

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

DISSERTATION

**Polymorphismen in der Promoter- und Enhancerregion von  
CYP3A4**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Felix Stoffels

aus Hamburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. I. Roots

2. Prof. Dr. med. J. Brockmüller

3. Prof. Dr. H.-J. Rommelspacher

**Datum der Promotion: 29.01.2010**

**Meiner Familie**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	CYP3A4	2
1.2	ALPRAZOLAM ALS AKTIVITÄTSINDIKATOR VON CYP3A4	6
1.3	POLYMORPHISMEN ARZNEIMITTELMETABOLISIERENDER ENZYME	7
1.4	EPIGENETIK	9
1.5	VORANGEHENDE STUDIEN	11
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>13</b>
3.1	MATERIAL	13
3.1.1	<i>Chemikalien</i>	13
3.1.2	<i>Geräte und Verbrauchsmaterialien</i>	17
3.1.3	<i>Computerprogramme</i>	17
3.2	METHODIK	18
3.2.1	<i>Aufbau der klinischen Studie</i>	18
3.2.2	<i>Isolierung der DNA</i>	19
3.2.3	<i>Sequenzanalyse</i>	20
3.2.3.1	Amplifizierung der DNA mittels PCR	20
3.2.3.2	Aufreinigung der PCR-Produkte	22
3.2.3.3	Agarosegelelektrophorese	22
3.2.3.4	Sequenzierreaktion	23
3.2.3.5	Sequenzierung	25
3.2.3.6	Nachweis des Polymorphismus CYP3A4*1B mittels Sequenzierung	26
3.2.3.7	Nachweis des Polymorphismus CYP3A4*1F mittels Sequenzierung	27
3.2.3.8	Computerauswertung und Alignment	27
3.2.3.9	RFLP	28
3.2.3.10	Nachweis des Polymorphismus CYP3A4*1B mittels RFLP	30
3.2.3.11	Nachweis des Polymorphismus CYP3A4*1F mittels RFLP	31
3.2.4	<i>Epigenetische Analyse</i>	31
3.2.4.1	Durchführung der Bisulfitbehandlung	32
3.2.4.2	Amplifizierung der bisulfonierten DNA mit nested-PCR	32
3.2.4.3	Sequenzierung	34
3.2.4.4	RFLP der bisulfonierten DNA	35
3.2.4.5	Methylierungsreaktion	36
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
4.1	PROBANDENKOLLEKTIV	39
4.2	ALPRAZOLAMKONZENTRATIONEN IM PLASMA	39
4.3	ERGEBNISSE DER GENOTYPISIERUNG	40

4.4 GENOTYP-PHÄNOTYP-ASSOZIATION	40
4.5 STATISTISCHE AUSWERTUNG	455
4.5.1. Clearance	46
<b>DISKUSSION</b>	<b>47</b>
5.1 NICHTGENETISCHE EINFLÜSSE AUF DEN ALPRAZOLAMABBAU	47
5.2 ALPRAZOLAM ALS TESTSUBSTANZ VON CYP3A4	50
5.3 POLYMORPHISMEN IM PROMOTERBEREICH VON CYP3A4	52
5.3.1 CYP3A4*1B	533
5.3.2 CYP3A4*1F	56
5.3.3 Enhancerregion	57
5.4 EPIGENETIK	58
5.5 WEITERE GENETISCHE URSACHEN FÜR VARIATIONEN IM ALPRAZOLAMABBAU DURCH CYP3A4	60
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>64</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>65</b>
<b>ANHANG:</b>	<b>81</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:</b>	<b>81</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS:</b>	<b>83</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS:</b>	<b>84</b>
<b>DANKSAGUNG</b>	<b>86</b>
<b>LEBENS LAUF</b>	<b>87</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>88</b>

# 1 Einleitung

Der menschliche Organismus steht in ständigem Austausch mit seiner Umwelt. Er nimmt Fremdstoffe auf, verstoffwechselt sie und scheidet sie wieder aus. Bei diesen Fremdstoffen handelt es sich sowohl um natürlich vorkommende Nahrungsbestandteile, als auch um Pharmaka und Umweltgifte. Für diese Aufgaben hat sich in der Evolution ein komplexes System von Enzymen entwickelt, das für Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung und Abbau dieser Stoffe verantwortlich ist. Der Abbau findet zum großen Teil in der Leber statt. Hier werden die Fremdstoffe enzymatisch umgewandelt, damit sie über Niere oder Galle wieder ausgeschieden werden können. Dies ist die Aufgabe der Biotransformation.

Die Reaktionen der Biotransformation werden in Phase-I- und Phase-II-Reaktionen unterteilt. In den Phase-I-Reaktionen werden funktionelle Gruppen in unpolare Fremdstoffmoleküle eingeführt oder vorhandene funktionelle Gruppen umgewandelt. Es entstehen durch Oxidation und Reduktion zumeist hydrophilere Metaboliten. In den Phase-II-Reaktionen werden diese Metaboliten an polare Moleküle gekoppelt (zum Beispiel Acetyl-, Sulfat- oder Glucuronylgruppen). Diese Konjugate besitzen eine vielfach höhere Polarität und somit eine stärkere Hydrophilie als die Ausgangssubstrate, was die biliäre beziehungsweise renale Ausscheidung erleichtert.

In der Phase I spielen die Cytochrom-P450-Monooxygenasen eine zentrale Rolle. Besonders das Cytochrom 3A4 (CYP3A4) ist hier von Bedeutung, da es am Abbau von ca. 60% der zur Zeit klinisch verwendeten Arzneimittel beteiligt ist. Wie viele der am Xenobiotikaabbau beteiligten Enzyme ist CYP3A4 physiologischerweise auch am Stoffwechsel körpereigener Stoffe, wie z. B. am Abbau der Steroidhormone, beteiligt (83).

## 1.1 CYP3A4

1985 wurde ein glucocorticoidinduzierbares Mitglied der Cytochrom-P-450-Superfamilie in der menschlichen Leber entdeckt (107); im folgenden Jahr wurde die cDNA-Sequenz entschlüsselt (73). Durch Experimente mit Hybridzellen wurde das dazugehörige Gen auf dem langen Arm von Chromosom 7 (7q 22.1) lokalisiert (29, 9). Nach Vergleichen mit anderen Cytochromen wurde es in die Subfamilie IIIA als Polypeptid 4 eingeordnet. Es handelt sich um ein Phase-I-Enzym mit einer Masse von 57,343 kDa und einer Länge von 503 Aminosäuren. CYP3A4 wird in Dünndarm (55), bei einigen Individuen in der Lunge (84), bei etwa 40% in der Niere (39) und vor allem in der Leber exprimiert; in letzterer macht es 30 bis 40% des gesamten Cytochrom-P-450-Gehaltes aus.

CYP3A4 gehört zu einer großen Enzymfamilie. Diese P-450-Superfamilie wird auf der Basis von Ähnlichkeit der Aminosäureabfolge, phylogenetischen Kriterien und Genorganisation eingeteilt (77).

CYP3A4 ist am oxidativen Metabolismus von 50% (117) bis 60% (63) aller zur Zeit klinisch genutzten Pharmaka beteiligt (s.Tab. 1). Es weist eine hohe interindividuelle Varianz in Expression und Aktivität auf (105). In Gewebeproben von Organspendern wurde eine bis zu vierzigfache Variabilität in der Enzymexpression festgestellt. Sowohl was die Menge anbetrifft, als auch was die metabolische Kapazität angeht, macht CYP3A4 den Großteil des in der Leber enthaltenen Cytochroms aus. Im Gegensatz zu anderen hepatischen Cytochromen zeichnet sich CYP3A4 durch eine geringe Substratspezifität aus. Während andere Cytochrome eine geringe Anzahl von Substraten mit hoher Effizienz verstoffwechseln, ist CYP3A4 am Phase-I-Metabolismus von mehr als der Hälfte der derzeit klinisch eingesetzten Pharmaka beteiligt, wobei sich eine deutliche Substratüberlappung mit anderen Cytochromen zeigt, wie z. B. mit der CYP2C-Unterfamilie.

