3.2.229. PubMed: 11972444.
36. Papp-Jámbor C, Jaschinski U, Forst H (2002) Cytochrome P450 enzymes and their role in drug interactions. *Anaesthesist* 51: 2-15. doi:10.1007/s101-002-8365-5. PubMed: 11963295.
37. de Leon J (2009) The future (or lack of future) of personalized prescription in psychiatry. *Pharmacol Res* 59: 81-89. doi:10.1016/j.phrs.2008.10.002. PubMed: 18996200.
38. Relling MV, Klein TE (2011) CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network. *Clin Pharmacol Ther* 89: 464-467. doi:10.1038/clpt.2010.279. PubMed: 21270786.
39. Roots I, Laschinski G, Arjomand-Nahad F, Kirchheiner J, Schwarz D et al. (2007) Genotype and phenotype relationship in drug metabolism. *Ernst Schering Res Found Workshop*. pp. 81-100. PubMed: 17117716.
40. Seeringer A, Kirchheiner J (2008) Pharmacogenetics-guided dose modifications of antidepressants. *Clin Lab Med* 28: 619-626. doi:10.1016/j.cl.2008.05.006. PubMed: 19059066.
41. Kirchheiner J, Brøsen K, Dahl ML, Gram LF, Kasper S et al. (2001) CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages. *Acta Psychiatr Scand* 104: 173-192. doi:10.1034/j.1600-0447.2001.00299.x. PubMed: 11531654.
42. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS et al. (2001) Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 358: 527-533. doi:10.1016/S0140-6736(01)05701-4. PubMed: 11520521.
43. Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT 3rd, Fry ET, DeLago A et al. (2002) Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 288: 2411-2420. doi:10.1001/jama.288.19.2411. PubMed: 12435254.
44. Dupont AG, Gabriel DA, Cohen MG (2009) Antiplatelet therapies and the role of antiplatelet resistance in acute coronary syndrome. *Thromb Res* 124: 6-13. doi:10.1016/j.thromres.2009.08.005. PubMed: 19324398.
45. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, Shechter M, Beinart R et al. (2004) Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 109: 3171-3175. doi:10.1161/01.CIR.0000130846.46168.03. PubMed: 15184279.
46. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Alfonso F, Macaya C et al. (2007) Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol* 49: 1505-1516. doi:10.1016/j.jacc.2006.11.044. PubMed: 17418288.
47. Savi P, Herbert JM (2005) Clopidogrel and ticlopidine: P2Y<sub>12</sub> adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost* 31: 174-183. doi:10.1055/s-2005-869523. PubMed: 15852221.
48. Hulot JS, Collet JP, Silvain J, Pena A, Bellemain-Appaix A et al. (2010) Cardiovascular risk in clopidogrel-treated patients according to cytochrome P450 2C19\*2 loss-of-function allele or proton pump inhibitor coadministration: a systematic meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 56: 134-143. doi:10.1016/j.jacc.2009.12.017. PubMed: 20620727.
49. Sofi F, Giusti B, Marcucci R, Gori AM, Abbate R et al. (2011) Cytochrome P450 2C19\*2 polymorphism and cardiovascular recurrences in patients taking clopidogrel: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J* 11: 199-206. doi:10.1038/tj.2010.21. PubMed: 20351750.
50. Pettersen AA, Arnesen H, Opstad TB, Seljeflot I (2011) The influence of CYP 2C19\*2 polymorphism on platelet function testing during single antiplatelet treatment with clopidogrel. *Thromb J* 9: 4. doi:10.1186/1477-9560-9-4. PubMed: 21426546.
51. Mega JL, Simon T, Collet JP, Anderson JL, Antman EM et al. (2010) Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: a meta-analysis. *JAMA* 304: 1821-1830. doi:10.1001/jama.2010.1543. PubMed: 20978260.
52. Kassimis G, Davlouros P, Xanthopoulos I, Stavrou EF, Athanassiadou A et al. (2012) CYP2C19\*2 and other genetic variants affecting platelet response to clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Thromb Res* 129: 441-446. doi:10.1016/j.thromres.2011.07.022. PubMed: 21831410.
53. Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S et al. (2010) Cytochrome 2C19\*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation* 121: 512-518. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.885194. PubMed: 20083681.
54. Dai ZL, Chen H, Wu XY (2012) Relationship between cytochrome P450 2C19\*17 genotype distribution, platelet aggregation and bleeding risk in patients with blood stasis syndrome of coronary artery disease treated with clopidogrel. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 10: 647-654.
55. Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP et al. (2000) CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther* 67: 48-56. doi:10.1067/mcp.2000.104391. PubMed: 10668853.
56. Tazaki J, Jinnai T, Tada T, Kato Y, Makiyama T et al. (2012) Prediction of clopidogrel low responders by a rapid CYP2C19 activity test. *J Atheroscler Thromb* 19: 186-193. doi:10.5551/jat.10009. PubMed: 22166969.
57. Sergentanis TN, Economopoulos KP, Choussein S, Vlahos NF (2012) Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) gene polymorphisms and ovarian cancer risk: a meta-analysis. *Mol Biol Rep*, 39: 9921-30. PubMed: 22733497.
58. Mrozkiewicz PM, Grześkowiak E, Seremak-Mrozkiewicz A, Bogacz A, Barlik M et al. (2011) Importance of CYP1A1 polymorphism and its transcriptional regulation in ovarian and endometrial cancer. *Ginekol Pol* 82: 925-932. PubMed: 22384629.
59. Fernández-Santander A, del Saz Sánchez M, Tejerina Gómez A, Moya Bandres F (2012) CYP2D6\*4 allele and breast cancer risk: is there any association? *Clin Transl Oncol* 14: 157-159. doi:10.1007/s12094-012-0776-4. PubMed: 22301406.
60. Ruwali M, Parmar D (2010) Association of functionally important polymorphisms in cytochrome P450s with squamous cell carcinoma of head and neck. *Indian J Exp Biol* 48: 651-665. PubMed: 20929050.
61. Sulem P, Gudbjartsson DF, Geller F, Prokopenko I, Feenstra B et al. (2011) Sequence variants at CYP1A1-CYP1A2 and AHR associate

