

## 1. Einleitung

In dem vergangenen Jahrhundert hat die koronare Herzkrankheit (KHK) weltweit zugenommen und überall dort epidemische Ausmaße erlangt, wo Infektionskrankheiten und Mangelernährung als Todesursachen weitestgehend beherrscht werden konnten. Sie ist zusammen mit den atherosklerotischen Erkrankungen an den zerebralen und peripheren Gefäßen zur Haupttodesursache von Erwachsenen geworden. Somit litten z.B. im Jahr 2001 in den USA ca. 62 Millionen Menschen an einer Koronaren Herzerkrankung (National Heart and Lung Institute, May 2002). Davon starben 946.000 Menschen an den Folgen der kardiovaskulären Erkrankung, das entsprach 39% aller Todesfälle (National Heart and Lung Institute Feb. 2003). Die KHK spielt bezüglich der Morbidität und der Mortalität auch in der Bundesrepublik Deutschland eine bedeutende Rolle. Hier leiden ca. eine Million Menschen an der Koronaren Herzerkrankung, und sie ist die häufigste Diagnose unter männlichen Krankenhauspatienten (Statistisches Bundesamt Deutschland). Wie allgemein bekannt ist und durch zahlreiche Studien -wie der Framingham-Studie - schlüssig belegt, gibt es genau definierte Risikofaktoren für die Entstehung der koronaren Herzerkrankung (Kannel WB 1976). Diese Risikofaktoren lassen sich einteilen in beeinflussbare, wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Rauchen und der Body-Mass-Index; weiterhin gibt es die so genannten nicht beeinflussbaren Risikofaktoren wie Alter und Geschlecht. Zu den weiteren Risikofaktoren zählen die sogenannten Risikofaktoren zweiter Ordnung: erhöhtes Lipoprotein(a), die Hyperfibrinogenämie, die Hyperhomocysteinämie, C-reaktives Protein, Antiphospholipid-AK, Bewegungsmangel, und negativer Stress (Typ I-Persönlichkeit mit Aggressivität, Hektik, Ehrgeiz).

Aufgrund der Resultate der MONICA-Studie, in der über einen Zeitraum von 10 Jahren in 21 Ländern die Entwicklung der Risikofaktoren Rauchen, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie und Übergewicht dokumentiert wurde, zeigte sich, dass der Risikofaktor Rauchen wahrscheinlich auch in Zukunft einer der wichtigsten Risikofaktoren der Koronaren Herzerkrankung bleiben wird (Evans A 2001).

Die Pathogenität des Rauchens in Bezug auf die Entstehung der koronaren Herzerkrankung lässt sich hauptsächlich auf die im Rauch enthaltenen Substanzen Kohlenmonoxid, Nikotin und die polyzyklischen Kohlenwasserstoffe zurückführen. Der Abbau dieser Inhaltsstoffe wiederum erfolgt hauptsächlich über das Cytochrom-P450-System der Leber. Das Cytochrom P450 1B1 ist durch Zigarettenrauch induzierbar. Es

wurde eine signifikant höhere Konzentration an mRNA von CYP1A1 und CYP1B1 in Bronchialepithelzellen von Rauchern als in denen von Nichtrauchern und damit eine Induktion dieser Enzyme durch diesen Fremdstoff nachgewiesen (Willey JC 1997). Die Induktion scheint Genotypenabhängig zu sein. Die aromatischen Kohlenwasserstoffe sind von besonderer Bedeutung für die Entstehung durch Tabakrauch induzierter Karzinome, die Rolle in Bezug auf die Artherosklerose ist dagegen erst in letzter Zeit besser verstanden worden (Curfs DM 2005).

Zusammenhänge zwischen Polymorphismen einzelner Cytochrome und ihre Auswirkung auf die Metabolisierung von Nikotin waren bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. CYP2D6 Poor-Metabolizer zeigen zum Beispiel eine geringere Metabolisierungsrate von Nikotin zu Kotinin als sogenannte Extensive-Metabolizer auf (Cholerton S 1994). Neben CYP2D6 scheinen aber andere Cytochrom P450-Enzyme eine bedeutende Rolle zu spielen. Oscarson et al. untersuchten CYP2A6 in seiner Funktion als Nikotin-C-Oxidase; danach führten bestimmte seltene CYP2A6-Allele zu einem inaktiven Enzym; unter Rauchern wurden sie weniger gefunden als unter Nichtrauchern. Die Raucher, die eine CYP 2A6-Defizient aufwiesen, rauchten im Durchschnitt 6 Zigaretten weniger pro Tag (Oscarson M 1998).

Bekannt ist mittlerweile, dass die Suszeptibilität für die Artherosklerose sehr unterschiedlich ist und durch bestimmte Kandidatengene, von denen bisher über 100 beschrieben wurden, mit beeinflusst wird. Die so genannten beeinflussbaren Risikofaktoren können durch bestimmte Genpolymorphismen determiniert werden (Nabel EG 2003). So konnte man bereits bestimmte Mutationen definieren, die das Lipidprofil im Blut oder den systolischen Blutdruck beeinflussen.

## 1.1 Pathogenese der Atherosklerose

Erste atherosklerotische Veränderungen finden sich bereits im ersten Lebensjahrzehnt in Form von Fettstreifen in der Aorta. In den folgenden Lebensjahrzehnten nehmen diese erheblich an Häufigkeit zu und verbreiten sich auf die großen Arterien, die Karotiden und die Koronarien.