Tab. 1: Einige Substrate von CYP3A4 (37).

<b><u>Antibiotika:</u></b>	<b><u>Kardiologische Medikamente:</u></b>	<b><u>Neuroleptika, Antidepressiva, Antiepileptika:</u></b>
Clarithromycin	Amiodaron	Amitriptylin
Dapson	Clopidogrel	Carbamazepin
Erythromycin	Digitoxin	Citalopram
Sulfamethoxazol	Diltiazem	Clozapin
	Felodipin	Haloperidol
	Lidocain	Imipramin
	Losartan	Sertindol
<b><u>Virostatika:</u></b>	Nicardipin	
Indinavir	Nifedipin	<b><u>Analgetika, Sedativa, Narkotika:</u></b>
Nevirapin	Nilvadipin	Alfentanil
Ritonavir	Nimodipin	Alprazolam
Saquinavir	Nisodipin	Codein
	Nitrendipin	Diazepam
<b><u>Antiemetika, Magen-Darm-Med.:</u></b>	Propafenon	Meloxicam
Granisetron	Tasosartan	Midazolam
Lansoprazol	Verapamil	Paracetamol
Omeprazol	Warfarin	Sufentanil
		Triazolam
<b><u>Hormone, Hormonanaloga, -Hormonrezeptoragonisten, -modulatoren:</u></b>	<b><u>Zytostatika:</u></b>	<b><u>Cholesterol-Synthese-Hemmer:</u></b>
17 $\beta$ -Estradiol	Colchicin	Atorvastatin
17 $\beta$ -Ethinylestradiol	Cyclophosphamid	Lovastatin
Budenosid	Docetaxel	
Cortisol	Etoposid	<b><u>Immunsuppressiva:</u></b>
Dehydroepiandrosteron	Ifosfamid	Cyclosporin A
Gestoden	Irinotecan	Cyclosporin G
Flutamid	Paclitaxel	Tacrolimus
Progesteron	Teniposid	
Tamoxifen		
Testosteron		
Toremifen		

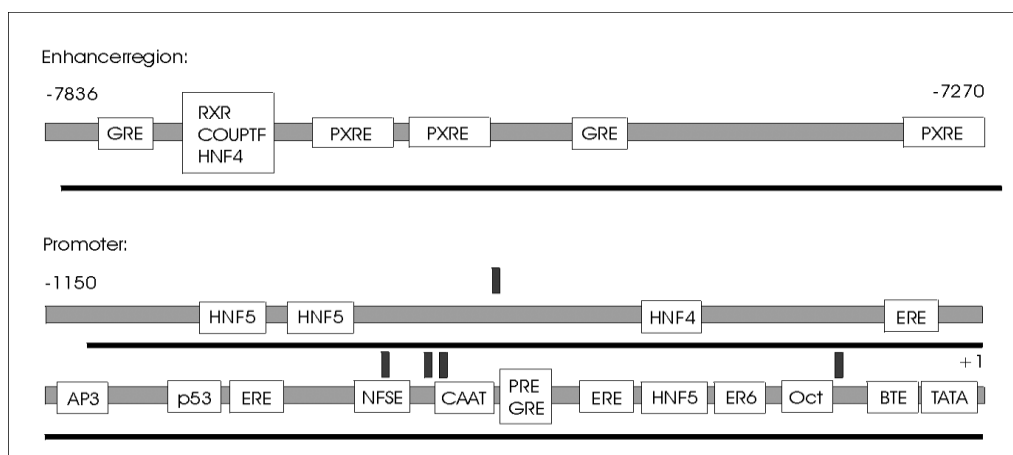
Die Expression von CYP3A4 kann in der Leber *in vitro* um das 35-100-fache (36), *in vivo* um das 20-fache (114) variieren. Im Dünndarm beträgt die Variation das 4-8-fache (55). Dies hat verschiedene Ursachen: Umwelteinflüsse wie die Exposition gegenüber Medikamenten und Umweltgiften (115), physiologische Faktoren wie Alter (47), Hormonstatus (65) und Infektionen (19) und Genetik (s.1.3).

Während einige Stoffe, wie Triacetyl-Oleandomycin und Erythromycin, eine Induktion durch posttranskriptionale Modifikation der mRNA oder durch Proteinstabilisierung bewirken (44), beeinflussen die meisten bekannten Induktoren die CYP3A4-Expression mittels DNA-



Rezeptoren. Der CYP3A4-Promoter umfasst den Bereich von  $-1$  bp bis etwa  $-1000$  bp (s. Abb. 1). In ihm sind das basale Transskriptionselement (BTE), die TATA-box sowie andere für die Induktion relevante Elemente nachgewiesen (54). Zusätzlich existieren mögliche Bindungsstellen für Regulationsfaktoren, so z. B. für das Oktamer-Bindungsprotein (Oct-1), das CCAAT-Bindungsprotein (CP-1), das Aktivatorprotein 3 (AP-3), der Östrogenrezeptor (ER), der Progesteron/Glucocorticoidrezeptor (PR/GR) sowie die hepatischen Kernrezeptoren 4 und 5 (HNF-4, HNF-5) und p53 (42). Ihr Einfluss auf die Regulation ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Gesichert ist die Bedeutung von drei Bereichen: Dies sind zum einen BTE und TATA-box für die Transskriptionsinitiation, zum anderen das ER6-Motiv im proximalen Promoter (63, 54) und drei als dNR1 (distaler Kernrezeptor 1), dNR2 und dNR3 bezeichnete Elemente in der Enhancerregion, an die der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) binden kann. Ein wichtiges Element der Induktion ist das distale Verstärkermotiv (30), eine Region bei  $-7607$  bis  $-7836$  bp. Weiterhin existieren zwei zusätzliche Elemente (FP1 und FP2) im Enhancerbereich, die zusammen mit den zuvor genannten für die volle Induktion durch Rifampicin in der Maus von Bedeutung sind (30). Ob FP1 und FP2 auch für die Induktion von CYP3A4 beim Menschen relevant ist, ist noch nicht abschließend geklärt (87).

Abb. 1: CYP3A4: Promoter- und Enhancerregion. Eingetragen sind potentielle HREs, bekannte Polymorphismen (senkrechte Striche) und die Lage der PCR-Produkte der vorliegenden Studie (dünne schwarze Striche) (modifiziert nach 27).



Als wichtigster DNA-Rezeptor im Gen von CYP3A4 hat sich bisher der für PXR erwiesen. PXR bindet als obligates Heterodimer zusammen mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) (105) an das ER6-Motiv im proximalen Promoter (63) und die Regionen dNR1-3, die für die volle Induktion nötig sind (30). Auch der Einfluss vom konstitutiven Androstanrezeptor (CAR), Glucocorticoidrezeptor (GR) und Vitamin-D-Rezeptor (VDR) auf die Induktion von CYP3A4 ist gesichert.