- with coffee consumption. *Hum Mol Genet* 20: 2071-2077. doi: 10.1093/hmg/ddr086. PubMed: 21357676.
62. Huo R, Tang K, Wei Z, Shen L, Xiong Y et al. (2012) Genetic polymorphisms in CYP2E1: association with schizophrenia susceptibility and risperidone response in the Chinese Han population. *PLOS ONE* 7: e34809. doi:10.1371/journal.pone.0034809. PubMed: 22606226.
63. Peñas-Lledó EM, Blasco-Fontecilla H, Dorado P, Vaquero-Lorenzo C, Baca-García E et al. (2012) CYP2D6 and the severity of suicide attempts. *Pharmacogenomics* 13: 179-184. doi:10.2217/pgs.11.146. PubMed: 22141351.
64. Jounaidi Y, Chen CS, Veal GJ, Waxman DJ (2006) Enhanced antitumor activity of P450 prodrug-based gene therapy using the low Km cyclophosphamide 4-hydroxylase P450 2B11. *Mol Cancer Ther* 5: 541-555. doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0321. PubMed: 16546968.
65. Kim S, Jo CH, Park JS, Han HJ, Kim GH (2011) The role of proximal nephron in cyclophosphamide-induced water retention: preliminary data. *Electrolyte. Blood Press* 9: 7-15.
66. Shalpour S, Hof J, Kirschner-Schwabe R, Bastian L, Eckert C et al. (2011) High VLA-4 expression is associated with adverse outcome and distinct gene expression changes in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia at first relapse. *Haematologica* 96: 1627-1635. doi:10.3324/haematol.2011.047993. PubMed: 21828124.

# Drug Cocktail Optimization in Chemotherapy of Cancer

Saskia Preissner<sup>1</sup>, Mathias Dunkel<sup>2</sup>, Michael F. Hoffmann<sup>2</sup>, Sarah C. Preissner<sup>2</sup>, Nikolai Genov<sup>2</sup>, Wen Wei Rong<sup>2</sup>, Robert Preissner<sup>2</sup>, Karlheinz Seeger<sup>3\*</sup>

**1** Charité - Universitätsmedizin Berlin, Dental, Oral and Maxillary Medicine, CC3, Department of Operative and Preventive Dentistry, Berlin, Germany, **2** Charité - Universitätsmedizin Berlin, Institute for Physiology, CC2, Structural Bioinformatics Group, Berlin, Germany, **3** Charité - Universitätsmedizin Berlin, Pediatric and Adolescent Medicine, CC17, Department of Pediatrics, Division of Oncology and Hematology, Berlin, Germany

## Abstract

**Background:** In general, drug metabolism has to be considered to avoid adverse effects and ineffective therapy. In particular, chemotherapeutic drug cocktails strain drug metabolizing enzymes especially the cytochrome P450 family (CYP). Furthermore, a number of important chemotherapeutic drugs such as cyclophosphamide, ifosfamide, tamoxifen or procarbazine are administered as prodrugs and have to be activated by CYP. Therefore, the genetic variability of these enzymes should be taken into account to design appropriate therapeutic regimens to avoid inadequate drug administration, toxicity and inefficiency.

**Objective:** The aim of this work was to find drug interactions and to avoid side effects or ineffective therapy in chemotherapy.

**Data sources and methods:** Information on drug administration in the therapy of leukemia and their drug metabolism was collected from scientific literature and various web resources. We carried out an automated textmining approach. Abstracts of PubMed were filtered for relevant articles using specific keywords. Abstracts were automatically screened for antineoplastic drugs and their synonyms in combination with a set of human CYPs in title or abstract.

**Results:** We present a comprehensive analysis of over 100 common cancer treatment regimens regarding drug-drug interactions and present alternatives avoiding CYP overload. Typical concomitant medication, e.g. antiemetics or antibiotics is a preferred subject to improvement. A webtool, which allows drug cocktail optimization was developed and is publicly available on <http://bioinformatics.charite.de/chemotherapy>.

**Citation:** Preissner S, Dunkel M, Hoffmann MF, Preissner SC, Genov N, et al. (2012) Drug Cocktail Optimization in Chemotherapy of Cancer. PLoS ONE 7(12): e51020. doi:10.1371/journal.pone.0051020

**Editor:** Daotai Nie, Southern Illinois University School of Medicine, United States of America

**Received:** August 6, 2012; **Accepted:** October 29, 2012; **Published:** December 7, 2012

**Copyright:** © 2012 Preissner et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by Berliner Krebsgesellschaft, DFG Graduate School 1776, BMBF MedSys, EU SynSys. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: [karl.seeger@charite.de](mailto:karl.seeger@charite.de)

## Introduction

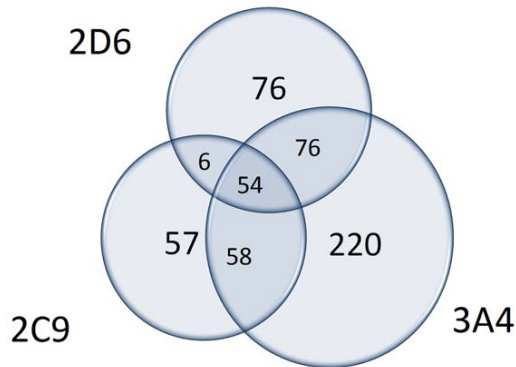
### Drug metabolism and drug-drug interactions

Drug metabolism is a complex biochemical network, which consists of many different reactions and pathways in the human organism. Some drugs are excreted unchanged in urine and faeces without metabolic degradation in the liver, but most drugs undergo a multi-step metabolism, which is mainly accomplished by enzymes of the cytochrome P450 family (CYP). CYP catalyze a large amount of enzymatic reactions, such as alcohol oxidations, dehydrogenation and isomerizations. It is a difficult task of medical science and daily clinical practice to establish effective combinations of drugs that do not affect each other's metabolic pathways.

