

5. Diskussion

5.1 Untersuchungen in der Nierentransplantationsstudie

Aufgrund der wichtigen Rolle, die CYP3A4 im Cyclosporinmetabolismus spielt, hat die Entdeckung des *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus und der polymorphen Expression von CYP3A5 großes Interesse verursacht. Die mögliche zusätzliche Verstoffwechslung von Cyclosporin durch CYP3A5 und der Einfluss seiner polymorphen Expression auf den Cyclosporinmetabolismus könnten weit reichende Folgen für die medikamentöse Therapie nach Transplantation haben, sowie für die Funktion des Transplantats und das Überleben des Patienten. Um dies zu untersuchen wurde eine Gruppe von Nierentransplantatempfängern mit einem TaqMan SNP Genotyping Assay für den A6986G-Polymorphismus, der den *CYP3A5*1/*3*-Genotyp bestimmt, genotypisiert. Die Daten zu Cyclosporindosierung und -konzentration im Blut, sowie Transplantat- und Patientenüberleben wurden in Abhängigkeit vom vorliegenden Allelstatus untersucht. Die Untersuchung erfolgte im Rahmen einer Studie, deren Ziel darin besteht pharmakogenetischen Faktoren zu identifizieren, die Therapie und Prognose bei Patienten nach Nierentransplantation beeinflussen.

Faktoren, die einen Einfluss auf Transplantat- und Patientenüberleben haben könnten, wie z.B. das Alter von Empfänger und Spender, die Nicht-Übereinstimmungen im HLA-System oder das Vorliegen einer Hypertonie, wurden ebenfalls in Abhängigkeit vom Allelstatus untersucht. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen der Gruppe der *CYP3A5*1*-Allelträger und der *CYP3A5*1*-Nichtträger. Somit scheidet ein Einfluss des *CYP3A5*1*-Allels auf diese Faktoren aus. Gleichzeitig wurden so mögliche Verzerrungen, die die weitere Auswertung beeinflussen könnten, ausgeschlossen.

Während für Tacrolimus ein Einfluss des *CYP3A5*1*-Allels auf Konzentration und Dosierung in mehreren Studien belegt wurde [Goto et al., 2004; Tsuchiya et al., 2004; Zhao et al., 2005; Zheng et al., 2003; Zheng et al., 2004], ist sein Einfluss auf den Cyclosporinmetabolismus noch unklar. Obwohl in einer Studie eine stärkere Metabolisierung von Cyclosporin bei *CYP3A5*1*-Allelträgern beobachtet wurde [Haufrond et al., 2004], konnte in den meisten der bisherigen Untersuchungen kein Einfluss von CYP3A5 auf den Cyclosporinmetabolismus festgestellt werden [Anglicheau et al., 2004; Yates et al., 2003; Zhao et al., 2005].

Bei der Untersuchung von Cyclosporindosis und Cyclosporindosierung pro kg Körpergewicht, sowie Talspiegelkonzentration und dosisangepaßter Talspiegelkonzentration konnte kein Einfluss des *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus beobachtet werden. Damit wurden die Arbeiten bestätigt, die keinen Zusammenhang zwischen CYP3A5 und dem Metabolismus

von Cyclosporin nachwiesen. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche hepatische Expression von CYP3A5 neben CYP3A4 keinen Einfluss auf die Metabolisierung von Cyclosporin zu haben scheint.

CYP3A5 wird bei Trägern des *CYP3A5*1*-Allel auch in der Niere exprimiert und stellt hier das vorherrschende CYP3A-Enzym dar. Obwohl Cyclosporin vor allem in der Leber und zum Teil auch im Intestinum verstoffwechselt wird, ist - zumindest *in vitro* - auch eine renale Metabolisierung nachgewiesen worden [Dai et al., 2004]. So gesehen wäre es denkbar, dass durch ein Transplantat von einem Spender der *CYP3A5*1*-Allelträger war bzw. ist, ein zusätzlicher Einfluss durch eine renale Expression von CYP3A5 erfolgt. Daher wurden die Daten zu Cyclosporindosierung und -konzentration ebenfalls in Abhängigkeit vom Status des Spenders untersucht. Jedoch konnte auch hier keinerlei Einfluss des *CYP3A5*1*-Allels auf Dosierung und Konzentration von Cyclosporin festgestellt werden. Damit scheint auch eine renale CYP3A5-Expression für die Metabolisierung von Cyclosporin keine Bedeutung zu haben.

