

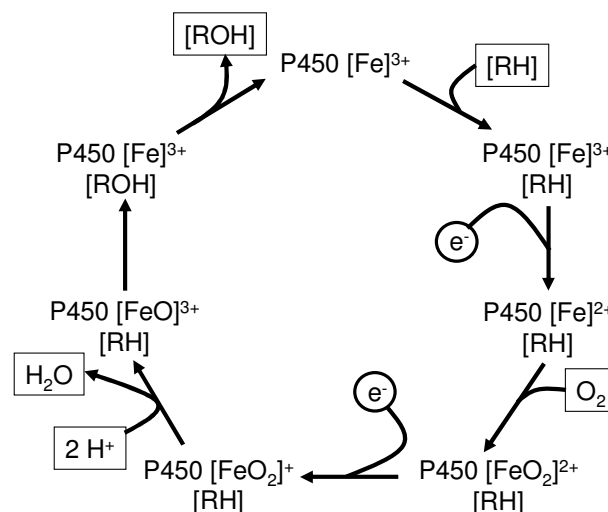
# 1. Einleitung

## 1.1 Die Cytochrom P450 Enzyme

### 1.1.1 Funktion und Lokalisation der Cytochrom P450 Enzyme

Die Cytochrom P450 Enzyme repräsentieren eine Superfamilie von Proteinen, die eine wesentliche Rolle im oxidativen Stoffwechsel spielen. Als Monooxygenasen katalysieren sie in Phase-I-Reaktionen den Metabolismus vieler lipophiler endogener und exogener Substanzen. Im Rahmen dieser Metabolisierungsreaktionen übertragen sie dabei ein Sauerstoffäquivalent auf das Wirkstoffmolekül mit dem Ziel dieses hydrophiler zu machen (Abb. 1). So wandeln sie Xenobiotika in weniger toxische und besser wasserlösliche Produkte um und ermöglichen damit eine bessere Ausscheidung. Jedoch können sie auch zu reaktiven Zwischenprodukten führen, die toxischer sind als die Ausgangssubstanz [Eichelbaum und Burk, 2001]. Des weiteren sind die Cytochrom P450 Enzyme an der Biosynthese von Steroidhormonen beteiligt, oxidieren ungesättigte Fettsäuren und verstoffwechseln fettlösliche Vitamine [Hasler, 1999].

Die Cytochrome kommen in Körper an vielen Orten vor, sind jedoch vor allem in der Leber lokalisiert. Bei Säugetieren sind die Cytochrome membrangebunden, teilweise an der inneren Membran der Mitochondrien, teilweise an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums [Werck-Reichhart und Feyereisen, 2000].



**Abb. 1**  
Die Hydroxylierung eines Substrates (RH) durch P450 (modifiziert nach [Guengerich und MacDonald, 1990])

### 1.1.2 Nomenklatur der Cytochrom P450 Enzyme

Da die Cytochrom P450 Enzyme in der reduzierten, mit Kohlenmonoxid komplexierten Form eine starke Absorption bei 450 nm zeigten, wurden sie als zelluläres Chromophor mit Absorption bei 450 nm kurz Cytochrom P450 bezeichnet, wobei das P für Pigment steht, da 450 nm im blauen Farbbereich liegt [Omura und Sato, 1964].

Die Einteilung der Cytochrome in verschiedene Familien und Subfamilien, sowie deren Nomenklatur erfolgt basierend auf ihrer Sequenzhomologie. Cytochrome deren Aminosäuresequenzen zu mindestens 40% identisch sind werden zu einer Familie und Cytochrome mit mindestens 55% identischer Aminosäuresequenz zu Subfamilien zusammengefasst. Davon ausgehend setzt sich der Name eines Cytochroms P450 zusammen aus den Buchstaben CYP, die die Überfamilie bezeichnen, gefolgt von einer arabischen Ziffer, die für die Familie steht und einen Buchstaben, der die Subfamilie kennzeichnet. Die danach folgende arabische Ziffer identifiziert das einzelne Enzym. Dabei erfolgt die Vergabe dieser letzten Ziffer chronologisch in der Reihenfolge der Entdeckung des Enzyms bzw. seiner Beschreibung in der Literatur [Nelson et al., 1996]. Eine Liste der humanen Cytochrom P450 Enzyme und deren Allelvarianten, die kontinuierlich aktualisiert wird, ist im Internet auf den Seiten des Human Cytochrome P450 (CYP) Allel Nomenclatur Committee unter [www.cypalleles.ki.se](http://www.cypalleles.ki.se) zu finden [Ingelman-Sundberg et al., 2001].

## 1.2 Die Cytochrom P450 3A Enzymfamilie

### 1.2.1 Bedeutung der CYP3A-Enzyme

Nach heutigem Wissen stellen die CYP3A-Enzyme die wichtigste Familie innerhalb der Gruppe klinisch bedeutsamer CYP-Enzyme dar. Sie sind besonders reichlich in Leber und Intestinum vorhanden und machen hier ca. 30% bzw. 70% des Gehalts an CYP-Enzymen aus [Thummel und Wilkinson, 1998]. Die CYP3A-Enzyme sind am Metabolismus vieler endogener und exogener Stoffe, darunter Steroidhormone, Medikamente und Toxine beteiligt [Eichelbaum und Burk, 2001]. Als primärer Katalysator der Steroid-6 $\beta$ -Hydroxylierung spielen sie außerdem eine wichtige Rolle in der Steroidhomöostase [Niwa et al., 1998]. Eine besondere Bedeutung besitzen die CYP3A-Isoenzyme für die Metabolisierung von Medikamenten, da 50-60% der derzeit im Handel befindlichen Arzneimittel von CYP3A-Isoenzymen verstoffwechselt werden (Tab. 1) [de Wildt et al., 1999; Li et al., 1995]. Damit stellen sie die vorherrschende Subfamilie im Metabolismus klinisch eingesetzter Wirkstoffe dar [Guengerich, 1999; Lee und Goldstein, 2005].

