

Medizinische Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Abteilung Klinische Pharmakologie
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Ivar Roots

Bedeutung des *CYP3A51/*3 Polymorphismus für
Therapie und Prognose
nach Nierentransplantation bei Patienten mit
Cyclosporin-Behandlung
sowie für die Blutdruckregulation in der
Allgemeinbevölkerung**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doctor rerum medicarum
Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von: Silke Kain
aus: Berlin

Referent: Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz

Korreferent: Prof. Dr. med. Ivar Roots

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 30.10.2007

meinen Eltern

1. Einleitung	7
1.1 Die Cytochrom P450 Enzyme	7
1.1.1 Funktion und Lokalisation der Cytochrom P450 Enzyme.....	7
1.2 Die Cytochrom P450 3A Enzymfamilie	8
1.2.1 Bedeutung der CYP3A-Enzyme.....	8
1.2.2 Mitglieder der CYP3A-Familie.....	9
1.2.3 Variabilität der CYP3A-Enzyme	10
1.2.4 Genetische Untersuchungen zu CYP3A4	11
1.3 Das CYP3A5-Isoenzym	11
1.3.1 Genetische Mechanismen der polymorphen Expression von CYP3A5.....	11
1.3.2 Der <i>CYP3A5*1/*3</i> -Polymorphismus	12
1.3.3 Funktionelle Bedeutung der polymorphen CYP3A5-Expression.....	14
1.4 Bedeutung der polymorphen CYP3A5-Expression für die Pharmakokinetik von Cyclosporin	14
1.4.1 Cyclosporin in der Transplantationsmedizin.....	14
1.4.2 Wirkmechanismus von Cyclosporin	15
1.4.3 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW)	15
1.4.3.1 Nephrotoxizität	16
1.4.3.2 Hypertonie	16
1.4.4 Variable Pharmakokinetik von Cyclosporin.....	16
1.4.5 CYP3A5	17
1.5 Bedeutung des CYP3A5-Enzyms für den Blutdruck	18
1.5.1 Protektion des Mineralkortikoidrezeptors (MR) vor Aktivierung durch Glucokortikoide	18
1.5.2 Hinweise auf eine Protektion durch CYP3A5	19
1.6 Die CYP3A Isoenzyme im Tiermodell	21
1.6.1 Die Spontan Hypertensive Ratte (SHR) in der Hypertonieforschung	21
1.6.2 CYP3A-Enzyme der Ratte	21
1.6.3 CYP3A-Enzyme in der Niere.....	21
1.6.4 CYP3A-Aktivität und Blutdruck.....	22
2. Ziele der Arbeit	23
3. Material und Methoden	25
3.1 Material	25
3.1.1 Verbrauchsmaterial.....	25

3.1.2 Chemikalien	25
3.1.3 Lösungen und Puffer.....	26
3.1.4 Geräte	26
3.1.5 Software.....	27
3.1.6 Primer	27
3.1.7 Sonden.....	28
3.2 Methoden.....	28
3.2.1 Untersuchte Studienpopulationen	28
3.2.1.1 Nierentransplantationsstudie.....	28
3.2.1.2 PREVEND-Population (Normalbevölkerung)	29
3.2.1.3 NECOSAD-Population (Dialyse-Patienten).....	30
3.2.2 TaqMan SNP Genotypisierung	31
3.2.3 Untersuchungen im Tiermodell	33
3.2.3.1 Tiere.....	33
3.2.3.2 Präparation der Tiere.....	33
3.2.3.3 RNA-Isolierung.....	34
3.2.3.4 Reverse Transkription.....	34
3.2.3.5 Qualitative Untersuchung der Expression der CYP3A-Enzyme	35
3.2.4 Statistik	36
4. Ergebnisse.....	37
4.1 Untersuchung des Einfluss des CYP3A5*1/*3-Polymorphismus auf Therapie und Prognose nach Nierentransplantation	37
4.1.1 Allel- und Genotypverteilung	37
4.1.2 Untersuchung des Einfluss des CYP3A5*1/*3-Polymorphismus auf die Konzentration und Dosierung von Cyclosporin	38
4.1.3 Untersuchung des Einfluss des CYP3A5*1/*3-Polymorphismus auf das Transplantatüberleben	39
4.1.4 Untersuchung des Einfluss des CYP3A5*1/*3-Polymorphismus auf das Patientenüberleben.....	41
4.1.5 Untersuchung des Einfluss des CYP3A5*1/*3-Polymorphismus auf den Blutdruck.....	42
4.2 Untersuchung des Einfluss des CYP3A5*1/*3-Polymorphismus auf die Prognose unter Dialysetherapie.....	43
4.2.1 Allel- und Genotypverteilung	43