## 1.2 Alprazolam als Aktivitätsindikator von CYP3A4

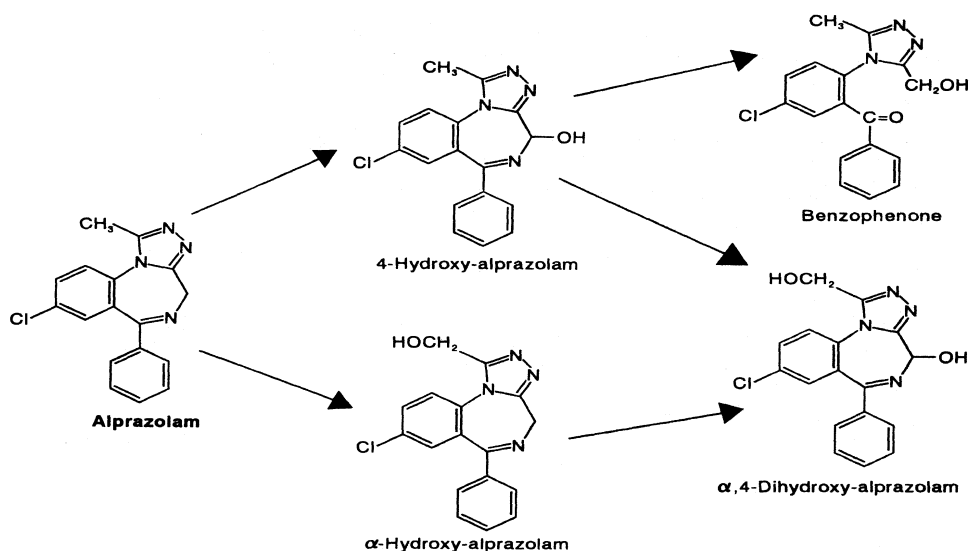
Für die Untersuchung der Aktivität von CYP3A4 *in vivo* wurden verschiedene Substrate vorgeschlagen. Dazu gehören unter anderem Midazolam (102), Nifedipin (92), der Erythromycin-Atemtest (108), Lidocain (79), das Verhältnis 6 $\beta$ -Hydroxycortisol:Cortisol im Urin (97), Alfentanil (58), Dextrometorphan (31) und Dapson (71). Es zeigte sich jedoch keine oder nur eine geringe Korrelation zwischen der Aktivität von CYP3A4 und der Substratclearance (53, 119). Eine Ausnahme bildet der Midazolam-Test. Da Midazolam jedoch ein sog. *High clearance drug* ist, ist der Test beeinflussbar durch Veränderungen der Leberdurchblutung. Mit Ausnahme des Erythromycin-Atemtests werden Substrat und Metabolit meist im Urin gemessen. Da auf die Konzentration eines Stoffes im Urin aber neben dem Leberstoffwechsel noch verschiedene andere Faktoren, wie z. B. die Metabolisierung in der Niere, einen Einfluss haben, ist es vorstellbar, dass diese die mangelnde Korrelation zwischen genetischen Varianzen und Clearance bedingen.

Alprazolam (8-Chlor-1-methyl-6-phenyl-4H-1,2,4-triazolam) ist ein Vertreter der Benzodiazepine von mittlerer bis kurzer Halbwertszeit und wird als Tranquillizer und als Anxiolytikum bei akuten und chronischen Angst-, Erregungs- und Spannungszuständen verwendet. Alprazolam eignet sich sowohl *in vitro* (94) als auch *in vivo* (118, 33) als Testsubstanz für CYP3A4. Die hohe orale Verfügbarkeit von 80-100% (33) erleichtert die Applikation im Rahmen klinischer Studien, die geringe präsystemische Metabolisierung (34) und der geringe Einfluss der Leberdurchblutung auf die Verstoffwechslung führen im Vergleich zu Midazolam zu einer größeren Unabhängigkeit von anderen Variablen, da der Plasmaspiegel

primär von der Enzymaktivität in der Leber beeinflusst wird.

In der Leber wird aus Alprazolam zunächst 4-Hydroxy-Alprazolam oder  $\alpha$ -Hydroxy-Alprazolam gebildet. 4-Hydroxy-Alprazolam wird weiter in Benzophenon und  $\alpha$ -4-Dihydroxy-Alprazolam umgewandelt. In letztere Substanz wird auch das  $\alpha$ -Hydroxy-Alprazolam überführt (s. Abb. 2). Alle diese Substanzen haben noch eine, wenn auch geringe, Affinität zu den zentralen Benzodiazepinrezeptoren und werden nach Glucuronidierung durch P-Glykoprotein renal eliminiert (33).

Abb. 2: Strukturformel von Alprazolam und seinen Metaboliten.



Diese Umbauvorgänge werden, wie Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* gezeigt haben (109, 118), von CYP3A4 katalysiert und sind fast vollständig von der  $\alpha$ - und 4-Hydroxylierung durch CYP3A4 abhängig (21). Die  $\alpha$ -Hydroxylierung erfolgt in menschlichen Lebermikrosomen zwar durch CYP3A5 dreimal schneller als durch CYP3A4 (43), aufgrund der geringeren Konzentration von CYP3A5 in der Leber spielt sie für den Gesamtabbau von Alprazolam aber nur eine untergeordnete Rolle (113). Der Beitrag von CYP3A5 zum Abbau von Alprazolam hängt vom Vorhandensein des Polymorphismus CYP3A5\*1 ab, da bei Abwesenheit dieses

Polymorphismus das Enzym nicht exprimiert wird, wie dies bei 90-95% aller Europäer der Fall ist. Dies wurde auch durch eine der vorliegenden Arbeit vorhergehende Studie bestätigt. In dieser wurde am gleichen Probandenkollektiv der Einfluss des Polymorphismus CYP3A5\*1 auf die Abbaugeschwindigkeit von Alprazolam untersucht und ein solcher ausgeschlossen (25a).

### 1.3 Polymorphismen arzneimittelmetabolisierender Enzyme

Im menschlichen Genom existieren wahrscheinlich etwa 10 Millionen *single nucleotide polymorphisms* (SNPs)(116). Hierzu gehören auch Genorte, die Enzyme des Fremdstoffmetabolismus verschlüsseln. Zu diesen Polymorphismen kommt es durch Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen sowie Duplikationen einzelner Nukleotide (102). Sie haben entweder keine Folgen für das dazugehörige Protein oder führen zu einer Funktion, die im Vergleich zum nicht mutierten Zustand, dem sogenannten Wildtyp, schlechter oder besser ist. Polymorphismen arzneimittelmetabolisierender Enzyme treten in verschiedenen ethnischen Gruppen mit verschiedener Häufigkeit auf (3). Als Ursache für die ethnischen Unterschiede gelten evolutionäre Anpassungen an geographisch bedingte unterschiedliche Umweltfaktoren und Nahrungsgrundlagen (75).

Bei CYP3A4 sind insgesamt 24 Allele nachgewiesen worden. Im Gegensatz zu anderen Cytochromen wie CYP2D6 und CYP2C19 wurde bisher noch keine „Nullvariante“ entdeckt. Das heißt, es wurde bisher kein Individuum gefunden, bei dem CYP3A4 überhaupt nicht exprimiert wird. Dies erklärt sich aus der Unentbehrlichkeit von CYP3A4.

Die bekannten Polymorphismen treten, von zwei Ausnahmen im Promoterbereich abgesehen (\*1B, \*1F), nur in sehr niedriger Frequenz auf. Für die Polymorphismen \*4, \*5 und \*6 wurde eine leichte Erniedrigung der Aktivität *in vivo* nachgewiesen (46), während \*2, \*12, \*17 und \*18 nur *in vitro* einen Einfluss auf die Aktivität zeigte (15, 11). In der vorliegenden Studie wurde der codierende Bereich nicht sequenziert.

Tab. 2: Polymorphismen im Gen und der Promoterregion von CYP3A4 (k. D.: keine Daten verfügbar).