Ein wichtiger Faktor für die Aussagekraft klinischer Studien ist die Anzahl der untersuchten Probanden. Während in den oben genannten Studien maximal 151 Personen untersucht wurden, ist in der vorliegenden Arbeit mit $n=399$ ein mehr als doppelt so großes Patientenkollektiv untersucht worden. Auch wenn durch die größere Studienpopulation ein statistischer Fehler in den Ergebnissen nicht vollständig ausgeschlossen werden kann ist dadurch die Gefahr einer Verzerrung der Ergebnisse verringert.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die interindividuellen Unterschiede in der Pharmakokinetik von Cyclosporin nicht durch die variable Expression von CYP3A5 erklärt werden kann und ein Testen auf den *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus für die Behandlung mit Cyclosporin nicht von Nutzen ist.

Nephrotoxizität stellt ein großes Problem in der Transplantationsmedizin dar und ist ein einschränkender Faktor in der Immunsuppressionsbehandlung mit Cyclosporin [Busauschina et al., 2004]. Trotz gut eingestellter Therapie erfahren Patienten oft akute Abstoßungen und Nierenschäden. Dabei wird der Einsatz von Cyclosporin in der Therapie als einer der Hauptfaktoren für Dysfunktionen und renalem Versagen angesehen [Paul und de Fijter, 2004]. Der kritische Faktor hierbei könnte entweder Cyclosporin selbst oder einer seiner Metabolite sein. Aus diesem Grund ist nicht nur eine sorgfältige Überwachung der Cyclosporinkonzentration wichtig, sondern auch das Identifizieren von Faktoren, die einen Einfluss auf Therapie und Prognose ausüben könnten. So könnten pharmakogenetische

Behandlungsstrategien entwickelt werden, die den individuellen Bedürfnissen angepasst sind und dadurch eine Verbesserung der Lebensqualität gewähren, sowie das Transplantatüberleben verlängern.

Vor diesem Hintergrund wurde untersucht, ob das Vorliegen des *CYP3A5*1*-Allels einen Einfluss auf das Langzeitüberleben des Transplantats hat. Jedoch wiesen die Ergebnisse auf keinen Zusammenhang des *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus und der Langzeitfunktion des Transplantats, weder in Abhängigkeit vom Allelstatus des Empfängers noch des Spenderorgans.

Obwohl kein Einfluss des *CYP3A5*1*-Allels auf die Langzeitfunktion des Transplantats festgestellt werden konnte, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen dem *CYP3A5*1*-Allel und dem allgemeinen Überleben der Patienten. Und zwar derart, dass bei Patienten, die ein *CYP3A5*1*-Allel trugen, ein signifikant höheres Langzeitüberleben bestand. Dieser protektive Effekt des *CYP3A5*1*-Allels blieb auch nach Verlust des Transplantats und Wiederaufnahme einer Dialysetherapie bestehen.

Der Effekt kann nicht durch einen Einfluss des *CYP3A5*1*-Allels auf die Langzeitfunktion des Transplantats erklärt werden, da die vorhergehende Untersuchung keinen Zusammenhang zwischen *CYP3A5*1*-Status und Transplantatüberleben zeigte. Ebenso ist ein Einfluss durch Unterschiede in Cyclosporindosierung und -konzentration zwischen *CYP3A5*1*-Allelträgern und Nichtträger ausgeschlossen worden.

Eine mögliche Ursache für den protektiven Effekt von *CYP3A5* könnte in dem komplexen Metabolitstoffwechsel von Cyclosporin liegen. Bisher sind über 30 Metaboliten bekannt, von denen einige, wenn auch im geringeren Maß als Cyclosporin, zu einer zusätzlichen Immunsuppression beitragen. Ob es sich bei allen Metaboliten um nichttoxische Substanzen handelt, ist noch nicht geklärt [Christians und Sewing, 1995; Kelly und Kahan, 2002].

Obwohl die genaue Wirkungsweise noch unklar ist, wird ein Zusammenspiel von Cyclosporin und seinen Metaboliten vermutet und zwar derart, dass einige der Metabolite zu der immunsuppressiven Wirkung und/oder der Toxizität von Cyclosporin beitragen [Christians und Sewing, 1995]. Daher müssen toxische Effekte nicht unbedingt allein von der Dosierung und Konzentration von Cyclosporin abhängen. Ein möglicher Einfluss könnte auch über die Metabolite bestehen, die in der klinischen Praxis nicht routinemäßig überwacht werden.