The Human Genome Project revealed 57 different CYP variants [1]. The variant biological activities and specificity among each single CYP are an important issue for researchers as well as physicians. The knowledge of level and catalytic activity of the specific CYP and the effect on drug metabolism could and should lead to personalized drug dosages to optimize the therapeutic effect and minimize harmful side effects. Furthermore, the

induction of a CYP by a drug, which is also active in another drug's metabolism, requires increase of the dosage of the first drug to achieve the same therapeutic effect. In case of inhibition, the dosage should be reduced, resulting in diminished side effects. In addition, the drug excretion pathway through kidney has also an important influence on individual drug response. Unfortunately, drugs that are mainly removed by this pathway from the body, will accumulate if an impaired kidney function exists. Therefore, the extrarenal fraction ( $Q_0$ ) value is able to predict whether a drug is primarily excreted unchanged via kidneys or metabolized and/or removed through another pathway. Thereby is  $(1 - Q_0)$  the fraction, which is removed unchanged via kidneys. High  $Q_0$  values stand for mainly metabolized drugs and/or kidney independent excretion. In order to prevent adverse side effects and toxic drug levels in diseased kidney patients the  $Q_0$  value should be taken into account to change the drug or adjust the dosage.

Due to multi-drug administration in polychemotherapeutic regimens, adverse side effects are discussed intensely in pharmaceutical research [2]. Three frequently occurring problems should be considered:



**Figure 1. The Venn diagram illustrates the enzyme overload of CYPs 3A4, 2C9, 2D6 in chemotherapy.** The numbers within the circles represent the drugs, which are metabolized by the CYPs. Intersection areas show the drugs, which are metabolized by two or three of the CYPs. doi:10.1371/journal.pone.0051020.g001

1. Adverse side effects because of limited capacity of metabolizing enzymes,
2. Malfunctioning in-vivo activation of prodrugs due to inhibited or mutated CYPs,
3. Unexpected drug levels because of enzyme induction or inhibition.

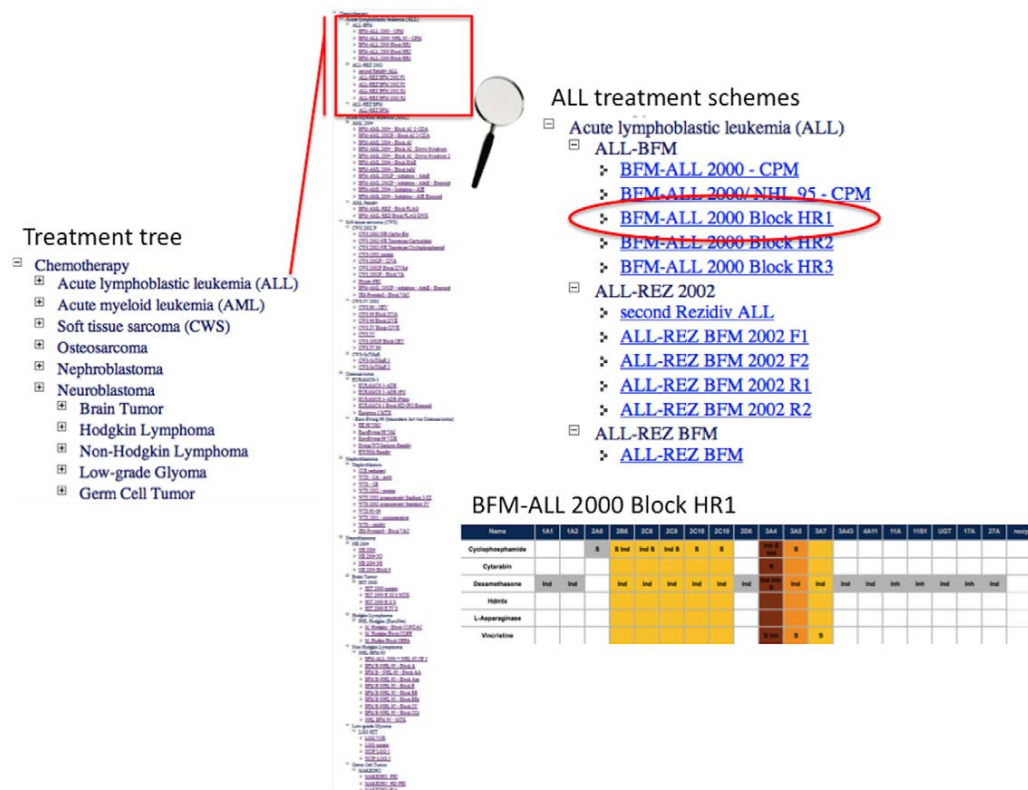
### CYPs in chemotherapy

In this manuscript, we focus on leukemia while other types of cancer (soft-tissue sarcoma, osteosarcoma, nephroblastoma, neuroblastoma, brain tumors, hodgkin-lymphoma, non-hodgkin lymphoma, low-grade glioma, and germ cell tumors) are considered at the website.

Most subtypes of leukemia are primarily treated with risk-adapted polychemotherapy protocols, which consist of induction, consolidation, re-induction and maintenance regimens. For risk-adaptation certain prognostic factors are applied, such as leukocyte cell count, age, gender, cytogenetic findings and response to induction therapy [3]. Patients receive up to 13 different antineoplastic drugs. In leukemia, disease progression can be influenced by genetic variants encoding proteases, angiogenic factors, hematopoietic cytokines, bone marrow stroma factors or structural proteins in epithelium. Due to scientific progress individualized medicine is being increasingly developed in the last years and CYP-drug, as well as drug-drug interactions are being considered [4,5]. Individualized medicine also deals with single nucleotide polymorphisms (SNPs) of CYPs to predict patient responses [6,7].

In children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) an increased risk of vincristine polynurotoxicity associated with low CYP 3A5 expression has been reported [8].

Many antineoplastic agents are prodrugs, e.g. cyclophosphamide, ifosfamide, dacarbazine, procarbazine and tamoxifen, requiring in vivo activation by CYPs [9]. An inhibition of CYPs due to multidrug administration could potentially affect negatively the therapeutic efficacy. The clinical relevance of such consider-



**Figure 2. Treatment algorithm: Different antineoplastic treatment regimens in chemotherapy, ordered by diseases.** By clicking on one of the diseases, different treatment options open up. After choosing one treatment regimen the metabolism of that drug-cocktail is illustrated. doi:10.1371/journal.pone.0051020.g002

**Table 1.** Treatment regimen before optimization: Drugs for the treatment of ALL at initial diagnosis.

Drug	Purpose	Q <sub>0</sub>	EHL	Involved CYPs			References
				Substrate of	Inducer of	Inhibitor of	
Cyclophosphamide	Antineoplastic agent	0.75	7	2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 3A4, 3A5	2B6, 2C8, 2C9, 3A4	3A4	[23,24,25,26,27]
Cytarabine	Antineoplastic agent	0.9	2	3A4			[28]
Dexamethasone	Corticosteroid	0.9	3	3A4	1A1, 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 3A4, 11A, 11B1, 2D6, 3A4, 3A5, 3A7, 3A43, 4A11, UGT, 17A, 27A		[17,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41]
Vincristine	Antineoplastic agent	0.8	85	3A4, 3A5, 3A7		3A4	[17,42,43,44]
HdMTX	Antineoplastic agent						
L-Asparaginase	Antineoplastic agent						