Allel	Nukleotidaustausch	Häufigkeit bei Europäern	Referenz
CYP3A4*1A			Gonzalez et al, 1988
CYP3A4*1B	-392 A>G	2-10%	Rebbeck et al., 1998 Westlind et al., 1999
CYP3A4*1C	-444 T>G	1%	Kuehl et al., 2001
CYP3A4*1D	-62 C>A	1%	Kuehl et al., 2001
CYP3A4*1E	-369 T>A	<1%	Hamzeiy et al., 2002
CYP3A4*1F	-747 C>G	20%	Hamzeiy et al., 2002
CYP3A4*2	222	2,7%	Sata et al., 2000
CYP3A4*3	1334 T>C (cDNA)	0,5-4%	Sata et al., 2000
CYP3A4*4	352 A>G (cDNA)	k. D.	Hsieh et al., 2001
CYP3A4*5	653 C>G (cDNA)	k. D.	Hsieh et al., 2001
CYP3A4*6	831 insA (cDNA)	k. D.	Hsieh et al., 2001
CYP3A4*7	6004 G>A	1,4%	Eiselt et al., 2001
CYP3A4*8	13908 G>A	0,33%	Eiselt et al., 2001
CYP3A4*9	14292 G>A	0,25%	Eiselt et al., 2001
CYP3A4*10	14304 G>C	0,25-2%	Eiselt et al., 2001
CYP3A4*11	21867 C>T	0,33%	Eiselt et al., 2001
CYP3A4*12	21896 C>T	0,33%	Eiselt et al., 2001
CYP3A4*13	22026 C>T	0,33%	Eiselt et al., 2001
CYP3A4*14	44 T>C	k. D.	Lamba et al., 2002
CYP3A4*15A	14269 G>A	<1%	Lamba et al., 2002
	-845ins	<1%	
CYP3A4*15B	ATGGAGTGA: -392 A>G		Hamzeiy et al., 2002
	14269 G>A		
CYP3A4*16	15603 C>G	k. D.	Lamba et al., 2002
CYP3A4*17	15615 T>C	2%	Dai et al., 2001
CYP3A4*18	20070 T>C	<1%	Dai et al., 2001
CYP3A4*19	23237 C>T	<1%	Dai et al., 2001
	20230 G>A		

## 1.4 Epigenetik

Die Weitergabe von Informationen von einer Zelle auf ihre Tochterzelle, ohne dass diese Information in der DNA-Sequenz kodiert ist, wird als Epigenetik bezeichnet. Es gibt verschiedene Wege der epigenetischen Vererbung. Die wichtigsten sind die Histonmodifikation und die DNA-Methylierung.

Bei der Histonmodifikation handelt es sich u. a. um die Acetylierung der Lysinreste der Histone im Zellkern, weitere Histonmodifikationen sind die Phosphorylierung von Serinresten und die Methylierung von Argininresten. Üblicherweise sind die positiv geladenen Lysinreste der Histone stark an die negativ geladenen Phosphatreste der DNA gebunden, wodurch transkriptionsaktive Proteine keinen Zugang zu ihren Rezeptoren finden, was zur Inaktivierung der Gene – dem *Gene-Silencing* – führt. Werden diese Lysinreste jedoch acetyliert, löst sich die enge Bindung, Transkriptionsfaktoren können sich an die DNA anlagern und eine Transkription kann stattfinden (52). Der Prozess der Acetylierung ist reversibel und wird durch das Zusammenspiel von Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC) reguliert (10). Beide Enzyme kommen in verschiedenen organspezifischen Untergruppen vor (52). Eine fehlerhafte Histondeacetylierung und dadurch bedingte Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ist z. B. ein Faktor bei der Entstehung von Karzinomen. So führt beispielsweise eine Hypermethylierung des Promoters von CDKN2A zu einer Anlagerung von HDAC an den entsprechenden Promoter mit daraus folgendem *Gene-Silencing*, was die Unterdrückung der Expression von p16 und TIMP3, zweier Tumorsuppressorproteine, zur Folge hat (70). Hier ist der Ansatzpunkt einer neuen Gruppe von Zytostatika, der HDAC-Inhibitoren (HDACI). Diese Substanzen sollen die durch Histondeacetylierung inaktivierten Tumorsuppressorgene wieder aktivieren. Zur Zeit sind ca. 50 HDACIs in der Erprobung (52). Einige HDACI, wie Valproat, werden in Kombination mit dem demethylierenden Wirkstoff 5-Azacytidin, bereits in Phase-II-Studien zur Therapie der akuten myeloischen Leukämie getestet (24).

Bei der DNA-Methylierung (8) handelt es sich um eine posttranskriptionelle Modifikation der

Cytosinbasen in der Dinukleotidsequenz CG (CpG). DNA-Methylierung und Histonmodifizierung sind eng miteinander verknüpft. So lagern sich z. B. *methyl binding domain* Proteine (MBDs) an methylierte DNA-Regionen an. Um diese MBDs sammeln sich größere Proteinkomplexe, zu denen auch HDACs und HMTs gehören, die wiederum zu einer weiteren Repression des entsprechenden DNA-Abschnittes führen (60). Das Ausmaß dieser Methylierung des Genoms ändert sich während der Embryogenese. Nach der Fertilisation kommt es innerhalb von Stunden zu einer genomweiten Demethylierung. Anschließend findet eine sukzessive Remethylierung statt, die mit der zunehmenden Differenzierung der Zellen einhergeht (4). Diese Methylierung ist Aufgabe der DNA-Methyltransferasen (DNMT). Eine Hemmung der DNMTs führt zu einer globalen Demethylierung und zum Absterben des Embryos (101).

Aus dem Meer der mehrheitlich methylierten CpG-Dinukleotide ragen die meist unmethylierten *CpG-islands* heraus, die üblicherweise in der Promoterregion von Genen lokalisiert sind. Eine vermehrte Methylierung in diesen Regionen führt meist zur dauerhaften Inaktivierung des dazugehörigen Gens (4). Methylierungen können im Laufe der Entwicklung eines Organismus jedoch wieder aufgehoben werden, wodurch Gene wieder reaktiviert werden (22). Ein Beispiel dafür ist das Gen des *brain derived neurotropic factor (Bdnf)*, der u. a. bei der Entstehung von Depressionen eine Rolle spielt (14). Dieses Gen enthält mindestens neun kurze nicht kodierende Exons, die durch alternatives Splicing zu neun verschiedenen Gentranskripten führen. Neuronale Aktivität führt u. a. über die Phosphorylierung des genrepressiven Methyl-CpG-Bindungsproteins 2 zu einer Induktion von *Bdnf III* (103). Zusätzlich kommt es zu einer schnellen Änderung des Methylierungsmusters der verschiedenen Promoteren dieses Gens (64). Zusammen mit weiteren epigenetischen Veränderungen ermöglicht dies eine örtliche und zeitliche Modifikation der Transskription der verschiedenen *Bdnf*-Subtypen.

Ein epigenetischer Einfluss auf den Medikamentenabbau, insbesondere durch CYP3A4, wurde bisher noch nicht untersucht.