CYP3A5 ist nicht nur am Metabolismus von Cyclosporin beteiligt [Aoyama et al., 1989]. Wie gezeigt wurde, ist bei Trägern des *CYP3A5*1*-Allels die Metabolisierungsrate bestimmter Metabolite größer als bei *CYP3A5*1*-Nichtträgern [Dai et al., 2004]. Daher wäre es möglich, dass bei Patienten mit *CYP3A5*1*-Allel ein anderes Metabolitenprofil besteht als bei

Patienten ohne *CYP3A5*1*-Allel, und dass diese Auswirkungen auf das allgemeine Überleben der Patienten haben könnte. So wäre zum Beispiel ein verstärkter Abbau von toxischen Substanzen zu nichttoxischen Produkten bei *CYP3A5*-Expressoren denkbar.

Bei der Auswertung der Daten zu Cyclosporindosierung und –konzentration fiel auf, dass die Talspiegel, gemessen nach der Abbott TDx-Methode, bei *CYP3A5*1*-Allelträgern leicht, wenn auch nicht signifikant, erhöht waren. Dieser Unterschied war bei den Werten, die nach der Abbot IMx-Methode gemessen wurden, nicht mehr erkennbar. Die Abbott TDx-Methode zeichnet sich durch eine erhöhte Kreuzreaktivität des Assays mit Cyclosporinmetabolite aus, die bei 15 - 40% liegt. Diese besteht zwar auch noch bei der Abbott IMx-Methode, ist hier aber signifikant auf 8 - 15% reduziert [Yatscoff et al., 1990]. Es wäre demnach denkbar, dass bei *CYP3A5*1*-Allelträgern durch die Abbott TDx-Methode Cyclosporinmetabolite mitdetektiert wurden die bei diesen durch *CYP3A5* verstärkt gebildet wurden. Dies könnte ein Hinweis auf Unterschiede im Metabolitstoffwechsel von Cyclosporin sein, die durch das *CYP3A5*-Enzym verursacht wurden. Gleichzeitig muss berücksichtigt werden, dass dieser Unterschied lediglich auf eine fehlerhafte Messung, bedingt durch die Kreuzreaktivität, beruhen kann. Zur Klärung dieses Sachverhalts wären spezifische Messungen der Metabolite nötig.

Neben Nephrotoxizität gehören auch Hypertonie, Hepatopathie und Neurotoxizität zu den Nebenwirkungen von Cyclosporin. Daher kann ein möglicher toxischer Einfluss durch Cyclosporin oder seine Metaboliten nicht nur die Niere betreffen, sondern auch Auswirkungen auf andere Organe wie Leber, Gehirn oder das Herz-Kreislaufsystem haben. Auch hier besteht die Möglichkeit, dass diese toxischen Effekte durch die *CYP3A5*-Expression bei *CYP3A5*1*-Allelträgern weniger stark ausgeprägt sind und so den in der vorliegenden Arbeit beobachteten protektive Effekt auf das Patientenüberleben erklären könnten.

Eine weitere Nebenwirkung von Cyclosporin ist die Hypertonie. Ein erhöhter Blutdruck, sowohl vor als auch nach Transplantation, stellt einen wesentlichen Risikofaktor für das Langzeitüberleben des Organs dar.

Wie bisherige Studien zeigten, besteht ein Zusammenhang zwischen der *CYP3A5*-Expression und der Blutdruckregulation [Fromm et al., 2005; Givens et al., 2003].

Als mögliche Ursache wird dabei die 6 β -Hydroxylaseaktivität des *CYP3A5*-Enzyms diskutiert. Dieses wird bei Trägern des *CYP3A5*1*-Allels in signifikanten Mengen in der Niere exprimiert und könnte hier durch 6 β -Hydroxylierung aktives Cortisol in inaktives Cortison umwandeln und dadurch eine Natriumretention und damit verbundene Blutdrucksteigerung verhindern.

Jedoch wurde dieser Effekt bisher nur bei gesunden Probanden untersucht [Fromm et al., 2005; Givens et al., 2003]. In wie weit ein Einfluss bei Nierentransplantatempfängern unter Cyclosporintherapie besteht ist bisher unklar. Daher wurde neben dem metabolischen Effekt von CYP3A5 auch ein möglicher Einfluss auf den Blutdruck untersucht.

Da sich der Allelstatus des Spenders und damit des Transplantats von dem des Empfängers unterscheiden kann, der Einfluss auf die Blutdruckregulation jedoch in der Niere stattfindet, wurde der Blutdruck sowohl in Abhängigkeit vom Allelstatus des Empfänger wie auch des Spenders untersucht. Dabei ergab die Untersuchung keinen Zusammenhang zwischen systolischem oder diastolischem Blutdruck und dem Allelstatus von Empfänger oder Spender.

