

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Abteilung Klinische Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Molekularbiologische Untersuchungen zur
polymorphen Expression von Cytochrom P450 3A5
in der humanen Niere**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefanie Seeberg

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. R. Kreuz
 2. Prof. Dr. med. M. van der Giet
 3. Prof. Dr. med. L. Wojnowski

Datum der Promotion: 01.02.2013

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Enzymsystem Cytochrom P450.....	1
1.2 Die Subfamilie CYP3A.....	2
1.2.1 Expression der Gene <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A7</i> und <i>CYP3A43</i>	3
1.2.2 Die polymorphe Expression von <i>CYP3A5</i>	5
1.3 Einfluss des <i>CYP3A5</i> *1/*3-Polymorphismus auf die Blutdruckregulation	9
1.3.1 Arterielle Hypertonie	9
1.3.2 <i>CYP3A5</i> und Blutdruck beim Menschen – Assoziationsstudien	11
1.3.3 Molekulare Wirkungsmechanismen – Hypothesen	13
1.3.3.1 6 β -Hydroxycortisol-Hypothese.....	14
1.3.3.2 Hypothese vom Mineralokortikoidrezeptorschutz	15
1.3.3.3 Interaktionshypothese <i>CYP3A5</i> – <i>ABCB1</i>	16
1.4 Ziele der Arbeit	18
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Materialliste und Bezugsquellen	20
2.1.1 Verbrauchsmaterial.....	20
2.1.2 Chemikalien	21
2.1.3 Gebrauchsfertig gemischte Reagenzien und Enzyme	24
2.1.4 Puffer, Gele, Lösungen	24
2.1.5 Kits/Sets.....	26
2.1.6 Geräte.....	26
2.1.7 Software.....	28
2.2 Untersuchte Gewebe	29
2.2.1 Urologische Patienten.....	29
2.2.2 Kommerziell erworbene Gewebe.....	29

2.3	Genotypisierung der DNA	30
2.3.1	DNA-Isolierung	30
2.3.2	Genotypisierung mittels TaqMan [®] -SNP-Assay	30
2.3.2.1	Design des Assays für den CYP3A5*1/*3-Polymorphismus	31
2.3.2.2	<i>Pre-designed Assays</i>	32
2.3.3	Direkte Sequenzierung	33
2.4	Quantifizierung der mRNA	35
2.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA	35
2.4.2	Reverse Transkription.....	35
2.4.3	Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion	36
2.4.4	Quantitative Realtime-PCR.....	37
2.4.4.1	Verwendung spezifischer TaqMan [®] -Sonden	38
2.4.4.2	Verwendung des DNA-Farbstoffs SYBR [®] Green.....	39
2.4.4.3	Quantitative Datenanalyse.....	40
2.5	Lokalisierung des Proteins CYP3A5	42
2.5.1	Western blots zur Untersuchung der Antikörperspezifität	42
2.5.1.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	43
2.5.1.2	Western-/ Immunoblot	44
2.5.2	Immunhistochemie.....	45
2.5.2.1	Immunhistochemische Anfärbung von Gefrierschnitten.....	45
2.5.2.2	Immunhistochemische Anfärbung von Paraffinschnitten	46
2.6	Statistische Auswertung der Daten.....	46
3.	ERGEBNISSE.....	47
3.1	Klinische Daten der Kohorte	47
3.2	CYP3A5*1/*3-Genotypverteilung in den humanen Nieren	48
3.3	Phänotypische Analysen.....	50
3.3.1	Genexpressionsanalyse CYP3A5.....	50

3.3.2	Genexpressionsanalysen für CYP3A4, ENaC α und SGK1.....	51
3.3.2.1	CYP3A4.....	51
3.3.2.2	ENaC α	53
3.3.2.3	SGK1.....	54
3.3.3	Detektion von CYP3A5-Protein mittels Immunhistochemie.....	56
3.3.3.1	Spezifität der verwendeten Antikörper.....	56
3.3.3.2	Nachweis von CYP3A in der Leber.....	58
3.3.3.3	Nachweis von CYP3A5 in der Niere.....	59
3.4	Haplotypanalysen.....	63
3.4.1	Haplotypanalyse eines CYP3A-Blocks.....	63
3.4.2	Haplotypanalyse ABCB1.....	66
4.	DISKUSSION.....	68
4.1	Genotyp-Phänotyp-Assoziation von CYP3A5 in der humanen Niere.....	68
4.1.1	Klinische Daten unserer Kohorte.....	68
4.1.2	Allelfrequenz und Genotypverteilung im Untersuchungskollektiv.....	68
4.1.3	Genotypenabhängige Expression der CYP3A5-mRNA.....	69
4.1.4	Quantifizierung der CYP3A4-mRNA.....	75
4.1.5	Haplotypenblock CYP3A.....	77
4.2	Hypothesen der CYP3A5-Wirkung auf die Blutdruckregulation in der Niere....	79
4.2.1	Einfluss des CYP3A5-Genotyps auf den Mineralokortikoidrezeptor.....	79
4.2.2	Einfluss von ABCB1 auf die CYP3A5-mRNA-Expression.....	83
4.2.3	Differenzen im renalen Expressionsmuster von CYP3A5.....	85
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	88

6. LITERATURVERZEICHNIS.....	90
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	103
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	108
9. TABELLENVERZEICHNIS	110
10.PROTOKOLLVERZEICHNIS.....	111
VERÖFFENTLICHUNGEN.....	112
LEBENS LAUF	113
DANKSAGUNG	114
ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	115

1. Einleitung

1.1 Das Enzymsystem Cytochrom P450

Die Entdeckung und Benennung des Cytochrom P450-Enzymsystems (CYP) geht zurück auf Martin Klingenberg, der 1958 in spektrophotometrischen Untersuchungen anhand von Mikrosomenpräparationen aus Rattenlebern feststellte, dass ein bis dahin unbekanntes CO-bindendes Pigment bei UV-Anregung ein Absorptionsmaximum bei 450 nm zeigt (1). In den nächsten Jahren folgten neue Erkenntnisse bezüglich der Struktur, wie die Identifikation als Hämprotein, sowie der Funktion im Fremdstoffmetabolismus (2, 3). Für den Menschen sind mittlerweile 57 sequenzierte CYP-Gene bekannt, die in 18 verschiedene Familien und 44 Subfamilien eingeteilt sind (4). Die Einteilung folgt dabei der Homologie der Aminosäuresequenz: ab einer Übereinstimmung von 40% erfolgt die Zuordnung zu einer Familie, bei mehr als 55% zur gleichen Subfamilie. Dabei folgen dem Kürzel CYP eine arabische Ziffer, die die Familie bezeichnet, ein lateinischer Buchstabe für die Subfamilie sowie die arabische Ziffer für das einzelne Isoenzym (5). Die Benennung unterschiedlicher allelischer Varianten eines CYP-Gens erfolgt mittels einer mit einem Stern versehenen Nummer gemäß den Richtlinien des *Human P450 Allele Nomenclature Committee*, online zugänglich unter <http://www.cypalleles.ki.se/> (6). Cytochrom P450-Proteine bestehen insgesamt aus etwa 500 Aminosäuren (aa), wobei ein Cysteinmolekül nahe des Carboxyterminus den essentiellen Thiolliganden des Häm-Eisenions im aktiven Zentrum des Enzyms liefert (7). Mit dem Aminoterminus, der reich an hydrophoben Aminosäuren ist, sind die Proteine an der zytosolischen Seite der Membranen des endoplasmatischen Retikulums, des Zellkerns und der Mitochondrien verankert (7). Als mischfunktionelle Oxidasen sind sie in Verbindung mit dem Kofaktor NADPH sowie einer NADPH-P450-Reduktase zu 75% für die oxidative Phase I-Metabolisierung der Leber verantwortlich (8). Weiterhin sind sie sowohl für den Abbau endogener Stoffwechselprodukte, darunter Steroidhormone und Fettsäuren, als auch für die Synthese von Prostaglandinen, Steroidhormonen und Gallensäuren essentiell (4).

1.2 Die Subfamilie CYP3A

Die Subfamilie 3A der humanen Cytochrom P450-Enzyme besteht aus den vier Isoenzymen CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A43, deren Gene in einem gemeinsamen Komplex (siehe **Abbildung 1**) über eine Länge von 231 Kilobasenpaaren (kbp) auf dem langen Arm von Chromosom 7 im Bereich 7q21.3-q22.1 liegen (9, 10). Alle Gene kodieren normalerweise für Transkripte mit 1709 bis 2153 bp Länge, gegliedert in jeweils 13 Exone, die nachfolgend in Proteinketten mit 502 bis 503 aa translatiert werden (11). Aufgrund genetischer Varianten existiert für alle CYP3A-Gene eine Vielzahl verschiedener weiterer Transkripte, die zu einer veränderten Aminosäureanzahl des Proteins oder aber zum Abbruch der Proteinsynthese bzw. dessen Degradation führen. Insgesamt ist die Subfamilie CYP3A an der Metabolisierung von geschätzten 45-60% aller momentan auf dem Markt erhältlichen Arzneimittel beteiligt (9). Dabei scheinen vor allem die strukturelle Substratvielfalt und das gleichzeitige Binden mehrerer Liganden im Aktiven Zentrum, welches wiederum die Möglichkeit von Induktions- und Inhibitionsphänomenen nach sich zieht, eine entscheidende Rolle zu spielen (12). Dies beinhaltet jedoch auch das potentielle Risiko klinisch relevanter Arzneimittelinteraktionen. So kann es beispielsweise durch die Komedikation des CYP3A-inhibitorisch wirksamen Antibiotikums Erythromycin mit dem Antihistaminikum Terfenadin zu einer Blockierung der kardialen Kaliumkanäle kommen, die im schlimmsten Fall tödliche Herzrhythmusstörungen nach sich zieht (13). Unter weiteren Medikamenten, die eine Induktion oder Inhibition von CYP3A zur Folge haben können, zählen Glukokortikoide, Antiepileptika, antiretrovirale Therapeutika, Glitazone und Calciumantagonisten. Ausführliche Übersichten zu Substraten, Induktoren und Inhibitoren des CYP3A-Systems bieten beispielsweise die *Indiana University School of Medicine* und die *United States (U.S.) Food and Drug Administration* (14, 15). Gerade im Hinblick auf diese Wechselwirkungen ist die Erforschung der Ursachen für interindividuelle Schwankungen in der metabolischen Aktivität des CYP3A-Systems von besonderer klinischer Relevanz, da beispielsweise eine Anpassung der Arzneimitteldosierung auf die individuelle CYP3A-Enzymaktivität von Nutzen sein könnte.

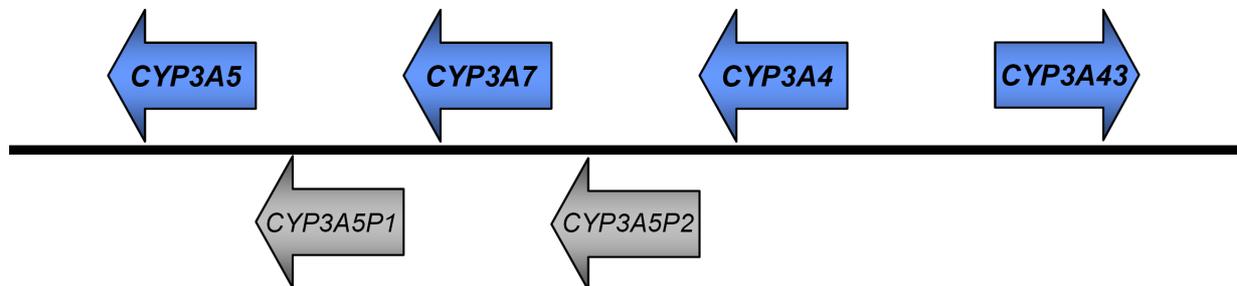


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung des *CYP3A*-Locus entsprechend der Datenbank *Entrez Gene* (16), online zugänglich über <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1574>, des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Der Genkomplex *CYP3A* beinhaltet neben vier Genen (blau) auch zwei Pseudogene, *CYP3A5P1* und *CYP3A5P2* (grau). Die Pfeilrichtung repräsentiert die Ableserichtung der Transkription.

1.2.1 Expression der Gene *CYP3A4*, *CYP3A7* und *CYP3A43*

Für die Metabolisierung endogener und exogener Stoffwechselprodukte in der Leber scheint bei den meisten Individuen *CYP3A4* die Hauptrolle zu spielen (9, 17). Um den genetischen Einfluss auf die Höhe der hepatischen *CYP3A4*-Spiegel zu eruieren, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Studien bezüglich verschiedener Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) in der Genregion von *CYP3A4* durchgeführt (18-22). So sind mittlerweile in der *Single Nucleotide Polymorphism Database* (dbSNP, online zugänglich unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) des *National Centers for Biotechnology Information* (NCBI) mehr als 300 unterschiedliche SNPs für den intra- und intergenetischen Bereich (Promotorbereich) des *CYP3A4*-Gens aufgeführt (23), von denen allerdings nur ein Bruchteil überhaupt funktionale Auswirkungen auf die Proteinbildung hat. Insgesamt implizieren die Meta-Analysen und Reviews der aktuellen Literatur, dass die interindividuell variable Höhe der *CYP3A4*-Spiegel weniger auf genetische Ursachen sondern vielmehr auf exogene Faktoren wie Induktions- und Inhibitionsprozesse zurückzuführen ist (9, 10, 24). Ein wichtiges Indiz dafür sind beispielsweise Schwankungen in der Metabolisierung von *CYP3A*-Substraten.

So variiert die Clearance des CYP3A-Substrates Midazolam nach Behandlung mit dem potenten CYP3A-Induktor Rifampicin verglichen mit der Gabe des starken CYP3A-Inhibitors Itraconazol um den Faktor 400 (25), während die normalen Schwankungen *in vivo* ohne medikamentöse Beeinflussung der Enzymaktivität mit einer vier- bis sechsfachen Variabilität deutlich geringer ausfallen (26, 27). Als Hauptenzym der Xenobiotikametabolisierung wird CYP3A4 vorwiegend in der Leber, in deutlich geringeren Mengen auch in Dünndarm, Kolon und Prostata exprimiert (28-31).

CYP3A7 galt lange Zeit als ausschließlich in der fetalen Leber exprimiertes Isoenzym, wo es 30-50% des gesamten Cytochrom P450-Gehalts ausmacht (32, 33). In neueren Expressionsstudien anhand von *messenger* RNA (mRNA) sowie durch die Etablierung spezifischer Antikörper konnte CYP3A7 jedoch sowohl in der adulten Leber als auch in den extrahepatischen Geweben Intestinum, Endometrium, Nebenniere und Prostata, nachgewiesen werden (18, 31, 34-36). Einer bimodalen Verteilung folgend, wird in 10-20% der kaukasischen Bevölkerung CYP3A7 in beträchtlichen Mengen exprimiert und trägt in diesen „Expressoren“ 9-36% zum gesamten CYP3A-Gehalt in der Leber bei (9, 35). Im Gegensatz zu CYP3A4, bei dem die Proteinverteilung unimodal ist, konnten für CYP3A7 interindividuelle Schwankungen in der Proteinexpression auf genetische Ursachen zurückgeführt werden. So können für die kaukasische Bevölkerung zwei Drittel aller Fälle erhöhter CYP3A7-Expression mit dem Vorhandensein des Allels *CYP3A7*1C* oder des weniger häufigen Allels *CYP3A7*1B* erklärt werden (18, 34, 35).

Erst vor wenigen Jahren wurde CYP3A43 als letztes Isoenzym der Subfamilie 3A entdeckt (37-39). Da das Nativprotein bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, ist noch immer unklar, ob und wie weit es zu klinisch relevanten Schwankungen im CYP3A-Spiegel beiträgt. Studien bezüglich der mRNA sowie anhand eines am Aminoterminus modifizierten CYP3A43-Enzyms in *Escherichia* (*E.*) *coli* deuten jedoch auf eine eher untergeordnete Rolle im Arzneimittelmetabolismus (31, 37). Die höchste Expression von CYP3A43-mRNA wurde in Prostata und Hoden beschrieben (38, 39). Von besonderer klinischer Relevanz erscheint eine mehrfach beschriebene Assoziation des *CYP3A43*3*-Allels mit dem Risiko einer Prostatakarzinom-Erkrankung (40-42).

1.2.2 Die polymorphe Expression von *CYP3A5*

Gemeinsam mit *CYP3A4* zählt *CYP3A5* zu den wichtigsten Enzymen des Fremdstoffmetabolismus in der humanen Leber (43). Bei starker Homologie der Aminosäuresequenzen und einem fast identischen Substratmuster mit ähnlichen katalytischen Aktivitäten liegt ein wesentlicher Unterschied im Verteilungsmuster der beiden Isoenzyme. Während *CYP3A4* unimodal in nahezu jeder adulten Leber exprimiert wird, kann *CYP3A5* in der kaukasischen Bevölkerung nur in etwa 10-25 % aller Lebern nachgewiesen werden (44). Für diese sogenannten *CYP3A5*-Expressoren sind die Angaben über den prozentualen Anteil von *CYP3A5* am gesamten *CYP3A*-Gehalt der Leber in der Literatur sehr unterschiedlich. Gegenüber ursprünglichen Annahmen von mehr als 50% (18), geht man heute eher von 10-20% aus (45). Nachdem 1990 erstmals das bimodale Verteilungsmuster von *CYP3A5* in der Leber beschrieben wurde (46), folgten zahlreiche Studien zur Aufdeckung einer möglicherweise zugrundeliegenden genetischen Variation. Im Jahr 2000 wurden in einer Arbeit zwei vermeintlich ursächliche genetische Varianten im 5'-stromaufwärts gelegenen Bereich des *CYP3A5*-Gens beschrieben (47), die sich jedoch nach heutigem Kenntnisstand eher im 5'-Bereich des Pseudogens *CYP3A5P1* befinden (12, 45). Ein Jahr später fand man neben mehreren weiteren funktionellen Polymorphismen die für die variable Proteinexpression hauptverantwortliche Sequenzvariation in Intron 3 des *CYP3A5*-Gens (18). Dieser Einzelbasenaustausch von Adenin (A) zu Guanin (G) an Nukleotid (nt) 22893 (*Accession number* des NCBI: AC005020, refSNP ID: rs776746) bzw. nt 6986 (relativ zum A des Translationsstartkodons ATG in Exon 1) führt über die Generation einer neuen 5'-Spleißdonorstelle zu alternativem Spleißen der PräkursormRNA (prä-mRNA; **Abbildung 2**). Dabei werden 131 bp der Sequenz von Intron 3 in die reife mRNA-Sequenz eingebaut, was in der Literatur auch als zusätzliches Exon oder Pseudoexon 3B bezeichnet wird. Diese aberrante mRNA zieht im weiteren Expressionsprozess eine Verschiebung des Protein-Leserasters nach sich und kreierte so mehrere vorzeitige Stoppkodons für den Translationsprozess. Das daraus resultierende Protein besäße im Vergleich zu normal gespleißtem *CYP3A5* statt 502 nur 102 Aminosäuren und hätte damit keine katalytische Aktivität mehr (12, 18). Das Wildtyp-Allel (A) wird als *CYP3A5**1, das mutierte Allel (G) als *CYP3A5**3 bezeichnet.

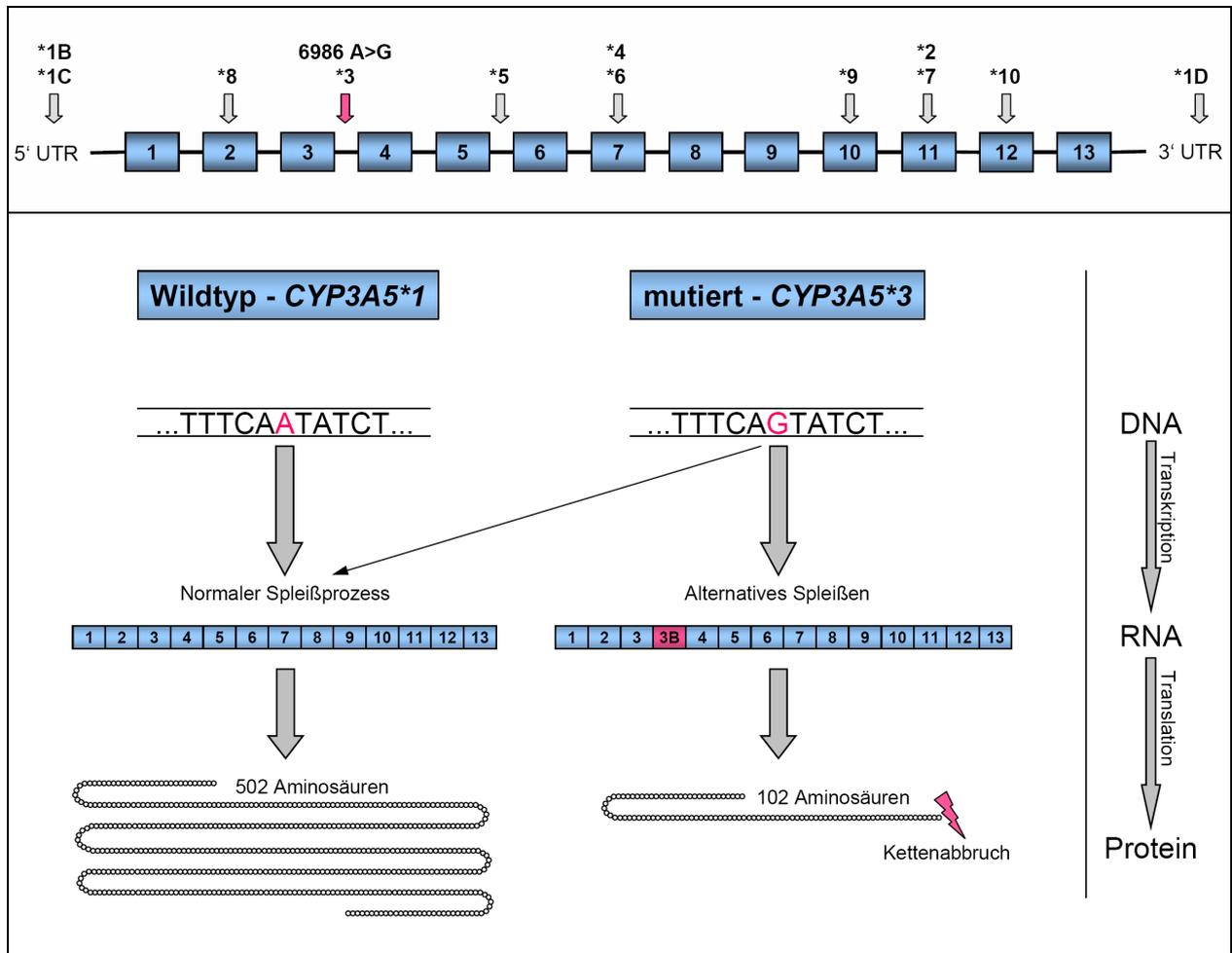


Abb. 2: Schematische Darstellung des *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus. Der obere Teil der Abbildung zeigt die Lokalisationen verschiedener SNPs im *CYP3A5*-Gen. Die Kästen repräsentieren die Exone, dazwischen liegen die intronischen Bereiche. UTR – Untranslatierter Bereich. Modifiziert nach Xie et al. (48). Der untere Teil der Abbildung zeigt die Auswirkung des 6986A>G-Polymorphismus auf Transkription und Translation von *CYP3A5*. Modifiziert nach Lamba et al. (12).

Der sogenannte Spleißstellenvorhersagewert (*splice site prediction score*) beruht auf bioinformatischen Berechnungen der Nutzungswahrscheinlichkeit einer Spleißstelle und kann beispielsweise mit Hilfe des Programms *Splice Site Prediction by Neural Network* ermittelt werden (*Berkeley Drosophila Genome Project*, online zugänglich über http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

Für die neu generierte Spleißdonorstelle in der prä-mRNA von CYP3A5 wird ein Spleißstellenvorhersagewert von 0,9 angegeben (18). Das heißt, dass zum einen theoretisch bei Vorliegen der Allelvariante *CYP3A5*3* der Großteil der prä-mRNA alternativ gespleißt wird, zum anderen aber auch, dass ein kleiner Teil weiterhin dem konventionellen Spleißprozess unterliegt und damit die Translation funktionsfähigen Proteins nach sich zieht. Versuche anhand von humanem Lebergewebe zeigen ebenfalls, dass in Individuen mit homozygot vorliegendem *CYP3A5*3*-Allel eine messbare Proteinexpression stattfindet, auch wenn die Proteinmenge deutlich geringer ist als in heterozygoten Trägern des Wildtyp-Allels (im Median 70,6 versus 2,5 pmol/mg) (49). Aufgrund der geringen Proteinexpression werden in der Literatur Individuen mit Genotyp *CYP3A5*3/*3* häufig als „*nonexpressors*“ (Nicht-Expressoren) bezeichnet, während Träger des *CYP3A5*1*-Allels (sowohl *CYP3A5*1/*3* als auch *CYP3A5*1/*1*) als „*expressors*“ (Expressoren) zusammengefasst werden. Da jedoch wie bereits beschrieben auch in Individuen mit *CYP3A5*3/*3*-Genotyp normales Protein gebildet wird, empfehlen Wojnowski und Kamdem die präziseren Bezeichnungen „*low-expressors*“ (Individuen mit geringer Expression) und „*high-expressors*“ (Individuen mit hoher Expression) (9). Die Frequenzen der beiden Allele variieren stark in Abhängigkeit vom ethnischen Hintergrund der untersuchten Population (siehe **Tabelle 1**). So besitzen bei einer Allelfrequenz von etwa 7% nur etwa 13% der Kaukasier das *CYP3A5*1*-Allel (50), während durchschnittlich etwa 85% aller afroamerikanischen Individuen dieses tragen (48).

Tabelle 1: Ethnische Allelfrequenzverteilung des *CYP3A5*-Polymorphismus 6986A>G

		<i>CYP3A5*1</i>	<i>CYP3A5*3</i>
Kaukasier		6 - 8%	92 - 94%
Asiaten	Ostasiaten	25 - 29%	71 - 75%
	Südasiaten	35 - 45%	55 - 65%
Lateinamerikaner		34 - 40%	60 - 66%
Afroamerikaner		65 - 71%	29 - 35%

Nach Xie et al. (48).

Die Spekulationen über die klinische Relevanz der Auswirkungen des genetischen *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus sind vielfältig. Theoretisch wären deutliche Unterschiede in der Biotransformation der Substrate von CYP3A5 zwischen Gruppen mit unterschiedlichem *CYP3A5*1*-Allelstatus zu erwarten. Untersuchungen diesbezüglich erweisen sich in der Praxis allerdings als schwierig und die Ergebnisse sind zum Teil widersprüchlich (43, 48). Die Ursachen hierfür werden zum einen in der Sequenzhomologie bzw. strukturellen Ähnlichkeit von CYP3A4 und CYP3A5 und zum anderen in der überlappenden Substratspezifität mit dem Effluxtransporter P-Glycoprotein (P-GP) gesehen. So wurde beispielsweise in Leberzellmikrosomen von *CYP3A5*1*-Allelträgern *in vitro* eine mehr als doppelt so hohe Clearance des Benzodiazepins Midazolam gemessen wie in den Mikrosomen homozygoter Träger des *CYP3A5*3*-Allels (18, 49). *In vivo* scheint jedoch in aktuelleren Studien ein derartiger Effekt nicht nachweisbar zu sein (51, 52). Ähnlich problematisch sind die Ergebnisse bezüglich des Immunsuppressivums Cyclosporin A. Während einige Studien eine Korrelation zwischen pharmakokinetischen Parametern des Calcineurininhibitors mit dem *CYP3A5*1*-Allelstatus beschrieben haben (53, 54), ist in der Mehrheit der Literatur kein statistisch signifikanter Zusammenhang nachgewiesen worden (55-59). Für Tacrolimus dagegen konnte in Studien gezeigt werden, dass bei einer höheren CYP3A5-Expression in *CYP3A5*1*-Allelträgern höhere Tagesdosen des Immunsuppressivums notwendig sind, um den therapeutischen Zielbereich der Serumkonzentration zu erreichen (60). Ein ähnlicher Zusammenhang scheint sich für den mTOR-Inhibitor (*mammalian Target of Rapamycin*) Sirolimus abzuzeichnen (60). Weitere Pharmaka, für die ein Einfluss des *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus nachgewiesen werden konnte, umfassen unter anderem die Statine Lovastatin, Atorvastatin und Simvastatin (61) sowie den HIV-Proteaseinhibitor Saquinavir (62) und das Benzodiazepin Alprazolam (63). Insgesamt wird jedoch angenommen, dass die prognostische Bedeutung des *CYP3A5*-Genotyps für die Pharmakokinetik von CYP3A-Substraten eher gering ist (17). Da für die meisten Individuen (besonders in der kaukasischen Bevölkerung) CYP3A4 die dominante CYP3A-Isoform in der Leber ist, scheinen sich die Auswirkungen der polymorphen CYP3A5-Expression auf die Metabolisierung spezifischer CYP3A5-Substrate oder Organe mit fehlender CYP3A4-Expression zu beschränken.

Abgesehen von den unmittelbaren Folgen des *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus für die Arzneimittelmetabolisierung, könnte die variable Proteinexpression von *CYP3A5* besonders in den extrahepatischen Geweben von klinischer Relevanz sein. *CYP3A5* wird neben der Leber auch in Dünndarm, Kolon, Lunge, Ösophagus, Nebenniere, Prostata, Hypophysenvorderlappen und Skelettmuskel exprimiert, und es ist die bedeutendste *CYP3A*-Isoform in der humanen Niere (10, 45, 64-66). Renale Erkrankungen, die in bisherigen Studien mit dem *CYP3A5*-Polymorphismus assoziiert worden sind, umfassen beispielsweise die Calcineurininhibitor-assoziierte Nephrotoxizität (CNIT) sowie die Balkan-Nephropathie (9, 67).

1.3 Einfluss des *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus auf die Blutdruckregulation

1.3.1 Arterielle Hypertonie

Als eine der am weitesten verbreiteten Erkrankungen ist die arterielle Hypertonie der weltweit bedeutendste Risikofaktor für Morbidität und Mortalität (68). Über mikro- und makroangiopathische Gefäßveränderungen und direkte druckmechanische Organbelastung führt sie unbehandelt sowohl zu akuten atherosklerotischen Komplikationen als auch zu einer Reihe chronischer Endorganschäden (69). So ist Bluthochdruck der wichtigste beeinflussbare Risikofaktor für den Schlaganfall und einer der wichtigsten Risikofaktoren für koronare Herzkrankheit (KHK) und chronische Herzinsuffizienz, periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK) und chronische Niereninsuffizienz (70). Global betrachtet galten im Jahr 2000 etwa eine Milliarde erwachsener Menschen als hyperten. Schätzungen zufolge wird die Anzahl Betroffener bis zum Jahr 2025 um weitere 50% zunehmen und damit auf 1,5 Milliarden ansteigen (71). Deutschland liegt im internationalen Vergleich bezüglich der Hypertoniehäufigkeit weit vorn. Mit einer Prävalenz von bis zu 55% sind hierzulande etwa doppelt so viele Erwachsene im Alter von 35-64 Jahren betroffen wie beispielsweise in Kanada oder den USA (72).