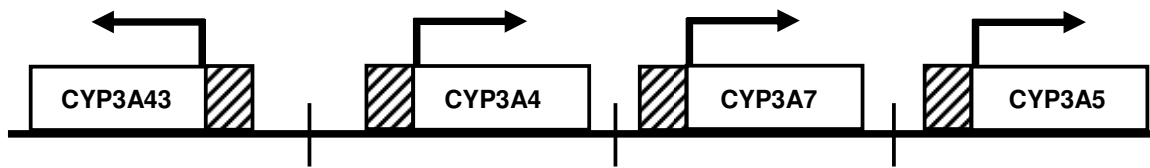
**Tab. 1**  
**Einige Substrate von CYP3A (nach [de Wildt et al., 1999])**

Gruppe	Stoffe
Antibiotika	Clarithromycin, Clindamycin, Erythromycin, Rifampicin
Antidepressiva	Imipramin, Sertralin
Antiemetika	Ondansetron
Antihistamine	Mizolastin, Terfenadin, Chlorpheniramin
Antikonvulsiva	Carbamazepin, Clonazepam, Ethoxsuximid
Antimykotika	Ketoconazol, Miconazol
Barbiturate	Phenobarbital
Benzodiazepine	Alprazolam, Diazepam, Midazolam, Temazepam, Triazolam
Glucokortikoide	Dexamethason, Hydrocortison
Kalziumantagonisten	Amlodipin, Diltiazem, Felodipin, Nifedipin, Nitrendipin, Verapamil
Immunsuppressiva	Cyclosporin, Tacrolimus, Sirolimus
Protonenpumpenhemmer	Omeprazol, Lansoprazol
Statine	Atorvastatin, Cerivastatin, Lovastatin, Simvastatin
Steroide	Cortisol, Estradiol, Progesteron, Testosteron
Virustatika	Indinavir, Nelfinavir, Lopinavir, Ritonavir, Saquinavir
Xenobiotika	Aflatoxin B1, heterocyclische Amine
Zytostatika	Busulfan, Doxorubicin, Etoposid, Tamoxifen, Vinblastin, Vincristin
Sonstige	Buspiron, Coffein, Chloramphenicol, Sildenafil, Codein, Fentanyl, Finasterid, Haloperidol, Hydrocortison, Lidocain, Domperidon

### 1.2.2 Mitglieder der CYP3A-Familie

Derzeit sind vier Mitglieder der CYP3A-Enzymfamilie bekannt, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 und CYP3A43. Diese sind auf Chromosom 7 in einem Cluster (*CYP3A* – Genlocus) (Abb. 2) im Bereich 7q21.1 – 7q22.1 lokalisiert [Gellner et al., 2001].

Ein weiteres in der Literatur beschriebenes Enzym der CYP3A-Familie ist CYP3A3 [Molowa et al., 1986], doch wird inzwischen angenommen, dass es sich hierbei nur um eine Variante von CYP3A4 handelt [Nelson et al., 1996].



**Abb. 2**  
**Schematische Darstellung des CYP3A-Locus (modifiziert nach [Burk und Wojnowski, 2004]).**  
**Vertikale Balken kennzeichnen die Grenzen der individuellen Genkassetten, Pfeile zeigen die**  
**Richtung der Transkription an.**

Obwohl die Aminosäuren- und Nukleotidsequenzen der vier Isoenzyme sehr homolog sind, unterscheiden sie sich in ihrer organspezifischen Expression.

CYP3A4 wird vor allem in Leber und Dünndarm exprimiert und stellt die hier vorherrschende CYP3A-Enzymform dar. Dagegen wird CYP3A5 in geringeren Mengen in verschiedenen Geweben wie Leber, Niere, Intestinum und Prostata gefunden [Lamba et al., 2002; Thummel und Wilkinson, 1998]. CYP3A7 wurde anfangs als rein fetale Form angesehen, konnte inzwischen aber auch in adultem Gewebe nachgewiesen werden [Burk et al., 2002]. Das zuletzt nachgewiesene Mitglied der Familie, CYP3A43, findet sich in geringen Spiegeln sowohl in Leber als auch in extrahepatischem Gewebe [Westlind et al., 2001].

### 1.2.3 Variabilität der CYP3A-Enzyme

Seit langem sind große interindividuelle Unterschiede in der Expression von CYP3A bekannt, die wesentlich zur variablen Bioverfügbarkeit nach per oraler Applikation und der systemischen Clearance von CYP3A-Substraten beitragen [Burk und Wojnowski, 2004]. So kann die hepatische Expression von CYP3A4 zwischen Individuen um das 50-fache und die enzymatische *in vivo* Funktion um das 20-fache variieren [Eichelbaum und Burk, 2001]. Diese interindividuellen Unterschiede können entscheidend dafür sein, welcher Patient gut auf ein bestimmtes Medikament anspricht und welcher bei gleicher Dosierung schädliche Effekte erfährt.

Weiterhin können eine Vielzahl von Xenobiotika eine Enzyminduktion oder -inhibition von CYP3A-Enzymen auslösen und somit die Variabilität erhöhen [Burk et al., 2002]. Ebenso können Alter, Geschlecht und ethnische Herkunft zur Variabilität beitragen [Cotreau et al., 2005; Wood, 1998]. Einen weiteren wichtigen Einfluss haben genetische Faktoren, deren Anteil an der interindividuellen Variabilität der Expression der unterschiedlichen CYP3A-Isoenzyme bislang noch unklar ist [Ozdemir et al., 2000].

### 1.2.4 Genetische Untersuchungen zu CYP3A4

Da CYP3A4 innerhalb der CYP3A-Enzymfamilie die dominante Isoform darstellt, stand es anfangs im Vordergrund molekulargenetischer Untersuchungen. Jedoch blieb die Suche nach genetischen Faktoren, die die Expression von CYP3A4 beeinflussen, bisher erfolglos. Obwohl eine Vielzahl genetischer Variationen in den flankierenden, intronischen und exonischen Regionen des Gens beschrieben wurde, scheinen die gefundenen Mutationen keinen Effekt auf Expression oder Aktivität zu haben. Dazu kommt, dass die bisher bekannten Strukturvarianten von CYP3A4 nur sehr geringe Allelfrequenzen aufweisen und dadurch nicht relevant erscheinen [Eichelbaum und Burk, 2001].