Damit scheint CYP3A5 keinen direkten Einfluss auf die Blutdruckregulation bei Nierentransplantatempfängern auszuüben.

Zwar ist es in der vorliegenden Arbeit nicht gelungen einen direkten Einfluss des CYP3A5-Enzyms auf Cyclosporindosierung, -konzentration, Transplantatüberleben oder Blutdruck nachzuweisen, jedoch wurde ein indirekter Einfluss, der sich über ein signifikant längeres Patientenüberleben manifestiert, festgestellt.

Auch wenn die Ergebnisse zeigen, dass eine Untersuchung auf den *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus vor Beginn einer Cyclosporintherapie für eine Optimierung der Behandlung nicht von Nutzen ist, weisen sie doch auf die Bedeutung des *CYP3A5*1*-Allels für die Prognose nach Nierentransplantation, die über direkte Effekte hinausgeht.

5.2 Untersuchungen in der NECOSAD-Population

Die Ergebnisse der Untersuchungen in der NTX-Population lassen darauf schließen, dass das CYP3A5-Enzym einen protektiven Effekt in der Langzeittherapie von Patienten nach Nierentransplantation ausübt. Jedoch zeigte eine Subgruppenanalyse, dass auch nach Transplantatverlust und Wiederaufnahme einer Dialysetherapie weiterhin ein signifikant protektiver Effekt durch das *CYP3A5*1*-Allel bestand. Somit stellte sich die Frage, ob dieser Effekt in Zusammenhang mit der Cyclosporintherapie steht oder ob er durch andere Faktoren, z.B. das Eintreten einer terminalen Niereninsuffizienz verbunden mit der Hämodialysetherapie verursacht ist.

Daher wurde das Überleben von Patienten in Dialysetherapie, die kein Transplantat und damit auch keine Langzeitbehandlung mit Cyclosporin erhielten, im Rahmen der NECOSAD-Studie (**NE**therlands **CO**operative **S**tudy on the **A**dequacy of **D**ialysis) untersucht.

Diese prospektive Beobachtungsstudie, an der fast alle Dialysezentren der Niederlande teilnehmen, hat zum Ziel, die Qualität und Angemessenheit der Dialysebehandlung in den Niederlanden zu überwachen und Entwicklung und Testung von Richtlinien der Dialysebehandlung zu dokumentieren. Außerdem wird untersucht, welche Behandlung dem Patienten die längste Lebenserwartung, die wenigsten Krankenhausaufenthalte und die beste Lebensqualität gewährleistet. Ein weiteres Ziel ist der Vergleich zwischen Hämodialyse und Peritonealdialyse sowie die Untersuchung der unterschiedlichen Auswirkungen dieser Methoden [Merkus et al., 1999].

Faktoren, die einen weiteren Einfluss ausüben könnten, wie das Alter der Patienten oder der Blutdruck, waren in beiden Gruppen gleich verteilt. Zwar zeigte der systolische Blutdruck in der Gruppe der *CYP3A5*1*-Allelträger leicht niedrigere Werte im Vergleich zu homozygoten *CYP3A5*3*-Allelträgern, dieser Unterschied erreichte jedoch keine Signifikanz. Damit sind die Ergebnisse in Übereinstimmung mit denen, die die Untersuchung des Blutdrucks in der NTX-Population ergab, welche ebenfalls keinen Einfluss zeigten.

Die Untersuchung zeigte keinen Unterschied im allgemeinen Überleben zwischen Trägern des *CYP3A5*1*-Allels und Nichtträgern. Damit unterstützen die Ergebnisse die Vermutung, dass der protektive Effekt des *CYP3A5*1*-Allels spezifisch für Nierentransplantatpatienten besteht, die eine Cyclosporintherapie erhielten.

Damit bestätigen die Ergebnisse den potentiellen Einfluss pharmakogenetischer Faktoren für die Langzeitprognose von Patienten, der über eine Rolle in einer individuell optimierten Therapie hinausgeht, welche sich vor allem auf die Überwachung des Wirkstoffs bezieht.

5.3 Untersuchungen in der PREVEND-Population

Bereits in anderen Arbeiten wurde einen Einfluss des CYP3A5-Enzyms auf die Blutdruckregulation beobachtet [Fromm et al., 2005; Givens et al., 2003; Kivisto et al., 2005]. Als mögliche Ursache wird hierbei die 6 β -Hydroxylaseaktivität des CYP3A5-Enzyms diskutiert. Dieses könnte aktives Cortisol durch 6 β -Hydroxylierung in inaktives Cortison umwandeln und so eine Aktivierung des Mineralkortikoidrezeptors und damit eine Natriumretention verhindern [Morris et al., 1998].

