
STRUKTUR-WIRKUNGSBEZIEHUNG DER
INHIBITION CYP-KATALYSIERTER OXYLIPINBILDUNG
DURCH FLAVONOIDE

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften,
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften
der
Bergischen Universität Wuppertal

von

Nadja Kampschulte
geb. in Herdecke

Wuppertal, 2021

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2017 bis November 2021 unter der Leitung von Prof. Dr. Nils Helge Schebb am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Bergischen Universität Wuppertal.

Erste*r Gutachter*in: Prof. Dr. Nils Helge Schebb

Zweite*r Gutachter*in: Prof. Dr. Julia Bornhorst

Tag der mündlichen Prüfung und Promotion: 16. Dezember 2021

Abstract

The intake of fruit and vegetables is associated with a positive impact on human health such as reduced inflammation or prevention of cardiovascular diseases. Secondary plant metabolites, particularly polyphenols, are believed to be in part responsible for these effects. However, the underlying molecular mechanisms are still controversial and not fully understood. In the regulation of the vascular tone and the homeostasis of several physiological processes such as inflammation, the products of the cytochrome P450 monooxygenase (CYP)-catalyzed oxidation of arachidonic acid, i.e. epoxy- and hydroxy-fatty acids, play a crucial role. As polyphenols can lead to food-drug interactions by modulation of CYP activity yielding side effects of pharmaceuticals, the inhibition of CYP-catalyzed oxylipin formation by these food ingredients might contribute to the health effects of these compounds.

In this thesis the product pattern of nine human arachidonic acid oxidizing CYP was investigated and a human liver microsomes-based multi-enzyme assay was developed based on these data. The assay allows to investigate the inhibition epoxidizing (CYP2C, CYP3A4), ω -hydroxylating (CYP4F and CYP4A), and (ω -n)-hydroxylating (CYP1A1, CYP2E1) CYP in parallel, but independently from each other. Screening of a library of selected polyphenols revealed inhibition of oxylipin formation by these plant metabolites with a remarkable selectivity and a potency comparable to known CYP inhibitors with IC_{50} -values in the low micromolar or sub-micromolar range. Moderate permeability of the flavonoids as tested in the Caco-2 model of intestinal absorption and confirmation of the inhibition of 20-HETE formation by apigenin in the colorectal cancer-derived cell line HCT 116 underline the possible relevance of these effects for human

health. Further research is needed to better understand how polyphenols impact human physiology by this newly described molecular mode of action.

In order to elucidate the structure-activity relationship of the inhibition of fatty acid oxidizing CYP by flavonoids, a sum of 64 naturally occurring as well as new flavonoids were tested in the multi-enzyme assay. Substituents at C2' and C7-position of the flavone structure caused epoxygenase blockade, while electronegative substituents at C4'-position led to ω -hydroxylase-selective inhibition. 4'-trifluoromethylflavone was identified as potent and selective compound inhibiting CYP4F2-catalyzed 20-HETE formation with an IC_{50} -value of 0.76 μ M, while the other human ω -hydroxylating CYP, CYP4A11, or epoxidizing CYP were not affected. The compound was also active in microsomes from rat and mouse liver, allowing its use in animal models. Moreover, it exhibited moderate permeability properties in membrane- and CaCo-2-models and was stable to metabolic conversion. With this inhibitor, a novel tool to selectively investigate the CYP4F2-catalyzed 20-HETE formation is provided which will help to further elucidate its role in physiology.

Inhalt

Kapitel 1 Motiv und Zielsetzung	1
Kapitel 2 Theoretischer Hintergrund.....	5
2.1 Die Arachidonsäure-Kaskade	5
2.1.1 Cytochrom P450 Monooxygenasen und der dritte Zweig der Arachidonsäure-Kaskade	6
2.1.2 Physiologische Bedeutung von Epoxyfettsäuren	10
2.1.3 Physiologische Bedeutung von 20-HETE.....	11
2.2 Polyphenole und Lebensmittel-Arzneistoff-Interaktionen	12
Kapitel 3 Inhibition der CYP-katalysierten Oxylinbildung durch natürliche Polyphenole im Multienzymassay	15
3.1 Produktmuster Arachidonsäure-oxidierender CYP	17
3.1.1 Epoxidierende CYP.....	17
3.1.2 ω -hydroxylierende CYP	20
3.1.3 (ω -n)-hydroxylierende CYP	20
3.1.4 Humane Leber- und Nierenmikrosomen	22
3.2 Humane Lebermikrosomen als Multienzymassay	25
3.3 Inhibition der CYP-katalysierten Oxylinbildung durch natürliche Polyphenole.....	29
3.3.1 Epoxygenase- und ω -Hydroxylaseinhibition durch Stilbenoide ...	30
3.3.2 Flavonoide als selektive Inhibitoren CYP-katalysierter Arachidonsäure-Hydroxylierung	35
3.3.3 Inhibition von CYP2J2	38

3.3.4	Apigenin als Inhibitor der ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure in Zellkultur.....	41
3.4	Schlussfolgerungen.....	48
Kapitel 4 Struktur-Wirkungsbeziehung der Inhibition von CYP durch Flavonoide: Entwicklung eines CYP4F2-selektiven ω-Hydroxylaseinhibitors		
51		
4.1	Modifikation der Flavonstruktur zur Inhibition der 20-HETE-Bildung	54
4.2	Inhibitorische Eigenschaften von 4'-Trifluormethylflavon.....	60
4.3	Schlussfolgerungen.....	63
Kapitel 5 Entwicklung einer online-SPE Methode zur quantitativen Analyse von Flavonen und anderen small molecules		
67		
5.1	Aufbau und chromatografische Parameter	69
5.2	Parameter der Quantifizierung	80
Kapitel 6 Charakterisierung der pharmakokinetischen Eigenschaften des CYP4F2 Inhibitors 4'-Trifluormethylflavon.....		
85		
6.1	Löslichkeit.....	87
6.2	Permeabilität	90
6.3	Proteinbindung	93
6.4	Metabolische Stabilität	97
6.5	Schlussfolgerungen.....	99
Kapitel 7 Abschließende Betrachtungen		
103		

Kapitel 8 Experimenteller Teil	107
8.1 Materialien und allgemeine Informationen	107
8.2 Inkubationen und Charakterisierungsassays	108
8.2.1 Mikrosomale Umsetzungen von Arachidonsäure	108
8.2.2 Oxidation von Polyphenolen durch Mikrosomen	110
8.2.3 Glucuronidierungsassay	110
8.2.4 Fluoreszenzbasiertes CYP2C9-Assay	111
8.2.5 Löslichkeitsbestimmung	111
8.2.6 Membranpermeabilitätsassay	111
8.2.7 Bestimmung der Proteinbindung	112
8.2.8 Zellkulturexperimente	112
8.3 Analytische Methoden	114
8.3.1 Quantifizierung von Oxylipinen	114
8.3.2 Online SPE	117
8.3.3 LC-UV zur Untersuchung der CYP-katalysierten Oxidation natürlicher Polyphenole	118
8.4 Datenauswertung	119
Abbildungsverzeichnis	121
Tabellenverzeichnis	123
Abkürzungsverzeichnis	125
Literatur	127
Appendix	161
Curriculum Vitae	177
Publikationen	179
Danksagung	183

Kapitel 1

Motiv und Zielsetzung

Der Verzehr von pflanzlichen Lebensmitteln, insbesondere von wenig verarbeiteten Obst und Gemüse, wird aus ernährungswissenschaftlicher Sicht als positiv bewertet. Dabei werden nicht nur die enthaltenen Mikro- und Makronährstoffe als physiologisch bedeutsam eingeschätzt – auch die Aufnahme von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, insbesondere Flavonoiden und anderen Polyphenolen, wird mit positiven gesundheitlichen Wirkungen assoziiert. Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass eine erhöhte Aufnahme von Polyphenolen das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen sowie für Typ II Diabetes reduzieren kann [1-3]. Die diesen Effekten zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind bisher wenig aufgeklärt. Mit großer Wahrscheinlichkeit sind die Wirkungen jedoch nicht ausschließlich mit den antioxidativen Eigenschaften der Polyphenole zu begründen – eine mögliche Modulation verschiedener zellulärer Signalwege durch Polyphenole wird in vielfältigen Studien beschrieben [4].

Die Wechselwirkung zwischen Polyphenolen und Cytochrom P450 Monoxygenasen (CYP), einer Gruppe von Enzymen, die im Rahmen des Phase I-Metabolismus endogene Verbindungen und exogene Substanzen wie pharmakologische Wirkstoffe umsetzt, ist eine der bekanntesten Lebensmittel-Arzneistoff-Interaktionen. Eine Modulation der CYP-Aktivität durch Lebensmittelinhaltsstoffe kann die Konzentration eines Arzneistoffes im Körper verändern, und folglich die Wirksamkeit und Sicherheit der Verbindung beeinflussen [5-8]. Als Konsequenz finden sich in den Gebrauchsinformationen zahlreicher Medikamente Hinweise auf mögliche Veränderungen der Wirksamkeit bei gleichzeitigem Verzehr pflanzlicher Produkte. Darunter fallen

zum Beispiel Grapefruit, Preiselbeerprodukte oder Johanniskraut – unter anderem beim Cholesterolsenker Simvastatin, dem Anticoagulant Warfarin sowie oralen Kontrazeptiva.

Auch wenn CYP vornehmlich für ihre Rolle im Fremdstoffmetabolismus bekannt sind, katalysieren sie mehrheitlich, und zum Teil hoch spezifisch, die Oxidation endogener Substrate, wie beispielsweise Sterole [9]. Mehrfach ungesättigte, langkettige Fettsäuren wie die Arachidonsäure werden durch CYP in der so genannten Arachidonsäure-Kaskade zu Oxylipinen umgesetzt. Die resultierenden Produkte sind als Lipidmediatoren physiologisch aktiv und steuern unter anderem inflammatorische Prozesse, die Regulation des Gefäßtonus und die Angiogenese [10, 11]. Das Produkt der ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure, 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE), spielt insbesondere bei der Regulation des Blutdrucks eine entscheidende Rolle, wobei in Abhängigkeit des Wirkungsortes ambivalente Effekte beschrieben sind: Während 20-HETE in Blutgefäßen eine Vasokonstriktion verursacht, wirkt es in der Niere vasodilativ [12].

Ob Inhaltsstoffe pflanzlicher Lebensmittel die CYP-katalysierte Bildung von Oxylipinen modulieren, ist bisher – trotz der bekannten Wechselwirkungen zwischen Polyphenolen und CYP im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus – wenig erforscht. Mit der Hypothese, dass sekundäre Pflanzenstoffe ihre gesundheitlichen Effekte teilweise durch eine Veränderung der Oxylipinbildung hervorrufen, wurde in dieser Arbeit die Inhibition der Bildung von Lipidmediatoren durch CYP ausgehend von natürlichen Polyphenolen untersucht. Die Charakterisierung der Potenz sowie Selektivität gegenüber einzelnen Arachidonsäure-oxidierenden Enzymen liefert Hinweise auf die potenziellen gesundheitlichen Auswirkungen einer polyphenolreichen Ernährung und hilft, die komplexen molekularen Mechanismen, über die Polyphenole ihre Wirkungen im menschlichen Körper entfalten, besser zu verstehen.

Insbesondere eine selektive Inhibition und die daraus resultierenden Veränderungen des endogenen Oxylipinmusters könnten zum Beispiel im Falle

von 20-HETE die Homöostase des Tonus des kardiovaskulären Systems beeinflussen. Die genaue biologische Bedeutung einer solchen enzymselektiven Inhibition und unter Umständen gewebe- oder organspezifischen Änderung des Oxylinmusters ist jedoch nicht bekannt – Es fehlen selektive, potente Wirkstoffe für entsprechende Untersuchungen beispielsweise im Tiermodell. Um eine solche Verbindung zu erarbeiten wurden ausgehend von natürlichen Flavonoiden die Flavon-Grundstruktur iterativ modifiziert und grundlegende Merkmale der Struktur-Wirkungsbeziehung der Inhibition der CYP-katalysierten Oxylinbildung abgeleitet. Der damit entwickelte enzymselektive Inhibitor kann zukünftig genutzt werden, die Modulation der Oxylinbildung durch Lebensmittelinhaltsstoffe besser zu verstehen und die daraus resultierenden physiologischen Effekte weiter zu untersuchen.

Kapitel 2

Theoretischer Hintergrund

2.1 Die Arachidonsäure-Kaskade

Arachidonsäure und andere mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) sind nicht nur Bestandteile von Lipiden und damit Biomembranen, sondern auch Substrate für die Enzyme der Arachidonsäure-Kaskade: Cyclooxygenasen (COX), Lipoxygenasen (LOX) und Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP) oxidieren in diesem Stoffwechselprozess die Fettsäuren zu Eicosanoiden und anderen Oxylipinen. Auch aus autoxidativen Prozessen gehen Oxylipine hervor, deren Strukturen teilweise mit denen enzymatisch gebildeten Produkte übereinstimmen. Während die enzymatisch katalysierten Reaktionen jedoch zumeist regio- und stereo-spezifisch erfolgen, resultiert aus der nicht-enzymatischen Lipidperoxidation ein komplexes Gemisch von Regio- und Stereoisomeren [13, 14]. Viele der in der Arachidonsäure-Kaskade gebildeten Oxylipine sind potente Lipidmediatoren, die im Organismus eine grundlegende und ebenso vielseitige Rolle bei der Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse spielen [15, 16].

COX katalysieren die Bildung von Prostaglandin H_2 aus Arachidonsäure, welches im Weiteren chemisch oder durch spezifische Synthasen zu weiteren Prostaglandinen, Thromboxanen oder zu Prostacyclin umgesetzt wird [15]. Es sind zwei humane Isoformen der COX bekannt (COX-1 und COX-2). Für die COX-1 ist außerdem eine mit COX-3 benannte Variante beschrieben, die durch alternatives Splicing nach der Transkription des COX-1-codierenden *PTGS1*-Gens resultiert [18]. *PTGS1* wird in vielen Geweben konstitutiv exprimiert, insbesondere in der Mucosa des Magens und der Niere. Die Aktivität der COX-1 ist für die Homöostase der Gewebe bedeutsam [19, 20]. Die Expression des

COX-2-codierenden *PTGS2*-Gens wird über Cytokine und andere Signalwege induziert, zum Beispiel durch Entzündungsmediatoren wie den Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin-1 (IL-1), oder Lipopolysaccharide [20, 21]. Bei der Entstehung von Entzündung und Schmerz spielen die COX-2 und ihre Produkte eine wesentliche Rolle. Viele entzündungshemmenden und schmerzstillenden Medikamente wie Diclofenac oder Ibuprofen wirken über eine Inhibition der COX [22].

Die Umsetzung von Arachidonsäure durch 5-LOX, 12-LOX und 15-LOX führt zur regio- und stereospezifischen Bildung von Hydroperoxyfettsäuren. Diese können zu Hydroxyfettsäuren reduziert werden und sind Vorläufer für Leukotriene und Hepoxiline [14, 15, 23]. 5-HETE und andere Hydroxyfettsäuren sind wie Prostaganoide parakrine Mediatoren inflammatorischer Prozesse und immunologischer Reaktionen. Zusammen mit Leukotrienen medieren sie die Chemotaxis und Degranulierung von Neutrophilen [24-27]. Leukotriene können außerdem eine Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur auslösen und stehen folglich im Zusammenhang mit Asthma und Allergien [28]. Neuere Forschungsarbeiten weisen darauf hin, dass mehrfach hydroxylierte Fettsäuren, sogenannte *specialized pro-resolving mediators* (SPM), für die aktive Auflösung von Entzündungsvorgängen bedeutsam sind [29, 30]. Insbesondere Resolvine, Protectine und Maresine aus ω 3-Fettsäuren und Lipoxine aus Arachidonsäure werden als lokal wirkende, potente Mediatoren beschrieben, die die Rückkehr des Gewebes zur Homöostase vermitteln. Als Bildungsweg der SPM wird ein konsekutives Zusammenspiel mehrerer Enzyme, in erster Linie der 5-LOX und 12- oder 15-LOX angenommen [29, 30].

2.1.1 Cytochrom P450 Monooxygenasen und der dritte Zweig der Arachidonsäure-Kaskade

Die Bildung von Oxylipinen im sogenannten dritten Zweig der Arachidonsäure-Kaskade wird durch Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP) katalysiert. Unter dem Begriff der CYP wird eine heterogene Gruppe von überwiegend

membrangebundenen Häm-Proteinen zusammengefasst, die ein Substrat monooxygenieren. CYP sind ubiquitär in pflanzlichen und tierischen Lebewesen vertreten: Mehr als 300 000 CYP-codierende Sequenzen sind bekannt, davon 57 im humanen Genom [31]. Die systematische Nomenklatur und Kategorisierung der einzelnen Enzyme basiert auf Sequenzhomologien: Bei einer Übereinstimmung von mehr als 40% werden CYP einer Familie zugeordnet, die mit einer arabischen Zahl nach dem Präfix CYP benannt wird (z. B. CYP4). Unterfamilien bilden Enzyme mit einer Sequenzhomologie von mehr als 55%. Diese werden mit einem lateinischen Buchstaben als Majuskel gekennzeichnet (z. B. CYP4A). Die einzelnen Enzyme werden abermals mit einer Ziffer bezeichnet (z. B. CYP4A11) [32].

Bei der von CYP katalysierten Reaktion werden formal ein Molekül Sauerstoff und die Äquivalente eines Wasserstoffmoleküls (2H^+ und 2e^-) zu Wasser umgesetzt, während das Substrat oxidiert wird. Als Reduktionsmittel dient Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), wobei der Elektronentransport von der Nicotinamid-Struktur nicht unmittelbar auf das CYP erfolgt: NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktasen, membranständige Flavoproteine, übertragen in zwei einzelnen Schritten jeweils ein Elektron auf das Häm-Eisen [33]. In Ruhephasen liegt das vom Protoporphyrin IX-Gerüst des Häms koordinierte Eisen in der Oxidationsstufe (+III) vor. Neben den vier N des Porphyrin-Gerüsts als äquatoriale Liganden werden ein Thiolat-Rest einer Cysteinseitenkette des Proteins sowie ein Wassermolekül axial koordiniert. Durch das Binden eines Substrates wird das Wasser vom Häm verdrängt, was den katalytischen Zyklus durch eine Reduktion des Fe(+III) zu Fe(+II) und die anschließende Bindung von O_2 initiiert. [34, 35]

Im dritten Zweig der Arachidonsäure-Kaskade werden die Fettsäuren durch CYP epoxidiert oder hydroxyliert (Abbildung 3-1). Die Epoxidierung der Doppelbindung führt zur Bildung vier regioisomerer Epoxyeicosatriensäuren (EpETrE): 14(15)-, 11(12)-, 8(9)- und 5(6)-EpETrE [36]. Die Reaktion wird unter anderem durch CYP der CYP2C- und CYP2J-Unterfamilien katalysiert (Kapitel

3.1). Abgesehen vom 5(6)-Epoxid, für welches eine Lactonbildung beschrieben ist [37], sind die Produkte unter physiologischen Bedingungen verhältnismäßig stabil. Durch lösliche Epoxidhydrolasen (sEH) werden sie jedoch mit hohen Umsatzraten zu Dihydroxyeicosatriensäuren (DiHETrE) hydrolysiert, und damit inaktiviert [38].

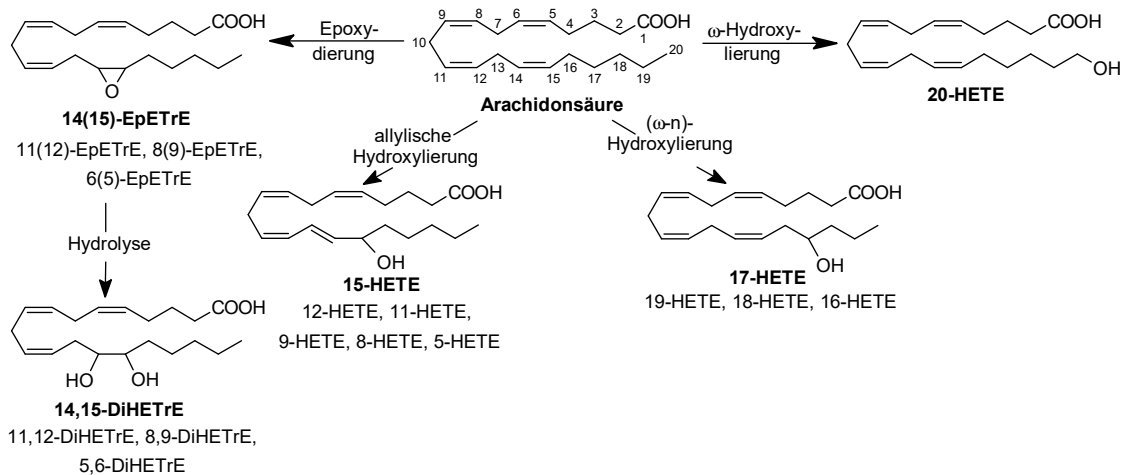


Abbildung 2-1 CYP-Zweig der Arachidonsäure-Kaskade. Arachidonsäure wird durch CYP zu verschiedenen Oxylipinen umgesetzt: Aus Epoxidierungsreaktionen gehen vier regioisomere Epoxyeicosatriensäuren (EpETrE) hervor, die (enzymatisch katalysiert) zu Dihydroxyeicosatriensäuren (DiHETrE) hydrolysiert werden. Eine Hydroxylierung am ω-Ende der Fettsäure führt zu 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE). Die Hydroxylierung an anderen aliphatischen Positionen bringt entsprechende (ω-n)-HETE hervor. Hydroxyfettsäuren mit einem konjugierten *cis-trans* Dienol-System resultieren durch Oxidation in allylischer Position.

In Abhängigkeit der Position der Hydroxylierung der Arachidonsäure durch CYP werden drei Produktgruppen unterschieden: Eine Hydroxylierung in allylischer Position führt zu mittelkettigen Hydroxylierungsprodukten, die eine konjugierte *cis-trans*-Dienol-Struktur aufweisen: 5-, 8-, 9-, 11-, 12- und 15-HETE (Abbildung 3-1) [39]. Die Produkte überschneiden sich somit mit den Folgeprodukten der Lipoxygenasereaktion. Mechanistisch ist zwischen den beiden Enzymklassen jedoch zu differenzieren: Die Peroxidation von Fettsäuren durch LOX findet infolge einer Aktivierung des Substrates statt. CYP unterdessen monooxygenieren das Substrat durch eine Aktivierung von Sauerstoff [23, 39, 40]. Während LOX die Arachidonsäure mit hoher Regio- und Stereoselektivität oxidieren, liegen die meisten der aus CYP-Katalyse resultierenden Produkte (5-,

8-, 9-, 11- und 15-HETE) annähernd racemisch vor ($\leq 20\%$ ee). Lediglich CYP2C9 bildet 12(*R*)-HETE in deutlichem Überschuss. [23, 39, 41, 42]. Die verschiedenen HETE-Regioisomere sind jeweils das Produkt mehrerer CYP (Kapitel 3.1).

Die Hydroxylierung der ω - sowie (ω -n)-Positionen von Arachidonsäure führt zur Bildung von 20-HETE und den entsprechenden subterminalen Hydroxylierungsprodukten (16-, 17-, 18- und 19-HETE). Die Hydroxylierung des aliphatischen Fettsäurerestes ist eine CYP-spezifische Reaktion [15]. Dabei wird die Bildung von 20-HETE ausschließlich durch Enzyme der CYP4-Familie katalysiert, während (ω -n)-HETE die Produkte verschiedener Enzymfamilien sind (Kapitel 3.1) [36].

Während 20-HETE ein Oxylin mit großer physiologischer Relevanz ist und dessen Wirkmechanismen Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten sind (Kapitel 2.1.3), sind die subterminalen Hydroxylierungsprodukte hinsichtlich ihrer biologischen Effekte nur wenig charakterisiert. Einige Daten lassen vermuten, dass 19-HETE und 18-HETE den Effekten von 20-HETE auf den Gefäßtonus entgegengerichtet agieren und, wie auch 17- und 16-HETE, die Natriumrückresorption in der Niere induzieren [15, 43]. Im Zellmodell stellt sich 19-HETE als protektiv gegen Angiotensin-II induzierte Herzmuskelhypertrophie dar [44]. Außerdem ist eine Inhibition der Adhäsion von Neutrophilen durch 16(*R*)-HETE beschrieben [45].

Unter basalen Bedingungen liegt Arachidonsäure an *sn*-2 Position in Phospholipiden, zum Beispiel in biologischen Membranen, verestert vor. Nur die freien, nicht veresterten Fettsäuren sind Substrate der CYP. Nach einer Aktivierung der cytosolischen, calciumabhängigen Phospholipase A₂ durch extrazelluläre Stimuli kommt es zur hydrolytischen Spaltung der Esterbindung, und damit zu einer Freisetzung der veresterten Fettsäuren. Die Bildung von Oxylinen ist direkt mit Signalkaskaden verknüpft, die eine Aktivierung von Phospholipasen auslösen. Die Lipidmediatoren sind folglich als *second messenger* von Cytokinen, Hormonen oder Wachstumsfaktoren zu verstehen

[46, 47]. Nach der Monooxygenierung wird ein Teil der gebildeten Epoxy- und Hydroxyfettsäuren an *sn*-2 Position von Lipiden reverestert [47-49] und bildet so einen Pool an verfügbaren Oxylipinen, die ihrerseits durch die Phospholipase A₂ freigesetzt werden können [36, 50].

2.1.2 Physiologische Bedeutung von Epoxyfettsäuren

Viele der Epoxygenasen, welche Arachidonsäure zu EpETrE umsetzen, sind in hepatischen Geweben aktiv. Hierunter fallen insbesondere die Enzyme der CYP2C-Familie, sowie CYP3A4. Außer in der Leber sind CYP2C9 und CYP2C19 auch im Endothel von Blutgefäßen und der Lunge vorhanden [46]. CYP2J2, welches nur in geringen Mengen in der Leber vorkommt, ist mehrheitlich in Kardiomyozyten und im Gefäßendothel aktiv, aber auch im Ileum und anderen Teilen des Gastrointestinaltraktes. [51-53]. Es wird vermutet, dass Epoxyfettsäuren als auto- und parakrine Mediatoren ihre Signale teilweise über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermitteln, auch wenn bis heute kein entsprechender Rezeptor identifiziert werden konnte [54, 55].

Die aus Arachidonsäure durch CYP gebildeten Epoxyfettsäuren regulieren als *endothelium derived hyperpolarization factors* (EDHF) den Gefäßtonus: Im Endothel gebildete Epoxyfettsäuren bewirken eine Relaxation der glatten Muskulatur des Gefäßes durch eine Hyperpolarisation der Zellen. Die Bildung bzw. Freisetzung von Epoxyfettsäuren wird durch Hormone wie Bradykinin, aber auch zyklische Dehnung des Gefäßes und Scherbelastung ausgelöst [56]. Die EpETrE vermitteln eine Aktivierung Calcium-abhängiger Kaliumkanäle der Muskelzellen, was zu einem Einstrom von Kalium in die Zellen führt, und in Folge dessen zu einer Hyperpolarisation und Dilatation des Gefäßes [56-58].

Epoxyfettsäuren sind auch für die Regulation von Entzündungsprozessen physiologisch relevant: Entzündungen als Reaktion eines Organismus auf eine Schädigung sind geprägt von einer Infiltration von Leukozyten in die betroffenen Gewebe und einer anschließenden Ausschüttung von (proinflammatorischen)

Cytokinen wie TNF α , einem zentralen Mediator von akuten und systemischen Entzündungsprozessen. Die durch TNF α ausgelöste Signalkaskade führt unter anderem zu einer Aktivierung des *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), einem Transkriptionsfaktor, welcher seinerseits die Expression inflammatorischer Gene, wie das der COX-2, induziert [59, 60]. EpETrE und andere Epoxyfettsäuren reduzieren Entzündungen durch eine Verminderung der Ausschüttung von TNF α durch Monozyten [61], sowie eine Inhibition der Aktivierung von NF- κ B bei verschiedenen Zelltypen [61-63].

Neben den (positiven) Effekten auf Blutdruck und Entzündungsprozesse werden weitere Wirkungen von Epoxyfettsäuren diskutiert. So wird den Verbindungen eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren und der Metastasierung zugeschrieben, unter anderem, weil EpETrE die Proliferation von Zellen sowie die Angiogenese fördern [64-66].

Die Epoxyfunktionen nicht veresterter EpETrE werden durch die lösliche Epoxidhydrolase (sEH) rasch zu vicinalen Dihydroxyfunktionen hydrolysiert. Für die resultierenden DiHETrE sind bisher keine biologischen Wirkungen bekannt. Die Inhibition der sEH ist ein vielfach beachtetes pharmakologisches Target: Zur Prävention und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen soll eine Erhöhung der biologischen Level von Epoxyfettsäuren aufgrund verminderter Degradation durch sEH-katalysierte Hydrolyse erzielt werden. Einige sEH-Inhibitoren werden zur Zeit in klinischen Phase I- und Phase II-Studien untersucht [67].

2.1.3 Physiologische Bedeutung von 20-HETE

Das Produkt der ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure, 20-HETE, kann durch seine Modulation der Nieren- und Gefäßfunktion sowohl blutdrucksenkende als auch blutdruckerhöhende Wirkungen ausüben. In der glatten Muskulatur von Blutgefäßen inhibiert 20-HETE Calcium-abhängige Kaliumkanäle. Dies bewirkt zunächst eine Erniedrigung des Membranpotentials, und infolge dieser Depolarisation ein Öffnen der spannungsabhängigen Calciumkanäle. Die

dadurch ausgelöste Kontraktion und Verengung des Gefäßes führt unmittelbar zu einem Anstieg des Gefäßtonus. Weitere Mechanismen der vasokonstriktiven Wirkung von 20-HETE werden diskutiert [12, 68-70]. Seine vasodilatativen Eigenschaften entfaltet 20-HETE insbesondere in der Niere: Durch die Verminderung der Natriumrückresorption im Nierentubulus, unter anderem durch eine Blockade der Na⁺/K⁺-ATPase, wird auch die Resorption von Wasser, und damit das Blutvolumen und der Gefäßtonus beeinflusst [70-73]. Eine Fehlregulierung der 20-HETE-Level in verschiedenen Organen kann zur Entstehung von Hypertonie beitragen. Die Bildung von 20-HETE aus Arachidonsäure wird im Menschen überwiegend durch CYP4A11 und CYP4F2 katalysiert (Kapitel 3.1). Sequenzvariationen durch Polymorphismen der CYP4A11- und CYP4F2-Gene konnten in verschiedenen epidemiologischen Studien in einen Zusammenhang mit der Inzidenz von Bluthochdruck gebracht werden [74]. Wie kürzlich beschrieben, vermittelt 20-HETE seine Effekte (teilweise) über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor GPR75 [75].

Aufgrund der vielfältigen und oft konträren Wirkungen von Epoxyfettsäuren aus Arachidonsäure und 20-HETE könnte eine Modulation dieser sensitiven Homöostase durch sekundäre Pflanzenstoffe weitreichende physiologische Folgen haben.

2.2 Polyphenole und Lebensmittel-Arzneistoff-Interaktionen

Gemüse und Obst werden von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) im Rahmen der Kampagne „5 am Tag“ als zentraler Teil einer gesunden und ausgewogenen Ernährung empfohlen [3]. Die in diesen Lebensmitteln enthaltenen Nähr- und Ballaststoffe sind nicht die einzige Begründung für diese Empfehlung – auch die sekundäre Pflanzenstoffe werden als ernährungsphysiologisch wertvoll eingeschätzt [3]. Die pflanzlichen Sekundärmetabolite sind basierend auf ihrer chemischen Struktur und den zugrundeliegenden Biosynthesewegen in drei Gruppen einzuteilen: Terpenoide, Alkaloide und (Poly-) Phenole [76].

Auch wenn der Begriff der „Polyphenole“ nicht immer einheitlich definiert wird, wird er zumeist zusammenfassend für (pflanzliche) Verbindungen verwendet, deren Strukturen mehr als einen (hydroxylierten) Phenolring aufweisen [77, 78]. Eine große Gruppe innerhalb der Polyphenole sind die Flavonoide. Ihr Grundkörper setzt sich aus zwei aromatischen Ringen zusammen, die über eine C₃-Brücke verknüpft sind, welche ihrerseits einen O-heterozyklischen Ring bildet. Basierend auf der Oxidationsstufe der Kohlenstoffatome in der C₃-Brücke und den Positionen der Verknüpfungen werden die Flavonoide in weitere Untergruppen eingeteilt (Abbildung 2-2).

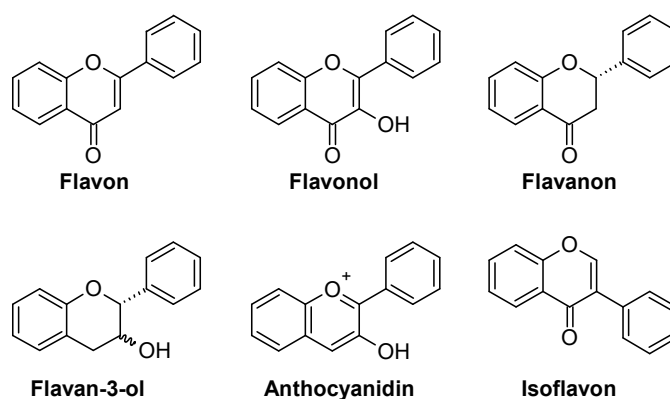


Abbildung 2-2 Grundstrukturen der verschiedenen Flavonoidklassen.

Mehr als 8000 natürliche Flavonoide sind bisher beschrieben. Die strukturelle Vielfalt ergibt sich unter anderem aus der Variation der Substitutionsmuster der Phenylringe. Die Biosynthese erfolgt über Phenylpropanoide aus dem Shikimat-Weg, die im Polyketid-Weg weiter zu Flavonoiden umgesetzt werden [77]. In der Pflanze haben die Flavonoide mehrere Funktionen, unter anderem dienen sie der Abwehr von Fraßfeinden und pathogenen Organismen, sowie dem Schutz vor UV-Strahlung [79].

Die Aktivität humaner fremdstoffmetabolisierender CYP kann durch Polyphenole beeinflusst werden: Beispielsweise führen einige Flavonoide durch Interaktion mit dem Pregnan-X-Rezeptor zur Induktion von CYP3A4 und anderen Enzymen

des Fremdstoffmetabolismus [80]. In zahlreichen Studien mit unterschiedlichen Modellsystemen ist die Inhibition verschiedener CYP durch Flavonoide beschrieben [80-84] – die belegte klinische Relevanz von toxischen Effekten pharmakologischer Wirkstoffe, die auf eine Modulation der CYP-Aktivität durch Flavonoide zurückzuführen ist, ist jedoch auf wenige Beispiele begrenzt. Nichtsdestoweniger ist die Interaktion zwischen CYP und sekundären Pflanzenstoffen und die daraus resultierenden Effekte auf die Gesundheit ein vielfach beachtetes Thema, welches sowohl im Bereich der klinischen Wirkstoffentwicklung als auch in Gebrauchsinformationen zu Medikamenten Beachtung findet [6, 8, 85-87]. Der Einfluss von Flavonoiden auf die Oxylinbildung durch CYP der Arachidonsäure-Kaskade ist bisher nicht untersucht.

Kapitel 3

Inhibition der CYP-katalysierten Oxylinbildung durch natürliche Polyphenole im Multienzymassay

Ein Teil der in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse wurde bereits publiziert:

Dietary Polyphenols Inhibit the Cytochrome P450 Monooxygenase Branch of the Arachidonic Acid Cascade with Remarkable Structure-Dependent Selectivity and Potency. Nadja Kampschulte, Ayah Alasmer, Michael T. Empl, Michael Krohn, Pablo Steinberg, and Nils Helge Schebb; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68 (34), 9235-9244

Teile der in diesem Kapitel diskutierten Daten basieren auf der von der Autorin im Jahr 2017 im Rahmen der ersten Staatsprüfung für LebensmittelchemikerInnen an der Bergischen Universität Wuppertal vorgelegten wissenschaftlichen Abschlussarbeit mit dem Titel „Charakterisierung des Produktmusters der Umsetzung von Arachidonsäure durch Cytochrom-P450-Monooxygenasen“.

Die Bildung von Epoxy- und Hydroxyfettsäuren aus Arachidonsäure wird im humanen Organismus nicht durch eine einzelne Cytochrom P450 Monooxygenase (CYP) katalysiert: Zahlreiche dieser Enzyme akzeptieren die Fettsäure als Substrat [36, 46, 52, 88-92]. Die isolierte Betrachtung der Interaktion zwischen Polyphenolen aus Lebensmitteln mit einem einzelnen CYP berücksichtigt folglich nur einen limitierten Ausschnitt möglicher Effekte der Lebensmittelinhaltsstoffe auf die CYP-katalysierte Oxylinbildung. Um eine umfassendere Sichtweise zu ermöglichen, war es ein Ziel dieser Arbeit einen Multienzymassay zu etablieren, welcher die parallele und gleichzeitige Untersuchung der Aktivität mehrerer CYP unabhängig voneinander erlaubt. Dafür wurden zunächst die aus der Oxidation der Arachidonsäure durch einzelne

Enzyme resultierenden Produktmuster charakterisiert. Neben rekombinanten CYP wurden auch die Produktmuster humaner Leber- sowie Nierenmikrosomen bestimmt. Mittels selektiver sowie nicht selektiver CYP-Inhibitoren konnte auf Grundlage dieser Produktmuster gezeigt werden, dass Mikrosomen aus humanem hepatischem Gewebe eine geeignete Enzymquelle darstellen, um die Aktivität ω -hydroxylierender, epoxidierender sowie (ω -n)-hydroxylierender CYP parallel und unabhängig voneinander zu untersuchen. Das Multienzymassay wurde eingesetzt, um eine Auswahl natürlicher Polyphenole auf ihre inhibitorischen Effekte auf die CYP-katalysierte Oxylinbildung zu untersuchen.

Im Screening zeigten fünf der neun getesteten Polyphenole eine hemmende Wirkung auf die Bildung eines oder mehrerer Produkte. Genauere Untersuchungen offenbarten eine zum Teil bemerkenswerte Selektivität auf die Oxidation von Arachidonsäure durch einzelne CYP, mit IC_{50} -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich. Auch das in erster Linie in extrahepatischen Geweben aktive und physiologisch höchst bedeutsame CYP2J2 wird durch einige Polyphenole gehemmt. Der Effekt von Apigenin auf die ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure konnte nach Auswahl einer geeigneten Zelllinie auch in Zellkulturen bestätigt werden. Unter Berücksichtigung der moderaten intestinalen Resorption der untersuchten Polyphenole unterstreicht dies, dass auch Effekte *in vivo* denkbar sind. Dies stellt einen neuartigen Mechanismus dar, über den Polyphenole ihre vielbeschriebenen Effekte auf die menschliche Physiologie und Gesundheit ausüben könnten.

3.1 Produktmuster Arachidonsäure-oxidierender CYP

Für die Etablierung eines Multienzymassays wurden im ersten Schritt die charakteristischen Oxylipinmuster, die aus der Umsetzung von Arachidonsäure durch individuelle CYP hervorgehen, bestimmt. Dabei wurden CYP berücksichtigt, für die ein Beitrag zur Bildung physiologisch relevanter Oxylipine beschrieben ist. Außerdem wurden CYP untersucht, die in hepatischem Gewebe in großen Mengen exprimiert werden und denen ein wichtiger Beitrag zum Phase-I Metabolismus von Xenobiotika zugeschrieben wird [93, 94].

Alle eingesetzten CYP setzen Arachidonsäure als Substrat zu Oxylipinen um, wobei die Umsatzraten in einer Größenordnung von 0.2 bis 11 pmol·min⁻¹·pmol CYP⁻¹ variieren (Abbildung 3-1, Appendix 2). Keines der Enzyme katalysiert die Bildung eines einzigen Oxylipins, vielmehr ergibt sich für jedes CYP ein individuelles Muster. Gleichzeitig wird kein Oxylipin exklusiv durch ein einziges Enzym gebildet (Abbildung 3-1). Folglich ist es nicht möglich in biologischen Systemen einen ausgewählten Lipidmediator als Aktivitätsmarker für ein individuelles CYP heranzuziehen. Basierend auf den Hauptprodukten lassen sich die CYP in drei Gruppen einteilen: (i) ω -hydroxylierende CYP (CYP4A11 und CYP4F2), deren Hauptprodukt aus der Umsetzung von Arachidonsäure 20-HETE ist, (ii) (ω -n)-hydroxylierende CYP wie CYP2E1 und CYP1A1, die mit hohen Raten 19-HETE und andere subterminale Hydroxylierungsprodukte hervorbringen, und (iii) epoxidierende CYP (CYP3A4 und die CYP2C-Unterfamilie), die überwiegend die Bildung der vier EpETrE-Regioisomere katalysieren (Abbildung 3-1).

3.1.1 Epoxidierende CYP

Epoxyeicosatriensäuren (EpETrE), die Epoxidierungsprodukte von Arachidonsäure, sind die Hauptprodukte von CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 und CYP3A4, wobei die gebildeten Epoxyfettsäuren unter den gegebenen experimentellen Bedingungen teilweise in Form des Hydrolyseproduktes Dihydroxyeicosatriensäure (DiHETrE) zu detektieren sind (Abbildung 3-1).

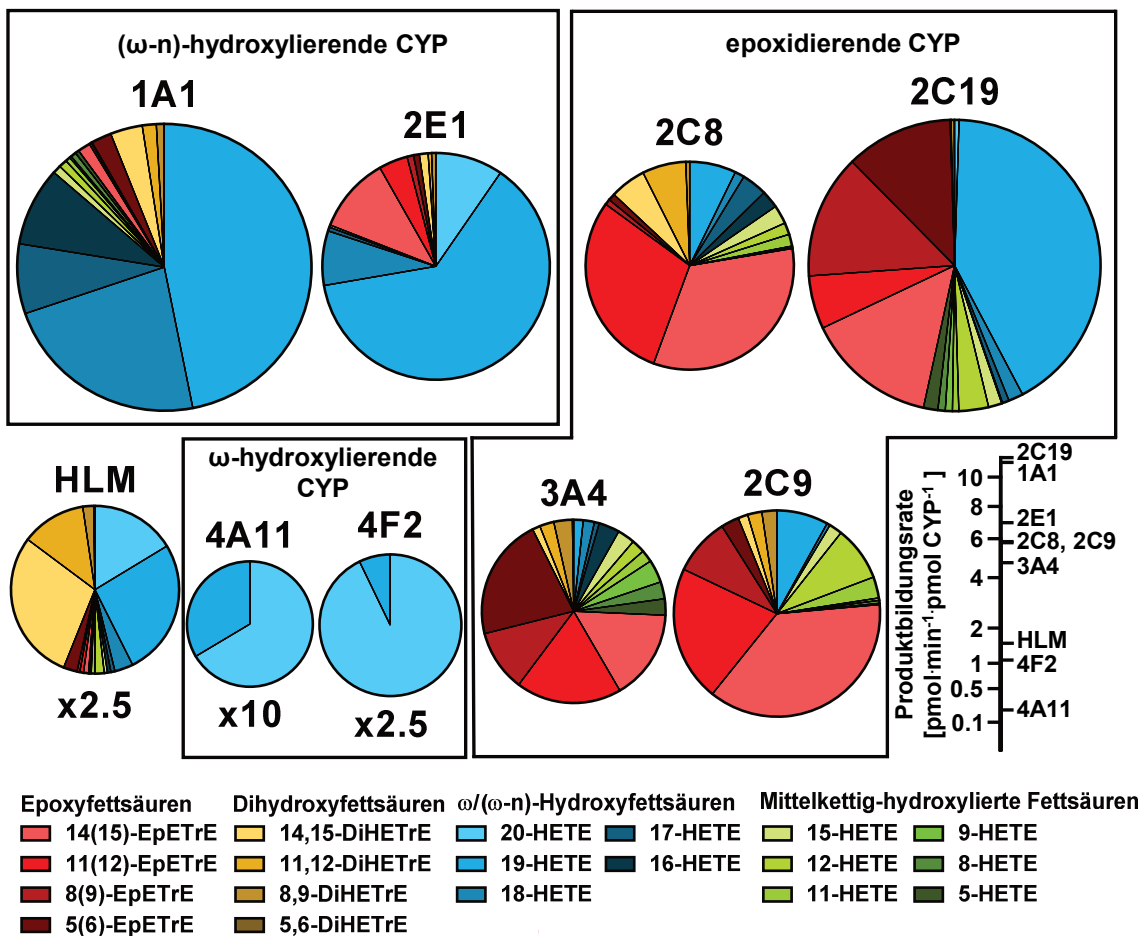


Abbildung 3-1 Produktmuster Arachidonsäure-oxidierender CYP und humaner Lebermikrosomen. 100 μM Arachidonsäure wurden mit rekombinanten CYP (25 pmol CYP·mL⁻¹) oder humanen Lebermikrosomen (HLM, 0.5 mg Protein·mL⁻¹, 400 pmol CYP·mL⁻¹) für 20 min bei 37 °C inkubiert. Ein NADPH-generierendes System wurde als Cosubstrat eingesetzt. Die Flächen der Diagramme stellen das Verhältnis der Bildungsrate zwischen den verschiedenen Präparaten dar (relativ zu CYP2C19, dem Enzym mit der höchsten Umsatzrate: 100% = 11 pmol·min⁻¹·pmol CYP⁻¹). Faktoren indizieren die vergrößerte Darstellung des jeweiligen Diagramms.

Aus der Epoxidierung der Arachidonsäure gehen vier regioisomere Verbindungen hervor. Keine der Positionen scheint bei der Umsetzung dieser Fettsäure durch CYP deutlich bevorzugt. Allerdings variiert die Bildungsrate der verschiedenen Regioisomere zwischen den einzelnen Enzymen: CYP2C8 bildet 14(15)-EpETrE und 11(12)-EpETrE mit vergleichbarer Geschwindigkeit (1.8 bzw. 2.1 pmol Produkt·min⁻¹·pmol CYP⁻¹), während andere Regioisomere, sowie auch Hydroxyfettsäuren, nur in kleinem Umfang gebildet werden. Eine vergleichbare Produktverteilung wurde auch bei der Identifizierung von CYP2C8 als

Epoxygenase beschrieben: 11(12)-EpETrE macht einen Anteil von 52% an der Summe aller gebildeter Epoxyfettsäuren aus, und 14(15)-EpETrE 48%, während die Bildung von 8(9)-EpETrE und 5(6)-EpETrE nicht beobachtet werden konnte [95].

Im Falle von CYP2C9 ist für 14(15)-EpETrE ein größerer Anteil an der Produktsumme beschrieben als für 11(12)-EpETrE und insbesondere 8(9)-EpETrE (52%, 30% und 17%) [95], was sehr gut mit dem hier gezeigten Produktmuster für CYP2C9 übereinstimmt (52% 14(15)-EpETrE, 30% 11(12)-EpETrE und 14% 8(9)-EpETrE bezogen auf die Summe aller gebildeten EpETrE). In der Mehrzahl bisheriger Studien, welche die Produktmuster dieser Enzyme aus Arachidonsäure beschreiben, wurden die Hydroxylierungsprodukte nicht erfasst. Die hier dargestellten Daten zeigen, dass 19-HETE ein Nebenprodukt der CYP2C9-abhängigen Monooxygenierung von Arachidonsäure ist, und dass CYP2C8 die sub-terminale Hydroxylierung an verschiedenen Positionen der Fettsäure katalysiert: (ω -n)-HETE machen 15% der Produkte von CYP2C8 aus (Abbildung 3-1). Rifkind et al. konnten in mit CYP2C8 und CYP2C9 mittels Vacciniavirus transfizierten HepG2 Zellen ebenfalls die Bildung von 18-HETE und anderen aliphatischen Hydroxylierungsprodukten beobachten [89]. Allerdings wurden dabei, wie auch in einigen anderen Arbeiten [96, 97], 19- und 20-HETE aufgrund nicht ausreichender chromatografischen Trennung lediglich als Summe erfasst. Die in dieser Arbeit bestimmten Produktmuster lassen schlussfolgern, dass 19-HETE, aber nicht 20-HETE, ein Produkt dieser CYP2C-Enzyme ist.

Auch CYP2C19, das dritte Mitglied der humanen CYP2C-Unterfamilie, katalysiert überwiegend die Bildung von Epoxyfettsäuren, wobei in vergleichbarem Umfang auch eine Hydroxylierung an Position C19 der Arachidonsäure erfolgt. Andere Hydroxylierungsprodukte sind als Nebenprodukte einzuordnen. Vergleichbare Produktmuster sind für dieses Enzym auch in der Literatur beschrieben [88, 96, 98]. Innerhalb der Epoxyfettsäuren wird 11(12)-EpETrE von CYP2C19 mit geringerer Rate gebildet als die anderen Regioisomere (Abbildung 3-1).

CYP3A4 ist allgemein bekannt für seine Rolle im Fremdstoffmetabolismus: Das Enzym oxidiert gering- bis mittelpolare Xenobiotika verschiedenster Größe, von 4-Acetaminophenol (Paracetamol), über Steroide bis hin zu Cyclosporin A [99, 100]. Rund die Hälfte aller auf dem Markt verfügbaren Wirkstoffe wird durch CYP3A4 metabolisiert [101]. Die hier dargestellten Resultate zeigen, dass CYP3A4 nicht nur die Bildung von Oxidationsprodukten von Xenobiotika katalysiert, sondern ebenso Fettsäuren monooxygeniert und somit zur endogenen Bildung von Lipidmediatoren beitragen kann. Dabei führt die CYP3A4-katalysierte Umsetzung von Arachidonsäure zu einem breiten Produktspektrum, in dem Epoxyfettsäuren überwiegen. Gleichzeitig sind alle Regioisomere aliphatischer und mittelkettiger Hydroxylierungsprodukte vertreten (Abbildung 3-1). Dieses Produktmuster stimmt gut mit Publikationen zur Epoxidierung [102] und Hydroxylierung [42, 103] von Arachidonsäure durch CYP3A4 überein. Es ist hervorzuheben, dass 20-HETE nicht durch dieses Enzym gebildet wird.

3.1.2 ω -hydroxylierende CYP

Konträr zum vielfältigen Produktmuster von CYP3A4 stellen sich die Produkte der Enzyme der CYP4-Familie dar: CYP4A11 und CYP4F2 bilden 20-HETE, das Produkt der ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure mit hohen Umsatzraten, während andere Produkte wie Epoxy- und allylische Hydroxyfettsäuren in den Inkubationen nicht zu detektieren sind (Abbildung 3-1). Neben 20-HETE wird in kleinerem Umfang auch 19-HETE gebildet: Dieses Oxylipin macht rund ein Drittel der gesamten Produkte von CYP4A11 und weniger als 10% an den Produkten von CYP4F2 aus. Vergleichbare Produktmuster sind auch für rekombinantes CYP4F2 sowie für aus humaner Leber isolierte CYP4 beschrieben. [96, 104]

3.1.3 (ω -n)-hydroxylierende CYP

Im Phase-I Metabolismus kleiner, polarer Moleküle spielt CYP2E1 eine entscheidende Rolle. Die hier dargestellten Daten zeigen, dass dieses P450-

Enzym auch Fettsäuren als Substrat akzeptiert. Aus der Oxidation von Arachidonsäure durch CYP2E1 resultiert überwiegend 19-HETE (64% der Gesamtprodukte), während 18-HETE und 20-HETE 8% beziehungsweise 9% der Gesamtprodukte ausmachen (Abbildung 3-1). Weitere aliphatische Hydroxyfettsäuren sowie Epoxyfettsäuren [insbesondere das 14(15)-Regioisomer] werden als Nebenprodukte gebildet, konsistent zu bereits bestehenden Daten zur Oxidation von Arachidonsäure durch CYP2E1 in transfizierten, humanen Hepatom-Zellen (HepG2) [89] und durch aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen gewonnenem rekombinanten CYP2E1 [88, 98].

Neben CYP2E1 oxidiert auch CYP1A1 Arachidonsäure vornehmlich zu (ω -n)-Hydroxyfettsäuren (Abbildung 3-1). Dabei werden alle 4 Regioisomere gebildet und machen 86% der Gesamtprodukte aus. Mit Anteilen von 47% und 22% an den Gesamtprodukten sind 19-HETE und 18-HETE als Hauptprodukte zu identifizieren. Vergleichbare Produktmuster sind von Schwarz et al. [105] (92% (ω -n)-HETE in Summe, 42% 19-HETE und 28% 18-HETE) und Choudhary et al. [106] (75% (ω -n)-HETE)) beschrieben, wobei letztere nicht zwischen 19- und 20-HETE differenzieren, und auch 16-, 17- und 18-HETE als Summe erfassen. Aus Rattenleber extrahiertes CYP1A1 weist ein mit dem humanen Enzym vergleichbares Produktmuster auf [87% (ω -n)-Hydroxylierungsprodukte, sowie 46% 19-HETE und 19% 18-HETE [107]], was die im Zusammenhang mit dem Phase-I Metabolismus von Xenobiotika beschriebene Konservierung der Sequenz zwischen verschiedenen Spezies unterstreicht [108].

Während CYP2E1 in der menschlichen Leber konstitutiv exprimiert wird, geht einer CYP1A1-Aktivität die Induktion durch exogene Aryl-Hydrocarbon- (Ah-) Rezeptor-Liganden voraus. Die Exposition mit β -Naphthoflavon oder 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin – beide Verbindungen sind starke Ah-Rezeptor-Agonisten – führt in zahlreichen Tiermodellen zu einer starken Erhöhung der CYP1A1 Aktivität, und damit auch zu veränderten Produktmustern der aus Arachidonsäure gebildeten Oxylipine [109].