## 1.5 Vorangehende Studien

Basierend auf diesen Kenntnissen wurde im Institut für Klinisch Pharmakologie der Charité in Berlin eine Studie durchgeführt. Ziel dieser Studie war es, genetische Faktoren, die ursächlich an der interindividuellen Aktivität von CYP3A4 beteiligt sind, zu finden und in ihrer Bedeutung zu untersuchen (8). Hierfür wurde 104 Probanden deutscher Abstammung Alprazolam als Testsubstanz und Rifampicin als Induktor von CYP3A4 verabreicht und die Alprazolamkonzentrationen im Serum zu definierten Zeitpunkten gemessen (s. 3.2.1). Beim Vergleich dieser Werte mit den biologischen Daten der Probanden (Alter, Geschlecht, Gewicht, Größe), den Laborparametern und dem Vorhandensein des Polymorphismus CYP3A5\*1 konnte ein relevanter Einfluss dieser Faktoren auf den Alprazolamabbau ausgeschlossen werden (25a, 121, 95). Im Anschluss wurde aus den Blutproben DNA für die weiteren genetischen Untersuchungen isoliert. Die Größe der Studiengruppe wurde so gewählt, dass mit 95%iger Wahrscheinlichkeit auch Varianten nachweisbar waren, die nur bei etwa 3% der Bevölkerung vorliegen (8). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, genetische Varianten in der Promoter- und Enhancerregion von CYP3A4 nachzuweisen und diese in Bezug zu den pharmakokinetischen Daten zu setzen. Insbesondere sollte der bekannte Polymorphismus CYP3A4\*1F auf seinen Methylierungsgrad untersucht und dieser in Bezug zu den vorher gewonnenen Daten gesetzt werden.



## 2 Zielsetzung

Cytochrom P450 3A4 ist das zentrale Enzym der Phase I der Biotransformation in Leber und Dünndarm. Seine Expression und Aktivität weist eine hohe Variabilität auf. Es wird davon ausgegangen, dass Polymorphismen hierbei eine wichtige Rolle spielen. Bisherige Studien konnten aber noch keine dafür verantwortlichen Mutationen nachweisen. In seiner 5'-flankierenden Region sind DNA-Rezeptorbindungsstellen nachgewiesen worden, die eine Induktion des Enzyms ermöglichen. Da die Induktion ein wichtiger Faktor ist, der die Variabilität bedingt, sind Mutationen im regulatorischen Bereich des Gens eine mögliche Ursache der interindividuellen Unterschiede.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, Vorhandensein, Häufigkeit, Art, Lage und ggf. Methylierungsgrad von Mutationen in der Promoter- und Enhancerregion von CYP3A4 zu untersuchen und ihren Einfluss auf die *In-vivo*-Aktivität des Enzyms zu beurteilen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Tab. 3: Medikamente für die klinische Studie

Alprazolam	Tafil®	Pharmacia & Upjohn GmbH, D
Rifampicin	Eremfat®	Fatol Arzneimittel GmbH, D

Tab. 4: Chemikalien und Lösungen zur Erythrozytenlyse

10x Erythrozyten-Lyse-Puffer	61,5 g NH <sub>4</sub> Cl (1,15 M) 10 g KHCO <sub>3</sub> (0,1 M) 2 ml 0,5 M EDTA (1 mM) mit aqua bidest. ad 1 l	alle Merck, D
1x Erythrozyten-Lyse-Puffer	Gebrauchslösung 1:10 mit aqua bidest. verdünnen	
10x TEN-Puffer	2,4 g Tris/HCl pH 7,5 (0,2 M) 400 µl 0,5 M EDTA (0,02 M) 17,5 g NaCl (0,3 M) mit aqua bidest. ad 1 l	alle Merck, D
1x TEN-Puffer	Gebrauchslösung 1:10 mit aqua bidest. verdünnen	

Tab. 5: Chemikalien und Lösungen zur DNA-Extraktion

20% SDS	20 g SDS (Natriumdodecylsulfat) in 100 ml H <sub>2</sub> O lösen	Merck, D
Proteinase-K-Lösung	Je Probe 2 mg Proteinase K in 100 µl 1x TEN-Puffer lösen	Boehringer, D
Phenollösung	Phenol/Chloroform/Wasser Fertiglösung	Perkin Elmer, Inc., USA
Chloroform-Lösung	Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 49:1 (v/v) mischen	Merck, D
Natriumacetat	40,8 g CH <sub>3</sub> COONa (3 M) ad 100 ml mit aqua bidest., mit Eisessig auf pH 5,5 einstellen	Merck, D
TE-Puffer	121 mg Tris-HCl (1 mM) 200 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 (1 mM) ad 100 ml mit aqua bidest.	alle Merck, D

Tab. 6: Chemikalien, Primer und Geräte für die PCR

10*-Puffer		GeneCraft Biotherm, D
dNTP	je 250 µl 100 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP mit 11,5 ml aqua bidest. zu 12,5 mM Gebrauchslösung gemischt	GeneCraft Biotherm, D
Magnesium	50 mmol/l	GeneCraft Biotherm, D
Taq-Polymerase	5 U/µl	GeneCraft Biotherm, D
3A4 P-f01	5'-GGG CAA TGC AGC AAG ACT-3'	Tib-Molbiol, D
Vorwärtsprimer		
3A4 P-r01	5'-TGG GGT CAA CAC AGG ACA A-3'	Tib-Molbiol, D
Rückwärtsprimer		
3A4-MWG 3	5'-GTG CAT GGA GCT TTC CTG-3'	MWG Biotech AG, D
Rückwärtsprimer		
3A4-MWG 2N	5'-ATC ATT GCT GGC TGA GGT G-3'	MWG Biotech AG, D
Vorwärtsprimer		

Tab. 7: Chemikalien für die Gelelektrophorese

Agarosegel	1,0% Ultrapure	Invitrogen GmbH, D
10xTBE-Puffer	0,9 mol Tris-Puffer 0,9 mol Borsäure 25 mmol EDTA ad 1 l mit aqua bidest.	alle Merck, D
1xTBE-Puffer	Gebrauchslösung, 1:10 mit aqua bidest.	
Ethidiumbromid	10 mg/ml Stammlösung,	Sigma-Aldrich Co, USA
Laufpuffer	Stammlösung: 0,25% Bromphenolblau	Merck, D
	15% Ficoll Typ 400 in 100 ml 1xTBE-Puffer Gebrauchslösung: 15% Ficoll in 80 ml 1xTBE-Puffer lösen, 2-3 ml Stammlösung zugeben , mit aqua bidest auf 100 ml auffüllen in 2-ml-Portionen verwenden	Ficoll, S
Marker 100 bp DNA ladder		MBI Fermentas, LT

Tab. 8: Chemikalien für die Sequenzierreaktion

3A4 MWG3-800	5'- GTG CAT GGA GCT TTC CGT-3'	MWG Biotech AG, D
Rückwärtsprimer		
3A4 MWG2N-800	5'- ATC ATT GCT GGC TGA GGT-3'	MWG Biotech AG, D
Vorwärtsprimer		
3A4 P seq f01-800	5'-GGG CAA TGC AGC AAG ACT-3'	Tib-Molbiol, D
Vorwärtsprimer		
3A4 P seq r01-800	5'-TGG GGT CAA CAC AGG ACA A-3'	Tib-Molbiol, D
Rückwärtsprimer		
ddNTPs	thermo sequencease fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP RPN2538	Amersham Pharmacia Biotech, UK

Tab. 9: : Chemikalien für die Sequenzierung

RapidGel XL Sol 40%		USB, USA
Harnstoff		Merck, D
10x TBE Long Run	107,8 g Tris-Puffer 55,0 g Borsäure 7,4 g EDTA ad 1 l mit aqua bidest.	alle Merck, D
1xTBE-Puffer	Gebrauchslösung 10xTBE 1:10 mit aqua bidest. vermischen.	
TEMED loading dye	N, N, N',N' -Tetramethylethyldiamin	Bio-Rad Laboratories, USA Amersham PharmaciaBiotech, UK
APS 10%	Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Co, USA