The second, third and fourth columns list the purpose of these drugs, their extrarenal fraction (Q<sub>0</sub>) and elimination half-life (EHL), while the next three columns show involved CYPs ordered by substrate, inducer and inhibitor. References are given in the last column. doi:10.1371/journal.pone.0051020.t001

ations was shown in several clinical trials, where CYPs and SNPs play a role in potentially preventing treatment related deaths [9,10,11,12,13]. A retrospective study showed a 3-fold higher risk of death in patients with a polymorphism of CYP3A4 who were receiving cyclophosphamide-based adjuvant chemotherapy [14].

These findings suggest that individual SNPs in CYPs and drug-drug interactions in polychemotherapy are important issues and treatment regimens should be reevaluated regarding such interactions.

## Materials and Methods

### Treatment regimens

Information on drug administration of chemotherapeutics in oncology and their drug metabolism was collected from scientific literature and various web resources. About 100 common treatment regimens were extracted from the blue book [15].

### CYP-drug interactions

The drugs from the treatment regimens were subdivided into two groups regarding their purpose:

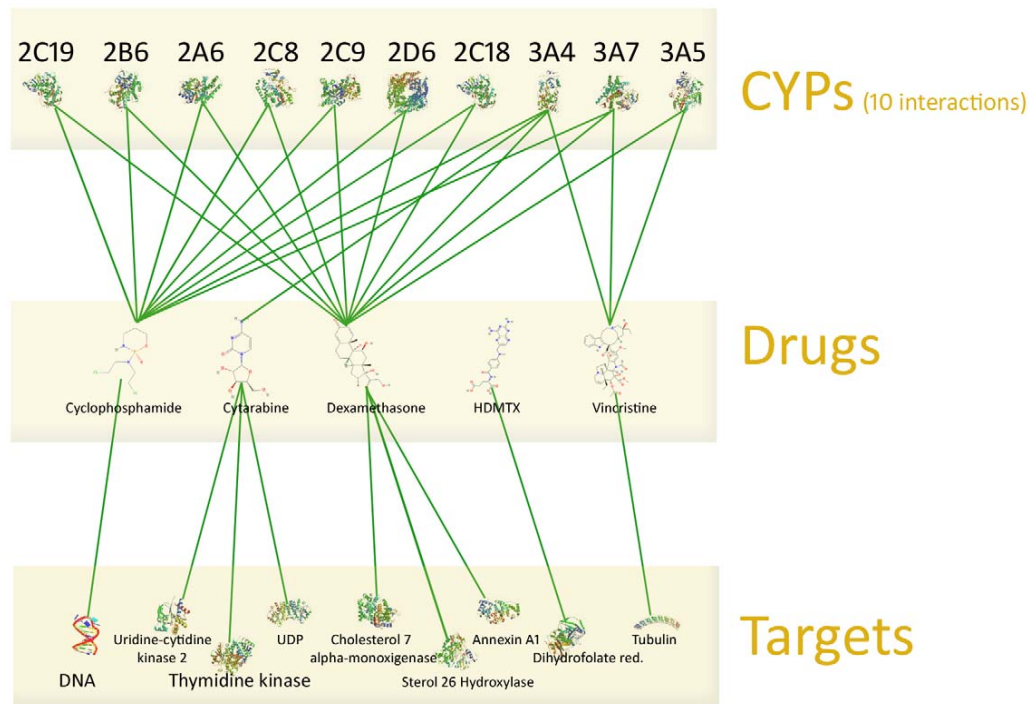
- Antineoplastic agents
- Supportive treatment, e.g. antiemetics, antimycotics, antibiotics

Information on CYP metabolism was also extracted from Nelsons Homepage [16], Flockharts Interaction Table [17], University of Maryland's Drug Checker, PubChem [18], PDB [19]. Some information was gathered from FDA-files.

### Textmining

The flood of information on drugs in the world wide web (WWW) is overwhelming [20]. The World Wide Web Consortium aims at converting the existing web into a Semantic Web or "web of data" [21]. Accordingly, we carried out a new textmining approach using Semantic Web Standards. For the development of the CYP-specialized textmining pipeline we used the literature and information retrieval packages Lucene and LingPipe. Therefore, the complete Medline/PubMed data was downloaded from the NCBI FTP site in xml-format and indexed. The indexed data is dynamically queried by a search engine written in Java resulting in a sql-file containing the textmining hits. The search engine comprises several lists of synonyms for identifying entities like chemical compounds, biological targets, genes, cell-types, polymorphisms as well as interaction related entities. Abstracts were automatically screened for antineoplastic drugs and their synonyms in combination with a set of human CYPs in title or abstract. Furthermore, the relation between drug and CYP was classified according to interaction terms like "inhibit", "induce", "metabolize" etc. The query was: (DrugSynonym[t<sub>i</sub>] AND CypSynonym[t<sub>i</sub>] OR (DrugSynonym[abstract] AND InteractionTerm AND CypSynonym[abstract])). There was a need for restricting positional distance between occurrences of the terms, e.g. if terms are found far from each other in a paper. Those 2,060 records found were scored rule-based to identify relations between entities. The rules employ order, redundancy and distance between entities, topic segmentation and sentence breaking for boundaries. Duplicates were removed and a team of scientists manually processed 723 papers found in PubMed. Each drug was attributed to those CYPs that are involved in drug metabolism as substrate, inhibitor or inducer.





**Figure 3. CYP interactions and targets of treatment regimen before optimization.** The drugs of the medication are listed centrally in the Figure. Several green lines heading upwards illustrate ten CYPs, which are involved in the metabolism. The green lines heading downwards show the targets, which are metabolized by these drugs.

doi:10.1371/journal.pone.0051020.g003

### ATC Classification System

Many problems, such as enzyme overload, enzyme induction or inhibition occur in combination therapy of leukemia. Some of these drug-drug interactions can be avoided by choosing an alternative drug. Based on the WHO classification system, that classifies drugs into different groups according to Anatomic site of action, Therapeutic effect and Chemical structure (ATC), alternative drugs could be administered. Additionally, the suggestions of alternative drugs were manually curated by oncologists and checked for sanity.