3.1.4 Humane Leber- und Nierenmikrosomen

In der menschlichen Leber werden mehr CYP exprimiert als in jedem anderen humanen Gewebe. Folglich erscheinen mikrosomale Präparate, die aus hepatischem Gewebe gewonnen werden, als eine geeignete Quelle aktiver CYP, um die Oxylinbildung verschiedener CYP parallel in einem Multienzymassay zu untersuchen. In Inkubationen von Arachidonsäure mit humanen Lebermikrosomen (HLM) werden sowohl Epoxy- als auch Hydroxyfettsäuren gebildet. Im resultierenden Produktmuster machen EpETrE (und ihre Hydrolyse-Produkte DiHETrE) rund 50% aus, während die andere Hälfte von monohydroxylierten Fettsäuren geprägt ist, was gut übereinstimmt mit bisherigen Daten [42, 109, 110]. Innerhalb der Hydroxyfettsäuren überwiegen 19-HETE und 20-HETE. 18-HETE ist als Nebenprodukt zu detektieren (Abbildung 3-1). Die Produktverteilung unterscheidet sich zwischen Mikrosomen einzelner Individuen zum Teil merklich, wobei eine höhere Bildungsrate von 19-HETE mit erhöhter CYP2E1-Aktivität (ermittelt durch den enzymespezifischen Umsatz des Modellsubstrats *p*-Nitrophenol) korreliert [89]. Da in dieser Arbeit ein HLM-Pool von 150 Donoren eingesetzt wurde (vgl. Kapitel 8), ist davon auszugehen, dass das Präparat eine repräsentative Verteilung und Aktivität der CYP aufweist.

Die Bildung von 20-HETE wird in der menschlichen Leber durch CYP4A11 und CYP4F2 katalysiert, wobei CYP4F2 ein etwas größerer Beitrag zugeschrieben wird [104, 111]. 20-HETE ist damit ein geeigneter Marker für die Aktivität der ω -hydroxylierenden Enzyme der CYP4-Familie in HLM in Abgrenzung zu anderen CYP der Arachidonsäure-Kaskade.

Auch für jedes untersuchte CYP innerhalb der Gruppe der Epoxygenasen (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 und CYP3A4) ist eine Expression des entsprechenden Gens in humanen hepatischen Geweben beschrieben [94, 112, 113]. Konsistent zu den ermittelten Produktmustern der einzelnen Enzyme macht 14(15)-EpETrE den größten Anteil innerhalb der Epoxyfettsäure-Regioisomere am Produktmuster von HLM aus (Abbildung 3-1). Die in HLM gebildeten Epoxyfettsäuren sind dabei überwiegend in Form ihrer Hydrolyseprodukte zu

detektieren. Dieser Umstand lässt eine Restaktivität der löslichen Epoxidhydrolase (sEH) im verwendeten Mikrosomenpräparat vermuten. Für die sEH sind sehr hohe Umsatzraten der Hydrolyse von EpETrE beschrieben, die mit der Nähe der Epoxy-Funktion hin zum Δ -Terminus der Fettsäure abnehmen [114, 115]. Im Gegensatz dazu wird von der mikrosomalen Epoxidhydrolase (mEH) 11(12)-EpETrE gegenüber 8(9)-EpETrE leicht und gegenüber 14(15)-EpETrE deutlich bevorzugt [116]. Auch wenn der sEH eine größere Bedeutung bei der Hydrolyse der Epoxyfettsäuren im menschlichen Körper zugeschrieben wird, weisen neuere Studien darauf hin, dass auch die mEH eine nennenswerte Rolle im Metabolismus biologisch aktiver Epoxyfettsäuren spielt [116]. Es ist wahrscheinlich, dass in der Membran lokalisierte Komplexe aus CYP und mEH unter den gegebenen experimentellen Bedingungen eine enzymatische Hydrolyse der Epoxyfettsäuren katalysieren [117-119].

Aus den Produktmustern der epoxidierenden CYP wird deutlich, dass kein EpETrE-Regioisomer das Produkt eines einzelnen Enzymes ist. Daher kann keines dieser Oxylipine allein als Marker für die Aktivität eines individuellen CYP dienen. Die in HLM gebildeten Epoxyfettsäuren können jedoch als Marker für die Aktivität epoxidierender CYP in Summe verwendet werden, was eine Abgrenzung zu anderen Produkten, und damit CYP-Familien, ermöglicht. Um die Hemmung von EpETrE-bildenden Isoformen in einem Multienzymassay zu untersuchen, werden die Produkte dieser Enzyme als Marker zusammengefasst. Dies umfasst die verschiedenen EpETrE-Regioisomere sowie die korrespondierenden DiHETrE. 5(6)-EpETrE und -DiHETrE sind von dieser Betrachtung auszunehmen, da von der Bildung eines Lactons auszugehen ist. Der resultierende zyklische Ester weist unter anderem eine andere Polarität als die eigentlichen CYP-Produkte auf, wodurch die quantitative Analyse mittels Flüssigkeitschromatografie verfälscht wird [37]. Da die Zyklisierung auch ohne vorherige enzymatische Hydrolyse der Epoxy-Gruppe durch eine intramolekulare Reaktion zwischen Epoxy- und Carbonsäurefunktion erfolgt, ist das zumeist als Parameter der sEH-Aktivität herangezogene Verhältnis zwischen Epoxid und Diol für das 5(6)-Regioisomer nur beschränkt aussagekräftig [37, 120, 121].

Um die Aktivität von CYP2E1 und CYP1A1 in einem Multienzymassay zu bemessen, dient die Bildung von 18-HETE als Indikator. 18-HETE, der repräsentative Metabolit dieser beiden Enzyme, trägt mit etwa 4% zu den in den mikrosomalen Inkubationen gebildeten Metaboliten bei (Abbildung 3-1). Die Bildung dieses Oxylipins in HLM kann auf das Vorhandensein von (ω -n)-hydroxylierenden CYP hinweisen und unterstreicht somit die Eignung von HLM für die Verwendung in einem Multi-Enzym-Assay zur Untersuchung der CYP-katalysierten Oxylipinbildung in Bezug auf (ω -n)-HETE. Auch wenn 19-HETE mit deutlich höheren Raten von den (ω -n)-hydroxylierenden CYP gebildet wird, ist die Verbindung als Marker ungeeignet, da sie auch ein Produkt zahlreicher weiterer Monooxygenasen wie CYP2C19 oder CYP4A11 ist. 18-HETE wird ausschließlich von CYP1A1 und CYP2E1 in größeren Mengen gebildet. Somit ist dieses Oxylipin ein geeigneter Marker für die Aktivität der (ω -n)-hydroxylierenden CYP.

In Übereinstimmung mit dem Produktmuster der in der menschlichen Leber aktiven CYP gehen mittelkettig-hydroxylierte Fettsäuren lediglich als Nebenprodukte aus den Inkubationen von Arachidonsäure mit HLM hervor (Abbildung 3-1). Dabei ist innerhalb dieser Produkte 12-HETE das dominierende Produkt, wie bereits an anderer Stelle beschrieben [41, 103]. Allylische HETE sind unspezifische Nebenprodukte von CYP1A1, der CYP2C-Unterfamilie und CYP3A4 (Abbildung 3-1). Sie können daher nicht als Marker für die Aktivität einzelner Enzyme oder Enzymfamilien innerhalb des CYP-Zweiges der Arachidonsäure-Kaskade angesehen werden. Insgesamt ist aufgrund der geringen Bildungsraten sowie der unspezifischen Regioselektivität bei der CYP-katalysierten Hydroxylierung von Arachidonsäure in allylischen Positionen davon auszugehen, dass die CYP-Superfamilie nur einen sehr beschränkten Beitrag zur endogenen Bildung der physiologisch relevanten Lipidmediatoren 5-HETE, 12-HETE und 15-HETE leistet. Als para- und autokrine Lipidmediatoren werden diese Oxylipine mit deutlich höheren Raten durch Lipoxygenasen über andere enzymatische Mechanismen gebildet.

Aus humanem Nierengewebe gewonnene Mikrosomen (HKM) setzen Arachidonsäure ebenfalls zu Oxylipinen um. Unter den resultierenden Produkten dominieren die Produkte der ω -hydroxylierenden CYP: 20-HETE und 19-HETE. Mit den hohen Gehalten von CYP4, die für die Niere beschrieben sind, ist dieses Produktmuster konsistent [91, 122-124]. 5-HETE und die EpETrE-Regioisomere (bestimmt als DiHETrE) werden nur in kleinem Umfang gebildet (Abbildung 3-2). Da 20-HETE in der Niere bedeutende physiologische Funktionen ausübt (Kapitel 2.1.3) ist ein solches von 20-HETE geprägte Produktmuster zu erwarten.

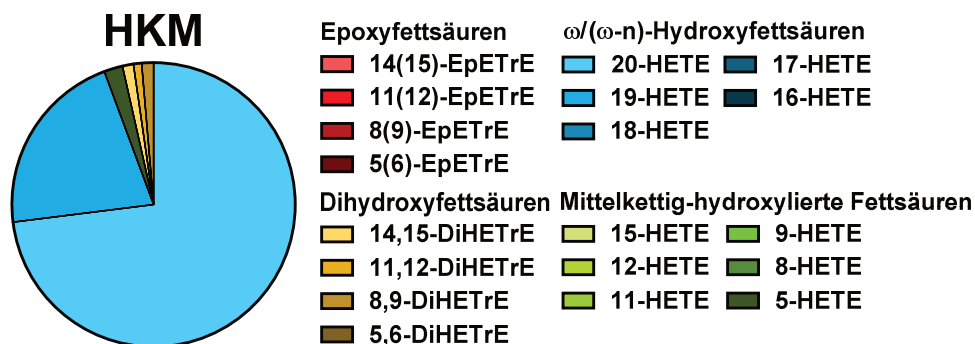


Abbildung 3-2 Produktmuster der in HKM aus Arachidonsäure gebildeten Oxylipine. 100 μ M Arachidonsäure wurden mit 0.5 mg HKM Protein mL⁻¹ und einem NADPH-generierenden System (1 mM NADPH) als Kosubstrat bei 37 °C für 20 min inkubiert.

Aufgrund der nur marginalen EpETrE-Bildung durch HKM sind diese Mikrosomen ungeeignet für die weitere Betrachtung des gesamten CYP-Zweigs der Arachidonsäure-Kaskade. Im Vergleich zu HLM sind in HKM die absoluten Gehalte an CYP4 geringer, was in einer vierfach geringeren Bildungsrate von 20-HETE resultiert [91]. Mikrosomen aus humaner Leber sind demnach die geeignetere Multienzymquelle zur parallelen Untersuchung der verschiedenen CYP der Arachidonsäure-Kaskade.

3.2 Humane Lebermikrosomen als Multienzymassay

Um die parallele und unabhängige Modulation der CYP-katalysierten ω -Hydroxylierung, (ω -n)-Hydroxylierung und Epoxidierung von Arachidonsäure

in HLM weiter zu charakterisieren, wurden eine Reihe selektiver sowie unselektiver CYP-Inhibitoren eingesetzt (Abbildung 3-3) und deren Potenz im HLM-Assay bestimmt.

Die beiden Imidazolderivate Ketoconazol und Miconazol hemmen die Bildung aller drei Produktgruppen in HLM mit IC_{50} -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich (Tabelle 3-1). Bei diesen Verbindungen, die als Antimykotika eingesetzt werden, handelt es sich um unspezifische CYP-Inhibitoren. Nichtsdestoweniger variieren die Potenz und die Selektivität zwischen den einzelnen Verbindungen [125].

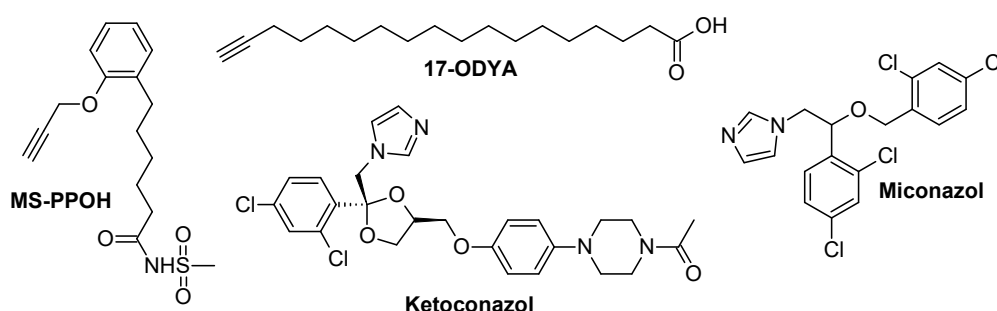


Abbildung 3-3 Chemische Struktur der verwendeten CYP-Inhibitoren. Die Imidazolderivate Ketoconazol und Miconazol wurden als unselektive Inhibitoren eingesetzt. 17-ODYA stellt einen selektiven ω -Hydroxylaseinhibitor dar, und MS-PPOH ist als selektiver Epoxygenaseinhibitor beschrieben.

Die Bildung von EpETrE in HLM, und damit die Aktivität der Epoxygenasen CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 und CYP3A4, wird durch Miconazol mit einem IC_{50} von 3 μ M gehemmt (Tabelle 3-1). Eine vergleichbare Potenz ist für diese Verbindung bei der Inhibition der Oxidation von Nifedipin durch CYP3A4 (IC_{50} 0.1 μ M), der Tolbutamid-Hydroxylierung durch CYP2C9 (IC_{50} 2.0 μ M) und der S-Mephenytoin 4'-Hydroxylierung durch CYP2C19 (IC_{50} 0.3 μ M) in HLM beschrieben [126]. Ketoconazol hemmt die EpETrE-Bildung etwas weniger effizient, mit einem IC_{50} von 25 μ M. Auch dies ist konsistent mit den Literaturwerten für einzelne CYP: Diese liegen, in Abhängigkeit des Enzymes sowie der Enzymquelle und der gewählten Modellreaktion, in einem Bereich von 0.4 μ M-7 μ M, [127-129]. Die Bildung von 20-HETE wird durch die nicht-selektiven CYP-Inhibitoren mit einem IC_{50} -Wert von 8 μ M gehemmt. Für Ketoconazol ist

eine Inhibition von CYP4F2 in vergleichbarer Größenordnung bereits beschrieben [127]. Die etwas geringere Potenz von Ketoconazol im Vergleich zu Miconazol bei der Inhibition der Bildung von (ω -n)-HETE deutet auf unterschiedliche Selektivität der beiden Verbindungen hin. Vergleichbare Effekte können auch bei der Verwendung von Modellsubstraten für CYP2E1 und CYP1A1 beobachtet werden [127, 130].

Die eingesetzten, unspezifischen CYP-Inhibitoren hemmen die gesamte Oxylinbildung in HLM und beeinflussen die verschiedenen Enzymgruppen mit vergleichbarer Potenz. Der hier vorgestellte Assay und die Inhibitoren sind daher geeignet neue Verbindungen mit vergleichbaren unspezifischen Wirkungen auf CYP zu charakterisieren.

Tabelle 3-1 Inhibition der Oxylinbildung in humanen Lebermikrosomen durch CYP-Inhibitoren.^a

	IC₅₀ [μM] (95% CI)			
	17-ODYA	MS-PPOH	Ketoconazol	Miconazol
20-HETE	0.6 (0.3–1)	100 μ M: < 50% Inhibition	7.8 (5.0–12)	8.5 (4.1–18)
18-HETE	100 μ M: < 50% Inhibition	100 μ M: < 50% Inhibition	69^c (25–193)	17 (8.4–33)
EpETrE^b	100 μ M: < 50% Inhibition	6.2 (2.1–18)	25 (17–37)	3.1 (2.3–4.1)

^aArachidonsäure (100 μ M) wurde mit 0.5 mg HLM Protein mL⁻¹ für 20 min mit einem NADPH-generierenden System inkubiert. Die dosisabhängige Inhibition der Produktbildung wurde in einem Konzentrationsbereich von 0.01–100 μ M des Inhibitors bestimmt. Die IC₅₀-Werte und die entsprechenden 95%-Konfidenzintervalle (CI) wurden auf Grundlage der Produktbildung und relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor berechnet.

^bEpETrE bezeichnet die Summe von 8(9)-, 11(12)- und 14(15)-EpETrE und -DiHETrE

^cMit der höchsten getesteten Konzentration (100 μ M) wurden 71% Inhibition erreicht.

Im Folgenden wurden die selektiven CYP-Inhibitoren 17-ODYA und MS-PPOH im HLM-basierten Multienzymassay getestet. Dabei hemmt 17-ODYA die Bildung von 20-HETE mit einem IC₅₀-Wert von 0.6 μ M, ohne die Bildung von 18-HETE oder EpETrE zu beeinträchtigen. Im Gegensatz dazu hemmt MS-PPOH die

Epoxidierung der Arachidonsäure (IC_{50} : 6 μ M), verringert aber nicht die Hydroxylierungsrate der Fettsäure (Tabelle 3-1). MS-PPOH ist als Epoxygenase-selektiver CYP-Inhibitor *in vitro* beschrieben. Mit einem IC_{50} -Wert von 13 μ M hemmt die Verbindung die Epoxidierung von Arachidonsäure in Nierenrindenmikrosomen der Ratte [131]. *In vivo* führt die Behandlung von Ratten mit MS-PPOH zu einer verringerten EpETrE-Bildung in anschließend präparierten Nierenmikrosomen, während keine Veränderungen bei der Bildung von 19- oder 20-HETE beobachtet wird [132]. Die Selektivität von 17-ODYA ist weniger einheitlich: Obwohl diese Verbindung als selektiver und irreversibler Inhibitor von ω -Hydroxylasen entwickelt und weithin eingesetzt wurde [133], ist in weiterführenden Studien auch eine Blockade der Arachidonsäure-Epoxidierung im niedrigen mikromolaren Bereich beschrieben [131]. In den hier durchgeführten Experimenten verhält sich 17-ODYA den Erwartungen entsprechend wie ein selektiver ω -Hydroxylaseinhibitor.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Oxylipinbildung in HLM durch eine spezifische Hemmung einzelner CYP selektiv moduliert werden kann. Der eingesetzte Multienzymassay ist folglich ein geeignetes Instrument für die parallele und dennoch unabhängige Untersuchung von terminal- und subterminalhydroxylierenden CYP, sowie von Epoxygenasen.

Der Einsatz von HLM als Quelle komplexer Enzymgemische findet bei zahlreichen Fragestellungen Anwendung: HLM werden für die Untersuchung isoformspezifischer UDP-Glucuronosyltransferase-Aktivität [134] oder für die Identifizierung von CYP4A-selektiven Inhibitoren verwendet [135]. Auch die Aktivitätsmessung einzelner CYP erfolgt unter Einsatz von HLM [136-138]. Bei diesen Ansätzen wird jedoch nicht der Metabolismus endogener Substrate berücksichtigt – stattdessen konzentrieren sich die Studien auf den Metabolismus von Modellsubstanzen als Surrogate für Xenobiotika. Des Weiteren sind für CYP spezifische und selektive Fluoreszenzassays beschrieben, die Hochdurchsatzanalysen (HTS) ermöglichen [139]. Die Verfügbarkeit von Fluoreszenzsonden ist jedoch auf einige P450-Enzyme

beschränkt. Außerdem schränkt der Modellcharakter dieser Verbindungen die Genauigkeit der Tests ein und kann sogar irreführende Resultate verursachen. Beispielsweise ergeben sich aus einem auf 7-Methoxy-4-trifluormethylcumarin (MFC) basierendem CYP2C9-Assay zehnfach niedrigere IC_{50} -Werte im Vergleich zu dem hier beschriebenen Assay, der auf einem natürlichen Substrat beruht (Appendix 1). Für andere als durch CYP-katalysierte Enzymreaktionen sind ähnliche Diskrepanzen zwischen natürlichen und synthetischen Substraten beschrieben [140, 141]. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, zur Untersuchung der Modulation der Aktivität eines Enzyms nicht ausschließlich Modellsubstrate heranzuziehen, sondern der Verwendung eines natürlichen Substrates Vorzug zu geben. Das hier beschriebene Multienzymassay ist folglich ein unverzichtbares Instrument für die Erforschung der CYP-katalysierten Oxylinbildung, welches die parallele und unabhängige Betrachtung der Epoxidierung, ω -Hydroxylierung und (ω -n)-Hydroxylierung von Arachidonsäure, einem natürlichen Substrat der Enzyme, ermöglicht.

3.3 Inhibition der CYP-katalysierten Oxylinbildung durch natürliche Polyphenole

Im nächsten Schritt wurden pflanzliche Polyphenole auf ihre Wirksamkeit und Selektivität bei der Inhibition der CYP-katalysierten Oxidation der Arachidonsäure getestet. Die Auswahl umfasste drei Flavone (Apigenin, Nobiletin und Wogonin), das Isoflavon Genistein, das Flavanon Naringenin, das Anthocyanidin Pelargonidin, das Flavanolkonjugat Epigallocatechingallat (EGCG) sowie das Stilben Resveratrol, sein Dimer ϵ -Viniferin, sein Tetramer Hopeaphenol und ein synthetisches Resveratrol-Imin-Analogon (IRA) (Abbildung 3-4). Der HLM-basierte Multienzymassay wurde verwendet, um die hemmende Wirkung von Polyphenolen bei einer Screening-Konzentration von 10 μ M zu testen. Alle Verbindungen, die 50% der Bildung von (i) 20-HETE, (ii) (ω -n)-HETE und/oder (iii) EpETrE hemmten, wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt. Zur Beurteilung der Potenz wurden IC_{50} -Werte bestimmt. Auf gleichem Wege wurde

auch die selektive Inhibition einzelner CYP durch die aktiven Polyphenole ermittelt. Die ω -hydroxylierenden Enzyme CYP4F2 und CYP4A11, die (ω -n)-hydroxylierenden Enzyme CYP2E1 und CYP1A1 sowie die epoxidierenden Isoformen CYP2C9, CYP2C19, CYP2C8 und CYP3A4 wurden dabei verwendet.

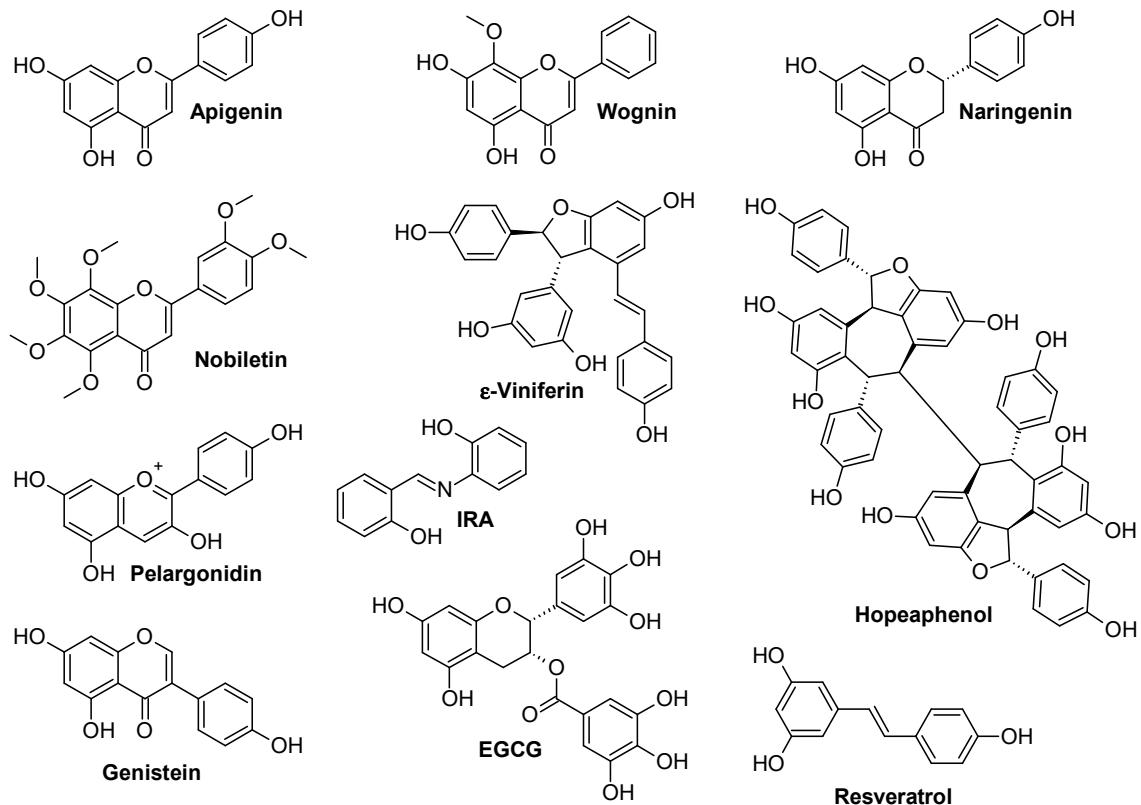


Abbildung 3-4 Chemische Struktur der getesteten Polyphenole. Von der Auswahl wurden Flavone (Apigenin, Wogonin, Nobiletin), Flavanone (Naringenin), Isoflavone (Genistein), Anthocyanidine (Pelargonidin), Catechine [Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG)], Stilbenoide (Resveratrol, ϵ -Viniferin, Hopeaphenol) sowie das synthetische Resveratrol-Derivat IRA abgedeckt.

3.3.1 Epoxygenase- und ω -Hydroxylaseinhibition durch Stilbenoide

Die Mehrheit der getesteten Polyphenole zeigt eine inhibitorische Wirkung auf die Oxylinbildung in HLM (Tabelle 3-2). Allerdings reduzieren weder Resveratrol noch sein Imin-Analogon die Oxylinbildung in HLM bei einer Konzentration von 10 μ M um mehr als 50%. Gleiches gilt für das

Tabelle 3-2 Screening natürlicher Polyphenole auf CYP-Inhibition.

Die inhibitorischen Effekte der Polyphenole sowie CYP-Inhibitoren (10 µM) auf die CYP-katalysierte Oxylipinbildung wurden in HLM sowie einzelnen CYP bestimmt. Die Inhibition wurde basierend auf der Menge gebildeter Produkte und relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor berechnet (100 - % der Kontrolle).

	Polyphenole											CYP -Inhibitoren			
	EGCG	Pelargonidin	Naringenin	Apigenin	Nobiletin	Wogonin	Genistein	Resveratrol	ε-Viniferin	Hopaphenol	IRA	Ketoconazol	MS-PPH	17-ODYA	
20-HETE	HLM	24%	< 15%	< 15%	71%	< 15%	< 15%	53%	20%	57%	63%	< 15%	67%	< 15%	81%
	CYP4F2	a ₋	a ₋	a ₋	53%	a ₋	68%	a ₋	a ₋	> 90%	> 90%	a ₋	> 90%	< 15%	> 90%
	CYP4A11	a ₋	a ₋	a ₋	32%	a ₋	< 15%	< 15%	a ₋	32%	33%	a ₋	< 15%	< 15%	48%
18-HETE	HLM	18%	< 15%	< 15%	> 90%	57%	< 15%	< 15%	41%	29%	42%	26%	31%	17%	< 15%
	CYP2E1	a ₋	a ₋	a ₋	> 90%	< 15%	a ₋	a ₋	a ₋	a ₋	a ₋	a ₋	38%	< 15%	< 15%
	CYP1A1	a ₋	a ₋	a ₋	> 90%	> 90%	> 90%	a ₋	a ₋	a ₋	a ₋	a ₋	> 90%	< 15%	< 15%
EpETrE^b	HLM	< 15%	< 15%	16%	60%	43%	41%	< 15%	< 15%	54%	> 90%	< 15%	40%	35%	< 15%
	CYP2C19	a ₋	a ₋	a ₋	38%	a ₋	a ₋	a ₋	a ₋	83%	49%	a ₋	39%	< 15%	< 15%
	CYP2C9	a ₋	a ₋	a ₋	68%	a ₋	a ₋	a ₋	a ₋	> 90%	> 90%	a ₋	49%	49%	17%
	CYP2C8	a ₋	a ₋	a ₋	70%	a ₋	a ₋	a ₋	a ₋	86%	> 90%	a ₋	66%	< 15%	24%
	CYP3A4	a ₋	a ₋	a ₋	< 15%	a ₋	a ₋	a ₋	a ₋	< 15%	< 15%	a ₋	92%	< 15%	20%

< 15% Inhibition

> 90% Inhibition

^a Nicht getestet in CYP, da die Inhibition in HLM weniger als 50% betrug;

^b EpETrE bezeichnet die Summe von 8(9), 11(12)- und 14(15)-EpETrE und DiHETrE

Grüntee-Polyphenol EGCG im verwendeten Multienzymassay (Tabelle 3-2). Insgesamt hemmen sechs von elf Polyphenolen die Bildung von mindestens einer Oxylin-Produktgruppe bei einer Konzentration von 10 μM um mehr als 50%. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen liegen die resultierenden IC_{50} -Werte im niedrigen mikromolaren oder submikromolaren Bereich (Tabelle 3-3).

Die Bildung von 20-HETE wird im Multienzymassay durch die Flavonoide Apigenin und Genistein (IC_{50} : 5 bzw. 15 μM), sowie die Resveratrol-Oligomere ϵ -Viniferin und Hopeaphenol gehemmt (IC_{50} : 13 bzw. 7 μM) inhibiert (Tabelle 3-3). Neben der ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure hemmen ϵ -Viniferin und Hopeaphenol auch die Bildung von Epoxyfettsäuren, während Resveratrol und IRA auch die epoxidierenden CYP nicht beeinflussen (Tabelle 3-2). Die Inhibition der EpETrE-Bildung durch Apigenin, ϵ -Viniferin und Hopeaphenol ist einer Inhibition von CYP2C9 und CYP2C8 zuzuschreiben. CYP3A4, welches ebenfalls zur Bildung von Epoxyfettsäuren beiträgt, wird von keinem der getesteten Polyphenole inaktiviert (Tabelle 3-2). Interessanterweise wird CYP2C19 durch ϵ -Viniferin stark gehemmt, während Hopeaphenol und Apigenin nur eine moderate Inhibition dieses Enzyms bewirken. Im Kontrast dazu werden die anderen Mitglieder der CYP2C-Unterfamilie (CYP2C8 und CYP2C9) von ϵ -Viniferin, Hopeaphenol sowie Apigenin mit IC_{50} -Werten zwischen 0.36 und 10 μM gehemmt (Tabelle 3-3). Auch wenn sich die Aminosäuresequenzen innerhalb dieser Unterfamilie nur geringfügig unterscheiden (< 10% Unterschied zwischen CYP2C9 und CYP2C19), sind signifikante Unterschiede in der Substratspezifität und Struktur beschrieben [142, 143]. Es ist zu schlussfolgern, dass die Variation in der Aminosäuresequenz am aktiven Zentrum der Enzyme auch die Bindung von Polyphenolen und die daraus resultierende Inhibition beeinflusst.

Die reduzierte Bildung von 20-HETE im Multienzymassay ist auf eine Inhibition des ω -hydroxylierenden CYP4F2 zurückzuführen. Die Aktivität von CYP4A11 wird von den eingesetzten Polyphenolen nur in geringem Maße beeinflusst (Tabelle 3-2). CYP4F2 wird von Apigenin mit einem IC_{50} von 8.4 μM gehemmt.

Die anderen getesteten Flavone (d.h. Nobiletin und Wogonin) interagieren nicht mit diesem Enzym. Das Isoflavon Genistein hemmt CYP4F2 mit einer vergleichbaren Potenz wie Apigenin (IC_{50} 5.4 μ M; Tabelle 3-3). Die Beobachtung, dass ϵ -Viniferin bei einer Konzentration von 10 μ M die CYP4A11-katalysierte 20-HETE-Bildung um weniger als 50% hemmt (Tabelle 3-2), deckt sich mit der von Piver et al. [144] beschriebenen Inhibition der CYP4A-katalysierten Hydroxylierung von Laurinsäure in HLM durch dieses Stilbenderivat mit einem IC_{50} von 15 μ M. Resveratrol hemmt die Bildung von 20-HETE in HLM bei einer Konzentration von 10 μ M um 20% (Tabelle 3-2). In anderen Arbeiten ist unter gleichen Bedingungen eine Inhibition von 32% beschrieben [103]. Dabei wird ein IC_{50} von 3.5 μ M für die Inhibition der ω -Hydroxylasen in HLM durch Resveratrol bestimmt. Des Weiteren wird das Stilben von den Autoren als selektiver CYP4F2-Inhibitor eingestuft, da dieses Enzym von Resveratrol mit einem IC_{50} von 4.0 μ M gehemmt wird, während CYP4A11 nur geringfügig beeinflusst wird (IC_{50} 90 μ M) [103]. Letzteres ist gut zu vereinbaren mit den hier beobachteten marginalen Effekten der untersuchten Polyphenole auf die CYP4A11-Aktivität. Die von Resveratrol im Multienzymassay gezeigte geringe Potenz führt jedoch zu dem Schluss, dass diese Verbindung unter unseren Inkubationsbedingungen kein (selektiver) ω -Hydroxylaseinhibitor ist. Es sei angemerkt, dass der hier beschriebene Assay andere ω -Hydroxylaseinhibitoren mit IC_{50} -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich zuverlässig identifiziert.

CYP4A11 wird im Vergleich zu CYP4F2 deutlich weniger durch Polyphenole inhibiert. Eine abschließende Erklärung kann hier nicht gegeben werden. Die reine Größe der Polyphenole scheint nicht die Ursache zu sein, da sowohl das verhältnismäßig kleine Apigenin als auch das sperrige Hopeaphenol keine Inhibition von CYP4A11 hervorrufen. Es ist wahrscheinlich, dass sich die aktiven Zentren bzw. die jeweiligen Bindungstaschen der beiden Enzyme strukturell unterscheiden. Somit sind auch die strukturellen Ansprüche an eine Verbindung, die zur Hemmung der katalytischen Aktivität der beiden CYP erforderlich ist, verschieden. Experimentelle kristallographische Daten über die Strukturen von CYP4A11 und CYP4F2 sind in der Literatur bisher jedoch nicht beschrieben.

Tabelle 3-3 Inhibition der Oxylipinbildung in HLM und CYP durch Polyphenole.^a

	IC ₅₀ [µM] (95% CI)						CYP-Inhibitoren		
	Polyphenole						17-ODYA	Ketocozazol	
	Apigenin	Nobiletin	Wogonin	Genistein	ε-Viniferin	Hopeaphenol			
20-HETE	HLM	5.4 (2.9–10)	48^c (11–220)	100 µM: < 50% Inhibition	15 (5.5–46)	13 (7.7–20)	7.3 (4.4–12)	0.6 (0.3–1)	7.8 (5.0–12)
	CYP4F2	8.4 (4.9–14)	-	-	5.4 (3.1–9.5)	0.82 (0.48–1.4)	2.8 (1.8–4.3)	0.4 (0.3–0.5)	0.24 (0.18–0.31)
18-HETE	HLM	1.6 (1.0–2.5)	10 (2.5–42)	0.22 (0.07–0.70)	100 µM: < 50% Inhibition	39^e (10–140)	35 (15–76)	100 µM: < 50% Inhibition	69^f (25–193)
	CYP2E1	1.0 (0.48–2.0)	-	-	-	-	-	-	-
	CYP1A1	0.90 (0.68–1.2)	2.9 (1.8–4.8)	0.15 (0.10–0.22)	-	-	-	-	0.36 (0.26–0.51)
EpETE^b	HLM	6.6 (4.4–9.8)	41^d (19–86)	100 µM: 55% Inhibition	100 µM: < 50% Inhibition	16 (8.9–28)	2 (1.3–3.0)	100 µM: < 50% Inhibition	25 (17–37)
	CYP2C19	-	-	-	-	6.7 (4.9–9.3)	-	-	-
	CYP2C9	10 (3.6–29)	-	-	-	2.3 (1.6–3.3)	0.36 (0.26–0.50)	-	-
	CYP2C8	2.7 (1.9–3.8)	-	-	-	0.87 (0.68–1.1)	1.5 (1.1–2.1)	-	4.0 (3.5–4.5)

^aArachidonsäure (100 µM) wurde mit 0.5 mg HLM Protein mL⁻¹ oder 25 pmol CYP mL⁻¹ für 20 min mit einem NADPH-generierenden System inkubiert. Die dosisabhängige Inhibition der Produktbildung wurde in einem Konzentrationsbereich von 0.01–100 µM des Inhibitors bestimmt. Die relativen IC₅₀-Werte und die entsprechenden 95%-Konfidenzintervalle (CI) wurden auf Grundlage der Produktbildung relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor berechnet.

^bEpETE bezeichnet die Summe von 8(9), 11(12)- und 14(15)-EpETE und DiHETE

^c mit der höchsten eingesetzten Konzentration (100 µM) wurde 67% Inhibition erreicht.

^d mit der höchsten eingesetzten Konzentration (100 µM) wurde 58% Inhibition erreicht.

^e mit der höchsten eingesetzten Konzentration (100 µM) wurde 76% Inhibition erreicht.

^f mit der höchsten eingesetzten Konzentration (100 µM) wurde 71% Inhibition erreicht.

"-" nicht bestimmt [$< 50\%$ Inhibition im Screening (10 µM)]

3.3.2 Flavonoide als selektive Inhibitoren CYP-katalysierter Arachidonsäure-Hydroxylierung

Die Bildung von 18-HETE in HLM wird durch Wogonin mit hoher Potenz (IC_{50} : 0.22 μ M) gehemmt, während Nobiletin einen etwas weniger potenten Inhibitor darstellt (IC_{50} : 10 μ M). Das dritte untersuchte Flavon Apigenin hemmt die 18-HETE-Bildung in HLM mit einem IC_{50} von 1.5 μ M. Interessanterweise ist das Apigenin-Isomer Genistein als selektiver ω -Hydroxylase-Inhibitor einzuordnen, der (ω -n)-hydroxylierende CYP nicht inhibiert. Das Flavanon Naringenin und das Anthocyanidin Pelargonidin – beide weisen Substitutionsmuster analog zu dem des Apigenins auf – zeigen keine inhibitorischen Effekte auf die CYP-katalysierte Oxylinbildung in HLM (Tabelle 3-2). Die Inhibition der 18-HETE Bildung in HLM durch Apigenin basiert auf einer nicht-selektiven Hemmung von CYP2E1 und CYP1A1 mit IC_{50} -Werten von 1.0 und 0.9 μ M (Tabelle 3-2, Tabelle 3-3). Die beiden anderen getesteten Flavone Wogonin und Nobiletin inhibieren selektiv CYP1A1, ohne die Aktivität von CYP2E1 zu beeinflussen (Tabelle 3-2, Tabelle 3-3). Wogonin ist in der Literatur bereits als selektiver CYP1A-Inhibitor beschrieben (IC_{50} CYP1A2: 0.27 μ M). Von CYP3A4, CYP2E1, CYP2C9 und CYP2C19 katalysierte Modellreaktionen in HLM werden nicht inhibiert [145]. Docking-Simulationen von CYP1A2 mit dem Flavon Apigenin legen nahe, dass sich das Polyphenol mit einer Ausrichtung des B-Rings zum Häm im katalytischen Zentrum des Enzyms platziert. Ein Hydroxy-Substituent an C4'-Position ist dabei für diese Wechselwirkung nicht Voraussetzung. Vielmehr trägt eine Wechselwirkung zwischen dem A-Ring des Flavons und dem Phenylring des Phe226 in der Aminosäuresequenz des Proteins zur Bindungsaffinität bei. Isoflavone wie Genistein interagieren nicht auf diese Weise mit dem aktiven Zentrum von CYP1A2 [146]. Ein Übertragen dieser Befunde auf das strukturell verwandte CYP1A1 kann als Erklärung für die potente Inhibition des Enzyms durch die Flavone Wogonin und Apigenin und die nicht vorliegende Wirkung von Genistein und Naringenin herangezogen werden.

Die Epoxygenaseaktivität in HLM wird von keinem der getesteten Flavonoide, Apigenin ausgenommen, inhibiert. Die fehlende Inhibition der EpETrE- sowie (ω -n)-HETE-Bildung durch Genistein ist konsistent mit Ergebnissen von Kopečná-Zapletalová et al. [145], die keine relevante Inhibition ($IC_{50} > 20 \mu\text{M}$) von CYP2C-, CYP3A4-, CYP2E1- und CYP1A1-katalysierten Modellreaktionen durch diese Verbindung und andere Isoflavonderivate beschreiben. Die chemische Struktur der Isoflavone, nicht aber der Flavanone, Flavone und Anthocyanidine, ermöglicht offenbar eine Interaktion mit CYP4F2, während sie eine Inhibition anderer CYP verhindert. Die planare Struktur der (Iso-) Flavone scheint ein essentielles Strukturmerkmal für die Interaktion mit CYP zu sein: Das aufgrund der sp^3 -Hybridisierung des Kohlenstoffs C2 im C-Ring nicht planare Flavanon Naringenin zeigt keine Inhibition der CYP-katalysierten Oxylinbildung (Tabelle 3-2).

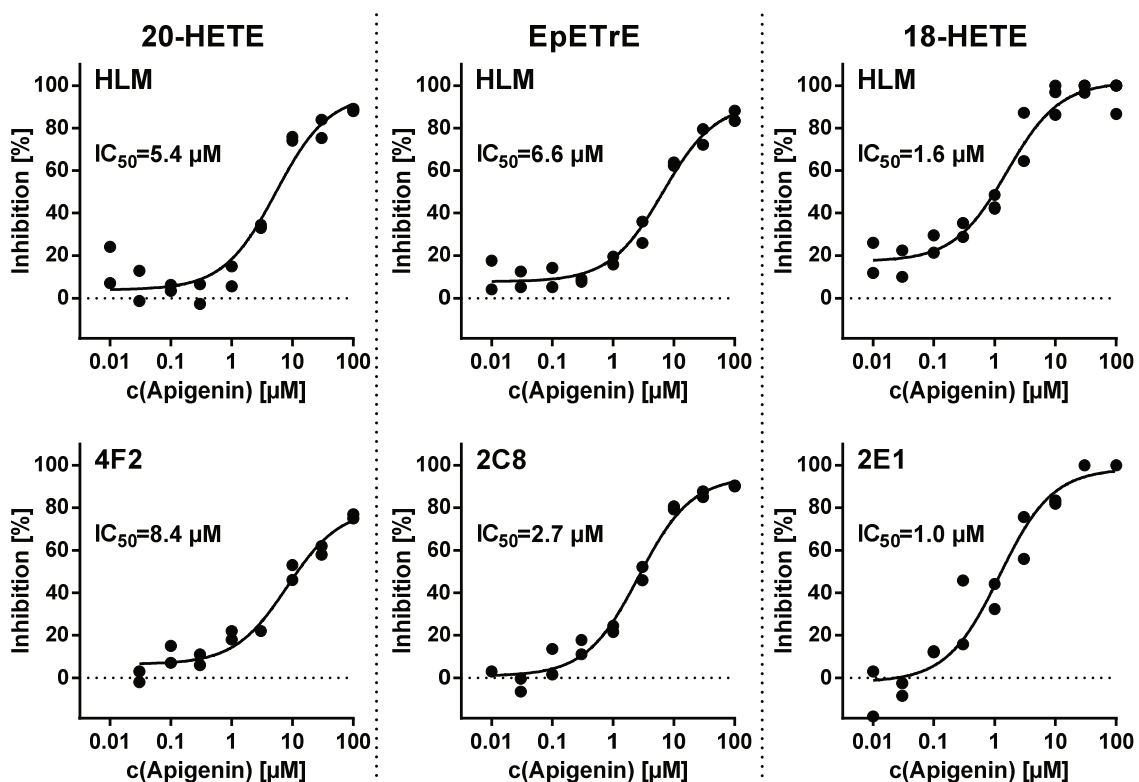


Abbildung 3-5 Inhibition der Oxylinbildung in HLM und CYP durch Apigenin. Die Inhibition wurde auf Grundlage der Produktbildung relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor berechnet. Die relativen IC_{50} -Werte wurden durch einen Fit der Daten an eine logistische Funktion (4 Parameter) bestimmt.

Unabhängig von etwaigen Struktur-Wirkungsbeziehungen ist hervorzuheben, dass Apigenin einen hochpotenten und nicht selektiven CYP-Inhibitor darstellt. Während Apigenin CYP3A4 – das Enzym, das für den Metabolismus von mehr als 50% der derzeit zugelassenen Arzneimittel verantwortlich ist – nicht blockiert, werden die meisten anderen der getesteten CYP inhibiert. Dabei wird die Bildung von EpETrE, 20-HETE und (ω -n)-HETE aus Arachidonsäure, einem endogenen Substrat der Enzyme, mit vergleichbarer Potenz inhibiert (Abbildung 3-5, Tabelle 3-3).

Die Inhibition der Oxylinbildung in HLM durch Apigenin ändert sich nicht mit der Dauer der Vorinkubation (0–30 min). Es ist zu schlussfolgern, dass es sich um einen zeitunabhängigen Inhibitionsmechanismus handelt. Im fluoreszenz-basierten CYP2C9-Assay steigt die Michaelis-Menten-Konstante der CYP2C9-katalysierten MFC-Demethylierung von 22–26 μ M ohne Inhibitor auf 58–70 μ M durch 0.1 μ M Hopeaphenol sowie auf 97–119 μ M durch 5 μ M Apigenin an. Im Gegensatz dazu ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit in allen Experimenten vergleichbar (120–140, 80–110 und 120–130 μ mol min⁻¹ pmol CYP⁻¹), was auf einen vorwiegend kompetitiven Inhibitionsmechanismus hindeutet. Die Polyphenole werden nicht, mit Ausnahme von Nobiletin, unter den gegebenen Versuchsbedingungen durch HLM oxidativ metabolisiert (Appendix 3, Appendix 4), und scheinen somit als kompetitive Inhibitoren zu agieren.

Die hier gezeigten Daten lassen schlussfolgern, dass pflanzliche Polyphenole mit hoher Potenz und bemerkenswerter Selektivität die Bildung von Lipidmediatoren durch CYP inhibieren. Schon auf Basis weniger ausgewählter Verbindungen lassen sich grundlegende Struktur-Wirkungsbeziehungen ableiten, die es weiter zu untersuchen gilt. Außerdem sind die Effekte in weiteren, komplexeren *in vitro* Testsystemen zu bestätigen. Neben der Interaktion mit CYP sind unter anderem auch Informationen über die intestinale Resorption essentiell, um mögliche physiologische Wirkungen ableiten zu können.

3.3.3 Inhibition von CYP2J2

CYP2J2 ist ein weiteres Mitglied der CYP2-Familie, welches eine bedeutende Rolle bei der Bildung physiologisch relevanter Epoxyfettsäuren spielt. CYP2J2 katalysiert die Epoxidierung an allen vier Doppelbindungen der Arachidonsäure in vergleichbaren Anteilen, wobei das 14(15)-EpETrE-Regioisomer mit einem Anteil von 34% an der Summe der Epoxyfettsäuren leicht überwiegt. Außerdem wird die Hydroxylierung an C19-Position der Arachidonsäure katalysiert (Abbildung 3-6). Weitere Hydroxyfettsäuren werden nicht gebildet. Frühe Literaturdaten kategorisieren CYP2J2 ebenfalls als Epoxygenase mit leichter Bevorzugung der (ω -6)-Position [52, 98]. In neueren Studien wird auch das Hydroxylierungsprodukt 19-HETE erfasst [88, 147], wobei es Hinweise gibt, dass das Verhältnis der Produkte untereinander durch funktionelle Polymorphismen des *CYP2J2*-Gens beeinflusst wird [147].

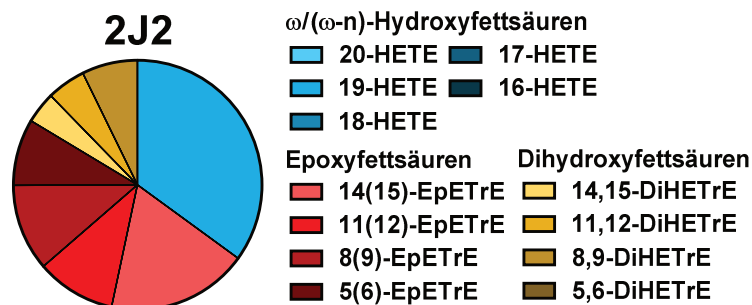


Abbildung 3-6 Produktmuster der Oxidation von Arachidonsäure durch CYP2J2. 100 μ M Arachidonsäure wurden mit 25 pmol CYP2J2 mL⁻¹ und einem NADPH-generierenden System (1 mM NADPH) als Cosubstrat bei 37 °C für 40 min inkubiert.

Innerhalb der hepatischen CYP macht CYP2J2 nur einen kleinen Anteil aus und trägt in diesem Organ wenig zum Phase-I Metabolismus von Xenobiotika bei [148]. Große Mengen von CYP2J2 wurden auf mRNA- und Proteinebene zunächst im Gewebe des menschlichen Herzens nachgewiesen [52], später auch im Gastrointestinaltrakt, insbesondere im Ileum [53], sowie im Endothel von Blutgefäßen [51]. Die von CYP2J2 aus Arachidonsäure gebildeten Metabolite wirken folglich als auto- oder parakrine Mediatoren unmittelbar am Bildungsort, wo sie unter anderem als *endothelium-derived hyperpolarizing factor* an der

Regulation des Gefäßtonus beteiligt sind [10, 57]. Das auf Mikrosomen aus hepatischem Gewebe basierende Multienzymassay (Kapitel 3.2) repräsentiert CYP2J2 nicht. Um die Interaktion von Lebensmittelinhaltsstoffen mit diesem wichtigen CYP der Arachidonsäure-Kaskade zu betrachten, ist folglich das isolierte Enzym heranzuziehen. Es wurde die gleiche Polyphenolauswahl getestet, die auch im HLM-Assay untersucht wurde. Sowohl der unselektive CYP-Inhibitor Ketoconazol als auch der Epoxygenaseinhibitor MS-PPOH hemmen, wie erwartet, die CYP2J2-katalysierte EpETrE-Bildung mit IC_{50} -Werten im niedrigen mikromolaren bzw. submikromolaren Bereich. Der Hydroxylaseinhibitor 17-ODYA reduziert die CYP2J2-Aktivität, wie erwartet, nicht (Tabelle 3-4).

Die aus dem HLM-basierten Multienzymassay abgeleiteten Zusammenhänge zwischen Polyphenolen und den CYP der Arachidonsäure-Kaskade lassen sich auf CYP2J2 übertragen: Im Multienzymassay zeigten die Flavone Nobiletin und Wogonin keine inhibitorischen Effekte auf die Bildung von EpETrE durch Epoxygenasen (Kapitel 3.3.2). Übereinstimmend damit wird auch die CYP2J2-Aktivität durch diese

Tabelle 3-4 Inhibition der CYP2J2-katalysierten Epoxidierung von CYP2J2 durch Polyphenole und CYP-Inhibitoren.^a

	Inhibition CYP2J2 IC_{50} [μM] (95% CI)
Apigenin	1.1 (0.48–2.5)
Nobiletin	10 μ M: 27% Inhibition
Wogonin	10 μ M: 32% Inhibition
Genistein	0.25 (0.14–0.42)
Naringenin	3.3 (1.7–6.2)
Resveratrol	0.13 (0.08–0.21)
ϵ-Viniferin	1.8 (1.2–2.7)
IRA	10 μ M: 46% Inhibition
Hopeaphenol	10 μ M: 46% Inhibition
EGCG	10 μ M: 30% Inhibition
17-ODYA	10 μ M: 26% Inhibition
Ketoconazol	0.10 (0.05–0.17)
MS-PPOH	1.4 (0.78–2.5)

^aArachidonsäure (100 μ M) wurde mit 25 pmol CYP2J2 mL^{-1} und einem NADPH-generierenden System (1 mM NADPH) als Cosubstrat bei 37 °C für 40 min inkubiert. Die dosisabhängige Inhibition der Produktbildung (Summe von 8(9)-, 11(12)- und 14(15)-EpETrE und -DiHETrE) wurde in einem Konzentrationsbereich von 0.01–100 μ M des Inhibitors bestimmt. Die IC_{50} -Werte und die entsprechenden 95%-Konfidenzintervalle (CI) wurden auf Grundlage der Produktbildung und relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor berechnet.

Flavone nicht reduziert (< 50% Inhibition im Screening mit einer Testkonzentration von 10 μM). Das zuvor als nicht-selektiver und potenter CYP-Inhibitor identifizierte Flavon Apigenin hemmt wie erwartet auch CYP2J2. Der resultierende IC_{50} -Wert (1.1 μM , Tabelle 3-4, Appendix 5) liegt dabei in der gleichen Größenordnung wie für die anderen untersuchten CYP (Kapitel 3.3.2, Tabelle 3-3). EGCG und das getestete Resveratrol-Imin-Analogon (IRA) inhibieren, wie auch im Multienzymassay, die CYP-katalysierte Oxylinbildung nur wenig. Im Gegensatz dazu hemmt das im HLM-Assay nicht aktive Resveratrol mit bemerkenswert hoher Potenz CYP2J2 (Tabelle 3-4, Appendix 5). Das Resveratrol-Dimer ϵ -Viniferin ist als CYP2-Inhibitor einzuordnen, da neben den zuvor getesteten CYP2C-Enzymen auch die Arachidonsäure-Epoxygenaseaktivität von CYP2J2 durch diese Verbindung inhibiert wird (Tabelle 3-4). Das Resveratrol-Tetramer Hopeaphenol hemmt CYP2J2 nur begrenzt (Tabelle 3-4). Auch dieser Befund ist konsistent mit den inhibitorischen Eigenschaften von Hopeaphenol gegenüber der CYP2C-Unterfamilie. Das initial als CYP4F2-selektiver Inhibitor eingeordnete Isoflavon Genistein (Kapitel 3.3.2) inhibiert die Monooxygenierung von Arachidonsäure durch CYP2J2 mit einem IC_{50} von 0.25 μM und ist folglich kein CYP4F2-exklusiver Inhibitor (Tabelle 3-4). Interessanterweise hemmt auch das Flavanon Naringenin das CYP2J2 mit einem IC_{50} von 3.3 μM , ohne mit anderen CYP der Arachidonsäure-Kaskade zu interagieren (Kapitel 3.3.2). Auch CYP2E1- und CYP3A4-katalysierte Modellreaktionen werden von Naringenin nicht mit der hier für CYP2J2 beobachteten Potenz gehemmt [149, 150].