Eine Ausnahme stellte die Variante *CYP3A4\*1B*, früher bezeichnet als *CYP3A4-V*, dar die in verschiedenen Studien mit einem erhöhten Auftreten von Prostatakrebs in Verbindung gebracht wurde [Paris et al., 1999; Rebbeck et al., 1998; Tayeb et al., 2002]. Jedoch zeigten neuere Untersuchungen, dass *CYP3A4\*1B* in einem starken Linkage Disequilibrium mit dem *CYP3A5\*1/\*3*-Polymorphismus steht [Wojnowski et al., 2002]. So wird inzwischen angenommen, dass nicht die *CYP3A4\*1B*-Variante, sondern der *CYP3A5\*1/\*3*-Polymorphismus der eigentliche Auslöser des beobachteten Effekts ist [Wojnowski, 2004].

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass noch unentdeckte Mutationen einen Einfluss auf die Funktion von CYP3A4 ausüben oder Effekte auf der Ebene der Transkription erfolgen, z.B. über den Pregnan X Rezeptor (PXR) [LeCluyse, 2001]. Dennoch scheint eine genetische Variabilität in der Expression von CYP3A4 eher von geringerer Bedeutung für die interindividuellen Unterschiede im CYP3A-abhängigen Medikamentmetabolismus zu sein [Eichelbaum und Burk, 2001; Lamba et al., 2002].

## 1.3 Das CYP3A5-Isoenzym

### 1.3.1 Genetische Mechanismen der polymorphen Expression von CYP3A5

Während bisher noch wenig über die Bedeutung der CYP3A-Enzyme CYP3A7 und CYP3A43 sowie ihrer Rolle innerhalb der CYP3A-Familie bekannt ist, steht CYP3A5 im Mittelpunkt einer Vielzahl molekulargenetischer Untersuchungen [Daly, 2006]. Im Gegensatz zu CYP3A4 wird die variable Expression und Enzymaktivität von CYP3A5 sehr stark durch genetische Faktoren beeinflusst [Jounaidi et al., 1996; Koch et al., 2002].

Dabei wurden für das *CYP3A5*-Gen mehrere Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) beschrieben (Tab. 2).

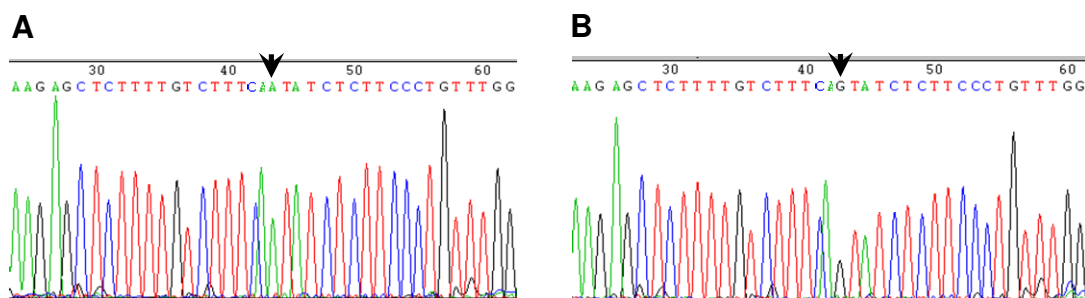
**Tab. 2**  
**Einige CYP3A5-Polymorphismen (nach [Daly, 2006])**

Allel	Polymorphismus	Effekt	Referenz
CYP3A5*1	Wildtyp-Variante		[Aoyama et al., 1989]
CYP3A5*2	A27289C	T398N	[Jounaidi et al., 1996]
CYP3A5*3	A6986G	Splicedefekt	[Kuehl et al., 2001]
CYP3A5*4	A14665G	Q200R	[Chou et al., 2001]
CYP3A5*5	T12952C	Splicedefekt	[Chou et al., 2001]
CYP3A5*6	G14690A	Splicedefekt	[Kuehl et al., 2001]
CYP3A5*7	27131insT	Frameshift	[Hustert et al., 2001]
CYP3A5*8	C3699T	R28C	[Lee et al., 2003]
CYP3A5*9	G19286A	A337T	[Lee et al., 2003]

Von diesen führt nur die Variante *CYP3A5\*1* – die so genannte Wildtyp-Variante - zu einer signifikanten Expression von CYP3A5. Dagegen sind die übrigen Varianten - die so genannten Mutant-Varianten - mit gar keiner, bzw. nur einer geringen Expression verbunden [Kuehl et al., 2001]. Die in der kaukasischen Bevölkerung am häufigsten auftretende Mutant-Variante ist *CYP3A5\*3*. Dagegen zeigen die restlichen *CYP3A5*-Mutant-Varianten nur eine sehr geringe Allelfrequenz und werden daher für die klinische Praxis als nicht relevant angesehen [Daly, 2006].

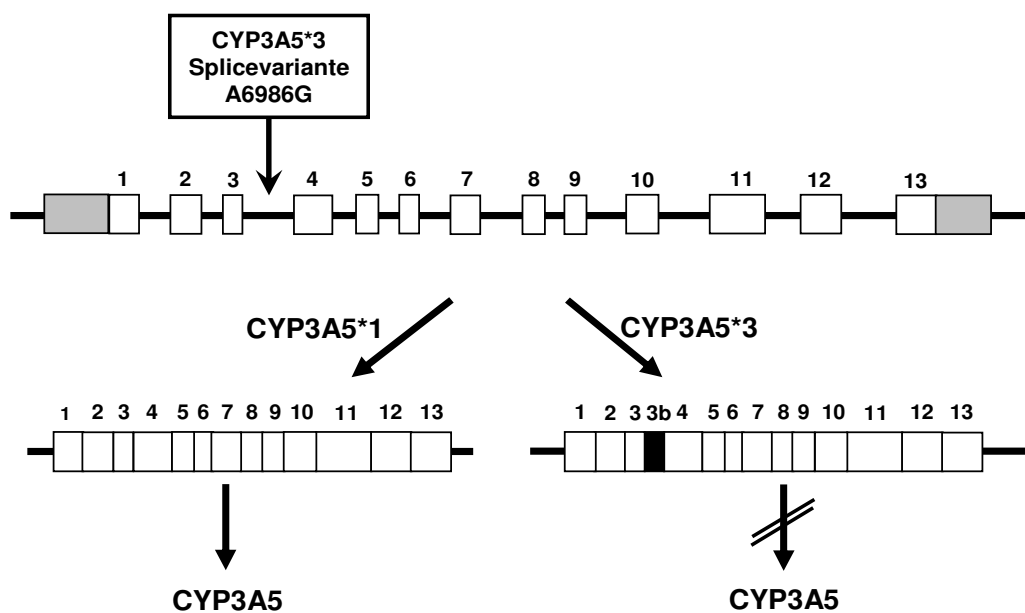
### 1.3.2 Der *CYP3A5\*1/\*3*-Polymorphismus