Mit klinischer Manifestation der Atherosklerose, insbesondere der KHK, ist dann zu rechnen, wenn mehr als 60 % der Endotheloberfläche mit Fettstreifen bedeckt sind. Von Lokalisation und Ausmaß der Stenose hängt das Ausmaß der Myokardischämie und damit die klinische Bedeutung ab. Die Veränderungen führen zur so genannten Koronarinsuffizienz, d.h. zu einem Missverhältnis zwischen Blutangebot und Blutbedarf des Herzmuskels.

Bei Personen mit einem hohen KHK-Risiko entwickelt sich die besonders hohe Anzahl an Fettstreifen in fibröse Plaques, wiederum zunächst in der Aorta, aber zumeist auch bald in den Koronarien. Die fibrinösen Plaques werden zu komplizierten Läsionen, wenn es zur Fissurierung kommt oder wenn proliferative subendotheliale Veränderungen zur Unterbrechung der Endothelzellenauskleidung führen. In beiden Fällen besteht die Gefahr der akuten Thrombosierung mit deutlicher Zunahme der Lumeneinengung bis hin zum akuten Verschluss. Diese Thrombosierung kann in jedem Stadium eintreffen. Bei der Entstehung der atherosklerotischen Veränderungen sind vier Zelltypen beteiligt, die sich gegenseitig beeinflussen: die Endothelzelle, aus der gefäßregulative Faktoren wie Prostacyclin, EDRF(NO) und Endothelin hervorgehen, die glatte Muskelzelle, der Monozyt/Makrophage und der Thrombozyt. Lipidinfiltration in die Gefäßintima, Phagozytose der Lipide und der dadurch bedingten Stimulation der glatten Muskelzelle und dem daraus folgenden Einwachsen aus der Media in die Intima und ihre Umwandlung in Fibroblasten sind der eine Weg; diese Stimulation der Muskelzellen kann aber auch durch eine chemisch, mechanisch, immunologisch oder sonst wie geartete Verletzung in Gang gebracht werden.

Inzwischen ist die im Vordergrund stehende Idee, dass die Atherosklerose eine Entzündungsreaktion auf Verletzungen der Gefäße ist (Hansson GK 1999).

## 1.2 Bedeutung des Tabakrauchs für die Entstehung der Atherosklerose

Tabakrauch ist ein Gemisch von Gasen und Aerosolen. Bisher sind darin mehrere tausend Substanzen aufgefunden und chemisch identifiziert worden. Die polyzyklischen Kohlenwasserstoffe haben einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung der Atherosklerose. Andere hierbei wichtige Stoffe sind das Nikotin, das Kohlenmonoxid und die Stickstoffoxide  $\text{NO}_2$  und  $\text{NO}$ .

Die polyzyklischen Kohlenwasserstoffe wie Benz(a)pyren, Benz(a)anthrazen, die Nitrosamine N-Dimethylnitrosamin, N-Diethylnitrosamin, N-Ethyl-N-methyl-nitrosamin und N-Nitrosopyrrolidin sind verdächtig oder sicher kanzerogen. Desweiteren wären zu erwähnen: Acrolein, Formaldehyd, N-Nitrosornikotin, Schwermetalle wie Cadmium, Arsen, Chrom, Vanadium, außerdem Nickel, Hydrazin, Anilin, Vinylchlorid. Unterschiede bezüglich der Konzentration gibt es im Haupt- und Nebenstromrauch.

Wie bereits erwähnt, ist schon länger bekannt, dass die Exposition gegenüber den polyzyklischen Kohlenwasserstoffen (PAH) das Risiko einer Atherosklerose erhöht (Van Schooten FJ 1998). Sie führt zu einer Interaktion mit DNA. Bekannt war, dass PAH-DNA in höherem Ausmaße in der Aorta vorkommt und das Ausmaß der PAH-DNA mit dem Schweregrad einer Koronaren Herzerkrankung korreliert. Die ursprüngliche Vorstellung war, dass eine Interaktion zwischen den polyzyklischen Kohlenwasserstoffen und der DNA kanzerogen sein kann und aufgrund dieser PAH-DNA und ihrer Bindung an die Gefäßwände es auch zu Proliferationen von Gefäßzellen kommen kann wie bei der Kanzerogenese (Ross JS 2001). Neuere Untersuchungen zeigen, dass dieser Mechanismus allein nicht verantwortlich ist, sondern dass auch eine Entzündungsreaktion eine wesentliche Rolle spielt, u.a. vermittelt durch das TGF $\beta$  (Transforming growth factor beta), da bei einem Vergleich von Benz[a]pyren, das DNA bindet und Benz[e]pyren, welches sich nicht an DNA bindet, in gleichem Maße eine signifikante Progression atheromatöser Plaques verursachen (Curfs DM 2005). Man stellte fest, dass sie eine Einwanderung von Entzündungszellen wie T-Lymphozyten in Plaques aber keinen Anstieg von Entzündungszellen im Blut bewirkten. Es handelt sich also hier um eine lokale Entzündungsreaktion durch polyzyklische Kohlenwasserstoffe.

Ein anderer Mechanismus ist zum Beispiel der über den Aromatischen Kohlenwasserstoff (Ah)-Rezeptor. Polyzyklische Kohlenwasserstoffe binden an den cytosolischen Ah-Rezeptor, der unter anderem die Genexpression von CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 reguliert. Andererseits wird durch Bindung von z.B.