Insgesamt folgt die Interaktion von CYP2J2 mit Polyphenolen also dem Trend anderer CYP. Allerdings stellt sich CYP2J2 etwas sensitiver dar, denn Naringenin und Resveratrol inhibieren dieses Enzym, während diese Stoffe im Multienzymassay keine Wirkung zeigen (Appendix 5). Des Weiteren inhibiert Genistein die CYP2J2-katalysierte Epoxidierung von Arachidonsäure, ohne dass andere Epoxygenasen von diesem Isoflavon gehemmt werden. Obwohl Resveratrol und Genistein als *Pan-Assay Interference Compounds* (PAINS) in vielen biochemischen Testsystemen falsch-positive Effekte zugeschrieben

werden [151-153], ist anzunehmen, dass die hier beobachtete Modulation der CYP2J2-Aktivität nicht von einer solchen artifiziellen Interaktion ausgeht, da die Verbindungen keine generische und unspezifische Inhibition, zum Beispiel im Multienzymassay, aufzeigen, sondern einzelne CYP hemmen – und andere nicht. Des Weiteren zeigt das ebenfalls umfassend als PAINS beschriebene EGCG [153] im hier angewandten Testsystem keine auffälligen Effekte. Es ist zu schlussfolgern, dass der in dieser Arbeit eingesetzte, auf einem natürlichen Substrat basierende Assay eine geeignete Grundlage zur Identifizierung von mit CYP wechselwirkenden Polyphenolen darstellt.

3.3.4 Apigenin als Inhibitor der ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure in Zellkultur

Die Untersuchung von Substanzen und deren Wirkungen in lebenden Zellen ist häufig aussagekräftiger als in zellfreien Enzyminkubationen. Kultivierte Humanzellen sind sowohl für Metabolismusstudien als auch für vielfältige andere biologische Fragestellungen ein vielversprechendes Model. Neben der direkten Interaktion zwischen Substanz (Polyphenol) und (CYP-) Enzym werden hier auch zelluläre Transportsysteme, metabolische Aspekte, sowie zelluläre Signalkaskaden abgebildet. In Bezug auf den CYP-katalysierten Phase-I Metabolismus von Xenobiotika, der überwiegend in der Leber stattfindet, sind die meisten Zellkulturen allerdings limitiert, da immortalisierte Zelllinien nur noch einen Bruchteil der CYP-Aktivität von hepatischem Gewebe oder primären Hepatozyten aufweisen. Dem gegenüber steht die Überexpression einzelner CYP-Gene in Karzinomzelllinien [154-157]. Für die Kolonkarzinomzellen HCT 116 und CaCo-2 ist eine im Vergleich zu gesunden Zellen erhöhte Expression von CYP2-Genen beschrieben [158]. Weitere Enzyme der Arachidonsäure-Kaskade werden ebenfalls in einigen Kolonzelllinien in hohem Maß gebildet – beispielsweise die 5-Lipoxygenase in HCT 116 und die Cyclooxygenase-2 in HCA-7 und HT-29 [159].

Die durch CYP gebildeten Oxylipine beeinflussen die Proliferation von Tumorzellen sowie auch das Tumorwachstum im Körper: Eine Inhibition der EpETrE-Bildung aus Arachidonsäure durch CYP3A4 reduziert die Proliferation von MCF-7 Zellen, einer aus einem Estrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom generierten Zelllinie [160]. *CYP4A11* und *CYP4F2* werden in vielen Tumoren, unter anderem auch solchen des Kolons in deutlich höherem Maße als in gesunden Geweben exprimiert [161]. Eine Inhibition der 20-HETE-Bildung in renalen Adenokarzinomzellen durch den CYP4-selektiven Inhibitor HET0016 reduziert die Proliferation dieser Zellkulturen, während die Proliferation primärer Epithelzellen aus humanen proximalen Nierentubuli nicht beeinflusst wird [162]. In Mausmodellen zu Kolonkarzinomen ist eine Überexpression von *Cyp2c* festzustellen, die mit deutlich erhöhten Leveln von Epoxyfettsäuren im Blutplasma einhergeht. Eine Inhibition der CYP2C in diesem Modell führt zu einer Reduktion der Tumorgenese, ebenso wie ein genetischer *knock-out* von *Cyp2c*. Im Gegensatz dazu erhöht die Gabe von 12(13)-Epoxyoctadecensäure [12(13)-EpOME], einer aus Linolsäure (18:2 n6) durch CYP gebildeten Epoxyfettsäure, die Tumorgenese deutlich [158]. Es ist zu schlussfolgern, dass Epoxygenasen und durch diese aus Fettsäuren gebildeten Metabolite zur Pathogenese von Kolonkarzinomen beitragen können.

Kolon-Adenokarzinom-Zelllinien kommen folglich als Modell infrage, um die CYP-katalysierte Oxylipinbildung und den Einfluss von Polyphenolen auf diese zu untersuchen. Neben den physiologischen Eigenschaften der Zellen legt noch ein weiterer Aspekt die Berücksichtigung von Darmzellen nahe: Es ist anzunehmen, dass Gewebe des Intestinaltraktes nach dem Verzehr von polyphenolreichen Lebensmitteln hohen Polyphenoldosen exponiert sind. Eine eingeschränkte Bioverfügbarkeit der Substanzen könnte im Gegensatz dazu die Level dieser sekundären Pflanzenmetabolite in anderen Geweben eines Organismus limitieren.

Um eine geeignete Zelllinie auszuwählen, wurde in einem ersten Schritt die Bildung von Lipidmediatoren aus Arachidonsäure in vier verschiedenen Kolon-

Adenokarzinom-Zelllinien untersucht: Caco-2, HCT 116, HCA-7 und HT-29. Dazu wurde das Zellkulturmedium mit Arachidonsäure (10 μ M) supplementiert und die Oxylipine nach alkalischer Verseifung der Lipide in den Zellen bestimmt. In allen vier Zelllinien ist nach Inkubation mit der Fettsäure ein höherer Gehalt an 20-HETE, dem ω -Hydroxylierungsprodukt der Arachidonsäure, festzustellen (Abbildung 3-7). Dabei unterscheiden sich sowohl die basalen Level als auch die Gehalte nach Zugaben der Fettsäure zwischen den Zelllinien. Für die Untersuchung der Inhibition der Oxylipinbildung durch Polyphenole wird diejenige Zelllinie am geeignetsten eingeschätzt, bei der aus geringen 20-HETE-Levels unter basalen Bedingungen hohe Gehalte nach Inkubation mit der Fettsäure resultieren, da eine solche die Enzymaktivität der ω -hydroxylierenden CYP am besten abbildet. Zur Bemessung dieser Effektgröße in einem Assay ist der Z'-Faktor ein etablierter Parameter [163]. Zur Berechnung dieser dimensionslosen statistischen Größe werden der dynamische Bereich zwischen Positiv- und Negativkontrolle sowie die Variabilität der Messwerte herangezogen.

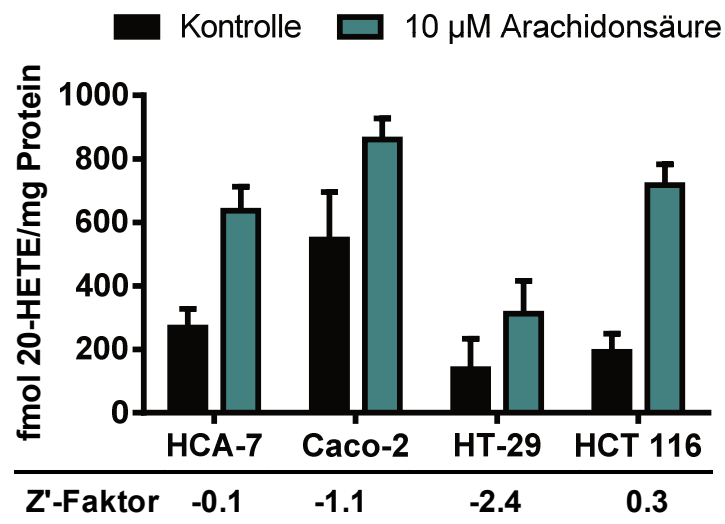


Abbildung 3-7 20-HETE-Level in humanen Kolonkarzinomzelllinien mit und ohne Supplementierung von Arachidonsäure. $2 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 60 cm^2 -Schalen ausgesät und für 24 h kultiviert. Nach 24 h erfolgte eine Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Arachidonsäure ins Zellkulturmedium. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und pelletiert und die Gesamtoxylipine nach Hydrolyse in den Zellen mittels LC-MS/MS bestimmt. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 4-6$.

Der Z'-Faktor wird eingesetzt, um die Eignung von Hochdurchsatzassays (HTS) bei der Identifizierung von *Hits* zu beurteilen. Testsysteme mit $Z' < 0$ sind als nicht geeignet anzusehen, exzellente Assays weisen Z'-Faktoren > 0.5 auf. Z'-Faktoren zwischen 0 und 0.5 indizieren Verfahren mit akzeptabler Eignung [163, 164]. Innerhalb der getesteten Zelllinien ist die HCT 116 Kultur am geeignetsten zur Untersuchung des Einflusses von Polyphenolen auf die Bildung von 20-HETE (Abbildung 3-7).

Die für HT-29 und Caco-2 beschriebenen sehr geringen Level von *CYP4F2*-mRNA [165] unterstützen die hier beobachtete eingeschränkte ω -Hydroxylierung der Fettsäure. Die Level ω -hydroxylierender CYP in HCA-7 und HCT 116 sind bisher nicht untersucht – die Erhöhung der 20-HETE-Gehalte in HCT 116 Zellen nach Arachidonsäuregabe lassen jedoch vermuten, dass diese Enzyme in den Zellen vorliegen. In HTS, und damit auch zur Bestimmung des Z'-Faktors, werden zumeist einzelne chemische oder enzymatische Reaktionen betrachtet, die ohne weitere Probenaufarbeitung, zum Beispiel photometrisch, mit hohem Probendurchsatz zu messen sind. Der Probendurchsatz, und damit auch die Anzahl von Positiv- und Negativkontrollen in Zellkulturexperimenten mit instrumentell-analytischem Endpunkt ist im Vergleich dazu deutlich beschränkter, was die Bestimmung des realen Z'-Faktors limitieren kann [164]. Auch wenn der ermittelte Z'-Faktor für die ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure in HCT 116 Zellen mit 0.3 kein *ideales* Testsystem auszeichnet, ist der Assay unter diesen Bedingungen als geeignet anzusehen, eine Modulation dieser Reaktion durch Polyphenole zu untersuchen. Der unselektive CYP-Inhibitor Ketoconazol inhibiert die 20-HETE-Bildung in den Zellen mit einem IC_{50} von $5.6 \mu\text{M}$ (95% CI: $0.92\text{--}34 \mu\text{M}$) und ist damit ähnlich potent wie im HLM-Assay. Folglich sind die ω -Hydroxylasen auch im Zellmodell, wie erwartet, zu modulieren.

Neben 20-HETE führt die Inkubation der HCT 116 Zellen auch zu erhöhten Leveln weiterer Oxylipine in den Zellen: Das Produktmuster ist geprägt von Epoxyfettsäuren sowie von 5-HETE (Abbildung 3-8). Einige weitere mittelkettige Hydroxylierungsprodukte sowie Dihydroxyfettsäuren sind ebenfalls zu

detektieren. 18-HETE, der Markermetabolit (ω -n)-hydroxylierender CYP, wird nicht gebildet. Die Bildung von 5-HETE ist wahrscheinlich einer 5-LOX-Aktivität in den Zellen zuzuschreiben [166] und erfolgt nicht durch eine CYP-katalysierte Reaktion. Die Bildung von EpETrE ist konsistent mit der für diese Zelllinie beschriebenen Expression von *CYP2C8*, *CYP2C9*, *CYP2C19* und *CYP2J2* [158, 167]. In vorherigen Arbeiten der Gruppe [168] wurde die Bildung von Hydroxyfettsäuren im Überstand von HCT 116-Kulturen, sowie in Überständen anderer Zelllinien nach Zugabe von Fettsäureethylestern untersucht. Dabei wurde die Bildung von 8-HETE und 12-HETE festgestellt. Es ist jedoch nicht abschließend zu differenzieren, ob durch die Zellen eine enzymatische Oxidation der Fettsäure (-Ethylester) erfolgt, oder lediglich eine Freisetzung autoxidativ gebildeter Oxylipine durch Hydrolyse der Ester. Weitere Hydroxylierungsprodukte, wie das ausschließlich enzymatisch gebildete 20-HETE, waren nicht zu detektieren [168]. In den hier durchgeführten Analysen wurden die Oxylipine nicht im Medium, sondern in den Zellen nach Verseifung der Lipide bestimmt. Es ist zu schlussfolgern, dass große Anteile der untersuchten Lipidmediatoren wie 20-HETE nicht ins Kulturmedium abgegeben werden [168].

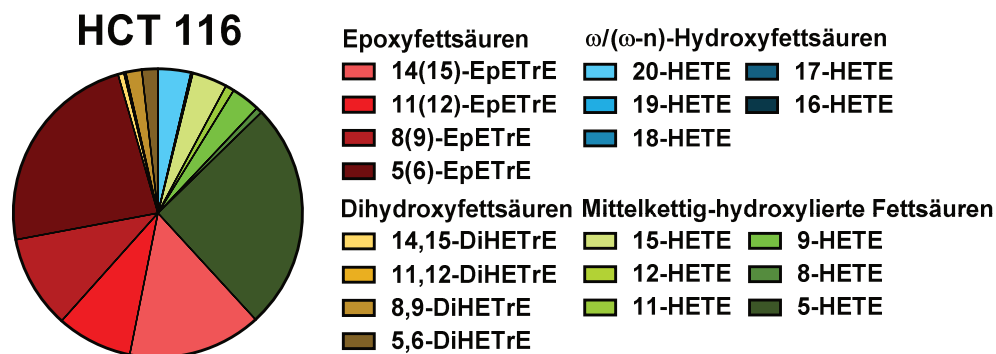


Abbildung 3-8 Produktmuster der Oxidation von Arachidonsäure durch HCT 116 Zellen. $2 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 60 cm^2 -Schalen ausgesät und für 24 h kultiviert. Nach 24 h wurde $10 \mu\text{M}$ Arachidonsäure ins Zellkulturmedium gegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und pelletiert und die Gesamtoxylipine nach Hydrolyse in den Zellen mittels LC-MS/MS bestimmt. Von der Menge der Produkte in den Inkubierten Zellen wurden die Oxylipingehalte in Kontrollinkubationen ohne Arachidonsäure abgezogen.

Auch die weiteren untersuchten Zelllinien zeigten einen Anstieg an Epoxyfettsäuren nach einer Inkubation mit Arachidonsäure für 24 h (Appendix 6).

Dieser Befund entspricht der in der Literatur beschriebenen Präsenz von CYP2C und CYP2J auf Protein- und mRNA-Ebene in HT29 und CaCo-2 Zellen [169]. In weiteren Experimenten konnte jedoch mit keinem der getesteten Inhibitoren (MS-PPOH als selektiver Epoxygenaseinhibitor und Miconazol sowie Ketoconazol als unspezifische CYP-Inhibitoren) eine Reduzierung der EpETrE-Level in den Zellen bewirkt werden. Die Ursache für diesen Befund ist nicht abschließend zu benennen: Möglicherweise werden die Epoxyfettsäuren durch CYP gebildet, deren Aktivität die getesteten CYP-Inhibitoren nicht reduzieren, wobei dies bei den in dieser Arbeit betrachteten Enzyme nicht der Fall ist. Ein Beitrag zur EpETrE-Bildung von weiteren CYP ist jedoch nicht auszuschließen. Auch eine nicht-enzymatische Bildung von Epoxyfettsäuren über radikalische Mechanismen ist möglich [170]. 20-HETE und andere aliphatische Hydroxylierungsprodukte werden nicht autoxidativ gebildet. Die Autoxidation kann während der Inkubation im Zellkulturmedium erfolgen, es ist außerdem wahrscheinlich, dass EpETrE über die Fettsäure in das Medium eingebracht werden: Auch in Spuren in der Arachidonsäure vorliegende Autoxidationsprodukte führen zu erhöhten Gehalten in den Zellen, da eine Aufkonzentrierung in oder an den Zellen anzunehmen ist. Die Epoxyfettsäuren gelangen wahrscheinlich ähnlich effizient in die Zellen wie Fettsäure selbst [171, 172]. Die autoxidative Bildung der EpETrE bringt dabei, anders als die enzymatisch katalysierte Reaktion, nicht ausschließlich *cis*-Epoxyfettsäuren hervor – *trans*-konfigurierte Produkte sind bevorzugt [170, 173]. In den durchgeführten Zellkulturexperimenten waren im Vergleich zu den *cis*-Isomeren nur geringe Mengen an *trans*-Epoxyfettsäuren zu detektieren, sodass radikalische Autoxidation nicht als ausschließliche Quelle der EpETrE anzunehmen ist.

Insgesamt sind die verwendeten Zellkulturen unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht geeignet den gesamten CYP-Zweig der Arachidonsäure und dessen Modulation durch Polyphenole umfassend abzubilden. Gleichwohl sind die HCT 116 Kolon-Adenokarzinom-Zelllinien ein adäquates Modell zur Untersuchung des Einflusses auf die *ω*-Hydroxylierung von

Arachidonsäure, da (i) die Inkubation der Zellen mit der Fettsäure einen ausgeprägten Anstieg an 20-HETE bewirkt, welcher (ii) durch einen Inhibitor (Ketoconazol) dosisabhängig und mit gleicher Potenz wie im Enzymassay reduziert werden kann.

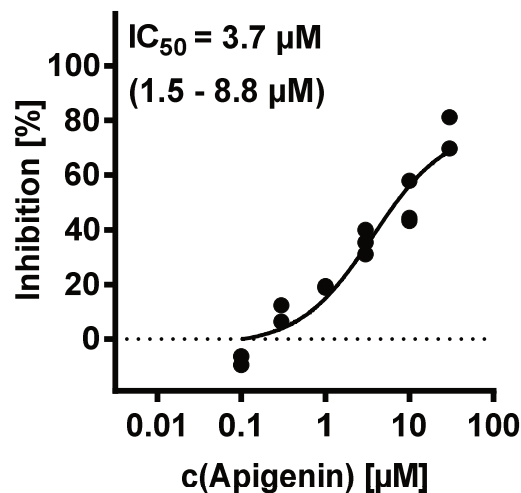


Abbildung 3-9 Inhibition der 20-HETE-Bildung in HCT 116-Zellen durch Apigenin. $2 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 60 cm^2 -Schalen ausgesät und für 24 h kultiviert. Nach 24 h erfolgte eine Zugabe von 10 µM Arachidonsäure ins Zellkulturmedium. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und pelletiert und die Gesamtoxylipine nach Hydrolyse in den Zellen mittels LC-MS/MS bestimmt. Die Inhibition wurde auf Grundlage der Produktbildung relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor berechnet (100 - % der Kontrolle). Der relative IC_{50} -Wert wurde durch einen Fit der Daten an eine logistische Funktion (4 Parameter) bestimmt.

In diesem Testsystem inhibiert das Flavon Apigenin die ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure mit einem IC_{50} von 3.6 µM (Abbildung 3-9). Dieses Polyphenol ist damit auch ähnlich potent wie im Multienzymassay und bei der Inhibition von CYP2. Dieses Ergebnis zeigt einerseits, dass sehr wahrscheinlich CYP4F2 zur Bildung von 20-HETE in HCT 116 beiträgt, da das andere ω -hydroxylierende CYP – CYP4A11 – nicht durch Apigenin inhibiert wird. Andererseits unterstreicht die Interaktion von Polyphenolen mit CYP der Arachidonsäure-Kaskade auch in komplexeren Modellen wie Zellkulturen die Relevanz dieses möglichen molekularen Mechanismus, über den Lebensmittelinhaltsstoffe auf die Physiologie wirken könnten.

3.4 Schlussfolgerungen

Die Produkte, die im dritten Zweig der Arachidonsäure-Kaskade aus Fettsäuren gebildet werden, sind physiologisch von höchster Relevanz. Insbesondere für die Homöostase des Gefäßtonus ist eine ausgewogene Interaktion zwischen diesen Lipidmediatoren von wesentlicher Bedeutung. Die vasodilatativen Effekte der EpETrE [insbesondere des 14(15)- und des 11(12)-Regioisomers], die durch CYP2C und CYP2J und Gefäß- und Endothelzellen gebildet werden, werden kontrastiert durch die vasokonstriktiven Wirkungen von 20-HETE, dessen Bildung in vaskulären glatten Muskelzellen von CYP4F, und in kleinerem Umfang von CYP4A, katalysiert wird [10].

Ein Eingriff in diese sensitive Homöostase durch die selektive Inhibition der Bildung einzelner Lipidmediatoren durch Polyphenole könnte weitreichende Konsequenzen für die humane Physiologie haben. Die selektive Inhibition der EpETrE-Bildung beeinflusst den Gefäßtonus nachteilig (fördert einen Phänotypen mit erhöhtem Blutdruck und daraus resultierenden Organschäden), wie in zahlreichen Tiermodellen für Hypertonie gezeigt werden konnte: Bei salzresistenten Dahl-Ratten führt bei einer salzreichen Diät die selektive Inhibition epoxidierender CYP durch MS-PPOH zu einer Erhöhung des Blutdrucks [174]. Im Einklang mit diesem Befund bewirkt eine Stabilisierung der Epoxyfettsäuren durch Inhibition des Abbaus über sEH eine Reduzierung des Gefäßtonus, unter anderem in spontan hypertensiven Ratten [38, 175]. Die Erhöhung der EpETrE-Level durch Inhibition der sEH in Verbindung mit einer Reduzierung der 20-HETE-Level mittels ω -Hydroxylaseinhibitoren senkt auch die Hypertonie in Ren-2 Renin transgenen Ratten [176]. Eine Senkung des Gefäßtonus wird ebenso bewirkt bei Gabe eines 20-HETE-Antagonisten in angiotensinogen-defizienten Mäusen [177] und durch Inhibition des ω -hydroxylierenden CYP4A1 in spontan hypertonen Ratten [178]. Aus einer durch Polyphenole aus pflanzlichen Lebensmitteln erwirkten selektiven Inhibition der CYP der Arachidonsäure-Kaskade könnte folglich eine Änderung des

Gefäßtonus folgen, und somit die Gesundheit des Menschen direkt beeinflusst werden.

In Anbetracht der in der Literatur genannten Plasmakonzentrationen im mikromolaren Bereich, zum Beispiel für das Isoflavon Genistein [179], ist anzunehmen, dass die in dieser Arbeit beschriebenen Level der bioaktiven Lebensmittelinhaltsstoffe auch *in vivo* erreicht werden. Zahlreiche kommerziell verfügbare Nahrungsergänzungsmittel auf Basis konzentrierter Pflanzenextrakte können bei Konsumierenden solcher Produkte zu sehr hohen Aufnahmemengen führen. Eine Bindung an Plasmaproteine und ein schneller Metabolismus können die effektiven Konzentrationen *in vivo* limitieren. Entscheidend für etwaige systemische Effekte eines Lebensmittelinhaltstoffes ist jedoch die Absorption im Gastrointestinaltrakt.

Im Caco-2 Permeabilitätsmodell, welches zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit der Flavonoide, welche die CYP-katalysierte Oxylinbildung inhibieren, eingesetzt wurde [180], zeigen die getesteten Polyphenole einen moderaten Transfer durch die Zellbarriere (Appendix 7): Der höchste Permeabilitätskoeffizient (P_{app}) wurde für Nobiletin bestimmt ($P_{app} 52 \pm 8 [10^{-6} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}]$). Für Stoffe, die im humanen Intestinaltrakt vollständig resorbiert werden, sind P_{app} -Werte über $70 \cdot 10^{-6} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ im Caco-2 Modell anzunehmen, während P_{app} -Werte unter $10 \cdot 10^{-6} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ eine Resorption von weniger als 20% indizieren [181]. Andere Quellen korrelieren eine gute Resorption (70% – 100%) mit P_{app} -Werten über $10 \cdot 10^{-6} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$, und gehen erst ab einer Permeabilität von weniger als $1 \cdot 10^{-6} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ von einer Resorption unter 20% aus [182-184]. Wogonin und Genistein werden moderat absorbiert (Appendix 7), während von Apigenin geringere Mengen den Caco-2-Layer passieren ($P_{app} 4.5 \pm 1.0 [10^{-6} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}]$). Für alle getesteten Flavonoide ist folglich eine zumindest teilweise Absorption *in vivo* anzunehmen.

Obwohl die Resorptionsrate von Polyphenolen im humanen Gastrointestinaltrakt limitiert ist, ist eine Modulation der CYP der Arachidonsäure-Kaskade in den

Zellen des Intestinaltraktes möglich, da diese nach dem Verzehr polyphenolreicher Speisen oder Getränke hohen Dosen dieser sekundären Pflanzenstoffe exponiert sind. Hohe Expressionsraten von *CYP2C9*, und in geringerem Maße von *CYP2C19*, sind für Darmgewebe beschrieben [185]. Des Weiteren konnte *CYP4F2*, aber nicht *CYP4A11*, in humanen Darmmikrosomen nachgewiesen werden. Bei Inkubation von Arachidonsäure mit solchen Präparaten in Anwesenheit von NADPH wird die Fettsäure zu 20-HETE oxidiert [186]. Das Flavon Apigenin inhibiert die 20-HETE-Bildung in HCT 116 Zellen mit einem IC_{50} von 3.6 μ M (Abbildung 3-9). Die Inhibition der Bildung von Lipidmediatoren durch Lebensmittelinhaltsstoffe ist folglich nicht auf mikrosomale Assays beschränkt, sondern erfolgt in humanen Zellen mit gleicher Wirksamkeit.

Es konnte gezeigt werden, dass Polyphenole, insbesondere Flavonoide und Stilbenoide, selektiv und potent den CYP-Zweig der Arachidonsäure-Kaskade modulieren. Auch wenn weitere Untersuchungen notwendig sind, um die physiologischen Auswirkungen zu verstehen, ist zu schlussfolgern, dass dies einen neuen molekularen Mechanismus darstellt, über den Polyphenole die vielfach beschriebenen Effekte auf die menschliche Gesundheit entfalten könnten.

Kapitel 4

Struktur-Wirkungsbeziehung der Inhibition von CYP durch Flavonoide: Entwicklung eines CYP4F2-selektiven ω -Hydroxylaseinhibitors

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden bereits publiziert:

Inhibition of cytochrome P450 monooxygenase catalyzed oxylipin formation by flavonoids: Evaluation of structure-activity relationship towards CYP4F2-selective inhibitors. Nadja Kampschulte, Tim Berking, Ibrahim E. Çelik, Stefan F. Kirsch, Nils Helge Schebb; *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 238, 11433

Die in dieser Arbeit eingesetzten synthetischen Flavonoide wurden im Rahmen eines Kooperationsprojektes dargestellt von Tim Berking als Teil der unter Anleitung von Prof. Dr. S. F. Kirsch durchgeführten Masterthesis „Synthese von Flavonen und Isoflavonen und ihre Wirkung auf die Aktivität von CYP Monooxygenasen“, die im September 2020 an der Bergischen Universität Wuppertal vorgelegt wurde. Die Verbindungen sind im Folgenden unsystematisch mit der Syntheseproduktkennung TB[ZAHL] benannt.

Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP) stellen eine Superfamilie Häm-haltiger Enzyme dar, die im Tier- und Pflanzenreich ubiquitär sind [31]. Die Mehrheit der bekannten Mitglieder dieser Superfamilie katalysiert die Monooxygenierung endogener Substrate: Im Rahmen der Arachidonsäure-Kaskade oxidieren CYP mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu Eicosanoiden und anderen Oxylipinen. Aus der Epoxidierung von Arachidonsäure gehen vier regioisomere Epoxyeicosatriensäuren (EpETrE) hervor. Diese Reaktion wird vornehmlich von Enzymen der CYP2C und CYP2J-Unterfamilie katalysiert (Kapitel 3.1). Im Endothel gebildete EpETrE, insbesondere das 14(15)- und das 11(12)-Regioisomer, wirken als

Vasodilatoren indem sie die K^+ -Kanäle der Zellen der glatten Gefäßmuskulatur aktivieren und so eine Hyperpolarisierung und Relaxation des Blutgefäßes hervorrufen [10]. Die Verminderung der Inaktivierung von Epoxyfettsäuren durch enzymatische Hydrolyse ist ein therapeutischer Ansatz der beispielsweise bei kardiovaskulären Erkrankungen verfolgt wird [187].

Für das Produkt der ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure ist eine den EpETrE konträre Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen beschrieben: 20-Hydroxy-eicosatetraensäure (20-HETE) wirkt vasokonstriktiv unter anderem durch eine Blockade von Calcium-abhängigen Kaliumkanälen, was zu einer Depolarisierung und einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt. Weitere Mechanismen der Signalwirkung dieses Oxylipins in Bezug auf Vasokonstriktion sind beschrieben [69, 70]. Es gibt Hinweise darauf, dass eine Fehlregulierung von 20-HETE im vaskulären System zur Entstehung von Hypertonie beiträgt [12]. Dies wird kontrastiert von den anti-hypertonischen Eigenschaften, die 20-HETE in der Niere entfaltet: Diese sind primär, aber nicht ausschließlich, auf eine Inhibition der Natriumrückresorption im dicken aufsteigenden Abschnitt der Henle-Schleifen zurückzuführen [12]. 20-HETE spielt folglich eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Gefäßtonus, die den ambivalenten Effekten dieses Lipidmediators in der Niere und den Blutgefäßen unterliegt.

Die Bildung von 20-HETE im Menschen wird durch zwei CYP Enzyme katalysiert: CYP4A11 und CYP4F2. Die Bedeutung sowie die gewebespezifischen Einflüsse des durch CYP4A11 und CYP4F2 gebildeten 20-HETE sind bisher spärlich beschrieben [12, 70]. Die begrenzte Anzahl an Studien auf diesem Gebiet ist unter anderem auf einen Mangel an verfügbaren spezifischen CYP4A- oder CYP4F-Inhibitoren zurückzuführen. Es besteht also ein Bedarf an Verbindungen, die die CYP4A- oder CYP4F-Aktivität selektiv modulieren. Ausgehend von vorherigen Befunden, wonach natürliche Polyphenole die CYP-katalysierte Bildung von Oxylipinen mit vergleichbarer Potenz wie pharmazeutisch eingesetzte CYP-Inhibitoren hemmen (Kapitel 3), wurde hier die Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen Flavonoiden und der Inhibition des CYP-Zweigs

der Arachidonsäure-Kaskade iterativ mit einem Fokus auf die Enzymselektivität charakterisiert. Von 65 synthetisierten Flavonoiden wurde der Einfluss die auf Oxylinbildung im Multienzymassay charakterisiert. Der abgeleitete selektive CYP4F-Inhibitor stellt ein neues Werkzeug zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung des durch CYP4F gebildeten 20-HETE dar.

4.1 Modifikation der Flavonstruktur zur Inhibition der 20-HETE-Bildung

Natürlich vorkommende Polyphenole inhibieren die CYP-katalysierte Oxylinbildung mit vergleichbarer Potenz wie bekannte CYP-Inhibitoren (Kapitel 3.3). Innerhalb der getesteten natürlichen Polyphenole sind zwei Strukturen als vielversprechender Ausgangspunkt für einen selektiven ω -Hydroxylaseinhibitor zu identifizieren: Das Isoflavon Genistein stellt sich im HLM-basierten Multienzymassay als ein selektiver CYP4F2-Inhibitor mit moderater Potenz dar. Dem gegenüber steht das potentere Flavon Apigenin, welches die CYP der Arachidonsäure-Kaskade unspezifisch mit IC_{50} -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich inhibiert. Ausgehend von diesen Verbindungen wurde in diesem Teil der Arbeit eine potente sowie CYP4F2-selektive Flavonoidstruktur erarbeitet, welche weitere Untersuchungen der physiologischen Bedeutung von CYP4F2 und den durch CYP4F2 gebildeten Lipidmediatoren – in Abgrenzung zu CYP4A11 – ermöglicht.

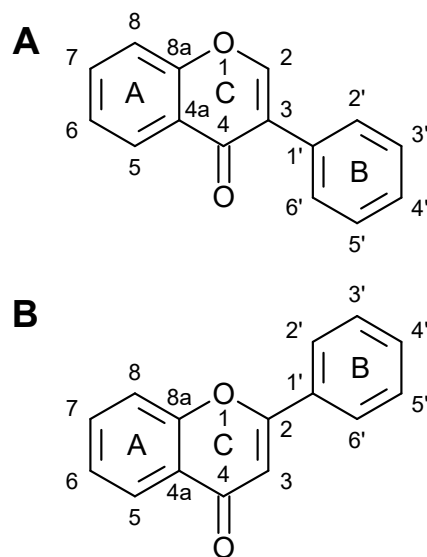


Abbildung 4-1 Chemische Struktur von Isoflavonen (A) und Flavonen (B) mit Angabe der Lokanten [188].

In einem ersten Schritt wurde die Isoflavon-Struktur (Abbildung 4-1A) modifiziert mit dem Ziel potentere Verbindungen als Genistein (Abbildung 3-4, Tabelle 4-1) zu entwickeln, bei gleichzeitigem Erhalt der Selektivität dieses Isoflavons. Es

wurden sechs Isoflavon-Derivate mit unterschiedlichen Substitutionsmustern dargestellt und diese im HLM-basierten Multienzymassay bei einer Screening-Konzentration von 10 µM hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirkungen auf die CYP-katalysierte Bildung von 20-HETE einerseits und die Bildung von Epoxyfettsäuren andererseits untersucht. Als Kriterien für eine Verbindung mit gewünschten Eigenschaften wurden eine Inhibition der 20-HETE-Bildung von mehr als 50% sowie ein Selektivitätsfaktor, welcher das Verhältnis zwischen Inhibition der Epoxidierung und ω-Hydroxylierung beschreibt, von über 0.5 zugrunde gelegt.

Keines der getesteten Isoflavone ist bei der Testkonzentration von 10 µM ein potenter CYP-Inhibitor: Weder die Bildung von EpETrE noch von 20-HETE wird um mehr als 50% gehemmt (Tabelle 4-1). Heterozyklische B-Ringe haben ebenfalls keinen Einfluss auf die inhibitorischen Eigenschaften der Isoflavone (Appendix 8).

Tabelle 4-1 Isoflavone mit variierenden Substitutionsmustern des B-Rings als CYP-Inhibitoren. Die Substanzen wurden bei einer Screeningkonzentration von 10 µM im Multienzymassay getestet. Die Inhibition wurde basierend auf der Produktbildung und relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor bestimmt (100 - % der Kontrolle; n=2). Der Selektivitätsparameter wurde berechnet als Logarithmus des Verhältnisses zwischen dem Prozentsatz der Inhibition der ω-Hydroxylierung (Mittelwert aus zwei Werten) und dem Prozentsatz der Inhibition der Epoxidierung (Mittelwert aus zwei Werten) [$\log(\text{Inhibition } \omega\text{-Hydroxylierung}/\text{Inhibition Epoxidierung})$].

Verbindung	Substituent						Inhibition [%]		
	5	6	7	2'	3'	4'	Epoxidierung	ω-Hydroxylierung	Selektivität
Genistein	OH	H	OH	H	H	OH	<15	39–53	0.49
TB021	H	H	H	H	H	H	< 15	< 15–31	0.19
TB032	H	H	H	OMe	H	H	< 15–27	< 15	-0.15
TB039	H	H	H	H	OMe	H	< 15	< 15	0.00
TB022	H	H	H	H	H	OMe	< 15	< 15–30	0.18
TB040	H	H	H	H	OMe	OMe	< 15–19	27–29	0.22
Biochanin A	OH	H	OH	H	H	OMe	< 15	25–28	0.25
> 90% Inhibition der Epoxygenasen < 15%							< 15% Inhibition der ω-Hydroxylasen > 90%		
-2							Selektivität 2		

Auch zahlreiche weitere natürliche Isoflavone zeigen keine inhibitorischen Effekte auf die Oxidation von Modellsubstraten, die selektiv von einzelnen CYP umgesetzt werden. Vielmehr ist auch in diesen Testsystemen Genistein als der potenteste Inhibitor beschrieben, mit IC_{50} -Werten $> 20 \mu\text{M}$ [189, 190]. Es ist zu schlussfolgern, dass Isoflavone die Bildung von Oxylipinen durch CYP im Allgemeinen nicht potent inhibieren. Das Isoflavon-Gerüst ist folglich kein geeigneter Ausgangspunkt zur Entwicklung eines potenten und gleichzeitig selektiven ω -Hydroxylaseinhibitors.

Neben Isoflavonen stellt auch das Flavon Apigenin einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die Entwicklung eines potenten ω -Hydroxylaseinhibitors dar: Im Multienzymassay inhibiert dieses Polyphenol die CYP-katalysierte Oxylipinbildung potent, aber nicht selektiv (Kapitel 3.3). Um die Selektivität des Flavons zu verbessern, wurden verschiedene Substituenten und Substitutionsmuster in die Grundstruktur des Flavons (Abbildung 4-1B) eingebracht, und iterativ verschiedene Aspekte der Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen Flavonen und CYP der Arachidonsäure-Kaskade abgeleitet.

Die Modifikation des Substitutionsmusters des B-Rings der Flavon-Grundstruktur (Abbildung 4-1B) führt in Abhängigkeit der Position zu unterschiedlichen Effekten auf die CYP-katalysierte Bildung von Oxylipinen (Tabelle 4-2): Methyl-, Methoxy- oder Hydroxy-Funktionen an C4'-Position verursachen eine reduzierte ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure und damit der Bildung von 20-HETE. Die Bildung von EpETrE wird jedoch gleichermaßen inhibiert, sodass diese Strukturen nicht als selektive ω -Hydroxylaseinhibitoren wirken. Im Gegensatz dazu inhibieren Flavone mit nicht-natürlichen Bromid- oder Trifluormethyl-Substituenten an C4'-Position die 20-HETE-Bildung stark, während die Aktivität epoxidierender CYP, und damit die Bildung von EpETrE, nicht beeinträchtigt wird (Tabelle 4-2).

Durch Alkoxy-Substituenten an C2'-Position wird die Epoxidierung von Arachidonsäure zu EpETrE selektiv inhibiert (Tabelle 4-2). Bei den resultierenden Strukturen handelt es sich zum Teil um potente Epoxygenaseinhibitoren

(Appendix 9). Die Wirkung ist dabei unabhängig vom Substitutionsmuster des A-Rings (Appendix 9). Auch bei sperrigeren, unpolaren Substituenten wie Isopropoxy-Resten an C2'-Position und bei Thioflavonen bleibt dieser Effekt bestehen (Appendix 9, Appendix 10). Heterozyklische 2-Thienyl- oder 2-Pyridyl-Substituenten an C2 anstelle des Phenyls als B-Ring bewirken keine Inhibition der CYP-katalysierten Oxylipinbildung (Appendix 11).

Tabelle 4-2 Flavone mit variierenden Substitutionsmustern des B-Rings als CYP-Inhibitoren. Die Substanzen wurden bei einer Screeningkonzentration von 10 µM im Multienzymassay getestet. Die Inhibition wurde basierend auf der Produktbildung und relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor bestimmt (100 - % der Kontrolle; n=2). Der Selektivitätsparameter wurde berechnet als Logarithmus des Verhältnisses zwischen dem Prozentsatz der Inhibition der ω-Hydroxylierung (Mittelwert aus zwei Werten) und dem Prozentsatz der Inhibition der Epoxidierung (Mittelwert aus zwei Werten) [$\log(\text{Inhibition } \omega\text{-Hydroxylierung}/\text{Inhibition Epoxidierung})$].

Verbindung	Substituent						Inhibition [%]		
	5	6	7	2'	3'	4'	Epoxidierung	ω-Hydroxylierung	Selektivität
Apigenin	OH	H	OH	H	H	OH	54–55	62–73	0.09
TB003	H	H	H	H	H	H	< 15	< 15	0.00
TB017	H	H	H	OMe	H	H	37–39	< 15	-0.40
TB008	H	H	H	H	H	OMe	20–21	27–28	0.13
TB018	H	H	H	H	OMe	OMe	< 15–19	18–23	0.08
TB086	H	H	H	OH	H	H	24–34	< 15	-0.29
TB042	H	H	H	H	H	OH	< 15	< 15–22	0.09
TB087	H	H	H	H	OH	OH	19–27	32–36	0.17
TB013	H	H	H	H	H	Br	< 15	35–41	0.40
TB009	H	H	H	H	H	CF ₃	< 15	53–62	0.58
TB085	H	H	H	H	H	CH ₃	26–38	32–44	0.07
> 90% Inhibition der Epoxygenasen < 15%							< 15%	Inhibition der ω-Hydroxylasen	> 90%
-2							Selektivität		2

Von den getesteten A-Ring-Substitutionsmustern inhibiert keines die Aktivität von ω-Hydroxylasen (Tabelle 4-3). Allerdings führen Hydroxy- sowie Methoxy-Substituenten an Position C7 des Flavons zu einer Inhibition der EpETrE-Bildung im Multienzymassay. Selektive ω-Hydroxylaseinhibitoren sollten folglich einen solchen Substituenten nicht aufweisen. Diese Struktur-Wirkungsbeziehung

besteht unabhängig vom Substitutionsmuster des B-Rings (Appendix 12). Eine Verknüpfung der Positionen C6 und C7 über eine Dioxolstruktur bewirkt keine Inhibition der CYP-katalysierten Oxylinbildung, lediglich die durch Substitutionsmuster des B-Rings hervorgerufenen Effekte bleiben bestehen (Appendix 13). Die Dioxolfunktion am A-Ring der Flavone führt folglich nicht zu potenten (ω -Hydroxylase-) Inhibitoren, auch wenn einige Benzodioxole als *suicide*-Inhibitoren unter anderem von CYP3A4 beschrieben sind. Bei *suicide*-Inhibitoren wird das Enzym durch die Bildung eines reaktiven Metaboliten aus dem Substrat inaktiviert. Im Falle der Benzodioxole führt die Oxidation (Hydroxylierung) der Methylenbrücke zu einem instabilen Produkt, welches zu einer Carbenstruktur zerfällt und in Folge dessen aufgrund der hohen Affinität zum Eisen im katalytischen Zentrum das Enzym inaktiviert [191]. Substituenten an Position C6 haben nur marginale inhibitorische Effekte auf die Bildung von Epoxy- und Hydroxyfettsäuren (Tabelle 4-3), so dass ein prototypischer selektiver ω -Hydroxylaseinhibitor durch einen solchen Substituenten nicht limitiert wird.

Tabelle 4-3 Flavone mit variierenden Substitutionsmustern des A-Rings als CYP-Inhibitoren. Die Substanzen wurden bei einer Screeningkonzentration von 10 μ M im Multienzymassay getestet. Die Inhibition wurde basierend auf der Produktbildung und relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor bestimmt (100 - % der Kontrolle; n=2). Der Selektivitätsparameter wurde berechnet als Logarithmus des Verhältnisses zwischen dem Prozentsatz der Inhibition der ω -Hydroxylierung (Mittelwert aus zwei Werten) und dem Prozentsatz der Inhibition der Epoxidierung (Mittelwert aus zwei Werten) [$\log(\text{Inhibition } \omega\text{-Hydroxylierung}/\text{Inhibition Epoxidierung})$].

Verbindung	Substituent						Inhibition [%]		Selektivität
	5	6	7	2'	3'	4'	Epoxidierung	ω -Hydroxylierung	
TB065	H	OMe	H	H	H	H	16–18	< 15	-0.05
TB071	H	H	OMe	H	H	H	50–55	< 15	-0.54
TB077	OMe	OMe	OMe	H	H	H	< 15–32	< 15–23	-0.09
TB084	H	OH	H	H	H	H	15–24	< 15–23	-0.01
TB095	H	H	OH	H	H	H	35–43	< 15	-0.41
TB093	OH	OH	OH	H	H	H	32–37	<15	-0.36
> 90% Inhibition der Epoxygenasen < 15%							< 15% Inhibition der ω -Hydroxylasen > 90%		
-2							Selektivität		2

Die Kombination der Substitutionsmuster des A- und B-Rings, die einerseits zu einer Inhibition der ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure und somit zu einer verminderten Bildung von 20-HETE führen, aber andererseits keine Inhibition der EpETrE-Bildung verursachen, führt zu Flavonen, die an den Positionen C7 und C2' nicht substituiert sind und vorzugsweise einen elektronegativen Substituenten an C4'-Position aufweisen (Tabelle 4-4). Die CF₃-Funktion an C4'-Position bewirkt eine ausgeprägte ω -Hydroxylaseinhibition, auch in Kombination mit unterschiedlichen A-Ring-Substituenten, z.B. Methoxy-Funktionen an den Positionen C6 oder C7. Zwei dieser Substanzen erfüllen die initial definierten Kriterien für einen potenten (> 50% Inhibition bei 10 μ M Inhibitorkonzentration im Multienzymscreening) und selektiven (Selektivität > 0.5) ω -Hydroxylaseinhibitor: TB009 und TB069 (Abbildung 4-2).

Tabelle 4-4 Flavone mit variierenden Substitutionsmustern des A- und B-Rings als selektive Inhibitoren der CYP-katalysierten ω -Hydroxylierung. Die Substanzen wurden bei einer Screeningkonzentration von 10 μ M im Multienzymassay getestet. Die Inhibition wurde basierend auf der Produktbildung und relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor bestimmt (100 - % der Kontrolle; n=2). Der Selektivitätsparameter wurde berechnet als Logarithmus des Verhältnisses zwischen dem Prozentsatz der Inhibition der ω -Hydroxylierung (Mittelwert aus zwei Werten) und dem Prozentsatz der Inhibition der Epoxidierung (Mittelwert aus zwei Werten) [$\log(\text{Inhibition } \omega\text{-Hydroxylierung}/\text{Inhibition Epoxidierung})$].

Verbindung	Substituent						Inhibition [%]		
	5	6	7	2'	3'	4'	Epoxidierung	ω -Hydroxylierung	Selektivität
TB115	H	OMe	H	H	OMe	H	< 15–22	< 15	-0.09
TB066	H	OMe	H	H	H	OMe	< 15	< 15	0.00
TB068	H	OMe	H	H	OMe	OMe	< 15	< 15–20	0.07
TB089	H	OH	H	H	OH	OH	< 15	26–32	0.29
TB070	H	OMe	H	H	H	Br	< 15	17–26	0.16
TB099	H	OH	H	H	H	Br	< 15	< 15	0.00
TB069	H	OMe	H	H	H	CF ₃	< 15	55–62	0.59
> 90% Inhibition der Epoxygenasen < 15%							< 15%	Inhibition der ω -Hydroxylasen	> 90%
-2							Selektivität		2

In weiteren Experimenten (Kapitel 6) stellte sich TB009 als der geeignetere ω -Hydroxylaseinhibitor heraus: Es wurde eine Löslichkeit von $3.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$ für

TB009 bestimmt [in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), pH 7.4, 25 °C, vgl. Kapitel 6.1]. Die Löslichkeit von TB069 unter den gleichen experimentellen Bedingungen ist deutlich geringer ($1.0 \pm 0.2 \mu\text{M}$). Aufgrund dieser limitierten Löslichkeit können in wässrigen Puffern, die in biologischen Assays eingesetzt werden, effektive Konzentrationen von TB069 nur teilweise erreicht werden. Da die Methoxylierung des A-Rings keinen offensichtlichen (positiven) Einfluss auf die inhibitorischen Eigenschaften des Flavonderivates zeigt, wurde lediglich TB009 als prototypischer ω -Hydroxylaseinhibitor weiter charakterisiert.

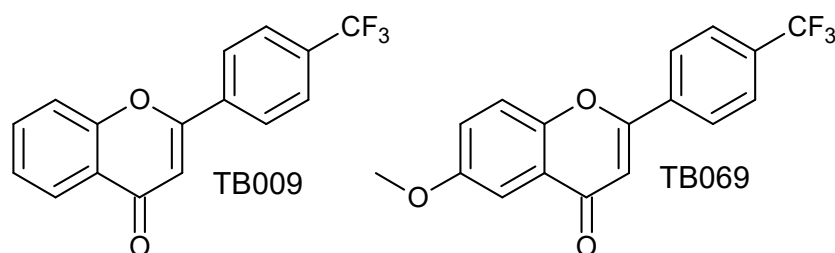


Abbildung 4-2 Chemische Struktur der ω -Hydroxylaseinhibitoren TB009 (4'-Trifluormethylflavon) und TB069 (4'-Trifluormethyl-6-Methoxyflavon).

4.2 Inhibitorische Eigenschaften von 4'-Trifluormethylflavon

Die Potenz des entwickelten ω -Hydroxylaseinhibitors TB009 (4'-Trifluormethylflavon) wurde basierend auf dessen relativen IC_{50} -Werten charakterisiert (Tabelle 4-5, Appendix 14). Der relative IC_{50} beschreibt den Wendepunkt der Dosis-Wirkungskurve, welche aus einer logistischen Regression [*Four Parameter Logistic Regression*] resultiert [192].

In humanen Lebermikrosomen inhibiert TB009 die Bildung von 20-HETE aus Arachidonsäure mit einem IC_{50} von $2.8 \mu\text{M}$ (Tabelle 4-5). Eine vergleichbare Potenz ist auch in Mikrosomen aus Ratten- oder Mausleber festzustellen (IC_{50} $1.4 \mu\text{M}$ bzw. $0.71 \mu\text{M}$), sowie in der humanen Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie HCT 116 (IC_{50} $1.9 \mu\text{M}$). Gleichzeitig werden Epoxygenasen, und damit die Bildung von EpETrE, durch TB009 nicht inhibiert (21 – 28% Inhibition bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ TB009 in HLM). Auch die Aktivität der extrahepatischen Epoxygenase CYP2J2 moduliert TB009 nicht (Tabelle 4-5).

Die Verminderung der 20-HETE-Bildung in HLM ist auf eine effektive Inhibition des ω -hydroxylierenden Enzyms CYP4F2 zurückzuführen (IC_{50} 0.76 μ M), während CYP4A11 auch bei hohen Konzentrationen von TB009 nicht inhibiert wird (Tabelle 4-5). TB069 weist ähnliche Eigenschaften auf (Appendix 15). Das Flavonderivat TB009 ist damit nicht nur hoch selektiv, sondern auch potenter als die Ausgangsverbindung Apigenin (Kapitel 3.3). Da eine Variation der Dauer der Vorinkubation über einen Zeitraum von 0 bis 30 min die Potenz des Inhibitors nicht beeinflusst, erfolgt die Inhibition von CYP4F2 durch TB009 zeitunabhängig. *Jump-Dilution*-Experimente, bei welchen die Vorinkubation des Enzyms mit hoher Inhibitorkonzentration erfolgt und die Produktbildung im Anschluss nach rapider Verdünnung des Inkubationsansatzes bestimmt wird [193, 194], lassen einen reversiblen Inhibitionsmechanismus schlussfolgern (Abbildung 4-3), da die Aktivität des Enzyms nach der Verdünnung wieder hergestellt werden kann.

Tabelle 4-5 Inhibitorische Potenz des synthetischen Flavonoids TB009.^a

	relativer IC_{50} [μ M] (95% CI) ^b	absoluter IC_{50} [μ M] (95% CI) ^c
Humane Lebermikrosomen	2.8 (1.3–6.1)	4.9 (3.0–8.1)
CYP4F2	0.76 (0.42–1.4)	0.87 (0.61–1.2)
CYP4A11	50 μ M: < 25% Inhibition	
CYP2J2	50 μ M: < 25% Inhibition	
Rattenlebermikrosomen	1.4 (0.77–2.7)	4.3 (2.9–6.5)
Mauslebermikrosomen	0.71 (0.24–2.2)	7.6 (2.6–22)
HCT 116	1.9 (0.61–5.9)	1.1 (0.50–2.3)

^a Die Inkubationen von Mikrosomen, Enzymen und HCT 116-Zellen mit Arachidonsäure und die quantitative Bestimmung der Oxidationsprodukte erfolgten wie in den Kapiteln 3 und 8 beschrieben. Die Dosisabhängigkeit der Inhibition der Produktbildung wurde in einem Konzentrationsbereich von 0.01 bis 50 μ M (HCT 116: bis 30 μ M) des Inhibitors bestimmt. Die Inhibition wurde auf Grundlage der Produktbildung relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor berechnet (100 - % der Kontrolle).

^b Wendepunkt der Dosis-Wirkungskurve nach Fit der Daten an eine logistische Funktion (4 Parameter).

^c Konzentration, bei der 50% Inhibition der maximalen Produktbildung erreicht wird.

Während sich der relative IC_{50} -Wert auf 50% der durch die Testsubstanz tatsächlich erreichten Wirkung bezieht, berücksichtigt der absolute IC_{50} -Wert die

verbleibende Aktivität innerhalb des Bereichs von 0 bis 100% Inhibition. Er benennt folglich jene Inhibitorkonzentration, bei welcher 50% Inhibition der maximalen Produktbildung erreicht werden [192]. Wenn die ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure von mehr als einem mikrosomalen CYP katalysiert wird, und eines davon durch den eingesetzten Inhibitor nicht blockiert wird, kann eine Inhibition von 100% des absoluten Effekts nicht erzielt werden. In humanen Lebermikrosomen liegt der absolute IC_{50} nur marginal über dem relativen Wert (Tabelle 4-5). Dies deutet auf einen geringen, aber messbaren Beitrag weiterer ω -hydroxylierender Enzyme hin, welche neben CYP4F2 zur Bildung von 20-HETE beitragen – in HLM wahrscheinlich hauptsächlich CYP4A11 [104, 111].