### Database

To overcome these problems, we generated a web-interface for clinicians to check drug-drug interactions. The database provides information on drug metabolism including PubMed references. The database is designed as a relational database on a MySQL server. For chemical functionality, the MyChem package is included, which aims to provide a complete set of functions for handling chemical data within MySQL. The website is built with PHP and javascript, web access is enabled via Apache Webserver 2.2.

### Results and Discussion

Those 2,060 records were found through the automated textmining approach. Another 50 records were manually identified. 864 duplicates were automatically removed and another 92 records were excluded. A team of scientists manually processed 723 papers found in PubMed. There are a lot of undesired drug-drug interactions via CYPs. In particular, the number and effect of anti-neoplastic drugs often cause severe problems, possibly ending

up with death. The extensive search revealed three CYPs, which are mainly involved in the metabolism of antineoplastic agents.

Figure 1 shows these CYPs, namely CYP 3A4, 2D6 and 2C9, which are involved in the metabolism of most of the drugs. Interestingly, CYPs 2D6 and 2C9 are highly polymorphic, which makes it even more important to disencumber the CYPs from some drugs and in second step, trying to use different metabolic pathways.

We have analyzed the antineoplastic drugs from over 100 treatment regimens regarding their drug metabolism. The results are summarized in Table S1 of Supporting Information.

To optimize therapeutic regimens, the effect of supportive drugs like antibiotics, antimycotics, antiemetics etc. in the metabolic process have to be taken into account, which are shown in Table S2 of Supporting Information.

These analyses suggest several drug-drug interactions, but also show some alternatives to avoid enzyme overload or induction. Additionally, the analysis of the ATC codes for drug classification and the addressed targets provide hints for possible alternative medication. Going through the list of chemotherapeutic drugs and supportive medication, we have compiled a comprehensive list of combination therapies, which are optimized regarding their metabolism. This list is structured according to an algorithm starting from the different cancer types, different therapy cycles, relapse etc. (Figure 2).

Furthermore, the  $Q_0$  and elimination half-life (EHL) values are displayed to compare the pharmacological properties of drugs and their alternatives. On the one hand, longer EHL potentially means CYP overload and should be avoided, on the other hand the effective presence of the drugs has to be longer than the cell cycle of the cancer cells (re-dosing may be required for shorter EHLs).



**Table 2.** Treatment regimen after optimization: Possible alternatives in the treatment of ALL.

Drug	Purpose	Q <sub>0</sub>	EHL	Involved CYPs			References
				Substrate of	Inducer of	Inhibitor of	
Gemcitabine	Antineoplastic agent	0.9	1.2				
Prednisolone	Corticosteroid	0.7	3	3A4, 3A5	3A4, 3A5	2A6	[45,46,47,48]
Trofosamide	Antineoplastic agent	0.9	1	2B6, 3A4			[49]
Vindesine	Antineoplastic agent	0.87	24	3A4			[50]
HdMTX	Antineoplastic agent						
L-Asparagine	Antineoplastic agent						

The second, third and fourth columns list the purpose of these drugs, their extrarenal fraction (Q<sub>0</sub>) and elimination half-life (EHL) in hours, while the next three columns show involved CYPs ordered by substrate, inducer and inhibitor. References are given in the last column.  
doi:10.1371/journal.pone.0051020.t002

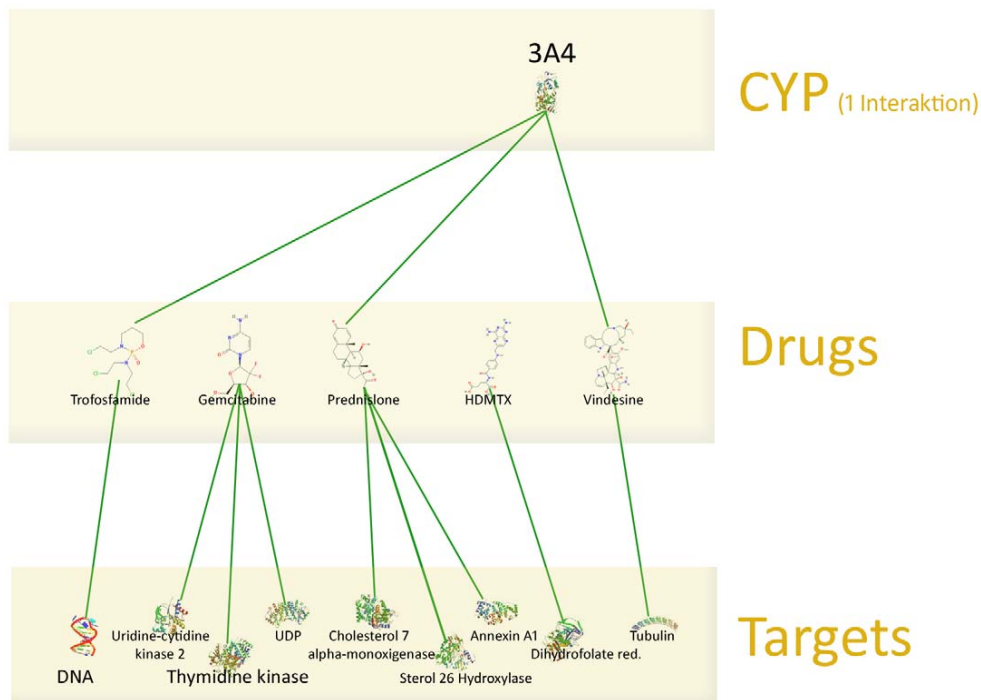
The consideration of individual pharmacokinetic parameters like Km and Vmax for drugs and CYPs [22] would be desirable but requires refined models for each particular drug-drug interaction (reversible, competitive, non-competitive, uncompetitive, irreversible etc.), which remains a future goal. Beside the role in patients with nephropathies, the Q<sub>0</sub> could also help to estimate the extent of CYP-drug interactions. Drugs with low Q<sub>0</sub> values (<0.3) are excreted unchanged to a large extent and occupying the CYP system lesser. In conclusion, their impact on interactions is lower than for drugs with higher Q<sub>0</sub> values. Hence, consideration of Q<sub>0</sub> values in finding alternative drugs is useful to reduce the interaction potential, if the function of kidneys is sufficient. However, limitations are a small number of eligible drugs with low Q<sub>0</sub> values, and that high values do not necessarily mean more

CYP reactions. But it provides a useful support to select the alternative drugs.