Methylcholanthren die Genexpression Cholesterin-verstoffwechselnder Enzyme gehemmt (Iwano S 2005). Auf diesem Weg entsteht somit ein Anstieg des Cholesterins, eines der Hauptrisikofaktoren für die KHK. Da die polyzyklischen Kohlenwasserstoffe zu den Substraten der Cytochrome wie CYP1A1 (Rothman N 1995) und CYP 1B1 (Kondraganti SR 2003) gehören und von ihnen zu toxischen Metaboliten verstoffwechselt werden, könnten unterschiedliche Genvarianten von CYP 1B1 eine Verstoffwechslung der PAH und somit Einfluss auf die Entstehung der Atherosklerose und der Koronaren Herzerkrankung haben.

Als weiterer wichtiger Bestandteil des Zigarettenrauches ist das Nicotin (S-3-(1-Methylpyrilodin-2-y1)pyridin) zu erwähnen. Aus inhaliertem Zigarettenrauch wird praktisch das gesamte Nicotin überwiegend über die Alveolarwände rasch aufgenommen. Das bedeutet, dass die Leber umgangen, das Herz aber unmittelbar erreicht wird. Dieses geschieht stoßweise mit jedem einzelnen Zug, bei dem intermittierend eine relativ hohe Konzentration von Nicotin in Herz und Gehirn und damit die Rezeptoren des vegetativen Nervensystems erreicht werden. Im Blut ist es an die roten Blutkörperchen gebunden. Da es in saurem Milieu Salze bildet, ist seine Diffusion durch Membranen stark pH-abhängig. Es wird also schneller aus alkalischem als aus saurem Rauch resorbiert. Als freies Alkaloid kann es rasch die Blut-Hirn-Schranke passieren.

Der Abbau des Nikotins erfolgt hauptsächlich über das Cytochrom-P450-System der Leber. Es ist bekannt, dass Nikotin und seine Derivate- die Nitrosamine-, Benz(a)anthrazen und das im Kondensat auftretende 1,2- Benz(a)pyren vor allem durch die mikrosomale Enzymfamilie 1 der Cytochrome P450 verstoffwechselt werden. Hierbei kann die Metabolisierung durch CYP1A1 und 1A2 durch Nikotin und allgemein Zigarettenrauch selbst induziert werden (Sutter TR 1994).

Einer der Hauptmetabolite ist Cotinin, welches dann einer weiteren Oxidation unterzogen wird, bei dem  $\gamma$ -(3-Pyridyl)- $\gamma$ -oxo-N-methylbutyramid entsteht. Über einen anderen Metabolisierungsweg entstehen 3-Hydroxynicotin und weiter  $\gamma$ -(3-pyridyl)-methylaminobuttersäure (anderer Hauptmetabolit). Durch die Metabolisierung von Nikotin können auch Karzinogene wie zum Beispiel N'-Nitrosonornicotin entstehen. Für die Verstoffwechslung zu Cotinin und Hydroxycotinin ist CYP2A6 hauptverantwortlich (Oscarson M 1998).

Durch die durch Nicotin gesteigerte Adrenalinsekretion kommt es zu einem erhöhten Gehalt an freien Fettsäuren und Cholesterin im Blut, und einer Senkung des HDL-Spiegels. Es kommt zu einer vermehrten Bildung von atheromatösen Veränderungen der Gefäßintima bzw. Plaques. Das Nicotin wirkt vor allen Dingen durch seine hämodynamischen Effekte wie Steigerung der Herzfrequenz, des Blutdrucks sowie durch eine Hyperkoagulabilität und spielt eine gesicherte Rolle bei akuten kardiovaskulären Geschehen (Benowitz NL 1997). Wie bereits erwähnt, sind Cytochrome wie CYP 2A6 bei der Verstoffwechslung von Nicotin von Bedeutung. Relativ neu beschriebene Risikofaktoren wie das C-reaktive Protein, Fibrinogen und Homocystein steigen ebenfalls durch Zigarettenrauch im Blut an (Bazzano LA 2003).

### **1.3 Funktionelle Bedeutung der Cytochrom-P450-Enzyme**

Die Cytochrom-P450-Enzyme gehören zur Gruppe der Monooxygenasen, einer Enzymgruppe, die entscheidend an der Metabolisierung von Arzneimitteln beteiligt ist (Drug Metabolizing Enzymes, DME). Eine Vielzahl von ihnen wie auch regulatorische intrazelluläre Rezeptoren wie z.B. der Estrogen-Rezeptor, die Peroxisomenproliferator-aktivierenden Rezeptoren (PPAR) oder aromatische Kohlenwasserstoff-Rezeptoren existierten bereits vor der Aufteilung in Prokaryonten und Eukaryonten. Veränderungen der DME-Gene fanden im Rahmen der Interaktion mit der Pflanzenwelt statt. Natürliche Fremdstoffe (Xenobiotica) wie auch nicht-natürliche Fremdstoffe (z.B. Pharmaka) gehören folglich ebenso zu ihren Substraten. Weitere Untersuchungen ergaben eine Rolle der DMEs bei Wachstum und Zelldifferenzierung (Nebert DW 1990). In jeder Eukaryontenzelle sind wenigstens einige DMEs vorhanden.

Cytochrom-P-450-Enzyme sind im endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien lokalisiert und dort an die lipoidhaltigen Membranen gebunden. Sie bilden dort Elektronen-Transportketten. Im mitochondrialen System ist zusätzlich noch Adrenodoxin (ein Eisen-Sulfat-Protein) beteiligt. Cytochrom bezeichnet die prosthetische Häm-Gruppe, die diese Enzyme tragen. Dieses Häm ist vom Typ b, sein zentrales Eisenatom kann reversibel oxidiert oder reduziert werden. Mit der gleichen Affinität, mit der sie Sauerstoff binden, können die Cytochrome auch einen Komplex mit Kohlenmonoxid bilden, der mit seinem charakteristischen Absorptionsmaximum bei 450 nm den Cytochromen ihren Namen gab (P steht für Pigment).