Auch in Rattenlebermikrosomen ist der absolute IC_{50} -Wert etwas höher als der Relative ($4.3 \mu\text{M}$ und $1.4 \mu\text{M}$), während bei den Lebermikrosomen der Maus bedeutende Unterschiede gegeben sind ($7.6 \mu\text{M}$ und $0.71 \mu\text{M}$, Tabelle 4-5). Die ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure wird in der Leber der Ratte durch CYP4F1 und CYP4F4 [195-197] katalysiert, sowie durch die Enzyme 1, 2 und 3 der CYP4A-Unterfamilie [198, 199]. Die Maus verfügt über die Enzyme CYP4A10, CYP4A12A und CYP4A12B, welche die 20-HETE-Bildung in hepatischen Geweben katalysieren [200, 201]. Zusätzlich ist für sechs Gene der CYP4F-Unterfamilie die Expression in der Mausleber beschrieben (*Cyp4f13*, *Cyp4f14*, *Cyp4f15*, *Cyp4f16*, *Cyp4f17* und *Cyp4f18*) [202]. Die funktionellen Eigenschaften und katalytischen Aktivitäten dieser CYP4F-Enzyme

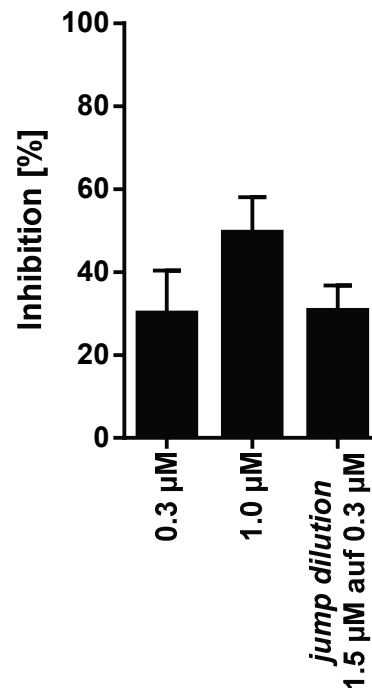


Abbildung 4-3 Jump dilution. Inhibition der CYP4F2-katalysierten 20-HETE-Bildung durch $0.3 \mu\text{M}$ und $1.0 \mu\text{M}$ TB009, sowie im Enzymassay, welcher mit $1.5 \mu\text{M}$ TB009 vorinkubiert und unmittelbar vor dem Start der Reaktion auf $0.3 \mu\text{M}$ verdünnt wurde. Die Inhibition wurde auf Grundlage der Produktbildung (20-HETE) relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor berechnet (100 - % der Kontrolle). Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 4-6$.

im Hinblick auf die ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure sind jedoch nicht aufgeklärt, auch wenn einige Daten darauf hindeuten, dass zumindest CYP4F13 und CYP4F16 zur Bildung von 20-HETE in der Leber der Maus beitragen könnten [203]. TB009 inhibiert die ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure in Mauslebermikrosomen mit einem absoluten IC_{50} von 7.6 μ M. Da die Verbindung TB009 als CYP4F-selektiver Inhibitor wirkt, ohne die CYP4A-Aktivität zu beeinträchtigen, zeigen diese Daten, dass neben CYP4A auch Enzyme der CYP4F-Unterfamilie in der Leber der Maus eine ω -Hydroxylase-Aktivität aufweisen.

4.3 Schlussfolgerungen

Selektive CYP-Inhibitoren haben sich in den letzten Jahrzehnten als unverzichtbares Werkzeug für ein besseres Verständnis der menschlichen Physiologie erwiesen. Sie werden eingesetzt, um die Rolle einzelner CYP im Fremdstoffmetabolismus zu charakterisieren, und sind als Medikament zur Behandlung von Prostatakrebs zugelassen [204, 205]. Die endogene Bildung von Eicosanoiden aus Arachidonsäure wird ebenfalls durch CYP katalysiert. Da die resultierenden Produkte eine fundamentale Rolle spielen bei der Regulierung der Vasokonstriktion, der endothelialen (Dys-) Funktion, der Angiogenese, sowie bei der Homöostase der Niere und bei inflammatorischen Prozessen, ist dieser Stoffwechselweg ein relevantes und gleichzeitig sensibles pharmakologisches Target. Der Beitrag einzelner CYP zur Bildung von 20-HETE in vielen Geweben und die Folgen einer selektiven Modulation ihrer Aktivität sind bisher wenig aufgeklärt [12, 70]. Um die Bedeutung der CYP4A- und CYP4F-Aktivität für die humane Physiologie besser zu verstehen, sind Inhibitoren, die eine selektive Modulation der Aktivität dieser Enzyme ermöglichen, unverzichtbar.

Ausgehend von den eingangs identifizierten Flavonen mit bemerkenswert potenten und zum Teil selektiven CYP-inhibitorischen Eigenschaften (Kapitel 3.3), wurden hier grundlegende strukturelle Merkmale eines Flavons erarbeitet, die für eine Inhibition der ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure wesentlich sind, sowie Substitutionsmuster, die eine Inhibition der Epoxygenasen verhindern,

abgeleitet. Es konnte gezeigt werden, dass Flavone, welche (Methoxy-) Substituenten an C2'-Position und/oder an Position C7 tragen, eine Inhibition epoxidierender CYP bewirken. Zahlreiche weitere inhibitorische Eigenschaften sind für solche Verbindungen beschrieben: Eine Hydroxylierung an Position C7 ist auch ein essentielles Strukturmerkmal von Flavonderivaten, die die CYP3A4-katalysierte Hydroxylierung von Testosteron inhibieren [190, 206]. Die von CYP19A1 katalysierte Oxidation von Dibenzylfluorescein wird durch 7-Methoxy- sowie 7-Hydroxyflavon mit IC_{50} -Werten von 0.51 μ M und 1.9 μ M inhibiert [207]. McKendall et al. beschreiben unter Verwendung eines fluorophorhaltigen Modellsubstrates eine Reduzierung der CYP1A2- und CYP2A6-Aktivität durch 2'-Methoxyflavon [208]. Substituenten an C2' und C7 bewirken folglich eine nicht-selektive Inhibition der katalytischen Aktivität von CYP, auch über die P450-Enzyme der Arachidonsäure-Kaskade hinaus. Im Gegensatz dazu führen elektronegative Substituenten an C4'-Position zu selektiven ω -Hydroxylaseinhibitoren. Das resultierende Flavon TB009 ist ein hoch selektiver CYP4F-Inhibitor, welcher die ω -Hydroxylierung der Arachidonsäure mit einem IC_{50} -Wert im sub-mikromolaren Bereich inhibiert, ohne die Aktivität von CYP4A zu beeinflussen. Der neue Inhibitor weist nicht nur bei humanen Enzymen eine hohe Potenz auf, sondern inhibiert die Bildung von 20-HETE auch in Mikrosomen der Maus und der Ratte und ist ein wirksamer Inhibitor der ω -Hydroxylaseaktivität in HCT 116 Zellen.

Obwohl von CYP4F2 ein bedeutender Beitrag zur Bildung von 20-HETE im Menschen ausgeht [104, 111], wird die ω -Hydroxylaseaktivität in Tiermodellen zu Hypertonie, wie spontan-hypertensiven Ratten, im Allgemeinen CYP4A-Enzymen zugeschrieben, während die CYP4F-Unterfamilie bisher wenig Beachtung findet [209-214]. Der neu entwickelte zeitunabhängige, reversible CYP4F-Inhibitor wird eine umfassende Untersuchung der physiologischen Auswirkungen des durch CYP4F-katalysierten 20-HETE *in vitro* und *in vivo* ermöglichen. Einige wenige Inhibitoren der ω -hydroxylierenden CYP4-Familie, aber nicht der 4F- oder 4A- Unterfamilie, sind verfügbar, wie zum Beispiel die Formamidderivate HET0016 und TS-011, die als *tight-binding* Inhibitoren die

CYP4-katalysierte 20-HETE-Bildung mit IC_{50} -Werten im Bereich um 100 nM inhibieren [210, 215, 216]. Der *suicide*-Inhibitor 17-ODYA wurde ursprünglich als selektiver ω -Hydroxylaseinhibitor identifiziert [133], in anschließenden Studien konnte eine solche Selektivität jedoch nicht immer beobachtet werden [131, 210, 217]. Lediglich eine Verbindung mit CYP4F-Selektivität ist in der Literatur beschrieben: Das natürliche Triterpenoid Rubiarbonon C inhibiert die Bildung von 20-HETE durch CYP4F2 mit einem IC_{50} von 4.2 μ M ohne eine Reduzierung der katalytischen Aktivität von CYP4A11 zu verursachen [218]. Aufgrund der anzunehmenden ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Verbindung [219] ist ihr Anwendungsfeld jedoch limitiert.

Es kann geschlussfolgert werden, dass Flavon-Derivate eine vielversprechende Ausgangsstruktur für die Entwicklung selektiver CYP4F-Inhibitoren sind. Der entwickelte Inhibitor TB009 weist eine hohe Potenz und ausgeprägte Selektivität auf. Er ist ein neues Instrument für die differenzierte Untersuchung von Enzymen der CYP4-Familie und eröffnet damit neue Möglichkeiten die ambivalente Rolle von 20-HETE, unter anderem bei der Regulierung des Blutdrucks, und den Beitrag von CYP4F2 zur Entstehung von Hypertonie besser zu verstehen.

Kapitel 5

Entwicklung einer online-SPE Methode zur quantitativen Analyse von Flavonen und anderen *small molecules*

Instrumentelle chromatografische Methoden sind für die Analyse von Minorbestandteilen in komplexen Matrices unersetzlich. Die quantitative Analyse von pharmakologischen Wirkstoffen und deren Metaboliten erfolgt häufig mittels Flüssigkeitschromatografie (LC) gekoppelt mit Massenspektrometrie (MS) [220, 221]. Auch für die Bestimmung von Polyphenolen in pflanzlichen Materialien, sowie von deren Transformationsprodukten in biologischen Proben wie Blutplasma oder Urin, werden zumeist LC-MS-Methoden eingesetzt [222, 223]. In zahlreichen aktuellen Methoden zur Quantifizierung von Flavonoiden geht der Analyse eine Flüssig-Flüssig-Extraktion der Analyten, häufig mit Ethylacetat, voraus [224-226]. Seltener wird eine Extraktion mittels Festphase (SPE) durchgeführt [227, 228]. Ziel solcher Extraktionen ist die Abtrennung von Matrixbestandteilen, welche die folgende Analyse durch Interferenzen stören können. Je nach Fragestellung und Probenmatrix können dies insbesondere Makromoleküle wie Proteine, aber auch die Lipidfraktion oder Salze sein [229]. Neben Interferenzen bei der Detektion, zum Beispiel durch Ionensuppression, kann eine ungenügende Matrixabreicherung auch die Verwendungsdauer von HPLC-Säulen und -Systemen limitieren. Eine effiziente Extraktion ermöglicht außerdem eine Aufkonzentrierung der Analyten, sodass auch solche Verbindungen zuverlässig bestimmt werden können, die nur in geringen Mengen in den Proben vorliegen.

Um die aus der Aufklärung der Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen Arachidonsäure-oxidierenden CYP und Flavonoiden abgeleiteten CYP4F-Inhibitoren (Kapitel 4) weiter charakterisieren zu können, wurde im Folgenden

eine Methode zur online-Festphasenextraktion (online-SPE) in Verbindung mit Flüssigkeitschromatografie mit UV-spektroskopischer sowie tandemmassenspektrometrischer Detektion (LC-UV-MS/MS) entwickelt. Die online-SPE erlaubt die Analyse verschiedener Proben, wie zum Beispiel Überstände von Zellkulturen oder Plasmaproben, direkt nach Zugabe eines internen Standards und ohne manuelle Aufreinigung [141, 168, 230]. Nach der automatisierten Festphasenextraktion werden die extrahierten Analyten direkt auf eine analytische Trennsäule transferiert und chromatografisch getrennt. Dies ermöglicht die Analyse und quantitative Bestimmung der in verschiedenen Assays eingesetzten Flavonoide mit einem hohen Probendurchsatz. Die Detektion mittels Diodenarray-Detektor (DAD) und Triple-Quadrupol-Massenspektrometer ermöglicht eine selektive Erfassung der Analyten über einen weiten Konzentrationsbereich. Die entwickelte Methode deckt dabei nicht nur einzelnen Verbindungen wie TB009 und TB069 (Kapitel 4, Abbildung 4-2) ab, sondern ist vielseitig einsetzbar und ermöglicht die Analyse zahlreicher niedermolekularer Verbindungen, wodurch sie auch bei anderen Fragestellungen Anwendung finden kann.

5.1 Aufbau und chromatografische Parameter

Der Aufbau des hier verwendeten online-SPE-Systems entspricht im Allgemeinen dem gängiger HPLC-Anlagen, mit dem Unterschied, dass eine zusätzliche HPLC-Pumpe sowie ein weiteres 2-Positionen-6-Wege-Ventil installiert sind. Außerdem wird das System durch eine zusätzliche chromatografische Säule ergänzt, welche für die Festphasenextraktion eingesetzt wird [Abbildung 5-1 (I)]. Für eine Vielzahl von Extraktionsverfahren ist eine online-Kopplung mit Flüssigkeitschromatografie beschrieben. Die eingesetzten Extraktionsphasen reichen von klassischen vollporösen 5 µm RP18-Partikeln [231-234] über monolithische Phasen in verschiedensten Dimensionen [235, 236] bis hin zu metallorganischen Gerüsten [237] und Kohlenstoff(nano)strukturen [238-240]. Für die Analytik von niedermolekularen Verbindungen in proteinhaltigen Matrices finden insbesondere *restricted-access materials* (RAM) Anwendung [241, 242]. Basierend auf dem Prinzip des Größenausschlusses findet bei RAM keine Interaktion mit Makromolekülen wie Proteinen statt, während kleine Moleküle in die Poren der Partikel diffundieren und durch intermolekulare Wechselwirkungen und Adsorptionseffekte retardiert und damit extrahiert werden [240, 242]. Diese Eigenschaften der RAM werden zumeist durch Modifizierung vollporöser Partikel realisiert, zum Beispiel indem innere und äußere Oberflächen mit funktionellen Gruppen unterschiedlicher Polarität modifiziert werden oder für Makromoleküle zugängliche Oberflächen durch den Einsatz von Polymeren gezielt deaktiviert werden [242, 243].

Eine alternative Technik zur Extraktion von niedermolekularen Verbindungen aus unter anderem proteinreichen Matrices ohne für diese Anwendung modifizierte stationäre Phasen ist die Trennung mit turbulentem Fluss (*turbulent flow chromatography*, TFC). Die für die TFC verwendeten Extraktionsphasen zeichnen sich durch verhältnismäßig große Partikel (20–50 µm) bei gleichzeitig geringer Säulenlänge (≤ 50 mm) und kleinem Innendurchmesser der Säule (< 2 mm) aus. Während der Extraktion wird die Probe mit hohen Flussraten von bis zu 10 mL/min auf die SPE-Säule gebracht.

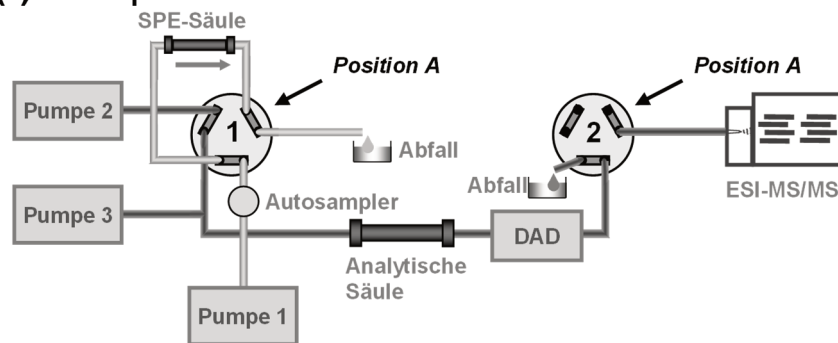
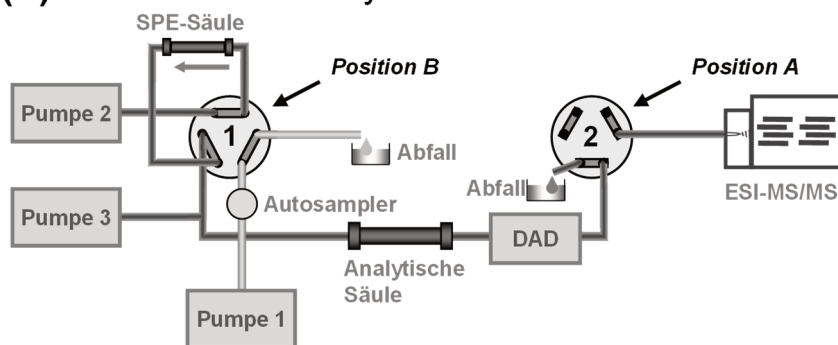
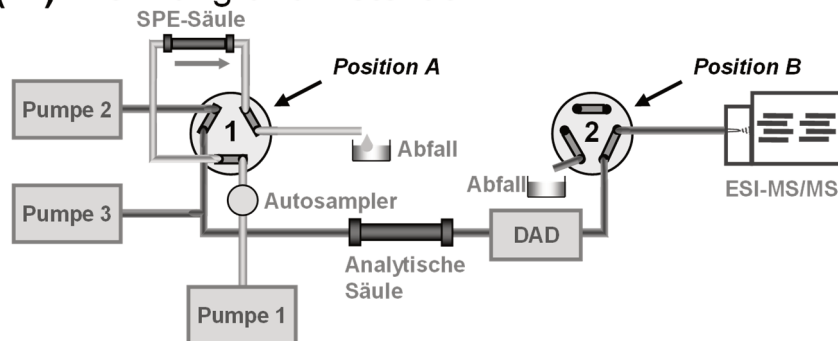
(I) Festphasenextraktion**(II) Transfer der Analyten****(III) Trennung und Detektion**

Abbildung 5-1 Aufbau des online-SPE-LC-UV-MS/MS-Systems. (Aus [244] erweiterte Darstellung) **(I)** Die Probe wird nach der Injektion durch den Fluss der Pumpe 1 auf die SPE-Säule gebracht, wo die Analyten extrahiert werden. **(II)** Nach Schaltung des Ventils 1 werden die Analyten durch den Fluss der Pumpe 2 mit hoher Elutionskraft von der SPE-Säule auf die analytische Säule transferiert. Das Eluat wird über ein T-Stück mit dem von Pumpe 3 geförderten wässrigen Eluenten vereint, was zu einer Reduktion der Elutionskraft des Solvents führt, und eine Retention polarer Analyten an der analytischen Säule (RP18-Material) ermöglicht. **(III)** Nach dem der Transfer abgeschlossen ist, wird das Ventil 1 erneut geschaltet. Es erfolgt die chromatografische Trennung mittels Gradientenelution, welche durch Änderungen der Flüsse der Pumpen 2 und 3 realisiert wird. Durch ein Schalten des Ventils 2 wird nur der zu analysierende Teil des Eluats in das Massenspektrometer zur Detektion eingeleitet. Während der chromatografischen Trennung wird die SPE-Phase durch die Pumpe 1 gespült und äquilibriert. Die Konfigurationen (I)–(III) entsprechen den in Abb. 5-5 identisch gekennzeichneten Abschnitten des Analysenlaufs.

Der hohe Fluss und die Größe der Partikel führen zu einer turbulenten Strömung [245]. Diese erhöht die Effizienz der Retention durch einen schnelleren Massentransfer zwischen mobiler und stationärer Phase [245-247]. Bei hohen Flussraten haben außerdem die Diffusionskoeffizienten der in der mobilen Phase gelösten Stoffe einen Einfluss auf die Retention: Größere Moleküle wie Proteine diffundieren langsamer als niedermolekulare Verbindungen – während kleine Moleküle an die Oberfläche und in die Poren der stationären Phase diffundieren und in Abhängigkeit der Eigenschaften des Phasenmaterials retardiert werden, werden große Moleküle, die wenig Interaktion mit der stationären Phase aufweisen, durch den hohen Fluss eluiert [248, 249]. Die online-Extraktion mittels TFC führt zu einer effizienten Extraktion niedermolekularer Analyten und Abtrennung von Proteinen [249, 250], wobei die Matrixanreicherung teilweise reproduzierbarer und vollständiger abläuft als mit automatisierter offline-SPE oder manueller Flüssig-Flüssig-Extraktion [251]. Auch die hier entwickelte online-SPE nutzt das Prinzip der TFC. Als SPE-Säule wird dabei ein polymeres Phasenmaterial (Waters Oasis HLB direct connect HP Säule, 2.1 × 30 mm, 20 µm Partikel) gewählt, da sich dieses für vergleichbare Anwendungen im Arbeitskreis als am Geeignetsten herausstellte [244]. Als Eluenten für die SPE werden 0.1% Essigsäure in Wasser als Solvent A und 0.1% Essigsäure in Acetonitril als Solvent B verwendet.

Für die Analyse der Polyphenole wurde mit Fokus auf die quantitative Bestimmung der synthetischen Flavonoide TB009 und TB069 (Abbildung 4-2) ein Flavon mit ähnlichem Substitutionsmuster als interner Standard gewählt: TB127 (2'-Trifluormethyl-7-Methoxyflavon, Abbildung 5-2). Diese Substanz weist ein vergleichbares Retentionsverhalten bei der chromatografischen Trennung auf wie die zu analysierenden CYP4F-Inhibitoren (Abbildung 5-5 D, Tabelle 5-1). Aufgrund dessen ist zu erwarten, dass Verluste der Analyten, sowie Matrixeffekte während der

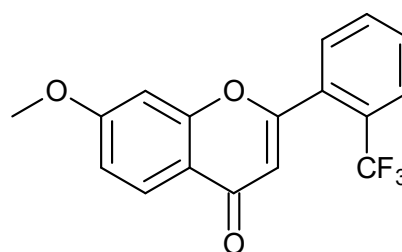


Abbildung 5-2 Struktur des als internen Standard eingesetzten TB127 (2'-Trifluormethyl-7-Methoxyflavon).

Extraktion und Detektion durch diesen internen Standard ausgeglichen werden. Bei Analysen mit massenspektrometrischer Detektion sind Isotopologe der jeweiligen Analyten als interne Standards der „Goldstandard“ für die quantitative Bestimmung. Da neben der Detektion mittels Massenspektrometrie in dieser Arbeit auch die spektroskopische Bestimmung mittels UV-Detektion angewendet wird, ist ein isotopenmarkierter interner Standard jedoch nicht geeignet, weil dessen Signal mit dem Signal des Analyten im UV-Detektor interferieren würde. Da die Flavonderivate außerdem vergleichbare Chromophore aufweisen – und damit eine differenzierte Erfassung über verschiedene Wellenlängen nicht möglich ist – ist bei den Zielsubstanzen eine chromatografische Trennung von Analyt und internem Standard Voraussetzung für die selektive UV-Detektion. Trotz struktureller Ähnlichkeit zu TB069 und TB009 erfüllt TB127 diese Voraussetzung (Abbildung 5-5). Da zudem auszuschließen ist, dass TB127 als ursprünglicher Bestandteil in der Probenmatrix enthalten ist, ist diese Verbindung für die Verwendung als interner Standard als geeignet anzusehen.

Vor der Injektion wird die zu analysierende Probe (zumeist eine wässrige Lösung, z.B. Kulturmedium von mit TB009 inkubierten Zellen) mit einem äquivalenten Volumen des in Acetonitril gelösten internen Standards versetzt. Für die Injektionslösung resultiert somit eine Zusammensetzung von Wasser/Acetonitril 50/50 (v/v). Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand dieser Probe wird für die online-SPE eingesetzt. Mit einem Fluss von 3.5 mL/min 0.1% Essigsäure in Wasser (Eluent A der SPE) wird die Probe (Injektionsvolumen: 20 µL) auf die SPE-Säule gebracht [Abbildung 5-1 (I)], wo die Extraktion der Analyten und das Entfernen von Matrixbestandteilen erfolgt. Die Extraktion erfolgt für 30 Sekunden. Da bei der hier gewählten Applikation eine Verlängerung der Extraktionszeit von 0.5 Minuten auf 5.5 Minuten keinen Einfluss auf die Peakhöhe der zu extrahierenden Polyphenole zeigt (bei gleicher Peakbreite, Abbildung 5-3), ist zu schlussfolgern, dass die verwendete SPE-Phase für die Extraktion von (synthetischen) Polyphenolen zweckmäßig ist, da unter den gegebenen Extraktionsbedingungen eine dauerhafte Retention erfolgt. Durch ein Schalten des 6-Wege-Ventils 1 nach 0.5 Minuten [Abbildung 5-1 (II)] wird der Fluss der für

die SPE eingesetzten Pumpe (Pumpe 1) auf die SPE-Säule unterbrochen und somit die Extraktion beendet. Gleichzeitig wird durch dieses Schalten von Ventil 1 das von der Pumpe 2 geförderte Solvent gegenläufig auf die Extraktionsphase geleitet. In Folge dessen werden die retardierten Analyten im sogenannten *Backflush*-Modus von der SPE-Phase eluiert und auf die analytische Säule transferiert.

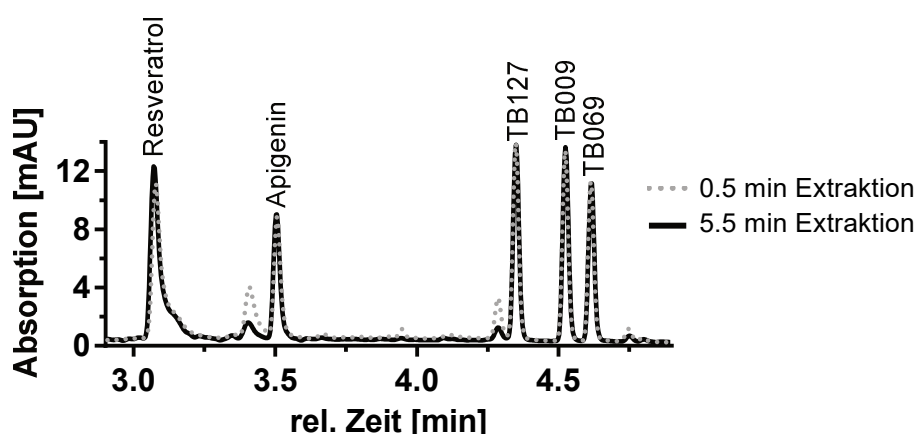


Abbildung 5-3 Durchbruchtest der online-SPE-Extraktion Dargestellt sind die Chromatogramme nach online-Extraktion für 0.5 min (graue, gepunktete Linie), sowie für 5.5 min (schwarze Linie). Die identischen Peakformen und -flächen weisen auf eine ausreichende Retention der Analyten auf der SPE-Phase hin, da bei verlängerter Extraktionsdauer kein Verlust zu beobachten ist. 20 μL einer Polyphenollösung (0.5 μM in Wasser/Acetonitril 50/50 (v/v)) wurden mit einem Fluss von 3.5 mL/min 0.1% Essigsäure in Wasser auf die SPE-Säule (Waters Oasis HLB, 2.1 x 30 mm, 20 μm Partikel) gebracht. Nach 0.5 min oder 5.5 min wurden die Analyten im *Backflush*-Modus mit einem Fluss von 0.1 mL/min 0.1% Essigsäure in Acetonitril/Wasser 95/5 (v/v) eluiert. Das Eluat wurde mit einem Fluss von 0.5 mL/min 0.1% Essigsäure in Wasser/Acetonitril 95/5 (v/v) über ein T-Stück vereint und die Polyphenole mittels eines linearen Gradienten auf einer RP18-Phase (50 x 2.1 mm, 1.8 μm Partikel) chromatografisch getrennt. Die Abbildung zeigt das UV-Signal (300 nm) der Trennung. Die Zeitachse ist relativ zum Schalten des 6-Wege-Ventils dargestellt, welches die Elution der Analyten und die chromatografische Trennung initiiert.

Die Zusammensetzung des Solvents für den Transfer ist so zu wählen, dass die Elutionskraft ausreichend ist, um die zu erfassenden Analyten vollständig von der SPE-Phase zu eluieren. Damit die auf den Transfer folgende chromatografische Trennung nicht limitiert wird, ist der Anteil an organischem Lösungsmittel gleichzeitig so gering wie möglich zu halten: Ein hoher Anteil an organischem Lösungsmittel würde die Retention polarer Analyten an der stationären RP18 Phase der analytischen Säule erschweren. Durch eine geringe Elutionskraft

während des Transfers wird zudem die Abtrennung der Analyten von der Probenmatrix verbessert, da stark unpolare Matrixbestandteile auf der SPE-Phase verbleiben. Der Transfer und die chromatografische Trennung wurden mit Wasser/Acetonitril 95/5 (v/v) mit 0.1% Essigsäure als Eluent A und Acetonitril/Wasser 95/5 (v/v) mit 0.1% Essigsäure als Eluent B realisiert. Eine Variation der für den Transfer eingesetzten Eluentenzusammensetzung zeigt, dass für den vollständigen Transfer unpolarer Verbindungen wie TB069 eine verhältnismäßig hohe Elutionskraft notwendig ist: Steigt der wässrige Anteil (Eluent A) im Eluenten auf über 30%, ist eine verminderte Elution festzustellen (Abbildung 5-4 A). 70% B sind folglich für den Transfer zu wählen.

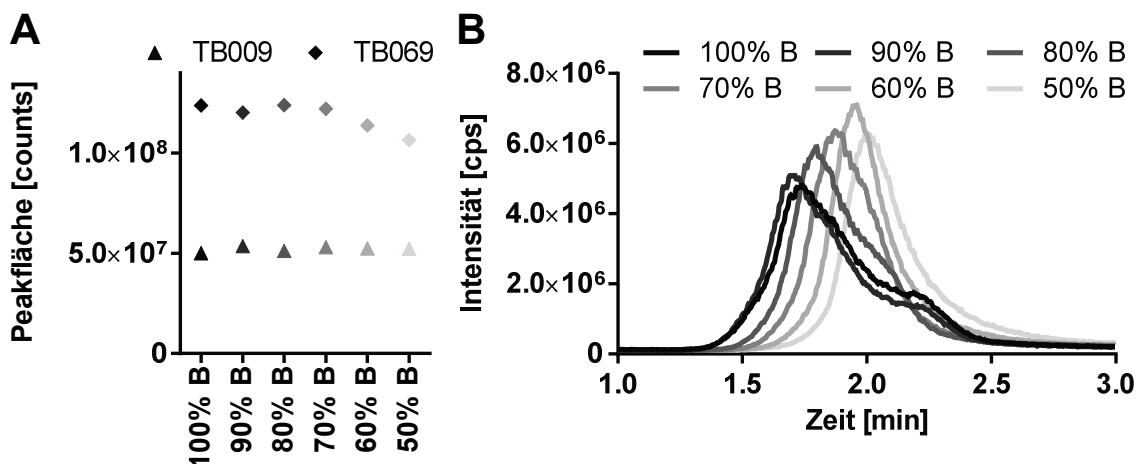


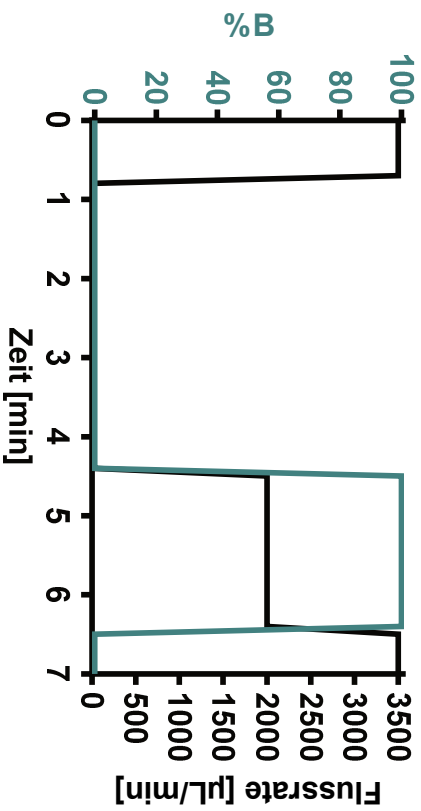
Abbildung 5-4 Optimierung der Eluentenzusammensetzung für die Elution der Analyten von der SPE-Säule. Nach der Beladung der SPE-Säule mit 20 μ L einer 100 nM Polyphenol-Standardlösung in Wasser/Acetonitril 50/50 (v/v) mit einem Fluss von 3.5 mL/min 0.1% Essigsäure in Wasser für 0.5 min wurden die Analyten im *Backflush*-Modus mit einem Fluss von 100 μ L/min mit verschiedenen Lösungsmittelzusammensetzungen eluiert. Eluent A entsprach Wasser/Acetonitril 95/5 (v/v) mit 0.1% Essigsäure und als Eluent B wurde Wasser/Acetonitril 5/95 (v/v) mit 0.1% Essigsäure eingesetzt. Das Eluat des Transfers wurde ohne analytische Säule direkt in den Detektor geleitet. **A** Peakflächen der SIM-Signale von m/z 321 ($[M+H]^+$ -Ion von TB069) und von m/z 291 ($[M+H]^+$ -Ion von TB009). **B** Chromatogramm des SIM-Signals von m/z 321 ($[M+H]^+$ -Ion von TB069).

Der Transfer des unpolarsten Analyten (TB069) von der SPE-Säule mit 70% B ist nach 2.0 Minuten (2.5 Minuten Gesamtlaufzeit) beendet (Abbildung 5-4 B). Nach dieser Zeit wird das 6-Wege-Ventil 1 erneut umgeschaltet, sodass der Fluss der Pumpe 2 zur Trennung der Polyphenole direkt auf die analytische Säule

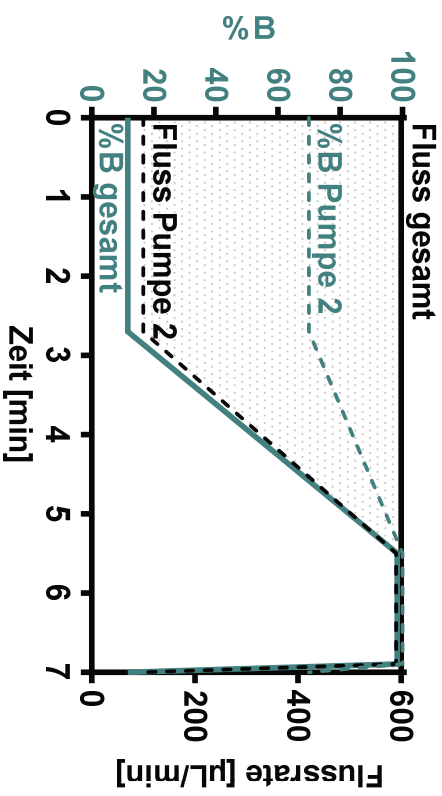
gelangt [Abbildung 5-1 (III)]. Da die zu entwickelnde Methode eine möglichst vielseitige sein sollte, die nicht nur die Bestimmung der synthetischen Flavone TB009 und TB069 ermöglicht, sondern auch weitere, deutlich polarere kleine Moleküle wie die Polyphenole Resveratrol und Apigenin, sowie einige pharmazeutische Wirkstoffe erfasst, wurde der in der Arbeitsgruppe etablierte instrumentelle Aufbau des online-SPE-Systems [168, 244] um eine weitere Pumpe ergänzt: Der Fluss dieser dritten Pumpe (Pumpe 3) wird mit dem Fluss von Pumpe 2 hinter der SPE-Säule, aber vor der analytischen Säule, über ein T-förmiges Verbindungsstück („T-Stück“) vereint (Abbildung 5-1). Dieser Aufbau erlaubt den Transfer der Analyten von der SPE-Säule auf die analytische Säule mit hoher Elutionskraft (70% Acetonitril) ohne die chromatografische Trennung negativ zu beeinflussen, da das Eluat durch den Fluss der Pumpe 3 mit einem wässrigen Eluenten verdünnt und die Elutionsstärke so reduziert wird.

Die Trennung der Polyphenole auf der analytischen Säule (RP18-Phase, 50 × 2.1 mm, 1.8 µm Partikel) erfolgt mittels Gradientenelution, wobei diese durch eine Variation der Flüsse der Pumpen 2 und 3 realisiert wird, und nicht durch die Änderung der Zusammensetzung des von einer einzelnen binären Pumpe geförderten Solvents (Abbildung 5-5; Kapitel 8.3.2). Durch das Schalten des 6-Wege-Ventils 2 wird das Eluat der analytischen Säule zum Zeitpunkt der Elution der Analyten außerdem in das Massenspektrometer geleitet, um zusätzlich zur photometrischen Detektion eine massenspektrometrische Detektion zu realisieren (Abbildung 5-1 (III)). Parallel zur chromatografischen Trennung erfolgt das Spülen und Reäquilibrieren der SPE-Säule durch die Pumpe 1 (Abbildung 5-5). Nach einer Gesamtlauzeit von 7.0 Minuten sind Extraktion, Trennung und Reäquilibrierung abgeschlossen (Abbildung 5-5).

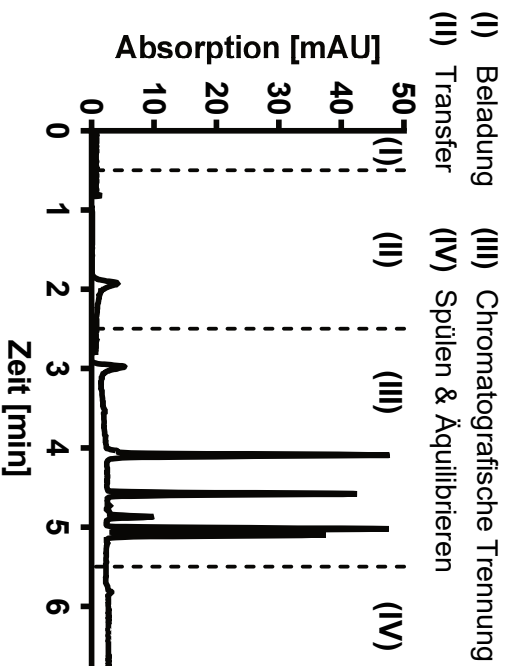
A SPE-Pumpe



B Chromatografische Pumpen



C Abschnitte der Extraktion und Chromatografie



D Chromatografische Trennung

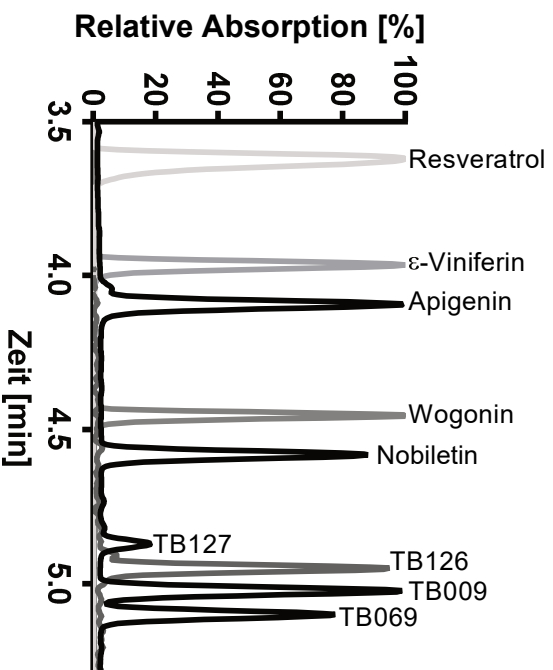


Abbildung 5-5 Parameter der online-SPE-Methode. (links, Seite 74) **A** Gradient und Flussrate der SPE-Pumpe (Pumpe 1). Als Eluent A wird 0.1% Essigsäure in Wasser eingesetzt und als Eluent B 0.1% Essigsäure in Acetonitril. **B** Gradient und Flussraten der für die Chromatografie eingesetzten Pumpen (Pumpe 2 und 3). Eluent A ist Wasser/Acetonitril (95/5) (v/v) mit 0.1% Essigsäure und Eluent B Acetonitril/Wasser (95/5) (v/v) mit 0.1% Essigsäure. Pumpe 3 fördert über den gesamten Lauf ausschließlich Eluent A. **C** UV-Signal (300 nm) über den Analysenlauf (3 µM Standard-Lösung). Einteilung des Analysenlaufs in 4 Abschnitte: (I) Beladung der SPE-Säule und Extraktion der Analyten (0.0–0.5 min), (II) Transfer der Analyten auf die analytische Säule (0.5–2.5 min), (III) Chromatografische Trennung der Zielverbindungen (2.5–5.5 min) und (IV) Spülen und Äquilibrieren der analytischen Säule (5.5–7.0 min). Das Spülen und Äquilibrieren der SPE-Säule erfolgt parallel in den Abschnitten (III) und (IV). **D** Chromatogramm der getrennten Verbindungen. Neben den synthetischen Flavonen werden auch weitere pflanzliche Sekundärmetabolite durch die Methode abgedeckt [schwarz: relatives UV-Signal bei 300 nm eines gemessenen Flavonoidgemisches. grau: Relatives UV-Signal am Absorptionsmaximum der jeweiligen Verbindung (separate Messungen)].

Für die UV-spektroskopische Detektion wird für die einzelnen Zielverbindungen jeweils die aus dem Absorptionsspektrum ermittelte Wellenlänge des Absorptionsmaximums herangezogen. Im Falle von TB009 ergeben sich zwei Maxima: 255 nm und 291 nm (Abbildung 5-6). Auch wenn die Verbindung bei 255 nm ihr absolutes Absorptionsmaximum aufweist, ist die höhere Wellenlänge (291 nm) für die Detektion zu bevorzugen: Sie ist spezifischer für Flavone [252, 253] und erlaubt so eine bessere Abgrenzung zu anderen Verbindungen der Probenmatrix ohne die Sensitivität merklich zu reduzieren (Abbildung 5-6 C).

Die massenspektrometrische Detektion erfolgt im *Selected Reaction Monitoring* (SRM) Modus nach Elektrosprayionisierung im Positiven (ESI+). Beim SRM erfolgt die Selektion eines ausgewählten Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) – in der Regel des $[M+H]^+$ -Ions – im ersten Quadrupol (Q1). Im zweiten Quadrupol (q2) wird dieses Ion mittels kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) fragmentiert, bevor das m/z eines ausgewählten Fragments im dritten Quadrupol (Q3) selektiert wird. Der SRM-Modus ermöglicht somit eine selektive Detektion von Verbindungen. Die zu betrachtenden m/z sind für jede Verbindung individuell zu bestimmen. Die Fragmentierung von Flavonen nach kollisionsinduzierter Dissoziation erfolgt zumeist am C Ring. Die resultierenden Fragmente werden entsprechend mit A und B gekennzeichnet (Abbildung 5-6 A). Die Nomenklatur folgt dem von Ma et al. [254] formulierten Vorschlag. Neben der Ringspaltung

zeigen die meisten Flavonoide im CID-Spektrum auch einen Neutralverlust von Wasser (-18), sowie im Falle methoxylierter Verbindungen von CH_3 (-15) [254-256]. Da die Kollisionsenergie einer derjenigen Parameter der Massenspektrometrie ist, der die Sensitivität einer Transition am stärksten beeinflusst [257], wurde diese Größe für die synthetischen Flavone TB009, TB069, TB127 sowie für Apigenin optimiert (Abbildung 5-6 B; Tabelle 5-1).

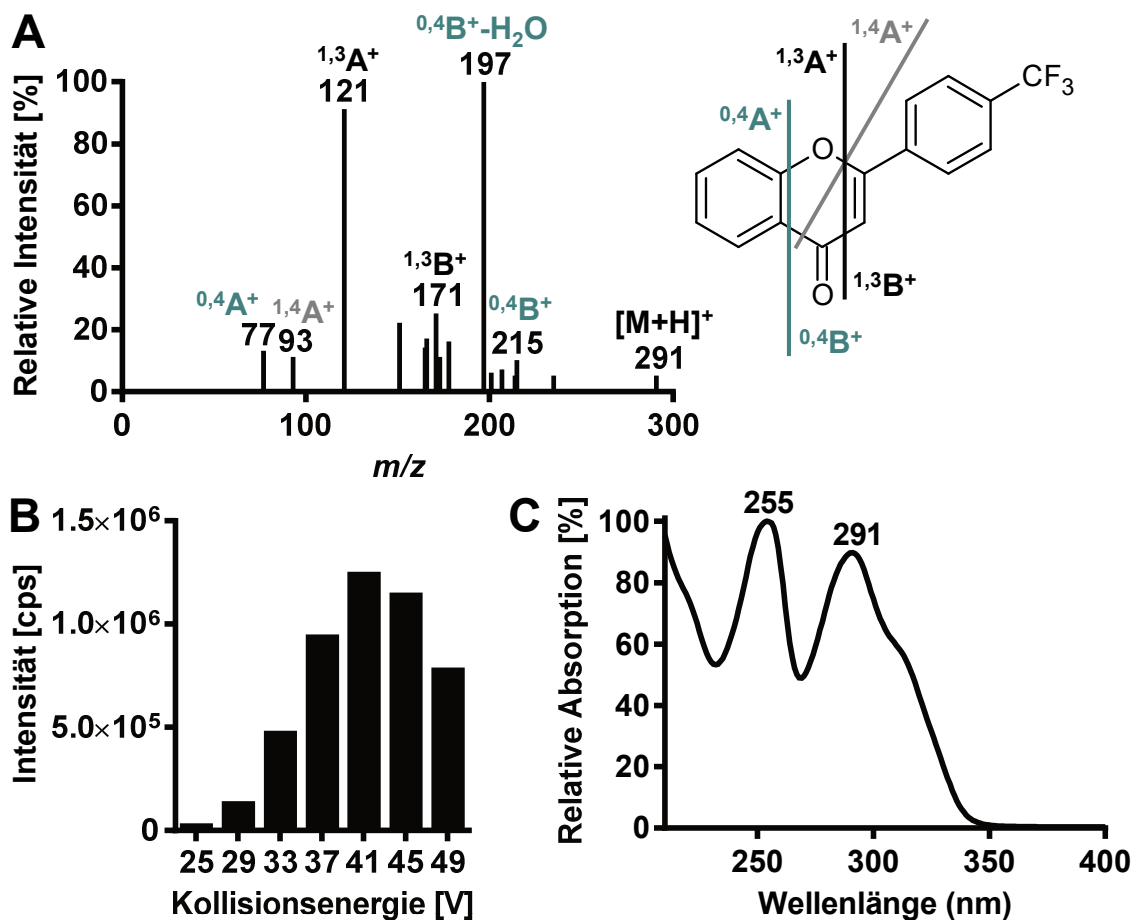


Abbildung 5-6 Wahl der Detektionsparameter – exemplarisch dargestellt für das synthetische Flavon TB009. A Fragmentspektrum des m/z 291 ($[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ion von TB009) nach kollisionsinduzierter Dissoziation mit einer Kollisionsenergie (CE) von 30–65 V, sowie Struktur von TB009 mit vermuteten Positionen der Fragmentierung des C-Rings. **B** Signalintensität des Massenübergangs m/z 291 → 121 in Abhängigkeit der Kollisionsenergie. **C** Absorptionsspektrum von TB009. Das Spektrum wurden mittels DAD in einem chromatografischen Lauf mit Wasser, Acetonitril und Essigsäure als Solvent aufgezeichnet.

Die entwickelte Methode ermöglicht eine automatisierte Extraktion der Analyten mittels online-SPE. Durch die Integration einer weiteren Pumpe zur Reduzierung

der Elutionskraft der Eluats beim Transfer auf die chromatografische Trennsäule ist eine Analyse von Polyphenolen über einen weiten Polaritätsbereich möglich (Abbildung 5-5, Tabelle 5-1). Die optimierte Trennung weist eine ausreichende Retention der Verbindungen (Retentionsfaktor $k' > 1$, bei einer Durchflusszeit von ~ 0.4 min), sowie schmale und symmetrische Peaks auf [Halbwertsbreite (FWHM) < 2 Sekunden, Asymmetriefaktor zwischen 0.9 und 1.3 auf 5% Peakhöhe]. Außerdem ist eine Basislinientrennung der Analyten gegeben (Auflösung $R \geq 1.5$; Abbildung 5-5, Tabelle 5-1). Mit den analytspezifischen Detektionsparametern können die Verbindungen selektiv und sensitiv erfasst werden.

Tabelle 5-1 Detektionsparameter der Flavonoide.^a Gezeigt sind die Retentionszeit, die Peakbreite auf halber Höhe (FWHM), die zur UV-Detektion eingesetzte Wellenlänge, die für die massenspektrometrische Detektion verwendete Transition sowie die optimierte Kollisionsenergie (CE) der Verbindungen.

Analyt	Retentionszeit [min] ^b	FWHM [s] ^c	λ_{\max}	m/z Q1	m/z Q3	CE [V]
TB009	5.02 ± 0.01	1.8 ± 0.2	291	291.2	121.0	41
TB069	5.09 ± 0.01	1.5 ± 0.1	271	321.2	108.0	54
Apigenin	4.08 ± 0.01	1.8 ± 0.1	337	271.2	153.0	42
TB127 (IS)	4.87 ± 0.01	1.6 ± 0.1	297	321.2	151.0	30

^a: Verbindungsunabhängig wurden die folgenden Parameter eingesetzt: Temperatur der Quelle: 450 °C, *Curtain gas* (N₂): 50 psi, Quellengas 1 (*zero air*): 60 psi; Quellengas 2 (*zero air*): 70 psi; Sprayspannung: 5000 V; *declustering potential* (DP): 90 V; Kollisionsgas (N₂): *medium*; *dwell time*: 7 ms; *cycle time*: 0.19 s, Eingangsspannung: 10 V; Kollisionszellenausgangsspannung: 10 V;

^b: Die Retentionszeit entspricht dem Signalmaximum im DAD. Zur massenspektrometrischen Detektion ergibt sich eine Verzögerung von 0.03 min. Angegeben ist der Mittelwert ± Standardabweichung der Retentionszeit über drei verschiedene Messreihen.

^c: Angegeben ist der Mittelwert ± Standardabweichung der Peakbreite auf halber Höhe über drei verschiedene Messreihen.

5.2 Parameter der Quantifizierung

Die Quantifizierung der Flavonoide erfolgt mittels externer Kalibrierung unter Einsatz eines internen Standards (TB127). Das untere Ende des Kalibrierbereichs ist durch die Bestimmungsgrenze limitiert, welche die geringste quantifizierbare Analytkonzentration in der Probenlösung darstellt [258]. In Anlehnung an die *Guideline on bioanalytical method validation* der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) wird für die Konzentration an der Bestimmungsgrenze ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) größer als fünf sowie eine Richtigkeit von 80 bis 120% innerhalb der Kalibriergraden zugrunde gelegt [258]. Für die betrachteten Flavone wird dies bei der UV-Detektion am jeweiligen Absorptionsmaximum ab einer Analytkonzentration von 30 nM in der Messlösung erreicht (Abbildung 5-7) – bei einem Injektionsvolumen von 20 µL entspricht dies 0.6 pmol Analyt auf der Säule. Bei massenspektrometrischer Detektion liegt die Bestimmungsgrenze unterhalb von 1 nM (Tabelle 5-2). Die obere Grenze des Kalibrierbereichs wird bei dieser Detektionsmethode durch das Ende des linearen Bereichs limitiert. Dieses ist gekennzeichnet durch eine Richtigkeit der basierend auf der Kalibriergraden berechneten Konzentration der Kalibratoren von weniger als 80% (Gewichtung der Kalibrierlevel mit $1/x^2$). Bei den hier betrachteten Flavonen ist dies bei Konzentrationen > 500 nM der Fall. Der lineare Bereich des UV-Detektors lässt die Quantifizierung höherer Konzentrationen zu: Auch bei Flavonkonzentrationen von 50 µM ist eine Linearität gegeben. Die obere Bestimmungsgrenze kann jedoch auch durch *carry-over* limitiert werden: Als *carry-over* (Verschleppung) wird das Auftreten eines Analytsignals in einer

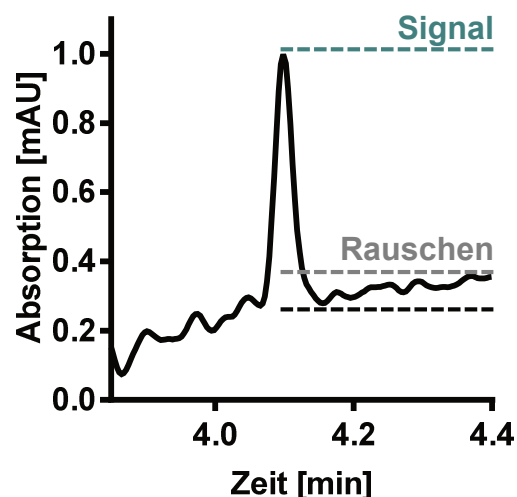


Abbildung 5-7 Bestimmungsgrenze der Methode exemplarisch für Apigenin. Dargestellt ist das UV-Signal (337 nm) eines 30 nM Standards (Injektionsvolumen: 20 µL). Die Bestimmungsgrenze wird definiert als die geringste Konzentration mit einem $S/N \geq 5$ und einer Richtigkeit von 80–120%.

Leerprobe nach der Messung von Proben mit einer hohen Analytkonzentration bezeichnet [258]. Eine vorliegende Verschleppung kann die quantitative Analyse einer Probe verfälschen, insbesondere dann, wenn in der Messreihe auf Proben mit hohen Analytgehalten solche mit niedrigen Leveln folgen. Aufgrund des relativ hohen Injektionsvolumens und wiederholter Verwendung der selben TFC-Extraktionssäule sind online-SPE-Methoden anfällig für *carry-over* [259]. Für die synthetischen Flavone TB009 und TB069 ist bei Konzentrationen von bis zu 10 µM (Konzentration der Analyten in der Messlösung) keine Verschleppung im UV-Signal festzustellen. Ab einer Konzentration von 50 µM in der Injektionslösung wird in einer nachfolgenden Messung ein Signal detektiert. Folglich ist 10 µM (200 pmol injizierte Stoffmenge) als obere Grenze des Arbeitsbereichs zu definieren (Tabelle 5-2). Da bei Analytkonzentrationen bis 50 µM der lineare Bereich der UV-Methode nicht überschritten wird, ist theoretisch auch eine Kalibrierung über 10 µM möglich, sofern sichergestellt wird, dass auf Proben sowie Standards mit Analytkonzentrationen über 10 µM Messungen von Leerproben erfolgen [258]. Der *carry-over* des internen Standards bei der für die Quantifizierung eingesetzten Konzentration von 500 nM in der Messlösung beträgt < 0.3% und liegt damit deutlich unter den in der *Guideline on bioanalytical method validation* der EMA geforderten 5% [258]. Dabei ist ein *carry-over* lediglich bei der massenspektrometrischen Detektion zu bemessen, während er im UV-Signal nicht festzustellen ist. Hieraus resultiert eine Limitierung der oberen Grenze des Kalibrierbereichs für die UV-Detektion, wenn innerhalb einer Messreihe zusätzlich das MS-Signal berücksichtigt werden soll, da für hohe Konzentrationen innerhalb des Arbeitsbereiches des UV-Detektors eine Verschleppung im MS-Signal sichtbar ist. Folglich ist für jede Fragestellung und Messreihe die Detektionsart und der entsprechende Arbeitsbereich individuell festzulegen.