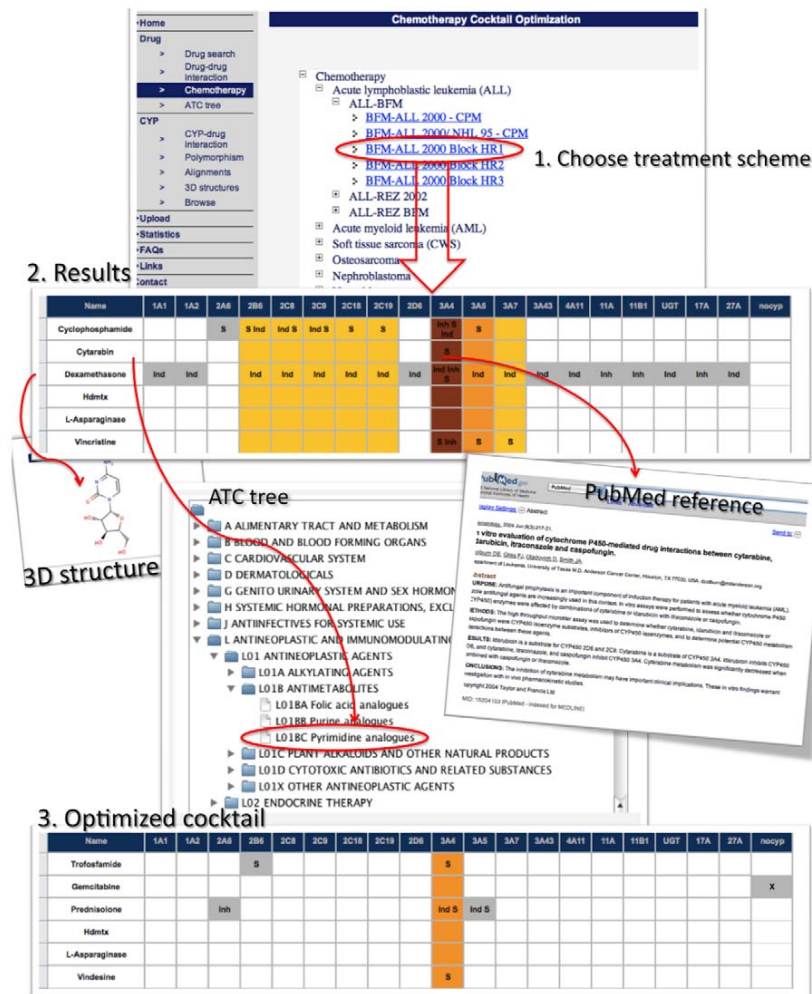
To exemplify here, we chose one typical treatment protocol for the treatment of ALL, which consists of the antineoplastic drugs cyclophosphamide, cytarabine, HDMTX, L-asparaginase and vincristine, as well as the corticosteroids prednisone/dexamethasone.

CYPs involved in the metabolism of the mentioned drugs are listed in Table 1, ordered by substrate, inducer and inhibitor. It is clearly visible, that many CYPs are involved in the metabolism processes, ending up in eleven interactions. These are illustrated with targets in Figure 3.

Based on the ATC codes, we extracted an alternative treatment regimen to avoid these interactions. The results are illustrated in Table 2 and Figure 4. Figure 4 shows that there is only one



**Figure 4. CYP interactions and targets of treatment regimen after optimization.** By choosing drugs from the same ATC group with different metabolism pathways, only one CYP interaction remains.  
doi:10.1371/journal.pone.0051020.g004



**Figure 5. Optimization tool.** Clicking on “Chemotherapy” in the navigation directs to the treatment tree, enabling to browse through different treatment regimens ordered by diseases. Once a treatment regimen is chosen, the drug-cocktail is shown on the “Results” page. The enzyme overload is visualized in different colors. PubMed references are indicated, as well as 3D structures of the drugs and the ATC tree defining the purpose of the drugs. Based on the ATC group, several alternatives for each drug are given, providing optimization of the cocktail with less drug-drug-interactions. doi:10.1371/journal.pone.0051020.g005

interaction left, while all other interactions could be omitted using different metabolic pathways of other drugs.

**Database**

We created a web-tool for clinicians to analyze diverse drug-drug interactions of over 100 antineoplastic treatment regimens. Figure 5 shows the main features of the website. To visualize treatment regimens, just click on “Chemotherapy” in the navigation. If your specific drug-cocktail is not in the list, click on “Drug-drug interaction” and type in your medication manually. Once a treatment regimen is chosen or manually typed a drug-cocktail, the database provides a variety of information.

To view drug structures or ATC groups, just click on the drug. CYPs involved in the same metabolic pathway are presented in different columns. “S” means substrate, “E” inducer and “I” inhibitor. Clicking on these abbreviations leads to the PubMed references. Colored columns illustrate the multi-use of specific CYP pathways. Based on ATC-codes, drug alternatives using

different metabolic pathways for each drug are presented below, which enables the user to optimize the cocktail regarding its metabolism.

This comprehensive resource is freely available at: <http://bioinformatics.charite.de/chemotherapy> and is also applicable on smartphones and tablet-PCs.

**Supporting Information**

**Table S1 Antineoplastic drugs in polychemotherapy regimens.** Involved CYPs are ordered by substrate “S”, inducer “E” and inhibitor “I”. (DOCX)

**Table S2 Supportive treatment used in chemotherapy.** Involved CYPs are ordered by substrate “S”, inducer “E” and inhibitor “I”. (DOCX)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RP SP. Performed the experiments: MFH SP SCP. Analyzed the data: MD WWR NG.

Contributed reagents/materials/analysis tools: KS. Wrote the paper: RP RP KS.