Bei etwa 5-10% aller Bluthochdruckpatienten liegt eine nachweisbare organische Ursache (z.B. renal, endokrin, medikamentös) oder eine monogenetische Form der Hypertonie (Liddle-Syndrom, glukokortikoidsensitiver Hyperaldosteronismus) vor, die prinzipiell einer kausalen Therapie zugänglich ist. Für den Großteil der Betroffenen jedoch kann von einem primär multifaktoriellen Geschehen mit sowohl genetischen als auch umweltassoziierten Komponenten ausgegangen werden. Die Pharmakotherapie erfolgt in diesem Fall im Wesentlichen symptomatisch. Obwohl mittlerweile eine Reihe verschiedener Medikamente zur Verfügung stehen, gibt es in der Behandlung noch immer deutliche Defizite. So führen die relativ geringen Ansprechraten von etwa 50% auf die Primärtherapie und die damit verbundene therapeutische Turbulenz sowohl zu einer ökonomisch ungünstigen Situation als auch zu reduzierter Compliance bei subjektiv asymptomatischen Patienten und daher mangelhafter Behandlung der betroffenen Bevölkerung (73). Für eine gezieltere ätiopathogenetisch orientierte Behandlung sind allerdings genauere Kenntnisse bezüglich der Krankheitsentstehung nötig. Ausgehend von Daten aus der Zwillings- bzw. Familienforschung sowie aus tierexperimentellen Versuchen wird der hereditäre Anteil der interindividuellen Blutdruckvariation auf etwa 30-60% geschätzt, wobei die genaue Anzahl beteiligter Gene und Allele unbekannt ist (74). Daher ist unabhängig von den zum größten Teil beeinflussbaren exogenen Faktoren vor allem die genetische Prädisposition von großem Interesse für die experimentelle Hypertonieforschung. Die Entschlüsselung der molekulargenetischen Grundlagen des polygenen Phänotyps erfolgt dabei primär über die Identifizierung und Validierung krankheitsassoziiierter Kandidatengene mittels *Linkage*-Analysen und Assoziationsstudien. Die Hoffnungen, die diesbezüglich an den Erkenntnisgewinn der nächsten Jahre geknüpft sind, reichen von einer individuellen Risikostratifizierung, über die Identifikation neuer pharmakologischer Targetmoleküle bis hin zu der Möglichkeit der gezielten pharmakogenetischen Therapie mit verbesserter Ansprechrate und Verträglichkeit für den Individualpatienten.

1.3.2 *CYP3A5* und Blutdruck beim Menschen – Assoziationsstudien

Die Identifizierung von *CYP3A5* als neues Kandidatengen der experimentellen Hypertonieforschung geht im Wesentlichen zurück auf eine Studie aus dem Frühjahr 2003, in der ein signifikanter Effekt des *CYP3A5**1/*3-Polymorphismus auf die Blutdruckhöhe beim Menschen beschrieben wird (75). Hintergrund der Untersuchung waren zum einen die neuen Erkenntnisse bezüglich des genetischen Polymorphismus im *CYP3A5*-Gen (18), und zum anderen Daten aus Tierexperimenten und Zellkulturversuchen, die auf einen Einfluss eines Isoenzym der CYP3A-Subfamilie auf die Natriumreabsorption in der Niere und damit auf die Blutdruckregulation deuteten (76-79). Anhand eines kleinen Kollektivs von 25 jungen, gesunden Probanden afroamerikanischer Herkunft wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass das *CYP3A5**1-Allel positiv mit der Höhe des systolischen Blutdrucks (SBD), mittleren arteriellen Drucks (MAD) und der Kreatininclearance korrelierte. Aufgrund des apparenten Gen-Dosis-Effekts waren die höchsten Werte unter den homozygoten Trägern des *CYP3A5**1-Allels zu verzeichnen. Es folgten weitere Studien zur Untersuchung dieser möglichen Assoziation mit kontroversen Ergebnissen (siehe **Tabelle 2**).

Auf der einen Seite zeigten Studien in Übereinstimmung mit den ursprünglichen Daten ebenfalls eine Assoziation des *CYP3A5**1-Allels mit höheren Blutdrücken (80, 81) bzw. der Diagnose eines Hypertonus (82). Auf der anderen Seite gibt es auch Arbeiten, in denen ein gegenteiliger Effekt des *CYP3A5**1-Allels auf den Blutdruck beschrieben wird (50, 83). In der bislang größten Untersuchung – eine prospektive Beobachtungsstudie der Allgemeinbevölkerung (PREVEND-Studie) an $n=6777$ Probanden – ist für Träger des *CYP3A5**1-Allels eine signifikante Absenkung des SBD und des Pulsdruckes (PD) beschrieben worden (50). In einigen Studien konnte entweder kein Zusammenhang zwischen dem *CYP3A5**1/*3-Polymorphismus und Merkmalen der Blutdruckregulation gefunden werden (58, 84, 85) oder die Daten innerhalb der Untersuchung blieben widersprüchlich (86).

Tabelle 2: Assoziationsstudien zum Thema *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus und Blutdruck

Erstautor	Anzahl	Ethnie	Alter	<i>CYP3A5*1</i> -Allelträger	Assoziation <i>CYP3A5*1</i> und Blutdruck
Givens (75) (2003)	25	AA	25	72	SBD ↑, MAD ↑
Kreutz (58) (2004)	399	K	44	16	Hypertonie ↔ SBD ↔, DBD ↔
Ho (86) (2005)	271 (IN)	K	k.A.	15	SBD ↔, MAD ↔
		AA	k.A.	59	SBD ↓, MAD ↓
	412 (CA)	K	k.A.	15	Hypertonie ↔
		AA	k.A.	87	Hypertonie ↑
Kivisto (82) (2005)	373	K	80	15	Hypertonie ↑
Fromm (83) (2005)	115	K	25	17	SBD ↓
Kreutz (50) (2005)	6777	K	48	13	SBD ↓, PD ↓
Bochud (80) (2006)	375	AA	46	70	SBD ↑, DBD ↑
Lieb (84) (2006)	1084	K	49	11	SBD ↔, DBD ↔
Langaee (85) (2007)	676 (HTN)	K	49	13	Hypertonie ↔, SBD ↔, DBD ↔
		AA		95	
	722 (INVEST)	K, AA, L	66	33	SBD (↑)
Zhang (81) (2010)	238	As	46	57	DBD ↑

Ergebnisdarstellung aus Assoziationsstudien bezüglich des Zusammenhangs zwischen *CYP3A5*1*-Allel und Blutdruck, geordnet nach Erscheinungsjahr. Als Studiencharakteristika sind angegeben: Anzahl der Probanden (*n*), Ethnie, mittleres Alter (in Jahren), prozentualer Anteil der *CYP3A5*1*-Allelträger sowie der ermittelte Einfluss des *CYP3A5*1*-Allels auf bestimmte Blutdruckparameter. IN – *Indiana University Medical Center* Studienpopulation. CA – *University of California* Studienpopulation. HTN – *Hypertension Genes Study*. INVEST – *International Verapamil/Trandolapril Study Genetic Substudy*. K – Kaukasier. AA – Afroamerikaner. L – Lateinamerikaner. k.A. – keine Angaben. SBD – systolischer Blutdruck. MAD – mittlerer arterieller Druck. DBD – diastolischer Blutdruck. PD – Pulsdruck. Modifiziert nach Bochud et al. (64).

In verschiedenen Arbeiten gibt es Hinweise auf komplexe Modulationsmechanismen der Assoziation zwischen *CYP3A5**1/*3-Polymorphismus und Blutdruckhomöostase *in vivo*. Beschrieben wurden zum Teil signifikante Interferenzen mit den Effektvariablen diätetische Salzaufnahme bzw. Natriumausscheidung (50, 80, 81), Aldosteronspiegel (83), glomerulärer Filtrationsrate (GFR) (80), Tageszeit (80), Alter (80) sowie das für den Effluxtransporter P-Glykoprotein (P-GP) kodierende Gen *ABCB1* (87). Der Einfluss einiger dieser Effektvariablen wurde in den entsprechenden Arbeiten durch eine Beteiligung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) erklärt.

In einer kürzlich publizierten Metaanalyse wurde insgesamt keine Assoziation zwischen *CYP3A5**1/*3-Polymorphismus und Blutdruckhöhe bzw. Auftreten einer Hypertonie gefunden (88). Jedoch zeigte sich in der ethnischen Subgruppenanalyse für Kaukasier bei *CYP3A5**1-Allelträgern ein signifikant niedrigerer SBD verglichen mit den *CYP3A5**3/*3-Individuen.

1.3.3 Molekulare Wirkungsmechanismen – Hypothesen

Abhängig von der demographischen Struktur des untersuchten Kollektivs, insbesondere ethnischem Hintergrund und Alter, wurden bei bestehender Assoziation des *CYP3A5**1-Allels mit der Höhe des Blutdrucks entweder gleichsinnige (positive Assoziation) oder gegensinnige (negative Assoziation) Beziehungen beobachtet. Um die Differenzen in den gemessenen Blutdruckwerten zwischen *CYP3A5**1-Allelträgern und *CYP3A5**3-Homozygoten zu erklären, wurden aufbauend auf Ergebnissen aus der tierexperimentellen Forschung sowie Zellkulturversuchen verschiedene Hypothesen bezüglich einer möglichen physiologischen Rolle von *CYP3A5* in der humanen Niere bzw. eines potentiellen molekularen Wirkungsmechanismus des Proteins auf die Blutdruckregulation beim Menschen aufgestellt.

1.3.3.1 6 β -Hydroxycortisol-Hypothese

Die 6 β -Hydroxycortisol-Hypothese geht im Wesentlichen von der Annahme aus, dass die Metabolisierung von Cortisol zu 6 β -Hydroxycortisol durch die intrinsische 6 β -Hydroxylaseaktivität von CYP3A5 in der humanen Niere über eine Natriumretention zu einer chronischen Blutdruckerhöhung führt. Ursprüngliche Daten aus Experimenten anhand der epithelialen Nierenzelllinie A6 des Krallenfrosches *Xenopus laevis* zeigten einen transepithelialen Natriumtransport infolge Stimulation mit Aldosteron oder dem in Nagern und Amphibien wichtigsten Glukokortikoid Corticosteron (89). Spezifischere Untersuchungen dieses Zusammenhangs deuteten darauf hin, dass weniger Corticosteron selbst, sondern vielmehr sein Metabolit 6 β -Hydroxycorticosteron für 90% des aktiven Ionentransport verantwortlich war (90). Im Signalweg wird ein niederaffiner intrazellulärer Rezeptor (Typ IV) beschrieben, der weder mit Aldosteron (Mineralokortikoidrezeptor, Typ I) noch mit Corticosteron (Glukokortikoidrezeptor, Typ II) geteilt wird. In folgenden Experimenten wird die für die Metabolisierung verantwortliche 6 β -Hydroxylase näher als Enzym des Cytochrom P450-Systems bzw. dessen Subfamilie 3A charakterisiert (77, 91). Der wesentliche Hinweis auf eine chronische Blutdruckerhöhung infolge vermehrter CYP3A-vermittelter 6 β -Hydroxylierung jedoch entstammt Untersuchungen am spontan hypertensiven Rattenstamm SHR (*spontaneously hypertensive rats*). Die Arbeitsgruppe um Watlington zeigte, dass die 6 β -Hydroxylierung von Corticosteron in der Niere, und damit die renale CYP3A-Aktivität, signifikant erhöht war im hypertensiven SHR-Stamm im Vergleich zu normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten (76, 78, 79). Weiterhin ließen sich sowohl die 6 β -Hydroxylaseaktivität als auch der systolische Blutdruck signifikant senken durch den selektiven CYP3A-Inhibitor Troleandomycin (TAO). Dass Enzyme der Subfamilie CYP3A auch beim Menschen die wichtigsten Katalysatoren der 6 β -Hydroxylierung von Steroidhormonen sind, konnte zunächst anhand von humanem Lebergewebe, später auch in der menschlichen Niere nachgewiesen werden (46, 92, 93). Weitere Hinweise auf eine Blutdruckerhöhung durch vermehrte CYP3A-Aktivität geben Daten aus klinischen Studien, die erhöhte 6 β -Hydroxycortisolwerte bei verschiedenen Hypertonieformen, beispielsweise Cushing-Syndrom und Präeklampsie, beschrieben (79, 94-96).

Da CYP3A5 heute als die dominierende CYP3A-Isoform in der humanen Niere betrachtet wird und die interindividuell sehr variable Expression einem einzelnen Basenaustausch zugeschrieben werden kann, ist der beschriebene *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus zunehmend in den Fokus dieser Blutdruckmodulationshypothese geraten. In späteren genetischen Studien wurde die Tatsache, dass das Vorkommen des Wildtyp-Allels *CYP3A5*1* mit steigendem geografischen Breitengrad abnimmt, als Hinweis für einen positiven Selektionsprozess des mutierten *CYP3A5*3*-Allels in nicht-afrikanischen Bevölkerungsgruppen gesehen (15, 97). Der potentiell natrium-retinierende Effekt von CYP3A5 wurde dabei als Selektionsvorteil in heißen äquatorialen Gebieten mit mangelhaften Wasservorkommen diskutiert, dessen Bedeutung nach Norden hin abnimmt.

1.3.3.2 Hypothese vom Mineralokortikoidrezeptorschutz

Die Hypothese vom Mineralokortikoidrezeptorschutz durch CYP3A entstammt ursprünglich einer von Morris und Kollegen 1998 veröffentlichten Arbeit an der epithelialen Nierenzelllinie A6 (98). Das im Menschen hauptsächlich für den Mineralokortikoidrezeptorschutz vor Glukokortikoidaktivierung verantwortliche Enzym 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (11 β -HSD) Typ 2 fehlt in diesem Zellmodell trotz Koexistenz des Mineralokortikoid- (MR) und Glukokortikoidrezeptors (GR). Trotzdem konnte in der ersten Versuchsreihe dieser Studie mittels verschiedenen Inhibitoren beider Isoenzyme der 11 β -HSD ein gesteigerter Natriumtransport nach Stimulation mit Corticosteron durch gesteigerten Kurzschlussstrom (SCC, *short circuit current*) nachgewiesen werden. In der weiteren Untersuchung dieses Phänomens zeigte sich, dass durch die vermeintliche 11 β -HSD-Hemmung außerdem die 6 β -Hydroxylaseaktivität von CYP3A unterdrückt wurde. Eine spezifische CYP3A-Inhibition durch TAO führte ebenfalls zu einem erhöhten SCC. Die mittels gezielter Hemmung des MR und GR gewonnenen Daten ließen darauf schließen, dass der einfache Corticosteron-assoziierte SCC durch den GR, der durch zusätzliche 6 β -Hydroxylasehemmung erhöhte SCC jedoch über den MR vermittelt wird.

In der Interpretation der Daten vermuteten die Autoren, dass die 6 β -Hydroxylierung von Corticosteron zu 6 β -Hydroxycorticosteron durch CYP3A einen Schutzmechanismus für den MR vor Corticosteronaktivierung darstellt, während die GR-Aktivität unbeeinflusst bleibt. Da auch in der humanen Niere eine CYP3A-assoziierte 6 β -Hydroxylierung nachgewiesen werden konnte (93), wurde vermutet, dass CYP3A5 zusätzlich zur 11 β -HSD2 den Mineralokortikoidrezeptor vor Glukokortikoidaktivierung und vor dadurch bedingter chronischer Blutdruckerhöhung schützt.

1.3.3.3 Interaktionshypothese CYP3A5 – ABCB1

Der transmembranäre Efflux vieler Medikamente erfolgt mithilfe der Superfamilie der Adenosintriphosphat (ATP)- *binding cassette* (ABC)- Transporter. Unter den 48 bekannten Genen der ABC-Familie, ist *ABCB1* (*ABC-binding cassette*, Subfamilie B, Mitglied 1) eines der am intensivsten untersuchten (99). Das Expressionsprodukt des *ABCB1/MDR1*-Gens P-GP, auch *Multidrug Resistance Protein 1* (MDR1) genannt, ist beim Menschen in der apikalen Zellmembran vieler exkretorischer Gewebe wie der intestinalen Schleimhaut, Leber, Niere und Nebenniere sowie im Endothel von Blut-Gewebescheiden in Hirn, Herz, Nervengewebe, Hoden und Plazenta lokalisiert (100). Die physiologische Funktion von P-GP besteht vor allem in der Exkretion potentiell toxischer Xenobiotika und deren Metaboliten. Klinisch bedeutsam in der Arzneimitteltherapie ist neben der viel beschriebenen unerwünschten Resistenzvermittlung gegenüber Antibiotika und Zytostatika („*Multidrug Resistance*“) auch seine polymorphe Expression in Bezug auf die Bioverfügbarkeit, Wirksamkeit, Toxizität und Clearance pharmakologischer Substrate. Untersuchungen bezüglich genetischer Grundlagen dieser Variabilität führten zur Beschreibung von mehr als 50 SNPs sowie Insertionen, Deletionen und Promotorsequenzveränderungen des *ABCB1*-Genbereichs (99). *ABCB1* liegt auf dem langen Arm von Chromosom 7 in der Region 7q21.12 und besteht laut neueren Veröffentlichungen aus 29 Exonen, die sich über etwa 209 kbp erstrecken (101, 102).

Die drei häufigsten und am besten untersuchten Polymorphismen im kodierenden Bereich von *ABCB1* sind der synonyme Basenaustausch von Cytosin (C) zu Thymin (T) an Stelle 1236 des Gens (*1236C>T*), der nicht-synonyme triallelische Polymorphismus von Guanin (G) zu Thymin oder Adenin (A) an Stelle 2677 (*2677G>T/A*), der einen Aminosäureaustausch von Alanin durch Serin bzw. Threonin in der Proteinkette nach sich zieht, und der synonyme SNP *3435C>T*, dem auch eine funktionelle Bedeutung im Sinne einer Veränderung der mRNA-Stabilität beigemessen wird. Die drei Polymorphismen werden untereinander stark gekoppelt vererbt (103).

Bereits Mitte der 90er Jahre wurde eine enorme Substratüberschneidung der wesentlich an der Xenobiotikadetoxifikation beteiligten Proteine CYP3A4/CYP3A5 und P-GP beschrieben sowie eine gemeinsame Regulation und Interaktion untereinander vermutet (104-106). Die klinische Relevanz dieses Zusammenhangs wurde dabei vor allem in einer veränderten Pharmakokinetik der sogenannten CYP/P-GP-Bisubstrate gesehen. Neuere Veröffentlichungen lassen jedoch sogar über den Einfluss einer genetischen Interaktion von *CYP3A5* mit *ABCB1* auf den Blutdruck beim Menschen mutmaßen (64, 87). Sowohl für *CYP3A5* als auch für P-GP existieren unabhängig voneinander Hinweise auf eine physiologische Funktion in der Blutdruckregulation. So deuten Daten aus tierexperimentellen und *in vitro*-Versuchen auf einen Einfluss von P-GP auf die Serumspiegel von Aldosteron, sowohl über den Transport des Hormons als auch über dessen Angiotensin II-vermittelte Sekretion (64). In der Untersuchung eines familiär hypertensiven Kollektivs auf den Seychellen wurde eine Interaktion funktioneller *CYP3A5*- und *ABCB1*-Polymorphismen mit Einfluss auf die humane Blutdruckregulation beschrieben (87). Im Detail wurden die Beobachtungen dieser Studie von den Autoren interpretiert als antagonistische Wirkung des *CYP3A5*1*- und *ABCB1 3435T*-Allels auf den Blutdruck, besonders unter hoher diätetischer Salzaufnahme. Die Vermittlung des Effekts wird dabei über eine Modulation der RAAS-Aktivität vermutet.

1.4 Ziele der Arbeit

CYP3A5 übt als Mitglied der Subfamilie 3A des humanen Cytochrom P450-Systems eine wesentliche Funktion in der Fremdstoffmetabolisierung der Leber aus. Die Ursache seiner polymorphen Expression liegt in einem intronischen Polymorphismus, in dessen Folge die entsprechende mRNA alternativ gespleißt und der Translationsprozess durch ein neu generiertes Stoppkodon vorzeitig beendet wird. Nur in Trägern des Wildtyp-Allels *CYP3A5*1* können daher beträchtliche Mengen des Proteins nachgewiesen werden, während Individuen mit zwei mutierten *CYP3A5*3*-Allelen kaum Protein synthetisieren. Die klinisch relevanten Auswirkungen dieses Polymorphismus scheinen sich jedoch nicht nur auf die Pharmakokinetik und -dynamik verschiedener Arzneimittel zu beschränken, die der Metabolisierung durch CYP3A unterliegen. In klinischen Studien wurde in den letzten Jahren vielfach eine Assoziation des *CYP3A5*1*-Allelstatus mit prospektiv ermittelten Blutdrücken in diversen Populationen mit unterschiedlichem ethnischen Hintergrund beschrieben. Da CYP3A5 als Hauptvertreter seiner Subfamilie in der Niere gilt, scheint eine physiologische Bedeutung für die Blutdruckregulation denkbar. Die Assoziationsstudien zeigen allerdings zum Teil widersprüchliche Ergebnisse, sodass ebenso konträre Hypothesen bezüglich einer möglichen Wirkungsweise des CYP3A5-Enzyms auf die Blutdruckhomöostase existieren. Diese Hypothesen gründen sich im Wesentlichen auf tierexperimentellen Untersuchungen an Nagetieren bzw. Zellkulturexperimenten einer Nierenzelllinie des Krallenfrosches. Experimentelle Daten bezüglich der CYP3A5-Expression in der menschlichen Niere sind dagegen rar.

Das Ziel dieser Arbeit war daher, die Genotyp-Phänotyp-Assoziation von CYP3A5 in Proben humaner Nieren zu beschreiben und die möglicherweise in den Signalweg der CYP3A5-Wirkung auf den Blutdruck integrierten Gene bezüglich ihrer Beziehung zum *CYP3A5*1*-Allelstatus zu untersuchen. Insgesamt wurden Gewebeproben von $n=102$ nephrektomierten Patienten für DNA- und RNA-spezifische Untersuchungen sowie zehn weitere Gefrierschnitte humaner Niere für immunhistochemische Versuche verwendet. Im Einzelnen wurde dafür wie folgt vorgegangen:

- 1.) Die DNA der Nierenproben wurde hinsichtlich des *CYP3A5**1/*3-Polymorphismus untersucht sowie Genotypverteilung und Allelfrequenz für das untersuchte Kollektiv bestimmt. Die Charakteristika der Patientenkohorte wurden retrospektiv anhand der archivierten Krankenakten ermittelt und hinsichtlich eventueller Unterschiede zwischen *CYP3A5**1-Allelträgern und *CYP3A5**3/*3-Individuen untersucht.
- 2.) Die Höhe der *CYP3A5*-mRNA-Spiegel wurde mittels quantitativer Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) bestimmt und in Abhängigkeit von dem bestehenden *CYP3A5*-Genotyp analysiert.
- 3.) Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch das zumindest in der Leber deutlich stärker exprimierte *CYP3A4* zu eruieren, wurde die mRNA von *CYP3A4* in denselben Proben quantifiziert.
- 4.) Die mRNA zweier weiterer Proteine wurde quantifiziert um die Hypothese des Mineralokortikoidrezeptorschutzes näher zu beleuchten. Da *CYP3A5* laut dieser These die Aktivierung des MR durch Cortisol verringern soll, wurde der mögliche Einfluss des *CYP3A5**1/*3-Polymorphismus auf die Transkription der α -Untereinheit des epithelialen Natriumkanals (ENaC α) und der Serum- und Glukokortikoid-induzierbaren Kinase 1 (SGK1) untersucht. Beide Proteine stellen Schlüsselstellen in der Mineralokortikoidrezeptor-induzierten Natriumretention dar (107).
- 5.) Um den Einfluss weiterer Polymorphismen auf die dem *CYP3A5**1/*3-SNP zugeschriebenen Veränderungen zu evaluieren, die mit eben jenem SNP stark gekoppelt sein könnten, wurde der Haplotypenblock (Block des *linkage disequilibrium*, LD-Block) um *CYP3A5* unter Zuhilfenahme zweier zusätzlicher *tagging* SNPs analysiert.
- 6.) Der Haplotypenblock des *ABCB1*-Gens wurde für alle untersuchten Nierenproben ebenfalls mittels Genotypisierung der drei Polymorphismen *1236C>T*, *2677G>T/A* und *3435C>T* bestimmt. Eine eventuelle Gen-Gen-Interaktion zwischen *CYP3A5* und *ABCB1* sollte so eruiert werden.
- 7.) Die Lokalisierung des *CYP3A5*-Proteins in der humanen Niere wurde immunhistochemisch mittels Gefrier- und Paraffinschnitten untersucht, um die Plausibilität der verschiedenen Hypothesen der *CYP3A5*-Wirkung zu prüfen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialliste und Bezugsquellen

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Artikel	Hersteller/Händler
96-well Optical Reaction Plates	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Amersham Hyperfilm™ MP	GE Healthcare, München, Deutschland
Einmalskalpelle	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Kanülen BD Microlance™ 3	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Latexhandschuhe DermaClean™	Ansell GmbH, München, Deutschland
Nitrilhandschuhe NitraTex®	Ansell GmbH, München, Deutschland
Objektträger	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Optical Adhesive Cover	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Optical Cover Compression Pads	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipetten (Einkanalpipetten und Multipette®)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen ART® (mit Filter; 10REACH, 100E, 1000E)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Reaktionsgefäße Safe-lock (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Röhrchen 12 ml	SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Rotilabo [®] Blottingpapier	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Spritzen Injekt-H, 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Whatman [®] Protran [®] B85 Nitrocellulose Membranen	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Substanz	Hersteller/Händler
100 bp DNA Längenstandard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Aceton	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose Broad Range	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ampuwa Spüllösung 1000ml, Plastipur [®]	Fresenius SE, Bad Homburg v.d.H., Deutschland
APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Aqua ad iniectabilia, Mini-Plasco [®]	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Bromphenolblau, Natriumsalz	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BSA, lyophilisiert	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
dNTPs	Rapidozym GmbH, Berlin, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Inc., Griesheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FICOLL™ Typ400	Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland (heute Pfizer Deutschland GmbH, Karlsruhe)
Formamid	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin (α -Aminoessigsäure)	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin, Lösung nach Mayer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O ₂ , 30%-ige Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Isopropanol	Mallinckrodt Baker, Inc., Griesheim, Deutschland
KCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
KMnO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Methanol	Mallinckrodt Baker, Inc., Griesheim, Deutschland
MgCl ₂	Rapidozym GmbH, Berlin, Deutschland

NaCl	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ CO ₃	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NFDM, Blotting-Grade Blocker	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
NuSieve [®] 3:1 Agarose	Lonza Verviers S.p.r.l., Verviers, Belgien
Ponceau S, Scharlachrot	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Precision Plus Protein [™] Standards All Blue	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Rotiphorese [®] Gel A, 30% Acrylamidlösung	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS ultra pure	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SuperSignal [®] West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific p/a Perbio Science Deutschland, Bonn, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS	Carl Roth GmbH Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TWEEN [®] 20 Detergent	Calbiochem [®] / Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
VectaMount [™] Permanent Mounting Medium	Vector Laboratories Inc. p/a AXXORA Deutschland GmbH, Loerrach, Deutschland

2.1.3 Gebrauchsfertig gemischte Reagenzien und Enzyme

Reagenz	Hersteller/Händler
10x PCR-Puffer	Rapidozym GmbH, Berlin, Deutschland
BigDye [®] Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Power SYBR [®] Green PCR Master Mix	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Taq-Polymerase	Rapidozym GmbH, Berlin, Deutschland
TaqMan [®] Genotyping Master Mix	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
TaqMan [®] SNP Genotyping Assay Mix	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
TaqMan [®] 2x Universal PCR Master Mix, No AmpErase [®] UNG	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
TAQurate [™] GREEN Real-Time PCR Master Mix	EPICENTRE Biotechnologies p/a Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
UltraPure [™] 10x TBE	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Puffer, Gele, Lösungen

Fällungsreagenz

Aqua bidest.	3,3 ml
Ethanol (100%)	10 ml
3M NaAc pH 5,2	400 µl
<hr/>	
NaAc, Ethanol und Aqua bidest. zusammengeben. Lagerung bei 2-8°C.	

FICOLL-Puffer

Ficoll [™]	15 g
1x TBE-Puffer	100 ml
Bromphenolblau (gesättigt)	1 ml
<hr/>	
Zunächst Ficoll mit 60 ml 1x TBE in Lösung bringen, dann auf 100 ml auffüllen und Bromphenolblau zugeben.	

3M Natriumacetat pH 5,2

NaAc-3H ₂ O	408 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Zunächst NaAc in H₂O lösen. Einstellung des pH-Wertes auf 5,2 mit 3M Essigsäure. Aqua bidest. ad 1000ml.

0,5M Sammelgel pH 6,8

TRIS	30,28 g
Aqua bidest	ad 500 ml

TRIS in 400 ml Aqua bidest lösen. Mit HCl auf pH 6,8 einstellen. Aqua bidest ad 500ml.

10x TBS-Puffer

NaCl	80 g
KCl	2 g
TRIS	30 g

Auf 800 ml Aqua bidest. auffüllen. pH 8,0 einstellen mit HCl. Auf 1000 ml auffüllen.

TE-Puffer

1,0 M Tris-Puffer pH 8,0	1 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	0,2 ml
Aqua dest.	ad 100 ml

Anschließend autoklavieren. Lagerung bei 2-8°C.

5x Running Buffer pH 8,3

TRIS	15 g
Glycin	72 g
SDS	5 g

Auf 800ml Aqua bidest. auffüllen. Mit 1-4 N HCl auf pH 8,3 einstellen. Rest auf 1000ml auffüllen.

Semi Dry Buffer

TRIS	5,8 g
Glycin	2,9 g
SDS	0,37 g
Methanol	200 ml

Zu 100 ml Aqua bidest. SDS, Glycin, TRIS geben. Auf 600 ml auffüllen. Methanol dazu, auf 1000 ml auffüllen.

TBS-Tween[®]

TBS (10x)	100 ml
Aqua bidest.	899 ml
Tween [®] 20	1 ml

10x TBS zu 899 ml Aqua bidest. geben. Zu 0,1% TBS-Tween[®]-Lösung mischen.

1,5M Trenngel pH 8,8

TRIS	90,85 g
Aqua bidest.	ad 500 ml

TRIS in 400 ml Aqua bidest. lösen. Mit HCl auf pH 8,8 einstellen. Auf 500 ml auffüllen.

2.1.5 Kits/Sets

Name	Hersteller/Händler
AllPrep [®] DNA/RNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Arcturus [®] HistoGene [®] Frozen Section LCM Staining Kit	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland (ehemals Molecular Devices)
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories Inc. p/a AXXORA Deutschland GmbH, Loerrach, Deutschland
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
ImmPRESS [™] Anti-Rabbit Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit	Vector Laboratories Inc. p/a AXXORA Deutschland GmbH, Loerrach, Deutschland
QIAEX [®] II Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy [®] MinElute [®] Cleanup Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

2.1.6 Geräte

Bezeichnung	Hersteller/Händler
ABI Prism [®] 3130 Genetic Analyzer	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
ABI Prism [®] 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Agarosegelkammer Subcell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen, Deutschland

Dispergierer ULTRA-TURRAX® T25	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Elektrophoresesystem Multigel	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Geldokumentationssystem 5000 UVP®	LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland
Inkubator Function line	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Magnetrührer IKAMAG Reo	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Mastercycler® personal	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikrozentrifuge MiniSpin® plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Minizentrifuge GMC-060	LMS Consult GmbH und Co. KG, Brigachtal, Deutschland
NanoDrop™ Spektrophotometer ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Netzgerät Power Pac300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
ph-Meter CG 840	Schott AG, Mainz, Deutschland
Photometer UV-1202	Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Deutschland
Photomikroskop Axiophot	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Plattformschüttler, reziprok PROMAX1020 , PROMAX2020	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Präzisionswaage TE212	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
<i>Semi-Dry Blotter</i> PEGASUS	PHASE GmbH, Lübeck, Deutschland
Peltier Thermal Cycler-225™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland (ehemals MJ Research)

Programmable Thermal Controller-100™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland (ehemals MJ Research)
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortex Schüttler Vibro-Fix VF2	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
Zentrifuge Labofuge®400	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

2.1.7 Software

Name	Hersteller
ABI Prism® 7000 System Software	Applied Biosystems Deutschland GmbH
ABI Prism® Sequencing Analysis Software	Applied Biosystems Deutschland GmbH
Agilent Expert 2100	Agilent Technologies Inc.
AxioVision v4.8.1.0	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH
Chromas Lite 2.01	Technelysium Pty. Ltd.
Haploview 4.2	Daly Lab at the Broad Institute
Microsoft® Excel 2002	Microsoft Corporation
Nanodrop ND-1000 Software v3.2	Thermo Fisher Scientific Inc.
PHASE 2.0	Stephens et al. 2001
Primer Express® Software v3.0	Applied Biosystems Deutschland GmbH
Sigmaplot 8.0	SPSS Inc.
SPSS 15.0	SPSS Inc.

Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden die Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Charité – Universitätsmedizin Berlin eingehalten.