Die quantitative Bestimmung von TB009 und TB069 innerhalb einer Messreihe (*intraday*) führt zu richtigen (bemessen als Verhältnis der bestimmten Konzentration und der theoretischen) sowie präzisen (bemessen als relative Standardabweichung) Resultaten (Tabelle 5-2). Die Ergebnisse aus

verschiedenen Messreihen (*interday*) weichen um bis zu 10% von der nominalen Konzentrationen der Verbindungen ab, und zeigen eine weitere Streuung (< 10%; Tabelle 5-2). Sie erfüllen jedoch die in der EMA-Guideline zur Methodenvalidierung beschriebenen Anforderungen an Richtigkeit (85 – 115%) und Präzision ($\pm 15\%$ relative Standardabweichung) [258]. In mit TB009 bzw. TB069 versetztem Humanplasma werden die beiden Verbindungen zu beinahe 100% wiedergefunden (Tabelle 5-2), was die Eignung der Methode zur Bestimmung der Flavonoide in komplexen Matrices verdeutlicht.

Tabelle 5-2 Parameter der quantitativen Bestimmung von Flavonen mittels online-SPE-LC-UV-MS/MS. Gezeigt sind die Kalibrierbereiche der verschiedenen Detektoren, die Präzision und Richtigkeit der Methode sowie die Wiederfindung der Analyten in komplexer Matrix.

Analyt	Kalibrierbereich UV [nM]	Kalibrierbereich MS/MS [nM]	Richtigkeit und Präzision [%] ^a		Wieder- findung in Plasma ^b
			innerhalb einer Messreihe	über 3 Messreihen	
TB009	30–10 000 ^c	1–500 ^d	100 \pm 1	91 \pm 6	97 \pm 3
TB069	30–10 000 ^c	1–500 ^d	100 \pm 1	110 \pm 7	103 \pm 4

^a: Angegeben sind die Übereinstimmung der gemessenen zur nominalen Konzentration (Richtigkeit) und relative Standardabweichung (Präzision) der wiederholten Bestimmung der Analytkonzentration eines 1 μ M Standards. Mittelwert der Wiederfindung \pm relative Standardabweichung, n=3.

^b: Humanes EDTA-Plasma wurde mit 2 μ M TB009 bzw. TB069 versetzt. Zu 50 μ L der Probe wurden 50 μ L einer 1 μ M Lösung des internen Standards gegeben. Die Konzentration der Analyten wurde im Überstand nach 20 min Zentrifugation (20 000 g, 4 °C) bestimmt (eine Messreihe). Mittelwert \pm Standardabweichung, n=4

^c: Das obere Ende des Kalibrierbereichs der UV-Detektion stellt nicht das Ende des linearen Bereichs dar, sondern ergibt sich durch Verschleppung bei höheren Konzentrationen.

^d: Das untere Ende des Kalibrierbereichs der massenspektrometrischen Detektion stellt nicht das Ende des linearen Bereichs dar, sondern entspricht der kleinsten gemessenen Konzentration der Kalibrierreihe.

Gleichzeitig erlaubt die Methode auch die Bestimmung weiterer, zum Teil deutlich polarerer Verbindungen: Zum Beispiel wird nach der Inkubation von Apigenin mit HLM und Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure (UDPGA) – dem Cosubstrat der mikrosomalen Glucuronosyltransferasen (vgl. Kapitel 6.4) – ein früh eluierender Peak im UV-Chromatogramm detektiert, von dem aufgrund der Retentionszeit und dem Absorptionsspektrum anzunehmen ist, dass es sich um ein Glucuronid

des Apigenins handelt. Auch Triflourmethylumbelliferon, eine Standardsubstanz zur Untersuchung der Aktivität von UDP-Glucuronosyltransferasen [260], und (wahrscheinlich) sein Glucuronid werden erfasst (Appendix 16). Ebenso werden pharmazeutische Wirkstoffe wie Indometacin, Fluconazol und Zileuton über die online-SPE extrahiert (Appendix 16). Die entwickelte online-SPE-LC-UV-MS/MS-Methode stellt damit ein vielseitiges Werkzeug für die quantitative Analyse von Flavonen und anderen niedermolekularen Verbindungen über einen weiten Konzentrationsbereich dar.

Kapitel 6

Charakterisierung der pharmakokinetischen Eigenschaften des CYP4F2 Inhibitors 4'-Trifluor-methylflavon

Für chemische Stoffe, die als pharmakologische Wirkstoffe eingesetzt werden, muss neben der Wirkung auf ein pharmakologisches Target – im Falle von TB009 die Inhibition der 20-HETE-Bildung durch CYP4F2 – auch deren Pharmakokinetik betrachtet werden. Dazu sind insbesondere die (intestinale) Resorption, die Verteilung im Organismus, die metabolische Transformation sowie die Exkretion der Verbindung oder der Metabolite zu charakterisieren, da durch diese Prozesse die Verfügbarkeit der aktiven Substanz maßgeblich bestimmt wird.

Lipinski et al. definierten 1997 vier physikochemische Parameter, mit denen die orale Bioverfügbarkeit einer Substanz eingeschätzt werden kann [261]. Demnach ist eine geringe Resorption nach oraler Applikation einer Verbindung wahrscheinlich, wenn das Molekül mehr als fünf Wasserstoffbrücken-Donoren und mehr als zehn Wasserstoffbrücken-Akzeptoren aufweist, das Molekulargewicht über $500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ liegt und der *n*-Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient ($\log P$) größer als fünf ist [261]. Diese Parameter wurden überwiegend aus theoretischen Überlegungen und Metaanalysen von Datenbanken zu oral verabreichten Wirkstoffen in klinischen Phase II-Studien abgeleitet, und werden von rund 90% aller Stoffe in diesem Entwicklungsstadium erfüllt [261-263]. Bei der Mehrzahl gängiger Arzneistoffe handelt es sich also um lipophile, kleine Moleküle. Die als *rule of five* zusammengefassten Kriterien wurden fünf Jahre später von Veber et al. [263] konkretisiert: Sie erkannten, dass nicht das Molekulargewicht an sich ein Kriterium für die Bioverfügbarkeit ist, sondern dass die Anzahl der im Molekül vorliegenden rotierbaren Bindungen sowie seine polare Oberfläche die Resorption beeinflussen – zwei Größen, die

im Allgemeinen mit der Molekülgröße (bemessen am Molekulargewicht) positiv korrelieren [263]. Eine hohe orale Bioverfügbarkeit ist wahrscheinlich, wenn die Verbindung zehn oder weniger rotierbare Bindungen und die polare Moleküloberfläche weniger als 140 Å² beträgt [263, 264].

Tabelle 6-1 Physikochemische Parameter des ω -Hydroxylaseinhibitors 4'-Trifluor-methylflavon die im Sinne der *rule of five* eine gute orale Bioverfügbarkeit wahrscheinlich machen.

Parameter	Wert
Molekulargewicht	290.24 g·mol ⁻¹
H-Brücken-Donoren	2
H-Brücken-Akzeptoren	0
log <i>P</i>	4.06 ^a
Rotierbare Bindungen	1
polare Oberfläche ^b	26 Å ²

^a Gemäß Lim et al. [265]

^b Berechnet mittels Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02

Der hier entwickelte selektive CYP4F2-Inhibitor erfüllt die beschriebenen Parameter für eine wahrscheinlich hohe orale Bioverfügbarkeit allesamt (Tabelle 6-1). Für eine abschließende Beurteilung sind diese theoretischen Kenngrößen jedoch nicht ausreichend, weswegen pharmakokinetische Eigenschaften wie die Permeabilität durch artifizielle Membranen und intestinale Zellbarrieren, Bindung an Plasmaproteine sowie die metabolische Stabilität von TB009 untersucht wurden.

6.1 Löslichkeit

Die Löslichkeit eines Wirkstoffes in einem wässrigen Medium ist ein wichtiger physikochemischer Parameter, der verschiedene physikalische und biologische Prozesse beeinflusst: Nur die gelöste Substanz kann intestinal aufgenommen werden und mit der Zielstruktur interagieren. Diese stoffspezifische Größe hängt von zahlreichen Parametern wie zum Beispiel der Temperatur und dem pH-Wert des Solvens ab. Auch die Kristallstruktur des Feststoffes [266, 267] und das Vorhandensein weiterer im Lösungsmittel solvatisierter Stoffe wie Komplexbildner, aber auch Emulgatoren wie Gallensäuren beeinflussen die Lösungseigenschaften.

Als thermodynamische Löslichkeit einer Substanz wird die Gleichgewichtskonzentration in einem Lösungsmittel über einem vorhandenen Bodenkörper verstanden [268]. Dabei liegt der Feststoff in seiner stabilsten kristallinen Form vor [269]. Zur Bestimmung dieser Größe wird ein Überschuss an Feststoff mit dem Lösungsmittel versetzt. Die resultierende Suspension wird über einen Zeitraum (Stunden bis Wochen) unter temperierten Bedingungen geschüttelt. Nach Abtrennung des überschüssigen Feststoffes durch Filtration oder Zentrifugation wird die Konzentration des Stoffes instrumentell-analytisch bestimmt [269, 270]. Die Bestimmung der Gleichgewichtskonzentration findet in frühen Phasen der Entwicklung und Charakterisierung pharmakologischer Wirkstoffe selten Anwendung: Die zahlreichen notwendigen manuellen Handgriffe, unter anderem aufgrund der nicht trivialen Automatisierung der Dosierung kleiner Feststoffmengen, der hohe Zeitaufwand und die notwendige quantitative Bestimmung der Analytkonzentration limitieren den Probendurchsatz [269-272].

Eine alternative Größe, welche das Lösungsvermögen wässriger Medien für eine Verbindung bemisst, ist die so genannte kinetische Löslichkeit. Bei deren Bestimmung wird nicht von einer Gleichgewichtskonzentration ausgegangen, sondern jene Konzentration ermittelt, bei der das gewählte Solvens nicht mehr in der Lage ist, den solvatisierten Stoff in Lösung zu halten. Dazu wird eine

hochkonzentrierte Lösung (z.B. 10 mM) der Testsubstanz in einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel, zumeist Dimethylsulfoxid (DMSO) eingesetzt. Diese Lösung wird graduell zu dem wässrigen Medium gegeben, in dem die kinetische Löslichkeit bestimmt werden soll [269, 270]. Die Konzentration, bei welcher das Lösungsvermögen der wässrigen Phase überschritten ist, entspricht der Löslichkeit der am schnellsten präzipitierenden Spezies, und damit der kinetischen Löslichkeit [269, 270]. Die Bestimmung der einsetzenden Präzipitation erfolgt häufig durch eine Streulichtmessung, seltener durch die Messung der (reduzierten) Transmission [269, 273]. Das resultierende Präzipitat ist zumeist amorph und damit nicht die thermodynamisch günstigste Struktur. Auch die Bildung metastabiler Kristallformen kann beobachtet werden [267, 270, 274]. Die auf dieser Grundlage ermittelte Löslichkeit ist folglich fehlerbehaftet, da nicht der Gleichgewichtszustand zwischen dem Feststoff und der in Lösung befindlichen Fraktion der Substanz erfasst wird. Der aufgrund der Verdünnung der Substanzlösung nicht vermeidbare Anteil von organischem Lösungsmittel (0.03% bis 5%) trägt zu einem höheren Lösungsvermögen im Vergleich zu reinem Wasser bei [270, 272, 274]. Das experimentelle Design begünstigt außerdem eine Übersättigung der Lösung [269, 270]. Die kinetische Löslichkeit ist somit im allgemeinen höher als die thermodynamische Gleichgewichtskonzentration [274]. Außerdem sind die Ergebnisse zeit- sowie methodenabhängig, und damit wenig vergleich- und reproduzierbar [270, 274, 275]. Aufgrund der einfachen Automatisierbarkeit und dem dadurch möglichen hohen Probendurchsatz, zum Beispiel im 96-Well Plate-Format, ist die Bestimmung der kinetischen Löslichkeit eine beliebte Methode zur Charakterisierung neuer (pharmakologisch interessanter) Verbindungen. Wegen der genannten Limitierungen sind inzwischen jedoch auch zahlreiche Hochdurchsatzmethoden zur Bestimmung der thermodynamischen Löslichkeit verfügbar [270, 271]. Da theoretische, softwarebasierte Methoden zur Beurteilung pharmakokinetischer Eigenschaften eines Stoffes auf experimentellen Daten zur Löslichkeit aufbauen, ist für valide Berechnungen auch bei diesen Anwendungen die thermodynamische Löslichkeit gegenüber der kinetischen zu bevorzugen [272].

Für das als potenter und selektiver CYP-Inhibitor identifizierte Flavon TB009 wurde die Gleichgewichtslöslichkeit in phosphatgepufferter Salzlösung (pH 7.4) bei einer Temperatur von 25 °C nach 45 h ermittelt. Der pH-Wert der Lösung blieb über diesen Zeitraum konstant. Mit einer bestimmten Löslichkeit von $3.4 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ist die Verbindung als nahezu unlöslich zu klassifizieren [276]. Andere Flavone weisen sehr vergleichbare Löslichkeiten auf [277-279]. Auch wenn diese Eigenschaft im Allgemeinen als eher ungünstig für die Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffs einzuschätzen ist, ist sie kein Ausschlusskriterium für die Eignung als Pharmakon: Eine steigende Zahl von Wirkstoffen in klinischen Studien sowie als Medikament zugelassen Substanzen sind unlöslich in Wasser, wie zum Beispiel der Lipidsenker Fenofibrat [280], das Antimykotikum Itraconazol [281] und der COX-Inhibitor Indometacin [282]. Durch angepasste Formulierungen bei der Applikation, unter anderem mittels oberflächenaktiven Stoffen oder (Nano)- Carriern kann eine ausreichende Bioverfügbarkeit erreicht werden [283]. Auch durch die Verwendung als Salz kann die Wasserlöslichkeit verbessert werden, da Stoffe in ihrer dissoziierten Form zumeist eine erhöhte Löslichkeit aufweisen [269, 283]. Bei sauren bzw. basischen Verbindungen hängt die Löslichkeit maßgeblich vom pH-Wert des Lösungsmittels ab. Im Falle der Flavone ist keine Dissoziation im vornehmlich sauren pH-Bereich des Gastrointestinaltraktes zu erwarten: Die Löslichkeit von Apigenin bleibt in einem Bereich von pH 1 bis pH 7 nahezu konstant [277]. Ein vergleichbares Verhalten ist auch für TB009 anzunehmen.

Die tatsächliche Konzentration von TB009 in den mikrosomalen Inkubationen sowie in Zellkulturexperimenten lag zum Teil oberhalb der in PBS bestimmten Löslichkeitsgrenze von $3.4 \mu\text{M}$ (Kapitel 4.2). Zu erklären ist dies durch eine Stabilisierung der Lösung durch Proteine (vgl. Kapitel 6.3). Der Einsatz von TB009 in den Testsystemen und der verwendete Konzentrationsbereich (10 nM–50 μM) sind folglich durch die geringe Wasserlöslichkeit nicht limitiert.

6.2 Permeabilität

Die Permeabilität, also die Fähigkeit eines Moleküls biologische Membranen zu passieren, ist einer der limitierenden Faktoren für die Resorption eines Wirkstoffes in den Organismus. Die meisten Wirkstoffe passieren Membranen durch passive Diffusion. Als Modell zur Untersuchung der passiven Diffusion sind zahlreiche *parallel artificial membrane permeability assays* (PAMPA) beschrieben: Durch das Aufbringen lipophiler Strukturen auf ein Filtermaterial werden künstliche Membranen generiert, die als Barriere zwischen zwei Kompartimenten dienen. Dieser Aufbau ermöglicht Permeabilitätsexperimente im 96-Well Plate-Format mit hohem Durchsatz (Abbildung 6-1). [284-286].

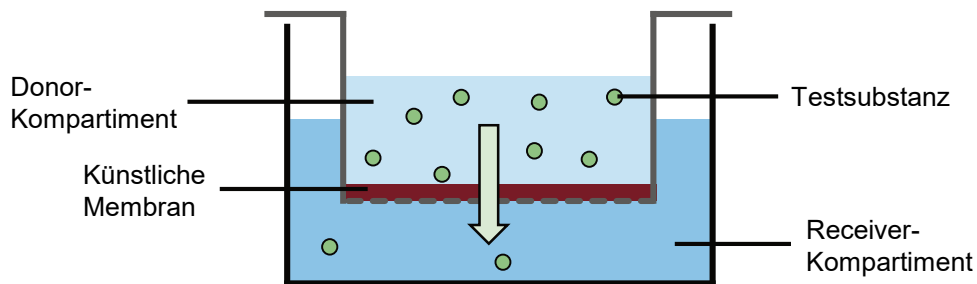


Abbildung 6-1 Schematischer Aufbau eines Permeabilitätstestsystems. Auf ein Filtermaterial wird eine Lipidphase aufgebracht, die als Membran fungiert. Eine Lösung der Testschubstanz wird das Donor-Kompartiment gegeben. Durch die quantitative Bestimmung der Substanz im Receiver- und Donor-Kompartiment nach entsprechender Inkubationszeit wird die Permeabilität der Verbindung bestimmt.

Ursprünglich wurde Phosphatidylcholin aus Ei (Eilecithin) als Material für die Lipidmembran verwendet, welches – gelöst in unpolaren, organischen Lösungsmitteln wie *n*-Dodecan oder 1,9-Decadien – auf die Filter aufgebracht wurden [284]. Abhängig von der Zusammensetzung dieser Membran ist jedoch die Permeabilität verschiedener Organe zu untersuchen: Durch den Einsatz von Ceramiden und synthetischen Ceramidanaloga wird eine Hautbarriere zur Untersuchung transdermaler Permeabilität nachgestellt [287]. Mit einer aus dem Gehirn von Schweinen extrahierten polaren Lipidfraktion kann eine artifizielle Blut-Hirn-Schranke nachgestellt werden [288]. Ein erster Ansatz zum Imitieren der Lipidzusammensetzung der Plazentaschranke ist ebenfalls beschrieben

[289]. Für die Untersuchung intestinaler Permeabilität wurde das ursprüngliche Phosphatidylcholin zu einem komplexeren Gemisch verschiedener Phospholipide optimiert, welches die Lipidzusammensetzung der intestinalen Bürstensaummembran nachstellen und eine präzisere Voraussage der Permeabilität im Organismus ermöglichen soll [290, 291]. Eine Weiterentwicklung sind so genannte *lipid/oil/lipid*-Systeme, bei der die Phospholipide über und unter einer Schicht von *n*-Hexadecan aufgetragen werden, was die Ausrichtung der amphiphilen Phospholipide nach dem Vorbild biologischer Membranen unterstützen und stabilisieren soll [292].

Für das Flavon-Derivat TB009 wurde ein Permeabilitätskoeffizient (P_{app}) von $4.6 \pm 0.6 [10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}]$ im PAMPA bestimmt [*lipid/oil/lipid*-System, PBS (pH 7.4) im Donor- und Akzeptor-Kompartiment]. Damit weist der ω -Hydroxylaseinhibitor eine höhere Permeabilität auf als die „Ausgangsverbindung“ Apigenin ($P_{app} 0.59 \pm 0.08 [10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}]$). Der für diese natürliche Flavon bestimmte Wert ist mit in der Literatur für ein solches Testsystem genannten Werten gut zu vereinbaren [293]; die Permeabilität von TB009 liegt in der gleichen Größenordnung wie die anderer Flavonoide [294, 295], und entspricht eher der von unpolaren oder methoxylierten Flavonen als der des freie aromatische Hydroxy-Gruppen tragenden Apigenins [293]. Viele gängige, gut resorbierte Wirkstoffe zeigen einen mit TB009 vergleichbaren Permeabilitätskoeffizienten [292]. Da der in dieser Arbeit bestimmte P_{app} -Wert von Indometacin, einem gängigen entzündungshemmenden Medikament mit hoher Bioverfügbarkeit [296], mit $3.7 \pm 1.0 [10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}]$ ebenfalls etwas unter dem von TB009 liegt, ist auf Grundlage des PAMPA eine Resorption von TB009 anzunehmen.

Zahlreiche Publikationen belegen die Korrelation zwischen der mittels PAMPA ermittelten Permeabilität und der Resorption im humanen Gastrointestinaltrakt [284, 290, 292, 297-299]. Die künstlichen Membranen eignen sich jedoch ausschließlich zur Untersuchung passiver Permeabilität: Sie weisen im Gegensatz zu biologischen Zellbarrieren keine parazellulären Räume, Influx- oder Effluxtransporter sowie fremdstoffmetabolisierenden Enzyme auf, welche

die Resorption von Stoffen beeinflussen. Für kleine, hydrophile Moleküle und insbesondere Stoffe, die durch Carrier über die Membran hinweg transportiert werden, liefert der PAMPA mitunter unzureichende Resultate [300, 301].

Mit dem Caco-2-Zellmodell zur Untersuchung der Permeabilität von Stoffen durch das Darmepithel werden weitere Transportvorgänge neben der passiven Diffusion durch Membranen abgebildet. Konfluente Dauerkulturen der humanen Kolon-Adenokarzinom-Zelllinie Caco-2 weisen phänotypische Eigenschaften des menschlichen Dünndarmepithels auf, welche sich insbesondere durch eine enge Verbindung der einzelnen Zellen durch *tight junctions* und Desmosomen sowie einen Bürstensaum auszeichnen [302, 303]. Ein dichte Caco-2 Barriere zur Untersuchung der Permeabilität einer Substanz wird zumeist nach einer Kultivierung der Zellen für 14 – 21 Tage auf semipermeablen Membranen erreicht. Modelle, die bereits nach vier [304] oder sechs [305] Tagen erfolgreich für entsprechende Experimente eingesetzt werden, sind ebenfalls beschrieben.

Zahlreiche der für Enterozyten charakteristischen Enzyme, wie zum Beispiel die alkalische Phosphatase, Saccharase und verschiedene Aminopeptidasen, sind in differenzierten Caco-2-Zellen aktiv [303, 306-308]. Die Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme in Caco-2-Zellen unterscheidet sich jedoch zum Teil von der in gesunden Saumzellen: Viele Cytochrom P450 Proteine sind in Caco-2 nicht vorhanden [309]. Gleichzeitig werden zahlreiche Konjugationsreaktionen in Caco-2 katalysiert [310]. Auch aktive Efflux-Transporter wie Permeabilitätsglycoproteine (P-Glycoproteine) und das *Multidrug Resistance Associated Protein* (MRP) 2 konnten in dem Zellmodell nachgewiesen werden [311-313], wobei für P-Glycoproteine eine sehr hohe Aktivität beschrieben ist [182, 312]. Für Substrate dieses Transporters indiziert das Caco-2-Modell mitunter eine zu geringe Permeabilität, da entsprechende Stoffe vermehrt aus der Zelle zurück ins apikale Kompartiment transportiert werden [182]. Polyphenole sind nicht als Substrat dieses Transporters bekannt, lediglich für einige Polyphenolkonjugate ist ein aktiver Transport (vornehmlich Efflux) über

Plasmamembranen beschrieben [295, 314]. Folglich ist auch für TB009 ein überwiegend passiver Transport durch die Zellbarriere zu erwarten.

Im Caco-2-Modell (mit serumfreiem Kulturmedium im Donor- und Akzeptor-Kompartiment) wurde für TB009 ein Permeabilitätskoeffizient von $4.1 \pm 0.4 [10^{-6} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}]$ ermittelt. Die Substanz verhält sich somit in diesem Testsystem ähnlich wie das natürliche Polyphenol Apigenin ($P_{\text{app}} 4.5 \pm 1.0 [10^{-6}\cdot\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}]$, vgl. Kapitel 3.4). Während Apigenin durch die Caco-2-Kultur glucuronidiert wird, bleibt TB009 über die Inkubation hinweg weitestgehend unverändert (Kapitel 6.4). Auf Grundlage dessen ist von einer zumindest moderaten intestinalen Resorption auszugehen [181, 182], welche eine systemische Verfügbarkeit des neuen ω -Hydroxylaseinhibitors ermöglicht.

6.3 Proteinbindung

Die Distribution intestinal resorbierter Wirkstoffe im Organismus erfolgt über den Blutkreislauf. Im Falle unpolarer Substanzen ist außerdem eine Verteilung durch das lymphatische System möglich [315, 316]. Beim Transport zum Wirkungsort mit dem Blut ist der Wirkstoff entweder im wässrigen Blutplasma gelöst, oder an die im Blut enthaltenen Proteine (reversibel) gebunden. Insbesondere an das in hoher Konzentration vorkommende Serumalbumin (35 – 50 mg/mL im Plasma) assoziiert eine Vielzahl lipophiler Verbindungen. Genauso vermögen es auch das saure α -1-Glykoprotein, sowie eine Reihe von Globulinen und Lipoproteinen niedermolekulare Stoffe zu adsorbieren [317].

Im Sinne der *free drug hypothesis* wird angenommen, dass die Bindung eines Wirkstoffs an ein Protein einen reversiblen und schnell eintretenden Gleichgewichtsprozess darstellt, welcher zu einer konstanten Konzentration des nicht-gebundenen Wirkstoffs führt. Da nur ein ungebundenes Molekül durch passive Diffusion vom vaskulären System aus an den Zielort gelangen und dort mit den Zielstrukturen interagieren kann, ist es der freie, ungebundene Anteil der Verbindung, der für die pharmakologischen Effekte des Wirkstoffs verantwortlich

ist [318, 319]. Die interzelluläre Konzentration des Wirkstoffs entspricht nach dieser Theorie der Konzentration des ungebundenen Wirkstoffs im Blutkreislauf, während die Gesamtkonzentration im Blutplasma unter Berücksichtigung der gebundenen Fraktion deutlich darüber liegen kann [320]. Energieabhängige Prozesse wie die Aktivität von Influx- oder Efflux-Transportern oder pH-Gradienten werden dabei nicht berücksichtigt, ebenso wenig wie etwaige Unterschiede zwischen intra- und extrazellulären Targets [318, 320].

Eine hohe Plasmaproteinbindung kann das pharmakokinetische Profil einer Verbindung beeinflussen, was bei der Wahl der Dosis für *in vivo* Experimente zu berücksichtigen ist [318, 321]. Informationen über die Proteinbindungsrate und die damit einhergehende die freie Wirkstoffkonzentration in verschiedenen Spezies sind außerdem wichtige Parameter zur Übertragung sicherer und effektiver Dosen von Tiermodellen auf klinische Studien im Menschen [320].

Als Verbindungen mit geringer Proteinaffinität werden Substanzen eingestuft, die zu weniger als 80% im Plasma proteingebunden vorliegen. Es ist davon auszugehen, dass unter diesen Umständen die Pharmakokinetik der Substanz nicht beeinflusst wird [322]. Alle mäßig bis stark lipophilen Verbindungen weisen eine hohe Plasmaproteinbindung auf, was die Eignung als pharmakologischen Wirkstoff jedoch nicht begrenzt: Unter den meist verkauften Arzneimitteln sind zahlreiche Verbindungen vertreten, die zu mehr als 99% an Plasmaproteine gebunden im Blut zirkulieren, darunter die Entzündungshemmer Diclofenac und Ibuprofen und der zur Behandlung von Typ II Diabetes eingesetzte Insulinsensitizer Pioglitazon. Die geringen therapeutischen Dosen dieser Wirkstoffe in Größenordnungen von wenigen Milligramm veranschaulichen, dass bei hoher Affinität zum Target die Wirksamkeit dieser Substanzen durch den geringen nicht-proteingebundene Anteil und die damit einhergehende theoretisch niedrige freie Plasmakonzentration nicht limitiert wird [320, 321].

Stoffe, die mit höheren Anteilen an Plasmaproteine assoziiert sind, weisen nicht nur eine veränderte Verfügbarkeit am Wirkungsort auf, sondern unter Umständen auch eine verlängerten Halbwertszeit im Blutplasma [322]: In der Niere gelangen

nicht-proteinassoziierte, kleine, polare Moleküle durch Filtration in den Nierenglomeruli in den Primärharn, von wo aus sie zum Teil nicht rückresorbiert werden, während Proteinstrukturen und daran gebundene Substanzen im Blut zurückgehalten werden [320, 321]. Durch die Assoziation an Plasmaproteine wird auch die Verfügbarkeit des Pharmakons in der Leber reduziert. In diesem Gewebe werden weniger polare Moleküle im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus in polarere Strukturen transformiert, die im Anschluss renal oder biliär ausgeschieden werden [321]. Die Bedeutung der Plasmaproteinbindung für die Pharmakokinetik einer Verbindung ist folglich nicht generalisiert zu bewerten, und kann lediglich als erster Anhaltspunkt für das *in vivo*-Verhalten eines Stoffes dienen [320, 321].

Für quantitative Bestimmung der Plasmaproteinbindung sind zahlreiche Methoden beschrieben. Diese basieren zumeist auf Fluoreszenzlöschung [323-325] oder der quantitativen Bestimmung der zu untersuchenden Verbindung in einer proteinhaltigen und/oder proteinfreien Phase nach Gleichgewichtsdialyse, Ultrafiltration oder Ultrazentrifugation [318, 319]. In dieser Arbeit wurde die Proteinbindung mittels eines *rapid equilibrium dialysis* (RED)-Systems bestimmt. Dieses setzt sich aus zwei Kammern zusammen, die durch eine Membran voneinander getrennt sind. Eine der Kammern wird mit einer proteinfreien Pufferlösung befüllt, die andere mit einer proteinreichen Matrix wie Blutplasma, welche mit der zu untersuchenden Substanz dotiert ist. Die semipermeable Membran ermöglicht einen passiven Durchgang niedermolekularer Verbindungen, während Moleküle mit einem Gewicht von über 8 kDa zurückgehalten werden [326]. Von der Gleichgewichtskonzentration kleiner Moleküle, die sich über die Membran hinweg in den Kompartimenten einstellt, kann auf die proteingebundenen Anteile geschlossen werden: Da nur der freie, ungebundene Anteil des Stoffes durch die Membran diffundiert, während der die an Plasmaproteine gebundenen Moleküle zurückgehalten werden, entspricht die Gleichgewichtskonzentration im pufferhaltigen Kompartiment der Konzentration an nicht-gebundenem Wirkstoff im Kompartiment der Proteinmatrix [318, 326].

Für TB009 wurde eine Proteinbindung von über 95% bestimmt (Tabelle 6-2). Der ω -Hydroxylase-Inhibitor verhält sich damit analog zu anderen, natürlichen Flavonoiden, welche ebenfalls zu großen Teilen an Proteine assoziiert im Blut zirkulieren. Dabei erfolgt die Bindung vornehmlich an Serumalbumin [323, 324, 327], wobei innerhalb der verschiedenen Klassen der Flavonoide Flavone die stärkste Affinität zu humanem Serumalbumin aufweisen [327, 328].

Die hohe Proteinaffinität von TB009 unterstützt die Annahme, dass durch Proteine eine wässrige Lösung von TB009 stabilisiert wird und Konzentrationen oberhalb der Löslichkeitsgrenze (Kapitel 6.1) durch Adsorption an Proteine in der Lösung verfügbar bleiben. Dies ermöglicht eine Applikation von TB009 auch in Konzentrationen von über 3.4 μ M. Für die Bestimmung des IC₅₀-Wertes der Inhibition der ω -Hydroxylierung durch TB009 in HCT 116-Zellen wurde die Substanz in Konzentrationen von bis zu 30 μ M im Zellkulturmedium eingesetzt (Kapitel 4.2, Appendix 14). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Medium, welchem 10% Serum zugesetzt sind. Es ist anzunehmen, dass ein großer Teil des CYP4F2-Inhibitors während der Inkubation gebunden an das Serumprotein vorliegt. In einem Konzentrationsbereich von 300 nM bis 30 μ M ist TB009 in dem serumhaltigen, carbonatgepufferten Medium stabil: Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C werden 90% der Verbindung wiedergefunden (Tabelle 6-2). Wahrscheinlich begünstigen die Serumproteine die Stabilität von TB009 in der wässrigen Lösung, wie es auch für einige natürliche Polyphenole beschrieben ist [329-332]. Trotz der hohen Proteinaffinität inhibiert TB009 unter diesen Bedingungen die ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure mit vergleichbarer Potenz und unveränderter Dosisabhängigkeit wie im proteinärmeren Enzymassay (Kapitel 4.2, Appendix 14). Es ist zu schlussfolgern, dass die Verfügbarkeit von TB009 am Wirkungsort, und damit die Interaktion mit CYP4F2, durch die Assoziation mit Proteinen nicht eingeschränkt ist.

6.4 Metabolische Stabilität

Etwa 75% aller Arzneimittel werden nicht unverändert vom menschlichen Organismus ausgeschieden, sondern zuvor im Rahmen des Fremdstoff-metabolismus in polarere Metabolite mit höherer Wasserlöslichkeit transformiert [333]. Die enzymatische Umsetzung einer Verbindung wirkt sich unmittelbar auf die systemisch verfügbare Dosis und ihre Halbwertszeit im Organismus aus – durch die metabolische Stabilität wird folglich die zu applizierende Menge des Stoffes definiert [334]. Interindividuelle Regulierung der Expression sowie genetische Variabilität fremdstoffmetabolisierender Enzyme können die Wirksamkeit von Pharmaka beeinflussen und eine individuelle Anpassung der Dosis notwendig machen [335].

Die metabolischen Prozesse, denen Xenobiotika unterliegen, werden in zwei Phasen eingeteilt: In der ersten Phase erfolgt die sogenannte Funktionalisierung der Verbindung. Die im Molekül freigelegten oder in das Molekül eingebrachten funktionellen Gruppen fungieren als Anker für eine Konjugation mit polaren Strukturen im Rahmen der Phase II-Reaktionen [334]. Die aktive Sekretion von funktionalisierten und/oder konjugierten Xenobiotika durch *ATP-binding cassette* (ABC) Transporter wie das P-Glycoprotein oder MRP2 wird bisweilen als Phase III-Metabolismus bezeichnet, auch wenn aufgrund der nicht vorliegenden metabolischen Transformation des Moleküls die Benennung als Phase III Eliminierung treffender erscheint [336, 337].

Den Phase I-Reaktionen ist unter anderem die hydrolytische Spaltung von Estern, Amiden und Thioestern durch Esterasen und andere Hydrolasen zuzuordnen [338, 339]. Einen großen Anteil an der Katalyse der Funktionalisierung machen Monoxygenierungsreaktionen durch CYP aus [333]: Diese katalysieren aliphatische oder aromatische Hydroxylierung, Desalkylierung sowie Epoxidierung von C=C-Doppelbindungen. Auch die Hydroxylierung von Heteroatomen durch CYP ist beschrieben [339, 340]. Neben CYP oxidieren Flavin-abhängige Monoxygenasen mit dem Cosubstrat NADPH verschiedene

(xenobiotische) Substrate, wobei zumeist, wie bei der Bildung des Nikotin-*N'*-Oxids aus Nikotin, sekundäre oder tertiäre Amine oxidiert werden [341, 342].

An funktionelle Gruppen der Molekülstruktur der ursprünglichen Verbindung oder des funktionalisierten Metaboliten erfolgt im Phase II-Metabolismus eine Konjugation mit weiteren polaren Strukturen, was eine renal oder biliäre Ausscheidung der Verbindung ermöglichen soll. Am häufigsten erfolgt eine Konjugation mit Glucuronsäure [333]. Die entsprechenden Glucuronosyltransferasen (UGT) setzen insbesondere Substrate mit nucleophilen Strukturen wie Alkoholen, Carbonsäuren oder Aminen um [334, 343]. Mit geringerer Kapazität, aber zumeist höherer Reaktionsgeschwindigkeit, werden Hydroxyfunktionen durch Sulfotransferasen mit einer Sulfonyl-Gruppe ($-\text{SO}_3^-$) konjugiert [334]. Elektrophile Xenobiotika und Metabolite reagieren – wie auch reaktive Sauerstoffspezies und Elektrophile, die durch andere Stoffwechselprozesse entstehen – mit Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin) zu Thioetherkonjugaten. Die Reaktion mit Glutathion, welches in Konzentrationen von bis zu 10 mM in hepatischen Zellen vorliegt, erfolgt auch ohne enzymatische Katalyse. Dabei reagieren weiche Elektrophile, also leicht polarisierbare Strukturen, schnell mit der als weiches Nucleophil einzustufenden Thiofunktion des Glutathions. Im Gegensatz dazu reagieren harte Elektrophile nicht bevorzugt Glutathion, was eine Katalyse durch Glutathion-S-Transferasen erforderlich macht [344-346].

Der Metabolismus von Flavonen und anderen Polyphenolen ist an zahlreichen Beispielen untersucht. Hydroxylierte Verbindungen werden mit hohen Raten glucuronidiert, und teilweise sulfonyliert [347]. Methoxylierte Flavonoide werden zuvor durch CYP-katalysierte Reaktionen oxidiert, und folglich demethyliert, wobei diese Umsetzung deutlich langsamer erfolgt [348, 349]. Verbindungen ohne oder mit einzelnen Substituenten am A-Ring oder B-Ring werden durch CYP hydroxyliert, wobei die Position 4' am B-Ring bevorzugt wird. Die in das Molekül eingebrachten Hydroxyfunktionen werden ihrerseits durch UGT glucuronidiert [348, 349].

Inkubationen von TB009 mit NADPH, dem Cosubstrat der CYP und anderer Monooxygenasen sowie mit Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure (UDPGA), dem Cosubstrat der UGT, weisen auf eine hohe metabolische Stabilität des neuen ω -Hydroxylaseinhibitors hin: Während die Ausgangsverbindung Apigenin wie erwartet rasch glucuronidiert wird (> 95% Umsetzung durch HLM nach 30 Minuten, Appendix 16), ist für TB009 keine Konjugation festzustellen (Tabelle 6-2). Lediglich kleine Mengen werden im Rahmen des NADPH-abhängigen Phase I-Metabolismus oxidiert (87% Wiederfindung nach 30 Minuten Inkubation mit HLM, Tabelle 6-2). Etwaige Oxidationsprodukte wurden mittels LC-UV nicht detektiert. Eine hohe Beständigkeit von TB009 gegen metabolische Konversion ist auch in Pilzorganismen beschrieben: Lim et al. [265] beobachteten eine Resistenz des CF₃-substituierten B-Rings gegenüber oxidativen Metabolismus und identifizierten die Hydroxylierung des A-Rings von TB009 als wahrscheinlichsten Transformationsweg in *Aspergillus niger*, da geringe Mengen dieser Metabolite detektiert werden konnten [265].

Die aus den Experimenten abzuleitende hohe metabolische Stabilität von TB009 lässt schlussfolgern, dass TB009, anders als viele andere (hydroxylierte) Flavonoide, keiner direkten Exkretion nach Glucuronidierung in den Enterozyten bzw. in der Leber (*first pass* Metabolismus) unterliegt. Es ist demnach wahrscheinlich, dass die resorbierte und systemisch verteilte Verbindung ihren Wirkungsort unverändert erreicht, ohne dass es zu einer raschen Ausscheidung kommt.

6.5 Schlussfolgerungen

Der ω -Hydroxylaseinhibitor TB009 weist neben seiner ausgeprägten Selektivität gegenüber CYP4F2 auch moderate pharmakokinetische Eigenschaften auf: Bemessen an grundlegenden Ansätzen zur Bewertung von Wirkstoffen (*rule of five* [261]) erfüllt die Molekülstruktur des Trifluormethylflavons TB009 mit ihrer geringen Anzahl von Wasserstoffbrücken-Akzeptoren und -Donoren sowie einem niedrigen Molekulargewicht und einer geringen Polarität die an einen Arzneistoff

gestellten Anforderungen. Sind diese Parameter erfüllt, weist die entsprechende Verbindung zumeist eine ausreichende Wasserlöslichkeit sowie intestinale Permeabilität auf, welche Voraussetzung für orale Bioverfügbarkeit ist [262].

Auch wenn TB009 basierend auf der experimentell bestimmten Löslichkeit in wässrigen Medien als nahezu unlöslich einzuordnen ist (Tabelle 6-2) [276], ist diese – für pharmakologische Stoffe nicht unübliche – Eigenschaft für seine Eignung als Pharmakon nicht als limitierend anzusehen. Die hydrophoben Eigenschaften von TB009 führen des Weiteren zu einer hohen Proteinbindungsrate von > 95% (Tabelle 6-2). Die daraus resultierende Stabilisierung der wässrigen Lösung von TB009 durch Proteine ermöglicht eine Verwendung der Substanz in Dosen über diese Löslichkeitsgrenze hinweg, ohne dass dabei die Inhibition von CYP4F2 durch TB009 beeinflusst wird.

Tabelle 6-2 Pharmakokinetische Parameter des ω -Hydroxylaseinhibitors 4'-Trifluor-methylflavon

Parameter	Wert
Löslichkeit ^a	3.4 ± 0.6 µM
Plasmaproteinbindung ^b	> 95% gebunden
Membranpermeabilität ^c (P_{app})	4.6 ± 0.6 × 10 ⁻⁶ cm/s
Permeabilität durch Caco-2-Monolayer ^d (P_{app})	4.1 ± 0.4 × 10 ⁻⁶ cm/s
Stabilität über Zellkulturen ^e	89% ± 13% Wiederfindung
NADPH-abhängiger oxidativer Metabolismus ^f	87% ± 4% Wiederfindung
UDPGA-abhängige Konjugation ^f	> 95% Wiederfindung

^a in phosphatgepufferter Salzlösung, pH 7.4, bei 25 °C. Bestimmt aus dem Überstand einer gesättigten Lösung

^b bestimmt mittels RED-System unter Verwendung von humanem Plasma

^c *lipid/oil/lipid*-PAMPA

^d CaCo-2 Permeabilitätsassay mit differenzierten, für 21 Tage kultivierten Zellen

^e Wiederfindung nach 24 h im Überstand von HCT 116 Zellen kultiviert in DMEM mit 10% fötalem Kälberserum

^f Wiederfindung nach Inkubation von TB009 mit dem jeweiligen Cosubstrat und humanen Lebermikrosomen nach 30 min

Da im PAMPA und im Caco-2-Transwell-System vergleichbare Permeabilitätskoeffizienten für den ω -Hydroxylaseinhibitor bestimmt wurden (Tabelle 6-2), ist anzunehmen, dass TB009 die intestinale Barriere überwiegend durch passive Diffusion überquert, wie es für zahlreiche polyphenolische Aglykone beschrieben ist [350]. Die Permeabilitätskoeffizienten indizieren eine akzeptable intestinale Resorption von TB009. In Kombination mit der hohen Stabilität des Flavonderivates gegenüber oxidativem Metabolismus und Konjugation im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus ist eine ausreichend hohe systemische Verfügbarkeit zu erwarten. Der neu entwickelte ω -Hydroxylaseinhibitor erscheint damit ein geeignetes Instrument, um erstmals auch im Tierversuch die selektive Modulation der CYP4F2-katalysierten 20-HETE-Bildung zu untersuchen.

Kapitel 7

Abschließende Betrachtungen

In dieser Dissertation wurde die Inhibition der CYP-katalysierten Bildung von Lipidmediatoren aus Arachidonsäure durch Flavonoide und andere pflanzliche Sekundärmetabolite umfassend untersucht, mit dem Ziel, die Interaktion zwischen Lebensmittelinhaltstoffen und dem menschlichen Organismus besser zu verstehen.

Zur Entwicklung eines Multienzymassays wurden zunächst die Produktmuster von verschiedenen Arachidonsäure-metabolisierenden P450-Enzymen sowie von Mikrosomen aus humaner Leber und Niere charakterisiert. Auch wenn kein Oxylipin das exklusive Produkt eines einzelnen CYP ist, können die Enzyme basierend auf ihren Produktspektren in drei Gruppen kategorisiert werden: ω -hydroxylierende, (ω -n)-hydroxylierende und epoxidierende CYP. Aus Inkubationen von Arachidonsäure mit humanen Lebermikrosomen gehen Oxylipine aller drei Produktgruppen hervor. Da in HLM die Bildung einzelner Oxylipine durch selektive Inhibitoren gezielt reduziert werden kann, ohne die Bildungsraten anderer Produkte zu beeinflussen, sind diese Mikrosomen als Multienzymquelle für ein Testsystem der parallelen aber unabhängigen Untersuchung von CYP der Arachidonsäure-Kaskade geeignet. Extrahepatische CYP wie CYP2J2 werden dabei nicht mit abgebildet und sind individuell zu betrachten. Des Weiteren wird im mikrosomalen Assay lediglich die unmittelbare Interaktion zwischen Polyphenolen und CYP erfasst – mögliche Einflüsse auf der Ebene der Genexpression oder anderer Signalkaskaden bleiben unberücksichtigt.

Ein Screening verschiedener Flavone, einem Flavanon, dem Isoflavon Genistein, einem Anthocyanidin sowie verschiedenen Stilbenoiden und einem Catechin-Konjugat im Multienzymassay zeigte eine Inhibition der CYP-katalysierten

Oxylipinbildung durch einige diese Naturstoffe mit vergleichbarer Potenz wie bekannte CYP-Inhibitoren. Die Bildung von 20-HETE, (ω -n)-HETE oder EpETrE wird mit IC_{50} -Werten im niedrigen mikromolaren Bereich inhibiert. Während das Flavon Apigenin die Aktivität zahlreicher CYP unselektiv reduziert, wirken die anderen getesteten Flavone als selektive (ω -n)-Hydroxylaseinhibitoren. Das Isoflavon Genistein hemmt selektiv die ω -Hydroxylierung der Fettsäure, und die Resveratrololigomere Hopeaphenol und ϵ -Viniferin inhibieren potent die CYP2C-katalysierte Bildung von Epoxyfettsäuren.

Basierend auf diesen Befunden wurden in einem iterativen Ansatz grundlegende Strukturmerkmale des Flavongerüsts erarbeitet, die eine selektive Inhibition der Bildung von Epoxy- bzw. Hydroxyfettsäuren verursachen. Flavone mit (Methoxy-) Substituenten an den Positionen C2' und/oder C7 hemmen die Bildung von Epoxyfettsäuren, während elektronegative Substituenten an C4' selektiv die ω -Hydroxylierung von Arachidonsäure inhibieren. 4'-Trifluormethylflavon (TB009) inhibiert die Bildung von 20-HETE in Mikrosomen aus Humanleber sowie der Leber von Ratten und Mäusen selektiv mit IC_{50} -Werten von 1 – 7 μ M, ohne die Epoxygenaseaktivität in diesen Präparaten herabzusetzen. Die Inhibition in HLM basiert dabei auf einer selektiven Hemmung von CYP4F2 mit einem IC_{50} von 0.76 μ M – die Aktivität von CYP4A11 wird nicht reduziert. Die Verbindung TB009 ist somit ein vielversprechender Ausgangspunkt für die Untersuchung der physiologischen Bedeutung von CYP4F2.

Die inhibitorischen Effekte der Flavone auf die Bildung von 20-HETE sowie die Permeabilität konnten auch im Zellsystem belegt werden. Eine Wirkung der Verbindungen nach oraler Aufnahme ist demnach möglich. TB009 ist in Anbetracht der pharmakokinetischen Eigenschaften (u.a. metabolische Stabilität) auch für die Anwendung im Tiermodell zur Erforschung der physiologischen Effekte einer selektiven Inhibition CYP4F2-katalysierter 20-HETE-Bildung geeignet. In Modellen zu Hypertonie wurde vielfach gezeigt, dass eine Modulation der 20-HETE-Level durch die Hemmung ω -hydroxylierender CYP den Blutdruck beeinflussen kann. Unter anderem Salz-sensitive Dahl-Ratten und

spontan hypertone Ratten sind hierfür geeignete Modelle [178, 351]. Die Effekte einer selektiven Inhibition von CYP4F sind bisher nicht bekannt – diese gilt es zu untersuchen. Weitere Modifikationen der Struktur von TB009, zum Beispiel eine leichte Erhöhung der Wasserlöslichkeit durch die Einführung polarer Anteile, könnten die pharmakokinetischen Eigenschaften weiter verbessern und die Verbindungen für ergänzende *in vitro*-Assays zugänglicher machen. Es ist anzunehmen, dass durch weitere Optimierung der Struktur die Potenz noch weiter erhöht werden kann.

Die in dieser Dissertation erstmals umfassend untersuchte Interaktion zwischen Polyphenolen und CYP der Arachidonsäure-Kaskade ist ein neuartiger Mechanismus, über den diese sekundären Pflanzenstoffe auf den Organismus wirken. Dieser Mechanismus kann zu der Erklärung beitragen, wie Polyphenole ihre vielbeschriebenen Effekte auf die menschliche Physiologie und Gesundheit ausüben. Aufgrund des komplexen Zusammenspiels strukturell vielfältiger Polyphenole aus dem mannigfaltigen Angebot an pflanzlichen Lebensmitteln liefert diese Arbeit lediglich einen Grundstein zur Erfassung dieses Mechanismus. Weitere Studien über den Einfluss von Polyphenolen auf die Arachidonsäure-Kaskade sind erforderlich, um die zugrundeliegenden molekularen Zusammenhänge weiter zu verstehen und die potenziellen gesundheitlichen Auswirkungen einer polyphenolreichen Ernährung bewerten zu können.

Kapitel 8

Experimenteller Teil

8.1 Materialien und allgemeine Informationen

Oxylipinstandards, deuterierte Oxylipine sowie die CYP-Inhibitoren Ketoconazol, Miconazol, MS-PPOH, 17-ODYA und Sulfaphenazol wurden bei Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, US) gekauft. PhytoLab (Vestenbergsgreuth, DE) stellte Perlargonidinchlorid ($\geq 90\%$) zur Verfügung. Hopeaphenol ($\geq 95\%$) und ϵ -Viniferin ($\geq 90\%$) wurden von Actichem (Montauban, FR) erhalten. Resveratrol ($\geq 99\%$), Genistein ($\geq 98\%$), Apigenin ($\geq 97\%$), (\pm)-Naringenin ($\geq 95\%$), Wogonin ($\geq 98\%$), Epigallocatechingallat (EGCG, $\geq 95\%$), Nobiletin ($\geq 97\%$) und das Resveratrol-Imin-Analogon (IRA) wurden gekauft bei Sigma-Aldrich (Schnelldorf, DE). Humane Lebermikrosomen (*UltraPool HLM 150, mixed gender*), Rattenlebermikrosomen (*pooled male Sprague-Dawley liver microsomes*), Mauslebermikrosomen (*pooled male B6C3F1 liver microsomes*) und rekombinante humane CYP (*Supersomes*) wurden gekauft bei Corning (Amsterdam, NL) und die humanen Nierenmikrosomen (*mixed gender human kidney microsomes*) bei BioIVT (West Sussex, UK).

Polyphenole, Inhibitoren und weitere Testsubstanzen wurden als 10 mM Stammlösungen in DMSO bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Verdünnungsreihen wurden durch sequenzielle Verdünnung aus dieser Stammlösung erstellt.

Das Cosubstrat für die CYP-katalysierte Oxidation, NADPH (Kapitel 8.2.1), wurde in Form eines NADPH-generierenden Systems in den Inkubationsansätzen eingesetzt. In diesem System oxidiert das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) das Substrat Glucose-6-Phosphat zur entsprechenden Gluconsäure, während das Cosubstrat NADP^+ zu NADPH

reduziert wird. Die Lösung enthält 43 mM MgCl_2 , 38 mM Glucose-6-Phosphat, $10 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, G6P-DH aus *Saccharomyces cerevisiae* (jeweils von Sigma-Aldrich), und 10 mM NADP^+ (Carl Roth, Karlsruhe, DE). Die Aktivität der G6P-DH und die Bildung von NADPH wurden in jedem System photometrisch über eine Extinktionsmessung am für NADPH charakteristischen Absorptionsmaximum von 340 nm sichergestellt [Extinktion > 2, ansonsten wurde ein neues Aliquot des Enzyms verwendet und/oder eine neue Lösung Glucose-6-Phosphat eingesetzt. Die Extinktion wurde gemessen mit einem NanoQuant-System (Tecan Infinite 200 pro Mikroplattenleser, TECAN, Grödig, AT)]. 20 μL dieses NADPH-generierenden Systems wurden im Assay (Gesamtvolumen 200 μL) eingesetzt.

Alle eingesetzten Lösungsmittel waren *HPLC-grade* oder *LC-MS-grade*, soweit verfügbar. Sie wurden gekauft bei Thermo Fisher Scientific (Schwerte, DE) oder VWR (Darmstadt, DE). Für alle Experimente wurde Reinstwasser ($R > 18 \text{ M}\Omega$; Barnstead GenPure Pro System, Thermo Fisher Scientific) verwendet.

8.2 Inkubationen und Charakterisierungsassays

8.2.1 Mikrosomale Umsetzungen von Arachidonsäure

50 μL einer 400 μM Lösung von Arachidonsäure (> 99%, Nu-Check Prep, Elysian, MN, US) in Ethanol (VWR) wurden in ein 1.5 mL Reagiergefäß gegeben und das Lösungsmittel sodann im Rotations-Vakuum-Konzentrator (Christ, Osterode am Harz, DE) bei 30 °C in einem Vakuum von rund 5 mbar entfernt. Die Fettsäure wurde anschließend mit 175 μL 0.1 M Kaliumhydrogenphosphat-Puffer, pH 7.4, rekonstituiert. Nach Zugabe von 5 μL des Mikrosomen- oder Enzympräparates ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ mikrosomales Protein oder $25 \text{ pmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ des rekombinanten CYP) erfolgte eine Vorinkubation bei 37 °C und 500 rpm im Thermoschüttler (*Thermomixer F*, Eppendorf, Hamburg, DE und *Biometra TSC ThermoShaker*, Analytik Jena, Jena, DE). Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 μL des NADPH-generierenden Systems gestartet. Es resultierte

ein Gesamtvolumen des Assays von 200 μL . Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 500 rpm für 20 min (CYP2J2: 40 min). Durch die Zugabe von 600 μL eiskaltem Ethylacetat (VWR) und rigorosem Schütteln wurde die Reaktion abgestoppt. Als interne Standards wurde eine Lösung von $^2\text{H}_8$ -5-HETE, $^2\text{H}_8$ -12-HETE sowie $^2\text{H}_8$ -15-HETE, jeweils 100 nM in Methanol, für die Bestimmung der Hydroxyfettsäuren eingesetzt. Mittels $^2\text{H}_{11}$ -11,12-DiHETrE (100 nM) und $^2\text{H}_{11}$ -14(15)-EpETrE (200 nM) in Methanol wurden Epoxy- und Dihydroxyfettsäuren quantifiziert. Von beiden Lösungen wurden je 50 μL zu den Probenansätzen nach Abstoppen der Reaktion zu den Inkubationsansätzen gegeben.