Bei diesem Polymorphismus handelt es sich um eine Substitution in Intron 3 an Position 22.893 nt (AC005020) – A6986G [Kuehl et al., 2001] (Abb. 3). Dabei erfolgt bei Vorliegen des selteneren Minor-Allels A6986 – des Wildtyp-Allels *CYP3A5\*1* – eine signifikante Expression von CYP3A5. Dagegen führt das häufigere Major-Allel 6986G - das Mutant-Allel *CYP3A5\*3* - zu einer Splicevariante durch die zusätzliches Material aus dem Intron 3 in die mRNA-Sequenz eingefügt wird.



**Abb. 3**  
**Eigene Sequenzchromatogramme des *CYP3A5\*1/\*3*-Polymorphismus; A: Minor-Allel A6988 (*CYP3A5\*1*), B: Major-Allel 6986G (*CYP3A5\*3*)**

Dadurch wird zwischen Exon 3 und 4 ein zusätzliches Exon, genannt 3b, in die Sequenz eingeführt. Dieses enthält ein Stopcodon, das während der Translation einen vorzeitigen Abbruch verursacht (Abb. 4) [Xie et al., 2004]. Jedoch zeigten Untersuchungen, dass auch bei Individuen, die homozygot für das *CYP3A5\*3*-Allel sind, geringe Mengen von intakter *CYP3A5*-mRNA vorhanden sind. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass alternative Splicewege bestehen und das *CYP3A5\*3* nicht zu einer vollständigen Aufhebung der Translation führt [Lin et al., 2002].



**Abb. 4**  
Auswirkung des *CYP3A5\*1/\*3*-Polymorphismus (modifiziert nach [Lee und Goldstein, 2005])

Aufgrund der bisherigen Untersuchungen kann angenommen werden, dass das *CYP3A5\*1*-Allel einen dominanten Effekt ausübt. Dieser führt dazu, dass sowohl bei homozygoten Trägern des *CYP3A5\*1*-Allels mit einem *CYP3A5\*1/CYP3A5\*1*-Genotyp, als auch bei heterozygoten Individuen mit einem *CYP3A5\*1/CYP3A5\*3*-Genotyp eine Expression von *CYP3A5* erfolgt. Damit können diese Personen als *CYP3A5*-„Expressoren“, bzw. als Personen mit einem positiven *CYP3A5*-Status (+ *CYP3A5*) betrachtet werden. Dagegen sind homozygote Träger des *CYP3A5\*3*-Allels mit einem *CYP3A5\*3/CYP3A5\*3*-Genotyp „Nicht-Expressoren“ mit einem negativen *CYP3A5*-Status (- *CYP3A5*). Nach früheren Untersuchungen findet man *CYP3A5*-Expressoren bei Kaukasiern mit einer relativen Häufigkeit von ca. 15%, bei Asiaten zu ca. 30-25% und bei Afroamerikanern zu ca. 25-50% [Hustert et al., 2001; Kuehl et al., 2001].

### 1.3.3 Funktionelle Bedeutung der polymorphen CYP3A5-Expression

Obwohl CYP3A4 als die vorherrschende Form angesehen wird, scheint CYP3A5 bei Expressoren des Enzyms ebenfalls einen wesentlichen Beitrag zum Metabolismus von CYP3A-Substraten zu leisten [Kuehl et al., 2001; Shimada et al., 1994; Wrighton et al., 1990]. Der Einfluss, den eine polymorphe Expression von CYP3A5 auf dem Metabolismus von Substanzen, die über die CYP3A-Subfamilie verstoffwechselt werden haben könnte ist Gegenstand vieler Untersuchungen wobei die bisherigen Ergebnisse zum Teil widersprüchlich sind [Westlind-Johnsson et al., 2003; Williams et al., 2003].

Die Enzyme zeichnen sich zwar durch ähnliche Strukturen und überlappende Substratspezifität aus [Thummel und Wilkinson, 1998; Williams et al., 2002], jedoch scheint der Beitrag, den CYP3A5 zum Metabolismus leistet unter anderen vom jeweiligen Substrat abhängig zu sein [Huang et al., 2004]. Dabei lassen Untersuchungen vermuten, dass bei einigen Substraten die Aktivität von CYP3A5 sogar größer ist, als die von CYP3A4 [Williams et al., 2002; Wrighton et al., 1990]

Vor diesem Hintergrund scheint das CYP3A5-Enzym ein wichtiger Faktor zu sein, der zu der Variabilität des CYP3A-Metabolismus beiträgt.

Auch wenn das *CYP3A5\*3*-Allel allein nicht ausreicht um die variable Expression der CYP3A-Proteine zu erklären, hat es von allen CYP3A-Allelen wahrscheinlich den stärksten genetische Einfluss auf die Gesamtvariabilität der Pharmakokinetik von CYP3A-Substraten [Lee und Goldstein, 2005].

## 1.4 Bedeutung der polymorphen CYP3A5-Expression für die Pharmakokinetik von Cyclosporin

### 1.4.1 Cyclosporin in der Transplantationsmedizin

Eine besondere Bedeutung besitzen die CYP3A-Enzyme für die Therapie nach Transplantation, da viele der eingesetzten Wirkstoffe über die CYP3A-Familie metabolisiert werden [Kelly und Kahan, 2002]. Dazu gehört auch der Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin, der ein wichtiger Bestandteil der derzeitigen Immunsuppressionsprotokolle in der Transplantationsmedizin darstellt [Hesselink et al., 2004a; Kronbach et al., 1988].