2.2 Untersuchte Gewebe

2.2.1 Urologische Patienten

In einer Kooperation mit der Klinik für Urologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (CBF) wurden Gewebeproben von $n=102$ nephrektomierten Patienten aus der dortigen Gewebebank für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um gesundes Nierengewebe, das im Rahmen einer Tumorentfernung mit entsprechendem Sicherheitsabstand entnommen worden war. Sofort nach Entnahme wurde das Gewebe in Flüssigstickstoff gefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C . Demographische und medizinische Informationen zu den Patienten wurden retrospektiv anhand der urologischen Krankenakten ermittelt. Dabei wurden Alter, Geschlecht, Diagnose eines arteriellen Hypertonus, stationär gemessene Blutdrücke (SBD und DBD), Medikation sowie nephrologische Grunderkrankung ermittelt. Alle Patienten stimmten der Verwendung ihrer Daten und Gewebeproben für wissenschaftliche Untersuchungen schriftlich zu.

2.2.2 Kommerziell erworbene Gewebe

Zusätzlich wurden für immunhistochemische Untersuchungen zehn Gefrierschnitte humanen Nierengewebes inklusive extrahierter DNA und RNA sowie ein Gefrierschnitt humaner Leber von der Firma BioCat (BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland) bezogen. Laut Herstellerangaben wurde auch hier das Gewebe sofort nach Entnahme mittels Flüssigstickstoff gefroren. Schnitte mit einer Dicke von 5 - 10 μm wurden auf Objektträger aufgezogen und mit Aceton fixiert.

2.3 Genotypisierung der DNA

2.3.1 DNA-Isolierung

Das Gewebe wurde zunächst mittels eines Rotor-Stator-Systems sowie mehrmaligem Aufziehen in einer Injektionsspritze mit 20-Gauge-Kanüle dispergiert und homogenisiert. Die anschließende DNA-Extraktion erfolgte simultan mit der Extraktion der Gesamt-RNA mit Hilfe des AllPrep[®] DNA/RNA Mini Kits entsprechend dem Herstellerprotokoll. Konzentration und Reinheit der DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt. Einen Anhalt über die Reinheit der DNA erhält man durch den Quotienten aus den Absorptionen bei $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, der zwischen 1,7 und 1,9 liegen sollte. Für die Konzentration gilt:

$$\text{Extinktion bei 260 nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50/1000 \times \mu\text{g}/\mu\text{l} = \mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$$

Die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei -20°C.

2.3.2 Genotypisierung mittels TaqMan[®]-SNP-Assay

Die allelische Diskriminierung bezüglich verschiedener Punktmutationen erfolgte mittels TaqMan[®]-SNP-Genotyping Assay. Bei dieser Methode werden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Sonden (TaqMan[®]-Sonden) verwendet, die sich Allel-spezifisch an die zu untersuchende DNA anlagern. Der jeweilige Fluorophor (Farbstoffdonor, *reporter*) – VIC[®] oder FAM[™] – liegt dabei am 5'-Ende der Sonde, während das 3'-Ende mit einem Farbstoffakzeptor (*quencher*) markiert ist, der das Fluoreszenzsignal zunächst durch Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) unterdrückt. Bei Amplifikation der DNA mittels PCR wird durch die Exonukleaseaktivität der verwendeten Taq-Polymerase die hybridisierte Sonde abgebaut und somit der Fluorophor abgespalten. Durch die räumliche Trennung des *quenchers* vom *reporter* wird das Fluoreszenzsignal nicht mehr unterdrückt und kann nun nach entsprechender Anregung detektiert werden. Für homozygote Allelträger ergeben sich dadurch die jeweiligen reinen Fluoreszenzsignale der einzelnen Fluorophore, für heterozygote Allelträger eine Mischfluoreszenz.

Die Fluoreszenzsignale mehrerer Proben werden nach der Analyse als Wolkendiagramm (*cluster plot*) graphisch dargestellt und die entsprechenden Wolken den einzelnen Genotypen zugeordnet (**Abbildung 3**).

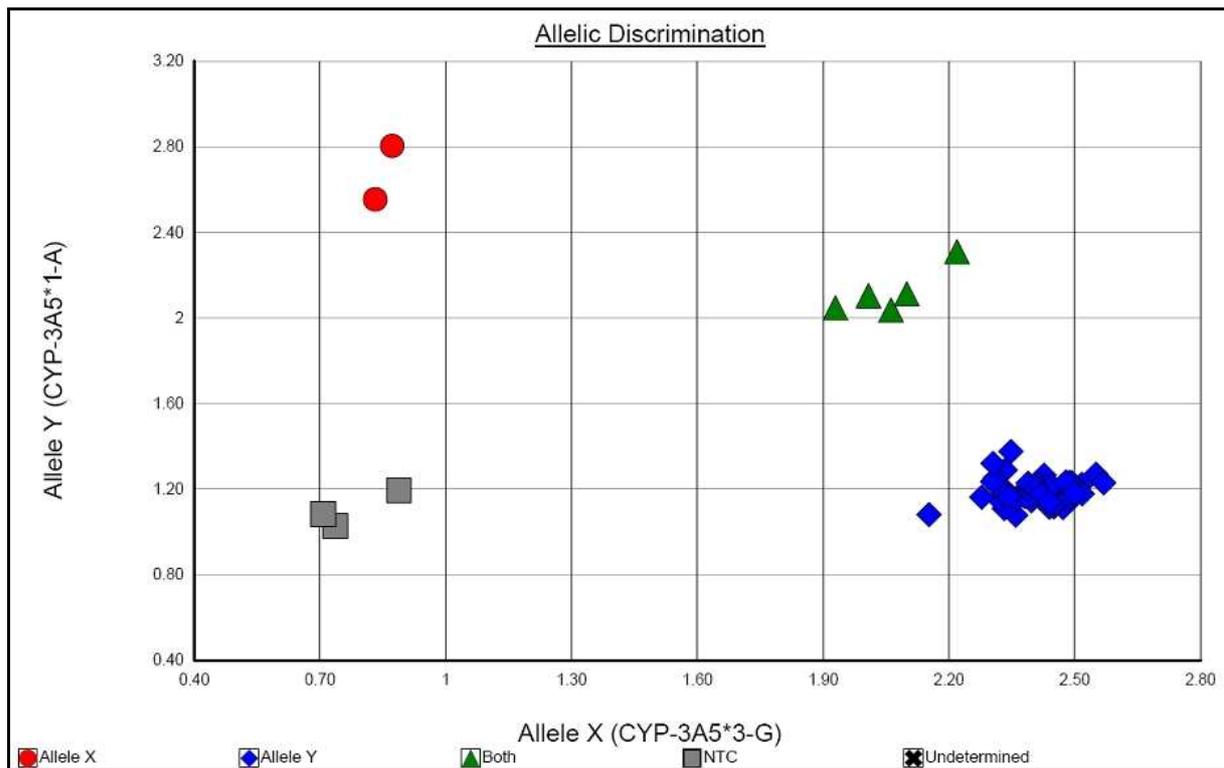


Abb. 3: Cluster plot eines TaqMan[®]-SNP-Assays zur Alleldiskriminierung des CYP3A5-SNP 6986A>G. NTC = No Template Controls. Allele X = *1-Allel. Allele Y = *3-Allel. ABI Prism[®] 7000 System Software.

2.3.2.1 Design des Assays für den CYP3A5*1/*3-Polymorphismus

Die Basensequenzen der Primer und TaqMan[®]-Sonden zur Alleldiskriminierung des CYP3A5*1/*3-Polymorphismus wurden – für alle folgenden Primer auch – mit Hilfe der Primer Express[®] Software festgelegt und durch die Firma TIB MOLBIOL GmbH (Berlin, Deutschland) synthetisiert (**Tabelle 3**). Die zugrunde liegenden Nukleotidsequenzen genomischer DNA wurden der Gendatenbank (GenBank) des *National Center for Biotechnology* (NCBI, online zugänglich unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) entnommen (108).

Tabelle 3: Zur Alleldiskriminierung von SNP 6986A>G (rs776746) verwendete Primer und Sonden

Primer	<i>Forward (sense)</i>	5'-ACCCAGCTTAACGAATGCTCTACT
	<i>Reverse (antisense)</i>	3'-GAAGGGTAATGTGGTCCAAACAG
TaqMan [®] -Sonden	<i>CYP3A5*1</i>	5'FAM-TGTCTTTCA a TATCTCTTC
	<i>CYP3A5*3</i>	5'VIC-TGTCTTTCA g TATCTCTT

Kleine dickgedruckte Buchstaben in der Basensequenz markieren den Polymorphismus.

2.3.2.2 Pre-designed Assays

Für die Polymorphismen zur Haplotypbestimmung des *CYP3A*-Blocks und des *ABCB1*-Gens wurden gebrauchsfertige, validierte Assays der Firma Applied Biosystems[™] bezogen (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Vorgefertigte TaqMan[®]-SNP-Genotyping Assays der Firma Applied Biosystems[™]

NCBI SNP Reference	Gen	Assay ID
rs4646450	<i>CYP3A5</i>	C_29771463_10
rs4646458	<i>CYP3A</i>	C_30311854_10
rs1128503	<i>ABCB1</i>	C_7586662_10
rs2032582	<i>ABCB1</i>	C_11711720C_30 ¹
		C_11711720D_40 ²
rs1045642	<i>ABCB1</i>	C_7586657_20

Für den triallelischen SNP 2677G>T/A (rs2032582) wurden zwei Assays verwendet:

¹ Alleldiskriminierung G – T. ² Alleldiskriminierung G – A. ID = *Identification*.

Die Durchführung der PCR-basierten Genotypisierung erfolgte mittels ABI Prism 7000 Sequence Detection System (**Protokoll 1**). Die Auswertung wurde anhand der ABI Prism 7000 SDS Software vorgenommen.

CYP3A5*1-Assay			pre-designed Assays	Reaktionsbedingungen
DNA-Probe (10 ng/μl)	5,0 μl		2,00 μl	<i>Pre-Read:</i> 60°C, 1 min 1. 50°C, 2 min 2. 95°C, 10 min 3. 40 Zyklen: a) 95°C, 15 s b) 59°C, 1 min <i>Post-Read:</i> 60°C, 1 min
TaqMan [®] Genotyping Master Mix	15,0 μl		2,50 μl	
F-Primer (10 μM)	1,2 μl	TaqMan [®] SNP Genotyping Assay Mix	0,25 μl	
R-Primer (10 μM)	1,2 μl			
Sonde 1 (10 μM)	0,6 μl			
Sonde 2 (10 μM)	0,6 μl			
Aqua bidest.	1,4 μl		2,25 μl	
Gesamtvolumen	25,0 μl		12,00 μl	

Protokoll 1: TaqMan[®]-SNP-Assay mit eigenen und vorgefertigten Primern. F= *Forward*. R= *Reverse*. Primerendkonzentrationen: 480 nM. Sondenendkonzentrationen: 240 nM.

2.3.3 Direkte Sequenzierung

Um die via TaqMan[®]-SNP-Assay gewonnenen Informationen bezüglich der vorliegenden Genotypen zu validieren, wurden für jeden Genotyp mindestens zwei DNA-Proben sequenziert. Die Sequenzanalyse erfolgte dabei durch die Didesoxy-/Kettenabbruchmethode (nach Sanger) und anschließender Kapillarelektrophorese mit Hilfe des ABI Prism[®] 3130 Genetic Analyzer (109). Dazu wurden zunächst in einer konventionellen PCR (siehe 2.4.2.2) die entsprechenden DNA-Fragmente amplifiziert (**Protokoll 2**) und mit Hilfe des QIAquick[®] PCR Purification Kits entsprechend dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Anschließend erfolgte der PCR-basierte Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxyribonukleotidtriphosphate (ddNTPs) neben den wie in der konventionellen PCR üblicherweise verwendeten Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs, **Protokoll 3**). Vor der automatisierten Kapillarelektrophorese wurden Verunreinigungen der Proben wie überschüssige ddNTPs, dNTPs, Primer und Salze mittels Ethanolfällung entfernt und die DNA resuspendiert in Formamid (**Protokoll 4**). Die Auswertung der Daten erfolgte mittels ABI Prism[®] Sequencing Analysis Software sowie Chromas Lite 2.01.

		Reaktionsbedingungen
DNA-Probe (10 ng/μl)	1,00 μl	<ol style="list-style-type: none"> 1. 94°C, 3 min 2. 40 Zyklen <ol style="list-style-type: none"> a) 94°C, 30 s b) 59°C, 1 min c) 72°C, 1 min 3. 72°C, 5 min 4. 4°C, 5 min
10x PCR-Puffer	2,50 μl	
MgCl ₂ (50mM)	0,75 μl	
dNTPs (2,5mM)	2,50 μl	
F-Primer (10 μM)	1,00 μl	
R-Primer (10 μM)	1,00 μl	
Taq-Polymerase (5 U/ μl)	0,25 μl	
Aqua bidest.	16,00 μl	
Gesamtvolumen	25,00 μl	

Protokoll 2: Standard-PCR-Protokoll für CYP3A5-Primer. F= Forward. R= Reverse.

		Reaktionsbedingungen
PCR-Produkt	2,0 μl	<ol style="list-style-type: none"> 1. 95°C, 2 min 2. 25 Zyklen <ol style="list-style-type: none"> a) 96°C, 15 s b) 45°C, 15 s c) 60°C, 4 min
F-Primer (10 μM)	1,5 μl	
BigDye [®] Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	2,0 μl	
Aqua bidest.	4,5 μl	
Gesamtvolumen	10,0 μl	

Protokoll 3: Einbau fluoreszenzmarkierter ddNTPs in die DNA-Fragmente.

Produkt der Sequenzierungs-PCR	10 μl	
+ Fällungsreagenz	340 μl	
		Zentrifugation (10000 rpm) für 20 min
		Überstand verwerfen
+ Ethanol 70%	200 μl	
		Zentrifugation (10000 rpm) für 5 min
		Überstand verwerfen
		Trocknen für 5-10 min
+ Formamid	20 μl	
		Denaturieren: 95°C, 5 min

Protokoll 4: Aufreinigung der DNA durch Ethanolfällung und Resuspension in Formamid.

2.4 Quantifizierung der mRNA

2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte simultan mit der DNA-Extraktion mit Hilfe des AllPrep[®] DNA/RNA Mini Kits entsprechend dem Herstellerprotokoll. Dies beinhaltet für die RNA-Isolation einen DNA-Dau der Proben mittels DNase. Konzentration sowie Integrität der Proben wurden mittels des Agilent 2100 Bioanalyzers unter Verwendung der Agilent Expert 2100 Software bestimmt. Einzelne Proben wurden zusätzlich spektrophotometrisch untersucht. Für die RNA-Konzentration gilt dabei:

$$\text{Extinktion bei 260 nm} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 / 1000 \times \mu\text{g}/\mu\text{l} = \mu\text{g RNA}/\mu\text{l}.$$

Die Lagerung der isolierten Gesamt-RNA erfolgte bei -80°C.

2.4.2 Reverse Transkription

Die Synthese des doppelsträngigen DNA-Moleküls anhand einer RNA-Matrize erfolgte mittels Reverser Transkription. Nach der eigentlichen Umschreibung der RNA in *complementary* DNA (cDNA) wird die Synthese mittels konventioneller PCR anhand des Nachweises konstitutiv exprimierter Gene (*housekeeping genes*) überprüft. Dabei dient die cDNA als Matrize.

Für die Reverse Transkription wurde das First Strand cDNA Synthesis Kit nach modifiziertem Herstellerprotokoll verwendet (**Protokoll 5**). Eingesetzt wurde jeweils 1 µg RNA, die Inkubation erfolgte mittels *Programmable Thermal Controller*. Nach Zugabe von 20 µl Diethylpyrocarbonat-behandelten Wassers (DEPC- H₂O) im Anschluss an die Reaktion liegt die Endkonzentration der cDNA bei 0,025 µg / µl. Zum Ausschluss einer möglichen DNA-Kontamination von Bestandteilen des Kits diente als Negativkontrolle ein Ansatz ohne Zugabe der Reversen Transkriptase (RT-Minus-Ansatz).

RNA	1,00 µg	Reaktionsbedingungen
Random Hexamer Primer (0,2 µg / µl)	1,00 µl	
5x reaction buffer	4,00 µl	
Ribonuklease-Inhibitor (20 U / µl)	1,00 µl	
dNTPs (10 mM)	2,00 µl	Anschließend Zugabe von 20 µl DEPC-H ₂ O. Lagerung bei -20°C.
M-MuLV reverse Transkriptase (20 U / µl)	2,00 µl	
DEPC- H ₂ O	9,00 µl	
Gesamtvolumen	20,00 µl	

Protokoll 5: Reverse Transkription nach modifiziertem Fermentas-Protokoll.

2.4.3 Konventionelle Polymerase-Kettenreaktion

Zur Überprüfung der Reversen Transkription wurde eine PCR mit Nachweis von 18S und Porphobilinogendesaminase (PBGD) anhand der cDNA-Matrize durchgeführt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Amplifikate im 1%igen Agarosegel konnten diese durch Anregung im UV-Licht als Banden sichtbar gemacht und dokumentiert werden. Intronüberspannende Primer sollten eine Amplifikation genomischer DNA ausschließen. Eine Wasserprobe ohne Zugabe von cDNA diente als Negativkontrolle. Verwendete Primer und das PCR-Protokoll sind nachfolgend in **Tabelle 5** bzw. **Protokoll 6** dargestellt.

Tabelle 5: Für den PCR-Nachweis von 18S und PBGD verwendete Primer

18S	<i>Forward</i>	5´- CGAAAGCATTTGCCAAGAATG
	<i>Reverse</i>	3´- AGCATGCCGAGAGTCTCGT
PBGD	<i>Forward</i>	5´- CCACGTGTCCCCGGTACTC
	<i>Reverse</i>	5´- GATGGTGAAGCCAGGAGGAA

		Reaktionsbedingungen	
		18S	PBGD
DNA-Probe (10 ng/μl)	1,00 μl		
10x PCR-Puffer	2,50 μl		
MgCl ₂ (50mM)	0,75 μl		
dNTPs (2,5mM)	2,50 μl	1. 94°C, 3 min	1. 94°C, 3 min
F-Primer (10 μM)	1,00 μl	2. 40 Zyklen	2. 40 Zyklen
R-Primer (10 μM)	1,00 μl	a) 94°C, 30 s	a) 94°C, 30 s
Taq-Polymerase (5 U/ μl)	0,25 μl	b) 59°C, 1 min	b) 62°C, 1 min
Aqua bidest.	16,00 μl	c) 72°C, 1 min	c) 72°C, 1 min
Gesamtvolumen	25,00 μl	3. 72°C, 5 min	3. 72°C, 5 min
		4. 4°C, 5 min	4. 4°C, 5 min

Protokoll 6: Standard-PCR-Protokoll mit 18S- und PBGD-Primern. F= *Forward*. R= *Reverse*.

2.4.4 Quantitative Realtime-PCR

Bei der RT-qPCR werden die entsprechenden Daten im Gegensatz zur konventionellen PCR nicht an einem definierten Endpunkt sondern über den gesamten Versuchsverlauf gesammelt. Während der Amplifikation werden Fluoreszenzsignale, die proportional zur Kopienanzahl der Matrize zunehmen, detektiert und anschließend als sigmoidaler Kurvenverlauf dargestellt. Da der Zeitpunkt (angegeben als Zykluszahl) der Überschreitung eines Schwellenwertes (*cycle threshold*, Ct-Wert) während der exponentiellen Signalzunahme abhängig von der initial eingesetzten cDNA-Menge ist, können so auch Rückschlüsse auf die Menge zuvor revers transkribierter mRNA gezogen werden. Die relative Quantifizierung kann mittels $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, d.h. dem direkten Vergleich der Ct-Werte zwischen Ziel- und Referenzgen sowie eines endogenen Kontrollgens (*housekeeper*) oder nach der Standardkurvenmethode erfolgen. Bei letzterer Methode werden aus der Kurve einer cDNA definierter Konzentration (Referenzstandard) die Konzentrationen der zu untersuchenden Proben extrapoliert. Für die Fluoreszenzmarkierung der Zielsequenz können sowohl unspezifische DNA-Farbstoffe (SYBR[®] Green) als auch sequenzspezifische FRET-Sonden (TaqMan[®]-Sonden, Molecular Beacons, Scorpion Primer) verwendet werden.

2.4.4.1 Verwendung spezifischer TaqMan[®]-Sonden

Es wurden analog zum Prinzip der TaqMan[®]-SNP-Genotypisierung Oligonukleotid-Sonden generiert, die spezifisch an cDNA-Sequenzen binden und erst nach Abspaltung durch die Taq-Polymerase (und damit räumlicher Trennung des *reporters* vom *quencher*) ein detektierbares Fluoreszenzlicht emittieren. Diese liegen dabei innerhalb der durch die Primer determinierten Amplifikatsequenz. Das Primerdesign selbst erfolgte über die Grenzen zweier benachbarter Exone hinaus (intronüberspannend) um eine Vervielfältigung genomischer DNA auszuschließen. Die zugrunde liegenden mRNA-Nukleotidsequenzen wurden analog zu den DNA-Sequenzen der NCBI-GenBank entnommen (108). Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer und Sonden sind in **Tabelle 6** dargestellt.

Tabelle 6: Nukleotidsequenzen der in der Realtime-PCR verwendeten Primer und TaqMan[®]-Sonden

CYP3A5*1	<i>Forward-Primer</i>	5'- TCGTCAGGGTCTCTGGAAATTT
NM_000777 ¹	<i>Reverse-Primer</i>	3'- TCTGATCACGTCGGGATCTG
	TaqMan [®] -Sonde	5'FAM- AAGTATGGAAAAATGTGGGGAACGTATGAAGGT
PBGD	<i>Forward-Primer</i>	5'- CCACACACAGCCTACTTTCCAA
NM_000190 ¹	<i>Reverse-Primer</i>	3'- ACGCGAATCACTCTCATCTTTG
	TaqMan [®] -Sonde	5'FAM- CCATGTCTGGTAACGGCAATGCGG
CYP3A4 _{exon} ²	<i>Forward-Primer</i>	5'- GAACTGAATGAGAACCAACAAGTAAA
NM_017460 ¹	<i>Reverse-Primer</i>	3'- CAATGGGCAAAGTCACAGTGGAT
	TaqMan [®] -Sonde	5'FAM- TTTGGTCATTGTAATCACTGTTGGCGTGG

¹Accession number der NCBI-Datenbank. ²Assay für die Amplifizierung von CYP3A4-cDNA und -DNA.

Da für CYP3A4 keine intronüberspannenden Primer generiert werden konnten, die spezifisch für das Isoenzym 4 der Subfamilie CYP3A wären, wurden zwei TaqMan[®]-Assays konstruiert.

Mithilfe des ersten Ansatzes sollten zunächst CYP3A4-cDNA und -DNA amplifiziert werden (**Tabelle 6**, CYP3A4_{exon}). Der zweite Ansatz wurde mittels intronischer Primer so gewählt, dass ausschließlich der DNA-Gehalt gemessen wurde (**Tabelle 7**, CYP3A4_{intron}). Nach Berechnung der entsprechenden Kopienanzahlen aus beiden Läufen konnte die Anzahl der CYP3A4-Transkripte durch Subtraktion beider Werte bestimmt werden.

2.4.4.2 Verwendung des DNA-Farbstoffs SYBR[®] Green

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green weist eine hohe Affinität zu doppelsträngiger DNA auf. Ohne direkt zu interkalieren, lagert sich der Farbstoff in der kleinen Furche der Doppelhelix an. Während einer PCR kann so die Akkumulation doppelsträngiger Nukleinsäuren sichtbar gemacht werden, weil erst das gebundene SYBR[®] Green deutlich fluoresziert. Da jedoch auch unspezifische Nebenprodukte der PCR zur Intensität des Fluoreszenzsignals beitragen können, wird an den eigentlichen Lauf der RT-qPCR eine Schmelzkurvenanalyse angeschlossen, mit der überprüft wird, ob es sich um ein einzelnes Produkt handelt. In **Tabelle 7** sind die Nukleotidsequenzen der Primer dargestellt, die für die Quantifizierung mittels SYBR[®] Green verwendet wurden.

Tabelle 7: Nukleotidsequenzen der für SYBR[®] Green-Assays verwendeten Primer

ENaC α	<i>Forward-Primer</i>	5'- CGTGACCAGCTACCAGCTCTCT
NM_001038 ¹	<i>Reverse-Primer</i>	3'- TGACTTTGGCCACTCCATTTC
SGK1	<i>Forward-Primer</i>	5'- TGCAAGGAGAACATTGAACACAA
NM_005627 ¹	<i>Reverse-Primer</i>	3'- AGCACCTCAGGTGCGAGATAC
CYP3A4 _{intron} ²	<i>Forward-Primer</i>	5'- TCCTCCTAGTCCAGGGC
NC_000007 ¹	<i>Reverse-Primer</i>	3'- AACTCAATGATTTAATGGCAAA

¹Accession number der NCBI-Datenbank. ²Assay für die Amplifizierung von CYP3A4-DNA.

2.4.3.3 Quantitative Datenanalyse

Die relative Quantifizierung mittels RT-qPCR wurde nach der Standardkurvenmethode durchgeführt. Dazu wurden in einer konventionellen PCR im Vorfeld für jedes Zielgen Standards generiert, die etwa 250 bis 450 bp lang waren (**Tabelle 8**).

Tabelle 8: Nukleotidsequenzen der für die cDNA-Standardgenerierung verwendeten Primer

CYP3A5	<i>Forward-Primer</i>	5'- AAATTTGGCGGTGGAAACC
NM_000777 ¹	<i>Reverse-Primer</i>	3'- AAATCCCCTGGGCCTAAAGAC
CYP3A4 ² _{exon}	<i>Forward-Primer</i>	5'- CATTATATCACATGTTTTCTCTGGA
NM_017460 ¹	<i>Reverse-Primer</i>	3'- GTGAGCCACTGTGCCTGA
ENaCa	<i>Forward-Primer</i>	5'- AGGAGTGTGGCTGTGCCTACA
NM_001038 ¹	<i>Reverse-Primer</i>	3'- GCCATCTCCACCACAGACAAC
SGK1	<i>Forward-Primer</i>	5'- ACCTGCATTCACTGAACATCGTT
NM_005627 ¹	<i>Reverse-Primer</i>	3'- CGGCAGGCCATACAGCAT
PBGD	<i>Forward-Primer</i>	5'- CCACGTGTCCCCGGTACTC
NM_000190 ¹	<i>Reverse-Primer</i>	3'- GATGGTGAAGCCAGGAGGAA

¹Accession number der NCBI-Datenbank. ²Assay für die Amplifizierung von CYP3A4-cDNA und DNA.

Für jeden dieser ursprünglichen Standards (S0) erfolgte eine Aufreinigung mit Hilfe des QIAquick[®] PCR Purification Kits sowie die erste Verdünnung (1:1000, in Aqua bidest.) zur Generierung von S1. Für alle weiteren Standards (S2-S7) wurde eine Verdünnung von 1:10 benutzt. Die eigentliche Quantifizierung erfolgte dann für die Standards S1 bis S7 im Sinne einer *nested* (verschachtelten) PCR mit innerhalb des ersten Produkts liegenden Primern und einer finalen Länge von ca. 100 bp. Anhand der Konzentrationsmessung aller Ursprungsstandards (S0) mittels Nanodrop konnten unter Kenntnis der Basenpaaranzahl der zugrunde liegenden Nukleotidsequenzen die Kopienanzahlen für alle Standards berechnet werden und für die Extrapolation der zu quantifizierenden cDNA-Proben benutzt werden.

Um eventuelle Schwankungen in der Menge der eingesetzten RNA bzw. der Effizienz der Reversen Transkription auszugleichen, wurden alle ermittelten Werte (Transkriptanzahlen) durch die Anzahl der Kopien einer endogenen Referenz (*housekeeping* Gen) geteilt. Dafür wurde PBGD benutzt, da es im Vergleich mit den ebenfalls als endogene Kontrollen benutzten Genen 18S und HPRT1 die geringste Varianz zeigte. Die Durchführung der RT-qPCR erfolgte mittels des ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems. Die Reaktionsansätze und -bedingungen der Quantifizierungen sind sowohl für die Verwendung spezifischer TaqMan[®]-Sonden als auch von SYBR[®]-Green-Farbstoff nachfolgend in **Protokoll 7 und 8** dargestellt. Durch unabhängige Variierung der eingesetzten *forward*- und *reverse*-Primer bei gleich bleibenden Reaktionsbedingungen wurden die einzelnen Assays optimiert (110). Die Auswertung wurde anhand der ABI Prism 7000 SDS Software vorgenommen.

cDNA-Probe (25 ng/μl)	1,0 μl	Reaktionsbedingungen 1. 50°C, 2 min 2. 95°C, 10 min 3. 45 Zyklen a) 95°C, 15 s b) 60°C, 1 min
TaqMan [®] 2xUniversal PCR Master Mix	12,5 μl	
F-Primer (10 μM)	0,75 μl	
R-Primer (10 μM)	0,75 μl	
TaqMan [®] -Sonde (10 μM)	0,25 μl	
Aqua bidest.	9,75 μl	
Gesamtvolumen	25,0 μl	

Protokoll 7: Quantitative Realtime-PCR mit spezifischen TaqMan[®]-Sonden. F=*Forward*. R=*Reverse*.

	ENaC α	SGK1	CYP3A4	
cDNA-Probe (25 ng/ μ l)	1,00 μ l	1,00 μ l	1,00 μ l	Reaktionsbedingungen 1. 95°C, 1,5 min 2. 45 Zyklen a) 95°C, 15 s b) 56°C, 40 s c) 72°C, 30 s 3. 95°C, 15 s 4. 60°C, 20 s 5. 95°C, 15 s
TAQurate™ Real-Time PCR Master Mix	12,50 μ l	12,50 μ l	-	
Passive Reference Dye	1,00 μ l	1,00 μ l	-	
Power SYBR® Green PCR Master Mix	-	-	12,50 μ l	
F-Primer (10 μ M)	0,75 μ l	0,75 μ l	2,25 μ l	
R-Primer (10 μ M)	0,75 μ l	2,25 μ l	2,25 μ l	
Aqua bidest.	10,00 μ l	8,50 μ l	7,00 μ l	
Gesamtvolumen	26,00 μ l	26,00 μ l	25,00 μ l	

Protokoll 8: Quantitative Realtime-PCR mit SYBR® Green. F=Forward. R=Reverse.

2.5 Lokalisierung des Proteins CYP3A5

2.5.1 Western blots zur Untersuchung der Antikörperspezifität

Die für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendeten polyklonalen Antikörper anti-CYP3A4 und anti-CYP3A5 (Abcam®, Cambridge, UK) wurden mittels Western blot hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht. Für die Bereitstellung der entsprechenden Enzyme CYP3A4, CYP3A5 und CYP3A7 wurden BD™ Supersomes (Becton Dickinson GmbH) verwendet. Dabei handelt es sich um Insektenzellmikrosomen, die nach Baculovirus-Infektion jeweils nur ein rekombinant cDNA-exprimiertes CYP3A-Isoenzym enthalten.

2.5.1.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Ziel der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ist die elektrophoretische Auftrennung der einzelnen Bestandteile eines Proteingemischs in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße. Dazu wurde zunächst ein Trenngel hergestellt, das wiederum mit einem Sammelgel beschichtet wurde (**Protokoll 9**). Nach Polymerisation beider Gele wurden diese in einer mit 1x *Running Buffer* befüllten Elektrophoresekammer eingespannt. Vor Befüllung der Geltaschen wurde Laemmli-Puffer (hergestellt aus β -Mercaptoethanol und Laemmli Sample Buffer im Mischungsverhältnis 1:20) zu gleichen Anteilen mit dem Probenmaterial gemischt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Für jedes Isoenzym wurde eine Spur mit 4 pmol und eine Spur mit 8 pmol Protein benutzt. Zur Größeneinordnung der finalen Banden wurde der Längenstandard Precision Plus Protein™ mitgeführt. Der Transfer der Proteine in das Sammelgel erfolgte für etwa 5-10 min bei einer Spannung von 100V. Danach fand die Auftrennung im Trenngel bei einer Spannung von 120V für ca. 40-60 min statt. Das Sammelgel wurde anschließend verworfen.