Tab. 10: Chemikalien für die Restriktionsenzymängenbestimmung

10x PCR-Puffer Biotherm		GeneCraft, D
dNTP-Set		GeneCraft, D
3A4 v1 F3'C24 Vorwärtsprimer	5' - AGG ACA GCC ATA GAG ACA AGG CCA-3'	Tib-Molbiol, D
3A4 v1 R3'-4g' Rückwärtsprimer	5'-AAT CAC ACA CAC ACC ACT CAC GGA C-3'	Tib-Molbiol, D
3A4 m2 F01 Vorwärtsprimer	5' - GCA GCA CAA ATT GAT ACT-3'	Tib-Molbiol, D
3A4 m2 R01 Rückwärtsprimer	5' - CCT TTG AGT TCA TAT TCT AT-3'	Tib-Molbiol, D
Taq-Polymerase Biotherm	5 U/µl	GeneCraft, D
10% DMSO	Dimethylsulfoxid	Merck,, D
Mg-Puffer 10x	50 mM Mg <sup>2+</sup> in aqua bidest	GeneCraft, D Fermentas, LT
Restriktionsendonukleasepuffer O <sup>+</sup>		
Bme 1390 I		Fermentas, LT
10x Restriktionsendo- nukleasepuffer NEB 2		New England Biolabs, CD
BsT N I		New England Biolabs, CD
PCR-Laufpuffer	0,25% Bromphenolblau 15,0% Ficoll 400 in 1xTBE-Puffer	Merck, D Ficoll, S
Agarosegel	2,0% für CYP3A4*1F 2,5% für CYP3A4*1B Qualex Gold®	Qualex Gold ThermoHybaid/Ashford, UK
Marker	0,1 µg/µl pBs-Hpa II-ladder	Rapidozym, D

Tab. 11: Chemikalien für die Bisulfitbehandlung

CT Konversionsreagens		alle Zymo Research, USA
M-Dilutionspuffer		
M-Bindungspuffer		
M-Waschpuffer		
M-Desulfonierungspuffer		
M-Elutionspuffer		
Reaktionsgefäße		

Tab. 12: Amplifizierung der bisulfonierten DNA mittels *nested*-PCR

10*-Puffer		GeneCraft Biotherm, D
DMSO	100%	GeneCraft Biotherm, D
BSA	1 mg/ml	GeneCraft Biotherm, D
dNTP	je 250 µl 100 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP mit 11,5 ml aqua bidest. zu 12,5 mM Gebrauchslösung gemischt	GeneCraft Biotherm, D
3A4 M02	5'- GCA GCA CAA ATT GAT ACT-3'	Tib-Molbiol, D
1. Vorwärtsprimer		
3A4 R02 mb	5'- CCT TTG AGT TCA TAT TCT AT-3'	Tib-Molbiol, D
1. Rückwärtsprimer		
3A4 CP_101	5'-GAAAGTTAGAAGGGATGATATGT	Tib-Molbiol, D
2. Vorwärtsprimer	AGAG-3'	
3A4 CP_201	5'-TCACCTCTCTCTTACCCTTATCTC-3'	Tib-Molbiol, D
2. Rückwärtsprimer		
Taq-Polymerase	5 U/l	GeneCraft Biotherm, D
Mg <sup>2+</sup>	50 mmol/l	GeneCraft Biotherm, D

Tab. 13: Verdau nach Bisulfitbehandlung

10x Restriktionsendonukleasepuffer O <sup>+</sup>		Fermentas, LT
Bme 1390 I		Fermentas, LT
10x Restriktionsendonukleasepuffer NEB 2		New England Biolabs, CD
Rsa I		New England Biolabs, CD
PCR-Laufpuffer	0,25% Bromphenolblau	Merck, D
	15,0% Ficoll 400 in 1xTBE-Puffer	Ficoll, Upsala, Schweden
Agarosegel	2,0%	Qualex Gold
Marker	0,1 µg/µl pBs-Hpa II-ladder	ThermoHybaid/Ashford, UK

Tab. 14: Sequenzierung der bisulfonierten DNA

Tris-HCl	800 mmol/l, pH: 8,8	Sigma-Aldrich Co, USA
Mg <sup>2+</sup>	50 mmol/l	GeneCraft Biotherm, D
3A4 CP_101	5'-GAAAGTTAGAAGGGATGATATGTAGAG-3'	Tib-Molbiol, D
Vorwärtsprimer		
3A4 CP_201	5'-TCACCTCTCTCTTACCCTTATCTC-3'	Tib-Molbiol, D
Rückwärtsprimer		
Big-Dye		GeneCraft Biotherm, D

### 3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 15: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

Zentrifuge	GS-6R	Beckmann Coulter, USA
Überkopfschüttler	OV3	Biometra, D
Rüttler	VF2	Jahnke&Kunkel, IKA Labortechnik, D
Reaktionsgefäße	Thermofast96	AB Applied Biosystems, USA
Pipetten		Eppendorf, D
Cycler	PCR System 9700	AB Applied Biosystems, USA
Reinigungsplatte	Millipore Multiscreen HV	Millipore GmbH, D
Vakuumpumpe		UniEquip Laborgerätebau, D
Elektrophoresekammer		
Gleichstromgerät	Mikrocomputer electrophoresis power supply 500/500	Renner GmbH, D
Videodokumentationssystem	Eagle Eye II	Stratagene, NL
Filter		Millipore GmbH, D
Achtkanalspritze		Hamilton, USA
Sequencer	LONG READIR 4200	MWG Biotech AG, D
Thermomixer		UniEquip Laborgerätebau, D

### 3.1.3 Computerprogramme

Tab. 16: Verwendete Computerprogramme

Base ImageIR <sup>2</sup>	Version 4	Li-cor, USA
AlignIR	Version 1.1	Li-cor, USA

## 3.2 Methodik

### 3.2.1 Aufbau der klinischen Studie

Die Probandenauswahl und die klinische Studie wurden vom Institut für Klinische Pharmakologie der Charité in Berlin unter der Leitung von PD Dr. med. Jürgen Brockmöller durchgeführt. Für die Serumkonzentrationsbestimmung war Dr. rer. nat. S. Bauer zuständig (8). Die Studie wurde der Ethikkommission der Universitätsmedizin Charité vorgelegt und genehmigt.

Es wurden 104 gesunde, freiwillige Probanden zwischen 18 und 65 Jahren ausgewählt. Vor Studienbeginn wurden ASAT, ALAT,  $\gamma$ GT, AP, Harnstoff, Gesamt-Bilirubin, Kreatinin, Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten- und Leukozytenzahl und bei weiblichen Probanden zusätzlich zum Ausschluss einer Schwangerschaft  $\beta$ -HCG bestimmt. Es mussten keine Probanden aufgrund einer auffälligen körperlichen Untersuchung oder abweichender Laborwerte ausgeschlossen werden. Die Probanden sollten normalgewichtig sein ( $\pm 15\%$  gemäß Brocatabelle), Nichtraucher und einen Blutdruck im Normbereich haben. Um systematische Fehler aufgrund von populationsgenetischen Varianzen zu vermeiden, sollten alle Probanden deutscher Abstammung sein (8). Weitere Ausschlusskriterien waren:

- Bekannte Leber- oder Nierenfunktionsstörungen
- Alkohol- oder Drogenabusus
- Bekanntes Tumorleiden
- Erkrankungen des ZNS
- Bekannte Schwangerschaft
- Asthma bronchiale
- Bekannte Arzneimittelallergie
- Begleitmedikation
- Kardiale Vorschädigung
- Zustand nach gastrointestinalen Operationen mit Ausnahme von Appendektomien

Den Probanden wurde Alprazolam als Substrat von CYP3A4 sowie Rifampicin als bekannter CYP3A4-Induktor (8) nach einem festen Schema verabreicht und zu definierten Zeitpunkten

Blut abgenommen (s. Tab. 17). Die Alprazolamkonzentration wurde mittels HPLC gemessen und daraus die Serumclearance errechnet (121, 95). Außerdem wurden die Blutproben der Voruntersuchung genutzt, um Leukozyten für die anschließenden genetischen Untersuchungen zu gewinnen.