Ungefähr 70% des Cytochrom-P-450-Proteins besteht aus  $\alpha$ -Helices, ca. 22% aus  $\beta$ -Helices; innerhalb der Superfamilie sind nur drei Reste absolut konserviert, nämlich das Cystein der Häm-bindenden Region (Cys470), das der fünfte koordinierende Ligand des Häm-Eisens ist, des weiteren eine Glutaminsäure (Glu387) und ein Arginin (Arg390) in der K-Helix der  $\alpha$ -Helix-Domäne, die nur eine Windung auseinander liegen und eine Salzverbindung bilden.

Hochkonservierte Strukturen, die alle Cytochrome miteinander teilen, sind  $4\alpha$ - Helix-Bündel (Helices D, I und L u. antiparallele Helix E), Helices J und K,  $\beta$ -Faltblätter 1 und 2, die Häm-bindende Region und drei Schlängelungsregionen am Carboxyende der K'-Helix. Die meisten dieser Regionen liegen in der C-terminalen Hälfte des Moleküls, die vermutlich maßgeblich an der Häm-Bindung und an der Molekülfaltung (Tertiärstruktur) beteiligt sind. Die Cytochrom-P450-Monooxygenasen haben am N-Terminus eine nicht abspaltbare, hydrophobe Sequenz, mit der sie in der jeweiligen Membran verankert sind; in diesen Membranen stehen sie in Kontakt mit den NADPH-Reduktasen; der Rest ist zur cytoplasmatischen Seite hin ausgerichtet.

Vermutlich sind die Gegenden mit den stärksten strukturellen Unterschieden an der Substraterkennung und -bindung und auch an der Redoxpartnerbindung beteiligt. Die Unterschiede bestehen in der Länge und Position der  $\alpha$ -Helices, der  $\beta$ -Faltblätter und der Schleifen. Zu diesen Regionen gehört zum Beispiel die F-G-Schleife, die sozusagen eine Türsteherfunktion am Substrattunneleingang innehat und damit die Substraterkennung betreibt. Diesen „Tunnel“ muss das Substrat zunächst passieren, um an das aktive Zentrum des Enzyms zu gelangen. Der Tunnel scheint bei den einzelnen Cytochromen je nach Substratgröße unterschiedlich lang zu sein. Erwiesen ist auch, dass sich bei Mutationen, die am aktiven Zentrum des Enzyms zu einem Aminosäureaustausch und damit zu einer veränderten Sekundär - und Tertiärstruktur führen, Substrataffinität und damit Substratumsatz des Enzyms ändern.

Die Interaktionen zwischen den einzelnen Cytochrom P 450 und ihren jeweiligen Redoxpartnern lässt sich auch anhand der unterschiedlichen elektrischen Ladungsverteilungen erklären. Diese elektrostatischen Interaktionen bestimmen die Ausrichtung des Substrates.

Kennzeichnend ist somit eine spezifische Cytochrom- P450-Proteinfaltung. Bei der Funktionsausübung des Enzyms spielen sowohl die räumliche Struktur als auch die

Reste und damit die Ladungen bei der Substraterkennung und -affinität eine Rolle bei der Substratumsatzrate (Graham-Lorence S 1996).

Die durch die Cytochrom-P450-Enzyme katalysierten Reaktionen kann man in verschiedene Gruppen einteilen. Dazu gehören die aliphatische Hydroxylierung, die Epoxidierung, die aromatische Hydroxylierung, die N-Oxidation, die S-Oxidation, die N- und O-Desalkylierungen, die Desaminierung, die Entschwefelung und die oxidative Dehalogenierung.

Die Cytochrome P450 oxygenieren das Substrat. Damit vermindern sie die Lipidlöslichkeit dieses Substrates und verbessern damit seine Ausscheidbarkeit. Gleichzeitig findet eine Reduktion von Sauerstoff statt. Aufgrund der doppelten Funktion - Oxidation des Substrats und Reduktion von Sauerstoff - werden sie als mischfunktionelle Oxygenasen bezeichnet.

Die Oxidation durch die Cytochrom-P450-Monooxygenasen nimmt folgenden Verlauf: zunächst bindet ein Substrat an das Cytochrom P450. Daraufhin wird durch Elektronenübertragung durch das Flavienzym das  $Fe^{3+}$  im Häm zu  $Fe^{2+}$  reduziert. Nach der Bindung von Sauerstoff folgt eine weitere Reduktion durch Elektronenübertragung. Dadurch geht der Sauerstoff in ein Sauerstoff-Dianion  $O_2^{2-}$  über. Dieses kann jetzt zwei H-Ionen aufnehmen und wird dadurch zu Wasser und einem Häm-gebundenen Oxen-Radikal gespalten. Dieses wiederum löst eine R-H-Bindung des Substrates und bildet eine phenolische OH-Gruppe. Damit ist das Substrat hydroxiliert und dissoziiert ab, so dass der Reaktionszyklus wieder von vorn beginnen kann.

Bei der Oxidation durch Monooxygenasen wirken mehrere Komponenten zusammen. Mitbeteiligt sind außer den Cytochromen die Coenzyme NADPH, FMN/FAD und die Phospholipide, vor allem Phosphatidylcholin. NADPH setzt sich zusammen aus Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, Phosphat und Wasserstoff. Es transportiert Hydridionen ( $H$  und  $2e^-$ ); die Flavinenzyme FMN und FAD konkurrieren mit den Cytochromen P450 vor allem um die Oxidation von tertiären Aminen. Sie bestehen aus der redoxaktiven Gruppe Flavin (Isoalloxazin), ein dreikerniges Ringsystem, das bei der Reduktion maximal zwei Elektronen und zwei Protonen aufnehmen kann. FMN trägt am Flavin den phosphorylierten Zuckeranteil Ribitol; FAD besteht aus der Verknüpfung von FMN mit AMP. Funktionell sind beide Coenzyme vergleichbar (Forth W 1996).