SDS-Trenngel, 10%		SDS-Sammelgel, 5%	
30% Acrylamid (Rotiphorese Gel)	5,00 ml	30% Acrylamid (Rotiphorese Gel)	830 μ l
Aqua bidest.	6,00 ml	Aqua bidest.	2,80 ml
1,5 M Trenngel pH 8,8	3,75 ml	0,5 M Sammelgel pH 6,8	1,25 ml
10% SDS (denaturiert: 95°C, 5 min)	150 μ l	10% SDS (denaturiert: 95°C, 5 min)	50 μ l
10% APS	150 μ l	10% APS	50 μ l
TEMED	15 μ l	TEMED	5 μ l
Gesamtvolumen	15,065 ml	Gesamtvolumen	4,985 ml

Protokoll 9: Herstellung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

2.5.1.2 Western-/ Immunoblot

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für etwa 10 min in Transferpuffer (*Semi Dry Buffer*) äquilibriert. Anschließend wurde ein Blot *sandwich*, bestehend aus Filterpapier, Polyacrylamidgel und Whatman[®] Nitrocellulosemembran, alle getränkt in Transferpuffer, in folgender Reihenfolge zwischen die Elektroden des *Semi-Dry Blotters* angeordnet:

Kathode (-)
Filterpapier
Filterpapier
Filterpapier
Polyacrylamidgel
Nitrocellulosemembran
Filterpapier
Filterpapier
Filterpapier
Anode (+)

Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte bei 600 mA (5 mA/cm^2) für etwa 20 min. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine im Gel sowie der Transfer auf die Membran wurden nach dem Blotten durch Färbung mit Ponceau S überprüft. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran, wurde für 1 h mit 5% *Non-fat dry milk* in TBS-Tween[®] (NFDM-TBST) geblockt. Für die Bindung des Primärantikörpers an die entsprechenden Antigene wurde dieser 1:4000 in 1% NFDM-TBST verdünnt und mit der Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden überschüssige Antikörperreste durch dreimaliges Waschen für jeweils 5 min mit TBST entfernt, bevor die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper (anti-Kaninchen IgG #A6154, Sigma-Aldrich), 1:4000 verdünnt in 0,5% *Non-fat dry milk* in TBS (NFDM-TBS), für 1 h bei Raumtemperatur stattfand. Nach erneutem Waschen (dreimalig à 10 min mit TBST) wurde die Membran schließlich mit dem Peroxidasesubstrat, SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate, für 5 min inkubiert. Die Membran wurde in Frischhaltefolie luftblasenfrei verpackt und das Chemilumineszenzsignal durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

2.5.2 Immunhistochemie

2.5.2.1 Immunhistochemische Anfärbung von Gefrierschnitten

Die bereits mit Aceton vorfixierten und anschließend bei -80°C gelagerten Schnitte humanen Gewebes wurden zunächst für etwa 5 min luftgetrocknet. Nach einem Waschschrift mit TBS (dreimal für jeweils 5 min) wurde eine mögliche endogene Peroxidaseaktivität mit 0,3% H_2O_2 in Methanol für 30 min geblockt. Das im ImmPRESSTM Anti-Rabbit Ig Polymer Detection Kit enthaltene normale Pferdeserum (*ready-to-use normal horse serum blocking solution*) wurde mit einer Inkubationszeit von 20 min verwendet, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu vermeiden. Der Primärantikörper wurde im Verhältnis 1:500 in 1%-igem Bovinen Serumalbumin (BSA) in TBS verdünnt und die Gefrierschnitte damit über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden überschüssige Reste des Primärantikörpers durch einen Waschschrift (dreimalig in TBS à 5 min) entfernt. Anschließend erfolgte für 30 min die Inkubation mit dem ebenfalls im ImmPRESSTM Anti-Rabbit Ig Polymer Detection Kit enthaltenen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (*ready-to-use ImmPRESSTM reagent anti-rabbit Ig*). Nach einem erneuten Waschschrift (TBS, dreimal à 5 min) wurde das DAB Peroxidase Substrate Kit nach den Herstellervorgaben zur farblichen Markierung des Antigen-Primärantikörper-Sekundärantikörper-Komplexes verwendet. Um eine grau-schwarze Färbung anstelle einer braunen zu erhalten, wurde die optional enthaltene Nickellösung hinzugegeben. Anschließend wurden die Schnitte in Wasser für 5 min gespült. Danach erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 1 min, sowie das anschließende Bläuen unter fließendem Wasser für 5 min. Die Schnitte wurden mit Hilfe des Arcturus[®] HistoGene[®] Frozen Section LCM Staining Kit in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (95% und 100% Ethanol, jeweils 2-3x für 3 min) und anschließend in Xylol überführt (2x, je 5 min). Zur Eindeckelung der Objektträger wurde VectaMountTM Permanent Mounting Medium verwendet. Getrocknet wurden die Schnitte abschließend im Brutschrank für ca. 1 h bei 55°C . Die Auswertung und digitale Fotografie der Schnitte erfolgte mit Hilfe des Photomikroskops Axiophot.

2.5.2.2 Immunhistochemische Anfärbung von Paraffinschnitten

Die immunhistochemische Anfärbung von Paraffinschnitten humaner Niere unter Verwendung des bereits zuvor beschriebenen polyklonalen CYP3A5-Antikörpers erfolgte in einer Kooperation mit der Universität Leiden, Niederlande. Es wurden 20 verschiedene Nierenbiopsien untersucht sowie sieben weitere Nierenproben der Stiftung Eurotransplant. Für die weitere Analyse wurden die qualitativ hochwertigsten Gewebeschnitte verwendet. Die Genotypisierung der Nierenproben erfolgte in unserem Labor nach dem bereits für die anderen DNA-Proben humaner Nieren benutzten Protokoll. Alle weiteren Schritte, angefangen von der Bereitstellung der Nierenproben, im Folgenden die Paraffinisierung und Anfärbung der Schnitte sowie abschließend die bildliche Auswertung der Ergebnisse erfolgte freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Emile de Heer, Pathologisches Institut, Universität Leiden. Der Verwendung der Daten in der vorliegenden Arbeit wurde durch den Arbeitsgruppenleiter zugestimmt.

2.6 Statistische Auswertung der Daten

Die Angabe konkreter Werte erfolgt als Mittelwert (*MW*) \pm Standardfehler (*SEM*) oder Prozent (%). Die Überprüfung der Häufigkeitsverteilungen der ermittelten Genotypen hinsichtlich des Hardy-Weinberg-Äquilibrium erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test. Unterschiede in den Patientencharakteristika zwischen *CYP3A5*1*-Allelträgern und homozygoten *CYP3A5*3*-Individuen wurden für den Vergleich kategorialer Variablen untereinander mittels exaktem Chi-Quadrat-Test nach Fisher, andernfalls mittels Mann-Whitney-U-Test oder ANOVA ermittelt. Potentielle Korrelationen wurden mit Hilfe der Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman und Pearson evaluiert. Die Höhe der Expression verschiedener Gene in Abhängigkeit von *CYP3A5*-Genotyp, *CYP3A*-Haplotyp oder *ABCB1*-Haplotyp wurde entsprechend der Normalverteilung der Daten durch Mann-Whitney-U-Test oder T-Test ausgewertet. Eine statistische Signifikanz wurde für einen *p*-Wert $< 0,05$ angenommen. Für die Anwendung der verschiedenen statistischen Testverfahren wurde SPSS, Version 15.0 verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Klinische Daten der Kohorte

Die retrospektiv anhand der urologischen Krankenakten der Patienten ermittelten Charakteristika sind sowohl für die Gesamtpopulation als auch in Abhängigkeit vom *CYP3A5**1-Allelstatus in **Tabelle 9** veranschaulicht.

Tabelle 9: Charakteristika der Patienten als Kollektiv sowie unterteilt nach *CYP3A5**1-Allelstatus

	<i>CYP3A5</i> *1-Allelstatus		
	Gesamt	*1-Träger	*3/*3
Anzahl (<i>n</i>)	102	13	89
Anteil Frauen (%)	38,2	30,8	39,3
Alter (Jahre)	63,9 ± 1,0	60,9 ± 2,2	64,4 ± 1,0
Hypertonus (%)	56,9	46,2	58,4
SBD (mmHg) ¹	134 ± 2,5	129 ± 5,6	135 ± 2,7
DBD (mmHg) ¹	79 ± 1,1	79 ± 2,4	79 ± 1,2
Medikation (<i>n</i>)	3,1 ± 0,3	2,2 ± 0,6	3,3 ± 0,3
Grunderkrankung ²	83,3% NCC	76,9% NCC	84,3% NCC

Daten sind angegeben als *MW* ± *SEM*. 1 - Systolischer Blutdruck, SBD, und diastolischer Blutdruck, DBD, stammen von normotensiven Patienten. 2 - Grunderkrankungen umfassen Nierenzellkarzinom, NCC, Von-Hippel-Lindau-Syndrom, Onkozytome, Adenokarzinome sowie Urothelkarzinome.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in Geschlecht, Alter, Häufigkeit des diagnostizierten Hypertonus, Blutdruck (SBD und DBD) der normotensiven Individuen (*n*=41) sowie Anzahl verschriebener Medikamente zwischen *CYP3A5**1-Allelträgern und *CYP3A5**3/*3-Individuen festgestellt werden. Vier Patienten nahmen Medikamente ein, die potenziell induzierend bzw. inhibitorisch auf *CYP3A* wirken können.

Die Identifikation der CYP3A-beeinflussenden Medikation erfolgte mit Hilfe des *Cytochrome P450 Drug Interaction Table*, zur Verfügung gestellt durch die *Indiana University School of Medicine*, und des *Table of Substrates, Inhibitors and Inducers* der *U.S. Food and Drug Administration* (14, 15). Entsprechende Unterschiede im mRNA-Gehalt von CYP3A5 wurden jedoch nicht beobachtet.

3.2 CYP3A5*1/*3-Genotypverteilung in den humanen Nieren

Nach Extraktion der DNA aus Gefrierschnitten gesunden Nierengewebes von $n=102$ nephrektomierten Patienten wurde diese hinsichtlich des CYP3A5-SNPs 6986A>G (rs776746) mittels TaqMan[®]-SNP-Assay untersucht. Bezüglich der Genotypen konnten dabei zwei Individuen als homozygot für das *1-Allel, elf als heterozygote *1-Allelträger und 89 als homozygote *3/*3-Individuen identifiziert werden (**Abbildung 4**). Die daraus ermittelten Allelfrequenzen betragen 7,4% für das CYP3A5*1-Allel und 92,6% für das CYP3A5*3-Allel. Die Häufigkeitsverteilung entspricht dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium ($p=0,109$).

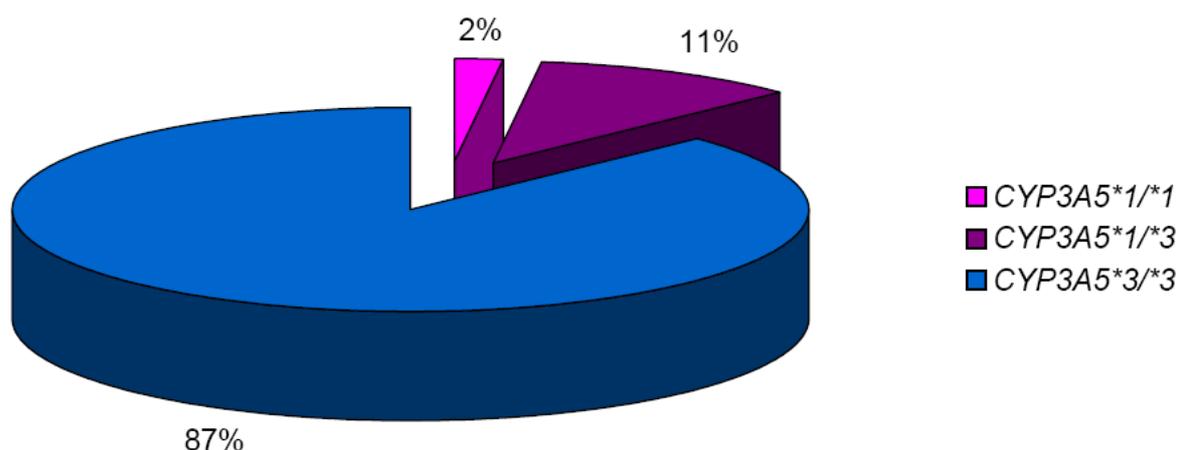


Abb. 4: Verteilung der Genotypen des CYP3A5*1/*3-Polymorphismus in humanen Nieren.

Aufgrund der geringen Allelfrequenz des *CYP3A5*-Wildtyp-Allels werden im weiteren Verlauf der Ergebnisdarstellung die homozygoten *CYP3A5**1/*1-Individuen mit den heterozygoten *1-Allelträgern mit Genotyp *CYP3A5**1/*3 als *CYP3A5**1-Allelträger zusammengefasst und mit den homozygoten *CYP3A5**3/*3-Individuen verglichen.

Zur Bestätigung der richtigen Zuordnung der entsprechenden Daten aus dem TaqMan[®]-SNP-Assay wurden einzelne Proben jedes Genotyps mittels Sequenzierung hinsichtlich der Punktmutation untersucht (**Abbildung 5**).

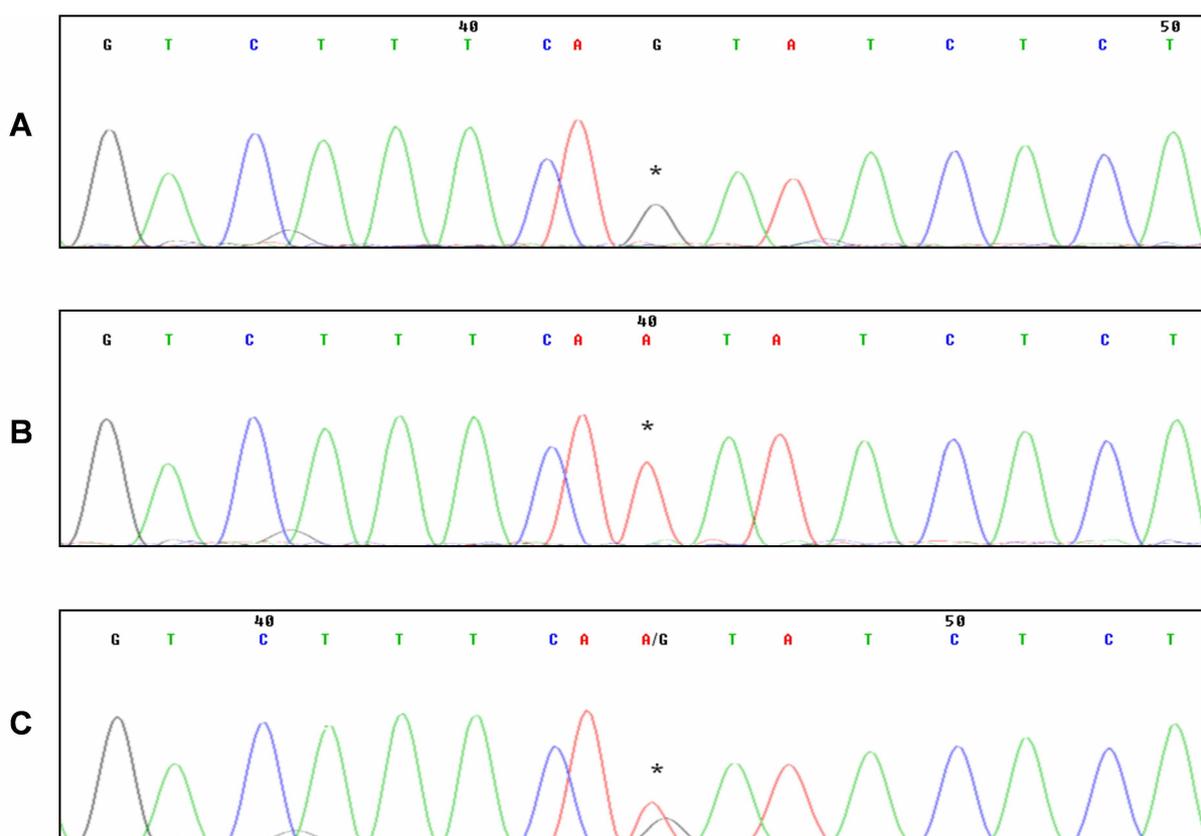


Abb. 5: Sequenzchromatogramme zur Bestätigung der via TaqMan[®]-SNP-Assay ermittelten Genotypen. A bzw. G an Position * steht für das Vorliegen des *CYP3A5**1- bzw. *3-Allels. Chromas Lite 2.01.

A – Individuum mit *CYP3A5**3/*3-Genotyp (homozygot).

B – Individuum mit *CYP3A5**1/*1-Genotyp (homozygot).

C – Individuum mit *CYP3A5**1/*3-Genotyp (heterozygot).

3.3 Phänotypische Analysen

3.3.1 Genexpressionsanalyse CYP3A5

Nach Extraktion der mRNA aus den Gefrierschnitten wurde diese für weitere Analysen revers transkribiert. Die Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte mittels RT-qPCR. Für CYP3A5 wurde dabei eine für die Sequenz der Wildtyp-mRNA spezifische TaqMan[®]-Sonde verwendet. Als konstitutiv exprimiertes Referenzgen (sogenanntes *housekeeping* Gen) wurde PBGD benutzt. Die relative mRNA-Expression wird angegeben als Anzahl der CYP3A5-Transkripte geteilt durch die Anzahl der PBGD-Transkripte.

Messbare Spiegel der CYP3A5-Wildtyp-mRNA wurden für $n=93$ Nierenproben ermittelt. Darunter befanden sich zwei homozygote und zehn heterozygote *CYP3A5**1-Allelträger sowie 81 *CYP3A5**3/*3-Individuen. In Abhängigkeit vom *CYP3A5*-Genotyp ergaben sich signifikante Unterschiede in der Höhe der CYP3A5-mRNA-Spiegel (**Abbildung 6**). So zeigte sich eine fast dreimal so hohe CYP3A5-Expression in den homozygoten verglichen mit den heterozygoten *CYP3A5**1-Allelträgern ($5,18 \pm 0,342$ versus $1,74 \pm 0,312$; $p=0,03$), während die relative mRNA-Menge der heterozygoten *CYP3A5**1-Allelträger die der *CYP3A5**3/*3-Individuen sogar um das mehr als sechsfache überstieg ($1,74 \pm 0,312$ vs. $0,28 \pm 0,030$; $p<0,001$). Insgesamt übertraf damit die CYP3A5-mRNA-Expression der *CYP3A5**1/*1- und *CYP3A5**1/*3-Individuen, zusammen betrachtet als *CYP3A5**1-Allelträger, die der Gruppe mit Genotyp *CYP3A5**3/*3 um das mehr als achtfache ($2,32 \pm 0,455$ vs. $0,28 \pm 0,030$; $p<0,001$). Der interindividuelle Variationskoeffizient (CV%) lag bei 169% für die Gesamtpopulation und bei 9%, 57% und 95% jeweils für die Genotypen *1/*1, *1/*3 und *3/*3. Mit CYP3A5/PBGD-Quotienten von 0,009 bis 5,7 variierte die Expression insgesamt um das mehr als 600fache.

In der Korrelationsanalyse der Daten aus der CYP3A5-mRNA-Quantifizierung mit verhältnisskalierten Patientenmerkmalen ließ sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der CYP3A5-mRNA-Expression und Alter, SBD oder DBD nachweisen.

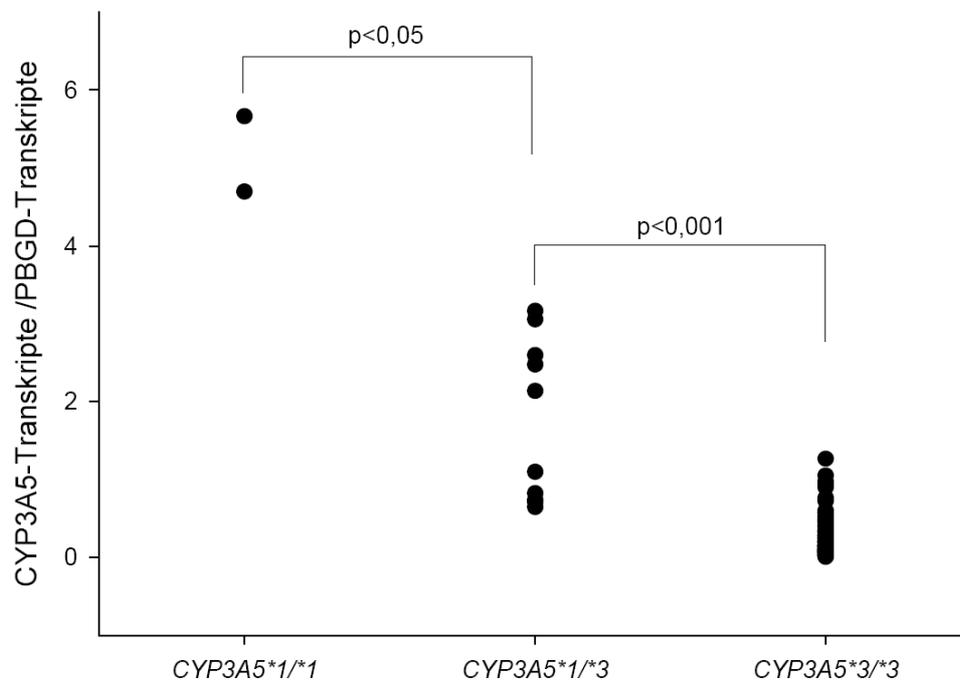


Abb. 6: Genotyp-abhängige mRNA-Expression von CYP3A5 für $n=93$ Nierenproben.

3.3.2 Genexpressionsanalysen für CYP3A4, ENaC α und SGK1

3.3.2.1 CYP3A4

Mithilfe der BLAST-Analyse des NCBI (bl2seq, online zugänglich unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) wurden die Basensequenzen der mRNA unter den vier Mitgliedern der Subfamilie 3A des humanen Cytochrom-P450-Systems verglichen und sind als prozentuale Homologie in **Tabelle 10** dargestellt (111).

Tabelle 10: Homologie der mRNA-Sequenzen der humanen CYP3A-Isoenzyme mittels BLAST

	CYP3A4 NM_017460 ¹	CYP3A5 NM_000777 ¹	CYP3A7 NM_000765 ¹	CYP3A43 ² NM_022820 ¹
CYP3A4	—	88%	92%	82%
CYP3A5	88%	—	87%	82%
CYP3A7	92%	87%	—	80%
CYP3A43	82%	82%	80%	—

1 - *Accession number* der NCBI-Datenbank. 2 - Für den Vergleich wurde Transkriptvariante 1 gewählt (mit 2167bp die längste mRNA-Sequenz der drei CYP3A43-Transkriptvarianten).

Um eine möglichst spezifische Amplifikation der CYP3A4-cDNA mittels RT-qPCR zu erzielen, wurden die Primer für das 3'-Ende der mRNA-Sequenz innerhalb von Exon 13 konstruiert, da dieser Sequenzabschnitt (etwa 600bp) in allen anderen CYP3A-Isoenzymen fehlt. Die üblicherweise durch Exon-überspannende Primer angestrebte mRNA-Spezifität konnte dadurch jedoch nicht mehr gesichert werden, weshalb zusätzlich intronische - also DNA-spezifische - Primer generiert wurden. Nach Ermittlung aller Kopienanzahlen in beiden Durchläufen wurde die Anzahl der mRNA-Transkripte durch Abzug der mittels intronischer Primer gemessenen DNA-Kopien von der Kopienanzahl mittels exonischer Primer berechnet:

$$[\text{Kopienanzahl}_{\text{mRNA}}] = [\text{Kopienanzahl}_{\text{mRNA+DNA}}] - [\text{Kopienanzahl}_{\text{DNA}}]$$

Entsprechende Werte konnten ermittelt werden für $n=95$ Nierenproben mit starken interindividuellen Schwankungen in der Höhe der mRNA-Expression ($CV\%=298\%$). Bei einem mittleren CYP3A4/PBGD-Quotienten von $0,06 \pm 0,019$ entsprach die renale Expression der CYP3A4-mRNA nur etwa einem Fünftel der mRNA-Expression von CYP3A5 in Nierenschnitten mit $*3/*3$ -Genotyp ($0,28 \pm 0,030$; $p<0,001$, **Abbildung 7**). Zwischen zwölf CYP3A5*1-Allelträgern und 83 CYP3A5*3/*3-Individuen war kein Unterschied in der mRNA-Expression von CYP3A4 zu beobachten ($0,05 \pm 0,028$ vs. $0,06 \pm 0,021$; $p=0,788$).

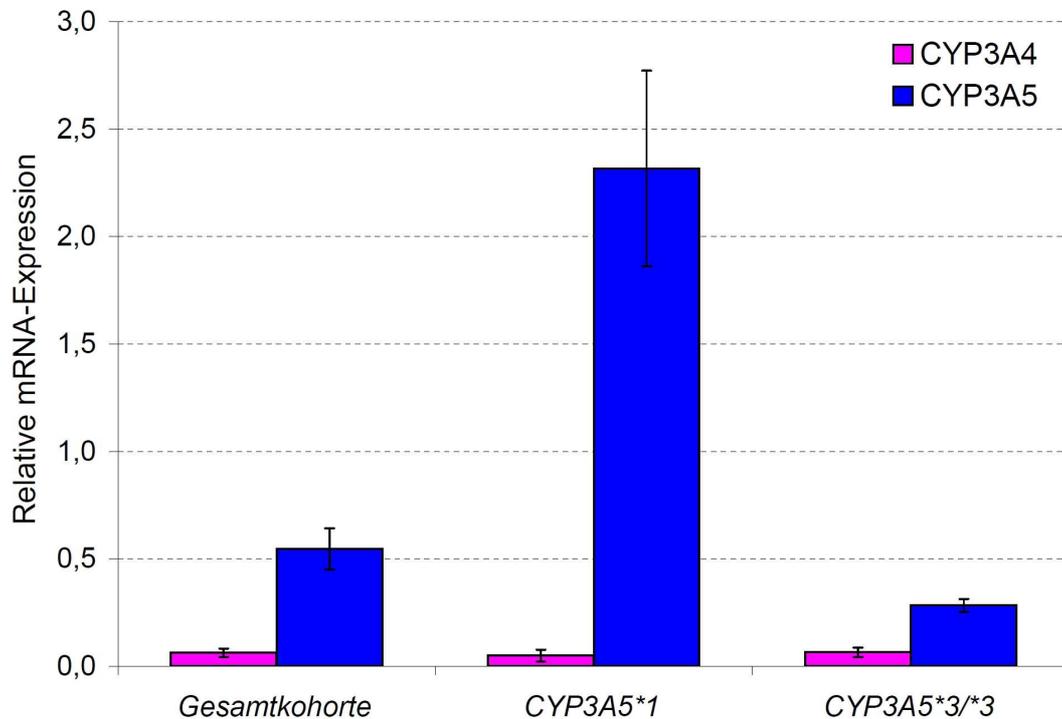


Abb. 7: Vergleich der Höhe der mRNA-Expression von CYP3A4 und CYP3A5 in der Niere. Die relative mRNA-Expression entspricht der CYP3A-/PBGD-Transkriptanzahl. Dargestellt sind $MW \pm SEM$.

3.3.2.2 ENaC α

Die mRNA-Expression von ENaC α wurde durch RT-qPCR mittels SYBR[®]Green-Farbstoff bestimmt. Bei $n=93$ Nierenproben lag der mittlere ENaC α /PBGD-Quotient bei $2,04 \pm 0,211$ ($CV\%=100\%$). Wie in Abbildung 10 veranschaulicht, ist die ENaC α -Expression damit etwa auf dem Niveau des mittleren CYP3A5-mRNA-Spiegels bei CYP3A5*1-Allelträgern ($2,32 \pm 0,455$, $p=0,465$). Im Vergleich zur Expression von CYP3A4 wurde ENaC α fast 40-mal so hoch exprimiert. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen CYP3A5*1-Allelstatus und der Höhe der ENaC α -Expression (**Abbildung 8**).

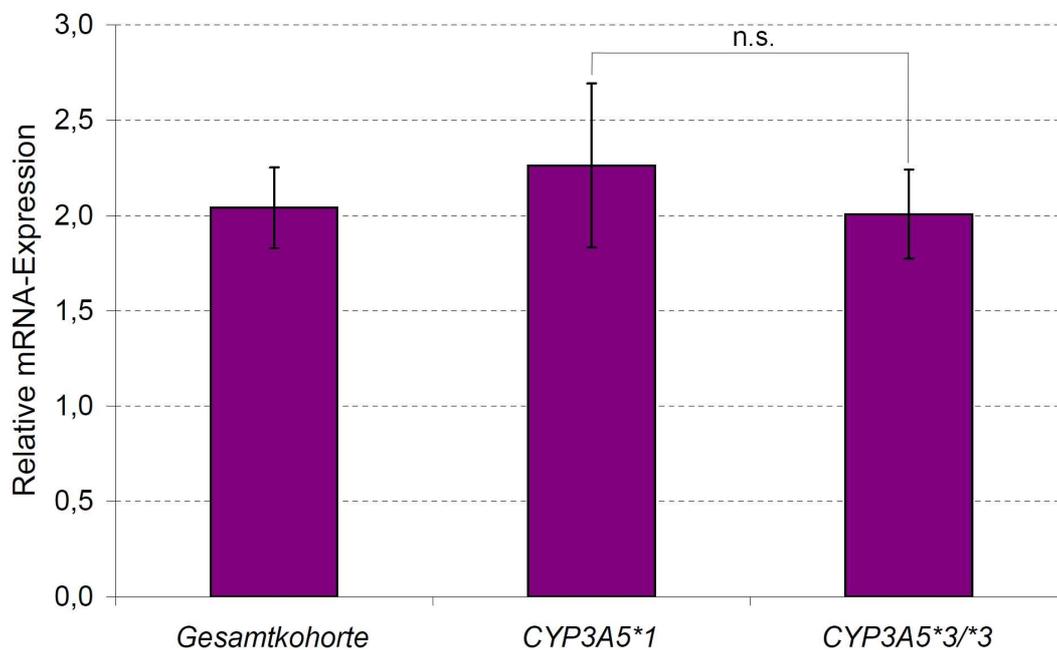


Abb. 8: mRNA-Expression von ENaC α in der Niere. n.s. - nicht signifikant. Die relative mRNA-Expression entspricht der ENaC α /PBGD-Transkriptanzahl. Dargestellt sind $MW \pm SEM$.

3.3.2.3 SGK1

Die mRNA-Expression von SGK1 wurde mittels SYBR[®]Green-Methode der RT-qPCR für $n=93$ Nierenproben quantifiziert. Die mittlere relative mRNA-Expression lag bei $11,68 \pm 1,012$ ($CV\%=84\%$). Damit war die SGK1-Expression höher als die der anderen Gene – im Vergleich zu ENaC α und CYP3A5 mehr als fünffach, im Vergleich zu CYP3A4 fast 200fach ($p<0,001$, **Abbildung 10**). Analog zu ENaC α zeigte sich für die mRNA-Expression von SGK1 keine Abhängigkeit vom CYP3A5*1-Allelstatus (**Abbildung 9**).