Schon in frühere Studien wurde eine mögliche Bedeutung von Cortisol für die Blutdruckregulation und die Entstehung von Hypertonie angedeutet [Litchfield et al., 1998; Watt et al., 1992]. Doch obwohl bekannt ist, dass Cortisol an der Blutdruckregulation beteiligt ist, ist der Mechanismus noch nicht vollständig geklärt [Ferrari et al., 2000; van Uum et al., 2004; Watt et al., 1992]. Neben der bereits beschriebenen Beteiligung der 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ 2 (11 β -HSD 2) an der Blutdruckregulation könnte

CYP3A5 daher als ein weiteres Enzym einen zusätzlichen Einfluss ausüben [Morris et al., 1998]. Diese Theorie wird durch Untersuchungen bei SHR unterstützt, die ebenfalls einen Zusammenhang der CYP3A-Aktivität mit dem Blutdruck zeigten [Ghosh et al., 1993; Ghosh et al., 1995].

Obwohl ein Zusammenhang zwischen CYP3A5-Expression und Blutdruck erwiesen scheint, ist die Auswirkung noch unklar. Die oben genannten Arbeiten zum Einfluss von CYP3A5 auf den Blutdruck unterscheiden sich in ihren Ergebnissen, jedoch auch hinsichtlich der untersuchten Individuen.

Givens und Mitarbeiter beobachteten bei n=25 gesunden Afroamerikanern einen erhöhten Blutdruck bei *CYP3A5*1*-Allelträgern [Givens et al., 2003]. Zu dem gleichen Ergebnis kamen Kivisto et al. bei der Untersuchung von n=373 Kaukasiern, die 75 Jahre oder älter waren [Kivisto et al., 2005]. Dagegen fanden Fromm und Mitarbeiter bei n=155 gesunden, männlichen Kaukasiern bei *CYP3A5*1*-Allelträgern einen geringeren Blutdruck [Fromm et al., 2005],.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus auf den Blutdruck im Rahmen der PREVEND-Studie (**P**revention of **R**enal and **V**ascular **E**nd Stage **D**isease) in der bisher größten untersuchte Kohorte, die aus der kaukasischen Allgemeinbevölkerung rekrutiert wurde, untersucht. Dabei wurde von n=6.777 teilnehmenden Individuen der Blutdruck in Abhängigkeit vom vorliegenden Genotyp untersucht. Damit ist dies die erste Untersuchung des Einfluss von CYP3A5 auf den Blutdruck in einer großen inhomogenen Gruppe aus der Allgemeinbevölkerung.

Die PREVEND-Studie ist eine prospektive Beobachtungsstudie mit dem Ziel die Bedeutung einer erhöhten Mikroalbuminurie bei Individuen ohne Diabetes für zukünftige kardiovaskuläre und renale Erkrankungen zu untersuchen. Dazu begann die Studie mit einer Bestandsaufnahme des Auftretens von Mikroalbuminurie in der Bevölkerung und der Bildung einer Studienkohorte aus der Allgemeinbevölkerung, in der die Langzeitentwicklung von kardialen, renalen und peripher-vaskulären Erkrankungen überwacht wird. Zu diesem Zweck werden die Teilnehmer alle drei bis vier Jahre auf kardialen, renalen und peripher-vaskulären Erkrankungen hin untersucht [de Jong et al., 2003].

Mit dieser bisher größten untersuchten Population aus der Allgemeinbevölkerung wurde zunächst bestätigt, dass 13% der Kaukasier Träger von mindestens einem *CYP3A5*1*-Allel und damit CYP3A5-Expressoren sind.

Die Untersuchung der Blutdruckwerte zeigte bei *CYP3A5*1*-Allelträgern signifikant niedrigere Werte für systolischen Blutdruck und Pulsdruck, während für den diastolischen Blutdruck kein Zusammenhang feststellbar war. Damit konnte nicht nur der Einfluss des CYP3A5-Enzyms auf den Blutdruck in der Allgemeinbevölkerung bestätigt werden. Die Ergebnisse unterstützen außerdem die Hypothese, dass bei CYP3A5-Expressoren durch eine erhöhte 6 β -Hydroxylaseaktivität des CYP3A5-Enzyms in der Nieren eine Inaktivierung von Cortisol erfolgen könnte, die so eine Aktivierung des Mineralkortikoidrezeptor verhindert wodurch eine Natriumretention und damit verbundene Blutdrucksteigerung vermieden wird.