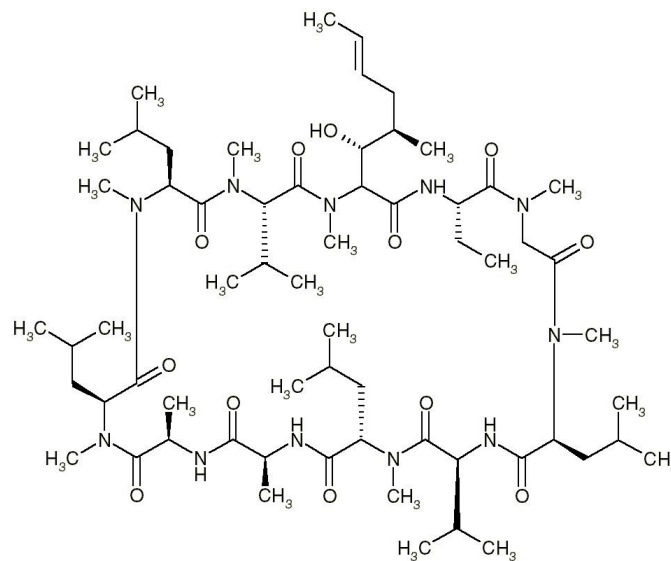
Mit seiner Einführung 1983 hat Cyclosporin die Transplantationsmedizin revolutioniert. Die 1-Jahresüberlebensrate der Transplantate wurde erheblich verbessert, die Häufigkeit und Schwere akuter Abstoßungen merklich verringert. Jedoch zeigte sich später, dass eine signifikante Verbesserung des Langzeitüberlebens nicht erreicht werden konnte [Busauschina et al., 2004].



### 1.4.2 Wirkmechanismus von Cyclosporin

Cyclosporin ist ein lipophiles Cyclopeptid, bestehend aus 11 Aminosäuren (Abb. 5), das ursprünglich in den Laboren des Sandoz Konzerns aus dem Fadenpilz *Tolypocladium inflatum Gams* gewonnen wurde [Kapturczak et al., 2004].

Cyclosporin (CsA) wirkt durch Anbindung an das Enzym Cyclophilin A (CyPA) mit dem es einen binären Komplex (CyPA-CsA) bildet. Dieser bindet an das Enzym Calcineurin (CN) zu einem ternären Komplex (CyPA-CsA-CN) an. Dadurch verliert CN seine Fähigkeit zur Dephosphorylierung und ist nicht mehr in der Lage die Phosphat-Gruppe der nukleären Faktoren aktivierter T-Zellen (NFAT) zu dephosphorylieren. Damit ist die durch dephosphoryliertes NFAT katalysierte Synthese von Interleukin-2 (IL2) nicht mehr möglich, wodurch eine Immunsuppression verursacht wird [Faulds et al., 1993]. Gleichzeitig werden jedoch auch andere Enzyme in ihrer Synthese beeinflusst, u.a. weitere Interleukine, der transformierende Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Endothelin 1 (ET-1) und Proteine, die am zellulären Apoptoseschutz beteiligt sind [Cattaneo et al., 2004].



**Abb. 5**  
**Strukturformel von Cyclosporin**

### 1.4.3 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW)

Der Einsatz von Cyclosporin ist mit wichtigen UAW verbunden und da es nach Transplantation als Langzeittherapeutikum angewendet werden muss, stellen diese Nebenwirkungen einen besonderen Faktor in der Therapie dar. Dazu gehören neben der Nephrotoxizität auch Hypertonie, Hyperlipidämie, Hepatopathie und Neurotoxizität und die Induktion von Glukoseintoleranz [Hesselink et al., 2004a]. Als weitere unangenehme Begleiterscheinungen sind gastrointestinale Beschwerden, Hypertrichose und die Gingivahyperplasie anzuführen.

Hiervon wird im Rahmen der Nierentransplantation vor allem die Nephrotoxizität als eine der wichtigsten Nebenwirkungen von Cyclosporin angesehen und stellt damit einen limitierenden Faktor für die Behandlung dar [Cattaneo et al., 2004].

#### **1.4.3.1 Nephrotoxizität**

Obwohl die genauen Ursachen der Nephrotoxizität noch unklar sind, wird vermutet, dass durch die Calcineurin-Inhibition das komplexe Autoregulationsystem der Niere gestört wird.

Als möglicher Mechanismus wird eine renale Vasokonstriktion diskutiert, die vermutlich durch eine Beeinträchtigung der Endothelzellularfunktion verursacht wird. Die Nephrotoxizität von Cyclosporin wird dabei in zwei Hauptkategorien unterteilt: Funktionell, als Konsequenz der Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen und strukturell, aufgrund von Läsionen der afferenten Arteriolen, Glomeruli und das Tubulointerstitiums. [Busauschina et al., 2004; Morozumi et al., 2004].

#### **1.4.3.2 Hypertonie**

Neben der Nephrotoxizität ist die Hypertonie ein weiterer ernst zu nehmender Risikofaktor für Transplantatempfänger. Die Hypertonie manifestiert sich mehrere Monate nach Transplantation [Cifkova und Hallen, 2001] und ist bei ungefähr 60-70% der mit Cyclosporin behandelten Patienten zu beobachten, wobei das vorher zugrunde liegende Krankheitsbild des Patienten eine Rolle für die Entwicklung einer Hypertonie nach Nierentransplantation und Cyclosporin-Behandlung spielt [Haas und Mayer, 1997]. Die Ursachen sind noch nicht vollständig geklärt, doch werden u.a. eine Beteiligung des sympatho-adrenalen Systems und des Endothelinsystems vermutet [Cairns et al., 1988].

#### **1.4.4 Variable Pharmakokinetik von Cyclosporin**

Der Einsatz von Cyclosporin wird nicht nur durch seine vielen Nebenwirkungen, sondern auch durch eine enge therapeutischen Breite und der hochvariablen und schwer vorhersagbaren Pharmakokinetik behindert [Hesselink et al., 2004b], die sowohl zwischen Patienten (interindividuell) aber auch bei ein und demselben Patienten (intraindividuell) über einen längeren Zeitraum zu beobachten ist.