## References

- Ingelman-Sundberg M (2005) The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicology and applied pharmacology* 207: 52–56.
- Angalakuditi M, Gomes J (2011) Retrospective drug utilization review: impact of pharmacist interventions on physician prescribing. *ClinicoEconomics and outcomes research* : CEOR 3: 105–108.
- Bazargan A, Tam CS, Keating MJ (2012) Predicting survival in chronic lymphocytic leukemia. Expert review of anticancer therapy 12: 393–403.
- Bates S (2010) Progress towards personalized medicine. *Drug discovery today* 15: 115–120.
- Gardiner SJ, Begg EJ (2006) Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice. *Pharmacological reviews* 58: 521–590.
- Davidson ML, Dalhoff K, Schmiegelow K (2008) Pharmacogenetics influence treatment efficacy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of pediatric hematology/oncology* 30: 831–849.
- Bosch TM, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH (2006) Genetic polymorphisms of drug-metabolising enzymes and drug transporters in the chemotherapeutic treatment of cancer. *Clinical pharmacokinetics* 45: 253–285.
- Egbelakin A, Ferguson MJ, MacGill EA, Lehmann AS, Toplez AR, et al. (2011) Increased risk of vincristine neurotoxicity associated with low CYP3A5 expression genotype in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric blood & cancer* 56: 361–367.
- Patterson LH, Murray GI (2002) Tumour cytochrome P450 and drug activation. *Current pharmaceutical design* 8: 1335–1347.
- Mehta PA, Davies SM (2004) Pharmacogenetics of acute lymphoblastic leukemia. *Current opinion in hematology* 11: 434–438.
- Morrow PK, Serna R, Broglio K, Pusztai L, Nikoloff DM, et al. (2011) Effect of CYP2D6 polymorphisms on breast cancer recurrence. *Cancer*.
- Potter GA, Patterson LH, Wanogho E, Perry PJ, Butler PC, et al. (2002) The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *British journal of cancer* 86: 774–778.
- Lund B, Asberg A, Heyman M, Kanerva J, Harila-Saari A, et al. (2011) Risk factors for treatment related mortality in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pediatric blood & cancer* 56: 551–559.
- Gor PP, Su HI, Gray RJ, Gimotty PA, Horn M, et al. (2010) Cyclophosphamide-metabolizing enzyme polymorphisms and survival outcomes after adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: a retrospective cohort study. *Breast cancer research* : BCR 12: R26.
- Engelhardt MB, Mertelsmann R (2008) *Das Blaue Buch*: Springer. 200 p.
- Nelson DR (2006) Cytochrome P450 nomenclature, 2004. *Methods in molecular biology* 320: 1–10.
- Flockhart DA (2007) *Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table*. Indiana University School of Medicine.
- Geer LY, Marchler-Bauer A, Geer RC, Han L, He J, et al. (2010) The NCBI BioSystems database. *Nucleic acids research* 38: D492–496.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, et al. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic acids research* 28: 235–242.
- Berners-Lee T, Hendler J (2001) Publishing on the semantic web. *Nature* 410: 1023–1024.
- Berners-Lee T, Hall W, Hendler J, Shadbolt N, Weitzner DJ (2006) Computer science. *Creating a science of the Web*. Science 313: 769–771.
- Niwa T, Murayama N, Yamazaki H (2011) Stereoselectivity of human cytochrome p450 in metabolic and inhibitory activities. *Current drug metabolism* 12: 549–569.
- Baumhake M, Kasel D, Rao-Schymanski RA, Bocker R, Beckurts KT, et al. (2001) Screening for inhibitory effects of antineoplastic agents on CYP3A4 in human liver microsomes. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 39: 517–528.
- Chang TK, Weber GF, Crespi CL, Waxman DJ (1993) Differential activation of cyclophosphamide and ifosfamide by cytochromes P-450 2B and 3A in human liver microsomes. *Cancer research* 53: 5629–5637.
- Chang TK, Yu L, Maurel P, Waxman DJ (1997) Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines. *Cancer research* 57: 1946–1954.
- Lindley C, Hamilton G, McCune JS, Faucette S, Shord SS, et al. (2002) The effect of cyclophosphamide with and without dexamethasone on cytochrome P450 3A4 and 2B6 in human hepatocytes. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 30: 814–822.
- Roy P, Yu LJ, Crespi CL, Waxman DJ (1999) Development of a substrate-activity based approach to identify the major human liver P-450 catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation based on cDNA-expressed activities and liver microsomal P-450 profiles. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 27: 655–666.
- Colburn DE, Giles FJ, Oladovich D, Smith JA (2004) In vitro evaluation of cytochrome P450-mediated drug interactions between cytarabine, idarubicin, itraconazole and caspofungin. *Hematology* 9: 217–221.
- Araya Z, Tang W, Wikvall K (2003) Hormonal regulation of the human sterol 27-hydroxylase gene CYP27A1. *The Biochemical journal* 372: 529–534.
- Gentile DM, Tomlinson ES, Maggs JL, Park BK, Back DJ (1996) Dexamethasone metabolism by human liver in vitro. Metabolite identification and inhibition of 6-hydroxylation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 277: 105–112.
- Gerbail-Chaloin S, Pascucci JM, Pichard-Garcia L, Daujat M, Waechter F, et al. (2001) Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 29: 242–251.
- Grishanov A, Kaledin VI, Zueva TV, Nekhoroshkova EK, Nikolin VP, et al. (2003) [Activity and induction of CYP2B, CYP2C, and CYP3A in tissues of cyclophosphane-sensitive and resistant neoplasms and the liver of neoplasm-carrying mice]. *Biomeditsinskaiia khimiia* 49: 27–34.
- Hukkanen J, Lassila A, Paivarinta K, Valanne S, Sarpo S, et al. (2000) Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 22: 360–366.
- Kanou M, Usui T, Ueyama H, Sato H, Ohkubo I, et al. (2004) Stimulation of transcriptional expression of human UDP-glucuronosyltransferase 1A1 by dexamethasone. *Molecular biology reports* 31: 151–158.
- Krusekopf S, Roots I, Kleeberg U (2003) Differential drug-induced mRNA expression of human CYP3A4 compared to CYP3A5, CYP3A7 and CYP3A43. *European journal of pharmacology* 466: 7–12.
- Lampen A, Christians U, Guengerich FP, Watkins PB, Kolars JC, et al. (1995) Metabolism of the immunosuppressant tacrolimus in the small intestine: cytochrome P450, drug interactions, and interindividual variability. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 23: 1315–1324.
- Miranda SR, Meyer SA (2007) Cytotoxicity of chloroacetanilide herbicide alachlor in HepG2 cells independent of CYP3A4 and CYP3A7. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 45: 871–877.
- Oertle M, Muller J (1993) Two types of cytochrome P-450(11 beta) in rat adrenals: separate regulation of gene expression. *Molecular and cellular endocrinology* 91: 201–209.
- Savas U, Hsu MH, Johnson EF (2003) Differential regulation of human CYP4A genes by peroxisome proliferators and dexamethasone. *Archives of biochemistry and biophysics* 409: 212–220.
- Trzeciak WH, LeHoux JG, Waterman MR, Simpson ER (1993) Dexamethasone inhibits corticotropin-induced accumulation of CYP11A and CYP17 messenger RNAs in bovine adrenocortical cells. *Molecular endocrinology* 7: 206–213.
- Vrzal R, Stejskalova L, Monostory K, Maurel P, Bachleda P, et al. (2009) Dexamethasone controls aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated CYP1A1 and CYP1A2 expression and activity in primary cultures of human hepatocytes. *Chemico-biological interactions* 179: 288–296.
- Dennison JB, Kulanthaivel P, Barbuch RJ, Renbarger JL, Ehlhardt WJ, et al. (2006) Selective metabolism of vincristine in vitro by CYP3A5. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 34: 1317–1327.
- Villikka K, Kivisto KT, Maenpaa H, Joensuu H, Neuvonen PJ (1999) Cytochrome P450-inducing antiepileptics increase the clearance of vincristine in patients with brain tumors. *Clinical pharmacology and therapeutics* 66: 589–593.
- Zhou-Pan XR, Serec E, Zhou XJ, Placidi M, Maurel P, et al. (1993) Involvement of human liver cytochrome P450 3A in vinblastine metabolism: drug interactions. *Cancer research* 53: 5121–5126.
- Bell EC, Ravis WR, Chan HM, Lin YJ (2007) Lack of pharmacokinetic interaction between St. John's wort and prednisone. *The Annals of pharmacotherapy* 41: 1819–1824.
- Ferron GM, Pyszczynski NA, Jusko WJ (1999) Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions between prednisolone and sirolimus in adrenalec-tomized rats. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics* 27: 1–21.
- Usui T, Saitoh Y, Komada F (2003) Induction of CYP3As in HepG2 cells by several drugs. Association between induction of CYP3A4 and expression of glucocorticoid receptor. *Biological & pharmaceutical bulletin* 26: 510–517.
- Xia XY, Peng RX, Yu JP, Wang H, Wang J (2002) In vitro metabolic characteristics of cytochrome P-450 2A6 in Chinese liver microsomes. *Acta pharmacologica Sinica* 23: 471–476.
- May-Manke A, Kroemer H, Hempel G, Bohnstengel F, Hohenlocher B, et al. (1999) Investigation of the major human hepatic cytochrome P450 involved in 4-hydroxylation and N-dechloroethylation of trofosamide. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 44: 327–334.
- Zhou XJ, Zhou-Pan XR, Gauthier T, Placidi M, Maurel P, et al. (1993) Human liver microsomal cytochrome P450 3A isozymes mediated vindesine biotransformation. *Metabolic drug interactions. Biochemical pharmacology* 45: 853–861.