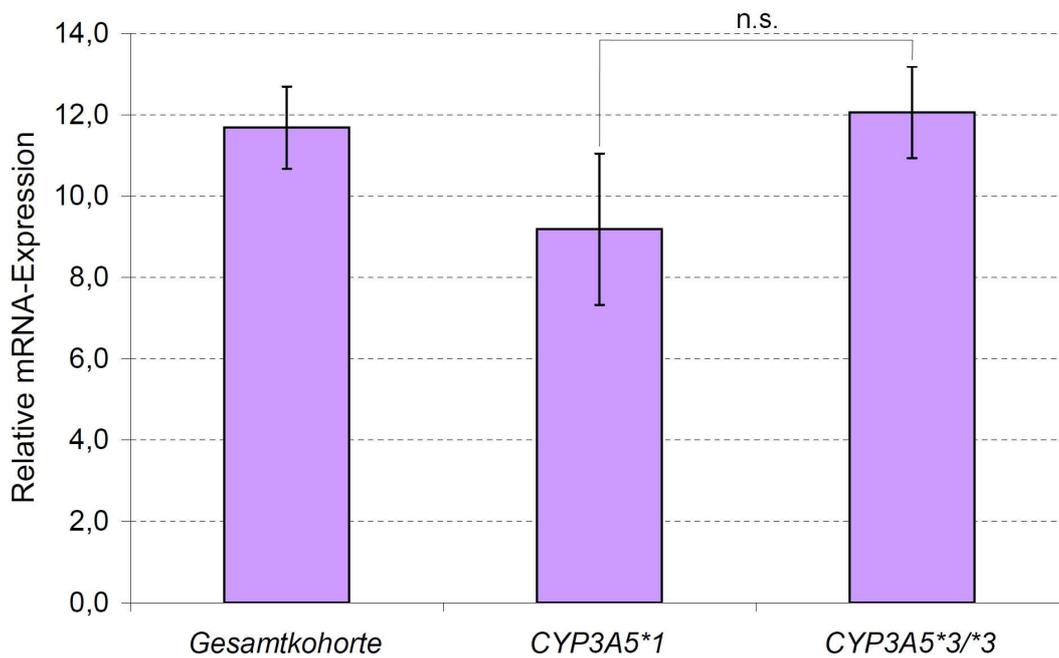


Abb. 9: mRNA-Expression von SGK1 in der Niere. n.s. - nicht signifikant. Die relative mRNA-Expression entspricht der SGK1/PBGD-Transkriptanzahl. Dargestellt sind $MW \pm SEM$.

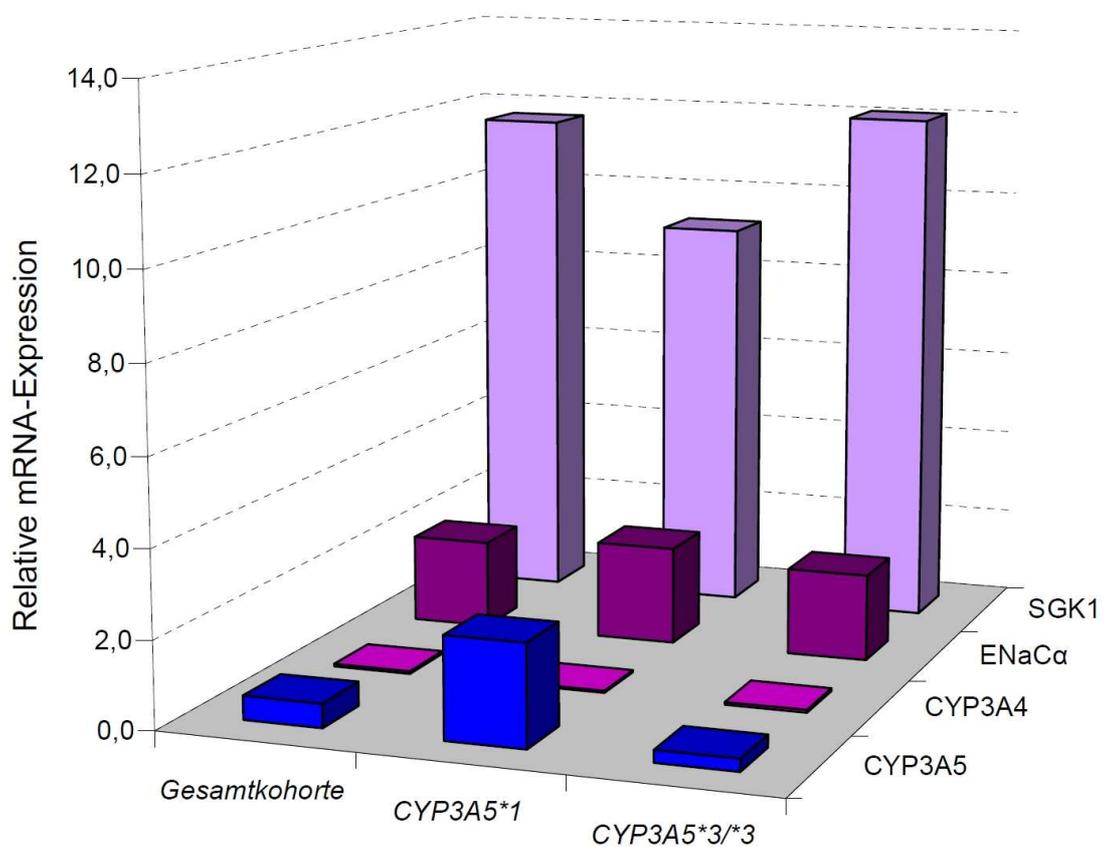


Abb. 10: mRNA-Expressionen von CYP3A5, CYP3A4, ENaCa und SGK1 im Vergleich.

3.3.3 Detektion von CYP3A5-Protein mittels Immunhistochemie

3.3.3.1 Spezifität der verwendeten Antikörper

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen aller CYP3A-Isoenzyme mittels BLAST zeigt die Homologie der vier Proteine (**Tabelle 11**).

Tabelle 11: Homologie der Aminosäuresequenzen der humanen CYP3A-Isoenzyme (BLAST)

	CYP3A4 NP_059488 ¹	CYP3A5 NP_000768 ¹	CYP3A7 NP_000756 ¹	CYP3A43 ² NP_073731 ¹
CYP3A4	—	84%	88%	75%
CYP3A5	84%	—	81%	75%
CYP3A7	88%	81%	—	71%
CYP3A43	75%	75%	71%	—

¹ *Accession number* der NCBI-Datenbank. ² Für den Vergleich wurde die Isoform 1 gewählt (mit 504aa die längste Aminosäuresequenz der drei möglichen CYP3A43-Isoformen).

Um die Spezifität der für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper zu überprüfen, wurden Baculovirus-infizierte Insektenzellmikrosomen mit jeweils einer rekombinant exprimierten CYP3A-Isoform mittels Western blot untersucht. Da CYP3A43 in größeren Mengen nur in Leber, Prostata und Hoden exprimiert wird, wurden Mikrosomen für die Enzyme CYP3A5, CYP3A4 und CYP3A7 benutzt (39).

Wie in **Abbildung 11** ersichtlich, zeigten sich im Western blot nach Inkubation mit dem CYP3A5-Antikörper (Abcam, ab22692) nur für Mikrosomen mit enthaltenem CYP3A5 deutliche Banden knapp oberhalb der 50 kDa-Marke.

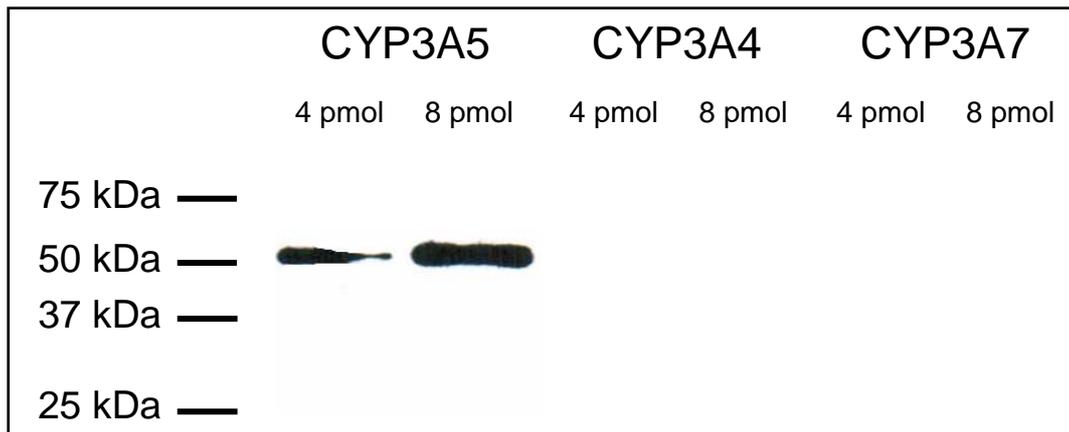


Abb. 11: Western blot zur Sicherung der Spezifität des CYP3A5-Antikörpers (ab22692, Abcam).

Dagegen waren im Western blot nach Inkubation mit dem CYP3A4-Antikörper (Abcam, ab22704) sowohl für Mikrosomen, in denen CYP3A4 exprimiert wurde, als auch für CYP3A7-enhaltende Mikrosomen, Banden deutlich sichtbar, ebenfalls knapp über der 50kDa-Marke (**Abbildung 12**).

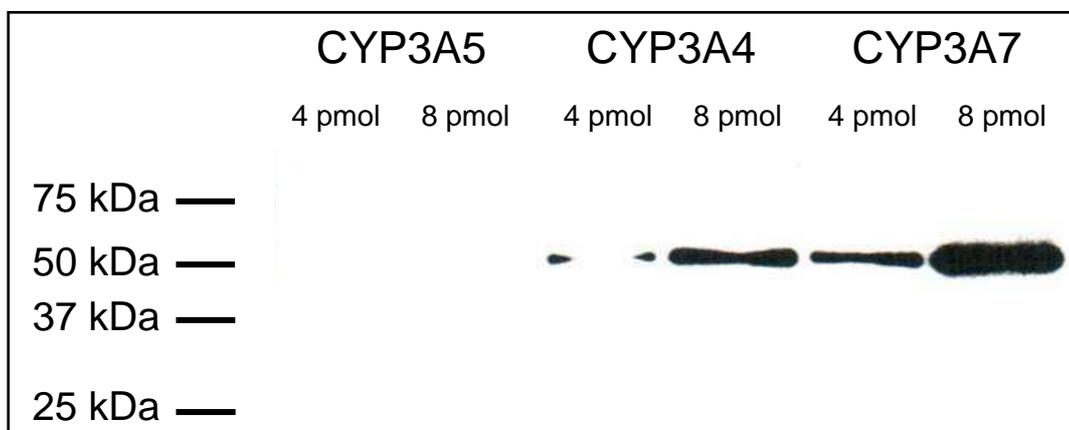


Abb. 12: Western blot zur Erkennung der Spezifität des CYP3A4-Antikörpers (ab22704, Abcam).

3.3.3.2 Immunhistochemischer Nachweis von CYP3A in der Leber

Anhand von Gefrierschnitten humanen Lebergewebes konnten sowohl CYP3A4 als auch CYP3A5 immunhistochemisch nachgewiesen werden. Wie in **Abbildung 13** ersichtlich, schien sich CYP3A4 dabei vor allem perivenös (zentrilobulär) anzureichern. Für CYP3A5 war insgesamt eine deutlich weniger intensive Anfärbung zu erkennen. Eine Anreicherung im zentrilobulären perivenösen Bereich ist ebenfalls weniger stark ausgeprägt als für CYP3A4. Zum Vergleich ist als Negativkontrolle ein Gefrierschnitt humaner Leber ohne Inkubation mit einem der beiden Primärantikörper abgebildet.

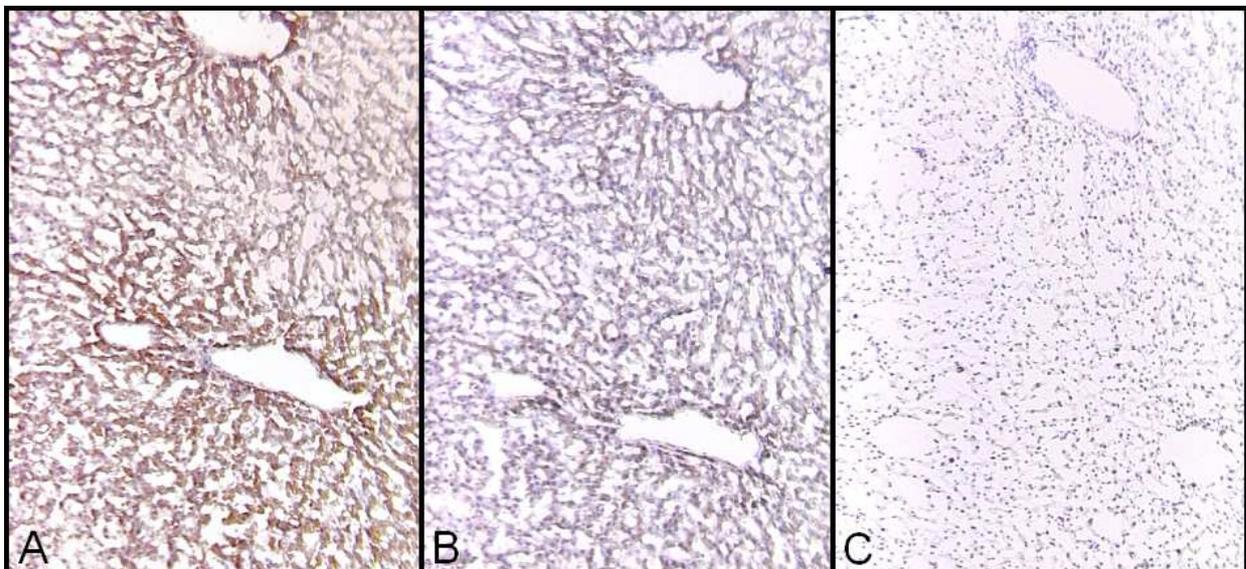


Abb. 13: Immunhistochemischer CYP3A-Nachweis in einem Gefrierschnitt humaner Leber unter Verwendung eines polyklonalen CYP3A4-Antikörpers (ab22704, Abcam) und eines polyklonalen CYP3A5-Antikörpers (ab22692, Abcam).

A – CYP3A4-Nachweis mittels Inkubation des CYP3A4-Primärantikörpers.

B – CYP3A5-Nachweis mittels Inkubation des CYP3A5-Primärantikörpers.

C – Negativkontrolle ohne Inkubation eines Primärantikörpers.

3.3.3.3 Immunhistochemischer Nachweis von CYP3A5 in der Niere

Immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis von CYP3A5 in der Niere wurden sequentiell anhand von Gefrier- und Paraffinschnitten menschlicher Nieren durchgeführt.

Für die verwendeten Gefrierschnitte menschlichen Nierengewebes wurden entsprechende DNA-Proben hinsichtlich des *CYP3A5**1/*3-Polymorphismus mittels TaqMan[®]-SNP-Assay untersucht. Dabei konnte unter den zehn Individuen ein heterozygoter *CYP3A5**1-Allelträger identifiziert werden, während die anderen neun homozygot für das *CYP3A5**3-Allel waren. Die extrahierte RNA der Gewebeproben wurde in cDNA umgeschrieben und bezüglich der relativen mRNA-Expression von CYP3A5 mittels RT-qPCR untersucht. Da im immunhistochemischen Vergleich ein Gefrierschnitt mit geringem CYP3A5-Proteingehalt einem Schnitt mit höherem Proteingehalt gegenübergestellt werden sollte, wurden zwei Proben mit jeweils dem höchsten und dem niedrigsten CYP3A5-mRNA-Spiegel, im Folgenden auch als *highCYP3A5* und *lowCYP3A5* bezeichnet, ausgewählt. Es handelt sich in beiden Fällen um Proben von Individuen mit Genotyp *CYP3A5**3/*3. Verglichen mit der Negativkontrolle konnte in beiden Proben (*lowCYP3A5* und *highCYP3A5*) CYP3A5 deutlich angefärbt werden (**Abbildung 14**). Während im Gewebeschnitt *lowCYP3A5* die Anfärbung relativ homogen in allen epithelialen Strukturen erschien, war im Gewebeschnitt *highCYP3A5* eine Intensitätszunahme vor allem im Tubulus (am ehesten proximalen Tubulus) zu erkennen.

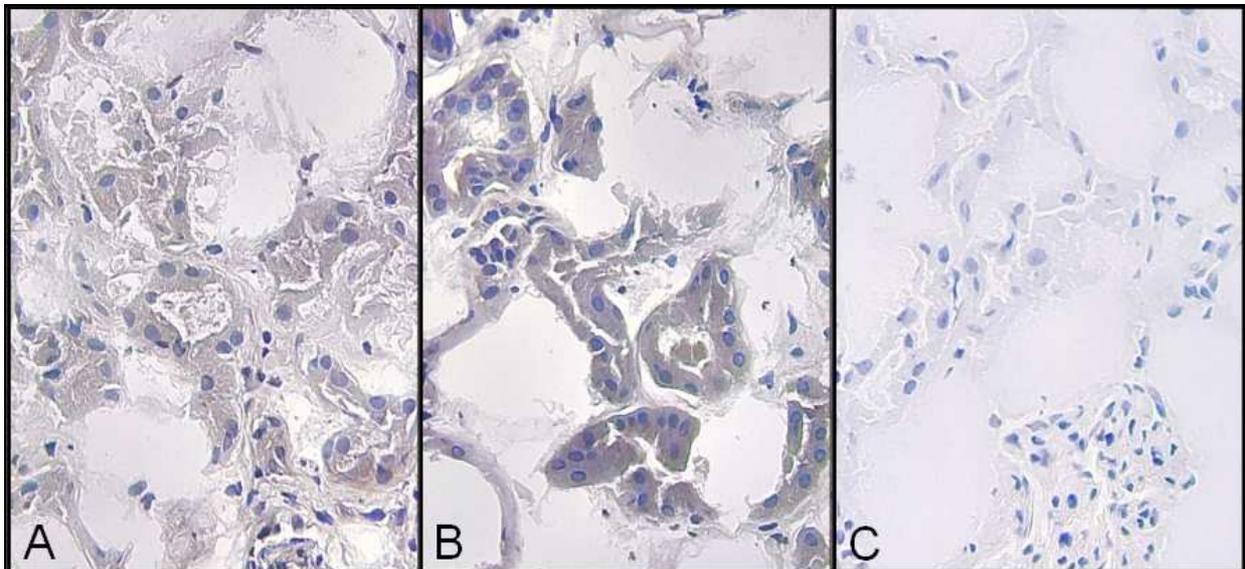


Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis von CYP3A5 in Gefrierschnitten humaner Niere unter Verwendung eines polyklonalen CYP3A5-Antikörpers (ab22692, Abcam).

A – *low*CYP3A5, Niere mit geringem CYP3A5-mRNA-Gehalt.

B – *high*CYP3A5, Niere mit hohem CYP3A5-mRNA-Gehalt.

C – Negativkontrolle ohne Inkubation eines Primärantikörpers.

Da anhand der angefärbten Gefrierschnitte humaner Niere die feingewebliche Unterscheidung einzelner Strukturen, beispielsweise zwischen proximalem und distalem Tubulus, nicht möglich war, wurden zusätzlich 27 Paraffinschnitte angefertigt und entsprechend angefärbt. Im weiteren Verlauf erwiesen sich die Nierenproben der Eurotransplant-Stiftung als morphologisch hochwertiger, sodass nur diese sieben Paraffinschnitte für die weitere Auswertung verwendet wurden. Dazu wurden vergleichend die Schnitte von zwei *CYP3A5*1*-Allelträgern (mit Genotyp **1/*3*) sowie die Schnitte von fünf Individuen mit Genotyp *CYP3A5*3/*3* betrachtet. In dem hier beispielhaft gezeigten Paraffinschnitt einer Niere mit *CYP3A5*3/*3*-Genotyp ist vor allem eine intensive Färbung von Sammelrohr und distalem Tubulus erkennbar, während proximaler Tubulus und Glomerulum weniger stark gefärbt erscheinen (**Abbildung 15**). Im Vergleich dazu zeigt der Nierenschnitt eines *CYP3A5*1*-Allelträgers eine deutliche Intensitätszunahme der Anfärbung in Epithelien des proximalen Tubulus, während die Intensität der Epithelien des Sammelrohrs, Glomerulum und distalen Tubulus weitestgehend unverändert blieb. Der Unterschied im renalen Proteinexpressionsmuster von *CYP3A5* zwischen Trägern des *CYP3A5*1*-Allels und *CYP3A5*3/*3*-Individuen ist somit auf den proximalen Tubulus beschränkt.

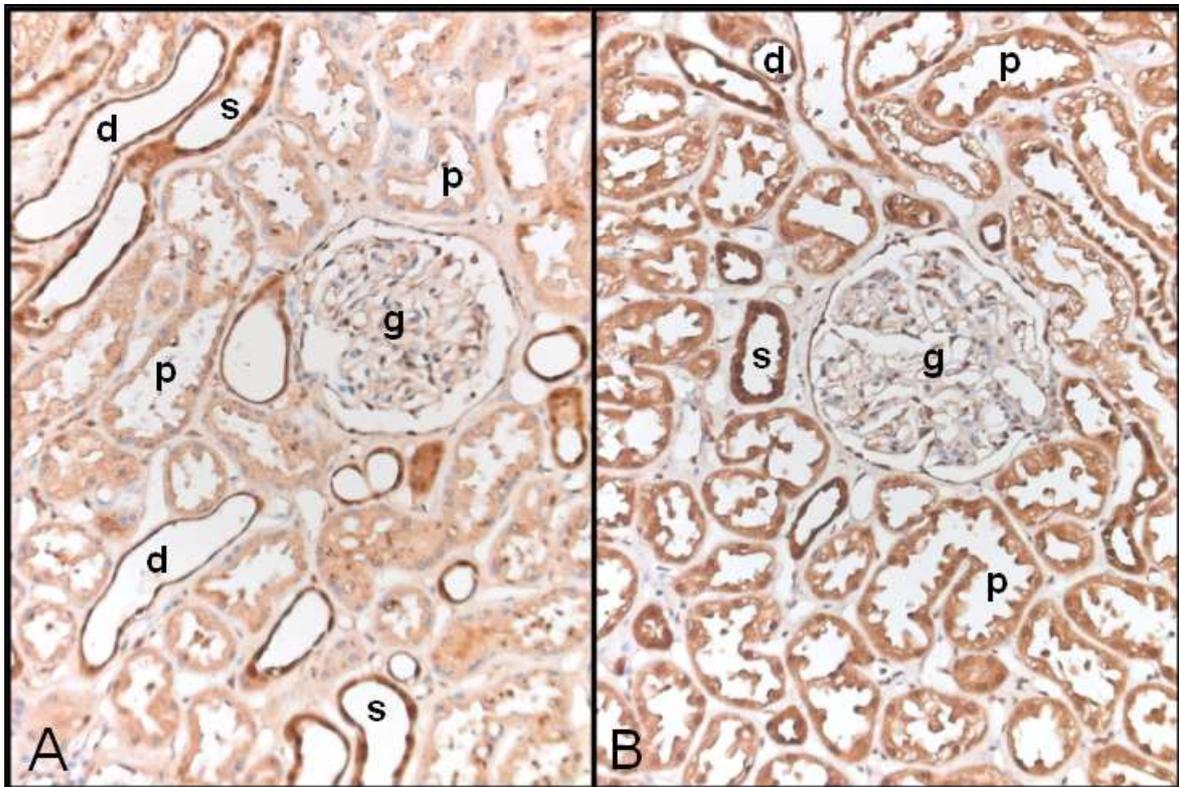


Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis von CYP3A5 in Paraffinschnitten humaner Niere unter Verwendung eines polyklonalen CYP3A5-Antikörpers (ab22692, Abcam). d - distaler Tubulus. g - Glomerulum. p - proximaler Tubulus. s - Sammelrohr

A – Niere mit Genotyp $CYP3A5^*3/^*3$.

B – Niere mit Genotyp $CYP3A5^*1/^*3$.

3.4 Haplotypenanalysen

3.4.1 Haplotypenanalyse eines *CYP3A*-Blocks

Um sicherzustellen, dass die bei der Quantifizierung der *CYP3A5*-mRNA festgestellten Differenzen auf den SNP 6986A>G zurückzuführen sind und nicht zusätzlich durch weitere, gekoppelte Polymorphismen bedingt sind, wurde der entsprechende LD-Block untersucht. Dafür wurde eine Analyse der Haplotypenstruktur des *CYP3A*-Genlocus mittels HapMap bzw. die anschließende Integration der Daten in Hapview vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass die Gene *CYP3A7*, *CYP3A5* und das Gen für das Zinkfingerprotein 498 (*ZNF 498*) in einem gemeinsamen LD-Block liegen (**Abbildung 16**). Das an *CYP3A7* angrenzende *CYP3A4*-Gen liegt auf einem weiteren Block, sodass man von einem sogenannten *hotspot*, d.h. einer Stelle bevorzugter Rekombination, zwischen *CYP3A4* und *CYP3A7* ausgehen kann.

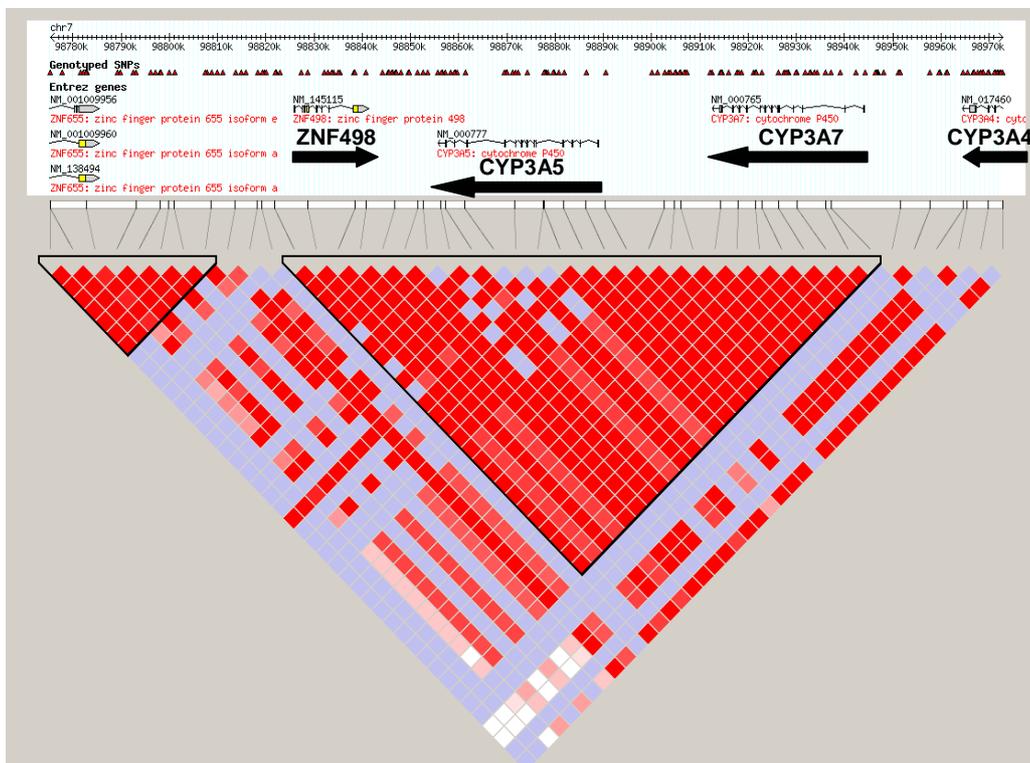


Abb. 16: Haplotypenstruktur der *CYP3A5*-Umgebung für Kaukasier (Population CEU in HapMap). Hapview 4.2 mit Integration von Daten aus HapMap (Public Data Release no. 19). D'/LOD -Farbschema: weiß - $D' < 1, LOD < 2$; rosa - $D' < 1, LOD \geq 2$; rot - $D' = 1, LOD \geq 2$, blau - $D' = 1, LOD \geq 2$.

Zur Erlangung eines Großteils (>90%) der genetischen Information in dem LD-Block von *CYP3A7*, *CYP3A5* und *ZNF498* wurden neben dem bereits untersuchten SNP 6986A>G (rs776746) zwei weitere *tagging* SNPs ausgewählt. Anschließend erfolgte die Genotypisierung des Patientenkollektivs hinsichtlich dieser beiden SNPs, von denen sich einer in Intron 4 des *CYP3A5*-Gens (rs4646450, T>C) und der andere im intergenetischen Bereich zwischen *CYP3A5* und *ZNF498* (rs4646458, C>A) befindet. Die Kopplung der drei innerhalb desselben LD-Blocks liegenden *tagging* SNPs zeigte sich dabei auch in unserem Kollektiv (**Abbildung 17**).

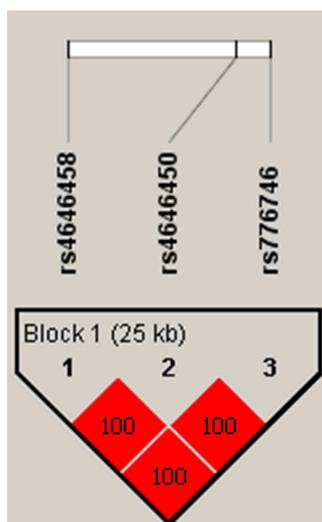


Abb. 17: Paarweise Kopplung der *tagging* SNPs aus Haploview 4.2, D'/LOD -Farbschema: rot - $D'=1$, $LOD \geq 2$; eingefügte Werte in Quadraten: $D' \times 100$

Da durch die Genotypisierung nicht bestimmt werden kann, welches Allel welchem Chromosomenstrang zuzuordnen ist, wurden für die einzelnen Individuen die wahrscheinlichsten Haplotypen mit Hilfe des auf dem Bayes-Theorem beruhenden PHASE-Programms (Version 2.0) geschätzt. Je nach festgestelltem Allel der Polymorphismen in der Reihenfolge rs4646458, rs4646450 und rs776746 werden die daraus abgeleiteten Haplotypen im Folgenden als ACG (Haplotyp 1, H1), ATG (H2), ATA (H3) und CTA (H4) bezeichnet. Eine Übersicht über die Haplotypenfrequenzen und die entsprechenden Spiegel der *CYP3A5*-mRNA sind in **Tabelle 12** wiedergegeben.

Tabelle 12: Einfluss der *CYP3A*-Haplotypen auf die Höhe der mRNA-Expression von *CYP3A5*

<i>CYP3A</i> -Haplotyp	Basenfolge ¹	Frequenz ²	<i>CYP3A5</i> -mRNA / n	p-Wert
H1	ACG	0,824	0,29 ± 0,368 ³ / 62	n.s.
H2	ATG	0,103	0,26 ± 0,438 ⁴ / 19	
H3	AT <u>A</u>	0,029	2,00 ± 0,593 ⁴ / 5	0.001
H4	CT <u>A</u>	0,044	2,93 ± 0,632 ⁴ / 7	<0.001

A repräsentiert das *CYP3A5*1*-Allel. p-Werte sind zweiseitig. n.s. - nicht signifikant. 1 - rs4646458/ rs4646450/ rs776746. 2 - Haplotypenfrequenzen beziehen sich auf n=102 Individuen. Die Werte der *CYP3A5*-mRNA für n Individuen sind angegeben als $MW \pm SEM$ für: 3 - Homozygote (H1H1), 4 - Hetero- und Homozygote (H2H1/H2H2, H3H1/H3H4 bzw. H4H1/H3H4/H4H4).

Bei acht möglichen Kombinationen der entsprechenden Allele konnten in unserer Population vier verschiedene Haplotypen differenziert werden. Der am häufigsten vorkommende Haplotyp H1 trägt mehr als 80% zu der genetischen Variation in diesem Block bei, während die anderen drei Haplotypen (H2, H3 und H4) die restliche Variation erfassen. Im Vergleich der Mittelwerte der mRNA-Expression von *CYP3A5* zeigten die beiden Haplotypen mit enthaltenem *CYP3A5*1*-Allel, H3 und H4, deutlich höhere Werte als die der Haplotypen H1 und H2 mit integriertem *CYP3A5*3*-Allel. Eine signifikante Differenz der mRNA-Spiegel zwischen Trägern des H1-Haplotypen und des H2-Haplotypen bestand nicht. Zur Auswertung wurde für H1 ein rezessives Vererbungsmodell (zwei Kopien vs. eine oder keine Kopie des Haplotyps) verwendet, während für H2, H3 und H4 ein additives Vererbungsmodell (eine oder zwei Kopien vs. keine Kopie des Haplotyps) benutzt wurde.

3.4.2 Haplotypenanalyse *ABCB1*

Haplotypen sind nicht zwangsläufig *per definitionem* an ganze Genregionen gebunden, sondern können auch als genspezifische Haplotypen ihre Allelbezeichnung in der Literatur erlangen. Für die Haplotypenanalyse von *ABCB1* wurden zur Genotypisierung die drei am häufigsten beschriebenen Polymorphismen 1236C>T (rs1128503), 2677G>T/A (rs2032582) und 3435C>T (rs1045642) herangezogen, deren Kopplung untereinander in **Abbildung 18** zu sehen ist. Um für die Individuen mit mehr als einem heterozygoten Genotyp die wahrscheinlichsten Haplotypen beider Chromosomenstränge zu schätzen, wurde auch hier das Programm PHASE 2.0 benutzt.