4.2.2 Untersuchung des Einfluss des <i>CYP3A5</i> *1/*3-Polymorphismus auf Überleben von Patienten unter Dialysetherapie.....	44
4.3 Untersuchung des Einfluss des <i>CYP3A5</i>*1/*3-Polymorphismus auf den Blutdruck in der Allgemeinbevölkerung.....	47
4.3.1 Allel- und Genotypverteilung	47
4.3.2 Untersuchung des Einfluss des <i>CYP3A5</i> *1/*3-Polymorphismus auf den Blutdruck in der Allgemeinbevölkerung.....	47
4.4 Untersuchungen zur Expression von CYP3A-Isoenzymen im Tiermodell	52
4.4.1 Homologievergleich der CYP3A-Isoenzyme	52
4.4.2 Untersuchung der qualitative Expression der CYP3A-Isoenzyme	53
5. Diskussion	56
5.1 Untersuchungen in der Nierentransplantationsstudie.....	56
5.2 Untersuchungen in der NECOSAD-Population	60
5.3 Untersuchungen in der PREVEND-Population	61
5.4 CYP3A-Isoenzyme bei der Ratte	65
6. Zusammenfassung	68
7. Literatur	70
8. Abkürzungen	79
9. Abbildungen und Tabellen	82
9.1 Abbildungsverzeichnis	82
9.2 Tabellenverzeichnis.....	83
10. Danksagung.....	84
11. Publikationen.....	85
12. Lebenslauf	87
Erklärung	88

2. Ziele der Arbeit

Die polymorphe Expression von CYP3A5 wird durch den *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus bestimmt. Während das bei Kaukasiern häufigere Major-Allel *CYP3A5*3* zu einer Splicevariante führt, die mit einer nur geringen bzw. fehlenden CYP3A5-Expression verbunden ist, führt das Minor-Allel *CYP3A5*1* zu einer hohen CYP3A5-Expression. CYP3A5 wird in der Leber und ebenfalls in der Niere exprimiert und stellt hier das vorherrschende CYP3A-Enzym dar.

Vor diesem Hintergrund erscheint es möglich, dass eine CYP3A5-Expression bei *CYP3A5*1*-Allelträgern nicht nur Auswirkung auf dem Metabolismus von CYP3A4-Substraten hat, sondern auch auf den renalen Steroidstoffwechsel und damit auf die Natriumresorption und die Blutdruckregulation.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CYP3A5 auf die Therapie und Prognose bei Nierentransplantatempfängern unter Cyclosporintherapie untersucht. Ebenfalls wurde seine Bedeutung für die Blutdruckregulation in der Allgemeinbevölkerung, sowie die Bedeutung einer renalen CYP3A-Expression im Tiermodell untersucht.

Zur Klärung der Bedeutung des *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus für die Therapie und Prognose bei Nierentransplantatempfängern unter Cyclosporintherapie wurden zwei Patientenpopulationen untersucht. Dabei wurde zum ersten Mal eine Untersuchung der Bedeutung von CYP3A5 für Transplantatempfänger durchgeführt, die über die Analyse seines Einfluss auf Dosis und Konzentration hinausgeht. Es wurden ebenfalls mögliche Auswirkungen auf Langzeitfunktion des Transplantats, sowie Überleben und Blutdruck der Patienten untersucht.

Die erste Gruppe bestand aus n=399 kaukasischen Nierentransplantatempfängern. Diese hatten im Zeitraum zwischen 1984 und 2000 im Nierentransplantationszentrum des Campus Benjamin Franklin ein Transplantat erhalten und wurden danach mit einem Cyclosporin-basiertem Medikationsregime behandelt. Transplantatempfänger wie auch -spender wurden für den *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus mit einer TaqMan SNP Genotyping Methode genotypisiert. Daten zu Cyclosporindosierung und Talspiegelkonzentration, Blutdruck, antihypertensive Medikation sowie Serumkreatinin wurden durch eine Recherche in den Patientenakten erhoben und in Abhängigkeit vom vorliegenden Genotyp untersucht.