Jedoch zeigte eine weitere, geschlechtsabhängige Untersuchung, dass ein signifikanter Effekt nur bei Frauen bestand. Obwohl keine Interaktion zwischen Geschlecht und Genotyp feststellbar war, deuten die Ergebnisse dennoch einen möglichen geschlechtsspezifischen Einfluss an. Der Mechanismus hierfür ist unklar, da die Beobachtung nicht durch den menopausalen Status oder einer Östrogensersatztherapie beeinflusst war, so dass ein hormoneller Einfluss eher unwahrscheinlich erscheint. Auch ist bisher nicht bekannt ob das CYP3A5-Enzym einer geschlechtsabhängigen Regulation unterliegt.

Dennoch waren bei den männlichen *CYP3A5*1*-Allelträgern die mittleren Werte für den systolischen Blutdruck wie auch für den Pulsdruck ebenfalls niedriger im Vergleich zu homozygoten *CYP3A5*3*-Allelträgern.

Auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant war, untermauern die Ergebnisse die Befunde von Fromm und Kollegen, die in einer Gruppe mit n=115 männlichen Kauasiern einen signifikant niedrigeren systolischen Blutdruck bei Trägern des *CYP3A5*1*-Allels beobachteten [Fromm et al., 2005].

Es ist anzumerken, dass in der vorliegenden Arbeit der Blutdruck nur über 10, bzw. 8 min gemessen wurde, während in der Studie von Fromm und Mitarbeitern die Blutdruckmessung mittels einer ambulanten 24 h Überwachung erfolgte. Auch war diese Probandengruppe in ihrer Zusammensetzung sehr viel homogener als die Population der PREVENT-Studie.

Dadurch könnte der blutdrucksenkende Effekt des *CYP3A5*1*-Allels in der Probandengruppe von Fromm et al. besser nachweisbar gewesen sein.

Dazu kommt, dass in der vorliegenden Arbeit das Durchschnittsalter der männlichen Probanden bei 49 Jahren lag, bzw. bei 47 Jahren für Frauen, während das Durchschnittsalter der von Fromm und Kollegen untersuchten Probanden nur 25 Jahre betrug, hier könnte ein Hinweis auf einen alterabhängigen Effekt von CYP3A5 bestehen.

Dies könnte auch erklären warum in einer Untersuchung von Kivisto et al. in einer Gruppe von Kaukasiern mit einem Mindestalter von 75 Jahren, das *CYP3A5*1*-Allel vermehrt bei Personen mit Hypertonie vorlag [Kivisto et al., 2005].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Widerspruch zu den Untersuchungen von Givens et al., die in einer kleinen Gruppe von 25 gesunden, normotensiven Afroamerikanern bei Trägern des *CYP3A5*1*-Allels ein erhöhter Blutdruck beobachteten [Givens et al., 2003]. Hierbei zeigte sich der Effekt bei homozygoten *CYP3A5*1*-Allelträgern besonders ausgeprägt, jedoch war eine statistisch signifikante Assoziation lediglich in der Gruppe der untersuchten Frauen (n=9) nachweisbar. Es ist anzumerken, dass der Stichprobenumfang mit n=25 Individuen sehr klein war und daher eine Aussage hinsichtlich einer übergeordneten Bedeutung des *CYP3A5*1*-Allels für die Blutdruckregulation bei Normalpersonen aufgrund dieser Untersuchung nicht sinnvoll erscheint. Außerdem handelte es sich bei den von Givens und Mitarbeiter untersuchten Probanden um Afroamerikaner und ein Einfluss durch die ethnische Herkunft kann nicht ausgeschlossen werden.

Auch konnte eine spätere Untersuchung durch Ho und Mitarbeiter die Ergebnisse von Givens et al. nicht bestätigen [Ho et al., 2005]. Diese untersuchten im Rahmen von zwei Studien zwei unabhängige Population bestehen aus n=217, bzw. n=412 Probanden beiderlei Geschlechts, die kaukasischer oder afroamerikanischer Herkunft waren. Dabei wurde in der ersten Population bei den untersuchten Afroamerikanern ein höherer Blutdruck bei homozygoten Trägern des *CYP3A5*3*-Allels festgestellt. Jedoch konnte in den zwei kaukasischen Probandengruppen kein Zusammenhang zwischen *CYP3A5* und dem Blutdruck beobachtet werden. Zusätzlich zeigte die afroamerikanische Population der zweiten Studie einen signifikant höheren Anteil *CYP3A5*1*-Allelträgern bei hypertensiven Individuen, als bei normotensiven.