Verschiedene Faktoren tragen zu dieser Variabilität bei. Während die intraindividuelle Variabilität hauptsächlich durch die Unterschiede bei der Absorption verursacht wird, die u.a. durch Darm- und Leberfunktion beeinflusst ist und ebenfalls einen Risikofaktor für das Auftreten von chronischen Abstoßungen darstellt [Kahan et al., 1996], werden als Hauptgrund für die interindividuelle Variabilität, neben Alter und Komedikation, vor allem

genetisch bedingte Unterschiede in der Metabolisierungskapazität vermutet [Lindholm, 1991].

Da der Erfolg einer Transplantation von einer empfindlichen Balance zwischen Immunsuppression und Abstoßung abhängt, ist die Erhaltung eines adäquaten Blutspiegels des Wirkstoffes von entscheidender Bedeutung [Zhao et al., 2005].

Aus diesem Grund wurde neben einer Verbesserung der galenischen Formulierung auch eine lückenlose therapeutische Überwachung der Medikation in der klinischen Praxis eingeführt, um Abstoßung und Nebenwirkungen zu reduzieren. Hierbei sind verschiedene Methoden zur Bestimmung des Wirkstoffspiegels im Einsatz, mit dem Ziel die therapeutische Effektivität zu maximieren, während unerwünschte toxische Effekte minimiert sind [Jorga et al., 2004].

#### 1.4.5 CYP3A5

Die Variablen, die die Medikamentenverfügbarkeit bei den individuellen Patienten kontrollieren, sind derzeit noch unklar. Jedoch hat sich gezeigt, dass die biologische Aktivität der CYP3A-Enzyme dabei eine wichtige Rolle spielt [Zhao et al., 2005].

Als Ursache kommen hierbei nicht nur Interaktionen zwischen verschiedenen Wirkstoffen, die über die CYP3A-Familie metabolisiert werden in Frage, sondern auch genetische Faktoren.

CYP3A5 ist am Metabolismus von Cyclosporin beteiligt und es wurde angenommen, dass die polymorphe Expression von CYP3A5 die Dosisanforderungen von Cyclosporin *in vivo* beeinflussen könnte [Aoyama et al., 1989; Thummel, 2003].

Jedoch ist die Relevanz der genetischen Variabilität von CYP3A5 in der klinischen Praxis und insbesondere bei der chronischen Behandlung von Nierentransplantatempfängern noch unklar [Thummel, 2003; Westlind-Johnsson et al., 2003; Williams et al., 2003].

Während für Tacrolimus ein Einfluss des *CYP3A5\*1*-Allels auf Dosis und Konzentration zu bestehen scheint [Tsuchiya et al., 2004; Zhao et al., 2005; Zheng et al., 2003; Zheng et al., 2004], ist die Frage ob und in wie weit ein Einfluss auf die Pharmakokinetik von Cyclosporin besteht bisher noch nicht geklärt [Anglicheau et al., 2004; Haufroid et al., 2004; Hesselink et al., 2003].

Als ein weiterer Faktor werden die Metabolite von Cyclosporin diskutiert. Derzeit sind über 30 Metabolite bekannt, von denen AM1, AM9 und AM4N die Hauptmetabolite darstellen, die den Großteil der gebildeten Metabolite ausmachen [Christians und Sewing, 1995]. Es ist

noch nicht klar, ob alle Metabolite inaktiv sind oder ob einige eine mögliche toxische Wirkung besitzen und so ebenfalls Effekte auf Transplantatfunktion und –überleben ausüben.

Wie eine kürzliche Studie zeigte, ist CYP3A5 an der Bildung des Metabolits AM9 beteiligt und zwar derart, dass bei Trägern des *CYP3A5\*1*-Allels dieser Metabolit im höheren Maß gebildet wurde als bei homozygoten *CYP3A5\*3*-Allelträgern [Dai et al., 2004].

CYP3A5 wird ebenfalls in der Niere exprimiert und stellt hier das vorherrschende CYP3A-Enzym dar [Koch et al., 2002; Schuetz et al., 1992]. Wie kürzlich berichtet wurde könnte die Expression von CYP3A5 die Blutdruckregulation über den Kortikoidmetabolismus und die renale Natriumabsorption beeinflussen [Givens et al., 2003; Morris et al., 1998].

Daher erscheint es möglich, dass bei Nierentransplantatträgern der Einfluss des *CYP3A5\*1*-Allels in zweierlei Hinsicht wirken kann. Zum einen durch den Genotyp des Empfängers, der über die CYP3A5-Expression in Leber und Intestinum den Metabolismus und damit Dosisanforderungen und Nebeneffekte von Cyclosporin beeinflusst. Zum anderen über den Genotyp des Spenderorgans, der zusätzlich Blutdruckregulation und antihypertensive Medikation beeinflussen kann.

Trotz der vielen Faktoren, die die Pharmakokinetik beeinflussen und den Einsatz einschränken, bleibt Cyclosporin ein Grundstein der Immunsuppressionsprotokolle.

Daher ist es für eine optimale Therapie von Anfang an wichtig diese Faktoren zu kennen. Hierbei kommt CYP3A5, das bei Kaukasiern polymorph in Abhängigkeit von *CYP3A5\*1/\*3*-Polymorphismus exprimiert wird, als einer dieser Faktoren in Betracht.

Es ist denkbar, dass dieses CYP3A-Isoenzym bei Individuen, die es exprimieren, zusammen mit CYP3A4 einen Einfluss auf die Pharmakokinetik ausübt, sowie über eine zusätzliche Blutdruckregulation.

## **1.5 Bedeutung des CYP3A5-Enzyms für den Blutdruck**

Neben den Einfluss den eine Expression von CYP3A5 auf den Metabolismus von Arzneistoffen haben könnte, deuten aktuelle Untersuchungen ebenfalls auf einen Effekt der polymorphen CYP3A5-Expression bei der Blutdruckregulation [Givens et al., 2003].

### **1.5.1 Protektion des Mineralkortikoidrezeptors (MR) vor Aktivierung durch Glucokortikoide**

Obwohl die Glucokortikoide Corticosteron und Cortisol *in vitro* die gleiche Bindungsaffinität für den MR aufweisen wie das Mineralkortikoid Aldosteron, erfolgt *in vivo* - trotz hoher Serumspiegel - keine Aktivierung des MR durch Glucokortikoide.