Die Affinität zu NADPH in der Membran kann einen weiteren Einfluss auf die Umsatzrate haben.

Die Substratspezifität der Monooxygenasen ist unterschiedlich, überlappt sich innerhalb der einzelnen Familien aber zum Teil auch deutlich. Meist haben Enzymsysteme, die mit Pharmaka reagieren eine geringere Substratspezifität. .

Mittlerweile sind insgesamt über 450 verschiedene P450-Cytochrome bei Pro -und Eukaryonten , Pflanzen, Tieren , endoplasmatischen Reticulae und Mitochondrien bekannt, unter den menschlichen Cytochromen P 450 sind bis jetzt 36 Familien und 200 Gene bekannt.

Es sind bisher 14 Cytochrom-Familien unter den Säugetieren bekannt, unter denen 5 multiple Subfamilien haben.

CYP großgeschrieben bedeutet humanes Cytochrom P450, die erste Zahl beschreibt die Familie; Gene werden der gleichen Familie zugeordnet, wenn die Aminosäurenidentität mehr als 40% beträgt. Der Buchstabe bezeichnet die Subfamilie; eine Zuordnung zur gleichen Subfamilie erfolgt, wenn die Aminosäurenidentität mehr als 55% beträgt. Die zweite Zahl bestimmt die Bezeichnung des bestimmten Gens innerhalb der Subfamilie; sie liegen anscheinend nicht-segregierend auf einem Chromosom.

Man kann die Cytochrome aber z.B. auch nach ihren Induktoren entsprechend in Gruppen einteilen (ungenauere Einteilung); CYP1A1,1A2 und 1B1 werden zum Beispiel durch Methylcholantren induziert, das ein schwacher AhRezeptor-Agonist ist, CYP 2B1 und 2B2 jedoch durch Phenobarbital. Der Ah-Rezeptor ist ein Mitglied der basic-helix-loop-helix-PAS -Familie der Transkriptionsfaktoren. AhR bildet mit ARNT ein Heterodimer, dieses bindet an DRE-Erkennungssequenzen (DRE:dioxin-responsive-elements); die Folge ist eine Aktivierung der Gentransskription.

Der Ligand –wie zum Beispiel TCDD- bindet an den Ah-Rezeptor, dieser Ah-Ligand-Komplex wandert in den Zellkern, und stimuliert über die Aktivierung eines Promoter-Gens die Synthese eines Enzyms.

Zu den über den Ah-Rezeptor kontrollierten Enzymen gehören außer einer Reihe von Cytochrom-P450-Enzymen eine GSH-Transferase, eine Aldehyddehydrogenase, eine NAD-Menadion-Oxidoreduktase und eine UDP-Glucuronyltransferase.

Die Fremdstoffmetabolisierenden Enzyme der Leber werden in die Gruppen I-IV eingeteilt. Extrahepatische DMEs beteiligen sich vorzugsweise an der Steroidbiosynthese und unterliegen anderen Klassifizierungen (Forth W 1996). Extrahepatische Cytochrome kommen häufig nur in bestimmten Zelltypen vor, so dass sie im Vergleich zu den hepatischen Cytochromen nur einen kleinen Anteil ausmachen.

## 1.4 Cytochrom P450 1B1 (CYP1B1)

Bei dem Cytochrom P450 1B1 handelt es sich um das bisher einzig bekannte Gen der CYP1B-Familie. Cytochrom P 450 1B1 gehört zur gleichen Familie wie CYP 1A1 und CYP 1A2.

CYP1B1 wurde 1991 zum ersten Mal beschrieben (Sutter TR 1991), 1994 erfolgte ebenfalls von Sutter et al. die vollständige cDNA-Sequenz-Beschreibung (Sutter TR 1994). 1996 gelang dann die Isolierung und genauere Charakterisierung (Tang YM 1996). Bei der Untersuchung des durch 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD oder Dioxin) induzierbaren CYP1A1 in Keratinozyten entdeckte man eine neue humane mRNA, deren Konzentration in einer Keratinozytenzelllinie nach TCDD-Behandlung auf das 50fache anstieg; dies ist gleichbedeutend mit einem starken Anstieg der Gentranskriptionsrate.

Bei der entsprechenden cDNA handelt es sich um eine 5,1 Kilobasenpaare enthaltende Sequenz (5102bp); nicht-translatierte Regionen sind -346 bis -1 und +1630 bis +4756; der einzige, lange open reading frame reicht von Nucleotid +1 bis +1629, der für ein aus 543 Aminosäuren bestehendes Polypeptid codiert. CYP1B1 weist mit CYP1A1 eine Aminosäurehomologie von 41%, bzw. mit CYP1A2 von 40% auf. Die Aminosäuresequenz ist zu 34% mit CYP2B1, zu 36% mit CYP2D6 und zu 29% mit CYP17 identisch.

CYP1B1 liegt auf Chromosom 2p21-22, besteht aus 12 kb und enthält 3 Exons und 2 Introns. Die drei Exons sind jeweils 371, 1044 und 3707 Basenpaare lang, die zwei Introns sind 390 und 3032 Basenpaare lang.