Tab. 17: Ablauf der klinischen Studie

In der Woche vor Studienbeginn		Blutentnahme
		Abholen der Medikation
Tag 1	22.00 Uhr	Einnahme von 1 mg Alprazolam
Tag 2	8.00 Uhr	Blutentnahme
	18.00 Uhr	Blutentnahme
Tag 3	8.00 Uhr	Einnahme von 450 mg Rifampicin
		Einnahme von 450 mg Rifampicin
Tag 4	8.00 Uhr	Einnahme von 450 mg Rifampicin
Tag 5	8.00 Uhr	Blutentnahme
Tag 6	8.00 Uhr	Einnahme von 450 mg Rifampicin
	18.00 Uhr	Einnahme von 450 mg Rifampicin
Tag 7	22.00 Uhr	Blutentnahme
	8.00 Uhr	Einnahme von 1 mg Alprazolam
	18.00 Uhr	Blutentnahme
Tag 21-35 am darauf folgenden Tag	22.00 Uhr	Einnahme von 1 mg Alprazolam
	8.00 Uhr	Blutentnahme
	18.00 Uhr	Blutentnahme

### 3.2.2 Isolierung der DNA

Die DNA wurde aus Leukozyten gewonnen. Dazu wurde das aufgetaute EDTA-Blut (jeweils ca. 5 ml) mit vier Volumeneinheiten eines Erythrozyten-Lyse-Puffers hoher Osmolarität versetzt und 30 min. auf Eis inkubiert, um die kern- und DNA-losen Erythrozyten zu zerstören. Anschließend wurde das Lysat 30 min. bei 4°C und 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellsediment in 1,5 ml 1x TE-Puffer aufgenommen und bis zur DNA-Extraktion bei -20°C eingefroren (s. Tab. 4). Nach der Lyse der Erythrozyten erfolgt die DNA-Isolation aus den Leukozyten (nach 8). Hierfür wurde die aufgetaute Zellsuspension mit je 100



µl 20% SDS-Lösung und 100 µl Proteinase-K-Lösung versetzt und im Überkopfschüttler mit 40 rpm über Nacht bei Raumtemperatur verdaut.

Die DNA-Isolation erfolgte in zwei Teilschritten: Im ersten wurde der Verdau in einem 12-ml-Reaktionsgefäß 4 h mit der gleichen Menge Phenollösung (pH: 8,0) im Rotationsmischer bei 30 rpm extrahiert. Im Anschluss erfolgte die Phasentrennung durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 3000 rpm. Die DNA konzentrierte sich dadurch in der oberen wässrigen Phase und wurde anschließend in ein neues Gefäß überführt. Die enthaltenen Lipidbestandteile wurden in einem zweiten Extraktionsschritt 1 h mit einem Volumen Chloroformlösung bei 30 rpm im Überkopfschüttler ausgewaschen. Nach erneuter Phasentrennung und fünfminütigem Zentrifugieren bei 3000 rpm wurde wieder die obere wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt.

Es wurden nun 100 µl 3 M Natriumacetat (pH: 5,5) sowie 2 Volumina 96%iges Ethanol dazugegeben und kräftig geschüttelt. Durch zehnteiliges Zentrifugieren bei 3000 rpm wurde die DNA ausgefällt. Nach vorsichtigem Dekantieren des wässrigen Überstandes wurde die DNA mit je 3 µl 70% Ethanol durch kräftiges Schütteln gewaschen und durch abermaliges zehnteiliges Zentrifugieren bei 3000 rpm sedimentiert.

Der wässrige Überstand wurde dekantiert und zum Trocknen 10 min. vorsichtig kopfüber auf Filterpapier gestellt. Je 600 µl TE-Puffer wurden der DNA zugesetzt und die Gefäße zum Lösen der DNA bei 55 °C über Nacht schüttelnd bei 40 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde die DNA in sterile, beschriftete Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C aufbewahrt (s. Tab. 5).

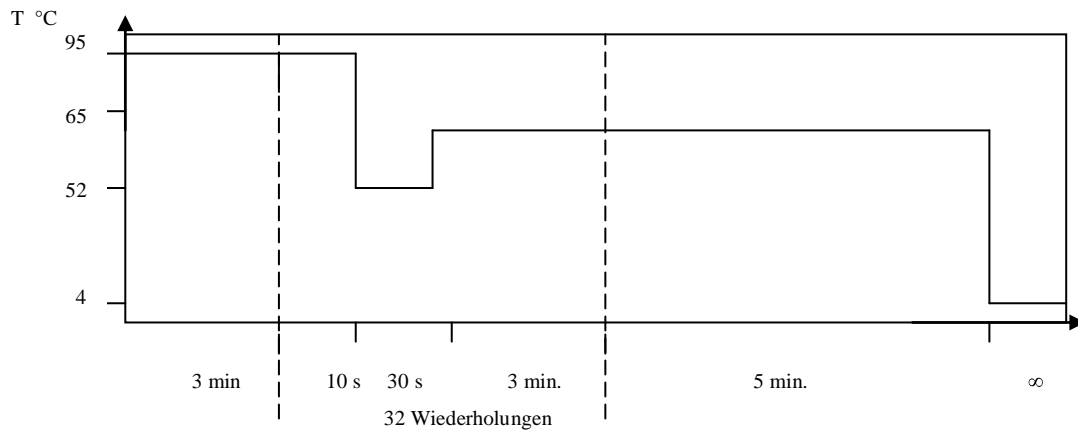
### **3.2.3 Sequenzanalyse**

#### *3.2.3.1 Amplifizierung der DNA mittels PCR*

Zur Amplifikation der DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion angewandt (75). Für jede PCR wurden eine Leerprobe und ein Mastermix ohne DNA mitgeführt, um mögliche Verunreinigungen der Chemikalien durch fremde DNA, die nicht von den Probanden stammte,



Inkubationsprofil des Cyclers:



### 3.2.3.2 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Abtrennung von Enzymen, überschüssigen Primern und Nukleotiden wurden die PCR-Produkte anschließend gereinigt. Dazu wurden Millipore-Multiscreen-PCR-Platten entsprechend den Empfehlungen des Herstellers verwendet (s. Tab. 15).

### 3.2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Reinheitskontrolle und zur semiquantitativen Konzentrationsbestimmung erfolgte eine Gelelektrophorese in horizontalen Gelkammern. Die Gelmatrix bestand aus einprozentigem Agarosegel in 1xTBE-Puffer. Zur Visualisierung der PCR-Produkte wurde 0,01% Ethidiumbromidlösung zugesetzt. 10 µl der Reaktionsprodukte wurden mit Laufpuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Anschließend wurden 100 V Gleichstrom angelegt. Die Laufzeit betrug 30 min.. Die Dokumentation erfolgte mit dem Videodokumentationssystem. Zur Bestimmung der Produktgröße diente ein 100-bp-Marker (s. Tab. 7).