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 20 000 g und 4 °C für 10 min. Daraufhin wurde die obere, organische Phase in ein weiteres Reagiergefäß überführt und die wässrige Phase erneut mit 600 μL kaltem Ethylacetat extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die organische Phase mit der vorherigen vereint und das Lösungsmittel des Extraktes im Rotations-Vakuum-Konzentrator bei 30 °C vollständig verdampft. Der verbleibende Extrakt wurde in 50 μL Methanol resuspendiert und für mindestens 30 min bei -80 °C gelagert. Nach anschließender Zentrifugation bei 20 000 g und 4 °C für 10 min wurde der Überstand der Probe mittels LC-MS/MS vermessen (Kapitel 8.3.1).

Bei Inkubationen, in denen Inhibitoren oder Testsubstanzen eingesetzt wurden, wurden lediglich 173 μL des Puffers eingesetzt, sowie 2 μL der in DMSO gelösten Testsubstanz. Die Konzentration der zugegebenen Substanzen entsprach dabei dem hundertfachen der Zielkonzentration im Assay. Kontrollinkubationen wurden mit dem gleichen Volumen an reinem DMSO durchgeführt. Bei Experimenten zur Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Inhibition wurde die Dauer der Vorinkubation variiert: Sie erfolgte für Ansätze mit der jeweiligen Testsubstanz und den entsprechenden Kontrollansätzen für 0, 10 und 30 Minuten. Bei den *Jump dilution* Ansätzen erfolgte die Vorinkubation in einem kleineren Volumen: Statt 173 μL Puffer wurden zunächst lediglich 33 μL Puffer zugegeben. Die Volumina der anderen Komponenten blieben unverändert. Nach Ablauf der

Vorinkubation wurde unmittelbar vor dem Start der Reaktion durch das NADPH-generierende System das ursprüngliche Assayvolumen von 200 μL durch die Zugabe von 120 μL 37 °C warmem Puffer hergestellt.

8.2.2 Oxidation von Polyphenolen durch Mikrosomen

Der Assay zur Stabilität der Verbindungen gegenüber oxidativem (NADPH-abhängigem) Metabolismus wurde wie unter 8.2.1 beschrieben, allerdings ohne die Zugabe von Arachidonsäure zu Beginn, durchgeführt. Die natürlichen Polyphenole (Kapitel 3.3.2) wurden mit einer Konzentration von 100 μM inkubiert und nach Extraktion mit Ethylacetat mit Flavon als internem Standard (2.5 μM) mittels LC-DAD vermessen (Kapitel 8.3.3). Die Inkubation von TB009 (3 μM , 30 min) wurde durch Zugabe von 200 μL TB127 (1 μM), gelöst in Acetonitril/Essigsäure (97/3, v/v), abgestoppt und der Überstand nach Zentrifugation (20 000 g, 10 min) mit online-SPE-LC-UV vermessen (Kapitel 5, Kapitel 8.3.2). Es wurde jeweils die Wiederfindung relativ zu Kontrollinkubationen ohne Cosubstrat bestimmt.

8.2.3 Glucuronidierungsassay

Die Inkubationen zur Untersuchung der Glucuronidierung wurden in 200 μL 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4) mit HLM (0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Protein), 5 μM Glucarsäure-1,4-lacton und 10 μM MgCl_2 durchgeführt [352]. Die Konzentration der Testsubstanz betrug 3 μM . Nach 10 min Vorkubation bei 37 °C und 500 rpm wurde die Reaktion durch die Zugabe von 2 mM Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure (UDPGA) gestartet. Nach 30 min wurde durch Zugabe von 200 μL TB127 (1 μM), gelöst in Acetonitril/Essigsäure (97/3, v/v), die Reaktion abgestoppt, und der Überstand nach Zentrifugation (20 000 g, 10 min) mit online-SPE-LC-UV vermessen (Kapitel 5, Kapitel 8.3.2). Es wurde jeweils die Wiederfindung relativ zu Kontrollinkubationen ohne Cosubstrat bestimmt.

8.2.4 Fluoreszenzbasiertes CYP2C9-Assay

Das auf der CYP2C9-katalysierten Demethylierung von 7-Methoxy-4-Trifluor-methylcoumarin (MFC) basierende Assay wurde in einer 96-Well Mikrotiterplatte in Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, pH 7.4, finales Volumen: 200 μ L) durchgeführt. CYP2C9 (25 pmol CYP·mL⁻¹) wurden mit MFC (8 μ M) und Sulfafenazol oder Hopeaphenol für 10 min bei 37 °C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des NADPH-generierenden Systems (20 μ L) gestartet. Nach 60 min Inkubation bei 37 °C wurde die Fluoreszenz des MFC-Metaboliten bei einer Absorptionswellenlänge von 405 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm gemessen und die Konzentration über eine externe Kalibrierung bestimmt.

8.2.5 Löslichkeitsbestimmung

Es wurde die Gleichgewichtskonzentration der Testsubstanzen in PBS (pH 7.4) bei 25 °C bestimmt. 200 μ L PBS wurden zu einem Überschuss der Testsubstanz (als Feststoff vorliegend) gegeben und das Gefäß in einem Orbitalschüttler (Innova 4000 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, New Jersey, US) für 4 Tage bei 25 °C und 150 rpm gelagert. Anschließend wurde die Probe für 30 min bei 20 000 g zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wurde mit dem gleichen Volumen Acetonitril versetzt (mit 1 μ M TB127). Die Gleichgewichtskonzentration wurde mit online-SPE-LC-UV bestimmt (Kapitel 5, Kapitel 8.3.2).

8.2.6 Membranpermeabilitätsassay

Das PAMPA wurde mit einem kommerziell erhältlichen Membransystem durchgeführt (Corning Gentest Pre-coated PAMPA Plate System, Corning). 200 μ L PBS wurden in die Filterplatte gegeben (oben, Receiver-Kompartiment) und 300 μ L der in PBS gelösten Testsubstanz (2 μ M) in die Donor-Wells. Die zusammengesetzte PAMPA-Platte wurde für 6 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 50 μ L aus jedem Kompartiment entnommen, mit dem

gleichen Volumen Acetonitril (mit 1 μM internem Standard) versetzt und mittels online-SPE-LC-UV-MS/MS vermessen (Kapitel 5, Kapitel 8.3.2).

8.2.7 Bestimmung der Proteinbindung

Zur Bestimmung der Proteinbindung wurde ein RED-System eingesetzt (Thermo Fisher Scientific). Humanes EDTA-Plasma wurde mit 2 μM der Testsubstanz versetzt (aus einer 1 mM Stammlösung in DMSO) und 200 μL dieses Plasmas wurden in das Donor-Well der RED-Platte gegeben. 400 μL PBS wurden in das Receiver-Well gegeben. Die versiegelte Platte wurde bei 37 °C in einem Orbitalschüttler inkubiert. Nach 4 h wurden 50 μL aus jeder Kammer entnommen, und mit 100 μL des internen Standards (1 μM in Acetonitril) versetzt. Zu den Donorproben wurden außerdem 50 μL PBS gegeben und zu den Receiverproben 50 μL Plasma. Nach rigorosem Mischen wurden die Proben für 30 min mit 20 000 g bei zentrifugiert und die Konzentration im Überstand mit online-SPE-LC-UV-MS/MS bestimmt.

8.2.8 Zellkulturexperimente

HCT 116 und HCA-7-Zellen wurden kultiviert in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma Aldrich), welches mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, superior standardisiert; Biochrom, Berlin, DE), 2 mM L-Glutamin, 200 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ Penicillin und 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Streptomycin (jeweils Sigma-Aldrich) supplementiert wurde. Das Kulturmedium für die HT-29 und Caco-2 Zellen enthielt außerdem 1% nicht-essentielle Aminosäuren. Die Zellkulturen wurden in einem Inkubator bei 37 °C und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO_2 kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden Passagen durchgeführt, bei denen 1×10^6 Zellen in 10 mL Medium in 60 cm^2 -Schalen ausgesät wurden.

Für die Inkubationen wurden 2×10^6 Zellen in 60 cm^2 -Schalen ausgesät und nach 24 h wurden 10 μM Arachidonsäure (in DMSO gelöst) und ggf. Inhibitoren oder Polyphenole zugegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit

Trypsin/EDTA (Sigma Aldrich) abgelöst und pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit PBS gewaschen. Zur Bestimmung der Oxylipine im Zellpellet wurde dieses in 490 μL PBS aufgenommen, mit 10 μL einer Lösung verschiedener Antioxidantien versetzt [353] und für 8 s sonifiziert (25% output, Branson Sonifier 250; Branson Ultrasonics, Brookfields, CT, US). 100 μL dieser aufgeschlossenen Suspension wurde für die Bestimmung der Oxylipine nach Hydrolyse eingesetzt. Die Probenvorbereitung erfolgte nach einer im Arbeitskreis etablierten Festphasenextraktion, die in der entsprechenden Publikation im Detail beschrieben ist [354].

Der Proteingehalt in der Suspension nach Sonifizierung wurde mit der Bicinchoninsäure-Methode bestimmt (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) mit Rinderserumalbumin (Sigma Aldrich) als Referenzprotein. Die Zytotoxizität aller inkubierten Verbindungen wurde im Resazurinassay über die zelluläre Dehydrogenaseaktivität evaluiert. Bei den in den Assays eingesetzten Konzentrationen zeigten die Substanzen keine zytotoxischen Effekte.

Für die Caco-2 Transwell-Experimente wurden 1×10^5 Zellen in einem 12 mm Insert mit permeabler Membran (1.12 cm^2 Wachstumsfläche, $0.4 \mu\text{m}$ Membranporen; Corning Costar, Amsterdam, NL) kultiviert. Die Transportexperimente wurden 23 Tage nach der Aussaat mit Medium ohne FCS einem etablierten Protokoll entsprechend durchgeführt [244, 330]. Der transepithelische elektrische Widerstand (TEER) wurde mit einem cellZscope Instrument (nanoAnalytics, Münster, DE) während der Experimente gemessen. Alle Wells wiesen einen TEER $\geq 200 \Omega \cdot \text{cm}^{-2}$ auf. Es wurden 2 μL der Testverbindungen in das apikale Kompartiment gegeben und nach 3 h 40 μL aus dem apikalen und 80 μL aus dem basolateralen Kompartiment entnommen und mit dem gleichen Volumen von internem Standard (1 μM in Acetonitril) versetzt. Die Konzentration in beiden Kompartimenten wurde im Überstand nach 10 min Zentrifugation bei 20 000 g mittels online-SPE-LC-UV-MS/MS bestimmt.

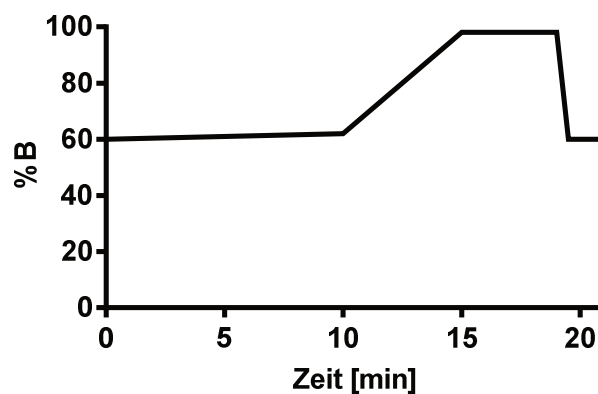
8.3 Analytische Methoden

8.3.1 Quantifizierung von Oxylipinen

Für die Quantifizierung der durch CYP gebildeten Oxylipine in den Enzym- bzw. mikrosomalen Assays wurde ein 1260-LC-System (Agilent Technologies, Waldbronn, DE) mit einem CTC-Pal-Autosampller (CTC Analytics, Zwingen, CH), gekoppelt an ein 3200 Triple Quadrupol Massenspektrometer (Sciex, Darmstadt, DE) eingesetzt. Die Trennung erfolgte auf einer C18 Umkehrphase (2.1 × 150 mm, 1.8 µm Partikelgröße; 9.5 nm Poren; Zorbax Eclipse Plus; Agilent Technologies) mit einem SecurityGuard Ultra Vorsäulensystem (1 × 2 mm; Phenomenex, Aschaffenburg, DE) mit einem Fluss von 0.3 mL/min bei 40 °C. Als Eluent A wurde 0.1% Essigsäure in Wasser mit 5% Solvent B (v/v) verwendet, Solvent B war eine Mischung aus Acetonitril, Methanol und Essigsäure [800/150/1 (v/v/v)]. Mit dem folgenden Gradienten wurde die Trennung der Analyten innerhalb von 21 Minuten realisiert (Tabelle 8-1).

Tabelle 8-1 LC-Gradient zur Trennung der Oxylipine (1260 LC-System mit 3200 MS).

Zeit [min]	%B
0.0	60
10.0	62
15.0	98
19.0	98
19.5	60
21.0	60



Das Injektionsvolumen betrug 10 µL. Die Detektion erfolgte im *scheduled SRM* nach Elektrosprayionisierung im negativen Modus (ESI-) mit einem Detektionszeitfenster von 90 s und einer *cycle time* von 0.45 s. Die analytenspezifischen Quellenparameter des MS waren wie folgt: Temperatur: 500 °C, *Curtain gas* (N₂): 20 psi, Quellengas 1 (*zero air*): 70 psi; Quellengas 2 (*zero air*): 55 psi; Sprayspannung: -4500 V; Kollisionsgas (N₂): 12 psi;

Eingangsspannung: -10 V; Kollisionszellenausgangsspannung: -12 V. Die Quantifizierung erfolgte durch externe Kalibrierung unter Verwendung isotoopenmarkierter interner Standards. Die analytischen Parameter der Detektion sowie der Kalibrierbereich sind in Tabelle 8-2 zusammengefasst.

Die Analyse der in Zellkulturen gebildeten Oxylipine erfolgte mit einer im Arbeitskreis entwickelten Multimethode für die quantitative Bestimmung von rund 160 Lipidmediatoren mit einem 1290-LC-System (Agilent) und einem 5500 QTrap-Massenspektrometer (Sciex). Die Methode ist im Detail in entsprechenden Publikationen beschrieben [257, 353-355].

Tabelle 8-2 MS-Parameter und Kalibrierbereich zur Bestimmung der in Enzyminkubationen gebildeten Oxylipine.

Verbindung	Retentionszeit [min]	m/z Q1	m/z Q3	DP [V]	CE [V]	Interner Standard	Kalibrierbereich	
							untere Bestimmungsgrenze ¹ [nM]	obere Bestimmungsgrenze ² [nM]
14,15-DIHETrE	7.87	337.2	207.1	-30	-25	d11-11(12)-DIHETrE	4.7	2350
11,12-DIHETrE	9.02	337.2	167.1	-40	-27	d11-11(12)-DIHETrE	7.5	7500
8,9-DIHETrE	10.06	337.2	127.1	-35	-26	d11-11(12)-DIHETrE	4.7	4650
5,6-DIHETrE	11.70	337.2	145.1	-35	-26	d11-11(12)-DIHETrE	9.4	2350
19-HETE	11.17	319.2	275.1	-55	-23	d8-15-HETE	100	1000
20-HETE	11.61	319.2	275.1	-60	-23	d8-15-HETE	250	1000
18-HETE	12.44	319.2	261.0	-50	-23	d8-15-HETE	25	1000
17-HETE	12.72	319.2	247.0	-50	-23	d8-15-HETE	25	1000
16-HETE	12.90	319.2	233.0	-50	-23	d8-15-HETE	50	1000
15-HETE	13.91	319.2	219.2	-50	-25	d8-15-HETE	44	440
11-HETE	14.28	319.2	167.2	-45	-23	d8-12-HETE	4.4	440
8-HETE	14.51	319.2	155.2	-45	-22	d8-12-HETE	24	940
12-HETE	14.53	319.2	179.2	-45	-23	d8-12-HETE	10	1000
9-HETE	14.27	319.2	167.2	-40	-20	d8-5-HETE	27	530
5-HETE	14.89	319.2	115.2	-45	-20	d8-5-HETE	7	700
14(15)-EPETrE	15.35	319.2	219.3	-30	-24	d11-14(15)-EPETrE	39	1950
11(12)-EPETrE	15.66	319.3	167.2	-30	-24	d11-14(15)-EPETrE	13	1250
8(9)-EPETrE	15.76	319.2	155.2	-35	-20	d11-14(15)-EPETrE	70	700
5(6)-EPETrE	15.87	319.2	191.1	-35	-20	d11-14(15)-EPETrE	125	1250
² H ₁₁ -11(12)-DIHETrE	8.78	348.2	167.1	-40	-27			
² H ₈ -15-HETE	13.77	327.0	226.0	-35	-20			
² H ₈ -12-HETE	14.42	327.2	184.2	-45	-23			
² H ₈ -5-HETE	14.80	327.2	116.1	-45	-20			
² H ₁₁ -14(15)-EPETrE	15.28	330.2	219.3	-30	-24			

¹Die untere Bestimmungsgrenze entspricht dem Kalibrator, der ein Signal-zu-Rauschen-Verhältnis > 5 sowie eine Richtigkeit von 80 bis 120% aufweist.
²Die obere Nachweisgrenze stellt nicht das Ende des linearen Bereiches dar, sondern entspricht der Konzentration des höchsten gemessenen Kalibratorstandards.

8.3.2 Online SPE

Der Aufbau und die Parameter der online-SPE-LC-UV-MS/MS-Methode sind in Kapitel 5 im Detail erläutert. Tabelle 8-3 und Tabelle 8-4 fassen die von den Pumpen geförderten Gradienten zusammen.

Tabelle 8-3 Gradient der online-SPE- Pumpe (Pumpe 1).

Zeit [min]	%B	Fluss [mL/min]
0.0	0	3.5
0.7	0	3.5
0.8	0	0.0
4.4	0	0.0
4.5	100	2.0
6.4	100	2.0
6.5	0	3.5
7.0	0	3.5

Tabelle 8-4 Gradient der chromatografischen Pumpen (Pumpe 2 und Pumpe 3).

Zeit [min]	Pumpe 2		Pumpe 3
	%B	Fluss [ml/min]	Fluss [ml/min]
0.0	70	0.10	0.50
2.7	70	0.10	0.50
5.5	100	0.59	0.01
6.9	100	0.59	0.01
7.0	70	0.10	0.50

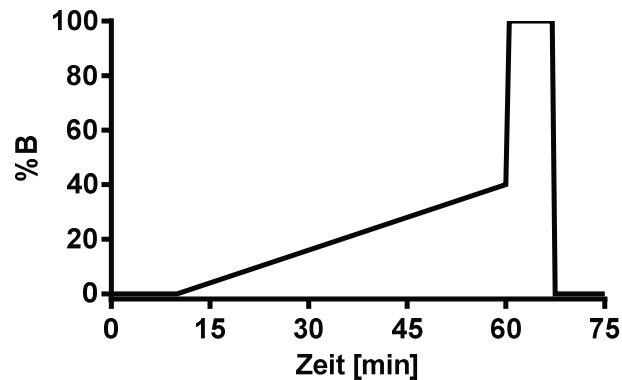
Pumpe 3 fördert über den gesamten Lauf Solvent A. Die Schaltung des 2-Positionen-6-Wege-Ventils der online-SPE erfolgte nach 0.5 min (Beenden der Extraktion) und 2.5 Minuten (Beenden des Transfers). Kalibrierreihen zur Quantifizierung wurden für jede Messreihe hergestellt durch sequenzielle Verdünnung. Die Absorption des Eluats wird im Bereich von 210 nm–500 nm (4 nm Spalt) mit einer Frequenz von 5 Hz aufgezeichnet.

8.3.3 LC-UV zur Untersuchung der CYP-katalysierten Oxidation natürlicher Polyphenole

Die Messung von Polyphenolinkubationen zur Untersuchung der metabolischen Stabilität (Kapitel 3.3.2) erfolgte Mittels LC-DAD. 10 µL des jeweiligen Extraktes wurden auf einer C18-Phase (100 x 3 mm, 2.6 µm Partikel; SecurityGuard Ultra Vorsäulensystem; beides Phenomenex) bei einem flachen Gradienten mit wenig Elutionskraft getrennt (Tabelle 8-5). Die HPLC-Anlage setzte sich zusammen aus einem L-7000 Interface, einer L-7100 quaternären Pumpe, einem L-7250 Autosampler und einem L-7455 Dioden Array Detektor (jeweils Merck-Hitachi, Hitachi Europe, Düsseldorf, DE), einem Igloo-Cil Säulenofen (50 °C, ERC, Riemerling, DE) und einem DG-2080-53-Degasser (Jasco, Pfungstadt, DE). Die Detektion erfolgte bei einer Spaltbreite von 4 nm und einer Frequenz von 5 Hz im Bereich von 220–320 nm. Es wurde das Absorptionsmaximum des jeweiligen Polyphenols zur Auswertung herangezogen (Appendix 3).

Tabelle 8-5 LC-Gradient zur Trennung gebildeter Polyphenolmetabolite (Merck-Hitachi-System).

Zeit [min]	%B
0.0	0
10.0	0
60.0	40
60.5	100
67.0	100
67.5	0
75.0	0



8.4 Datenauswertung

Die Bestimmung des IC₅₀ erfolgte mit Daten aus zwei unabhängigen Replikaten. Die Oxlipinbildung in den mikrosomalen Inkubationen wurde berechnet nach Subtraktion der Oxylipinlevel von Leerinkubationen ohne Cosubstrat (bei Zellkulturexperimenten erfolgten Leerinkubationen ohne Arachidonsäure). Die Inhibition wurde berechnet basierend auf Kontrollinkubationen ohne Inhibitor (100% - % der Kontrolle). Die IC₅₀-Werte und 95% Konfidenzintervalle wurden durch einen Fit der Konzentrations-Wirkungskurve an eine logistische Funktion (4 Parameter) bestimmt mittels GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, US).

Die Steuerung und Datenerhebung erfolgte mit Sciex Analyst 1.6.2 (3200 LC-MS), 1.6.3 (5500 LC-MS) oder 1.7 (online-SPE, 6500+). Zur Peakintegration und Quantifizierung wurde Sciex Multiquant 3.0.3 verwendet. Die Kalibriereihen zur LC-MS/MS-Analyse wurden mit 1/x² gewichtet, die der LC-UV-Analysen mit 1/x.

Der Z'-Faktor wurde berechnet nach [163]

$$(1) \quad Z' = 1 - 3 * \frac{\sigma_{max} + \sigma_{min}}{\mu_{max} - \mu_{min}}$$

Mit μ und σ als Mittelwert und Standardabweichung der Oxylipinkonzentration in Kontroll- (max) und Leerinkubationen (min).

Die Permeabilitätskoeffizienten (P_{app}) im PAMPA und Caco-2 wurden berechnet nach:

$$(2) \quad P_{app} = \frac{-\ln\left(1 - \frac{C_A(t)}{C_{eq}}\right)}{A * \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A}\right) * t}$$

Mit $C_A(t)$ als Konzentration der Testsubstanz im Receiverkompartiment zum Zeitpunkt t , A als Größe der Grenzfläche, V_D als Volumen des Donorkompartiments, V_A als Volumen des Receiverkompartiments und t als Inkubationszeit. $C_D(t)$ ist die Konzentration der Testsubstanz im Donorkompartiment zum Zeitpunkt t . Für C_{eq} gilt:

$$(3) \quad C_{eq} = \frac{C_D(t) * V_D + C_A(t) * V_A}{V_D + V_A}$$

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 CYP-Zweig der Arachidonsäure-Kaskade.	8
Abbildung 2-2 Grundstrukturen der verschiedenen Flavonoidklassen	13
Abbildung 3-1 Produktmuster Arachidonsäure-oxidierender CYP und humaner Lebermikrosomen.	18
Abbildung 3-2 Produktmuster der in HKM aus Arachidonsäure gebildeten Oxylipine.....	25
Abbildung 3-3 Chemische Struktur der verwendeten CYP-Inhibitoren.....	26
Abbildung 3-4 Chemische Struktur der getesteten Polyphenole	30
Abbildung 3-5 Inhibition der Oxylipinbildung in HLM und CYP durch Apigenin.....	36
Abbildung 3-6 Produktmuster der Oxidation von Arachidonsäure durch CYP2J2	38
Abbildung 3-7 20-HETE-Level in humanen Kolonkarzinomzelllinien mit und ohne Supplementierung von Arachidonsäure.....	43
Abbildung 3-8 Produktmuster der Oxidation von Arachidonsäure durch HCT 116 Zellen	45
Abbildung 3-9 Inhibition der 20-HETE-Bildung in HCT 116-Zellen durch Apigenin.....	47
Abbildung 4-1 Chemische Struktur von Isoflavonen (A) und Flavonen (B)	54

Abbildung 4-2 Chemische Struktur der ω -Hydroxylaseinhibitoren TB009 (4'-Trifluormethyl-flavon) und TB069 (4'-Trifluormethyl-6-Methoxyflavon).....	60
Abbildung 4-3 <i>Jump dilution</i>	62
Abbildung 5-1 Aufbau des online-SPE-LC-UV-MS/MS-Systems.....	70
Abbildung 5-2 Struktur des als internen Standard eingesetzten TB127 (2'-Trifluormethyl-7-Methoxyflavon).....	71
Abbildung 5-3 Durchbruchtest der online-SPE-Extraktion	73
Abbildung 5-4 Optimierung der Eluentenzusammensetzung für die Elution der Analyten von der SPE-Säule.	74
Abbildung 5-5 Parameter der online-SPE-Methode.....	77
Abbildung 5-6 Wahl der Detektionsparameter – exemplarisch dargestellt für das synthetische Flavon TB009.....	78
Abbildung 5-7 Bestimmungsgrenze der Methode exemplarisch für Apigenin ..	80
Abbildung 6-1 Schematischer Aufbau eines Permeabilitätstestsystems.	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1	Inhibition der Oxylinbildung in humanen Lebermikrosomen durch CYP-Inhibitoren.....	27
Tabelle 3-2	Screening natürlicher Polyphenole auf CYP-Inhibition.....	31
Tabelle 3-3	Inhibition der Oxylinbildung in HLM und CYP durch Polyphenole.....	34
Tabelle 3-4	Inhibition der CYP2J2-katalysierten Epoxidierung von CYP2J2 durch Polyphenole und CYP-Inhibitoren.	39
Tabelle 4-1	Isoflavone mit variierenden Substitutionsmustern des B-Rings als CYP-Inhibitoren.	55
Tabelle 4-2	Flavone mit variierenden Substitutionsmustern des B-Rings als CYP-Inhibitoren	57
Tabelle 4-3	Flavone mit variierenden Substitutionsmustern des A-Rings als CYP-Inhibitoren	58
Tabelle 4-4	Flavone mit variierenden Substitutionsmustern des A- und B-Rings als selektive Inhibitoren der CYP-katalysierten ω -Hydroxylierung	59
Tabelle 4-5	Inhibitorische Potenz des synthetischen Flavonoids TB009	61
Tabelle 5-1	Detektionsparameter der Flavonoide.....	79
Tabelle 5-2	Parameter der quantitativen Bestimmung von Flavonen mittels online-SPE-LC-UV-MS/MS.....	82

Tabelle 6-1	Physikochemische Parameter des ω -Hydroxylaseinhibitors 4'-Trifluormethylflavon	86
Tabelle 6-2	Pharmakokinetische Parameter des ω -Hydroxylaseinhibitors 4'-Trifluormethylflavon	100
Tabelle 8-1	LC-Gradient zur Trennung der Oxylipine	114
Tabelle 8-2	MS-Parameter und Kalibrierbereich zur Bestimmung der in Enzyminkubationen gebildeten Oxylipine.	116
Tabelle 8-3	Gradient der online-SPE- Pumpe	117
Tabelle 8-4	Gradient der chromatografischen Pumpen	117
Tabelle 8-5	LC-Gradient zur Trennung gebildeter Polyphenolmetabolite ..	118

Abkürzungsverzeichnis

CE	Kollisionsenergie
CI	Konfidenzintervall
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P450 Monooxygenase
DAD	Diodenarray-Detektor
DP	<i>declustering potential</i>
DiHETrE	Dihydroxyeicosatriensäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGCG	Epigallocatechin-3-Gallat
EMA	Europäischen Arzneimittel-Agentur
EpETrE	Epoxyeicosatriensäuren
EpOME	Epoxyoctadecensäure
ESI	Elektrosprayionisierung
FCS	fötale Kälberserum
FWHM	Halbwertsbreite
G6P-DH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HKM	humane Nierenmikrosomen
HLM	humane Lebermikrosomen
HTS	Hochdurchsatzassay
IRA	Resveratrol-Imin-Analogon
LC	Flüssigkeitschromatografie
LOX	Lipoxygenase

mEH	mikrosomale Epoxidhydrolase
MFC	7-Methoxy-4-Trifluormethylcoumarin
MLM	Mauslebermikrosomen
MRP	<i>Multidrug Resistance Associated Protein</i>
MS	Massenspektrometrie
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PAINS	<i>pan-assay interference compounds</i>
PAMPA	<i>parallel artificial membrane permeability assays</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
P-Glycoprotein	Permeabilitätsglycoprotein
RAM	<i>restricted-access materials</i>
RED	<i>rapid equilibrium dialysis</i>
RLM	Rattenlebermikrosomen
RP	Umkehrphase
S/N	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
sEH	lösliche Epoxidhydrolase
SPE	Festphasenextraktion
SPM	<i>specialized pro-resolving mediators</i>
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
TFC	<i>turbulent flow chromatography</i>
TNFα	Tumornekrosefaktor α
UDPGA	Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure
UGT	Glucuronosyltransferasen

Literatur

1. Arts IC and Hollman PC: Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. (2005) *Am. J. Clin. Nutr.*, 81(1 Suppl): 317S-325S.
2. Rienks J, Barbaresko J, Oluwagbemigun K, Schmid M, and Nöthlings U: Polyphenol exposure and risk of type 2 diabetes: dose-response meta-analyses and systematic review of prospective cohort studies. (2018) *Am. J. Clin. Nutr.*, 108(1): 49-61.
3. Boeing H, Bechthold A, Bub A, Ellinger S, Haller D, Kroke A, Leschik-Bonnet E, Müller MJ, Oberritter H, Schulze M, Stehle P, and Watzl B: Gemüse und Obst in der Prävention ausgewählter chronischer Krankheiten. (2012) *Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Ernährung e. V. (DGE)*.
4. Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, and Matar C: The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. (2018) *Nutrients*, 10(11): 1618.
5. Mandlekar S, Hong J-L, and Tony Kong A-N: Modulation of metabolic enzymes by dietary phytochemicals: A review of mechanisms underlying beneficial versus unfavorable effects. (2006) *Curr. Drug Metab.*, 7(6): 661-675.
6. Bailey DG, Dresser G, and Arnold JMO: Grapefruit–medication interactions: Forbidden fruit or avoidable consequences? (2013) *Can. Med. Assoc. J.*, 185(4): 309.
7. Rahimi R and Abdollahi M: An update on the ability of St. John's wort to affect the metabolism of other drugs. (2012) *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 8(6): 691-708.
8. Mouly S, Lloret-Linares C, Sellier P-O, Sene D, and Bergmann JF: Is the clinical relevance of drug-food and drug-herb interactions limited to grapefruit juice and Saint-John's Wort? (2017) *Pharmacol. Res.*, 118: 82-92.
9. Guengerich FP: Intersection of the Roles of Cytochrome P450 Enzymes with Xenobiotic and Endogenous Substrates: Relevance to Toxicity and Drug Interactions. (2017) *Chem. Res. Toxicol.*, 30(1): 2-12.
10. Imig JD: Epoxyeicosatrienoic acids and 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid on endothelial and vascular function. (2016) *Adv. Pharmacol.*, 77: 105-41.

11. Williams JM, Murphy S, Burke M, and Roman RJ: 20-hydroxyeicosatetraenoic acid: a new target for the treatment of hypertension. (2010) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 56(4): 336-44.
12. Zhang C, Booz GW, Yu Q, He X, Wang S, and Fan F: Conflicting roles of 20-HETE in hypertension and renal end organ damage. (2018) *Eur. J. Pharmacol.*, 833: 190-200.
13. Niki E: Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. (2009) *Free Radic. Biol. Med.*, 47(5): 469-84.
14. Spickett CM, Wiswedel I, Siems W, Zarkovic K, and Zarkovic N: Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. (2010) *Free Radical Res.*, 44(10): 1172-1202.
15. Buczynski MW, Dumlao DS, and Dennis EA: Thematic Review Series: Proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. (2009) *J. Lipid Res.*, 50(6): 1015-38.
16. Sonnweber T, Pizzini A, Nairz M, Weiss G, and Tancevski I: Arachidonic Acid Metabolites in Cardiovascular and Metabolic Diseases. (2018) *Int. J. Mol. Sci.*, 19(11): 3285.
17. Smith WL and Murphy RC: The Eicosanoids: Cyclooxygenase, Lipoxygenase and Epoxygenase Pathways, in *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)*, N.D. Ridgway and R.S. McLeod, Editors. 2016, Elsevier: Boston. p. 259-296.
18. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, and Simmons DL: COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(21): 13926.
19. Wallace JL: Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? (2008) *Physiol. Rev.*, 88(4): 1547-1565.
20. Morita I: Distinct functions of COX-1 and COX-2. (2002) *Prostag Oth Lipid M*, 68-69: 165-175.
21. Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, and Wilson CB: Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and lipopolysaccharide. (1995) *J. Clin. Invest.*, 95(4): 1669-1675.
22. Lee Y, Rodriguez C, and Dionne AR: The Role of COX-2 in Acute Pain and the Use of Selective COX-2 Inhibitors for Acute Pain Relief. (2005) *Curr. Pharm. Des.*, 11(14): 1737-1755.

23. Biringer RG: The enzymology of human eicosanoid pathways: the lipoxygenase branches. (2020) *Mol. Biol. Rep.*, 47(9): 7189-7207.
24. Spector AA, Gordon JA, and Moore SA: Hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs). (1988) *Prog. Lipid Res.*, 27(4): 271-323.
25. Stenson WF and Parker CW: Prostaglandins, macrophages, and immunity. (1980) *J. Immunol.*, 125(1): 1-5.
26. Heidel JR, Taylor SM, Laegreid WW, Silflow RM, Liggitt HD, and Leid RW: In vivo chemotaxis of bovine neutrophils induced by 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic and eicosapentaenoic acid. (1989) *Am. J. Pathol.*, 134(3): 671-6.
27. Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, and Smith MJH: Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. (1980) *Nature*, 286(5770): 264-265.
28. Haeggstrom JZ and Funk CD: Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. (2011) *Chem. Rev.*, 111(10): 5866-98.
29. Serhan CN: Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? (2010) *Am. J. Pathol.*, 177(4): 1576-91.
30. Chiang N and Serhan CN: Specialized pro-resolving mediator network: an update on production and actions. (2020) *Essays Biochem.*, 64(3): 443-462.
31. Nelson DR: Cytochrome P450 diversity in the tree of life. (2018) *BBA Proteins Proteom*, 1866(1): 141-154.
32. Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, Gunsalus IC, Johnson EF, Kemper B, Levin W, Phillips IR, Sato RYO, and Waterman MR: The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature. (1987) *DNA*, 6(1): 1-11.
33. Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, and Schlichting I: Structure and chemistry of cytochrome P450. (2005) *Chem. Rev.*, 105(6): 2253-77.
34. Conner KP, Woods CM, and Atkins WM: Interactions of cytochrome P450s with their ligands. (2011) *Arch. Biochem. Biophys.*, 507(1): 56-65.
35. Meunier B, De Visser SP, and Shaik S: Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. (2004) *Chem. Rev.*, 104(9): 3947-3980.

36. Westphal C, Konkel A, and Schunck WH: Cytochrome p450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated Fatty acids and their role in cardiovascular disease. (2015) *Adv. Exp. Med. Biol.*, 851: 151-87.
37. Fulton D, Falck JR, Mcgiff JC, Carroll MA, and Quilley J: A method for the determination of 5,6-EET using the lactone as an intermediate in the formation of the diol. (1998) *J. Lipid Res.*, 39(8): 1713-21.
38. Morisseau C and Hammock BD: Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. (2013) *Annu. Rev. Pharmacol.*, 53: 37-58.
39. Capdevila JH, Falck JR, and Harris RC: Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation. Molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. (2000) *J. Lipid Res.*, 41(2): 163-81.
40. Yamamoto S: "Enzymatic" lipid peroxidation: reactions of mammalian lipoxygenases. (1991) *Free Radic. Biol. Med.*, 10(2): 149-59.
41. Capdevila J, Yadagiri P, Manna S, and Falck JR: Absolute configuration of the hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) formed during catalytic oxygenation of arachidonic acid by microsomal cytochrome P-450. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 141(3): 1007-11.
42. Bylund J, Kunz T, Valmsen K, and Oliw EH: Cytochromes P450 with bisallylic hydroxylation activity on arachidonic and linoleic acids studied with human recombinant enzymes and with human and rat liver microsomes. (1998) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 284(1): 51-60.
43. Carroll MA, Balazy M, Margiotta P, Huang DD, Falck JR, and Mcgiff JC: Cytochrome P-450-dependent HETEs: profile of biological activity and stimulation by vasoactive peptides. (1996) *Am. J. Physiol.*, 271(4 Pt 2): R863-9.
44. Shoieb SM and El-Kadi AOS: S-Enantiomer of 19-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Preferentially Protects Against Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy. (2018) *Drug Metab. Dispos.*, 46(8): 1157.
45. Bednar MM, Gross CE, Russell SR, Fuller SP, Ahern TP, Howard DB, Falck JR, Reddy KM, and Balazy M: 16(R)-hydroxyeicosatetraenoic acid, a novel cytochrome P450 product of arachidonic acid, suppresses activation of human polymorphonuclear leukocyte and reduces intracranial pressure in a rabbit model of thromboembolic stroke. (2000) *Neurosurgery*, 47(6): 1410-1419.
46. Roman RJ: P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. (2002) *Physiol. Rev.*, 82(1): 131-85.

47. Konkel A and Schunck WH: Role of cytochrome P450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated fatty acids. (2011) *Biochim. Biophys. Acta*, 1814(1): 210-22.
48. Carroll MA, Balazy M, Huang D-D, Rybalova S, Falck JR, and Mcgiff JC: Cytochrome P450-derived renal HETEs: Storage and release. (1997) *Kidney Int.*, 51(6): 1696-1702.
49. Bernstrom K, Kayganich K, Murphy RC, and Fitzpatrick FA: Incorporation and distribution of epoxyeicosatrienoic acids into cellular phospholipids. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267(6): 3686-3690.
50. Spector AA: Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. (2009) *J. Lipid Res.*, 50: S52-S56.
51. Askari A, Thomson SJ, Edin ML, Zeldin DC, and Bishop-Bailey D: Roles of the epoxygenase CYP2J2 in the endothelium. (2013) *Prostag Oth Lipid M*, 107: 56-63.
52. Wu S, Moomaw CR, Tomer KB, Falck JR, and Zeldin DC: Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271(7): 3460-8.
53. Zeldin DC, Foley J, Goldsworthy SM, Cook ME, Boyle JE, Ma J, Moomaw CR, Tomer KB, Steenbergen C, and Wu S: CYP2J Subfamily Cytochrome P450s in the Gastrointestinal Tract: Expression, Localization, and Potential Functional Significance. (1997) *Mol. Pharmacol.*, 51(6): 931.
54. Liu X, Qian Z-Y, Xie F, Fan W, Nelson JW, Xiao X, Kaul S, Barnes AP, and Alkayed NJ: Functional screening for G protein-coupled receptor targets of 14,15-epoxyeicosatrienoic acid. (2017) *Prostag Oth Lipid M*, 132: 31-40.
55. Imig JD, Inscho EW, Deichmann PC, Reddy KM, and Falck JR: Afferent Arteriolar Vasodilation to the Sulfonimide Analog of 11,12-Epoxyeicosatrienoic Acid Involves Protein Kinase A. (1999) *Hypertension*, 33(1): 408-413.
56. Campbell WB and Fleming I: Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. (2010) *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 459(6): 881-895.
57. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, and Harder DR: Identification of Epoxyeicosatrienoic Acids as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. (1996) *Circul. Res.*, 78(3): 415-423.
58. Archer SL, Gragasin FS, Wu X, Wang S, Mcmurtry S, Kim DH, Platonov M, Koshal A, Hashimoto K, Campbell WB, Falck JR, and Michelakis ED: Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Human Internal Mammary

- Artery Is 11,12-Epoxyeicosatrienoic Acid and Causes Relaxation by Activating Smooth Muscle BKCa Channels. (2003) *Circulation*, 107(5): 769-776.
59. Liu T, Zhang L, Joo D, and Sun S-C: NF- κ B signaling in inflammation. (2017) *Signal Transduct. Target. Ther.*, 2(1): 17023.
60. Wagner KM, McCreynolds CB, Schmidt WK, and Hammock BD: Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for pain, inflammatory and neurodegenerative diseases. (2017) *Pharmacol. Ther.*, 180: 62-76.
61. Bystrom J, Wray JA, Sugden MC, Holness MJ, Swales KE, Warner TD, Edin ML, Zeldin DC, Gilroy DW, and Bishop-Bailey D: Endogenous Epoxygenases Are Modulators of Monocyte/Macrophage Activity. (2011) *PLoS One*, 6(10): e26591.
62. Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, Zeldin DC, and Liao JK: Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. (1999) *Science*, 285(5431): 1276-9.
63. Fleming I, Michaelis UR, Bredenkötter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, and Busse R: Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Synthase (Cytochrome P450 2C9) Is a Functionally Significant Source of Reactive Oxygen Species in Coronary Arteries. (2001) *Circul. Res.*, 88(1): 44-51.
64. Zhang C and Harder DR: Cerebral capillary endothelial cell mitogenesis and morphogenesis induced by astrocytic epoxyeicosatrienoic Acid. (2002) *Stroke*, 33(12): 2957-64.
65. Panigrahy D, Edin ML, Lee CR, Huang S, Bielenberg DR, Butterfield CE, Barnes CM, Mammoto A, Mammoto T, Luria A, Benny O, Chaponis DM, Dudley AC, Greene ER, Vergilio JA, Pietramaggiori G, Scherer-Pietramaggiori SS, Short SM, Seth M, Lih FB, Tomer KB, Yang J, Schwendener RA, Hammock BD, Falck JR, Manthathi VL, Ingber DE, Kaipainen A, D'amore PA, Kieran MW, and Zeldin DC: Epoxyeicosanoids stimulate multiorgan metastasis and tumor dormancy escape in mice. (2012) *J. Clin. Invest.*, 122(1): 178-91.
66. Capdevila JH and Falck JR: The arachidonic acid monooxygenase: from biochemical curiosity to physiological/pathophysiological significance. (2018) *J. Lipid Res.*, 59(11): 2047-2062.
67. Sun C-P, Zhang X-Y, Morisseau C, Hwang SH, Zhang Z-J, Hammock BD, and Ma X-C: Discovery of Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors from Chemical Synthesis and Natural Products. (2021) *J. Med. Chem.*, 64(1): 184-215.

68. Sarkis A, Lopez B, and Roman RJ: Role of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid and epoxyeicosatrienoic acids in hypertension. (2004) *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 13(2): 205-14.
69. Zou AP, Fleming JT, Falck JR, Jacobs ER, Gebremedhin D, Harder DR, and Roman RJ: 20-HETE is an endogenous inhibitor of the large-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channel in renal arterioles. (1996) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 270(1): R228-R237.
70. Roman RJ and Fan F: 20-HETE - Hypertension and Beyond. (2018) *Hypertension*, 72(1): 12-18.
71. Nowicki S, Chen SL, Aizman O, Cheng XJ, Li D, Nowicki C, Nairn A, Greengard P, and Aperia A: 20-Hydroxyeicosa-tetraenoic acid (20 HETE) activates protein kinase C. Role in regulation of rat renal Na⁺,K⁺-ATPase. (1997) *J Clin Invest*, 99(6): 1224-1230.
72. Quigley R, Baum M, Reddy KM, Griener JC, and Falck JR: Effects of 20-HETE and 19(S)-HETE on rabbit proximal straight tubule volume transport. (2000) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 278(6): F949-53.
73. Yu M, Lopez B, Dos Santos EA, Falck JR, and Roman RJ: Effects of 20-HETE on Na⁺ transport and Na⁺-K⁺-ATPase activity in the thick ascending loop of Henle. (2007) *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 292(6): R2400-R2405.
74. Fan F, Muroya Y, and Roman RJ: Cytochrome P450 eicosanoids in hypertension and renal disease. (2015) *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 24(1): 37-46.
75. Garcia V, Gilani A, Shkolnik B, Pandey V, Zhang FF, Dakarapu R, Gandham SK, Reddy NR, Graves JP, Gruzdev A, Zeldin DC, Capdevila JH, Falck JR, and Schwartzman ML: 20-HETE Signals Through G-Protein-Coupled Receptor GPR75 (Gq) to Affect Vascular Function and Trigger Hypertension. (2017) *Circul. Res.*, 120(11): 1776-1788.
76. Crozier A, Clifford MN, and Ashihara H: Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. 2008: John Wiley & Sons.
77. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, and Pouységu L: Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. (2011) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 50(3): 586-621.
78. Belščak-Cvitanović A, Durgo K, Huđek A, Bačun-Družina V, and Komes D: 1 - Overview of polyphenols and their properties, in Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications, C.M. Galanakis, Editor. 2018, Woodhead Publishing. p. 3-44.

79. Khalid M, Saeed Ur R, Bilal M, and Huang D-F: Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens — A review. (2019) *J Integr Agric*, 18(1): 211-230.
80. Korobkova EA: Effect of Natural Polyphenols on CYP Metabolism: Implications for Diseases. (2015) *Chem. Res. Toxicol.*, 28(7): 1359-1390.
81. Shimada T, Tanaka K, Takenaka S, Murayama N, Martin MV, Foroozesh MK, Yamazaki H, Guengerich FP, and Komori M: Structure-function relationships of inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, 1B1, 2C9, and 3A4 by 33 flavonoid derivatives. (2010) *Chem. Res. Toxicol.*, 23(12): 1921-35.
82. Kimura Y, Ito H, Ohnishi R, and Hatano T: Inhibitory effects of polyphenols on human cytochrome P450 3A4 and 2C9 activity. (2010) *Food Chem. Toxicol.*, 48(1): 429-435.
83. Si D, Wang Y, Zhou Y-H, Guo Y, Wang J, Zhou H, Li Z-S, and Fawcett JP: Mechanism of CYP2C9 Inhibition by Flavones and Flavonols. (2009) *Drug Metab. Disposition*, 37(3): 629.
84. Moon YJ, Wang X, and Morris ME: Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. (2006) *Toxicol. In Vitro*, 20(2): 187-210.
85. Rajnarayana K, Reddy MS, and Krishna DR: Diosmin pretreatment affects bioavailability of metronidazole. (2003) *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 58(12): 803-807.
86. Srinivas NR: Cranberry Juice Ingestion and Clinical Drug-Drug Interaction Potentials; Review of Case Studies and Perspectives. (2013) *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 16(2): 289-303.
87. Singh M, Kaur M, and Silakari O: Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. (2014) *Eur. J. Med. Chem.*, 84: 206-239.
88. Arnold C, Markovic M, Blossey K, Wallukat G, Fischer R, Dechend R, Konkel A, Von Schacky C, Luft FC, Muller DN, Rothe M, and Schunck WH: Arachidonic acid-metabolizing cytochrome P450 enzymes are targets of {omega}-3 fatty acids. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285(43): 32720-33.
89. Rifkind AB, Lee C, Chang TK, and Waxman DJ: Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxygenation in human liver microsomes. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, 320(2): 380-9.
90. Powell PK, Wolf I, Jin R, and Lasker JM: Metabolism of arachidonic acid to 20-hydroxy-5,8,11, 14-eicosatetraenoic acid by P450 enzymes in human

- liver: involvement of CYP4F2 and CYP4A11. (1998) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 285(3): 1327-36.
91. Lasker JM, Chen WB, Wolf I, Bloswick BP, Wilson PD, and Powell PK: Formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid, a vasoactive and natriuretic eicosanoid, in human kidney. Role of Cyp4F2 and Cyp4A11. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275(6): 4118-26.
 92. Zeldin DC: Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276(39): 36059-62.
 93. Zanger UM and Schwab M: Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. (2013) *Pharmacol. Ther.*, 138(1): 103-41.
 94. Song W, Yu L, and Peng Z: Targeted label-free approach for quantification of epoxide hydrolase and glutathione transferases in microsomes. (2015) *Anal. Biochem.*, 478: 8-13.
 95. Zeldin DC, Dubois RN, Falck JR, and Capdevila JH: Molecular cloning, expression and characterization of an endogenous human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase isoform. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, 322(1): 76-86.
 96. Imaoka S, Hashizume T, and Funae Y: Localization of rat cytochrome P450 in various tissues and comparison of arachidonic acid metabolism by rat P450 with that by human P450 orthologs. (2005) *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 20(6): 478-84.
 97. Bylund J, Ericsson J, and Oliw EH: Analysis of Cytochrome P450 Metabolites of Arachidonic and Linoleic Acids by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry with Ion Trap MS2. (1998) *Anal. Biochem.*, 265(1): 55-68.
 98. Fer M, Dreano Y, Lucas D, Corcos L, Salaun JP, Berthou F, and Amet Y: Metabolism of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by recombinant human cytochromes P450. (2008) *Arch. Biochem. Biophys.*, 471(2): 116-25.
 99. Guengerich FP: CYTOCHROME P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism. (1999) *Annu. Rev. Pharmacool. Toxicol.*, 39(1): 1-17.
 100. Zhou SF: Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. (2008) *Curr. Drug Metab.*, 9(4): 310-22.
 101. Guengerich FP: Cytochrome p450 and chemical toxicology. (2008) *Chem. Res. Toxicol.*, 21(1): 70-83.

102. Lucas D, Goullitquer S, Marienhagen J, Fer M, Dreano Y, Schwaneberg U, Amet Y, and Corcos L: Stereoselective epoxidation of the last double bond of polyunsaturated fatty acids by human cytochromes P450. (2010) *J. Lipid Res.*, 51(5): 1125-33.
103. El-Sherbeni AA and El-Kadi AO: Repurposing Resveratrol and Fluconazole To Modulate Human Cytochrome P450-Mediated Arachidonic Acid Metabolism. (2016) *Mol. Pharm.*, 13(4): 1278-88.
104. Powell PK, Wolf I, Jin R, and Lasker JM: Metabolism of Arachidonic Acid to 20-Hydroxy-5,8,11,14-eicosatetraenoic Acid by P450 Enzymes in Human Liver: Involvement of CYP4F2 and CYP4A11. (1998) *J Pharmacol Exper Ther*, 285(3): 1327.
105. Schwarz D, Kisselev P, Ericksen SS, Szklarz GD, Chernogolov A, Honeck H, Schunck WH, and Roots I: Arachidonic and eicosapentaenoic acid metabolism by human CYP1A1: highly stereoselective formation of 17(R),18(S)-epoxyeicosatetraenoic acid. (2004) *Biochem. Pharmacol.*, 67(8): 1445-57.
106. Choudhary D, Jansson I, Stoilov I, Sarfarazi M, and Schenkman JB: Metabolism of retinoids and arachidonic acid by human and mouse cytochrome P450 1b1. (2004) *Drug Metab. Dispos.*, 32(8): 840-7.
107. Falck JR, Lumin S, Blair I, Dishman E, Martin MV, Waxman DJ, Guengerich FP, and Capdevila JH: Cytochrome P-450-dependent oxidation of arachidonic acid to 16-, 17-, and 18-hydroxyeicosatetraenoic acids. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265(18): 10244-9.
108. Martignoni M, Groothuis GMM, and De Kanter R: Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. (2006) *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2(6): 875-894.
109. Rifkind AB: CYP1A in TCDD toxicity and in physiology-with particular reference to CYP dependent arachidonic acid metabolism and other endogenous substrates. (2006) *Drug Metab. Rev.*, 38(1-2): 291-335.
110. Zeldin DC, Moomaw CR, Jesse N, Tomer KB, Beetham J, Hammock BD, and Wu S: Biochemical characterization of the human liver cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase pathway. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.*, 330(1): 87-96.
111. Lasker JM, Chen WB, Wolf I, Blowski BP, Wilson PD, and Powell PK: Formation of 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid, a Vasoactive and Natriuretic Eicosanoid, in Human Kidney: Role of CYP4F2 and CYP4A11. (2000) *Journal of Biological Chemistry*, 275(6): 4118-4126.