Aufgrund der teilweise widersprüchlichen Daten ist eine eindeutige Aussage hinsichtlich eines protektiven Effekts des *CYP3A5*-Enzyms für den Blutdruck nicht möglich. Doch zeigt sich in der Gesamtschau der Ergebnisse, dass ein Einfluss von *CYP3A5* auf die Blutdruckregulation besteht. Außerdem lassen die Studien vermuten, dass die Auswirkung des Effekts wahrscheinlich von der ethnischen Herkunft abhängig ist und daher nicht unbedingt auf alle Bevölkerungsgruppen übertragbar ist.

Somit bestätigen die Ergebnisse den Einfluss von *CYP3A5* auf den Blutdruck und auch wenn dieser für die klinische Praxis keine Bedeutung hat, hilft er doch den komplexen Regulationsmechanismus des Blutdrucks zu verstehen, der durch verschiedene genetische Faktoren beeinflusst wird und von denen der *CYP3A5*1/*3*-Polymorphismus einer ist.

5.4 CYP3A-Isoenzyme bei der Ratte

Die Ergebnisse der Untersuchungen in der PREVEND-Population sowie Arbeiten anderer Gruppen [Fromm et al., 2005; Givens et al., 2003], lassen vermuten, dass ein blutdruckregulierender Effekt von CYP3A5 beim Menschen besteht.

Frühere Untersuchungen bei SHR deuten ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen der renalen Expression von CYP3A-Isoenzymen bzw. ihrer 6 β -Hydroxylaseaktivität und dem Blutdruck [Ghosh et al., 1993; Ghosh et al., 1995; Watlington et al., 1992]. Obwohl die Ergebnisse von Ghosh et al. einen Einfluss der CYP3A-Enzyme auf die Blutdruckregulation vermuten lassen, scheint dieser Ansatz nicht weiter verfolgt worden zu sein. Außer von dieser Arbeitsgruppe wurde in einer ausführlichen Literaturrecherche nur eine weitere Arbeit zu diesem Thema gefunden [Imaoka und Funae, 1991]. Ansonsten sind keine weiteren Veröffentlichungen bekannt in denen die renale CYP3A-Expression von Ratten in Zusammenhang mit dem Blutdruck untersucht wurde.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den CYP3A-Enzyme und der Blutdruckregulation in der Ratte zu klären wurde daher, in Anlehnung an die Arbeiten von Ghosh und Mitarbeitern, die renale Expression der CYP3A-Enzyme in der Niere von SHR und WKY vergleichend untersucht [Ghosh et al., 1995].

Es ist derzeit unklar, ob und wenn ja, welches Enzym der Ratte als Homolog für das CYP3A5 des Menschen in Frage kommt. Enzymmuster und gewebespezifische Expressionsmuster der CYP3A-Enzyme bei Mensch und Ratte sind unterschiedlich. Daher wurden in einem ersten Schritt Homologievergleiche der mRNA-Sequenzen und Aminosäure-Sequenzen zwischen den Ratten CYP3A Genen und den human CYP3A4 und CYP3A5 Genen durchgeführt. Dabei zeigte der Vergleich der mRNA-Sequenzen, dass CYP3A9 die größte Übereinstimmung mit dem humanen CYP3A5 aufwies (80%). Das gleiche Ergebnis ergab die Analyse der Proteinsequenzen, auch hier war CYP3A9 die dem humanen CYP3A5 ähnlichste Sequenz (75%), so dass daher CYP3A9 als wahrscheinlichstes Homolog zum CYP3A5 erscheint.

Beim Vergleich der mRNA-Sequenzen der Ratte untereinander fiel außerdem eine sehr hohe Ähnlichkeit zwischen CYP3A1 und CYP3A23 auf (98%). Dies korrespondiert mit Ergebnissen von Nagata und Mitarbeitern, die nach Untersuchung von Genstruktur, Expression in Rattenleber und katalytische Eigenschaften des Proteins zu dem Ergebnis kamen, dass CYP3A23 eine Variante von CYP3A1 ist [Nagata et al., 1999]. Aus diesem Grund wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auf eine separate Untersuchung von CYP3A23 verzichtet und dieses als mit CYP3A1 identisch angesehen.

In weiteren Untersuchungen wurde die Expression von vier CYP3A-Enzymen (CYP3A1, CYP3A2, CYP3A9 und CYP3A18) in Cortex und Leber von adulten SHR untersucht und mit der Expression in normotensiven WKY verglichen.