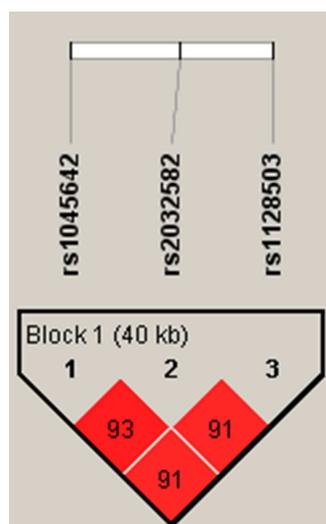


Abb. 18: Paarweise Kopplung der bestimmten Polymorphismen, aus Haploview 4.2, D'/LOD -Farbschema: rot = $D'=1$, $LOD \geq 2$; eingefügte Werte in Quadraten: $D' \times 100$

Da sich unter den für die *ABCB1*-Haplotypenbestimmung benutzten Polymorphismen ein trialleler SNP befand, gibt es zwölf theoretisch mögliche Haplotypen. Davon wurden in unserer Population neun nachgewiesen, die im Folgenden in der Reihenfolge 1236C>T - 2677G>T/A - 3435C>T als CGC (H1), TTT (H2), CGT (H3), TTC (H4), TGC (H5), CTT (H6), CAT (H7), CAC (H8) und CTC (H9) bezeichnet werden. Die drei häufigsten Haplotypen H1, H2 und H3, die zusammen für über 90% der genetischen Variation verantwortlich sind, werden auch als *ABCB1*1*, *ABCB1*2* und *ABCB1*13* bezeichnet (112, 113). Die Frequenzen aller Haplotypen sowie die entsprechenden mRNA-Spiegel von *CYP3A5* sind in **Tabelle 13** dargestellt.

Tabelle 13: Frequenz der einzelnen *ABCB1*-Haplotypen und entsprechende CYP3A5-mRNA-Spiegel

<i>ABCB1</i> -Haplotyp	Basenfolge ¹	Frequenz ²	CYP3A5-mRNA / <i>n</i>
H1	CGC	0,431	0,50 ± 0,100 / 62
H2	TTT	0,392	0,52 ± 0,091 / 57
H3	CGT	0,108	0,87 ± 0,336 / 21
H4	TTC	0,010	0,44 ± 0,232 / 2
H5	TGC	0,015	1,97 ± 1,509 / 3
H6	CTT	0,010	0,14 ± 0,072 / 2
H7	CAT	0,010	0,39 ± 0,177 / 2
H8	CAC	0,020	0,27 ± 0,032 / 4
H9	CTC	0,005	- ³

Werte der CYP3A5-mRNA sind angegeben als $MW \pm SEM$. 1 – rs1128503 / rs2032582 / rs1045642. 2 – Haplotypenfrequenzen beziehen sich auf $n=102$ Individuen. 3 – Für $n=1$ Individuum mit Haplotyp CTC war keine CYP3A5-mRNA messbar.

Die *ABCB1*-Haplotypen zeigten keinen Einfluss auf die Höhe der CYP3A5-mRNA-Expression, auch bei getrennter Auswertung von Gewebeproben männlicher und weiblicher Individuen. Für den Vergleich der beiden am häufigsten vorkommenden Haplotypen H1 und H2 untereinander wurde ein rezessives Vererbungsmodell benutzt. Für alle anderen Haplotypen wurde ein additives Vererbungsmodell verwendet.

4. Diskussion

4.1 Genotyp-Phänotyp-Assoziation von CYP3A5 in der humanen Niere

4.1.1 Klinische Daten unserer Kohorte

Die Charakterisierung der Kohorte diene vor allem dem Ausschluss bzw. der Identifizierung systematischer Fehler im Sinne eines oder mehrerer Confounder. Durch die retrospektive Datenerhebung anhand der stationären Krankenakten der Patienten ist die Aussagekraft dieser Untersuchung beschränkt. Ungenauigkeiten bezüglich des ethnischen Hintergrundes der Individuen, in den Krankenakten möglicherweise unvollständig dokumentierte Medikation inklusive Selbstmedikation mit frei verkäuflichen (OTC) Arzneimitteln oder Phytotherapeutika sowie eine nicht standardisierte Blutdruckmessung im Rahmen des stationären Aufenthaltes könnten geringgradige Differenzen der Untersuchungsgruppen maskieren.

4.1.2 Allelfrequenz und Genotypverteilung im Untersuchungskollektiv

In einer aktuellen Übersichtsarbeit wird die Frequenz des *CYP3A5**3-Allels für Kaukasier ($n=3854$) mit 92-94% beziffert (48). Anhand des bislang größten kaukasischen Kollektivs mit $n=6777$ untersuchten Individuen ermittelten Kreuz et al. Allelfrequenzen von 7% für das *CYP3A5**1-Allel und 93% für das *CYP3A5**3-Allel (50). Im Einklang mit diesen Untersuchungsergebnissen sind in der vorliegenden Arbeit Frequenzen von 7% für das Wildtyp-*CYP3A5**1-Allel und 93% für das mutierte *CYP3A5**3-Allel kalkuliert worden. Unter $n=102$ nephrektomierten Patienten konnten 2% als *CYP3A5**1-Homozygote, 11% als heterozygote *CYP3A5**1-Allelträger und 89% als *CYP3A5**3-Homozygote identifiziert werden. Die Verteilung der Genotypen entspricht dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium.

Die Allel- und Genotypverteilung der untersuchten Kohorte lässt darauf schließen, dass unser Kollektiv trotz des für DNA-Analysen limitierten Umfangs repräsentativ für seine ethnische Population zu sein scheint. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in definierten Patientenmerkmalen (Alter, Geschlecht, Medikation, Grunderkrankung, Diagnose eines Hypertonus, SBD und DBD) zwischen *CYP3A5*1*-Allelträgern und homozygoten *CYP3A5*3*/**3*-Individuen gefunden.

4.1.3 Genotypabhängige Expression der CYP3A5-mRNA

Bereits in der Erstbeschreibung des funktionellen *CYP3A5*1*/**3*-Polymorphismus berichteten Kuehl et al. von einer mit 21-202 pmol/mg Protein etwa zehnmal so hohen Proteinexpression in *CYP3A5*1*-Allelträgern im Vergleich zu *CYP3A5*3*-Homozygoten (18). Weitere Untersuchungen zeigten mit etwa neun- bis zehnfachen Expressionsdifferenzen einen vergleichbaren Zusammenhang, wenn auch die absolut gemessenen Proteinmengen mit etwa 29-66 pmol/mg Protein in *CYP3A5*1*-Allelträgern stark von den ursprünglichen Daten von Kuehl et al. abwichen (114, 115). In weiteren Publikationen mit ähnlicher Fragestellung variierten sowohl die absolut gemessenen Proteinspiegel als auch die Differenzen der Proteinmengen zwischen Trägern und Nicht-Trägern des Wildtyp-Allels in den untersuchten Mikrosomen stark (49, 116). In der Gesamtschau der publizierten Proteinuntersuchungen muss man daher sagen, dass es wahrscheinlich in Abhängigkeit von der Quantifizierungsmethode, der Spezifität der verwendeten Antikörper und dem Untersuchungsmaterial selbst immer wieder zu erheblichen Messschwankungen der Proteinspiegel kommen kann. In der Literatur wird darauf verwiesen, dass die mRNA-Quantifizierung eine genauere Spezifität zu bieten scheint, zumal in verschiedenen Studien eine gute Korrelation zwischen gemessenen mRNA-Spiegeln und CYP3A5-Proteinaktivität gezeigt werden konnte (117).

Lin und Kollegen quantifizierten in ihrer Arbeit mit Hilfe eines für die Wildtyp-Variante spezifischen Assays die normal gespleißte CYP3A5-mRNA und fanden eine vierfach erhöhte Expression in Trägern des *CYP3A5*1*-Allels im Vergleich zu *CYP3A5*3*-Homozygoten (49).

In weiteren Studien, die allerdings nicht spezifisch die Wildtyp-mRNA, sondern theoretisch auch alternativ gespleißte, d.h. das Pseudoexon 3B enthaltende mRNA-Transkripte mit ihren Assays erfassten, wurden etwa vier- bis achtfache Expressionsunterschiede in Abhängigkeit vom Vorhandensein oder Fehlen des funktionellen *CYP3A5*1*-Allels anhand der quantifizierten CYP3A5-mRNA beschrieben (31, 116).

Für alle genannten Untersuchungen wurde Lebergewebe verwendet. Eine analoge Genotyp-Phänotyp-Beziehung wurde auch für die Niere angenommen, eindeutige Untersuchungsergebnisse standen bislang allerdings aus.

So benutzten Koch et al. zwar für die extrahepatischen mRNA-Quantifizierungen von CYP3A5 auch einen mRNA-Pool aus sechs Nierenproben, konnten damit allerdings nur einen primär qualitativen Nachweis von CYP3A5 als einzigem renal exprimierten CYP3A-Isoenzym erbringen (31). In der Arbeit von Givens und Kollegen wurde für Nierenproben von 21 Organspendern die Höhe der CYP3A5-Proteinspiegel in Anhängigkeit vom *CYP3A5*-Genotyp ermittelt (75). Hier konnte anhand eines relativ kleinen ethnisch diversen Kollektivs gezeigt werden, dass die renale CYP3A5-Proteinmenge heterozygoter *CYP3A5*1*-Träger die der homozygoten *CYP3A5*3/*3*-Individuen übersteigt. Da die für *CYP3A5*3*-Homozygote gemessenen Proteinspiegel unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Methodik lagen, war ein genauer Vergleich der Expressionen jedoch nicht möglich.

Somit zeigt ein Teil der vorliegenden Arbeit erstmals an einem für die Verwendung humanen Nierengewebes relativ großen und homogenen Kollektiv, dass das Vorhandensein bzw. Fehlen des *CYP3A5*1*-Allels analog zur Leber auch in der Niere eindeutig mit der Höhe korrekt transkribierter Wildtyp-mRNA korreliert. Es konnte bei Vorliegen eines funktionellen *CYP3A5*1*-Allels bei heterozygoten Trägern im Mittel eine sechsmal so hohe CYP3A5-mRNA-Expression nachgewiesen werden wie bei *CYP3A5*3*-Homozygoten. Die höchsten mRNA-Expressionen wurden jedoch erwartungsgemäß bei den für das *CYP3A5*1*-Allel homozygoten Individuen beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit wurde in den Nierenproben fast aller *CYP3A5**3-Homozygoten auch normal gespleißte *CYP3A5**1-mRNA detektiert. In verschiedenen Untersuchungen anhand von Lebergewebe konnten bereits ebenfalls variable Mengen normal translatierten *CYP3A5*-Proteins bzw. Wildtyp-mRNA in homozygoten *CYP3A5**3/*3-Individuen nachgewiesen werden (18, 31, 49). Um dieses Nebenergebnis zu erklären, müssen die funktionellen Auswirkungen des *CYP3A5**1/*3-Polymorphismus auf molekularer Ebene näher betrachtet werden. Die Erkenntnisse diesbezüglich stützen sich bislang auf Experimente anhand von Lebergewebe (18).

Ausgangspunkt ist ein Einzelbasenaustausch von Adenin zu Guanin an Nukleotid 22893 (*Accession number* des NCBI: AC005020, rs776746) bzw. 6986 (relativ zum A des Translationsstartkodons ATG in Exon 1) 6986 im Intron 3 des *CYP3A5*-Gens. Neben der wahrscheinlich regelrechten Transkription der prä-mRNA durch die RNA-Polymerase II kommt es zur veränderten co-transkriptionellen Modifikation im Rahmen des Spleißvorgangs. Die Erkennungssequenz einer 5'-Exon-Intron-Grenze für das Spleißosom beinhaltet in der Regel das Dinukleotid GU am 5'-Ende des Introns, die weiterhin umspannt wird von einer größeren, aber weniger konservierten Konsensussequenz (118). Bei Vorliegen des G-Allels liegt anstelle von AU in der prä-mRNA-Sequenz das Dinukleotid GU vor. Damit wird eine kryptische 5'-Spleißdonorstelle innerhalb des Introns 3 kreiert. Der für die neu generierte Spleißdonorstelle in der Literatur angegebene Spleißstellenvorhersagewert von 0,9 zeigt, dass zu etwa 90% die alternative Spleißstelle benutzt wird, die zur Integration des zusätzlichen Exons 3B führt (18). Zu einem deutlich kleineren Anteil (10%) wird allerdings auch die konventionelle Wildtyp-Spleißstelle verwendet. In diesem Fall findet sich kein zusätzliches Exon und es wird funktionelles *CYP3A5*-Protein synthetisiert.

Warum das Spleißosom offensichtlich eine so hohe Affinität gegenüber der kryptischen 5'-Spleißstelle besitzt, gleichzeitig aber variabel genug ist, um in einem geringen Ausmaß trotzdem die konservative Spleißdonorstelle zu nutzen, ist bislang unklar. Die Entschlüsselung alternativer Spleißvorgänge ist aktuell eines der am intensivsten untersuchten Forschungsgebiete in der Molekularbiologie, mit dem sich u.a. das durch die Europäische Kommission geförderte internationale Konsortium „European Alternative Splicing Network“ (EURASNET) beschäftigt (119).

Da den etwa 25.000 menschlichen Genen geschätzte 150.000 verschiedene Proteine gegenüberstehen, gilt das physiologische Vorkommen alternativen bzw. differentiellen Spleißens als einer der Hauptgründe für die proteomische Vielfalt (120, 121). Während der generelle Aufbau und Ablauf des Spleißvorgangs mittlerweile gut bekannt sind, ist das variable Zusammenspiel und Wirken einer Fülle verschiedener Regulationsmechanismen im Detail bislang kaum verstanden. Als Hauptkatalysator der Spleißreaktion gilt das Spleißosom. Dieses besteht im Wesentlichen aus fünf kleinen Kern-Ribonukleo-proteinpartikeln (*small nuclear Ribonucleoprotein Particles*, snRNPs), d.h. Komplexen aus kleiner nukleärer RNA (*small nuclear RNA*, snRNA) und assoziierten Proteinen, sowie mehr als 100 weiteren nicht-snRNP-assoziierten Proteinen (121-125).

Ein entscheidender Schritt für die Initiation des Spleißvorgangs liegt in der Identifikation der Exon-Intron-Grenzen durch das Spleißosom. Zur Erkennung der korrekten 5'-Spleißdonorstelle durch das snRNP U1 und die entsprechende RNA-RNA-Interaktion zwischen snRNA und prä-mRNA existieren diverse *cis*-agierende und *trans*-agierende Faktoren, die im Zusammenspiel miteinander die Wahl der entsprechenden Spleißstelle beeinflussen. Für die Bindung und Aggregation des Spleißosoms unerlässlich sind drei Kernsequenzen innerhalb eines Introns: die stromaufwärts gelegene 5'-Spleißdonorstelle, die stromabwärts gelegene 3'-Spleißakzeptorstelle und eine zwischen beiden gelegene Verzweigungsstelle (*branch site*) mit hoch-konserviertem Adenosin (125). Als weitere *cis*-regulatorische Elemente zur Spleißstellenerkennung dienen Sequenzen in der mRNA, die je nach ihrer Position und Funktion eingeteilt werden in exonische und intronische Spleiß-Enhancer (ESEs und ISEs) sowie exonische und intronische Spleiß-Silencer (ESSs und ISSs) (121). Hinzu kommen eine Reihe weiterer *trans*-agierender Faktoren. Zu den wichtigsten regulatorischen Proteinen gehören dabei Proteine der SR-Proteinfamilie (*serine- and arginine-rich*) und heterogene nukleäre Ribonukleoproteinpartikel (hnRNPs). Während SR-Proteine in der Regel ESEs binden und damit vorwiegend aktivierend auf den Spleißvorgang wirken, binden hnRNPs üblicherweise ESSs und ISSs und wirken somit eher hemmend auf den Spleißprozess (124).

Ebenfalls Einfluss auf die Auswahl alternativer Spleißstellen haben beispielsweise die Sekundärstruktur der prä-mRNA, kleine nukleoläre RNAs (*small nucleolar RNA*, snRNA) sowie die reversible Phosphorylierung regulatorischer Proteine mithilfe verschiedener Kinasen und Phosphatasen. Durch die jeweils intrinsisch schwachen, aber damit äußerst flexiblen Interaktionen dieses enormen Spleißapparates zwischen RNA und RNA, RNA und Protein sowie Protein und Protein scheinen für unterschiedliche mRNAs jeweils einzigartige Arrangements aus Proteinen zu entstehen, die in der Gesamtheit auch als „Spleiß-Code“ bezeichnet werden (124).

Bezüglich des in dieser Arbeit untersuchten *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus kann die eingangs formulierte Frage nicht eindeutig beantwortet werden, warum das Spleißosom eine so unterschiedliche Affinität zu den zwei alternativen Spleißdonorstellen der mutierten *CYP3A5*3*-prä-mRNA besitzt. Die Veranschaulichung der Komplexität und Variabilität des Spleißvorgangs erklärt jedoch, warum die exakte Vorhersage einer Spleißstelle oder die Suche nach einer eindeutigen Kausalität mithilfe der bislang verfügbaren experimentellen Methoden nur schwer möglich sind.

Gut bekannt sind dagegen die Folgen des alternativen Spleißvorgangs für die weitere Prozessierung der reifen *CYP3A5*-mRNA. Die unmittelbare Folge des alternativen Spleißens der prä-mRNA ist eine durch das zusätzliche Exon 3B bedingte Verschiebung des Proteinleserasters (48). Des Weiteren zieht das dadurch neu generierte vorzeitige Stoppkodon (*premature termination codon*, PTC) einen Abbau der mRNA im Rahmen des *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) nach sich (31, 126). Der NMD ist ein post-transkriptioneller Kontrollmechanismus zur Eliminierung *nonsense*-mutierter oder fehlerhaft transkribierter mRNA und damit Limitierung potentiell toxischer verkürzter Proteine (127-129). Voraussetzung sind dabei PTCs, genauer gesagt *nonsense*-Codons (NC), in der mRNA-Sequenz, die sich innerhalb des offenen Leserasters befinden. Dabei werden nur NCs erkannt, die mehr als 50-55 bp stromaufwärts von Proteinkomplexen (*exon junction complex*, EJC) liegen, die wiederum im Rahmen des Spleißvorgangs etwa 20-24 bp stromaufwärts der Exon-Exon-Verbindungen an die mRNA angelagert wurden (128).

Wird in einer vorläufigen Translationsrunde („*pioneer*“ *round*) ein NC registriert, erfolgt die Aggregation verschiedener Proteine zum sogenannten NMD-Komplex. Der darauffolgende Abbau der NMD-Target-mRNA erfolgt von beiden Enden über Entfernung der 5'-Capstruktur (Decapping) und 5'-3'-Exonukleaseaktivität bzw. Deadenylierung und 3'-5'-Exonukleaseaktivität (130). Die Tatsache, dass auch in Untersuchungen, in der die gesamte CYP3A5-mRNA (auch alternativ gespleißte) mittels RT-qPCR gemessen wurde, deutliche quantitative Unterschiede zwischen CYP3A5*1-Allelträgern und homozygoten CYP3A5*3-Individuen bestanden (31, 116), kann somit durch den schnellen Abbau der aberranten CYP3A5-mRNA durch NMD erklärt werden. Es sei allerdings noch einmal darauf verwiesen, dass in der vorliegenden Arbeit mittels des spezifischen Assays ausschließlich Wildtyp-, also CYP3A5*1-mRNA detektiert wurde.

Der Methodik der durchgeführten mRNA-Messung mittels RT-qPCR sind natürlich Grenzen gesetzt. Auch wenn die jeweiligen Transkriptanzahlen der Proben berechnet und auf ein Referenzgen bezogen wurden, bleibt die Quantifizierung relativ. Das heißt, die Interpretation bezieht sich primär auf Differenzen der mRNA-Expressionen innerhalb des Kollektivs bzw. zwischen Zielgenen, nicht auf deren absolute Werte. Da es keine Kontrolle für die Effizienz der Reversen Transkription gibt, wäre eine absolute Quantifizierung nur mithilfe von RNA-Standards möglich. Weiterhin ist bei der Interpretation der Daten zu beachten, dass Fehler in den gemessenen Ct-Werten exponentiell in die Berechnung der initialen Templatemenge eingehen, da der Ct-Wert sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der eingesetzten cDNA verhält. Der Bezug der ermittelten Daten auf ein Referenzgen oder *housekeeper* stellt eine weitere mögliche Unsicherheit dar. Um diese zu minimieren, haben wir drei mögliche *housekeeper* (HPRT1, 18S und PBGD) untersucht und in der Auswertung der Daten keine signifikanten Differenzen festgestellt. Zudem muss auch die Qualität der Proben hinterfragt werden. Bei der Sammlung einer großen Anzahl humaner Organproben ist es unumgänglich, dass die Akquirierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgt. Unterschiede im Procedere der Probenentnahme, Lagerung oder auch eine zeitlich bedingte enzymatische Gewebsautolyse können nicht ausgeschlossen werden.

Da eine weitere Quantifizierung des translatierten CYP3A5-Proteins zum einen aufgrund der limitierten Probenmenge und zum anderen aufgrund der Variabilität der Proteinspiegel nicht durchgeführt wurde, kann nur aus den Daten vorangegangener Publikationen darauf geschlossen werden, dass die untersuchte mRNA auch wirklich funktionelles Protein repräsentiert (117).

4.1.4 Quantifizierung der CYP3A4-mRNA

In der Literatur finden sich zum Teil widersprüchliche Daten bezüglich einer renalen CYP3A4-Expression. So wurde aufbauend auf Immunoblotanalysen an humanen Nierenproben von einer polymorphen Expression von CYP3A4 in der Niere berichtet (77). Während CYP3A5 in fünf von sieben Nieren gefunden wurde, konnte CYP3A4 in lediglich einer Probe (entsprechend 14%) nachgewiesen werden. In einer ähnlichen Untersuchung anhand von 27 menschlichen Nieren fanden sich in 100% der Proben CYP3A5-mRNA und Protein, während CYP3A4-mRNA nur in elf (41%) und Protein in 14 (52%) der 27 Proben nachweisbar war (66). Allerdings sollte man dabei beachten, dass beide Arbeitsgruppen nicht über zuverlässige Isoform-spezifische Antikörper verfügten. Im Wesentlichen wurden unspezifische CYP3A-Antikörper benutzt und der Immunoblot durch visuelle Diskriminierung bezüglich einer mit CYP3A5 (52kD) oder CYP3A4 (51kD) ko-migrierenden Bande ausgewertet. So schreiben die Autoren, dass es sich bei dieser als CYP3A4-Protein gewerteten Bande auch um ein Zerfallsprodukt von CYP3A5 handeln könnte (66). Für den qualitativen mRNA-Nachweis wurden außerdem Primer einer zuvor veröffentlichten Arbeit benutzt (29), die sich in einer von uns durchgeführten Analyse ebenfalls als nicht Isoform-spezifisch erwiesen.

Im Gegensatz zu diesen früheren Untersuchungen konnten aktuellere Arbeiten CYP3A4 in der Niere nicht nachweisen. So fand sich in sechs Nieren mittels RT-qPCR keine mRNA-Expression von CYP3A4 (31). In einer weiteren Arbeit wurde in 21 Nierenmikrosomen mittels eines spezifischen CYP3A4-Antikörpers ebenfalls kein CYP3A4-Protein nachgewiesen (75).

In dem von uns untersuchten Kollektiv zeigte sich nur eine sehr geringe mRNA-Expression von CYP3A4 in der Niere. Im Vergleich zu den Messungen der CYP3A5-Wildtyp-mRNA betrug die mittlere CYP3A4-Expression insgesamt nur etwa ein Fünftel der CYP3A5-Expression in homozygoten *CYP3A5*3*-Individuen. Zwischen den beiden Gruppen der *CYP3A5*1*-Allelträger und *CYP3A5*3*-Homozygoten bestand keine signifikante Differenz der CYP3A4-mRNA-Expression. Extrapoliert man die Daten dieser mRNA-Messungen auch auf die entsprechende Proteinebene, so ist davon auszugehen, dass die CYP3A4-Expression in der Niere vernachlässigbar gering ist. Die Höhe des Variationskoeffizienten ($CV\%=298\%$) spricht ebenfalls dafür, dass der Mittelwert aus den Einzelmessungen um den Nullpunkt liegt. Somit sind die Ergebnisse unserer Untersuchungen zur renalen CYP3A4-Expression am ehesten mit denen aktuellerer Studien vereinbar, gleichwohl fügen sie neue Informationen zur quantitativen Differenzierung hinzu.

Im Fall der CYP3A4-Quantifizierung diene die Ausweitung der konventionellen Methodik einer möglichst hohen Spezifität der Untersuchung. Da sowohl die Aminosäuresequenzen als auch die DNA- und mRNA-Nukleotidsequenzen der vier CYP3A-Isoenzyme untereinander äußerst homolog sind, ist der Nachweis bzw. die Quantifizierung von nur einer der Isoformen schwierig. Die einzige hochspezifische Amplifikation der CYP3A4-cDNA war durch ein Assay innerhalb des letzten Exons möglich. Für die Spezifität der Untersuchung sprechen neben dem gewählten methodischen Vorgehen in erster Linie die gewonnenen Ergebnisse. Die deutlich geringere CYP3A4-Expression im Vergleich zu CYP3A5 in denselben Proben zeigt, dass nicht fälschlicherweise zum Teil CYP3A5 miterfasst wurde. Es ist jedoch möglich, dass die CYP3A4-Expression zu niedrig bestimmt wurde. Allerdings sprechen sowohl die Plausibilität und Höhe der in denselben Proben gemessenen CYP3A5-Expression als auch die Expression anderer Zielstrukturen (ENaC α , SGK1, PBGD) dagegen.

4.1.5 Haplotypenblock CYP3A

Die interindividuelle Variation der humanen genomischen DNA-Sequenz wird auf etwa 0,1% geschätzt (131). Für den größten Teil der Unterschiede zwischen den Sequenzen sind Einzelnukleotidpolymorphismen verantwortlich. Die Gesamtanzahl dieser SNPs wird dabei für humane Genome auf etwa 10 Millionen geschätzt (132). Das Vorkommen dieser Polymorphismen im Genom folgt dabei keinem zufälligen Verteilungsmuster (133). Das menschliche Genom ist in einer charakteristischen Blockstruktur angeordnet. Zum einen treten Crossing-over-Ereignisse während der Meiose nicht an beliebigen Stellen eines Chromosoms auf; es existieren Orte bevorzugter Rekombination (*hotspots*) und stark konservierte Genabschnitte. So finden etwa 95% aller Rekombinationen an *hotspots* statt, die etwa 1-2 kbp umfassen (134). Zum anderen zeigen evolutionsgenetische Untersuchungen, dass der demographische bzw. phylogenetische Hintergrund einer Population ebenfalls dessen genomische Blockstruktur zu beeinflussen scheint. Beispielsweise sind die Abschnitte konservierter Genbereiche in afrikanischen Populationen deutlich kürzer als die in jüngeren Populationen, z.B. Europäern (135). Diese charakteristischen Blockstrukturen entsprechen Bereichen von in der Regel gemeinsam vererbten Allelen und angrenzenden *hotspots*. Die spezifische Kombination dieser miteinander gekoppelten Allele von benachbarten Genloci wird dabei als Haplotyp bezeichnet (131, 135). Da die entsprechenden Polymorphismen nicht zufällig miteinander assoziiert sind, d.h. im Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) zueinander stehen, wird auch von LD-Blöcken gesprochen. Ein 2002 gegründetes internationales Konsortium akademischer Forschungsgruppen sowie öffentlicher und privater Leistungsträger (*The International HapMap Consortium*) machte sich die Kartographierung der Haplotypenblöcke für verschiedene Populationen zum Ziel und veröffentlichte zuletzt die dritte Generation ihrer Haplotypenkarte, HapMap III (136). Die öffentliche Bereitstellung der Daten soll dabei internationalen Forschern die Durchführung nachfolgender Assoziationsstudien bezüglich krankheitsassoziierter Gene erleichtern. Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Nutzung sogenannter *tagging* SNPs, die vertretend für eine Vielzahl weiterer SNPs einen spezifischen Haplotypen repräsentieren.

Obwohl die Funktionalität des *CYP3A5**1/*3-Polymorphismus nahezu eindeutig belegt ist, muss die Evaluation seiner genetischen Effekte auch im Kontext der Haplotypenstruktur des entsprechenden Sequenzabschnitts auf Chromosom 7 betrachtet werden. In der Analyse des *CYP3A*-Locus mittels HapMap zeigte sich, dass in einer kaukasischen Population (CEU-Population) ein LD-Block die Gene *CYP3A7*, *CYP3A5* und *ZNF498* zu umfassen scheint, flankiert von *hotspots* der Rekombination jeweils am 3'- und 5'-Ende. Zusätzlich zu dem bereits untersuchten 6986A>G-Polymorphismus konnte mittels zweier weiterer *tagging* SNPs (rs4646450 und rs4646458) der entsprechende Haplotyp dieses *CYP3A*-Blocks bestimmt werden. In der Auswertung der Ergebnisse zeigten sich vier verschiedene Haplotypen, von denen der am häufigsten vorkommende Haplotyp (H1) mehr als 80% der genetischen Variation erfasste. Die Haplotypenfrequenzen entsprechen denen einer weiteren aktuellen Studie (137). In der vergleichenden Analyse der Expression der *CYP3A5*-mRNA zeigte sich, dass allein die das Wildtyp-Allel des 6986A>G-SNP enthaltenden Haplotypen H3 und H4 eine signifikant höhere *CYP3A5*-Expression nach sich zogen. Diese Ergebnisse untermauern zum einen die Funktionalität des untersuchten Polymorphismus und zeigen zum anderen, dass der Einfluss weiterer gekoppelter Genloci desselben Haplotyps auf die Höhe der *CYP3A5*-mRNA-Expression vernachlässigbar erscheint. Ein potentieller genetischer Einfluss innerhalb des *CYP3A4*-Locus wurde nicht untersucht. In der Vergangenheit ist eine mögliche Kopplung der beiden Allele *CYP3A5**1 und *CYP3A4**1B beschrieben worden (9, 18, 45, 138), insbesondere in klinischen Studien bezüglich des Prostata- und Lungenkarzinoms (139-142). Zum Teil ist die Datenlage diesbezüglich jedoch widersprüchlich (9, 45, 137, 143). Die These, dass *CYP3A5**1 und *CYP3A4**1B auf demselben Haplotyp liegen, konnte anhand der Haplotypanalyse dieser Arbeit nicht unterstützt werden. Dass Polymorphismen innerhalb des *CYP3A4*-Locus unabhängig von diesem Zusammenhang die *CYP3A*-Spiegel in der Niere beeinflussen, scheint darüber hinaus angesichts der dort vernachlässigbaren *CYP3A4*-mRNA-Expression unwahrscheinlich.

4.2 Hypothesen der CYP3A5-Wirkung auf die Blutdruckregulation in der Niere

4.2.1 Einfluss des CYP3A5-Genotyps auf den Mineralokortikoidrezeptor

Die antinatriuretische Wirkung von Aldosteron in Epithelzellen des Aldosteron-sensitiven distalen Nephrons (ASDN) umfasst komplexe molekulare Mechanismen. Beeinflusst von verschiedenen Regulationsproteinen wie beispielsweise Serin/Threonin-Proteinkinase SGK1, Ubiquitinligase Nedd4-2, Ki-Ras, MAP-Kinasen (*mitogen activated protein*) sowie Gilz (*glucocorticoid-induced leucine zipper*), erfolgt die transzelluläre Natriumrückresorption über den luminalen Ionenkanal ENaC und den basolateral gelegenen ATP-abhängigen Natrium-Kalium-Austauschtransporter (Na^+ - K^+ -ATPase, **Abbildung 19**) (144-146).