112. Michaels S and Wang MZ: The revised human liver cytochrome P450 "Pie": absolute protein quantification of CYP4F and CYP3A enzymes using targeted quantitative proteomics. (2014) *Drug Metab. Dispos.*, 42(8): 1241-51.
113. Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, Ishiguro N, Kishimoto W, Ludwig-Schwellinger E, Ebner T, and Terasaki T: Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. (2012) *Drug Metab. Dispos.*, 40(1): 83-92.
114. Zeldin DC, Kobayashi J, Falck JR, Winder BS, Hammock BD, Snapper JR, and Capdevila JH: Regio- and enantiofacial selectivity of epoxyeicosatrienoic acid hydration by cytosolic epoxide hydrolase. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268(9): 6402-7.
115. Morisseau C and Hammock BD: Impact of Soluble Epoxide Hydrolase and Epoxyeicosanoids on Human Health. (2013) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 53: 37-58.
116. Morisseau C, Kodani SD, Kamita SG, Yang J, Lee KS, and Hammock BD: Relative Importance of Soluble and Microsomal Epoxide Hydrolases for the Hydrolysis of Epoxy-Fatty Acids in Human Tissues. (2021) *Int. J. Mol. Sci.*, 22(9).
117. Orjuela Leon AC, Marwosky A, and Arand M: Evidence for a complex formation between CYP2J5 and mEH in living cells by FRET analysis of membrane protein interaction in the endoplasmic reticulum (FAMPIR). (2017) *Arch. Toxicol.*, 91(11): 3561-3570.
118. Marowsky A, Meyer I, Erismann-Ebner K, Pellegrini G, Mule N, and Arand M: Beyond detoxification: a role for mouse mEH in the hepatic metabolism of endogenous lipids. (2017) *Arch. Toxicol.*, 91(11): 3571-3585.
119. Marowsky A, Burgener J, Falck JR, Fritschy JM, and Arand M: Distribution of soluble and microsomal epoxide hydrolase in the mouse brain and its contribution to cerebral epoxyeicosatrienoic acid metabolism. (2009) *Neuroscience*, 163(2): 646-61.
120. Ostermann AI, Reutzel M, Hartung N, Franke N, Kutzner L, Schoenfeld K, Weylandt KH, Eckert GP, and Schebb NH: A diet rich in omega-3 fatty acids enhances expression of soluble epoxide hydrolase in murine brain. (2017) *Prostag Oth Lipid M*, 133: 79-87.
121. Ulu A, Davis BB, Tsai H-J, Kim I-H, Morisseau C, Inceoglu B, Fiehn O, Hammock BD, and Weiss RH: Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitors

- Reduce the Development of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Knockout Mouse Model. (2008) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 52(4).
122. Cummings BS, Lasker JM, and Lash LH: Expression of glutathione-dependent enzymes and cytochrome P450s in freshly isolated and primary cultures of proximal tubular cells from human kidney. (2000) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 293(2): 677-85.
123. Karara A, Dishman E, Jacobson H, Falck JR, and Capdevila JH: Arachidonic acid epoxygenase. Stereochemical analysis of the endogenous epoxyeicosatrienoic acids of human kidney cortex. (1990) *FEBS Lett.*, 268(1): 227-30.
124. Knights KM, Rowland A, and Miners JO: Renal drug metabolism in humans: the potential for drug-endobiotic interactions involving cytochrome P450 (CYP) and UDP-glucuronosyltransferase (UGT). (2013) *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 76(4): 587-602.
125. Zhang W, Ramamoorthy Y, Kilicarslan T, Nolte H, Tyndale RF, and Sellers EM: Inhibition of cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives. (2002) *Drug Metab. Dispos.*, 30(3): 314-8.
126. Niwa T, Shiraga T, and Takagi A: Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 2C9, CYP2C19, and CYP3A4 activities in human liver microsomes. (2005) *Biol. Pharm. Bull.*, 28(9): 1805-8.
127. Stresser DM, Broudy MI, Ho T, Cargill CE, Blanchard AP, Sharma R, Dandeneau AA, Goodwin JJ, Turner SD, Erve JC, Patten CJ, Dehal SS, and Crespi CL: Highly selective inhibition of human CYP3Aa in vitro by azamulin and evidence that inhibition is irreversible. (2004) *Drug Metab. Dispos.*, 32(1): 105-12.
128. Eagling VA, Tjia JF, and Back DJ: Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes. (1998) *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 45(2): 107-14.
129. Godamudunage MP, Grech AM, and Scott EE: Comparison of Antifungal Azole Interactions with Adult Cytochrome P450 3A4 versus Neonatal Cytochrome P450 3A7. (2018) *Drug Metab. Dispos.*, 46(9): 1329-1337.
130. Niwa T, Inoue-Yamamoto S, Shiraga T, and Takagi A: Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2D6, and CYP2E1 activities in human liver microsomes. (2005) *Biol. Pharm. Bull.*, 28(9): 1813-6.
131. Wang MH, Brand-Schieber E, Zand BA, Nguyen X, Falck JR, Balu N, and Schwartzman ML: Cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolism in the rat kidney: characterization of selective inhibitors. (1998) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 284(3): 966-73.

132. Brand-Schieber E, Falck JF, and Schwartzman M: Selective inhibition of arachidonic acid epoxidation in vivo. (2000) *J. Physiol. Pharmacol.*, 51(4 Pt 1): 655-72.
133. Muerhoff AS, Williams DE, Reich NO, Cajacob CA, Ortiz De Montellano PR, and Masters BSS: Prostaglandin and Fatty Acid ω - and (ω -1)-Oxidation in Rabbit Lung: Acetylenic fatty acid mechanism-based inactivators as specific inhibitors. (1989) *J. Biol. Chem.*, 264(2): 749-756.
134. Donato MT, Montero S, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, and Lahoz A: Validated assay for studying activity profiles of human liver UGTs after drug exposure: inhibition and induction studies. (2010) *Anal. Bioanal. Chem.*, 396(6): 2251-63.
135. Choi YJ, Zhou Y, Lee JY, Ryu CS, Kim YH, Lee K, and Kim SK: Cytochrome P450 4A11 inhibition assays based on characterization of lauric acid metabolites. (2018) *Food Chem. Toxicol.*, 112: 205-215.
136. Qin CZ, Ren X, Tan ZR, Chen Y, Yin JY, Yu J, Qu J, Zhou HH, and Liu ZQ: A high-throughput inhibition screening of major human cytochrome P450 enzymes using an in vitro cocktail and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. (2014) *Biomed. Chromatogr.*, 28(2): 197-203.
137. Oh HA, Lee H, Kim D, and Jung BH: Development of GC-MS based cytochrome P450 assay for the investigation of multi-herb interaction. (2017) *Anal. Biochem.*, 519: 71-83.
138. Kim MJ, Kim H, Cha IJ, Park JS, Shon JH, Liu KH, and Shin JG: High-throughput screening of inhibitory potential of nine cytochrome P450 enzymes in vitro using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. (2005) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19(18): 2651-8.
139. Ung YT, Ong CE, and Pan Y: Current High-Throughput Approaches of Screening Modulatory Effects of Xenobiotics on Cytochrome P450 (CYP) Enzymes. (2018) *High Throughput*, 7(4).
140. Ben Henda Y, Labidi A, Arnaudin I, Bridiau N, Delatouche R, Maugard T, Piot JM, Sannier F, Thiery V, and Bordenave-Juchereau S: Measuring angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity by micro plate assays: comparison using marine cryptides and tentative threshold determinations with captopril and losartan. (2013) *J. Agric. Food. Chem.*, 61(45): 10685-90.
141. Schebb NH, Huby M, Morisseau C, Hwang SH, and Hammock BD: Development of an online SPE-LC-MS-based assay using endogenous substrate for investigation of soluble epoxide hydrolase (sEH) inhibitors. (2011) *Anal. Bioanal. Chem.*, 400(5): 1359-66.

142. Lewis DFV: Homology modelling of human CYP2 family enzymes based on the CYP2C5 crystal structure. (2002) *Xenobiotica*, 32(4): 305-323.
143. Reynald RL, Sansen S, Stout CD, and Johnson EF: Structural characterization of human cytochrome P450 2C19: active site differences between P450s 2C8, 2C9, and 2C19. (2012) *J Biol Chem*, 287(53): 44581-91.
144. Piver B, Berthou F, Dreano Y, and Lucas D: Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by epsilon-viniferin, the dimer of resveratrol: comparison with resveratrol and polyphenols from alcoholized beverages. (2003) *Life Sci.*, 73(9): 1199-213.
145. Li T, Li N, Guo Q, Ji H, Zhao D, Xie S, Li X, Qiu Z, Han D, Chen X, and You Q: Inhibitory effects of wogonin on catalytic activity of cytochrome P450 enzyme in human liver microsomes. (2011) *Eur J Drug Metab Ph*, 36(4): 249-56.
146. Shimada H, Eto M, Ohtaguro M, Ohtsubo M, Mizukami Y, Ide T, and Imamura Y: Differential mechanisms for the inhibition of human cytochrome P450 1A2 by apigenin and genistein. (2010) *J Biochem Mol Toxic*, 24(4): 230-234.
147. King LM, Ma J, Srettabunjong S, Graves J, Bradbury JA, Li L, Spiecker M, Liao JK, Mohrenweiser H, and Zeldin DC: Cloning of CYP2J2 Gene and Identification of Functional Polymorphisms. (2002) *Mol. Pharmacol.*, 61(4): 840.
148. Lee CA, Neul D, Clouser-Roche A, Dalvie D, Wester MR, Jiang Y, Jones JP, Freiwald S, Zientek M, and Totah RA: Identification of Novel Substrates for Human Cytochrome P450 2J2. (2010) *Drug Metab. Disposition*, 38(2): 347.
149. Santes-Palacios R, Olguín-Reyes S, Hernández-Ojeda SL, Camacho-Carranza R, and Espinosa-Aguirre JJ: Differential inhibition of naringenin on human and rat cytochrome P450 2E1 activity. (2020) *Toxicol. In Vitro*, 69: 105009.
150. Ho PC, Saville DJ, and Wanwimolruk S: Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. (2001) *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 4(3): 217-27.
151. Ingólfsson HI, Thakur P, Herold KF, Hobart EA, Ramsey NB, Periolo X, De Jong DH, Zwama M, Yilmaz D, Hall K, Marezky T, Hemmings HC, Blobel C, Marrink SJ, Koçer A, Sack JT, and Andersen OS: Phytochemicals Perturb Membranes and Promiscuously Alter Protein Function. (2014) *ACS Chem. Biol.*, 9(8): 1788-1798.

152. Baell J and Walters MA: Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery. (2014) *Nature*, 513(7519): 481-3.
153. Baell JB: Feeling Nature's PAINS: Natural Products, Natural Product Drugs, and Pan Assay Interference Compounds (PAINS). (2016) *J. Nat. Prod.*, 79(3): 616-628.
154. Fleming I: Epoxyeicosatrienoic acids, cell signaling and angiogenesis. (2007) *Prostag Oth Lipid M*, 82(1-4): 60-7.
155. Westerink WM and Schoonen WG: Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. (2007) *Toxicol. In Vitro*, 21(8): 1581-91.
156. Lampen A, Bader A, Bestmann T, Winkler M, Witte L, and Borlak JT: Catalytic activities, protein- and mRNA-expression of cytochrome P450 isoenzymes in intestinal cell lines. (1998) *Xenobiotica*, 28(5): 429-41.
157. Yu LJ, Matias J, Scudiero DA, Hite KM, Monks A, Sausville EA, and Waxman DJ: P450 enzyme expression patterns in the NCI human tumor cell line panel. (2001) *Drug Metab. Dispos.*, 29(3): 304-12.
158. Wang W, Yang J, Edin ML, Wang Y, Luo Y, Wan D, Yang H, Song C-Q, Xue W, Sanidad KZ, Song M, Bisbee HA, Bradbury JA, Nan G, Zhang J, Shih P-aB, Lee KSS, Minter LM, Kim D, Xiao H, Liu J-Y, Hammock BD, Zeldin DC, and Zhang G: Targeted Metabolomics Identifies the Cytochrome P450 Monooxygenase Eicosanoid Pathway as a Novel Therapeutic Target of Colon Tumorigenesis. (2019) *Cancer Res.*, 79(8): 1822.
159. Hartung NM, Ostermann AI, Immenschuh S, and Schebb NH: Combined Targeted Proteomics and Oxylipin Metabolomics for Monitoring of the COX-2 Pathway. (2021) *Proteomics*, 21(3-4): 1900058.
160. Guo Z, Sevrioukova IF, Denisov IG, Zhang X, Chiu TL, Thomas DG, Hanse EA, Cuellar RaD, Grinkova YV, Langenfeld VW, Swedien DS, Stamschror JD, Alvarez J, Luna F, Galvan A, Bae YK, Wulfkuhle JD, Gallagher RI, Petricoin EFR, Norris B, Flory CM, Schumacher RJ, O'sullivan MG, Cao Q, Chu H, Lipscomb JD, Atkins WM, Gupta K, Kelekar A, Blair IA, Capdevila JH, Falck JR, Sligar SG, Poulos TL, Georg GI, Ambrose E, and Potter DA: Heme Binding Biguanides Target Cytochrome P450-Dependent Cancer Cell Mitochondria. (2017) *Cell Chem Biol*, 24(10): 1314.
161. Alexanian A, Miller B, Roman RJ, and Sorokin A: 20-HETE-producing Enzymes Are Up-regulated in Human Cancers. (2012) *Cancer Genomics - Proteomics*, 9(4): 163.

162. Alexanian A, Rufanova VA, Miller B, Flasch A, Roman RJ, and Sorokin A: Down-regulation of 20-HETE Synthesis and Signaling Inhibits Renal Adenocarcinoma Cell Proliferation and Tumor Growth. (2009) *Anticancer Res.*, 29(10): 3819.
163. Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR: A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. (1999) *J. Biomol. Screen.*, 4(2): 67-73.
164. Iversen PW, Eastwood BJ, Sittampalam GS, and Cox KL: A Comparison of Assay Performance Measures in Screening Assays: Signal Window, Z' Factor, and Assay Variability Ratio. (2006) *J. Biomol. Screen.*, 11(3): 247-252.
165. Bourguine J, Billaut-Laden I, Happillon M, Lo-Guidice J-M, Maunoury V, Imbenotte M, and Broly F: Gene Expression Profiling of Systems Involved in the Metabolism and the Disposition of Xenobiotics: Comparison between Human Intestinal Biopsy Samples and Colon Cell Lines. (2012) *Drug Metab. Disposition*, 40(4): 694.
166. Lepage C, Liagre B, Cook-Moreau J, Pinon A, and Beneytout JL: Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase pathways in diosgenin-induced apoptosis in HT-29 and HCT-116 colon cancer cells. (2010) *Int. J. Oncol.*, 36(5): 1183-91.
167. Burns KE, Shepherd P, Finlay G, Tingle MD, and Helsby NA: Indirect regulation of CYP2C19 gene expression via DNA methylation. (2018) *Xenobiotica*, 48(8): 781-792.
168. Ostermann AI, Willenberg I, Weylandt KH, and Schebb NH: Development of an Online-SPE–LC–MS/MS Method for 26 Hydroxylated Polyunsaturated Fatty Acids as Rapid Targeted Metabolomics Approach for the LOX, CYP, and Autoxidation Pathways of the Arachidonic Acid Cascade. (2015) *Chromatographia*, 78(5): 415-428.
169. Cizkova K, Birke P, Malohlava J, Tauber Z, Huskova Z, and Ehrmann J: HT-29 and Caco2 Cell Lines Are Suitable Models for Studying the Role of Arachidonic Acid-Metabolizing Enzymes in Intestinal Cell Differentiation. (2019) *Cells Tissues Organs*, 208(1-2): 37-47.
170. Aliwarga T, Raccor BS, Lemaitre RN, Sotoodehnia N, Gharib SA, Xu L, and Totah RA: Enzymatic and free radical formation of cis- and trans-epoxyeicosatrienoic acids in vitro and in vivo. (2017) *Free Radical Biol. Med.*, 112: 131-140.
171. Schwenk RW, Holloway GP, Luiken JJ, Bonen A, and Glatz JF: Fatty acid transport across the cell membrane: regulation by fatty acid transporters. (2010) *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 82(4-6): 149-54.

172. Kamp F and Hamilton JA: How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion. (2006) *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 75(3): 149-59.
173. Rund KM, Heylmann D, Seiwert N, Wecklein S, Oger C, Galano J-M, Durand T, Chen R, Gueler F, Fahrer J, Bornhorst J, and Schebb NH: Formation of trans-epoxy fatty acids correlates with formation of isoprostanes and could serve as biomarker of oxidative stress. (2019) *Prostag Oth Lipid M*, 144: 106334.
174. Liclican EL, Doumad AB, Wang J, Li J, Falck JR, Stier CT, and Carroll MA: Inhibition of the adenosine2A receptor-epoxyeicosatrienoic acid pathway renders Dahl salt-resistant rats hypertensive. (2009) *Hypertension*, 54(6): 1284-1290.
175. Yu Z, Xu F, Huse LM, Morisseau C, Draper AJ, Newman JW, Parker C, Graham L, Engler MM, Hammock BD, Zeldin DC, and Kroetz DL: Soluble Epoxide Hydrolase Regulates Hydrolysis of Vasoactive Epoxyeicosatrienoic Acids. (2000) *Circul. Res.*, 87(11): 992-998.
176. Chábová VČ, Walkowska A, Kompanowska-Jeziarska E, Sadowski J, Kujal P, Vernerová Z, Vaňourková Z, Kopkan L, Kramer HJ, Falck JR, Imig JD, Hammock BD, Vaněčková I, and Červenka L: Combined inhibition of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid formation and of epoxyeicosatrienoic acids degradation attenuates hypertension and hypertension-induced end-organ damage in Ren-2 transgenic rats. (2010) *Clin. Sci.*, 118(10): 617-632.
177. Garcia V, Cheng J, Weidenhammer A, Ding Y, Wu C-C, Zhang F, Gotlinger K, Falck JR, and Schwartzman ML: Androgen-induced hypertension in angiotensinogen deficient mice: Role of 20-HETE and EETS. (2015) *Prostag Oth Lipid M*, 116-117: 124-130.
178. Wang M-H, Zhang F, Marji J, Zand BA, Nasjletti A, and Laniado-Schwartzman M: CYP4A1 antisense oligonucleotide reduces mesenteric vascular reactivity and blood pressure in SHR. (2001) *Am J Physiol-Reg I*, 280(1): R255-R261.
179. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, and Jiménez L: Polyphenols: food sources and bioavailability. (2004) *Am. J. Clin. Nutr.*, 79(5): 727-747.
180. Hubatsch I, Ragnarsson EGE, and Artursson P: Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. (2007) *Nat. Protoc.*, 2(9): 2111-2119.
181. Rubas W, Jezyk N, and Grass GM: Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial (Caco-2) cell line to colon of rabbit, monkey, and dog intestine and human drug absorption. (1993) *Pharm. Res.*, 10(1): 113-8.

182. Yee S: In Vitro Permeability Across Caco-2 Cells (Colonic) Can Predict In Vivo (Small Intestinal) Absorption in Man—Fact or Myth. (1997) *Pharm. Res.*, 14(6): 763-766.
183. Matsson P, Bergström CaS, Nagahara N, Tavelin S, Norinder U, and Artursson P: Exploring the Role of Different Drug Transport Routes in Permeability Screening. (2005) *J. Med. Chem.*, 48(2): 604-613.
184. Skolnik S, Lin X, Wang J, Chen XH, He T, and Zhang B: Towards prediction of in vivo intestinal absorption using a 96-well Caco-2 assay. (2010) *J. Pharm. Sci.*, 99(7): 3246-65.
185. Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, and Zeldin DC: The human intestinal cytochrome P450 “pie”. (2006) *Drug Metab. Dispos.*, 34(5): 880.
186. Wang MZ, Wu JQ, Bridges AS, Zeldin DC, Kornbluth S, Tidwell RR, Hall JE, and Paine MF: Human enteric microsomal CYP4F enzymes O-demethylate the antiparasitic prodrug pafuramidine. (2007) *Drug Metab. Dispos.*, 35(11): 2067.
187. Imig JD and Hammock BD: Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. (2009) *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(10): 794-805.
188. Rauter AP, Ennis M, Hellwich K-H, Herold BJ, Horton D, Moss GP, and Schomburg I: Nomenclature of flavonoids (IUPAC Recommendations 2017). (2018) *Pure Appl. Chem.*, 90(9): 1429-1486.
189. Kopecna-Zapletalova M, Krasulova K, Anzenbacher P, Hodek P, and Anzenbacherova E: Interaction of isoflavonoids with human liver microsomal cytochromes P450: inhibition of CYP enzyme activities. (2017) *Xenobiotica*, 47(4): 324-331.
190. Tsujimoto M, Horie M, Honda H, Takara K, and Nishiguchi K: The Structure-Activity Correlation on the Inhibitory Effects of Flavonoids on Cytochrome P450 3A Activity. (2009) *Biol. Pharm. Bull.*, 32(4): 671-676.
191. Fontana E, Dansette PM, and Poli SM: Cytochrome p450 enzymes mechanism based inhibitors: common sub-structures and reactivity. (2005) *Curr. Drug Metab.*, 6(5): 413-54.
192. Sebaugh JL: Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. (2011) *Pharmaceut. Statist.*, 10(2): 128-134.
193. Copeland RA, Basavapathruni A, Moyer M, and Scott MP: Impact of enzyme concentration and residence time on apparent activity recovery in jump dilution analysis. (2011) *Anal. Biochem.*, 416(2): 206-210.

194. Dahlin JL, Baell J, and Walters MA: Assay Interference by Chemical Reactivity. 2004: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD).
195. Xu F, Falck JR, Ortiz De Montellano PR, and Kroetz DL: Catalytic Activity and Isoform-Specific Inhibition of Rat Cytochrome P450 4F Enzymes. (2004) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 308(3): 887.
196. Chen LP and Hardwick JP: Identification of a New P450 Subfamily, CYP4F1, Expressed in Rat Hepatic Tumors. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.*, 300(1): 18-23.
197. Kalsotra A, Anakk S, Boehme CL, and Strobel HW: Sexual dimorphism and tissue specificity in the expression of CYP4F forms in Sprague Dawley rats. (2002) *Drug Metab. Dispos.*, 30(9): 1022-8.
198. Nguyen X, Wang M-H, Reddy KM, Falck JR, and Schwartzman ML: Kinetic profile of the rat CYP4A isoforms: arachidonic acid metabolism and isoform-specific inhibitors. (1999) *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 276(6): R1691-R1700.
199. Okita JR, Johnson SB, Castle PJ, Dezellem SC, and Okita RT: Improved separation and immunodetection of rat cytochrome P450 4A forms in liver and kidney. (1997) *Drug Metab. Dispos.*, 25(8): 1008-12.
200. Zhang Y and Klaassen CD: Hormonal regulation of Cyp4a isoforms in mouse liver and kidney. (2013) *Xenobiotica*, 43(12): 1055-1063.
201. Muller Dominik n, Schmidt C, Barbosa-Sicard E, Wellner M, Gross V, Hercule H, Markovic M, Honeck H, Luft Friedrich c, and Schunck W-H: Mouse Cyp4a isoforms: enzymatic properties, gender- and strain-specific expression, and role in renal 20-hydroxyeicosatetraenoic acid formation. (2007) *Biochem. J*, 403(1): 109-118.
202. Wu Q and Tsuduki T: CYP4F13 is the Major Enzyme for Conversion of alpha-Eleostearic Acid into cis-9, trans-11-Conjugated Linoleic Acid in Mouse Hepatic Microsomes. (2020) *J Oleo Sci*, 69(9): 1061-1075.
203. Theken KN, Deng Y, Kannon MA, Miller TM, Poloyac SM, and Lee CR: Activation of the Acute Inflammatory Response Alters Cytochrome P450 Expression and Eicosanoid Metabolism. (2011) *Drug Metab. Disposition*, 39(1): 22.
204. Bonomo S, Hansen CH, Petrunak EM, Scott EE, Styris have B, Jørgensen FS, and Olsen L: Promising Tools in Prostate Cancer Research: Selective Non-Steroidal Cytochrome P450 17A1 Inhibitors. (2016) *Sci. Rep.*, 6(1): 29468.

205. Potter GA, Barrie SE, Jarman M, and Rowlands MG: Novel Steroidal Inhibitors of Human Cytochrome P45017.alpha.-Hydroxylase-C17,20-lyase): Potential Agents for the Treatment of Prostatic Cancer. (1995) *J. Med. Chem.*, 38(13): 2463-2471.
206. Šarić Mustapić D, Debeljak Ž, Maleš Ž, and Bojić M: The Inhibitory Effect of Flavonoid Aglycones on the Metabolic Activity of CYP3A4 Enzyme. (2018) *Molecules*, 23(10).
207. Ta N and Walle T: Aromatase inhibition by bioavailable methylated flavones. (2007) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 107(1): 127-129.
208. Mckendall M, Smith T, Anh K, Ellis J, Mcgee T, Foroozesh M, Zhu N, and Stevens CLK: Methoxyflavone Inhibitors of Cytochrome P450. (2008) *J. Chem. Crystallogr.*, 38(4): 231-237.
209. Stec DE, Trolliet MR, Krieger JE, Jacob HJ, and Roman RJ: Renal Cytochrome P4504A Activity and Salt Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats. (1996) *Hypertension*, 27(6): 1329-1336.
210. Miyata N, Taniguchi K, Seki T, Ishimoto T, Sato-Watanabe M, Yasuda Y, Doi M, Kametani S, Tomishima Y, Ueki T, Sato M, and Kameo K: HET0016, a potent and selective inhibitor of 20-HETE synthesizing enzyme. (2001) *Br. J. Pharmacol.*, 133(3): 325-329.
211. Gebremedhin D, Zhang DX, Carver KA, Rau N, Rarick KR, Roman RJ, and Harder DR: Expression of CYP 4A ω -hydroxylase and formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) in cultured rat brain astrocytes. (2016) *Prostag Oth Lipid M*, 124: 16-26.
212. Lukaszewicz KM and Lombard JH: Role of the CYP4A/20-HETE pathway in vascular dysfunction of the Dahl salt-sensitive rat. (2013) *Clin. Sci. (Lond.)*, 124(12): 695-700.
213. Honeck H, Gross V, Erdmann B, Kärgel E, Neunaber R, Milia AF, Schneider W, Luft FC, and Schunck WH: Cytochrome P450-dependent renal arachidonic acid metabolism in desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive mice. (2000) *Hypertension*, 36(4): 610-6.
214. Gonzalez-Fernandez E, Staurisky D, Lucas K, Nguyen BV, Li M, Liu Y, Washington C, Coolen LM, Fan F, and Roman RJ: 20-HETE Enzymes and Receptors in the Neurovascular Unit: Implications in Cerebrovascular Disease. (2020) *Front. Neurol.*, 11: 983.
215. Miyata N, Seki T, Tanaka Y, Omura T, Taniguchi K, Doi M, Bandou K, Kametani S, Sato M, Okuyama S, Cambj-Sapunar L, Harder DR, and Roman RJ: Beneficial Effects of a New 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Synthesis Inhibitor, TS-011 [*N*-(3-Chloro-4-morpholin-4-yl) Phenyl-*N'*-

- hydroxyimido Formamide], on Hemorrhagic and Ischemic Stroke. (2005) *J Pharmacol Exp Ther*, 314(1): 77-85.
216. Steuck M, Hellhake S, and Schebb NH: Food Polyphenol Apigenin Inhibits the Cytochrome P450 Monooxygenase Branch of the Arachidonic Acid Cascade. (2016) *J. Agric. Food. Chem.*, 64(47): 8973-8976.
217. Zou AP, Ma YH, Sui ZH, Ortiz De Montellano PR, Clark JE, Masters BS, and Roman RJ: Effects of 17-octadecynoic acid, a suicide-substrate inhibitor of cytochrome P450 fatty acid omega-hydroxylase, on renal function in rats. (1994) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 268(1): 474-81.
218. Choi YJ, Quan KT, Park I, Lee SJ, Kang KW, Na M, and Kim SK: Discovery of rubiarbonone C as a selective inhibitor of cytochrome P450 4F enzymes. (2018) *Arch. Toxicol.*, 92(11): 3325-3336.
219. J. C. Furtado NA, Pirson L, Edelberg H, M. Miranda L, Loira-Pastoriza C, Preat V, Larondelle Y, and André CM: Pentacyclic Triterpene Bioavailability: An Overview of In Vitro and In Vivo Studies. (2017) *Molecules*, 22(3).
220. Sabourian R, Mirjalili SZ, Namini N, Chavoshy F, Hajimahmoodi M, and Safavi M: HPLC methods for quantifying anticancer drugs in human samples: A systematic review. (2020) *Anal. Biochem.*, 610: 113891.
221. Youdim KA and Saunders KC: A review of LC–MS techniques and high-throughput approaches used to investigate drug metabolism by cytochrome P450s. (2010) *J. Chromatogr. B*, 878(17): 1326-1336.
222. López-Fernández O, Domínguez R, Pateiro M, Munekata PES, Rocchetti G, and Lorenzo JM: Determination of Polyphenols Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Technique (LC–MS/MS): A Review. (2020) *Antioxidants*, 9(6).
223. López-Yerena A, Domínguez-López I, Vallverdú-Queralt A, Pérez M, Jáuregui O, Escribano-Ferrer E, and Lamuela-Raventós RM: Metabolomics Technologies for the Identification and Quantification of Dietary Phenolic Compound Metabolites: An Overview. (2021) *Antioxidants*, 10(6).
224. Fan Y, Zhao L, Huang X, Shen J, Wang W, Jia X, Gao M, Ouyang H, Chang Y, and He J: UPLC-MS/MS Method for the Simultaneous Quantification of Eight Compounds in Rat Plasma and Its Application to a Pharmacokinetic Study after Oral Administration of Veratrum (*Veratrum nigrum* L.) Extract. (2020) *BioMed Research International*, 2020: 8883277.

225. Huang J-T, Cheng Y-Y, Lin L-C, and Tsai T-H: Structural Pharmacokinetics of Polymethoxylated Flavones in Rat Plasma Using HPLC-MS/MS. (2017) *J. Agric. Food. Chem.*, 65(11): 2406-2413.
226. Wang T, Xiao J, Hou H, Li P, Yuan Z, Xu H, Liu R, Li Q, and Bi K: Development of an ultra-fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of seven flavonoids in rat plasma: Application to a comparative pharmacokinetic investigation of Ginkgo biloba extract and single pure ginkgo flavonoids after oral administration. (2017) *J. Chromatogr. B*, 1060: 173-181.
227. Tu Y, Zhou L, Li L, Wang L, Gao S, and Hu M: Development and validation of an LC-MS/MS method for the quantification of flavonoid glucuronides (wogonoside, baicalin, and apigenin-glucuronide) in the bile and blood samples: Application to a portal vein infusion study. (2020) *Anal. Biochem.*, 601: 113723.
228. Li G-J, Wu H-J, Wang Y, Hung W-L, and Rouseff RL: Determination of citrus juice coumarins, furanocoumarins and methoxylated flavones using solid phase extraction and HPLC with photodiode array and fluorescence detection. (2019) *Food Chem.*, 271: 29-38.
229. Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, and Michotte Y: Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. (2009) *J. Chromatogr. B*, 877(23): 2198-2207.
230. Willenberg I, Meschede AK, and Schebb NH: Determining cyclooxygenase-2 activity in three different test systems utilizing online-solid phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry for parallel quantification of prostaglandin E(2), D(2) and thromboxane B(2). (2015) *J. Chromatogr. A*, 1391: 40-8.
231. Kot-Wasik A, Dębska J, Wasik A, and Namieśnik J: Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Natural Waters Using Off-Line and On-Line SPE Followed by LC Coupled with DAD-MS. (2006) *Chromatographia*, 64(1): 13-21.
232. Wilson SR, Jankowski M, Pepaj M, Mihailova A, Boix F, Vivo Truyols G, Lundanes E, and Greibrokk T: 2D LC Separation and Determination of Bradykinin in Rat Muscle Tissue Dialysate with On-Line SPE-HILIC-SPE-RP-MS. (2007) *Chromatographia*, 66(7): 469-474.
233. Márta Z, Bobály B, Fekete J, Magda B, Imre T, Mészáros KV, Bálint M, and Szabó PT: Simultaneous determination of thirteen different steroid hormones using micro UHPLC-MS/MS with on-line SPE system. (2018) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 150: 258-267.

-
234. Bittersohl H, Schniedewind B, Christians U, and Luppä PB: A simple and highly sensitive on-line column extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of protein-unbound tacrolimus in human plasma samples. (2018) *J. Chromatogr. A*, 1547: 45-52.
235. Pan J, Zhang C, Zhang Z, and Li G: Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. (2014) *Anal. Chim. Acta*, 815: 1-15.
236. Masini JC and Svec F: Porous monoliths for on-line sample preparation: A review. (2017) *Anal. Chim. Acta*, 964: 24-44.
237. Yang X-Q, Yang C-X, and Yan X-P: Zeolite imidazolate framework-8 as sorbent for on-line solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of tetracyclines in water and milk samples. (2013) *J. Chromatogr. A*, 1304: 28-33.
238. Londonio A, Hasuoka PE, Pacheco P, Gil RA, and Smichowski P: Online solid phase extraction-HPLC-ICP-MS system for mercury and methylmercury preconcentration using functionalised carbon nanotubes for their determination in dietary supplements. (2018) *J. Anal. At. Spectrom.*, 33(10): 1737-1744.
239. Røen BT, Sellevåg SR, and Lundanes E: On-line solid phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry for trace determination of nerve agent degradation products in water samples. (2013) *Anal. Chim. Acta*, 761: 109-116.
240. Rogeberg M, Malerod H, Roberg-Larsen H, Aass C, and Wilson SR: On-line solid phase extraction-liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems. (2014) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 87: 120-129.
241. Cassiano NM, Barreiro JC, Moraes MC, Oliveira RV, and Cass QB: Restricted-access media supports for direct high-throughput analysis of biological fluid samples: review of recent applications. (2009) *Bioanalysis*, 1(3): 577-594.
242. De Faria HD, Abrão LCD, Santos MG, Barbosa AF, and Figueiredo EC: New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. (2017) *Anal. Chim. Acta*, 959: 43-65.
243. Yang SH, Fan H, Classon RJ, and Schug KA: Restricted access media as a streamlined approach toward on-line sample preparation: Recent advancements and applications. (2013) *J. Sep. Sci.*, 36(17): 2922-2938.

244. Willenberg I, Von Elsner L, Steinberg P, and Schebb NH: Development of an online-SPE-LC-MS method for the investigation of the intestinal absorption of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PHIP) and its bacterial metabolite PHIP-M1 in a Caco-2 Transwell system. (2015) *Food Chem.*, 166: 537-543.
245. Quinn HM and Takarewski Jr JJ: High performance liquid chromatography method and apparatus. 1999, US Patent 5,919,368.
246. Pretorius V and Smuts TW: Turbulent Flow Chromatography. A New Approach to Faster Analysis. (1966) *Anal. Chem.*, 38(2): 274-281.
247. Ayrton J, Dear GJ, Leavens WJ, Mallett DN, and Plumb RS: Optimisation and routine use of generic ultra-high flow-rate liquid chromatography with mass spectrometric detection for the direct on-line analysis of pharmaceuticals in plasma. (1998) *J. Chromatogr. A*, 828(1): 199-207.
248. Couchman L: Turbulent flow chromatography in bioanalysis: a review. (2012) *Biomed. Chromatogr.*, 26(8): 892-905.
249. Herman JL, Edge T, and Majors RE: Theoretical Concepts and Applications of Turbulent Flow Chromatography. (2012) *LC GC North America*, 30(3).
250. Liesener A and Karst U: Turbulent flow chromatography for the reduction of matrix effects in electrospray ionization mass spectrometry-based enzyme assays. (2005) *J. Sep. Sci.*, 28(14): 1658-1665.
251. Zimmer D, Pickard V, Czembor W, and Müller C: Comparison of turbulent-flow chromatography with automated solid-phase extraction in 96-well plates and liquid-liquid extraction used as plasma sample preparation techniques for liquid chromatography-tandem mass spectrometry. (1999) *J. Chromatogr. A*, 854(1-2): 23-35.
252. Mabry TJ, Markham KR, and Thomas MB: The Ultraviolet Spectra of Flavones and Flavonols, in *The Systematic Identification of Flavonoids*, T.J. Mabry, K.R. Markham, and M.B. Thomas, Editors. 1970, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 41-164.
253. Greenham J, Harborne JB, and Williams CA: Identification of lipophilic flavones and flavonols by comparative HPLC, TLC and UV spectral analysis. (2003) *Phytochem. Anal*, 14(2): 100-118.
254. Ma YL, Li QM, Van Den Heuvel H, and Claeys M: Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. (1997) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11(12): 1357-1364.
255. Fabre N, Rustan I, De Hoffmann E, and Quetin-Leclercq J: Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid

- chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. (2001) *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, 12(6): 707-715.
256. Wu W, Yan C, Li L, Liu Z, and Liu S: Studies on the flavones using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. (2004) *J. Chromatogr. A*, 1047(2): 213-220.
257. Kutzner L, Rund KM, Ostermann AI, Hartung NM, Galano J-M, Balas L, Durand T, Balzer MS, David S, and Schebb NH: Development of an Optimized LC-MS Method for the Detection of Specialized Pro-Resolving Mediators in Biological Samples. (2019) *Front. Pharmacol.*, 10: 169.
258. Guideline on bioanalytical method validation. (2011) *European Medicines Agency*, (EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2).
259. Mueller DM: The current role of on-line extraction approaches in clinical and forensic toxicology. (2014) *Bioanalysis*, 6(17): 2261-2274.
260. Baranczewski P, Kallin A, Andersson A, Hagigi S, Åberg M, Postlind H, and Mankowitz L: Development of an Assay Using 4-Trifluoromethylumbelliferyl as a Marker Substrate for Assessment of Drug–Drug Interactions to Multiple Isoforms of UDP-Glucuronosyltransferases. (2004) *Assay Drug Dev. Technol.*, 2(4): 345-352.
261. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, and Feeney PJ: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. (2001) *Adv. Drug Del. Rev.*, 46(1): 3-26.
262. Lipinski CA: Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. (2004) *Drug Discov Today: Technol*, 1(4): 337-341.
263. Veber DF, Johnson SR, Cheng H-Y, Smith BR, Ward KW, and Kopple KD: Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. (2002) *J. Med. Chem.*, 45(12): 2615-2623.
264. Kelder J, Grootenhuis PDJ, Bayada DM, Delbressine LPC, and Ploemen J-P: Polar Molecular Surface as a Dominating Determinant for Oral Absorption and Brain Penetration of Drugs. (1999) *Pharm. Res.*, 16(10): 1514-1519.
265. Lim D-S, Lim D-H, Lee J-H, Oh E-T, and Keum Y-S: Structure–Oxidative Metabolism Relationships of Substituted Flavones by *Aspergillus niger*. (2017) *J. Agric. Food. Chem.*, 65(14): 3056-3064.
266. Llinàs A, Burley JC, Box KJ, Glen RC, and Goodman JM: Diclofenac Solubility: Independent Determination of the Intrinsic Solubility of Three Crystal Forms. (2007) *J. Med. Chem.*, 50(5): 979-983.

267. Saal C and Petereit AC: Optimizing solubility: Kinetic versus thermodynamic solubility temptations and risks. (2012) *Eur. J. Pharm. Sci.*, 47(3): 589-595.
268. Mcnaught AD and Wilkinson A: The IUPAC Compendium of Chemical Terminology. 2nd ed. 1997: Blackwell.
269. Bhattachar SN, Deschenes LA, and Wesley JA: Solubility: it's not just for physical chemists. (2006) *Drug Discov Today*, 11(21): 1012-1018.
270. Sou T and Bergström CaS: Automated assays for thermodynamic (equilibrium) solubility determination. (2018) *Drug Discov Today: Technol*, 27: 11-19.
271. Veseli A, Žakelj S, and Kristl A: A review of methods for solubility determination in biopharmaceutical drug characterization. (2019) *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 45(11): 1717-1724.
272. Alsenz J and Kansy M: High throughput solubility measurement in drug discovery and development. (2007) *Adv. Drug Del. Rev.*, 59(7): 546-567.
273. Hoelke B, Gieringer S, Arlt M, and Saal C: Comparison of Nephelometric, UV-Spectroscopic, and HPLC Methods for High-Throughput Determination of Aqueous Drug Solubility in Microtiter Plates. (2009) *Anal. Chem.*, 81(8): 3165-3172.
274. Sugano K, Kato T, Suzuki K, Keiko K, Sujaku T, and Mano T: High throughput solubility measurement with automated polarized light microscopy analysis. (2006) *J. Pharm. Sci.*, 95(10): 2115-2122.
275. Stuart M and Box K: Chasing Equilibrium: Measuring the Intrinsic Solubility of Weak Acids and Bases. (2005) *Anal. Chem.*, 77(4): 983-990.
276. Europäisches Arzneibuch. 10. ed. 2020: Deutscher Apotheker Verlag.
277. Zhang J, Liu D, Huang Y, Gao Y, and Qian S: Biopharmaceutics classification and intestinal absorption study of apigenin. (2012) *Int. J. Pharm.*, 436(1): 311-317.
278. Walle T: Methylation of Dietary Flavones Increases Their Metabolic Stability and Chemopreventive Effects. (2009) *Int. J. Mol. Sci.*, 10(11).
279. Yu H, Chang J-S, Kim SY, Kim YG, and Choi H-K: Enhancement of solubility and dissolution rate of baicalein, wogonin and oroxylin A extracted from *Radix scutellariae*. (2017) *Int. J. Pharm.*, 528(1): 602-610.
280. Yousaf AM, Kim DW, Oh YK, Yong CS, Kim JO, and Choi HG: Enhanced oral bioavailability of fenofibrate using polymeric nanoparticulated systems:

- physicochemical characterization and in vivo investigation. (2015) *Int J Nanomedicine*, 10: 1819-30.
281. Jung J-Y, Yoo SD, Lee S-H, Kim K-H, Yoon D-S, and Lee K-H: Enhanced solubility and dissolution rate of itraconazole by a solid dispersion technique. (1999) *Int. J. Pharm.*, 187(2): 209-218.
282. Surwase SA, Boetker JP, Saville D, Boyd BJ, Gordon KC, Peltonen L, and Strachan CJ: Indomethacin: New Polymorphs of an Old Drug. (2013) *Mol. Pharm.*, 10(12): 4472-4480.
283. Kalepu S and Nekkanti V: Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. (2015) *Acta Pharm Sin B*, 5(5): 442-453.
284. Kansy M, Senner F, and Gubernator K: Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. (1998) *J. Med. Chem.*, 41(7): 1007-1010.
285. Avdeef A: The rise of PAMPA. (2005) *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 1(2): 325-342.
286. Berben P, Bauer-Brandl A, Brandl M, Faller B, Flaten GE, Jacobsen A-C, Brouwers J, and Augustijns P: Drug permeability profiling using cell-free permeation tools: Overview and applications. (2018) *Eur. J. Pharm. Sci.*, 119: 219-233.
287. Sinkó B, Garrigues TM, Balogh GT, Nagy ZK, Tsinman O, Avdeef A, and Takács-Novák K: Skin–PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration. (2012) *Eur. J. Pharm. Sci.*, 45(5): 698-707.
288. Di L, Kerns EH, Fan K, Mcconnell OJ, and Carter GT: High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. (2003) *Eur. J. Med. Chem.*, 38(3): 223-232.
289. Bailey-Hytholt CM, Shen T-L, Nie B, Tripathi A, and Shukla A: Placental Trophoblast-Inspired Lipid Bilayers for Cell-Free Investigation of Molecular Interactions. (2020) *ACS Appl Mater Inter*, 12(28): 31099-31111.
290. Sugano K, Hamada H, Machida M, Ushio H, Saitoh K, and Terada K: Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay. (2001) *Int. J. Pharm.*, 228(1): 181-188.
291. Sugano K, Hamada H, Machida M, and Ushio H: High Throughput Prediction of Oral Absorption: Improvement of the Composition of the Lipid Solution Used in Parallel Artificial Membrane Permeation Assay. (2001) *J. Biomol. Screen.*, 6(3): 189-196.

292. Chen X, Murawski A, Patel K, Crespi CL, and Balimane PV: A Novel Design of Artificial Membrane for Improving the PAMPA Model. (2008) *Pharm. Res.*, 25(7): 1511-1520.
293. Li H, Zeng H, He D, Wang M, Liu L, Liang W, Shu Y, Zhao S, Sun G, Lv C, Xiao C, and Liu Y: A new approach to examining the extraction process of Zhishi and Zhiqiao considering the synergistic effect of complex mixtures by PAMPA. (2018) *J. Chromatogr. B*, 1099: 10-17.
294. Diukendjieva A, Alov P, Tsakovska I, Pencheva T, Richarz A, Kren V, Cronin MTD, and Pajeva I: In vitro and in silico studies of the membrane permeability of natural flavonoids from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. and their derivatives. (2019) *Phytomedicine*, 53: 79-85.
295. Rastogi H and Jana S: Evaluation of physicochemical properties and intestinal permeability of six dietary polyphenols in human intestinal colon adenocarcinoma Caco-2 cells. (2016) *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, 41(1): 33-43.
296. Kwan KC, Breault GO, Umbenhauer ER, McMahon FG, and Duggan DE: Kinetics of indomethacin absorption, elimination, and enterohepatic circulation in man. (1976) *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 4(3): 255-280.
297. Verma RP, Hansch C, and Selassie CD: Comparative QSAR studies on PAMPA/modified PAMPA for high throughput profiling of drug absorption potential with respect to Caco-2 cells and human intestinal absorption. (2007) *J. Comput. Aided Mol. Des.*, 21(1): 3-22.
298. Bermejo M, Avdeef A, Ruiz A, Nalda R, Ruell JA, Tsinman O, González I, Fernández C, Sánchez G, Garrigues TM, and Merino V: PAMPA—a drug absorption in vitro model: 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. (2004) *Eur. J. Pharm. Sci.*, 21(4): 429-441.
299. Bujard A, Sol M, Carrupt P-A, and Martel S: Predicting both passive intestinal absorption and the dissociation constant toward albumin using the PAMPA technique. (2014) *Eur. J. Pharm. Sci.*, 63: 36-44.
300. Kerns EH, Di L, Petusky S, Farris M, Ley R, and Jupp P: Combined Application of Parallel Artificial Membrane Permeability Assay and Caco-2 Permeability Assays in Drug Discovery. (2004) *J. Pharm. Sci.*, 93(6): 1440-1453.
301. Balimane PV, Chong S, and Morrison RA: Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. (2000) *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 44(1): 301-312.

302. Hidalgo IJ, Raub TJ, and Borchardt RT: Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability. (1989) *Gastroenterology*, 96(2, Part 2): 736-749.
303. Engle MJ, Goetz GS, and Alpers DH: Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. (1998) *J. Cell. Physiol.*, 174(3): 362-369.
304. Lentz KA, Hayashi J, Lucisano LJ, and Polli JE: Development of a more rapid, reduced serum culture system for Caco-2 monolayers and application to the biopharmaceutics classification system. (2000) *Int. J. Pharm.*, 200(1): 41-51.
305. Sevin E, Dehouck L, Fabulas-Da Costa A, Cecchelli R, Dehouck MP, Lundquist S, and Culot M: Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery. (2013) *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 68(3): 334-339.
306. Hauri HP, Sterchi EE, Bienz D, Fransen JA, and Marxer A: Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. (1985) *J. Cell Biol.*, 101(3): 838-851.
307. Howell S, Kenny AJ, and Turner AJ: A survey of membrane peptidases in two human colonic cell lines, Caco-2 and HT-29. (1992) *Biochem. J*, 284(2): 595-601.
308. Ungell A-L and Karlsson J: Cell Cultures in Drug Discovery: An Industrial Perspective, in Drug Bioavailability, R. Mannhold, et al., Editors. 2003, Wiley-VCH. p. 90-131.
309. Vaessen SFC, Van Lipzig MMH, Pieters RHH, Krul CaM, Wortelboer HM, and Van De Steeg E: Regional expression levels of drug transporters and metabolizing enzymes along the pig and human intestinal tract and comparison with Caco-2 cells. (2017) *Drug Metab. Disposition: dmd.116.072231*.
310. Van Breemen RB and Li Y: Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. (2005) *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 1(2): 175-185.
311. Gutmann H, Fricker G, Török M, Michael S, Beglinger C, and Drewe J: Evidence for Different ABC-Transporters in Caco-2 Cells Modulating Drug Uptake. (1999) *Pharm. Res.*, 16(3): 402-407.
312. Hunter J, Hirst BH, and Simmons NL: Drug Absorption Limited by P-Glycoprotein-Mediated Secretory Drug Transport in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cell Layers. (1993) *Pharm. Res.*, 10(5): 743-749.
313. Prime-Chapman HM, Fearn RA, Cooper AE, Moore V, and Hirst BH: Differential Multidrug Resistance-Associated Protein 1 through 6 Isoform

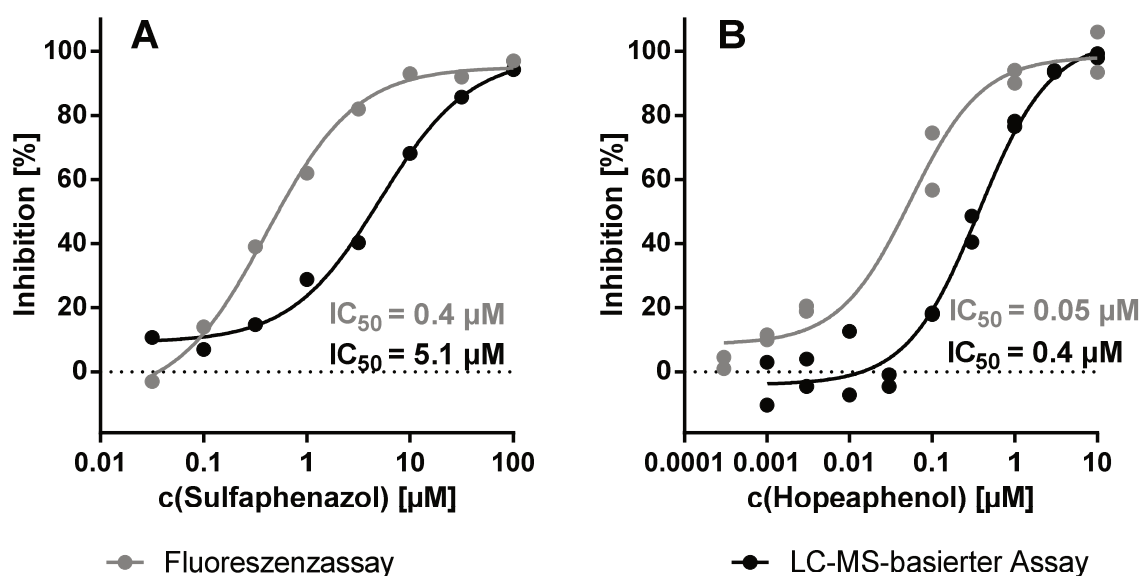
- Expression and Function in Human Intestinal Epithelial Caco-2 Cells. (2004) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 311(2): 476.
314. Walle T: Absorption and metabolism of flavonoids. (2004) *Free Radical Biol. Med.*, 36(7): 829-837.
315. Caliph SM, Cao E, Bulitta JB, Hu L, Han S, Porter CJH, and Trevaskis NL: The Impact of Lymphatic Transport on the Systemic Disposition of Lipophilic Drugs. (2013) *J. Pharm. Sci.*, 102(7): 2395-2408.
316. Trevaskis NL, Charman WN, and Porter CJH: Lipid-based delivery systems and intestinal lymphatic drug transport: A mechanistic update. (2008) *Adv. Drug Del. Rev.*, 60(6): 702-716.
317. Schmidt S, Gonzalez D, and Derendorf H: Significance of Protein Binding in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. (2010) *J. Pharm. Sci.*, 99(3): 1107-1122.
318. Trainor GL: The importance of plasma protein binding in drug discovery. (2007) *Expert Opin Drug Discov*, 2(1): 51-64.
319. Howard ML, Hill JJ, Galluppi GR, and Mclean MA: Plasma Protein Binding in Drug Discovery and Development. (2010) *Combinatorial Chem. High Throughput Screening*, 13(2): 170-187.
320. Bohnert T and Gan L-S: Plasma protein binding: From discovery to development. (2013) *J. Pharm. Sci.*, 102(9): 2953-2994.
321. Smith DA, Di L, and Kerns EH: The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. (2010) *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(12): 929-939.
322. Scheife RT: Protein Binding: What Does it Mean? (1989) *DICP*, 23(7-8): S27-S31.
323. Dangles O, Dufour C, Manach C, Morand C, and Remesy C: Binding of flavonoids to plasma proteins, in *Methods Enzymol.* 2001, Academic Press. p. 319-333.
324. Bolli A, Marino M, Rimbach G, Fanali G, Fasano M, and Ascenzi P: Flavonoid binding to human serum albumin. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 398(3): 444-449.
325. Yamine A, Gao J, and Kwan AH: Tryptophan Fluorescence Quenching Assays for Measuring Protein-ligand Binding Affinities: Principles and a Practical Guide. (2019) *Bio-protocol*, 9(11): e3253.

-
326. Waters NJ, Jones R, Williams G, and Sohal B: Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding. (2008) *J. Pharm. Sci.*, 97(10): 4586-95.
 327. Cao H, Liu X, Ulrich NP, Sengupta PK, and Xiao J: Plasma protein binding of dietary polyphenols to human serum albumin: A high performance affinity chromatography approach. (2019) *Food Chem.*, 270: 257-263.
 328. Rimac H, Debeljak Ž, Šakić D, Weitner T, Gabričević M, Vrček V, Zorc B, and Bojić M: Structural and electronic determinants of flavonoid binding to human serum albumin: an extensive ligand-based study. (2016) *RSC Advances*, 6(79): 75014-75022.
 329. Willenberg I, Brauer W, Empl MT, and Schebb NH: Development of a Rapid LC-UV Method for the Investigation of Chemical and Metabolic Stability of Resveratrol Oligomers. (2012) *J. Agric. Food. Chem.*, 60(32): 7844-7850.
 330. Willenberg I, Michael M, Wonik J, Bartel LC, Empl MT, and Schebb NH: Investigation of the absorption of resveratrol oligomers in the Caco-2 cellular model of intestinal absorption. (2015) *Food Chem.*, 167: 245-250.
 331. Yang N-C, Lee C-H, and Song T-Y: Evaluation of Resveratrol Oxidation in Vitro and the Crucial Role of Bicarbonate Ions. (2010) *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 74(1): 63-68.
 332. Boulton DW, Walle UK, and Walle T: Fate of the Flavonoid Quercetin in Human Cell Lines: Chemical Instability and Metabolism. (1999) *J. Pharm. Pharmacol.*, 51(3): 353-359.
 333. Wienkers LC and Heath TG: Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. (2005) *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(10): 825-833.
 334. Di L: The role of drug metabolizing enzymes in clearance. (2014) *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 10(3): 379-393.
 335. Zanger UM and Schwab M: Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. (2013) *Pharmacol Ther*, 138(1): 103-141.
 336. Döring B and Petzinger E: Phase 0 and phase III transport in various organs: Combined concept of phases in xenobiotic transport and metabolism. (2014) *Drug Metab. Rev.*, 46(3): 261-282.
 337. Ishikawa T: The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. (1992) *Trends Biochem. Sci.*, 17(11): 463-468.