Die gesamte Codierungsregion liegt in Exon 2 und 3; sie beginnt am 5'-Ende des 2. Exons, endet innerhalb des 3. Exons und besteht aus 1629 Basenpaaren. Wichtige Unterscheidungsmerkmale zu den anderen CYP-Superfamilien sind zum einen, dass der open reading frame innerhalb des 2. Exons beginnt, dass es nur eine einzige transcription initiation site gibt und eine TATA-box in der die Promoter-Region fehlt. Wichtige Enhancer der CYP1B1-Expression sind 9 DRE- (dioxin-responsive-elements mit dem Motiv 5'-GCGTG-3'), die in Interaktion mit dem Ah-Rezeptor/ARNT (AhR nuclear transporter) treten und somit eine Induktion durch TCDD ermöglichen. Diese Erkennungssequenzen liegen in der Startregion und zwar in der Region -260- -2320; 3 davon zwischen -1022 - -835, 6 auf dem Gegenstrang ; weitere 4 wurden im 1. Intron, 3 in der Kodierungsregion des 2. Exons und 5 im 2. Intron gefunden. Die Introns

enthalten typische Lasso-Strukturen. Es ist nachgewiesen, dass letztere Sequenzen für die spezifische Bindung des AhR/ARNT-Dimer benötigt werden. Vermutlich interagiert zumindest eine der drei DREs zwischen -835 und -1022 durch synergistischen Effekt einiger Transkriptionsfaktoren wie Sp1. Es ist nachgewiesen, dass bei CYP1A1 das Vorhandensein von Sp1-bindenden Regionen (GGGTGG-Motive) die Reaktion auf TCDD signifikant erhöht.

Bezüglich der Protein-Struktur enthält CYP1B1, wie alle Cytochrome P450 den Cys-470-Rest (axialer Hämligand) – an diesen angrenzend Phe-463 bis Gly-472. Diese entsprechen wiederum dem PROSITE-Erkennungsmotiv, der Abschnitt, der den Cystein Häm-Eisen-Liganden-Abschnitt aller Cytochrome P 450s charakterisiert.

Bisher konnten CYP1B1, bzw. z.T. geringe Konzentrationen von CYP1B1-mRNA in folgenden Organen nachgewiesen werden: Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskulatur, Niere, Pankreas, Milz, Thymus, Prostata, Hoden, Ovarien, Dünn- und Dickdarm, Leukozyten, Monozyten und Makrophagen, in verschiedenen Geweben des Auges (Trabekelwerk, vorderer Uvealtrakt, Ziliarkörper, Iris, nichtpigmentiertes ziliäres Epithel); vor allem in Nieren und Augen ließen sich höhere Konzentrationen (Expression von mRNA in entsprechenden Gewebe durch Northern Blotting) finden (Sutter TR 1994).

Bisher sind über 300 Arzneimittel und Umweltstoffe als Induktoren der CYP1-Enzyme bekannt, von denen TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) der weitaus wirksamste ist. Zu den Induktoren gehören unter anderem auch die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, die zum Beispiel auch im Zigarettenrauch vorkommen. Die meisten Induktoren haben ihr eigenes Profil, häufig unterteilt man sie aber in zwei Typen: den Barbiturat-Typ und den Methylcholanthren-Typ. Der Mechanismus des letzteren ist am besten untersucht und entspricht dem oben beschriebenen. Allerdings kann die durch Cytochrome bedingte Arzneimittelmetabolisierung durch Konkurrenz an den Bindungsstellen durch bestimmte Fremdstoffe wie Ethanol oder halogenierte Kohlenwasserstoffe gehemmt werden.

Die meisten Untersuchungen über die physiologische Rolle des CYP1B1 fanden bisher im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen statt.

Ausgangspunkt dafür war die Feststellung, dass das Cytochrom P 4501B1 über den AhR reguliert wird, und damit auch eine bedeutende Rolle bei der Regulierung von Wachstum und Differenzierung spielen könnte (Nebert DW 1997). Zum Beispiel werden

Wachstumseffektoren z.T. durch Cytochrom P 450-Reaktionen synthetisiert, z. T. auch von ihnen und anderen DMEs verstoffwechselt. Laut Nebert sind CYP1B1 und andere Fremdstoffverstoffwechselnde Enzyme daran beteiligt, den steady state von Liganden zu regulieren, die Einfluss auf Wachstum und Differenzierung haben. Mutationen an ihnen führen entweder zu abnorm hohen Konzentrationen dieser Liganden oder zu einer verlängerten Exposition der sich entwickelnden Gewebe zu den genannten Effektoren. Diese beiden Effekte könnten zu Aberrationen in den entsprechenden Geweben führen.

Diese Mutationen führen zu entweder ungewöhnlich hohen Konzentrationen der Wachstumseffektoren oder verlängertem Kontakt dieser Effektoren zum entsprechenden Gewebe.

CYP1B1 ist ein fester Bestandteil von endokrinbeeinflusstem Gewebe wie Mamma, Uterus, Prostata und könnte an der Produktion von Prokarzinogenen beteiligt sein. Die Präsenz von CYP1B1 in besonders häufig von Karzinomen betroffenen Geweben ließ Vermutungen über eine Beteiligung an der Kanzerogenese von CYP1B1 aufkommen.

Untersuchungen darüber gibt es bezüglich Lungen- und Respirationstrakttumoren, Blasen-, Mamma-, Colon-, Prostata-Tumoren (bei Karzinomen ist die Expression evtl. AhR - unabhängig); weiter ist bekannt, dass CYP1B1 ein wichtiges Enzym für die Aktivierung von Prokarzinogenen wie Arylarene, Nitroarene und Arylamine, DNA-schädigenden Metaboliten ist.