Dabei wurden folgende Punkte analysiert.

1. Es wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen *CYP3A5**1/*3-Genotyp und Blutdruck untersucht.
2. Es wurde analysiert, ob der *CYP3A5**1/*3-Genotyp einen Einfluss auf die Cyclosporindosierung und Talspiegelkonzentration bei Patienten nach Nierentransplantation ausübt.
3. Eine mögliche Bedeutung des *CYP3A5**1/*3-Genotyps für Transplantatfunktion und -überleben wurde untersucht.
4. Ebenfalls wurde ein Einfluss des *CYP3A5**1/*3-Genotyps auf das Patientenüberleben nach Nierentransplantation und Cyclosporinbehandlung betrachtet. In diesem Zusammenhang wurde als Kontrollgruppe eine zweite Patientenpopulation, bestehend aus n=399 Dialysepatienten, untersucht, die im Rahmen der derzeit in den Niederlanden laufenden **NE**therlands **CO**operative **S**tudy on the **A**dequacy of **D**ialysis (NECOSAD) Studie registriert wurden. Hierbei handelte es sich um Patienten mit einer Nierenerkrankung im Endstadium, die eine Dialyse als erste Ersatztherapie erhielten und vor Erhalt eines Transplantats verstarben. Die Patienten wurden genotypisiert und das Patientenüberleben beider Populationen wurde in Abhängigkeit vom vorliegenden Genotyp analysiert.

Die Bedeutung von CYP3A5 für die Blutdruckregulation in der Allgemeinbevölkerung wurde in der bisher größten untersuchten Kohorte im Rahmen der Bevölkerungs-basierten **P**revention of **RE**nal and **V**ascular **EN**d Stage **D**isease (PREVEND) Studie analysiert.

Hierfür wurden bei n=6777 Individuen der *CYP3A5**1/*3-Genotyp mittels des TaqMan SNP Genotyping Assays bestimmt und im Hinblick auf die Blutdruckwerte untersucht.

Gleichzeitig wurde im Tiermodell untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der renalen CYP3A-Expression und der Blutdruckregulation besteht. Dabei sollte auch geklärt werden welches bzw. welche CYP3A-Isoenzyme der Ratte als Homologe zum humanen CYP3A5 in Frage kommen. Hiefür wurden folgende Punkte behandelt.

1. Es wurden Homologievergleiche der Gensequenzen und der Proteinsequenzen der CYP3A-Isoenzyme von Mensch und Ratte mittels BLAST-Analyse durchgeführt.
2. Das Expressionsmuster der CYP3A-Isoenzyme in der Niere im Cortex, sowie in der Leber von normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) und Spontan Hypertensiven Ratten (SHR) wurde qualitativ untersucht.

6. Zusammenfassung

Kenntnisse der pharmakogenetischen Hintergründe der Enzymexpression sind nicht nur von Bedeutung für die Optimierung der individuellen Therapie durch Verbesserung der Effektivität und Verringerung der Gefahr schädlicher Nebenwirkungen, insbesondere bei Wirkstoffen mit geringer therapeutischer Breite. Sie sind auch durch ihre Beteiligung an endogenen Stoffwechselfvorgängen von Bedeutung.

Ein Beispiel ist das Isoenzym Cytochrom P450 3A5 (CYP3A5), das bei Kaukasiern polymorph in Abhängigkeit vom *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus exprimiert wird. Hierbei führt das bei Kaukasiern häufigere Major-Allel *CYP3A5*3* zu einer Splicevariante, die mit einer nur geringen oder fehlenden CYP3A5-Expression einhergeht. Dagegen ist das Minor-Allel *CYP3A5*1* mit einer hohen CYP3A5-Expression verbunden. Im Gegensatz zu CYP3A4 wird CYP3A5 ebenfalls in der Niere exprimiert und stellt hier das vorherrschende CYP3A-Enzym dar.