## **9 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 10 Vollständige Publikationsliste

*The Transformer database: biotransformation of xenobiotics.*

Michael F. Hoffmann\*, **Sarah C. Preissner\***, Janette Nickel, Mathias Dunkel, Robert Preissner, Saskia Preissner – \* geteilte Erstautorenschaft

Zeitschrift: Nucleic Acids Research (2014 Jan)

Impact Factor: 8.808

*Polymorphic Cytochrome P450 Enzymes (CYPs) and Their Role in Personalized Therapy.*

**Sarah C. Preissner\***, Michael F. Hoffmann\*, Robert Preissner, Mathias Dunkel, Andreas Gewiess, Saskia Preissner – \* geteilte Erstautorenschaft

Zeitschrift: PLoS One (12/2013)

Impact Factor: 3.534

*Drug Cocktail Optimization in Chemotherapy of Cancer.*

Saskia Preissner, Mathias Dunkel, Michael F. Hoffmann, **Sarah C. Preissner**, Nikolai Genov, Wen Wei Rong, Robert Preissner, Karlheinz Seeger

Zeitschrift: PLoS One (07/2012)

Impact Factor: 3.730

*SynSysNet: integration of experimental data on synaptic protein-protein interactions with drug-target relations.*

Joachim von Eichborn, Mathias Dunkel, Björn O. Gohlke, **Sarah C. Preissner**, Michael F. Hoffmann, Jakob M. J. Bauer, J. D. Armstrong, Martin H. Schaefer, Miguel A. Andrade-Navarro, Nicolas Le Novere, Michael D. R. Croning, Seth G. N. Grant, Pim van Nierop, August B. Smit, Robert Preissner

Zeitschrift: Nucleic Acids Research (01/2013)

Impact Factor: 8.278

## 11 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Karlheinz Seeger für seine freundliche Betreuung und stets hilfreichen Hinweise und Tipps bedanken.

Insbesondere möchte ich mich bei Michael Hoffmann für die großartige Zusammenarbeit bedanken. Ohne seine Begeisterungsfähigkeit und seine unerschöpfliche Motivation hätte ich die Forschung wohl schnell aufgegeben.

Ich danke, Mathias Dunkel für die gute Einführung in die Bioinformatik und die professionelle Programmierung und Verwaltung der Datenbank *Transformer*. Isabella Wen Wei Rong und Mathias Dunkel für die unermüdliche Anpassung des Textminings. Janette Nickel für die stilvolle Anpassung des Web-Designs und der ausgezeichneten Suchfunktion von *Transformer*. Björn Gohlke danke ich für seine Hilfsbereitschaft bei jedem Projekt und seine regelmäßigen Aufmunterungen.

Dank gilt außerdem den Machern der *GEO* Datenbank und allen teilnehmenden Arbeitsgruppen für die Erhebung und Bereitstellung ihrer Expressionsdatensätze, insbesondere dem Department of Molecular Medicine in San Diego für die Serie GSE3526.

Ich danke Jana Ihlow für ihre fleißige Hilfe mit dem "Blauen Buch" und ihren aufbauenden Optimismus über sechs Jahre Studium hinweg.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie für die liebevolle Unterstützung und die bereichernde Ablenkung.