Da CYP1B1 17- $\beta$ -Estradiol zu 4- und 2-Hydroxyestradiol und 16-  $\alpha$ -Hydroxyestradiol metabolisiert, wurde es im Zusammenhang mit dem Östrogen - induzierten Mamma-Ca. untersucht. Die E2-Konzentration und die seiner Metabolite, v.a. 4-OH, bestimmen das Risiko einer Frau an Brustkrebs zu erkranken.

Anhand dieser Untersuchungen wurde die funktionelle Bedeutung des CYP1B1 erkannt.

Insgesamt ließ sich zu Beginn dieser Arbeit feststellen, dass CYP1B1 in die Metabolisierung des Zigarettenrauches involviert ist, und letzterer ein erwiesenermaßen bedeutsamer Risikofaktor bei der Entstehung der KHK.

Bereits bei anderen humanen Cytochromen wurde die Rolle der Polymorphismen in Bezug auf die Entstehung maligner Erkrankungen untersucht, so auch die des C/G-Polymorphismus an Codon 432 von CYP1B1. Jedoch erfolgte noch keine Untersuchung dieser Mutation bezüglich einer Mitbeteiligung an der Entstehung der koronaren

Herzerkrankung. In dieser Arbeit wird die Auswirkung des Polymorphismus Leu432Val im Codon 432, Nucleotid 1640 der cDNA, bzw. an Nucleotid 8131 des CYP1B1-Gens, im folgenden CYP1B1\*3 genannt, auf die Entstehung der koronaren Herzkrankheit untersucht.

### **1.5 Funktionelle Bedeutung des Leu432Val-Polymorphismus des CYP1B1**

Erste Beschreibungen dieses Polymorphismus' erfolgten in Zusammenhang mit der Untersuchung des Primären Congenitalen Glaukoms (PCG). In einer Arbeit von (Sarfarazi M 1995) erfolgte die Zuordnung von PCG zu der Chromosomenlokalisierung 2p21 (CYP1B1); erste Mutationen im Bereich des CYP1B1-Gens fand man 1997 im Rahmen einer Studie, in der 5 Familien, die vom primären kongenitalen Glaukom (Buphthalmos) betroffen waren, untersucht wurden; bereits bekannt war die autosomal-rezessive Vererbung. Mittels dieser Studie fand man drei verschiedene Varianten, eine davon war CYP1B1\*3 (Stoilov I 1997), die in dieser Arbeit das erste Mal beschrieben wurde. Weitere 16 Mutationen, 3 davon bereits bekannt, fanden sich bei 22 PCG-Familien aus der Türkei, USA, UK, Kanada. Die in dieser Arbeit beschriebenen Mutationen kamen in keinem der 200 untersuchten Chromosomen von gesunden Individuen vor (Stoilov I 1998). (Bejjani BA 1998) untersuchten 1998 25 saudi-arabische Familien, bei denen ebenfalls 3 der 16 Mutationen gefunden wurden.

Durch diese Studien wurden erstmalig ein Zusammenhang zwischen Mutationen an CYP1B1 und vermutlich dadurch bedingten Struktur- und Funktions-/Aktivitätsveränderungen des Enzymkorrelats dadurch verursachte Erkrankungen beschrieben. Gleichzeitig wurde eine Verbindung zwischen einer Mutation bei einem Mitglied der Cytochrom P450-Superfamilie und einem primär entwicklungsbedingten Defekt erkannt.

Jedoch lässt sich für diese genannten Arbeiten zusammenfassend sagen, dass CYP1B1\*3 nicht in direktem Zusammenhang mit der Entstehung des PCG gebracht werden konnte.

Die in dieser Arbeit untersuchte Substitution der Base Cytosin durch die Base Guanin an Nukleotidposition 1640 der cDNA des CYP P450 1B1 führt zu einem Aminosäureaustausch von Leucin zu Valin im Codon 432. Beide Aminosäuren - Leucin und Valin - sind aliphatisch und hydrophob, das heißt ihre Seitenketten sind ausgeprägt unpolar und haben sehr ähnliche aliphatische Seitengruppen. Leucin besitzt

lediglich eine CH<sub>2</sub>-Kette mehr und eine Polarität von 2,3 (Valin 2,0). Dieser Aminosäuren-Austausch findet in einer Region statt, die zu den wenig konservierten Regionen des Gens gehört. Shimada et al. wiesen 1999 nach, dass die verschiedenen Allelvarianten des CYP1B1 und im Besonderen CYP1B1\*3 unterschiedliche katalytische Aktivitäten gegenüber

4-Hydroxyestradiol bei der Umwandlung zu 2-Hydroxyestradiol aufweisen. Die Metabolisierungsrate lag im Fall der Val432-Variante höher als die der Leu432-Variante (Shimada T 1999). Mit dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass der hier untersuchte Polymorphismus direkt in Zusammenhang mit Funktionsveränderungen des Enzyms gebracht werden kann. Shimada und Mitarbeiter beschreiben für den Arg48, Ser119, Leu432 und Asn453-Genotyp eine leicht erhöhte Katalyserate für polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe wie z.B. (+)- und (-)-Benzo[a]pyrene-7,8diole oder 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene-3,4-diole, um nur einige zu nennen. Zu Beginn des experimentellen Teils der vorliegenden Arbeit, stand CYP1B1\*3 im Vordergrund.