Die Ursache hierfür sind protektive Mechanismen in den Zielzellen von Mineralkortikoiden wie das kortikale Sammelrohrepithel in der menschlichen Niere. Diese schützen den MR vor der Wirkung des endogenen Glucokortikoids Cortisol und damit vor mineralkortikoiden Effekten im Sinne einer Natriumretention und Blutdrucksteigerung.

Einer dieser Mechanismen wird über die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 2 (11 $\beta$ -HSD2) vermittelt. Diese metabolisiert Glucokortikoide zu 11-Keto/Dehydro-Produkten, die nur noch eine geringe Affinität für den MR aufweisen, dadurch keine mineralkortikoiden Wirkungen mehr zeigen und somit als inaktiv betrachtet werden [Funder et al., 1988].

Jedoch scheint die von 11 $\beta$ -HSD2 vermittelte Protektion allein nicht auszureichen um den Effekt zu erklären und es gibt Hinweise auf die Beteiligung weiterer Mechanismen [Farman und Rafestin-Oblin, 2001]. In diesem Zusammenhang scheint die renale CYP3A-Aktivität als ein weiterer Mechanismus in Frage zu kommen.

### 1.5.2 Hinweise auf eine Protektion durch CYP3A5

Die CYP3A-Isoenzyme sind 6 $\beta$ -Hydroxylasen, die Glucokortikoide wie Cortisol und Corticosteron in 6 $\beta$ -Hydroxyglucokortikoide umwandeln [Waxman et al., 1988] und auch in der Niere ihre 6 $\beta$ -Hydroxylaseaktivität ausüben [Agrawal et al., 1997].

Bereits in früheren Studien wurde im Tiermodell ein Zusammenhang zwischen CYP3A-Aktivität und dem Blutdruck beobachtet [Ghosh et al., 1993; Ghosh et al., 1995; Watlington et al., 1992]. Dabei wurde bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) eine höhere 6 $\beta$ -Hydroxylaseaktivität im Vergleich zu normotensiven Wistar-Kyoto Ratten (WKY) festgestellt [Ghosh et al., 1993; Watlington et al., 1992]. Außerdem beobachtete die Gruppe um Watlington und Mitarbeiter, dass eine Inhibition der CYP3A-Aktivität bei SHR durch den CYP3A-Inhibitor Troleandomycin (TAO) zu einer Blutdrucksenkung führte [Ghosh et al., 1995].

Auch *in vitro* Experimente in isolierten epithelialen Nierenzellen der Zelllinie A6 aus *Xenopus laevis* deuteten auf einen Blutdruckeffekt durch die CYP3A-Expression [Duncan et al., 1988; Grogan et al., 1990; Morris et al., 1998]. Diese Zellen exprimieren sowohl Glucokortikoidrezeptoren (GR) als auch MR, zeigen aber keine 11 $\beta$ -HSD Aktivität. Experimentelle Untersuchungen lassen vermuten, dass die 6 $\beta$ -Hydroxylierung der Hauptmechanismus der Metabolisierung von Glucokortikoiden in diesem Zelltyp darstellt [Duncan et al., 1988] und dieser von CYP3A vermittelt wird [Schuetz et al., 1992].

Während frühere Experimente auf eine Beteiligung von 6 $\beta$ -Hydroxymetaboliten an der Natriumresorption schließen lassen, bei der der Metabolit 6 $\beta$ -Hydroxycorticosteron als Agonist wirkt und eine erhöhte Natriumresorption stimuliert [Duncan et al., 1988; Grogan et al., 1990], zeigen spätere Untersuchungen, dass die 6 $\beta$ -Hydroxylaseaktivität von CYP3A als protektiver Effekt wirken könnte, der den MR vor einer Aktivierung durch Glucokortikoide

schützt [Morris et al., 1998]. Dabei gehen Morris und Kollegen davon aus, dass in diesem System der 6 $\beta$ -Hydroxymetabolit von Corticosteron konzentrationsabhängig als Antagonist am MR wirkt [Morris et al., 1998].

Aufgrund dieser Untersuchungen könnte man sich die intrarenale 6 $\beta$ -Hydroxylierung von Glucokortikoiden durch CYP3A-Enzyme als weiteren protektiven Mechanismus *in vivo* vorstellen, der durch Bildung von 6 $\beta$ -Hydroxymetabolite der Glucokortikoide einen blutdrucksenkenden Effekt vermittelt.

Dieser könnte neben der 11 $\beta$ -HSD2 den MR vor der Stimulation mit Cortisol schützen und dadurch eine erhöhte Natriumresorption verhindern.

Obwohl in Leber und Dünndarm vor allem CYP3A4 exprimiert wird, ist in der Niere CYP3A5 die vorherrschende CYP3A-Isoform [Koch et al., 2002; Schuetz et al., 1992]. Dabei konnte mittels Immunohistochemie die Expression von CYP3A5 in Epithelzellen des proximalen und distalen Tubulus, wie auch in Zellen des kortikalen Sammelrohrs nachgewiesen werden [Murray et al., 1999]. Bei einer Untersuchung renaler Mikrosomen konnte in allen Proben mRNA und Protein von CYP3A5 nachgewiesen werden, jedoch zeigte die Proteinexpression eine klare bimodale Verteilung. In 4 von 27 (15%) der untersuchten Proben war die Expression von CYP3A5 um das 10-fache höher als bei den übrigen [Haehner et al., 1996]. Wie später gezeigt wurde wird die renalen CYP3A5-Expression - wie die hepatische - durch das *CYP3A5\*1*-Allel bestimmt [Givens et al., 2003]. Somit scheint die Niere das Organ zu sein, in dem der Effekt des *CYP3A5\*1*/*\*3*-Polymorphismus am ausgeprägtesten sein könnte.

Vor diesem Hintergrund erscheint es möglich, dass bei Trägern des *CYP3A5\*1*- Allels eine erhöhte CYP3A5-Aktivität in der Niere besteht und damit eine gesteigerte 6 $\beta$ -Hydroxylierung von Glucokortikoiden erfolgt.

Obwohl die funktionelle Bedeutung dieses Mechanismus noch unklar ist, könnte über die gebildeten 6 $\beta$ -Hydroxymetabolite ein Effekt auf den Mineralkortikoidrezeptor bestehen, der über die Natriumresorption Einfluss auf die Blutdruckregulation ausübt.