338. Oda S, Fukami T, Yokoi T, and Nakajima M: A comprehensive review of UDP-glucuronosyltransferase and esterases for drug development. (2015) *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 30(1): 30-51.
339. Testa B, Pedretti A, and Vistoli G: Reactions and enzymes in the metabolism of drugs and other xenobiotics. (2012) *Drug Discovery Today*, 17(11): 549-560.
340. Guengerich FP: Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. (2001) *Chem. Res. Toxicol.*, 14(6): 611-650.
341. Phillips IR and Shephard EA: Drug metabolism by flavin-containing monooxygenases of human and mouse. (2017) *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 13(2): 167-181.
342. Cashman JR, Park SB, Yang ZC, Wrighton SA, Jacob P, and Benowitz NL: Metabolism of nicotine by human liver microsomes: stereoselective formation of trans-nicotine N'-oxide. (1992) *Chem. Res. Toxicol.*, 5(5): 639-646.
343. Rowland A, Miners JO, and Mackenzie PI: The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. (2013) *Int J of Biochem Cell Biol*, 45(6): 1121-1132.
344. Akerboom TP, Bilzer M, and Sies H: The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257(8): 4248-4252.
345. Zhang Z and Tang W: Drug metabolism in drug discovery and development. (2018) *Acta Pharm Sin B*, 8(5): 721-732.
346. Jancova P, Anzenbacher P, and Anzenbacherova E: Phase II Drug Metabolizing Enzymes. (2010) *Biomedical papers*, 154(2): 103-116.
347. Zhang L, Zuo Z, and Lin G: Intestinal and Hepatic Glucuronidation of Flavonoids. (2007) *Mol. Pharm.*, 4(6): 833-845.
348. Benković G, Bojić M, Maleš Ž, and Tomić S: Screening of flavonoid aglycons' metabolism mediated by the human liver cytochromes P450. (2019) *Acta Pharmaceut*, 69(4): 541-562.
349. Walle T: Methylation of Dietary Flavones Greatly Improves Their Hepatic Metabolic Stability and Intestinal Absorption. (2007) *Mol. Pharm.*, 4(6): 826-832.
350. Passamonti S, Terdoslavich M, Franca R, Vanzo A, Tramer F, Braidot E, Petrusa E, and Vianello A: Bioavailability of Flavonoids: A Review of Their

-
- Membrane Transport and the Function of Bilirubin Translocase in Animal and Plant Organisms. (2009) *Curr. Drug Metab.*, 10: 369-94.
351. Lukaszewicz Kathleen M and Lombard Julian H: Role of the CYP4A/20-HETE pathway in vascular dysfunction of the Dahl salt-sensitive rat. (2013) *Clin. Sci.*, 124(12): 695-700.
352. Schebb NH, Franze B, Maul R, Ranganathan A, and Hammock BD: In Vitro Glucuronidation of the Antibacterial Triclocarban and Its Oxidative Metabolites. (2012) *Drug Metab. Disposition*, 40(1): 25.
353. Koch E, Mainka M, Dalle C, Ostermann AI, Rund KM, Kutzner L, Froehlich LF, Bertrand-Michel J, Gladine C, and Schebb NH: Stability of oxylipins during plasma generation and long-term storage. (2020) *Talanta*, 217: 121074.
354. Ostermann AI, Koch E, Rund KM, Kutzner L, Mainka M, and Schebb NH: Targeting esterified oxylipins by LC-MS - Effect of sample preparation on oxylipin pattern. (2020) *Prostag Oth Lipid M*, 146: 106384.
355. Rund KM, Ostermann AI, Kutzner L, Galano JM, Oger C, Vigor C, Wecklein S, Seiwert N, Durand T, and Schebb NH: Development of an LC-ESI(-)-MS/MS method for the simultaneous quantification of 35 isoprostanes and isofurans derived from the major n3- and n6-PUFAs. (2018) *Anal. Chim. Acta*, 1037: 63-74.

Appendix



Appendix 1 Vergleich der Inhibitor-Potenz in zwei verschiedenen Assaysystemen. (A) der CYP-Inhibitor Sulfaphenazol und (B) das Polyphenol Hopeaphenol. Im LC-MS-basierten Assay wurde die Hemmung der CYP2C9-katalysierten EpETrE-Bildung aus Arachidonsäure durch Bestimmung von EpETrE mittels LC-MS gemessen. Im fluoreszenzbasierten Assay wurde das Fluorophor 7-Hydroxy-4-Trifluormethyl-Coumarin, ein durch CYP2C9 gebildeter Metabolit von 7-Methoxy-4-Trifluormethyl-Coumarin gemessen, um die CYP2C9-Hemmung zu evaluieren. Die Inhibition wurde anhand der Produktbildung im Vergleich zu Kontrollinkubationen berechnet. Die IC_{50} -Werte wurden durch einen Fit der Daten an eine logistische Funktion (4 Parameter) bestimmt.

Appendix 2 Produktmuster der CYP-katalysierten Oxidation von Arachidonsäure. Produktbildungsrate [fmol min⁻¹·pmol CYP⁻¹] von Oxylipinen, katalysiert durch CYP und Mikrosomen aus humaner Leber (HLM) sowie aus humanen Nierenmikrosomen (HKM). 100 µM Arachidonsäure wurde mit CYP (25 pmol CYP mL⁻¹) oder humanen Mikrosomen (0.5 mg Protein mL⁻¹) bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert. Als Cosubstrat wurde ein NADPH-generierendes System (1 mM NADPH) eingesetzt. Die Oxylipingehalte in Kontrollinkubationen ohne Cosubstrat wurden subtrahiert. Mittelwert ± Standardabweichung, n=3.

	CYP2C8	CYP2C9	CYP1C19	CYP2J2	CYP4F2	CYP4A11	CYP2E1	CYP1A1	CYP3A4	HLM	HKM ¹
14,15-DIHEPTE	320 ± 40	86 ± 18	8.8 ± 1	10 ± 1.2	-	-	86 ± 4	380 ± 140	60 ± 2	435 ± 15	0.2 ± 0.04
11,12-DIHEPTE	400 ± 40	126 ± 18	3 ± 6	14 ± 2	-	-	34 ± 2	166 ± 50	112 ± 6	185 ± 8	0.15 ± 0.05
8,9-DIHEPTE	34 ± 4	134 ± 14	38 ± 4	20 ± 2	-	-	42 ± 2	88 ± 16	146 ± 8	31 ± 0.8	0.21 ± 0.08
5,6-DIHEPTE	-	-	5.6 ± 0.2	-	-	-	-	8 ± 2	10.6 ± 0.4	4.3 ± 0.3	-
14(15)-EPETRE	1520 ± 160	2200 ± 400	1660 ± 180	52 ± 12	-	-	740 ± 60	152 ± 14	700 ± 80	14 ± 1	-
11(12)-EPETRE	1700 ± 100	1200 ± 200	680 ± 60	30 ± 4	-	-	306 ± 16	24 ± 4	840 ± 80	10.3 ± 0.3	-
8(9)-EPETRE	50 ± 4	500 ± 120	1580 ± 140	32 ± 6	-	-	62 ± 6	12.6 ± 1.8	480 ± 40	8.25 ± 0.5	-
5(6)-EPETRE	62 ± 2	160 ± 20	1360 ± 60	24 ± 2	-	-	56 ± 6	240 ± 20	960 ± 20	40 ± 5	-
20-HETE	-	-	58 ± 6	-	1000 ± 200	140 ± 30	660 ± 40	-	-	243 ± 15	11.9 ± 0.8
19-HETE	420 ± 60	460 ± 20	4800 ± 200	102 ± 18	80 ± 20	72 ± 4	4600 ± 600	5000 ± 200	74 ± 8	400 ± 25	3.5 ± 1
18-HETE	20 ± 20	30 ± 6	186 ± 4	-	-	-	540 ± 60	2400 ± 140	88 ± 4	52.5 ± 2.5	-
17-HETE	220 ± 20	-	84 ± 2	-	-	-	40 ± 4	860 ± 60	36 ± 4	11 ± 2	-
16-HETE	158 ± 6	-	13 ± 1.6	-	-	-	-	960 ± 80	164 ± 12	10.3 ± 0.8	-
15-HETE	160 ± 20	116 ± 14	168 ± 6	-	-	-	-	100 ± 14	136 ± 8	9.5 ± 1.5	-
12-HETE	106 ± 12	480 ± 40	376 ± 14	-	-	-	-	98 ± 6	106 ± 2	3.8 ± 0.5	-
11-HETE	112 ± 16	190 ± 16	80 ± 4	-	-	-	22 ± 2	62 ± 8	94 ± 6	25.8 ± 1.8	-
9-HETE	-	16 ± 4	92 ± 10	-	-	-	-	22 ± 2	180 ± 12	2.3 ± 0.8	-
8-HETE	16 ± 6	26 ± 8	92 ± 6	-	-	-	-	66 ± 10	134 ± 8	11 ± 0.5	-
5-HETE	5.4 ± 0.4	14 ± 2	182 ± 18	-	-	-	-	46 ± 4	128 ± 2	2 ± 0.3	0.34 ± 0.07

¹ pmol Produkt min⁻¹ mg Protein⁻¹

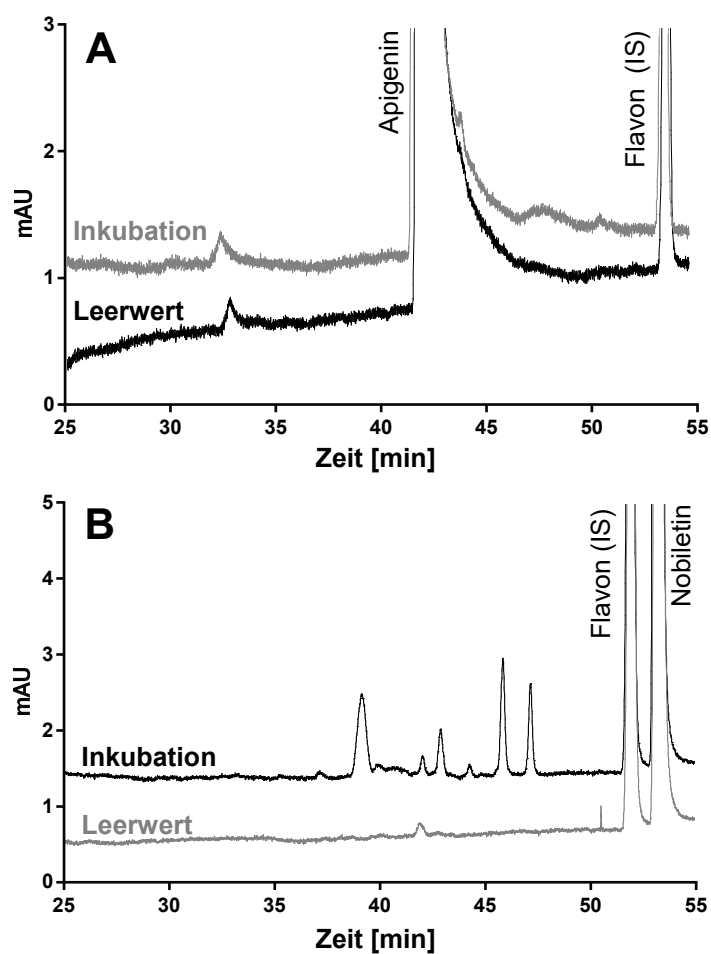
Appendix 3 Wiederfindung der Polyphenole nach Inkubation mit humanen Lebermikrosomen.^a

	λ [nm] ^b	Wiederfindung [%] ^c
Apigenin	265	> 95%
Nobiletin	248	90%
Wogonin	274	> 95%
Genistein	258	> 95%
ϵ-Viniferin	319	> 95%
Hopeaphenol	220	> 95%

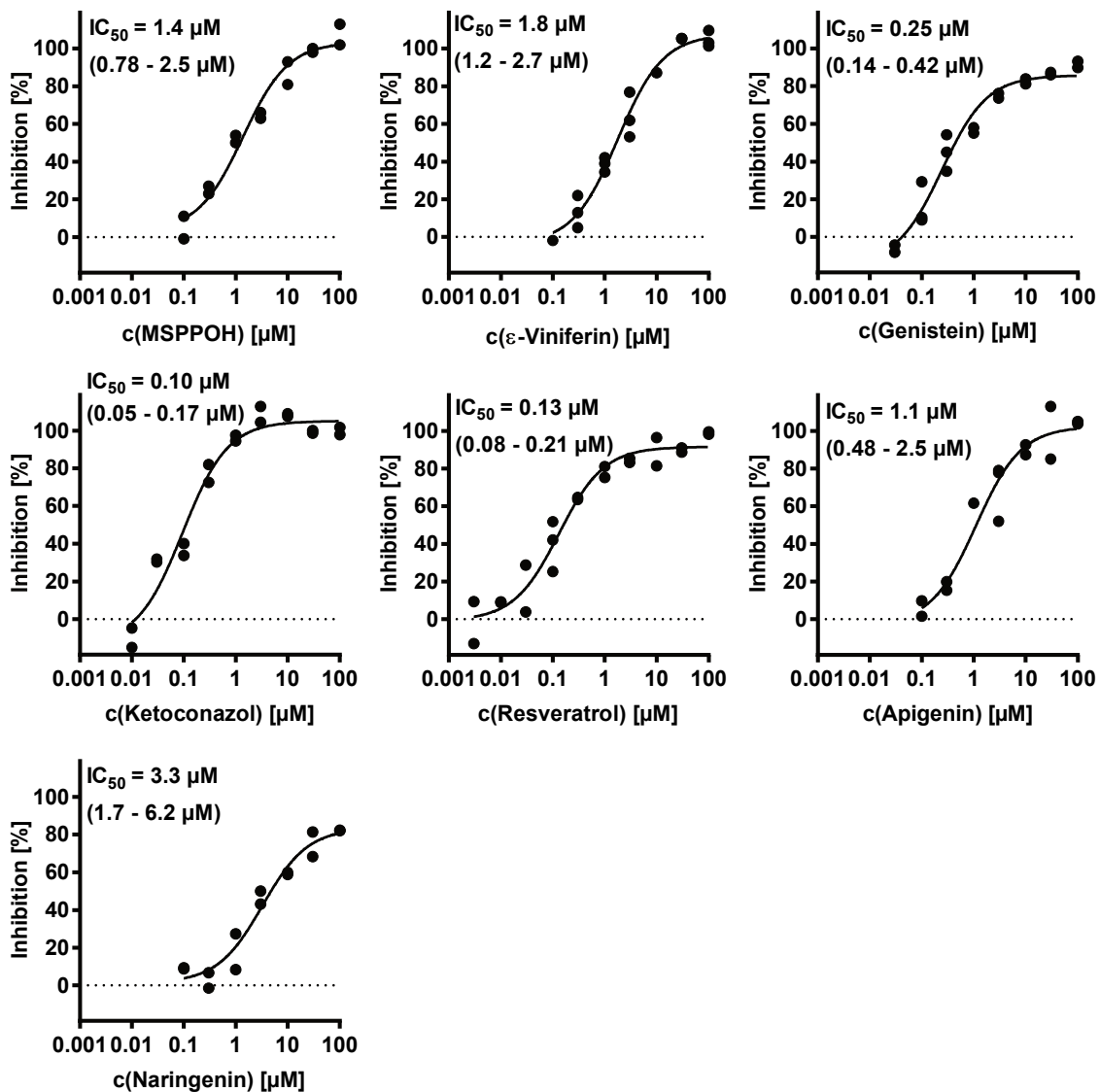
^a die Polyphenole (100 μ M) wurden jeweils mit 0.5 mg HLM Protein mL⁻¹ und NADPH-generierendem System für 20 min inkubiert.

^b Absorptionsmaximum der jeweiligen Verbindung und Wellenlänge, bei der die jeweiligen Chromatogramme ausgewertet wurden

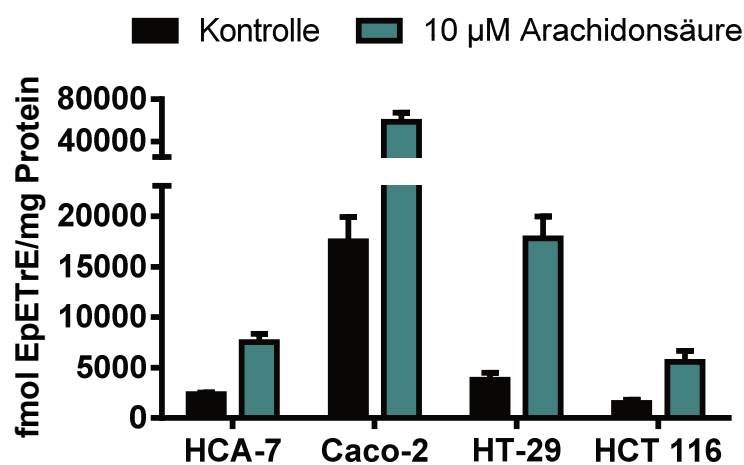
^c Bezogen auf Kontrollinkubationen ohne NADPH



Appendix 4 Metabolite von Polyphenolen nach Inkubation mit humanen Lebermikrosomen. (A) Apigenin und (B) Nobiletin. Das Polyphenol ($100 \mu\text{M}$) wurde mit humanen Lebermikrosomen (HLM, $0.5 \text{ mg Protein ml}^{-1}$) für 20 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ mit (Inkubation) und ohne (Leewert) einem NADPH-generierenden System (1 mM NADPH , 1 U mL^{-1} Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, $3.8 \text{ mM Glucose-6-Phosphat}$, 4.3 mM MgCl_2) inkubiert. Die Polyphenole wurden mit Ethylacetat extrahiert, nach Eindampfen des Extraktionsmittels in Methanol rekonstituiert und mittels LC-DAD gemessen.



Appendix 5 Inhibition der EpETrE-Bildung von CYP2J2 durch Polyphenole und CYP-Inhibitoren. 100 μM Arachidonsäure wurden mit 25 pmol CYP2J2 mL^{-1} und einem NADPH-generierenden System (1 mM NADPH) als Cosubstrat bei 37 °C für 40 min inkubiert. Die Quantifizierung der gebildeten EpETrE und DiHETrE erfolgte nach Flüssig-flüssig-Extraktion mittels LC-MS/MS. Die Inhibition wurde auf Grundlage der Produktbildung relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor berechnet. Die relativen IC_{50} -Werte wurden durch einen Fit der Daten an eine logistische Funktion (4 Parameter) bestimmt.



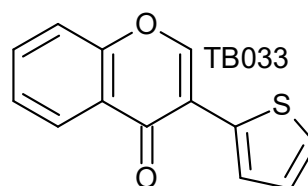
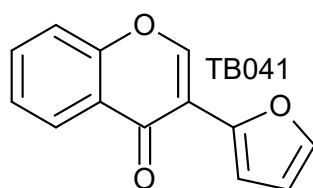
Appendix 6 EpETrE-Level in humanen Kolonkarzinomzelllinien mit und ohne Supplementierung von Arachidonsäure. $2 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 60 cm^2 -Schalen ausgesät und für 24 h kultiviert. Nach 24 h erfolgte eine Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Arachidonsäure ins Zellkulturmedium. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und pelletiert und die Gesamtoxylipine nach Hydrolyse in den Zellen mittels LC-MS/MS bestimmt. Dargestellt ist die Summe der bestimmten Gehalte von 8(9)-, 11(12)- und 14(15)-EpETrE und -DiHETrE. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 2-6$.

Appendix 7 Permeabilitätskoeffizient (P_{app}) von Polyphenolen im Caco-2-Modell. Die Resorption wurde bei einer Konzentration von $20 \mu\text{M}$ nach 1 h Inkubation bestimmt. Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 3$)

	$P_{\text{app}} [10^{-6} \text{ cm/s}]$
Apigenin	4.5 ± 1
Nobiletin	52 ± 8
wogonin	12 ± 3
Genistein	39 ± 1

Appendix 8 Isoflavonderivate mit heterozyklischen B-Ringen als CYP-Inhibitoren. Die Substanzen wurden bei einer Screeningkonzentration von 10 μM im Multienzymassay getestet. Die Inhibition wurde basierend auf der Produktbildung und relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor bestimmt (100 - % der Kontrolle; n=2). Der Selektivitätsparameter wurde berechnet als Logarithmus des Verhältnisses zwischen dem Prozentsatz der Inhibition der ω -Hydroxylierung (Mittelwert aus zwei Werten) und dem Prozentsatz der Inhibition der Epoxidierung (Mittelwert aus zwei Werten) [$\log(\text{Inhibition } \omega\text{-Hydroxylierung}/\text{Inhibition Epoxidierung})$].

Verbindung	Substituent						Inhibition [%]		
	5	6	7	2'	3'	4'	Epoxidierung	ω -Hydroxylierung	Selektivität
TB021	H	H	H	H	H	H	< 15	< 15–31	0.19
TB041	H	H	H				< 15–16	15–27	0.13
TB033	H	H	H				< 15	< 15	0.00
> 90% Inhibition der Epoxygenasen < 15%							< 15% Inhibition der ω -Hydroxylasen > 90%		
-2							Selektivität 2		



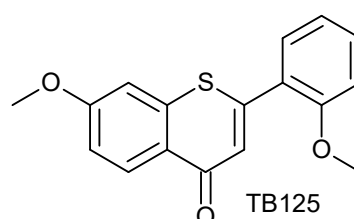
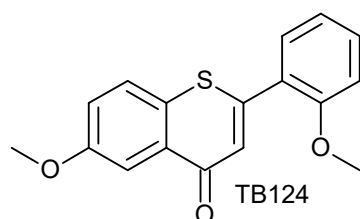
Appendix 9 Flavonderivate mit verschiedenen C2'-Substituenten als CYP-Inhibitoren. Die Substanzen wurden bei einer Screeningkonzentration von 10 μM im Multienzymassay getestet. Die Inhibition wurde basierend auf der Produktbildung und relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor bestimmt (100 - % der Kontrolle; n=2). Der Selektivitätsparameter wurde berechnet als Logarithmus des Verhältnisses zwischen dem Prozentsatz der Inhibition der ω -Hydroxylierung (Mittelwert aus zwei Werten) und dem Prozentsatz der Inhibition der Epoxidierung (Mittelwert aus zwei Werten) [$\log(\text{Inhibition } \omega\text{-Hydroxylierung}/\text{Inhibition Epoxidierung})$].

Verbindung	Substituent						Inhibition [%]			
	5	6	7	2'	3'	4'	Epoxidierung	ω -Hydroxylierung	Selektivität	
TB067	H	OMe	H	OMe	H	H	45–57	< 15–32	-0.34	
TB130	H	OMe	H	OEt	H	H	39–48	20–34	-0.21	
TB133	H	OMe	H	OiPr	H	H	43–51	22–21	-0.34	
TB126	H	OMe	H	CF ₃	H	H	42–53	< 15–21	-0.42	
TB114	H	OMe	H	OCF ₃	H	H	50–54	23–28	-0.32	
TB073	H	H	OMe	OMe	H	H	56–60	21–25	-0.40	
TB131	H	H	OMe	OEt	H	H	47–52	< 15–19	-0.46	
TB134	H	H	OMe	OiPr	H	H	47–53	19–22	-0.39	
TB127	H	H	OMe	CF ₃	H	H	26–34	40–44	0.15	
TB118	H	H	OMe	OCF ₃	H	H	42–54	21–32	-0.26	
> 90% Inhibition der Epoxygenasen < 15%							< 15% Inhibition der ω -Hydroxylasen > 90%			
-2							Selektivität			2

Appendix 10 Thioflavone als CYP-Inhibitoren. Die Substanzen wurden bei einer Screeningkonzentration von 10 μM im Multienzymassay getestet. Die Inhibition wurde basierend auf der Produktbildung und relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor bestimmt (100 - % der Kontrolle; n=2). Der Selektivitätsparameter wurde berechnet als Logarithmus des Verhältnisses zwischen dem Prozentsatz der Inhibition der ω -Hydroxylierung (Mittelwert aus zwei Werten) und dem Prozentsatz der Inhibition der Epoxidierung (Mittelwert aus zwei Werten) [$\log(\text{Inhibition } \omega\text{-Hydroxylierung}/\text{Inhibition Epoxidierung})$].

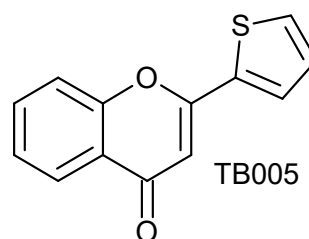
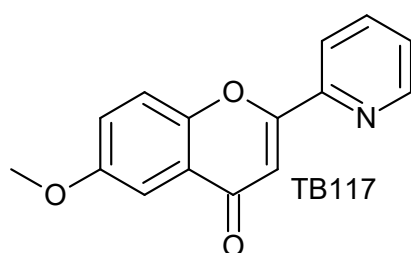
Verbindung	Substituent						Inhibition [%]		
	5	6	7	2'	3'	4'	Epoxidierung	ω -Hydroxylierung	Selektivität
TB067 (F)	H	OMe	H	OMe	H	H	45–57	< 15–32	-0.34
TB124 (T)	H	OMe	H	OMe	H	H	53–56	15–34	-0.35
TB073 (F)	H	H	OMe	OMe	H	H	56–60	21–25	-0.40
TB125 (T)	H	H	OMe	OMe	H	H	55–67	30–38	-0.25
> 90% Inhibition der Epoxygenasen < 15%							< 15% Inhibition der ω-Hydroxylasen > 90%		
-2							Selektivität 2		

F: Flavon; T=Thioflavon



Appendix 11 Flavonderivate mit heterozyklischen B-Ringen als CYP-Inhibitoren. Die Substanzen wurden bei einer Screeningkonzentration von 10 μM im Multienzymassay getestet. Die Inhibition wurde basierend auf der Produktbildung und relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor bestimmt (100 - % der Kontrolle; n=2). Der Selektivitätsparameter wurde berechnet als Logarithmus des Verhältnisses zwischen dem Prozentsatz der Inhibition der ω -Hydroxylierung (Mittelwert aus zwei Werten) und dem Prozentsatz der Inhibition der Epoxidierung (Mittelwert aus zwei Werten) [$\log(\text{Inhibition } \omega\text{-Hydroxylierung}/\text{Inhibition Epoxidierung})$].

Verbindung	Substituent						Inhibition [%]		Selektivität
	5	6	7	2'	3'	4'	Epoxidierung	ω -Hydroxylierung	
TB003	H	H	H	H	H	H	< 15	< 15	0.00
TB065	H	OMe	H	H	H	H	16–18	< 15	-0.05
TB005	H	H	H				< 15	< 15	0.00
TB117	H	OMe	H				< 15	< 15	0.00
> 90% Inhibition der Epoxygenasen < 15%							< 15% Inhibition der ω-Hydroxylasen > 90%		
-2							Selektivität		2

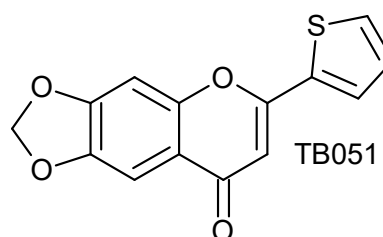
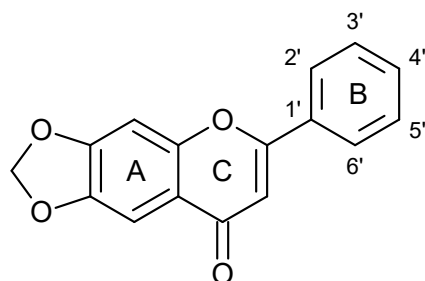


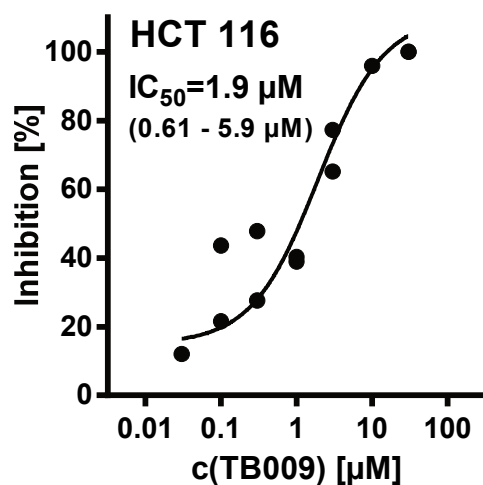
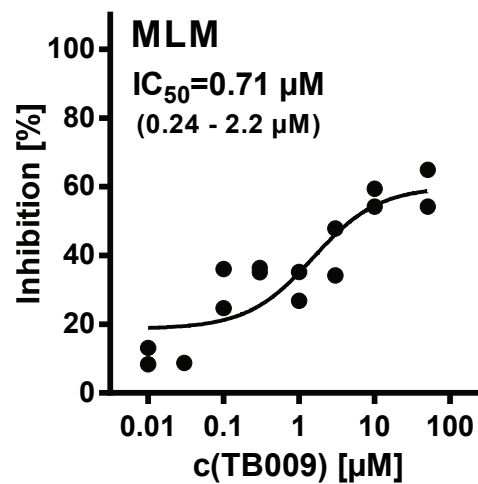
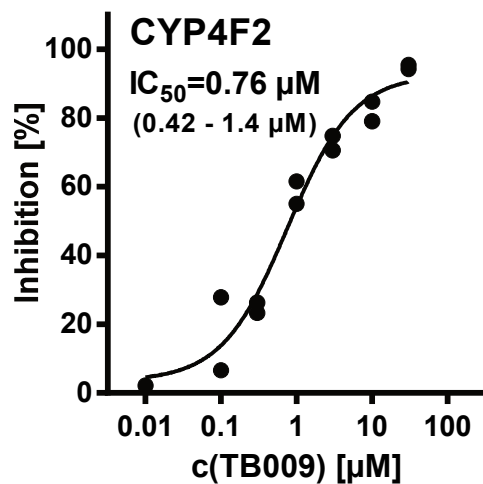
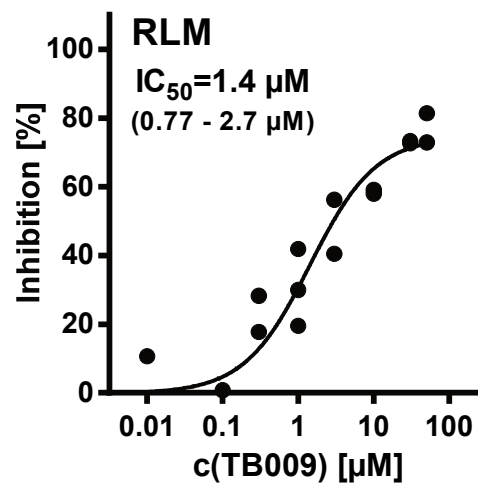
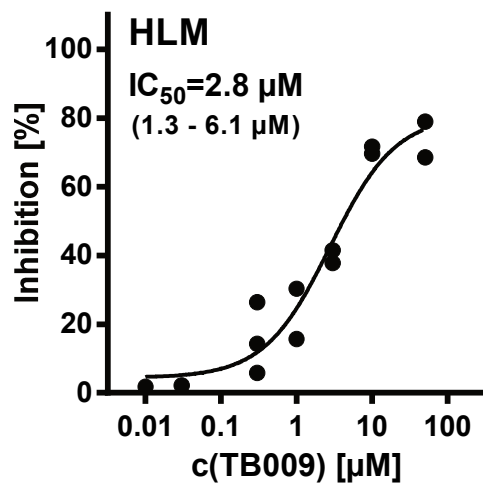
Appendix 12 Flavonderivate mit verschiedenen C7-Substituenten als CYP-Inhibitoren. Die Substanzen wurden bei einer Screeningkonzentration von 10 μ M im Multienzymassay getestet. Die Inhibition wurde basierend auf der Produktbildung und relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor bestimmt (100 - % der Kontrolle; n=2). Der Selektivitätsparameter wurde berechnet als Logarithmus des Verhältnisses zwischen dem Prozentsatz der Inhibition der ω -Hydroxylierung (Mittelwert aus zwei Werten) und dem Prozentsatz der Inhibition der Epoxidierung (Mittelwert aus zwei Werten) [$\log(\text{Inhibition } \omega\text{-Hydroxylierung}/\text{Inhibition Epoxidierung})$].

Verbindung	Substituent						Inhibition [%]		
	5	6	7	2'	3'	4'	Epoxidierung	ω -Hydroxylierung	Selektivität
TB119	H	H	OMe	H	OMe	H	47–52	< 15–30	-0.34
TB072	H	H	OMe	H	H	OMe	30–42	27–35	-0.06
TB074	H	H	OMe	H	OMe	OMe	22–31	< 15	-0.25
TB076	H	H	OMe	H	H	Br	24–28	37–39	0.16
TB075	H	H	OMe	H	H	CF ₃	43–44	73–79	0.24
TB078	OMe	OMe	OMe	H	H	OMe	26–31	57–58	0.30
TB082	OMe	OMe	OMe	H	OMe	OMe	< 15	< 15–19	0.05
TB080	OMe	OMe	OMe	OMe	H	H	24–36	20–30	0.00
TB083	OMe	OMe	OMe	H	H	Br	21–28	52–62	0.37
TB097	H	H	OH	H	H	OH	50–53	24–32	-0.26
TB100	H	H	OH	H	OH	OH	45–58	< 15	-0.54
> 90% Inhibition der Epoxygenasen < 15%							< 15% Inhibition der ω -Hydroxylasen > 90%		
-2							Selektivität 2		

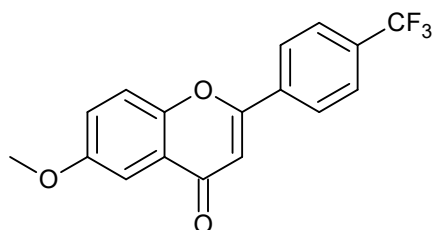
Appendix 13 Dioxolverbindungen als CYP-Inhibitoren. Die Substanzen wurden bei einer Screeningkonzentration von 10 μM im Multienzymassay getestet. Die Inhibition wurde basierend auf der Produktbildung und relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor bestimmt (100 - % der Kontrolle; n=2). Der Selektivitätsparameter wurde berechnet als Logarithmus des Verhältnisses zwischen dem Prozentsatz der Inhibition der ω -Hydroxylierung (Mittelwert aus zwei Werten) und dem Prozentsatz der Inhibition der Epoxidierung (Mittelwert aus zwei Werten) [$\log(\text{Inhibition } \omega\text{-Hydroxylierung}/\text{Inhibition Epoxidierung})$].

Verbindung	Substituent			Inhibition [%]		Selektivität	
	2'	3'	4'	Epoxidierung	ω -Hydroxylierung		
TB044	H	H	H	20–24	< 15	-0.17	
TB047	OMe	H	H	45–50	< 15–20	-0.43	
TB046	H	H	OMe	< 15	< 15	0.00	
TB053	H	H	Br	19–35	50–59	0.31	
TB049	H	H	CF ₃	< 15	< 15–27	0.15	
TB048	H	OMe	OMe	30–41	31–43	0.02	
TB051				30–38	< 15	-0.36	
> 90% Inhibition der Epoxygenasen				< 15%	< 15%	Inhibition der ω -Hydroxylasen	> 90%
-2				Selektivität		2	





Appendix 14 Inhibition der 20-HETE-Bildung durch TB009 in verschiedenen Testsystemen. Die Inhibition wurde auf Grundlage der Produktbildung relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor berechnet. Die relativen IC_{50} -Werte wurden durch einen Fit der Daten an eine logistische Funktion (4 Parameter) bestimmt.

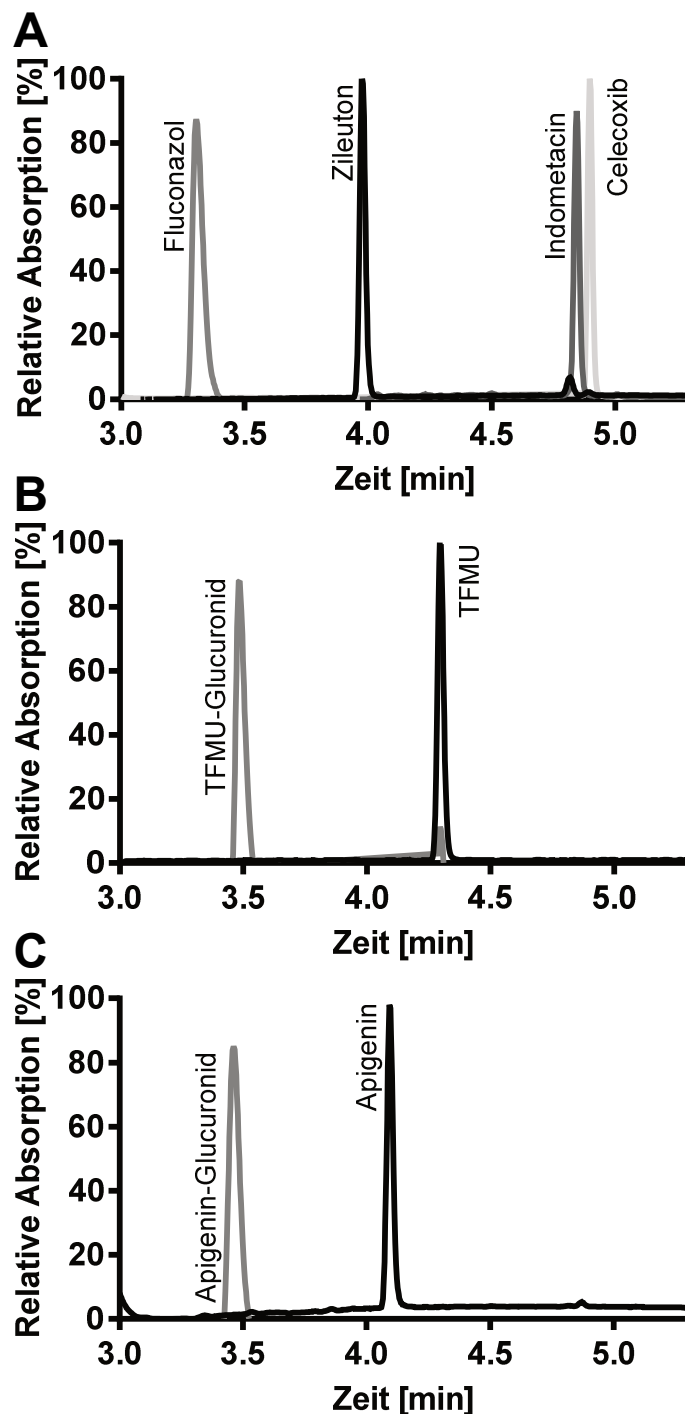
Appendix 15 Inhibitorische Potenz des synthetischen Flavonoids TB069.^a

	relativer IC ₅₀ [µM] (95% CI) ^b	absoluter IC ₅₀ [µM] (95% CI) ^c
Humane Lebermikrosomen	1.2 (0.69 - 2.0)	2.3 (1.5 - 3.5)
CYP4F2	0.44 (0.30 - 0.64)	1.2 (0.76 - 1.9)
CYP4A11	50 µM: <15% Inhibition	
CYP2J2	50 µM: <15% Inhibition	
Rattenlebermikrosomen	0.82 (0.32 - 2.1)	19 (7.8 - 48)

^a Inkubationen von Mikrosomen, Enzymen und HCT 116 Zellen mit Arachidonsäure und die quantitative Bestimmung der Oxidationsprodukte erfolgte wie in den Kapiteln 3 und 8 beschrieben. Die Dosisabhängigkeit der Inhibition der Produktbildung wurde in einem Konzentrationsbereich von 0.01 bis 50 µM des Inhibitors bestimmt. Die Inhibition wurde auf Grundlage der Produktbildung relativ zu Kontrollinkubationen ohne Inhibitor berechnet (100 - % der Kontrolle).

^b Wendepunkt der Dosis-Wirkungskurve nach Fit der Daten an eine logistische Funktion (4 Parameter).

^c Konzentration, bei der 50% Inhibition der maximalen Produktbildung erreicht wird.



Appendix 16 Anwendungsbereiche der online-SPE-Methode Neben der Analytik von Flavonoiden ermöglicht die online-Festphasenextraktion auch die Analyse verschiedener Pharmaka (**A**) und ist ein hilfreiches Werkzeug für Metabolismus-Studien: Da nicht nur Standardsubstrate zur Untersuchung des Phase-II Metabolismus wie 4-(Trifluormethyl)-umbelliferon (TFMU) erfasst werden, sondern auch ein weiterer Peak nach der Inkubation dieser Substanz mit HLM und UDPGA; dem Cosubstrat von Glucuronosyltransferasen zu detektieren ist (**B**). Aufgrund der Retentionszeit und des nahezu identischen Absorptionsspektrums ist zu vermuten, dass es sich hierbei um das glucuronidierte TFMU handelt. Auch ein (wahrscheinliches) Glucuronid von Apigenin wird nach entsprechender Inkubation detektiert (**C**).

Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Version dieser Dissertation nicht enthalten.

Publikationen

VERÖFFENTLICHUNGEN IN WISSENSCHAFTLICHEN ZEITSCHRIFTEN

N. Kampschulte, T. Berking, I.E. Çelik, S.F. Kirsch, N. H. Schebb (2022) Inhibition of cytochrome P450 monooxygenase catalyzed oxylipin formation by flavonoids: Evaluation of structure-activity relationship towards CYP4F2-selective inhibitors. Eur J Med Chem, 238, 114332

M. Mainka, S. George, C. Angioni, R. Ebert, T. Goebel, N. Kampschulte, A. Krommes, D. Thomas, N. H. Schebb, D. Steinhilber, A. S. Kahnt (2022) On the biosynthesis of specialized pro-resolving mediator in human neutrophils and the influence of cell integrity. BBA Lipids, 1867, 159093

K. L. Gützkow, J. Ebmeyer, N. Kröncke, N. Kampschulte, L. Böhmert, C. Schöne, N. H. Schebb, R. Benning, A. Bräuning, R. Maul (2021) Metabolic fate and toxicity reduction of aflatoxin B1 after uptake by edible *Tenebrio molitor* larvae. Food Chem Toxicol 155, 112375

E. Koch, M. Wiebel, C. Hopmann, N. Kampschulte, N. H. Schebb (2021) Rapid quantification of fatty acids in plant oils and biological samples by LC-MS. Anal Bioanal Chem 413, 5439–5451

N. Kampschulte, A. Alasmer, M. Empl, M. Krohn, P. Steinberg, N. H. Schebb (2020) Dietary polyphenols inhibit the Cytochrome P450 Monooxygenase branch of the arachidonic acid cascade with remarkable structure-dependent selectivity and potency. J Agric Food Chem 68 (34) 9235–9244

M. Mainka, C. Dalle, M. Pétéra, J. Dalloux-Chioccioli, N. Kampschulte, A. I. Ostermann, M. Rothe, J. Bertrand-Michel, J. W. Newman, C. Gladine, N. H.

PUBLIKATIONEN

Schebb (2020) Harmonized procedures lead to comparable quantification of total oxylipins across laboratories. *J Lipid Res* 61 (11), 1424–1436

N. M. Hartung, M. Mainka, N. Kampschulte, A. I. Ostermann, N. H. Schebb (2019) A strategy for validating concentrations of oxylipin standards for external calibration. *Prostag Oth Lipid M* 141, 22–24

WEITERE PUBLIKATIONEN

N. Kampschulte, N. H. Schebb (2021) Wie wirken Obst und Gemüse auf die Gesundheit? – Inhibition der CYP-katalysierten Bildung von Lipidmediatoren als möglicher neuer Mechanismus der gesundheitlichen Wirkung von Polyphenolen. *Lebensmittelchemie* 75: 47-51.

VORTRÄGE

N. Kampschulte (2019) Untersuchung zur Inhibition der CYP-abhängigen Oxylipinbildung mittels LC-MS basierter Targeted Metabolomics. 29. Doktorandenseminar des AK Separation Sciences der Fachgruppe Analytische Chemie der Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh), Hohenroda, DE

POSTERPRÄSENTATIONEN

N. Kampschulte, A. Alasmer, M. Bedenbender, N. H. Schebb (2019) CYP dependent oxylipin formation and inhibition by polyphenols in cells and cell free systems. 48. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, DE

A. Alasmer, N. Kampschulte, N.H. Schebb (2019) Investigating the inhibition of the third branch of the arachidonic acid cascade by dietary polyphenols. 48. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Dresden, DE

N. Kampschulte, M. Bedenbender, N.H. Schebb **(2019)** CYP-catalyzed oxylipin formation and its modulation by food polyphenols. Regionalverbandstagung LChG NRW, Wuppertal, DE

M. Mainka, N. M. Hartung, N. Kampschulte, A. I. Ostermann, N.H. Schebb **(2018)** Is in, what's on? – Verification of concentrations of commercially available standards for quantification of oxylipins. 47. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin, DE

N. Kampschulte, M. Steuck, N.H. Schebb **(2018)** Modulation of epoxy- and hydroxy-PUFA formation by food polyphenols. 47. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin, DE

M. Mainka, N. M. Hartung, N. Kampschulte, A. I. Ostermann, N.H. Schebb **(2018)** Challenges in absolute quantification of oxylipins – a strategy for the preparation of standard series and verification of concentrations. 7. European Workshop on Lipid Mediators, Brüssel, BE

N. Kampschulte, M. Steuck, N.H. Schebb **(2018)** Food polyphenols inhibit the CYP-dependent formation of epoxy and hydroxy fatty acids *in vitro*. 7. European Workshop on Lipid Mediators, Brüssel, BE

N. Kampschulte, M. Steuck, T. Konrad, M. T. Empl, N.H. Schebb **(2018)** Inhibition of the CYP branch of the arachidonic acid cascade by food polyphenols. 17. Winter Eicosanoid Conference, Baltimore, US

N. Kampschulte, T. Konrad, N.H. Schebb **(2017)** Inhibitory effects of food polyphenols on the CYP branch of the arachidonic acid cascade. 46. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Würzburg, DE

N. Kampschulte, T. Konrad, M. Steuck, N.H. Schebb **(2017)** Food Polyphenols Inhibit the Cytochrome-P450 Monooxygenase Dependent Formation of Hydroxy- and Epoxy-Fatty Acids *in vitro*. Regionalverbandstagung LChG NRW, Münster, DE

N. Kampschulte, T. Konrad, M. Steuck, S. Hellhake, N.H. Schebb **(2017)** Effects of food polyphenols on the cytochrome-P450 dependent formation of epoxy- and hydroxy-fatty acids from poly unsaturated fatty acids. Lipid Mediators in Ageing and Disease: A Biochemical Society Focused Meeting, Birmingham, GB

T. Konrad, N. Kampschulte, M. Steuck, S. Hellhake, N.H. Schebb **(2016)** Inhibition of cytochrome-P450 dependent formation of hydroxy and epoxy fatty acids by food polyphenols. 6. European Workshop on Lipid Mediators, Frankfurt, DE

Danksagung

Allen Menschen, die mich in meiner Zeit als Doktorandin begleitet oder mich dort hingeführt haben, möchte ich herzlich danken. Die Unterstützung von Kolleg*innen und Freund*innen war ein unschätzbare Beitrag zur Erforschung der *Cypanoids* und zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. Nils Helge Schebb für die Möglichkeit, die interessante Fragestellung dieser Dissertation in seinem Arbeitskreis zu bearbeiten. Ich bin dankbar für die stets konstruktive und motivierende fachliche Betreuung ebenso wie für die vielfältigen Möglichkeiten, die mir eröffnet wurden und den Freiraum, verschiedenste Techniken ausprobieren zu können.

Prof. Dr. Julia Bornhorst danke ich für ihre zahlreichen praktischen Tipps zum Arbeiten mit Zellkulturen und so vielen anderen Dingen, ebenso wie für die Begutachtung dieser Arbeit.

Für die Zusammenarbeit im Bereich der Struktur-Wirkungsbeziehung möchte ich mich bei Prof. Dr. Stefan F. Kirsch bedanken. Die Diskussionen rund um dieses Thema haben mir stets neue Blickwinkel eröffnet. Ein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang auch Tim Berking, dessen Syntheseprodukte ein Grundstein dieser Arbeit sind. Danke für deine Produkte, dein Engagement und die konstruktiven Gespräche.

Ich danke Manuela Bedenbender, Ayah Alasmer und Veronika Latka für ihre Unterstützung im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlussarbeiten: Manuela Bedenbender dafür, dass sie mit mir in die für uns neue Welt der Zellkultur eingetaucht ist, Ayah Alasmer für die umfassende Mitarbeit bei der Charakterisierung der Inhibition der CYP durch natürliche Polyphenole und

Veronika Latka für die Charakterisierung der Zellkulturassays. Ich hoffe, ihr konntet mindestens genau so viel von mir lernen, wie ich von euch.

Malwina Mainka, ich bin dankbar für unsere *kompetente* Zusammenarbeit in all den Jahren – es war mir stets ein Vergnügen. Ich danke dir für jedes geteilte Stück Schokolade, für die Expertise bei allen Fragen zur jedweden Kalibrierreihen und Analyten und F*****n, für jede einzelne Musik-, Quatsch- oder Prokrastinationspause, und für das Teilen deiner Zimmerpflanzen. Ich hoffe, sie bleiben mir noch lange erhalten.

Dr. Katharina Rund (oder Rind?), ich danke dir von Herzen für deinen so hilfreichen Input bei so vielen Dingen, deine zahlreichen, manchmal unkonventionellen Ideen und deinen umfassenden Blick auf Herausforderungen. Unsere Bastel- und Schraub-Aktionen (besonders die, die abends etwas länger gedauert haben) werde ich nie vergessen. Danke für deinen steten Support und dein immer offenes Ohr. Einige der Dinge, die du aufbewahrt hast, werden mir sicher noch nützlich sein. Du warst eine wunderbare Mitbewohnerin in unserer Chaos-WG und ein wertvoller Gegenpol meiner Ungeduld. Ein Teil des Dankes sollte wohl auch an Matthias gehen, der so oft auf dich verzichten musste, weil ich etwas von deiner Zeit beanspruchte.

Elisabeth Koch, für deine vielen schlechten und nicht ganz so vielen guten Einflüsse möchte danken. Noch mehr aber dafür, dass du ab und an über meine Witze lachst. Danke für die zahllosen hilfreichen Gespräche und dein Anpacken – nicht nur beim Entsorgen von Dingen. Beim Schreiben von Papern warst du ein echtes Vorbild. Ich danke dir auch dafür, dass du mir bei der gemeinsamen Arbeit im Labor gezeigt hast, wie man eine seriös pfuschende Wissenschaftlerin ist und dass du unsere Musikpausen stets inhaltlich zu gestalten wusstest.

Nicole Hartung sei gedankt für das Teilen ihrer Expertise in so vielen Dingen: Proteomics, riesige Exceltabellen, F*****n, Spartipps oder Ästhetik – bei allen Themen hast du ein offenes Ohr und Antworten gehabt. Ganz besonders aber danke ich dir für die endlose Inspiration!

Des Weiteren möchte ich Dr. Laura Kutzner danken für Ihre Unterstützung bei meiner Arbeit. Sie hat immer Rat gewusst und mit ihrem kritischen Blick viele Herausforderungen lösen können – auch später am Abend.

Liebeskartoffel an alle Hannis und Wuppis!

Ein weiterer großer Dank gilt Dr. Stefan Hellhake für seine sehr nützlichen Tipps und Einblicke in Geräte und Technik(en). Auch allen weiteren – früheren und aktuellen – Mitgliedern des „Schebb Labs“ sowie der AGB (wofür das B auch immer stehen mag) möchte ich Danke sagen: Sie alle haben mit kleinen und großen Dingen zu der wunderbaren Arbeitsatmosphäre in ‚der Lebensmittelchemie‘ beigetragen. Insbesondere danke ich Claudia Steinhage, Sabine Scalet und Dieter Riegel: Ihr habt mich stets mit dem notwendigen Kaffee und der noch notwendigeren Schokolade versorgt, etwas System und Ordnung in meine Arbeit gebracht, standet mir bei bürokratische Herausforderungen und zahlreichen Beschaffungen zur Seite, und habt nicht zuletzt jeden Tag mit einer freundlichen Begegnung bereichert.

Die familiäre und offene Atmosphäre der Uni Wuppertal und der Fachgruppe Chemie und Biologie habe ich stets genossen: Die Bekanntschaften zwischen den Arbeitskreisen und die damit verbundenen kurzen und langen Gespräche auf dem Flur, im Aufzug, auf dem Weg in die Mensa, beim Pizzaessen im Büro oder bei Bier auf dem Flügel-Hügel waren stets eine Bereicherung. Ich bin dankbar dafür, dass ich ein Teil davon sein konnte. Auch die vielen großen und kleinen Hilfestellungen in fachlichen sowie praktischen Belangen waren unersetzlich. Ich möchte allen Danke sagen, die dazu beigetragen haben.

Mein letzter und wichtigster Dank gilt meiner Familie und meinen Freund*innen: Euch allen danke ich von Herzen für die wundervolle Zeit außerhalb der Uni, auch wenn diese manchmal knapp bemessen wurde. Ganz besonders danke ich meinen Eltern Susanne und Ralf und meiner Schwester Anna Katharina für die bedingungslose Unterstützung und endlose Geduld in den letzten Jahren – ach, eigentlich schon immer. Und Simon: danke, dass du da bist.

Alexandra E. soll an dieser Stelle nicht ungenannt bleiben, da sie mir stets Zugang zur Wissenschaft ermöglicht hat. Ich danke ihr für ihren Einsatz.