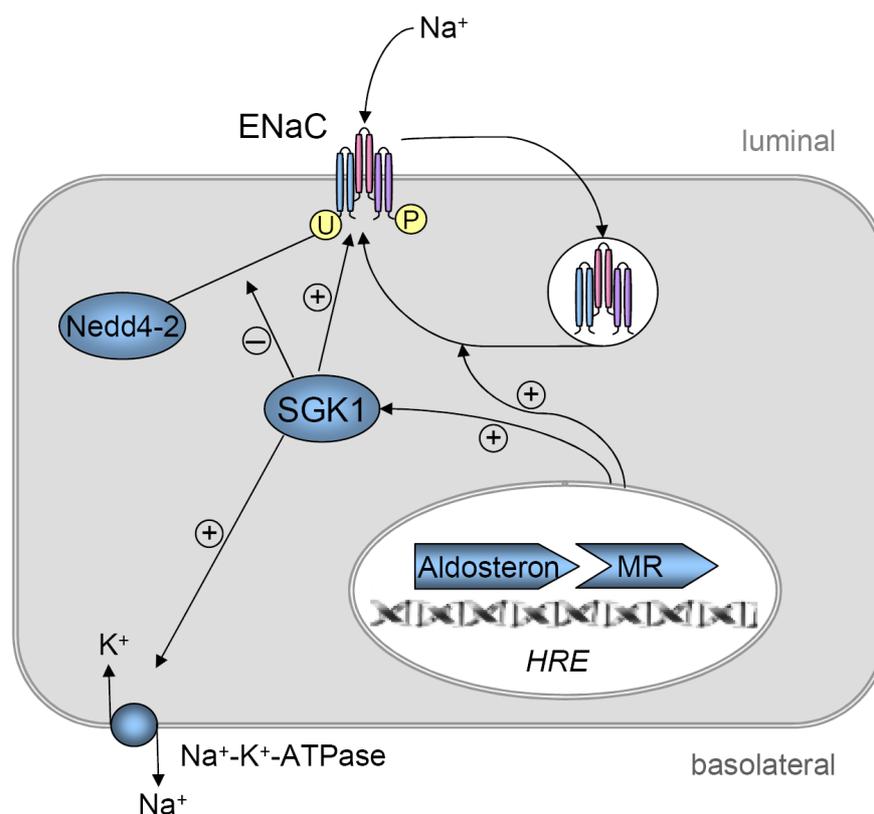


Abb. 19: Schematische Darstellung der Wirkung von Aldosteron in einer Epithelzelle des Aldosteron-sensitiven distalen Nephrons. *HRE* – *hormone responsive element*. MR – Mineralokortikoidrezeptor. ENaC – epithelialer Natriumkanal. Nedd4-2 – Ubiquitinligase. Na^+ – Natrium. K^+ – Kalium. Modifiziert nach Briet und Schiffrin (145) sowie Snyder et al. (147).

Nach Bindung von Aldosteron an den intrazellulären MR wird der Komplex als Dimer in den Zellkern transportiert, wo er via *hormone responsive elements* (HRE) im Promotorbereich entsprechender Zielgene deren Transkription reguliert. Als eines der wichtigsten Gene der Aldosteron-assoziierten Transkriptionsaktivierung in der humanen Niere gilt das *SCNN1A*-Gen (*sodium channel, non-neuronal 1A*), welches für die α -Untereinheit von ENaC kodiert. Dagegen werden *SCNN1B* und *SCNN1C*, die für jeweils ENaC β und ENaC γ kodieren, konstitutiv exprimiert (144). Ebenfalls gesteigert durch Aldosteron wird die Transkriptionsrate von *SGK1*, welches über komplexe Mechanismen eine Natriumretention bewirkt (146). Zum Ersten erhöht die Phosphorylierung von ENaC durch *SGK1* direkt dessen Öffnungswahrscheinlichkeit. Zum Zweiten hemmt *SGK1* *Nedd4-2*, welches durch Ubiquitylierung von ENaC dessen Endozytose und Degradation fördert. Zum Dritten aktiviert *SGK1* direkt die basolaterale Na^+ - K^+ -ATPase (**Abbildung 19**). Von diesen genotropen Effekten mit verzögertem Wirkungseintritt werden schnelle nicht-genotrope Effekte von Aldosteron wie beispielsweise der Anstieg intrazellulären Kalziums oder des pH abgegrenzt, deren physiologische Bedeutung für die Nierenfunktion noch nicht ausreichend geklärt ist (148). Diese nicht-genotropen Effekte können sowohl abhängig als auch unabhängig vom MR ablaufen (149). Da der MR neben Aldosteron mit nahezu gleicher Affinität Cortisol bindet, welches verglichen mit Aldosteron im Plasma in etwa 100fach höherer Konzentration zirkuliert, wird in klassischen epithelialen Zielgeweben von Aldosteron wie Niere, Colon, Speichel- und Schweißdrüsen die 11β -HSD2 exprimiert. Diese soll durch Hydroxylierung von Cortisol zu seiner inaktiven 11 -Ketoform den MR vor Glukokortikoidaktivierung schützen, da 11β -Hydroxycortisol nicht mehr an den MR bindet (150). Gemäß der eingangs erläuterten Hypothese des Mineralokortikoidrezeptorschutzes von *CYP3A5* stellt die intrinsische 6β -Hydroxylaseaktivität des Cytochroms in der Niere einen zusätzlichen Schutz des MR vor Aktivierung durch Cortisol in Trägern des *CYP3A5*1*-Allels dar. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Höhe der mRNA-Expression von *SCNN1A* (ENaC α) und *SGK1* in Abhängigkeit vom Vorhandensein des *CYP3A5*1*-Allels untersucht. In der Auswertung der Daten konnte in allen Geweben eine deutliche mRNA-Expression beider Gene nachgewiesen werden. Eine Abhängigkeit vom *CYP3A5*-Genotyp wurde jedoch nicht ermittelt.

Mögliche Erklärungen für diese Ergebnisse umfassen sowohl methodische Grundsätze als auch die kritische Evaluation der Ausgangshypothese. So sprechen die gewonnenen Daten zwar gegen eine generelle Aktivierung der Transkription der beiden MR-Zielmoleküle ENaC α und SGK1 in homozygoten *CYP3A5*^{*3}/^{*3}-Individuen. Ob allerdings tatsächlich die MR-vermittelte Natriumresorption in Individuen mit *CYP3A5*^{*3}/^{*3}-Genotyp der in *CYP3A5*^{*1}-Allelträgern gleicht, lässt sich nicht beurteilen. Für die Initialphase der Aldosteronwirkung ist ein vermehrtes Vorkommen von ENaC in der apikalen Zellmembran beschrieben worden bei weiterhin gleich bleibender Expression (146). Dies könnte beispielsweise auf nicht-genotrope Effekte der MR-Aktivierung wie die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*) und JNK1/2 (*c-Jun N-terminal kinases*) zurückzuführen sein, die durch das Versuchsdesign nicht erfasst wurden (149). Eine genaue Messung des Netto-Natrium-Influx via ENaC könnte mittels Patch-Clamp-Technik durchgeführt werden. Auch eine Beeinflussung der Transkriptionsrate von ENaC α und SGK1 durch MR-unabhängige Faktoren wäre denkbar. So ist beispielsweise für SGK1 *in vitro* eine Aktivierung unter osmotischem Stress beschrieben worden (146). Unter physiologischen Bedingungen könnten gegenregulatorische Mechanismen die MR-assoziierten Transkriptionsraten von ENaC α und SGK1 beeinflussen. In den komplexen Regelkreisläufen der Natriumhomöostase, die wiederum eng verbunden sind mit der Osmo- und Blutdruckregulation, spielen sowohl Feedback-Mechanismen auf Proteinebene (wie beispielsweise zwischen SGK1 und Nedd4-2) als auch die übergeordnete Kontrolle weiterer Hormone (u.a. ADH und ANP) möglicherweise eine entscheidende Rolle. Insgesamt könnte die Aktivierung von ENaC und SGK1 durch den MR eher kurzfristige Anpassungsvorgänge widerspiegeln, die über eine längere Dauer von weiteren Regulationsmechanismen überlagert werden.

Auch die These des Mineralokortikoidrezeptorschutzes durch *CYP3A5* als zusätzlichen Mechanismus zur 11 β -HSD2 sollte kritisch betrachtet werden. Für die molekulare Wirkung der 11 β -HSD2 nahm man lange Zeit an, dass die Metabolisierung von Cortisol zu 11 β -Hydroxycortisol den Glukokortikoidbesatz des MR verhindern würde. Aktuellere Übersichtsarbeiten lassen jedoch komplexere Zusammenhänge vermuten (150, 151).

Rechnerische Modelle zeigen, dass selbst bei vollständiger Funktion der 11 β -HSD2 nur etwa 90% des vorhandenen Cortisols inaktiviert werden können (150). Die verbleibenden 10% würden, den Plasmakonzentrationen der beiden Steroide entsprechend, immer noch etwa zehnmal so viele MR besetzen wie Aldosteron und müssten eigentlich laut ursprünglichen Annahmen eine permanente mineralokortikoide Wirkung hervorrufen. Funder erklärt diese Diskrepanz mit einer unter physiologischen Bedingungen primär tonisch-inhibitorischen Wirkung von Cortisol auf den MR (150). In der erwähnten Arbeit wird vermutet, dass der Redoxstatus einer Zelle über einen bisher nicht geklärten Mechanismus darüber entscheidet, ob Cortisol eine agonistische oder antagonistische Wirkung am Rezeptor entfaltet. Als obligates Ko-Substrat der 11 β -HSD2 gilt NAD⁺ bzw. der Quotient aus NADH und NAD⁺ in epithelialen Geweben als ein wichtiger Indikator des zellulären Redoxhaushaltes. Folgt man dieser These, wäre ein zusätzlicher Schutz des MR vor einer Glukokortikoidaktivierung durch die 6 β -Hydroxylaseaktivität von CYP3A5 unter physiologischen Bedingungen von nur geringem Ausmaß. Denkbar wäre aber noch immer eine Beeinflussung des Redoxsystems der Zelle durch den Verbrauch von NADPH als Ko-Substrat.

Zusätzlich könnte CYP3A5 allerdings unter pathologischen Bedingungen eine entscheidende Rolle spielen. Ändert sich in einer solchen Situation das zelluläre Redoxpotential, würde Cortisol gemäß der genannten These nun agonistisch am MR wirken. In diesem Fall könnte eine zusätzliche Inaktivierung der Glukokortikoide in CYP3A5*1-Allelträgern tatsächlich zu einer Verminderung MR-vermittelter Effekte führen.

4.2.2 Einfluss von *ABCB1* auf die *CYP3A5*-mRNA-Expression

Eine genetische Interaktion zwischen *CYP3A5* und *ABCB1* mit gemeinsamer Beeinflussung der Blutdruckhöhe wurde in einer Untersuchung an 375 Individuen mit vornehmlich Ostafrikanischer Abstammung (Einwohner der Seychellen) postuliert (87). Diese Wechselwirkung schien sich vor allem bei hoher Natriumexkretion im Urin – höchstwahrscheinlich ein Surrogat für eine höhere diätetische Salzaufnahme – zu manifestieren. In diesem Fall war das *CYP3A5*1*-Allel mit höherem Blutdruck assoziiert, allerdings nur bei denjenigen Individuen, die nicht das *ABCB1 3435T*-Allel trugen. Auf der anderen Seite war *ABCB1 3435T* mit höherem Blutdruck assoziiert bei den Individuen, die nicht *CYP3A5*1* trugen. Sowohl Individuen, die keines der beiden Allele besaßen als auch Träger beider Allele wiesen insgesamt niedrigere Blutdrücke auf als Träger jeweils nur eines Allels. Die Autoren interpretieren dies als eine antagonistische Wirkung von *CYP3A5*1* und *ABCB1 3435T* auf die Blutdruckregulation mit steigendem Salzkonsum (64). Weitere Beobachtungen führten zu der Vermutung, die Vermittlung dieses Effekts auf den Blutdruck geschehe via Modulation des RAAS. So wurde beobachtet, dass die *ABCB1 3435T*- und *2677T*-Allele mit der Höhe des Plasmaaldosterons nur in Trägern des *CYP3A5*1*-Allels positiv korrelierten, während sie in Individuen ohne *CYP3A5*1* mit der Plasmapareninaktivität assoziiert waren (87). Weiterhin waren die Genotypen *ABCB1 3435CT* und *-TT* in *CYP3A5*1*-Allelträgern mit gesteigerter distaler Natriumresorption assoziiert. Im Ansprechen des Blutdrucks auf eine antihypertensive Therapie mit dem ACE-Hemmer Lisinopril im Vergleich zum Thiaziddiuretikum Hydrochlorothiazid zeigte sich, dass eine ähnliche Interaktion der beiden Gene für die tagsüber gemessenen Blutdruckwerte, jedoch nicht für die nächtlichen galt. Bezüglich der Form dieser Interaktion wurde von den Autoren vermutet, die *ABCB1*-Genotypen könnten die mRNA-Expression von *CYP3A5* in der Niere beeinflussen. Hintergrund dieser These war eine aktuelle Studie, die eine Assoziation des *ABCB1 2677T*-Allels mit einer erhöhten basalen *CYP3A4*-Expression in Leber und Intestinum beschrieb (152).

In der vorliegenden Arbeit wurden daher für alle untersuchten Individuen die *ABCB1*-Haplotypen bestimmt und bezüglich einer möglichen Differenz in der CYP3A5-mRNA-Expression analysiert. Aus der Ermittlung der Genotypen bezüglich der *ABCB1*-Polymorphismen 1236C>T, 2677G>T/A und 3435C>T, ließen sich in der Auswertung der Daten neun verschiedene Haplotypen ableiten, wobei drei dieser Haplotypen zusammen bereits mehr als 90% der genetischen Variation erfassten. Mit einer Frequenz von etwa 43% war der Haplotyp 1236C/2677G/3435C (H1) in unserer Population der häufigste, gefolgt vom Haplotyp TTT (H2) mit einer Frequenz von 39% sowie CGT (H3) mit etwa 11%. In vorangegangenen Untersuchungen finden sich diesbezüglich für die kaukasische Bevölkerung vergleichbare Frequenzen mit durchschnittlich 37-43% für den CGC-, 32-41% für den TTT- und 6-12% für den CGT-Haplotyp (112, 113, 153). Im Hinblick auf die postulierte Gen-Gen-Interaktion fand sich in der vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang zwischen einem spezifischen *ABCB1*-Haplotyp und der Höhe der mRNA-Expression von CYP3A5. Damit kann zumindest die Vermutung, *ABCB1* wirke sich auf die CYP3A5-mRNA-Expression aus, nicht unterstützt werden. Eine wesentliche Limitation der durchgeführten Untersuchung liegt allerdings auch hier in der geringen Allelfrequenz von *CYP3A5*1* in der kaukasischen Bevölkerung (48). Es ist daher nicht auszuschließen, dass eine analoge Untersuchung an einem deutlich größeren kaukasischen Kollektiv oder aber einem anderen ethnischen Kollektiv wie beispielsweise mit afroamerikanischem Hintergrund, zu einem abweichendem Ergebnis führen könnte. Weitere methodische Schwächen liegen in der Ermittlung der Haplotypen auf der Basis einer Wahrscheinlichkeitsschätzung, insbesondere unter Inklusion des triallelischen SNPs 2677G>T/A, sowie der Verwendung eines additiven und eines rezessiven Vererbungsmodells. Außerdem konnten wir beeinflussende Umweltfaktoren aufgrund der retrospektiven Datenschau nicht mit einbeziehen. Zum Beispiel sind in der eingangs beschriebenen Untersuchung die statistisch signifikanten Differenzen in der Blutdruckhöhe vor allem unter steigendem Salzkonsum beobachtet worden (87); die Information über das diätetische Verhalten unseres Patientenkollektivs lag uns jedoch nicht vor.

Auch unabhängig von einem Einfluss des *ABCB1*-Genotyps auf die CYP3A5-mRNA sind noch eine Vielzahl weiterer Wechselwirkungsmechanismen auf DNA-, RNA- und Proteinebene denkbar. So teilen der Effluxtransporter MDR1 und das Detoxifikationsenzym CYP3A5 viele Substrate, die zum Teil induzierend oder inhibitorisch auf eines der beiden Proteine wirken. Daher ist eine Wechselwirkung auf Proteinebene wie beispielsweise über Feedbackmechanismen vorstellbar. Zudem sind unabhängige Effekte der beiden Proteine auf ein gemeinsames Substrat mit Wirkung auf den Blutdruck möglich. So gibt es sowohl für *ABCB1*/MDR1 als auch für CYP3A5 Hinweise auf eine Beeinflussung des RAAS über Aldosteron (64, 83, 154).

4.2.3 Differenzen im renalen Expressionsmuster von CYP3A5

In der Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit anhand von Gefrier- und Paraffinschnitten gewonnen wurden, zeigt sich eine Zunahme der Proteinexpression vor allem im proximalen Tubulus bei Individuen mit erhöhter CYP3A5-mRNA-Expression bzw. Trägern des *CYP3A5*1*-Allels. Prinzipiell schien das CYP3A5-Enzym jedoch in allen epithelialen Strukturen des Nierengewebes exprimiert zu sein.

In der Literatur sind diesbezüglich zum großen Teil ähnliche Daten zu finden. In einer länger zurückliegenden Untersuchung wird eine schwache renale Immunoreaktion auf einen monoklonalen CYP3A-Antikörper im proximalen Tubulus beschrieben (155). In einer späteren Veröffentlichung wurde in gesundem Nierengewebe eine starke Immunoreaktion auf den gleichen CYP3A-Antikörper im proximalen Tubulus und dem Sammelrohr beobachtet, während der distale Tubulus nur eine schwache und das Glomerulum keine Immunoreaktion zeigte (156). Fast zeitgleich berichtete eine weitere Arbeitsgruppe von einer in ihrer immunhistochemischen Untersuchung gelegentlich aufgetretenen fokalen CYP3A-Immunoreaktion im proximalen Tubulus (157). In einer aktuellen Studie wird eine renale CYP3A5-Expression sowohl im proximalen als auch im distalen Tubulus beschrieben, und zwar in den Nuklei, im Zytoplasma und der apikalen Plasmamembran (158).

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten die Autoren einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung keine signifikante Assoziation zwischen *CYP3A5*-Genotyp und immunhistochemisch analysierter *CYP3A5*-Expression in der Niere nachweisen (159), obwohl in einer zuvor erschienenen Studie derselben Arbeitsgruppe ein signifikanter Zusammenhang zwischen *CYP3A5**1-Allelstatus und Auftreten einer CNIT gefunden worden war (67). Eine mögliche Erklärung für diesen Kontrast ist die Tatsache, dass in der zuerst genannten Studie alle Teilnehmer (einschließlich der Kontrollgruppe) nach Nierentransplantation immunsuppressiver Medikation wie beispielsweise Kortikosteroiden ausgesetzt waren. Der Einfluss dieser potentiellen *CYP3A*-Induktion könnte die genetisch determinierte Variabilität der *CYP3A5*-Expression maskiert haben.

In der Gesamtschau der Literatur in Verbindung mit den eigenen Ergebnissen scheint für die renale *CYP3A5*-Expression – vor allem in Trägern des *CYP3A5**1-Allels – der proximale Tubulus von entscheidender Bedeutung zu sein. Überlegungen bezüglich einer Rolle von *CYP3A5* für die Blutdruckregulation implizieren daher auch die pathophysiologische Bedeutung des proximalen Tubulus für die essentielle Hypertonie. Da die initiale Rückresorption von Natrium über eine Reihe aktiver Transporter im proximalen Tubulus geschieht und damit wesentlich den extrazellulären Flüssigkeitshaushalt beeinflusst, ist dieser Abschnitt des Nephrons von entscheidender Bedeutung für die Blutdruckhomöostase. So finden unter physiologischen Bedingungen etwa 65-70% der Natrium- und Wasserresorption im proximalen Tubulus statt (160). Bei chronischem Bluthochdruck findet eine Steigerung des Natriumtransports für die essentielle Hypertonie primär im proximalen Tubulus und dem dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife statt, während der distale Tubulus eher in den monogenen Hypertonieformen pathophysiologische Relevanz besitzt (160).

Wichtige Natriumtransporter im proximalen Tubulus umfassen Natrium-Glucose-Cotransporter (SGLT), Natrium-Aminosäure-Symporter, Na^+ - H^+ -Antiporter (NHE) und Natrium-Phosphat-Cotransporter Typ 2 (NaPi2) an der luminalen Membran sowie Na^+ - K^+ -ATPase und Natrium-Bicarbonat-Cotransporter (NBC) an der basolateralen Seite des Tubulusepithels.

Auch MDR1 ist in der apikalen Membran des proximalen Tubulus lokalisiert (103, 161). Angesichts dieser Ko-Lokalisation ist eine Interaktion von *ABCB1*/MDR1 mit CYP3A5 daher weiterhin plausibel.

Eine hauptsächliche Lokalisation von CYP3A5 im proximalen Tubulus schließt aber auch einen Effekt auf den MR nicht aus. So gibt es neben der klassischen Lokalisation in den distalen Segmenten des Nephrons auch Hinweise auf die mRNA- und Proteinexpression des MR im proximalen Tubulus, wo genotrope und nicht-genotrope Effekte von Aldosteron auf die Aktivität der Transporter NHE1 und NHE3 beschrieben worden sind (162, 163).

5. Zusammenfassung

In der aktuellen Literatur wird *CYP3A5* als ein interessantes neues Kandidatengen für die Blutdruckforschung angesehen. Sowohl Ergebnisse aus der tierexperimentellen Grundlagenforschung als auch klinisch-prospektive Assoziationsstudien der letzten Jahre gaben Grund zu der Annahme, die mischfunktionelle Oxidase *CYP3A5* habe neben ihrer Rolle in der hepatischen Fremdstoffmetabolisierung eine physiologische Bedeutung für die Blutdruckregulation. Mit der Entdeckung eines funktionellen Polymorphismus im *CYP3A5*-Gen konnten starke interindividuelle Schwankungen der Proteinexpression von *CYP3A5* erklärt werden. Untersuchungen an Lebergewebe zeigten, dass ein einzelner Basenaustausch im Intron 3 des *CYP3A5*-Gens (6986A>G) zu alternativem Spleißen der prä-mRNA führt. Die unmittelbare Folge für den Translationsprozess besteht in einer Verschiebung des Protein-Leserasters mit Kreation mehrerer vorzeitiger Stoppkodons und damit einem Abbruch der Proteinsynthese. Daher zeigen Träger von mindestens einem Wildtyp-Allel (A-Allel, *CYP3A5**1) eine deutliche Proteinexpression, während bei homozygotem Vorliegen des mutierten Allels (G-Allel, *CYP3A5**3) nur sehr geringe Mengen funktionellen Proteins gebildet werden. Da *CYP3A5* als einziges *CYP3A*-Isoenzym eine deutliche Expression in der humanen Niere zeigt, erscheint ein Einfluss des Polymorphismus auf die Blutdruckregulation plausibel. Entsprechende Untersuchungen an Studienpopulationen unterschiedlichen ethnischen Hintergrunds führten jedoch bislang zu widersprüchlichen Ergebnissen. Die vorliegende Arbeit sollte daher die Genotyp-Phänotyp-Assoziation von *CYP3A5* in menschlichem Nierengewebe beschreiben und weitere Erkenntnisse zu einem möglichen Einfluss auf die renale Blutdruckregulation hinzufügen. Dazu wurden zunächst $n=102$ Nierenproben eines kaukasischen Kollektivs hinsichtlich des 6986A>G-SNP im *CYP3A5*-Gen genotypisiert und anschließend der Gehalt an korrekt gespleißter *CYP3A5*-mRNA für jedes Individuum mittels Realtime-PCR quantifiziert. Es konnte eine klare Abhängigkeit der Expressionshöhe vom Vorhandensein eines oder zweier funktioneller *CYP3A5**1-Allele festgestellt werden.

Eine Beeinflussung der Genotyp-Phänotyp-Assoziation durch das strukturell sehr ähnliche und zumindest in der Leber quantitativ deutlich überlegene CYP3A4 oder durch weitere mit dem 6986A>G-SNP gekoppelte Polymorphismen in demselben Haplotypenblock um das *CYP3A5*-Gen konnte dabei nahezu ausgeschlossen werden. Hinsichtlich einer potentiellen Wirkung von CYP3A5 auf die Blutdruckregulation wurde eine Assoziation des *CYP3A5**1-Allels mit der Transkription zweier Schlüsselproteine der Aktivierung des Mineralokortikoidrezeptors, ENaC α und SGK1, untersucht. Hierbei konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen *CYP3A5**1-Allelstatus und der Expressionshöhe der ENaC α - und SGK1-mRNA gefunden werden. Gemäß einer weiteren aktuellen Hypothese findet eine Gen-Gen-Interaktion zwischen *CYP3A5* und dem für den MDR1-Effluxtransporter kodierenden Gen *ABCB1* mit Auswirkungen auf die Blutdruckhöhe beim Menschen statt. Nach Haplotypanalyse unserer Studienpopulation zeigte sich jedoch kein signifikanter Einfluss eines *ABCB1*-Haplotyps auf die Höhe der quantifizierten CYP3A5-mRNA. Die Lokalisierung des CYP3A5-Proteins in der humanen Niere erfolgte mittels Immunhistochemie anhand von Kryo- und Paraffinschnitten renaler Gewebeproben mit Hilfe eines polyklonalen CYP3A5-Antikörpers. Die Spezifität des verwendeten Antikörpers wurde mittels Western blot nachgewiesen. Während eine basale CYP3A5-Expression in allen epithelialen Strukturen der Niere nachweisbar war, zeigten sich quantitative Unterschiede in Abhängigkeit vom *CYP3A5**1-Allelstatus ausschließlich im proximalen Tubulus.

Diese Arbeit zeigt erstmals an einem relativ großen kaukasischen Kollektiv humaner Nierenproben, dass die mRNA-Expression von CYP3A5 analog zu Untersuchungen an Lebergewebe abhängig vom vorliegenden *CYP3A5*-Genotyp ist. Aktuelle Thesen bezüglich einer potentiellen Wirkung von CYP3A5 auf die Blutdruckregulation konnten zwar weder eindeutig bestätigt noch abgelehnt werden, allerdings könnten die in dieser Arbeit nachgewiesene Lokalisation der renalen CYP3A5-Proteinexpression sowie die Allel-spezifischen Expressionsunterschiede im proximalen Tubulus einen weiteren wichtigen Beitrag zu dessen möglicher Aufklärung leisten.

6. Literaturverzeichnis

1. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. Arch Biochem Biophys 1958;75(2):376-86.
2. Omura T, Sato R. The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature. J Biol Chem 1964;239:2370-8.
3. Cooper DY, Levin S, Narasimhulu S, Rosenthal O. Photochemical Action Spectrum of the Terminal Oxidase of Mixed Function Oxidase Systems. Science 1965;147:400-2.
4. Nelson DR. The cytochrome p450 homepage. Hum Genomics 2009;4(1):59-65.
5. Nelson DR. Cytochrome P450 nomenclature, 2004. Methods Mol Biol 2006;320:1-10.
6. Sim SC, Ingelman-Sundberg M. The human cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee Web site: submission criteria, procedures, and objectives. Methods Mol Biol 2006;320:183-91.
7. Hasler JA. Human cytochromes P450. Mol Aspects Med 1999;20(1-2):1-137.
8. Guengerich FP. Cytochrome p450 and chemical toxicology. Chem Res Toxicol 2008;21(1):70-83.
9. Wojnowski L, Kamdem LK. Clinical implications of CYP3A polymorphisms. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2006;2(2):171-82.
10. Plant N. The human cytochrome P450 sub-family: transcriptional regulation, inter-individual variation and interaction networks. Biochim Biophys Acta 2007;1770(3):478-88.
11. Ensembl. 2009. <http://Aug2010.archive.ensembl.org/index.html> (letzter Zugriff 09.08.2010)
12. Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. Adv Drug Deliv Rev 2002;54(10):1271-94.
13. Wilkinson GR. Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of in vivo activity in humans. J Pharmacokinet Biopharm 1996;24(5):475-90.

14. Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table. Indiana University School of Medicine, 2007. <http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/table.aspx> (letzter Zugriff 19.06.2009)
15. Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers. U.S. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research, 2009. <http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm> (letzter Zugriff 12.08.2010)
16. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. National Center for Biotechnology Information, 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene> (letzter Zugriff 12.08.2010)
17. Burk O, Schwab M. The limited impact of CYP3A5 genotype for the pharmacokinetics of CYP3A substrates. *Eur J Clin Pharmacol* 2007;63(12):1097-8.
18. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001;27(4):383-91.
19. Lamba JK, Lin YS, Thummel K, et al. Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations. *Pharmacogenetics* 2002;12(2):121-32.
20. Eiselt R, Domanski TL, Zibat A, et al. Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants. *Pharmacogenetics* 2001;11(5):447-58.
21. Fukushima-Uesaka H, Saito Y, Watanabe H, et al. Haplotypes of CYP3A4 and their close linkage with CYP3A5 haplotypes in a Japanese population. *Hum Mutat* 2004;23(1):100.
22. Solus JF, Arietta BJ, Harris JR, et al. Genetic variation in eleven phase I drug metabolism genes in an ethnically diverse population. *Pharmacogenomics* 2004;5(7):895-931.
23. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001;29(1):308-11.
24. He P, Court MH, Greenblatt DJ, Von Moltke LL. Genotype-phenotype associations of cytochrome P450 3A4 and 3A5 polymorphism with midazolam clearance in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 2005;77(5):373-87.
25. Backman JT, Kivisto KT, Olkkola KT, Neuvonen PJ. The area under the plasma concentration-time curve for oral midazolam is 400-fold larger during treatment with itraconazole than with rifampicin. *Eur J Clin Pharmacol* 1998;54(1):53-8.

26. Floyd MD, Gervasini G, Masica AL, et al. Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of midazolam in European- and African-American men and women. *Pharmacogenetics* 2003;13(10):595-606.
27. Lin YS, Lockwood GF, Graham MA, et al. In-vivo phenotyping for CYP3A by a single-point determination of midazolam plasma concentration. *Pharmacogenetics* 2001;11(9):781-91.
28. Kolars JC, Schmiedlin-Ren P, Schuetz JD, Fang C, Watkins PB. Identification of rifampin-inducible P450IIIA4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. *J Clin Invest* 1992;90(5):1871-8.
29. Kolars JC, Lown KS, Schmiedlin-Ren P, et al. CYP3A gene expression in human gut epithelium. *Pharmacogenetics* 1994;4(5):247-59.
30. Finnstrom N, Bjelfman C, Soderstrom TG, et al. Detection of cytochrome P450 mRNA transcripts in prostate samples by RT-PCR. *Eur J Clin Invest* 2001;31(10):880-6.
31. Koch I, Weil R, Wolbold R, et al. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos* 2002;30(10):1108-14.
32. Komori M, Nishio K, Kitada M, et al. Fetus-specific expression of a form of cytochrome P-450 in human livers. *Biochemistry* 1990;29(18):4430-3.
33. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, et al. Characterization of microsomal cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of xenobiotic chemicals in human fetal liver and adult lungs. *Drug Metab Dispos* 1996;24(5):515-22.
34. Burk O, Tegude H, Koch I, et al. Molecular mechanisms of polymorphic CYP3A7 expression in adult human liver and intestine. *J Biol Chem* 2002;277(27):24280-8.
35. Sim SC, Edwards RJ, Boobis AR, Ingelman-Sundberg M. CYP3A7 protein expression is high in a fraction of adult human livers and partially associated with the CYP3A7*1C allele. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15(9):625-31.
36. Schuetz JD, Kauma S, Guzelian PS. Identification of the fetal liver cytochrome CYP3A7 in human endometrium and placenta. *J Clin Invest* 1993;92(2):1018-24.
37. Domanski TL, Finta C, Halpert JR, Zaphiropoulos PG. cDNA cloning and initial characterization of CYP3A43, a novel human cytochrome P450. *Mol Pharmacol* 2001;59(2):386-92.
38. Gellner K, Eiselt R, Hustert E, et al. Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene. *Pharmacogenetics* 2001;11(2):111-21.