## 1.6 Die CYP3A Isoenzyme im Tiermodell

### 1.6.1 Die Spontan Hypertensive Ratte (SHR) in der Hypertonieforschung

Ratten sind ein in der Forschung häufig genutztes Tiermodell, das sich durch einfache, standardisierte Zucht- und Haltungsbedingungen, einen relativ schnellen Generationswechsel sowie einer detaillierten physiologischen Charakterisierung auszeichnet.

Wie beim Menschen wird der Blutdruck bei Ratten durch verschiedene genetische Faktoren bestimmt, die sich gegenseitig beeinflussen oder mit Umwelteinflüssen interagieren. Daher wird die Ratte als ein beliebtes Tiermodell zur Untersuchung von Faktoren, die den Blutdruck beeinflussen, verwendet.

Ein häufig eingesetztes Modell in der Hypertonieforschung ist die SHR. Hierbei handelt es sich um einen Inzuchtrattenstamm, der sich durch spontan auftretende Hypertonie auszeichnet und der von Wistar-Ratten ausgehend durch Okamoto und Aoki 1963 durch gezielte Verpaarungen der Tiere mit den höchsten Blutdrücken etabliert wurde [Okamoto und Aoki, 1963]. Dabei setzt der Blutdruckanstieg im Alter von 5 bis 6 Wochen ein und manifestiert sich im Alter von 10 Wochen mit Werten zwischen 160 und 180 mmHg.

### 1.6.2 CYP3A-Enzyme der Ratte

Derzeit sind sechs CYP3A-Enzyme der Ratte bekannt, die auf dem Rattenchromosom 12 (RNO 12) in einem Cluster lokalisiert sind: CYP3A1 [Gonzalez et al., 1985], CYP3A2 [Gonzalez et al., 1986], CYP3A9 [Wang et al., 1996], CYP3A18 [Nagata et al., 1996; Strotkamp et al., 1995], CYP3A23 [Huss et al., 1996] und CYP3A62 [Matsubara et al., 2004]. Jedoch wird das Enzym CYP3A23 aufgrund von Untersuchungen der Genstruktur, Expression und katalytischer Eigenschaften als eine Variante von CYP3A1 angesehen [Nagata et al., 1999].

Die CYP3A-Isoenzyme werden bei Ratten - wie beim Menschen - vorherrschend in der Leber exprimiert, sind aber auch in extrahepatischen Gewebe wie z.B. Gehirn [Wang et al., 1996], Intestinum [Watkins, 1992], Leukozyten [Mahnke et al., 1996] und in der Niere [Debri et al., 1995; Schuetz et al., 1992] zu finden.

### 1.6.3 CYP3A-Enzyme in der Niere

Obwohl die renale Expression der CYP3A-Enzyme bei Ratten nachgewiesen wurde [Schuetz et al., 1992] sind Studien, die die Expression in der Niere untersuchen eher selten und in ihren Ergebnissen teilweise widersprüchlich. So wurden in einer Untersuchung in renalen Mikrosomen von Wistar-Ratten mittels Western Blot lediglich CYP3A1, aber nicht CYP3A2 nachgewiesen [Debri et al., 1995]. Dagegen wurden von einer anderen Arbeitsgruppe in

renalen Mikrosomen von Fischer-344 Ratten sowohl CYP3A1 als auch CYP3A2 mittels Western Blot gefunden, wobei CYP3A2 sogar das vorherrschende Enzym darstellte [Warrington et al., 2004].

Auch ist die genaue Lokalisation der CYP3A-Enzyme im Nierengewebe noch unklar. So konnte CYP3A1 und CYP3A2 bei Fischer-344 Ratten mittels Western Blot in renalen Mikrosomen aus der Gesamtniere nachgewiesen werden, jedoch nicht in Mikrosomen aus den proximalen oder distalen Tubulus sowie aus dem Cortex [Cummings et al., 1999].

Dazu kommt, dass die CYP3A-Enzyme der Ratte, anders als beim Menschen, eine Geschlechts- und Altersabhängige Expression zeigen [Mahnke et al., 1997]. So sind CYP3A1, CYP3A2 und CYP3A18 die bei männlichen Ratten vorherrschenden Enzyme [Strotkamp et al., 1995]. Dagegen wird CYP3A9 vor allem bei Weibchen exprimiert [Mahnke et al., 1997].

#### 1.6.4 CYP3A-Aktivität und Blutdruck

Die Ergebnisse der bereits genannten Untersuchungen von Ghosh und Mitarbeitern bei SHR wiesen auf einen Zusammenhang zwischen der renaler CYP3A-Aktivität und Blutdruck in diesem Tiermodell [Ghosh et al., 1993; Ghosh et al., 1995]. Dabei lassen diese Untersuchungen vermuten, dass eine gesteigerte und über CYP3A-Enzyme vermittelte intrarenale 6 $\beta$ -Hydroxylierungsaktivität der Glucokortikoide zu einer Blutdruckerhöhung in diesem Modell beitragen kann. In den Untersuchungen zeigten die SHR (aus der Zucht von Taconi Farms, Germantown, NY) eine erhöhte renale 6 $\beta$ -Hydroxylierungsaktivität für Corticosteron - das Hauptglucokortikoid der Ratte - im Vergleich zu normotensiven WKY Ratten, die als Kontrollstamm eingesetzt wurden [Ghosh et al., 1993]. Weitere Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass eine kurzfristige Inhibition des CYP3A-Systems über 4 Tage nach s.c. Injektion von TAO zu einer Blutdrucksenkung bei SHR führte (-29 mmHg) [Ghosh et al., 1995].

Die Untersuchungen wurden vor der Charakterisierung des CYP3A5-Polymorphismus und der Identifizierung der renalen Expression von CYP3A5 beim Menschen durchgeführt. Auch war der mögliche Einfluss des CYP3A5-Enzyms auf die Blutdruckregulation beim Menschen noch nicht bekannt.

Obwohl noch nicht geklärt ist, ob und wenn ja welches CYP3A-Enzym der Ratte als Homolog zum humanen CYP3A5 in Frage kommt, erscheint es möglich, dass - ähnlich wie beim Menschen - die renale CYP3A-Aktivität bei der Ratte einen Einfluss auf die Blutdruckregulation ausübt.