Somit besteht durch die polymorphe Expression von CYP3A5 nicht nur ein potentieller Einfluss auf die Metabolisierung von Wirkstoffen, die über CYP3A-Enzyme verstoffwechselt werden, sondern auch ein möglicher Einfluss auf den Steroidmetabolismus, sowie die Natriumresorption und damit auf die Blutdruckregulation.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung des CYP3A5-Isoenzym hinsichtlich seiner Bedeutung für die Pharmakotherapie mit Cyclosporin nach Nierentransplantation, sowie seines Einfluss bei der Blutdruckregulation.

Dabei ist es nicht gelungen einen Einfluss des *CYP3A5*1*-Allels auf Dosierung und Talspiegelkonzentration von Cyclosporin zu bestätigen. Auch konnte kein Einfluss auf die Funktion oder das Überleben des Transplantats festgestellt werden. Jedoch zeigte sich ein signifikant protektiver Effekt hinsichtlich des Patientenüberlebens, der auch nach Transplantatverlust erhalten blieb.

Die Überlebensanalyse einer Population aus Dialysepatienten ohne Cyclosporintherapie zeigte dagegen keinen Einfluss des *CYP3A5*1*-Allels auf das Überleben.

Damit konnte gezeigt werden, dass der *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus, auch wenn er keine Bedeutung für die direkte Cyclosporintherapie besitzt, von Bedeutung für die Prognose nach Transplantation ist. Hierbei sind Effekte über den Metabolitstoffwechsel von Cyclosporin denkbar.

Zur Klärung der Bedeutung der CYP3A5-Expression für die Cyclosporintherapie und vor allem hinsichtlich seines Einfluss auf den Metabolitstoffwechsel und das Patientenüberleben erscheinen daher weitere Untersuchungen nötig.

Die Untersuchung des Einfluss von CYP3A5 und des *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus auf den Blutdruck in der Allgemeinbevölkerung zeigte einen signifikant niedrigeren systolischen Blutdruck bei Trägern des *CYP3A5*1*-Allels. Obwohl der Effekt in einer geschlechtsabhängigen Analyse nur noch bei weiblichen Personen signifikant war, bestätigen die Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen der CYP3A5-Expression und dem Blutdruck und unterstützen die Hypothese eines protektiven Mechanismus durch CYP3A5.

Auch wenn die Bedeutung für die klinische Praxis gering ist, stellt CYP3A5 somit einen Faktor dar, der die Blutdruckregulation beeinflusst und dabei hilft, das komplexe Bild der Regelmechanismen besser zu verstehen.

Vor diesem Hintergrund erscheinen weitere Untersuchungen zur Bedeutung der CYP3A5-Expression für die Blutdruckregulation und die Klärung der zugrunde liegenden Mechanismen angebracht.

Dabei können neben klinische Studien auch experimentelle Untersuchungen im Tiermodell, zum Beispiel bei SHR und WKY, sowie gezielte quantitative Analysen auf mRNA- und Proteinebene, dazu beitragen die Bedeutung der CYP3A-Isoenzyme für die Blutdruckregulation besser zu verstehen.

10. Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Abteilung Klinische Pharmakologie des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Charité - Universitätsmedizin Berlin.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Reinhold Kreutz für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas, die gewissenhafte Betreuung und die stets gewährte Unterstützung meiner Arbeit.

Frau Dr. Angela Schulz danke ich für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die vielen hilfreichen Anregungen und Ratschläge

Herrn Dr. Markus Wehland-von Trebra gilt mein Dank für die Einweisung in die Methode der TaqMan SNP Genotypisierung und für die Einweisung in die tierexperimentelle Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei folgenden Personen für die Kooperation und die Zurverfügungstellung der Studienpopulationen und den dazugehörenden Daten:

Herrn PD Dr. Joachim Beige, Abteilung Nephrologie, Klinikum St. Georg, Leipzig und Herrn Prof. Dr. Gerd Offermann, Transplantationszentrum des Campus Benjamin Franklin, Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Frau Dr. Femke van der Smaan-de Beer und Herrn Prof. Dr. Friedo W. Dekker, Abteilung Klinische Epidemiologie, Medizinisches Zentrum der Universität Leiden, Niederlande.

Herrn Prof. Dr. Paul E. de Jong und Herrn Prof. Dr. Gerjan Navis, Abteilung Innere Medizin, Bereich Nephrologie, Medizinisches Zentrum der Universität Groningen, Niederlande.