39. Westlind A, Malmebo S, Johansson I, et al. Cloning and tissue distribution of a novel human cytochrome p450 of the CYP3A subfamily, CYP3A43. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281(5):1349-55.
40. Zeigler-Johnson C, Friebe T, Walker AH, et al. CYP3A4, CYP3A5, and CYP3A43 genotypes and haplotypes in the etiology and severity of prostate cancer. *Cancer Res* 2004;64(22):8461-7.
41. Stone A, Ratnasinghe LD, Emerson GL, et al. CYP3A43 Pro(340)Ala polymorphism and prostate cancer risk in African Americans and Caucasians. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(5):1257-61.
42. Rebbeck TR, Rennert H, Walker AH, et al. Joint effects of inflammation and androgen metabolism on prostate cancer severity. *Int J Cancer* 2008;123(6):1385-9.
43. Liu YT, Hao HP, Liu CX, Wang GJ, Xie HG. Drugs as CYP3A probes, inducers, and inhibitors. *Drug Metab Rev* 2007;39(4):699-721.
44. Wojnowski L. Genetics of the variable expression of CYP3A in humans. *Ther Drug Monit* 2004;26(2):192-9.
45. Daly AK. Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms. *Clin Pharmacokinet* 2006;45(1):13-31.
46. Wrighton SA, Brian WR, Sari MA, et al. Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III_{A5} (HLp3). *Mol Pharmacol* 1990;38(2):207-13.
47. Paulussen A, Lavrijsen K, Bohets H, et al. Two linked mutations in transcriptional regulatory elements of the CYP3A5 gene constitute the major genetic determinant of polymorphic activity in humans. *Pharmacogenetics* 2000;10(5):415-24.
48. Xie HG, Wood AJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics* 2004;5(3):243-72.
49. Lin YS, Dowling AL, Quigley SD, et al. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol Pharmacol* 2002;62(1):162-72.
50. Kreutz R, Zuurman M, Kain S, Bolbrinker J, de Jong PE, Navis G. The role of the cytochrome P450 3A5 enzyme for blood pressure regulation in the general Caucasian population. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15(12):831-7.
51. Fromm MF, Schwilden H, Bachmakov I, König J, Bremer F, Schuttler J. Impact of the CYP3A5 genotype on midazolam pharmacokinetics and pharmacodynamics during intensive care sedation. *Eur J Clin Pharmacol* 2007;63(12):1129-33.

52. Lepper ER, Baker SD, Permenter M, et al. Effect of common CYP3A4 and CYP3A5 variants on the pharmacokinetics of the cytochrome P450 3A phenotyping probe midazolam in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005;11(20):7398-404.
53. Haufroid V, Mourad M, Van Kerckhove V, et al. The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004;14(3):147-54.
54. Hu YF, Qiu W, Liu ZQ, et al. Effects of genetic polymorphisms of CYP3A4, CYP3A5 and MDR1 on cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33(11):1093-8.
55. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003;74(3):245-54.
56. Anglicheau D, Thervet E, Etienne I, et al. CYP3A5 and MDR1 genetic polymorphisms and cyclosporine pharmacokinetics after renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75(5):422-33.
57. Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RH, et al. Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney and heart transplant recipients and the influence of ethnicity and genetic polymorphisms in the MDR-1, CYP3A4, and CYP3A5 genes. *Clin Pharmacol Ther* 2004;76(6):545-56.
58. Kreuz R, Zurcher H, Kain S, Martus P, Offermann G, Beige J. The effect of variable CYP3A5 expression on cyclosporine dosing, blood pressure and long-term graft survival in renal transplant patients. *Pharmacogenetics* 2004;14(10):665-71.
59. Zhao Y, Song M, Guan D, et al. Genetic polymorphisms of CYP3A5 genes and concentration of the cyclosporine and tacrolimus. *Transplant Proc* 2005;37(1):178-81.
60. Anglicheau D, Legendre C, Beaune P, Thervet E. Cytochrome P450 3A polymorphisms and immunosuppressive drugs: an update. *Pharmacogenomics* 2007;8(7):835-49.
61. Kivisto KT, Niemi M, Schaeffeler E, et al. Lipid-lowering response to statins is affected by CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2004;14(8):523-5.
62. Frohlich M, Hoffmann MM, Burhenne J, Mikus G, Weiss J, Haefeli WE. Association of the CYP3A5 A6986G (CYP3A5*3) polymorphism with saquinavir pharmacokinetics. *Br J Clin Pharmacol* 2004;58(4):443-4.
63. Park JY, Kim KA, Park PW, et al. Effect of CYP3A5*3 genotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of alprazolam in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2006;79(6):590-9.

64. Bochud M, Bovet P, Burnier M, Eap CB. CYP3A5 and ABCB1 genes and hypertension. *Pharmacogenomics* 2009;10(3):477-87.
65. Leskela S, Honrado E, Montero-Conde C, et al. Cytochrome P450 3A5 is highly expressed in normal prostate cells but absent in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2007;14(3):645-54.
66. Haehner BD, Gorski JC, Vandenbranden M, et al. Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. *Mol Pharmacol* 1996;50(1):52-9.
67. Kuypers DR, Naesens M, de Jonge H, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Tacrolimus dose requirements and CYP3A5 genotype and the development of calcineurin inhibitor-associated nephrotoxicity in renal allograft recipients. *Ther Drug Monit* 2010;32(4):394-404.
68. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 2006;367(9524):1747-57.
69. Middeke M. Arterielle Hypertonie: Empfohlen von der Deutschen Hochdruckliga/Deutsche Hypertonie Gesellschaft Referenz-Reihe Kardiologie. 1. Auflage: Georg Thieme Verlag KG; 2005.
70. Lemmer B, Brune K. Pharmakotherapie: Klinische Pharmakologie. 14. Auflage: Springer Verlag; 2010.
71. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005;365(9455):217-23.
72. Wolf-Maier K, Cooper RS, Banegas JR, et al. Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *Jama* 2003;289(18):2363-9.
73. Rosenthal J, Kolloch R. Arterielle Hypertonie. 4. Auflage: Springer Verlag GmbH; 2004.
74. Binder A. A review of the genetics of essential hypertension. *Curr Opin Cardiol* 2007;22(3):176-84.
75. Givens RC, Lin YS, Dowling AL, et al. CYP3A5 genotype predicts renal CYP3A activity and blood pressure in healthy adults. *J Appl Physiol* 2003;95(3):1297-300.
76. Watlington CO, Kramer LB, Schuetz EG, et al. Corticosterone 6 beta-hydroxylation correlates with blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol* 1992;262(6 Pt 2):F927-31.

77. Schuetz EG, Schuetz JD, Grogan WM, et al. Expression of cytochrome P450 3A in amphibian, rat, and human kidney. *Arch Biochem Biophys* 1992;294(1):206-14.
78. Ghosh S, Grogan WM, Basu A, Watlington C. Renal corticosterone 6 beta-hydroxylase in the spontaneously hypertensive rat. *Biochim Biophys Acta* 1993;1182(2):152-6.
79. Ghosh SS, Basu AK, Ghosh S, et al. Renal and hepatic family 3A cytochromes P450 (CYP3A) in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Pharmacol* 1995;50(1):49-54.
80. Bochud M, Eap CB, Elston RC, et al. Association of CYP3A5 genotypes with blood pressure and renal function in African families. *J Hypertens* 2006;24(5):923-9.
81. Zhang L, Miyaki K, Wang W, Muramatsu M. CYP3A5 polymorphism and sensitivity of blood pressure to dietary salt in Japanese men. *J Hum Hypertens* 2010;24(5):345-50.
82. Kivisto KT, Niemi M, Schaeffeler E, et al. CYP3A5 genotype is associated with diagnosis of hypertension in elderly patients: data from the DEBATE Study. *Am J Pharmacogenomics* 2005;5(3):191-5.
83. Fromm MF, Schmidt BM, Pahl A, Jacobi J, Schmieder RE. CYP3A5 genotype is associated with elevated blood pressure. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15(10):737-41.
84. Lieb W, Bolbrinker J, Doring A, et al. No association of the CYP3A5*1 allele with blood pressure and left ventricular mass and geometry: the KORA/MONICA Augsburg echocardiographic substudy. *Clin Sci (Lond)* 2006;111(6):365-72.
85. Langaee TY, Gong Y, Yarandi HN, et al. Association of CYP3A5 polymorphisms with hypertension and antihypertensive response to verapamil. *Clin Pharmacol Ther* 2007;81(3):386-91.
86. Ho H, Pinto A, Hall SD, et al. Association between the CYP3A5 genotype and blood pressure. *Hypertension* 2005;45(2):294-8.
87. Eap CB, Bochud M, Elston RC, et al. CYP3A5 and ABCB1 genes influence blood pressure and response to treatment, and their effect is modified by salt. *Hypertension* 2007;49(5):1007-14.
88. Xi B, Wang C, Liu L, et al. Association of the CYP3A5 polymorphism (6986G>A) with blood pressure and hypertension. *Hypertens Res* 2011;34(11):1216-20.
89. Watlington CO, Perkins FM, Munson PJ, Handler JS. Aldosterone and corticosterone binding and effects on Na⁺ transport in cultured kidney cells. *Am J Physiol* 1982;242(6):F610-9.

90. Duncan RL, Grogan WM, Kramer LB, Watlington CO. Corticosterone's metabolite is an agonist for Na⁺ transport stimulation in A6 cells. *Am J Physiol* 1988;255(4 Pt 2):F736-48.
91. Grogan WM, Phillips VM, Schuetz EG, Guzelian PS, Watlington CO. Corticosterone 6 beta-hydroxylase in A6 epithelia: a steroid-inducible cytochrome P-450. *Am J Physiol* 1990;258(3 Pt 1):C480-8.
92. Waxman DJ, Attisano C, Guengerich FP, Lapenson DP. Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6 beta-hydroxylase cytochrome P-450 enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1988;263(2):424-36.
93. Agrawal R, Lichtenstein I, Siebe H, Hierholzer K. In vitro 6 beta-hydroxylation of progesterone in human renal tissue. *Wien Klin Wochenschr* 1997;109(12-13):493-6.
94. Katz FH, Lipman MM, Frantz AG, Jailer JW. The physiologic significance of 6beta-hydroxycortisol in human corticoid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1962;22:71-7.
95. Yamaji T, Motohashi K, Murakawa S, Ibayashi H. Urinary excretion of 6 beta-hydroxycortisol in states of altered thyroid function. *J Clin Endocrinol Metab* 1969;29(6):801-6.
96. Frantz AG, Katz FH, Jailer JW. 6-beta-hydroxy-cortisol: high levels in human urine in pregnancy and toxemia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1960;105:41-3.
97. Thompson EE, Kuttub-Boulos H, Witonsky D, Yang L, Roe BA, Di Rienzo A. CYP3A variation and the evolution of salt-sensitivity variants. *Am J Hum Genet* 2004;75(6):1059-69.
98. Morris DJ, Latif SA, Rokaw MD, Watlington CO, Johnson JP. A second enzyme protecting mineralocorticoid receptors from glucocorticoid occupancy. *Am J Physiol* 1998;274(5 Pt 1):C1245-52.
99. Sissung TM, Gardner ER, Gao R, Figg WD. Pharmacogenetics of membrane transporters: a review of current approaches. *Methods Mol Biol* 2008;448:41-62.
100. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 2008;38(7-8):802-32.
101. Bodor M, Kelly EJ, Ho RJ. Characterization of the human MDR1 gene. *Aaps J* 2005;7(1):E1-5.
102. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, et al. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics* 2010.

103. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, et al. Very important pharmacogene summary. *Pharmacogenet Genomics* 2011;21(3):152-61.
104. Wacher VJ, Wu CY, Benet LZ. Overlapping substrate specificities and tissue distribution of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy. *Mol Carcinog* 1995;13(3):129-34.
105. Schuetz EG, Beck WT, Schuetz JD. Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 1996;49(2):311-8.
106. Schuetz EG, Schinkel AH, Relling MV, Schuetz JD. P-glycoprotein: a major determinant of rifampicin-inducible expression of cytochrome P4503A in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(9):4001-5.
107. Zhang D, Yu ZY, Cruz P, Kong Q, Li S, Kone BC. Epigenetics and the control of epithelial sodium channel expression in collecting duct. *Kidney Int* 2009;75(3):260-7.
108. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Rapp BA, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Res* 2000;28(1):15-8.
109. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74(12):5463-7.
110. Biosystems P. Sequence Detection Systems Quantitative Assay Design and Optimization.
111. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 2000;7(1-2):203-14.
112. Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, et al. Sequence diversity and haplotype structure in the human ABCB1 (MDR1, multidrug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics* 2003;13(8):481-94.
113. Kim RB, Leake BF, Choo EF, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70(2):189-99.
114. Hustert E, Haberl M, Burk O, et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001;11(9):773-9.
115. King BP, Leathart JB, Mutch E, Williams FM, Daly AK. CYP3A5 phenotype-genotype correlations in a British population. *Br J Clin Pharmacol* 2003;55(6):625-9.

116. Westlind-Johnsson A, Malmebo S, Johansson A, et al. Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 2003;31(6):755-61.
117. Burk O, Wojnowski L. Cytochrome P450 3A and their regulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004;369(1):105-24.
118. Black DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 2003;72:291-336.
119. EURASNET. European Alternative Splicing Network, 2006. <http://www.eurasnet.info/> (letzter Zugriff 28.03.2011)
120. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431(7011):931-45.
121. Chen M, Manley JL. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(11):741-54.
122. Faustino NA, Cooper TA. Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev* 2003;17(4):419-37.
123. Tazi J, Bakkour N, Stamm S. Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792(1):14-26.
124. Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet* 2007;8(10):749-61.
125. Ward AJ, Cooper TA. The pathobiology of splicing. *J Pathol* 2010;220(2):152-63.
126. Busi F, Cresteil T. CYP3A5 mRNA degradation by nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Pharmacol* 2005;68(3):808-15.
127. Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* 2007;76:51-74.
128. Isken O, Maquat LE. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* 2007;21(15):1833-56.
129. Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 9):1773-6.

130. Nicholson P, Yepiskoposyan H, Metze S, Zamudio Orozco R, Kleinschmidt N, Muhlemann O. Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell Mol Life Sci* 2010;67(5):677-700.
131. The International HapMap Project. *Nature* 2003;426(6968):789-96.
132. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet* 2001;27(3):234-6.
133. Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nat Genet* 2001;29(2):229-32.
134. Jeffreys AJ, Kauppi L, Neumann R. Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. *Nat Genet* 2001;29(2):217-22.
135. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002;296(5576):2225-9.
136. Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 2010;467(7311):52-8.
137. Kreuz R, Bolbrinker J, van der Sman-de Beer F, et al. CYP3A5 genotype is associated with longer patient survival after kidney transplantation and long-term treatment with cyclosporine. *Pharmacogenomics J* 2008;8(6):416-22.
138. Westlind A, Lofberg L, Tindberg N, Andersson TB, Ingelman-Sundberg M. Interindividual differences in hepatic expression of CYP3A4: relationship to genetic polymorphism in the 5'-upstream regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;259(1):201-5.
139. Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB. Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(16):1225-9.
140. Paris PL, Kupelian PA, Hall JM, et al. Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8(10):901-5.
141. Plummer SJ, Conti DV, Paris PL, Curran AP, Casey G, Witte JS. CYP3A4 and CYP3A5 genotypes, haplotypes, and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12(9):928-32.
142. Dally H, Edler L, Jager B, et al. The CYP3A4*1B allele increases risk for small cell lung cancer: effect of gender and smoking dose. *Pharmacogenetics* 2003;13(10):607-18.

143. Miao J, Jin Y, Marunde RL, et al. Association of genotypes of the CYP3A cluster with midazolam disposition in vivo. *Pharmacogenomics J* 2009;9(5):319-26.
144. Loffing J, Korbmacher C. Regulated sodium transport in the renal connecting tubule (CNT) via the epithelial sodium channel (ENaC). *Pflugers Arch* 2009;458(1):111-35.
145. Briet M, Schiffrin EL. Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol* 2010;6(5):261-73.
146. Lee IH, Campbell CR, Cook DI, Dinudom A. Regulation of epithelial Na⁺ channels by aldosterone: role of Sgk1. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008;35(2):235-41.
147. Snyder PM. The epithelial Na⁺ channel: cell surface insertion and retrieval in Na⁺ homeostasis and hypertension. *Endocr Rev* 2002;23(2):258-75.
148. Funder JW. The nongenomic actions of aldosterone. *Endocr Rev* 2005;26(3):313-21.
149. Grossmann C, Benesic A, Krug AW, et al. Human mineralocorticoid receptor expression renders cells responsive for nongenotropic aldosterone actions. *Mol Endocrinol* 2005;19(7):1697-710.
150. Funder JW. Aldosterone and mineralocorticoid receptors in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 2010;52(5):393-400.
151. Morris DJ, Latif SA, Brem AS. Interactions of mineralocorticoids and glucocorticoids in epithelial target tissues revisited. *Steroids* 2009;74(1):1-6.
152. Lamba J, Strom S, Venkataramanan R, et al. MDR1 genotype is associated with hepatic cytochrome P450 3A4 basal and induction phenotype. *Clin Pharmacol Ther* 2006;79(4):325-38.
153. Sipeky C, Csongei V, Jaromi L, et al. Genetic variability and haplotype profile of MDR1 (ABCB1) gene in Roma and Hungarian population samples with a review of the literature. *Drug Metab Pharmacokinet* 2011.
154. Zolk O, Jacobi J, Pahl A, Fromm MF, Schmieder RE. MDR1 genotype-dependent regulation of the aldosterone system in humans. *Pharmacogenet Genomics* 2007;17(2):137-44.
155. Murray GI, Barnes TS, Sewell HF, Ewen SW, Melvin WT, Burke MD. The immunocytochemical localisation and distribution of cytochrome P-450 in normal human hepatic and extrahepatic tissues with a monoclonal antibody to human cytochrome P-450. *Br J Clin Pharmacol* 1988;25(4):465-75.

156. Murray GI, McFadyen MC, Mitchell RT, Cheung YL, Kerr AC, Melvin WT. Cytochrome P450 CYP3A in human renal cell cancer. *Br J Cancer* 1999;79(11-12):1836-42.
157. Yokose T, Doy M, Taniguchi T, et al. Immunohistochemical study of cytochrome P450 2C and 3A in human non-neoplastic and neoplastic tissues. *Virchows Arch* 1999;434(5):401-11.
158. Joy MS, Hogan SL, Thompson BD, Finn WF, Nickeleit V. Cytochrome P450 3A5 expression in the kidneys of patients with calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transplant* 2007;22(7):1963-8.
159. Metalidis C, Lerut E, Naesens M, Kuypers DR. Expression of CYP3A5 and P-glycoprotein in renal allografts with histological signs of calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Transplantation* 2011;91(10):1098-102.
160. Wang X, Armando I, Upadhyay K, Pascua A, Jose PA. The regulation of proximal tubular salt transport in hypertension: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2009;18(5):412-20.
161. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84(21):7735-8.
162. Leite-Dellova DC, Oliveira-Souza M, Malnic G, Mello-Aires M. Genomic and nongenomic dose-dependent biphasic effect of aldosterone on Na⁺/H⁺ exchanger in proximal S3 segment: role of cytosolic calcium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008;295(5):F1342-52.
163. Leite-Dellova DC, Malnic G, Mello-Aires M. Genomic and nongenomic stimulatory effect of aldosterone on H⁺-ATPase in proximal S3 segments. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300(3):F682-91.

7. Abkürzungsverzeichnis

11 β -HSD	11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase
%	Prozent
A	Adenin
aa	Aminosäuren (<i>amino acids</i>)
Abb.	Abbildung
<i>ABCB1</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family B member 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare (<i>base pairs</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CEU	HapMap-Population; Bewohner Utahs mit west- oder nordeuropäischer Abstammung
cm ²	Quadratcentimeter
CBF	Campus Benjamin Franklin
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CNIT	Calcineurininhibitor-assoziierte Nephrotoxizität
CO	Kohlenstoffmonoxid
Ct	Zyklus bei Überschreitung eines Schwellenwertes (<i>cycle threshold</i>)
CV%	Variationskoeffizient (<i>coefficient of variation</i>), relatives Streuungsmaß
CYP	Cytochrom-P450

DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DBD	Diastolischer Blutdruck
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DME	<i>drug metabolizing enzymes</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E.	Escherichia
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ESE	<i>exonic splicing enhancer</i>
ESS	<i>exonic splicing silencer</i>
et al.	<i>et alii, et alteri</i>
EURASNET	<i>European Alternative Splicing Network</i>
FRET	Förster-(auch Fluoreszenz-) Resonanzenergietransfer
G	Guanin
Gilz	<i>glucocorticoid-induced leucine zipper</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
H	Haplotyp
HCl	Salzsäure
HCT	Hydrochlorothiazid
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear Ribonucleoproteins</i>
H₂O	Wasser
ISE	<i>intronic splicing enhancer</i>
ISS	<i>intronic splicing silencer</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
K⁺	Kalium
kbp	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid

kD	kilo Dalton
KMnO ₄	Kaliumpermanganat
LD	Kopplungsungleichgewicht (<i>linkage disequilibrium</i>)
LVMl	Linksventrikulärer Massenindex
mA	Milliampère
MAD	mittlerer arterieller Druck
MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i>
MDR1	<i>Multidrug Resistance Protein 1</i> (bzw. dessen Gen)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	Mikromolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	<i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
MW	Mittelwert
<i>n</i>	Stichprobenumfang
N	Normalität
Na ⁺	Natrium
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NC	<i>Nonsense Codon</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCC	Nierenzellkarzinom
Nedd4-2	<i>Neural precursor cell-expressed, developmentally downregulated gene 4</i>
NFDM	<i>Non-fat dry milk</i>

ng	Nanogramm
NHE	Na ⁺ -H ⁺ -Antiporter
nm	Nanometer
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>
n.s.	nicht signifikant
nt	Nukleotid
NTC	Negativkontrolle (<i>No Template Control</i>)
OTC	<i>over the counter</i> (frei verkäufliche Arzneimittel)
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
P-GP	P-Glykoprotein
PD	Pulsdruck
Prä-mRNA	Präkursor-mRNA (Vorläufer der <i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>)
PTC	<i>premature termination codon</i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
rs	<i>reference SNP</i>
RT-qPCR	<i>Realtime quantitative PCR</i>
s	Sekunden
s.	siehe
S	Standard
SBD	Systolischer Blutdruck
SCC	<i>short circuit current</i>
SCNN1	<i>sodium channel, non-neuronal, Gen 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
SGK1	Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1
SHR	<i>spontaneously hypertensive rats</i>
SNP	Einzelbasenaustausch (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
snRNA	<i>small nucleolar ribonucleic acid</i>

snRNP	<i>small nuclear Ribonucleoprotein Particles</i>
SR-Proteine	Serin- und Arginin-reiche Proteine
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAO	Troleandomycin (auch: Triacetyloleandomycin)
TBE	Puffer aus TRIS, Borsäure und EDTA
TBS	<i>Tris buffered Saline</i>
TBST	TBS-Tween [®]
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
U	Urapidil
u.a.	unter anderem
UK	<i>United Kingdom</i>
UNG	Uracil-N-Glycosylase
U.S.	<i>United States</i>
UTR	untranslatierter Bereich (<i>untranslated region</i>)
V	Volt
v.a.	vor allem
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

8. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Vereinfachte Darstellung des *CYP3A*-Locus entsprechend *Entrez Gene*
- Abb. 2:** Schematische Darstellung des *CYP3A5**1/*3-Polymorphismus
- Abb. 3:** *Cluster plot* eines TaqMan[®]-SNP-Assays zur Alleldiskriminierung des *CYP3A5*-SNP 6986A>G
- Abb. 4:** Verteilung der Genotypen des *CYP3A5**1/*3-Polymorphismus in humanen Nieren
- Abb. 5:** Sequenzchromatogramme zur Bestätigung der via TaqMan[®]-SNP-Assay ermittelten Genotypen
- Abb. 6:** Genotyp-abhängige mRNA-Expression von *CYP3A5* für $n=93$ Nierenproben
- Abb. 7:** Vergleich der Höhe der mRNA-Expression von *CYP3A4* und *CYP3A5* in der Niere
- Abb. 8:** mRNA-Expression von *ENaCa* in der Niere
- Abb. 9:** mRNA-Expression von *SGK1* in der Niere
- Abb. 10:** mRNA-Expressionen von *CYP3A5*, *CYP3A4*, *ENaCa* und *SGK1* im Vergleich
- Abb. 11:** Western blot zur Sicherung der Spezifität des *CYP3A5*-Antikörpers (ab22692, Abcam)
- Abb. 12:** Western blot zur Erkennung der Spezifität des *CYP3A4*-Antikörpers (ab22704, Abcam)
- Abb. 13:** Immunhistochemischer *CYP3A*-Nachweis in einem Gefrierschnitt humaner Leber unter Verwendung eines polyklonalen *CYP3A4*-Antikörpers und eines polyklonalen *CYP3A5*-Antikörpers
- Abb. 14:** Immunhistochemischer Nachweis von *CYP3A5* in Gefrierschnitten humaner Niere unter Verwendung eines polyklonalen *CYP3A5*-Antikörpers

- Abb. 15:** Immunhistochemischer Nachweis von CYP3A5 in Paraffinschnitten humaner Niere unter Verwendung eines polyklonalen CYP3A5-Antikörpers
- Abb. 16:** Haplotypenstruktur der *CYP3A5*-Umgebung für Kaukasier (Population CEU in HapMap)
- Abb. 17:** Paarweise Kopplung der *tagging* SNPs aus Haploview 4.2
- Abb. 18:** Paarweise Kopplung der bestimmten Polymorphismen aus Haploview 4.2
- Abb. 19:** Schematische Darstellung der Wirkung von Aldosteron in einer Epithelzelle des Aldosteron-sensitiven distalen Nephrons

9. Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1:** Ethnische Allelfrequenzverteilung des *CYP3A5*-Polymorphismus 6986A>G
- Tabelle 2:** Assoziationsstudien zum Thema *CYP3A5**1/*3-Polymorphismus und Blutdruck
- Tabelle 3:** Zur Alleldiskriminierung von SNP 6986A>G (rs776746) verwendete Primer und Sonden
- Tabelle 4:** vorgefertigte TaqMan[®]-SNP-Genotyping Assays der Firma Applied Biosystems[™]
- Tabelle 5:** Für den PCR-Nachweis von 18S und PBGD verwendete Primer
- Tabelle 6:** Nukleotidsequenzen der in der Realtime-PCR verwendeten Primer und Taqman[®]-Sonden
- Tabelle 7:** Nukleotidsequenzen der für SYBR[®] Green-Assays verwendeten Primer
- Tabelle 8:** Nukleotidsequenzen der für die cDNA-Standardgenerierung verwendeten Primer
- Tabelle 9:** Charakteristika der Patienten als Kollektiv sowie unterteilt nach *CYP3A5**1-Allelstatus
- Tabelle 10:** Homologie der mRNA-Sequenzen der humanen CYP3A-Isoenzyme mittels BLAST
- Tabelle 11:** Homologie der Aminosäuresequenzen der humanen CYP3A-Isoenzyme (BLAST)
- Tabelle 12:** Einfluss der *CYP3A*-Haplotypen auf die Höhe der mRNA-Expression von *CYP3A5*
- Tabelle 13:** Frequenz der einzelnen *ABCB1*-Haplotypen und entsprechende *CYP3A5*-mRNA-Spiegel

10. Protokollverzeichnis

Protokoll 1: TaqMan[®]-SNP-Assay mit eigenen und vorgefertigten Primern

Protokoll 2: Standard-PCR-Protokoll für *CYP3A5*-Primer

Protokoll 3: Einbau fluoreszenzmarkierter ddNTPs in die DNA-Fragmente

Protokoll 4: Aufreinigung der DNA durch Ethanol-fällung und Resuspension in Formamid

Protokoll 5: Reverse Transkription nach modifiziertem Fermentas-Protokoll

Protokoll 6: Standard-PCR-Protokoll mit 18S- und PBGD-Primern

Protokoll 7: quantitative Realtime-PCR mit spezifischen TaqMan[®]-Sonden

Protokoll 8: quantitative Realtime-PCR mit SYBR[®] Green

Protokoll 9: Herstellung von Trenn- und Sammelgel für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Veröffentlichungen

Publikation

Bolbrinker J*, **Seeberg S***, Schostak M, Kempkensteffen C, Baelde H, de Heer E, Kreutz R. *CYP3A5 genotype - phenotype analysis in the human kidney reveals a strong site-specific expression of CYP3A5 in the proximal tubule in carriers of the CYP3A5*1 allele*. Drug Metab Dispos. 2012 Jan 3, doi: 10.1124/dmd.111.042648.

* geteilte Erstautorenschaft

Poster

Schaller S., Schostak M., Kempkensteffen C., Kreutz R., Bolbrinker J.

Genotype - phenotype correlation of CYP3A5 in human kidney.

30. Wissenschaftliche Tagung der Deutschen Hochdruckliga mit der Österreichischen Gesellschaft für Hypertensiologie und der Schweizer Gesellschaft für Hypertonie „Hypertonie 2006“; 22.-24.11.2006 in München

Schaller S., Herrlinger F., Kempkensteffen C., Schostak M., Kreutz R., Bolbrinker J.

Genotype - phenotype analysis confirms polymorphic expression of CYP3A5 exceeding CYP3A4 in kidneys of Caucasian individuals

Gemeinsame Wissenschaftliche Tagung der European mit der International Society of Hypertension „Hypertension 2008“; 14.-19.06.2008 in Berlin

Auszeichnung

„Young Investigator Award 2006“ der Deutschen Hochdruckliga e.V. DHL[®] anlässlich seiner 30. Wissenschaftlichen Tagung „Hypertonie 2006“ in München

Lebenslauf

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

Danksagung

Auch wenn eine Dissertationsschrift allgemein einem Einzelnen zugeschrieben wird, weiß ich nun aus eigener Erfahrung, welchen großen Anteil die uneigennützig Hilfe vieler Menschen an dem Schaffensprozess einer solchen Arbeit hat. Allen, die im Verlauf der letzten Jahre zur Sammlung der Daten im Labor, dem Erkenntnisgewinn in Theorie und Praxis sowie letztendlich der Verfassung dieser Dissertation beigetragen haben, bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Im speziellen möchte ich meinem Doktorvater, Herr Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz, danken für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung und Forschungsgruppe, die Überlassung meines Promotionsthemas, die geduldige Betreuung über die lange Zeit sowie die vielen konstruktiven und lehrreichen Gespräche.

Zu größter Dankbarkeit für eine höchst engagierte und intensive Betreuung bin ich gegenüber Dr. med. Juliane Bolbrinker verpflichtet. Über sämtliche Schritte meiner Promotion hinweg war sie mir ein unverzichtbarer Begleiter, der zu meiner Begeisterung für experimentelle Forschung und Freude am wissenschaftlichen Arbeiten bis heute maßgeblich beigetragen hat.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern und Promovenden des Instituts, allen voran Dr. rer. nat. Markus Wehland-von Trebra, Heike Negatu, Frithjof Herrlinger und Dr. rer. medic. Norbert Wendt, die für mich immer geduldige Ansprechpartner und motivierte Helfer bei Problemen des Laboralltags waren.

Für die gewissenhafte Korrektur dieser aus der Sicht eines Laien sicherlich alles andere als spannenden Lektüre sei meinem Großvater Werner Schaller besonders herzlich gedankt.

Meinem Mann Lucas danke ich für die vielen kritischen, aber immer konstruktiven Anregungen und vor allem seine unendliche Motivation und Geduld über den gesamten bisherigen Zeitraum des „Projekts Promotion“.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, allen voran meinen Eltern, die mir erst mit ihrer Geduld, ihrem Vertrauen sowie ihrer fortwährenden Unterstützung die Freiheit und den nötigen Rückhalt gaben, diese Arbeit und letztlich mein gesamtes Studium erfolgreich abzuschließen.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, Stefanie Seeberg, geb. Schaller, an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

**Molekularbiologische Untersuchungen zum Einfluss der polymorphen
Expression von Cytochrom P450 3A5 in der humanen Niere**

von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 03.09.2012

Stefanie Seeberg