Dabei stellte die Wahl geeigneter Primerpaare einen kritischen Punkt bei der Expressionsmessung dar. Da zwischen den vier untersuchten Isoenzymen der Subfamilie eine große Sequenzhomologie besteht, mussten Primer gefunden werden, die spezifisch für die zu untersuchte mRNA amplifizierten und dennoch in der PCR effizient waren. Als weiteres Kriterium sollten die Primer eine Exon/Exon-Grenze umschließen, um ein falsch positives Ergebnis durch mögliche Verunreinigungen mit genomischer DNA zu vermeiden. Obwohl durch diese Kriterien die Möglichkeiten eingeschränkt waren, konnten für alle untersuchten Enzyme Primerpaare gefunden werden. Durch Amplifikation von cDNA aus Lebergewebe und anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte konnte die Spezifität aller eingesetzter Primer und ihre Funktionsfähigkeit in der PCR bestätigt werden.

Ein weiterer Punkt war der Umstand, dass die Expressionsmuster der CYP3A-Enzyme bei der Ratte sowohl alters-, gewebs- als auch geschlechtsabhängig differieren [Debri et al., 1995; Ribeiro und Lechner, 1992; Robertson et al., 1998; Strotkamp et al., 1995; Warrington et al., 2004]. So sind CYP3A1, CYP3A2 und CYP3A18 bei Männchen vorherrschend. CYP3A9 ist dagegen die bei Weibchen vorherrschende Form. Jedoch erfolgt, wie Anakk und Mitarbeiter zeigten, die Expression von CYP3A9 in den verschiedenen Geweben weiblicher Ratten unterschiedlich und ist der Niere bei Männchen sogar stärker ist als bei Weibchen [Anakk et al., 2003].

Um einen Ansatzpunkt für die Untersuchungen zur Expression zu haben wurde daher, ausgehend von den Arbeiten von Ghosh und Mitarbeitern, zunächst die Expression im Nierengewebe von adulten männlichen SHR und WKY untersucht [Ghosh et al., 1995].

Bei der qualitativen Untersuchung konnte eine Expression aller vier CYP3A-Enzyme im Lebergewebe bestätigt werden. Dagegen wurden im Cortex von SHR und WKY nur CYP3A2, CYP3A9 und CYP3A18 detektiert. Bei dem Vergleich der PCR-Produkte auf dem Agarose-Gel fiel auf, dass CYP3A9 und CYP3A18 in Niere und Leber im ungefähr gleichen Maß exprimiert wurden. Dagegen lag von CYP3A2 in der Niere nur eine schwache Expression im Vergleich zur Leber vor.

Damit bestätigen die Ergebnisse die Befunde frühere Arbeiten, die CYP3A1 und CYP3A2 als Enzyme beschreiben, die vorherrschend in der Leber, aber kaum in renalem Gewebe exprimiert werden [Mahnke et al., 1997]. CYP3A9 und CYP3A18 dagegen konnten als Enzyme bestätigt werden die, im Vergleich zu CYP3A1 und CYP3A2, in der Leber

schwächer dafür aber stärker in renalem Geweben exprimiert sind [Anakk et al., 2003; Takara et al., 2003].

Einen besonderen Fall stellt das Enzym CYP3A62 dar, das erst in einer Veröffentlichung genannt wurde [Matsubara et al., 2004]. Da die mRNA-Sequenz dieses Enzyms noch nicht in der Datenbank des NCBI geführt war als die Expressionsuntersuchung durchgeführt wurden, konnte für dieses Enzym kein Assay erstellt werden. Somit konnte nur ein nachträglicher Homologievergleich der mRNA-Sequenz erfolgen. Diese zeigte die größte Übereinstimmung mit CYP3A9 (84%). Die Untersuchung der Expression von CYP3A62 Enzyms in Leber und Gastrointestinal-Trakt von männlichen und weiblichen Ratten durch Matsubara und Mitarbeiter wiesen eine stärkere extrahepatische Expression von CYP3A62-ähnlich wie bei CYP3A9. Die Ergebnisse ließen die Autoren zu dem Schluss kommen, dass CYP3A62 ähnliche Bedeutung wie CYP3A9 und CYP3A18 besitzt.

In wie weit diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind ist noch unklar. Die unterschiedlichen Expressionsmuster erschweren die Identifizierung eines Homologs zum humanen CYP3A5. Zusätzlich wird eine Bedeutung der renalen CYP3A-Enzyme der Ratte für die Blutdruckregulation durch bisherige Untersuchungen nicht unterstützt [Rapp, 2000; Stoll et al., 2000].