Darüber hinaus gilt mein herzlicher Dank Sabine Wunderlich und Claudia Plum für die vielfältige Hilfestellung und die Unterstützung bei technischen Fragestellungen.

Allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden des Institutes danke ich für die angenehme und freundliche Atmosphäre, insbesondere seien hier genannt Dr. Juliane Bolbrinker, Norbert Wendt und Heike Negatu.

Ein großes Dankeschön gilt nicht zuletzt meinen Eltern. Auf ihre Unterstützung und Motivation konnte ich mich im Verlauf dieser Arbeit wie auch während meines gesamten beruflichen Werdeganges immer verlassen.

11. Publikationen

Publikationen

Kreutz R, Zuercher 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. IF 2004: 6,406

Kreutz R, Zuurman M, Kain S, Bolbrinker J, de Jong PE

The role of the cytochrome P450 3A5 enzyme for blood pressure regulation in the general Caucasian population.

Pharmacogenetics and Genomics, 2005; 15(12): 831-837. IF 2005: 5,882

Abstracts

Kain S, Spormann-Lagodzinski M, Gross M, Kreutz R

Role of the A1555G mutation in the mitochondrial 12S rRNA in aminoglycoside associated non-syndromal hearing loss in Caucasians

European Journal of Clinical Pharmacology, 2005; 61 (9): 710-710

Kain S, Bolbrinker J, Zuurman M, de Jong P, Navis G, Kreutz R

The CYP3A5 polymorphism affects systolic blood pressure and pulse pressure in the general population

Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 2005, 371: R135-R136 564 Suppl. 1

Poster

Reinhold Kreutz, Heiko Zürcher, Silke Kain, Peter Martus, Gerd Offermann Joachim Beige

The effect of CYP3A5*1/*3 polymorphism on cyclosporine dosing, blood pressure and long-term graft survival in renal transplant patients

35. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie, 36. Jahresversammlung der Schweizerischen Gesellschaft für Nephrologie 37. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Klinische Nephrologie, 18.-21.09.2004, Basel

Reinhold Kreutz, Heiko Zürcher, Silke Kain, Peter Martus, Gerd Offermann Joachim Beige
The Effect of Variable CYP3A5 Expression on Cyclosporine Dosing, Blood Pressure and Long-Term Graft Survival in Renal Transplant Patients

Renal week, American Society of Nephrology, 27.10. – 1.11.2004, St. Louis, Missouri, USA

Silke Kain, Heiko Zürcher, Peter Martus, Gerd Offermann, Joachim Beige, Reinhold Kreutz
The Effect of Variable CYP3A5 Expression on Cyclosporine Dosing, Blood Pressure and Long-Term Graft Survival in Renal Transplant Patients

6. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, 4. - 6.11.2004, Stuttgart

Kain S, Spormann-Lagodzinski M, Gross M, Kreutz R

Role of the A1555G mutation in the mitochondrial 12S rRNA in aminoglycoside associated non-syndromal hearing loss in Caucasians

7. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, 3. - 5.11.2005, Dresden

Vorträge

Kain S, Spormann-Lagodzinski M, Gross M, Kreutz R

Role of the A1555G mutation in the mitochondrial 12S rRNA in aminoglycoside associated non-syndromal hearing loss in Caucasians

7. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, 3. - 5.11.2005, Dresden

Kain S, Bolbrinker J, Wehland M, Kreutz R

CYP3A-Isoenzyme und ihre Bedeutung für die Hypertonie im SHR Modell

29. Wissenschaftlicher Kongress, Hypertonie 2005, 23. - 25.11. 2005, Berlin

Auszeichnungen

Preis über besten Kurzvortrag bzw. Poster

6. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie, 4. - 6.11.2004, Stuttgart

Young Investigator Award

29. Wissenschaftlicher Kongress, Hypertonie 2005, 23. - 25.11. 2005, Berlin

12. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Silke Kain, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Bedeutung des *CYP3A5**1/*3 Polymorphismus für Therapie und Prognose nach Nierentransplantation bei Patienten mit Cyclosporin-Behandlung sowie für die Blutdruckregulation in der Allgemeinbevölkerung selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

18.02.2007

Unterschrift