Tab.1 gibt einen Gesamtüberblick über die bisher bekannten Genvarianten an CYP1B1. Zum Zeitpunkt des Beginns der experimentellen Durchführung dieser Arbeit waren erst ein Teil dieser Polymorphismen beschrieben. Ein Zusammenhang zu einer Erkrankung, nämlich dem primären kongenitalen Glaukom (Buphthalmos) war zu diesem Zeitpunkt für drei Polymorphismen beschrieben: *CYP1B1\*15*, *CYP1B1\*16* und *CYP1B1\*17*. Was die anderen der von Stoilov I 1998 beschriebenen Genvarianten betrifft, so liegen sie alle in der hochkonservierten Region und könnten Einfluss auf die Häm-Bindungs-Region und andere Regionen des Enzyms, die für korrekte Fältelung und die Häm-Bindungskapazität verantwortlich sind, haben. Die Genvarianten *CYP1B1\*2*, *CYP1B1\*3* und *CYP1B1\*4* liegen in einer weniger konservierten Region außerhalb der Kernstruktur.

Genauere Aussagen bezüglich 6 SNPs (single-nucleotide-polymorphisms) beschrieb (McLellan RA 2000). Fünf von ihnen liegen in der Kodierungsregion, 4 davon führen zu Aminosäureaustauschen: R48G, A119S, L432V und N453S. (Aklillu E 2002) untersuchten 2002 sechs SNPs, von denen *CYP1B1\*2*, \*3 und \*4 (s. Tabelle) bereits beschrieben waren. Der 4360C-/G-Polymorphismus in Exon 3, mit dem Resultat Ala443Gly, wurde hier erstmalig gefunden. Aufgrund bestimmter Genvarianten, die in Kombination auftraten, benannten sie 3 neue Genotypen, nämlich *CYP1B1\*5*, \*6 und \*7. Für die letzteren beiden konnte eine erhöhte K<sub>m</sub> und ein gesenkter V<sub>max</sub> bezüglich der 2- und 4-Hydroxylierung von 17β- Estradiol gemessen werden.

Nachgewiesen ist, dass eine veränderte Struktur des aktiven Zentrums des Enzyms auftritt, wenn folgende Substitutionen gemeinsam auftreten: Ala48Gly, Ala119Ser und Leu432Val. In Deutschland wurde CYP1B1\*3 erstmals in einer Arbeit von *E. Fritsche et al.* 1999, die die Verteilung der Genotypen bei Gesunden und Patienten mit kolorektalem Karzinom untersuchten, beschrieben. Hier trat die homozygote G-Mutante im Zusammenhang mit dem Colon-Karzinom gehäuft auf.

Die folgende Nomenklatur ist die heute allgemein gültige.

**Tab 1: CYP1B1-Allel-Nomenklatur**

CYP1B1* <i>n</i>	CYP1B1. <i>n</i>	Mutation	Wild-type	Effect
CYP1B1*1	CYP1B1.1	None	Wild-type	
CYP1B1*2	CYP1B1.2	142C>G; 355G>T		R48G; A119S
CYP1B1*3	CYP1B1.3	4326C>G		L432V
CYP1B1*4	CYP1B1.4	4390A>G		N453S
CYP1B1*5	CYP1B1.5	142C>G; 4326C>G		R48G; L432V
CYP1B1*6	CYP1B1.6	142C>G; 355G>T; 4326C>G		R48G; A119S; L432V
CYP1B1*7	CYP1B1.7	142C>G; 355G>T; 4326C>G; 4360C>G		R48G; A119S; L432V; A443G
CYP1B1*11	CYP1B1.11	171G>C	<i>a</i>	W57C
CYP1B1*12	CYP1B1.12	182G>A	<i>b</i>	G61E
CYP1B1*13		501insT	<i>c</i>	frameshift
CYP1B1*14		841G>T	<i>d</i>	E281X
CYP1B1*15		863insC	<i>e</i>	frameshift
CYP1B1*16		deletion	<i>f</i>	splicing error
CYP1B1*17		4096del13	<i>g</i>	frameshift
CYP1B1*18	CYP1B1.18	4125G>T	<i>h</i>	G365W
CYP1B1*19	CYP1B1.19	4168C>T	<i>i</i>	P379L
CYP1B1*20	CYP1B1.20	4191G>A	<i>j</i>	E387K
CYP1B1*21	CYP1B1.21	4201G>A	<i>k</i>	R390H
CYP1B1*22		4232dup10	<i>l</i>	frameshift
CYP1B1*23	CYP1B1.23	4342C>T	<i>m</i>	P437L
CYP1B1*24		G4377del	<i>n</i>	frameshift
CYP1B1*25	CYP1B1.25	4437C>T	<i>o</i>	R469W
CYP1B1*26		4435dup27	<i>p</i>	frameshift

## 1.6 Ziele der Studie

Es sollte untersucht werden, inwieweit das Vorhandensein von *CYP1B1\*3* mit dem Risiko der koronaren Herzerkrankung assoziiert ist.

Dazu wurde ein großes Patientenkollektiv von 1000 Patienten mit angiographisch gesicherter KHK und eine ebenso große Hospital-Kontrollgruppe in die Studie eingeschlossen.

Es sollten hierbei die wesentlichen Risikofaktoren: Nikotinabusus, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie in die Analyse mit einbezogen werden. Weiterhin wurden auch Beziehungen zu Geschlecht und Alter der Erstmanifestierung, zum akuten Myokardinfarkt und zum Schweregrad der KHK untersucht. Zusätzlich sollte die Interaktion mit der polymorphen detoxifizierenden Glutathion-S-Transferase alpha analysiert werden.

Die Größe der Studie erlaubte es, auch geringe Unterschiede der Prävalenz von *CYP1B1\*3* statistisch nachzuweisen bzw. Subgruppenanalysen vorzunehmen.