#### 3.2.3.4 Sequenzierreaktion

Anwendung fand ein sogenanntes *Cycle-sequencing*-Verfahren. Hierbei handelt es sich um eine PCR, zu der zusätzlich zu den Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) noch Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) als sog. Terminatoren zugesetzt werden. Diese werden an beliebiger Stelle zufällig in den DNA-Strang eingebaut und führen zu einer Beendigung der Kettenreaktion. Die Konzentration von dNTPs und ddNTPs wird so gewählt, dass der Einbau eines ddNTPs anstelle eines dNTPs an jeder beliebigen Position der zu sequenzierenden DNA möglich ist. Dadurch findet der Kettenabbruch mit konstanter Wahrscheinlichkeit statt, es liegen also in etwa gleich viele Fragmente jeder Länge vor. Um zu erkennen, welche Base am Ende des Fragments ist, werden vier Reaktionen parallel unter Zusatz der vier entsprechenden ddNTPs durchgeführt. Trennt man die Reaktionsprodukte nun parallel mit einem Gel entsprechender Trennschärfe auf, ergibt sich die Sequenz des DNA-Stranges. Um Lesefehler zu minimieren, führt man die Reaktion sowohl für den Vorwärts- als auch für den Rückwärtsstrang durch. Bei diesem Verfahren trägt der Primer eine 5'-Infrarot-Farbstoff-Markierung, die durch den Laser des LI-COR-DNA-Sequencer (Modell 4200 von MWG Biotech) erkannt wird. Die Synthese der DNA-Stränge erfolgt wie bei der PCR durch wiederholte Zyklen von Denaturierung, Annealing und Extension/Terminierung. Der markierte Primer kann also mehrfach an das PCR-Produkt binden, wodurch einerseits nur eine geringe Menge DNA benötigt wird und sich andererseits der Anteil an markierten Banden/DNA-Fragmenten erhöht.

Es wurden Mastermixe aus markierten Primern und Aq. bidest. hergestellt. Da die DNA aus vier verschiedenen Basen besteht, wurden pro Probe jeweils vier Ansätze für die Hin- und vier Ansätze für die Rückreaktion hergestellt. Die Reaktionsgefäße wurden verschlossen und der Ansatz im Cycler zur Reaktion gebracht. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Ansätze herunterzentrifugiert und im Kühlschrank bei 4°C bis zur Sequenzierung gelagert (s. Tab. 8).

Verwendete Mastermixe:

- Promoter Vorwärtsreaktion:

MWG2N-800	2,0 µl	aqua bidest	8,0 µl
-----------	--------	-------------	--------

- Promoter Rückwärtsreaktion:

MWG3-800	2,0 µl	aqua bidest.	8,0 µl
----------	--------	--------------	--------

- Enhancer Vorwärtsreaktion:

3A4 P seq f01-800	2,0 µl	aqua bidest.	8,0 µl
-------------------	--------	--------------	--------

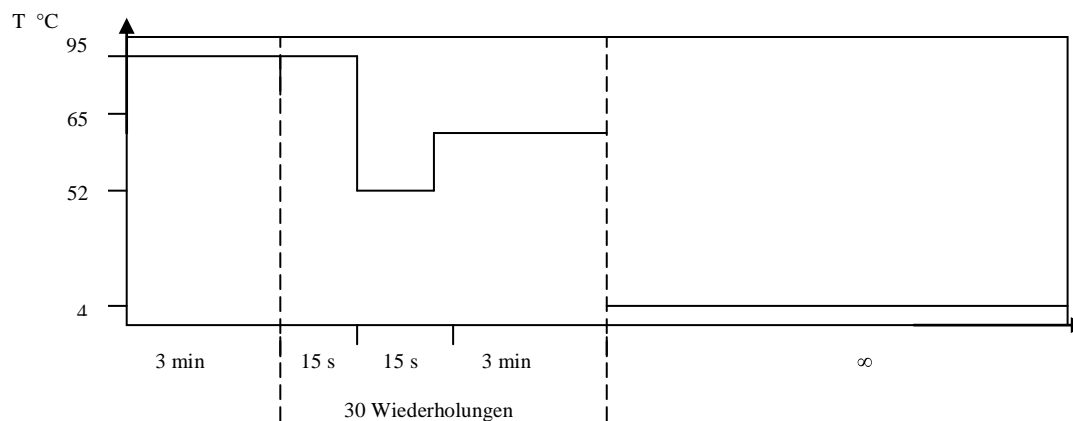
- Enhancer Rückwärtsreaktion:

3A4 P seq r01-800	2,0 µl	aqua bidest.	8,0 µl
-------------------	--------	--------------	--------

Pipettierschema für die Sequenzierreaktionen:

- Mastermix 10,0 µl
- Seq-Kit 4,0 µl
- DNA-Probe 12,0 µl

Inkubationsprofil des Cyclers:



### 3.2.3.5 Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde der Sequencer der Fa. Licor mit einem 55 cm langen und 4 mm dicken Gel verwendet. Die Reinigung und Handhabung des Sequencers erfolgten nach den Empfehlungen des Herstellers (s. Tab. 9).

Ansetzen des Gels:

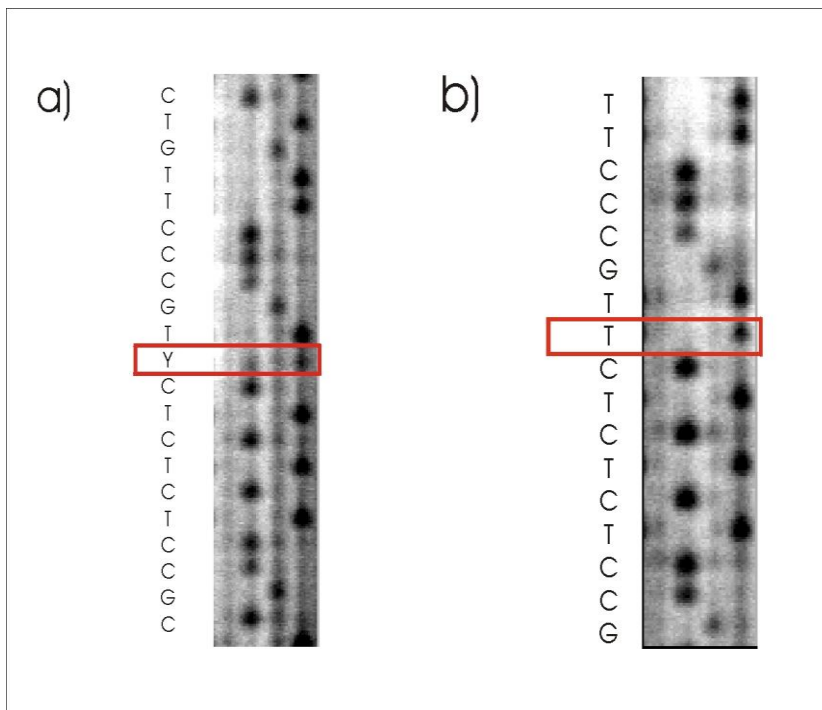
- Urea 210 g
- Aqua bidest. 30 ml
- 10x TBE Puffer 5,0 ml
- APS 350 µl
- TEMED 75 µl

Nach Auftragen des Gels und Montage der Gelplatten wurden die Proben zusammen mit je 5 µl *loading dye* mittels einer Hamilton Achtkanalspritze in die Taschen des Gels pipettiert.

### 3.2.3.6 Nachweis des Polymorphismus CYP3A4\*1B mittels Sequenzierung

Es wurde ein Gelbild mit einer Sequenzlänge von durchschnittlich 1130 Basen ermittelt. Der Polymorphismus \*1B lag dabei im Vorwärtsstrang in einer Entfernung von 320 Basen vom Primer, im Rückwärtsstrang in einer Entfernung von 810 Basen. Abb. 3 stellt den Nachweis der heterozygoten Variante \*1A/\*1B und der homozygoten Variante \*1A/\*1A dar.

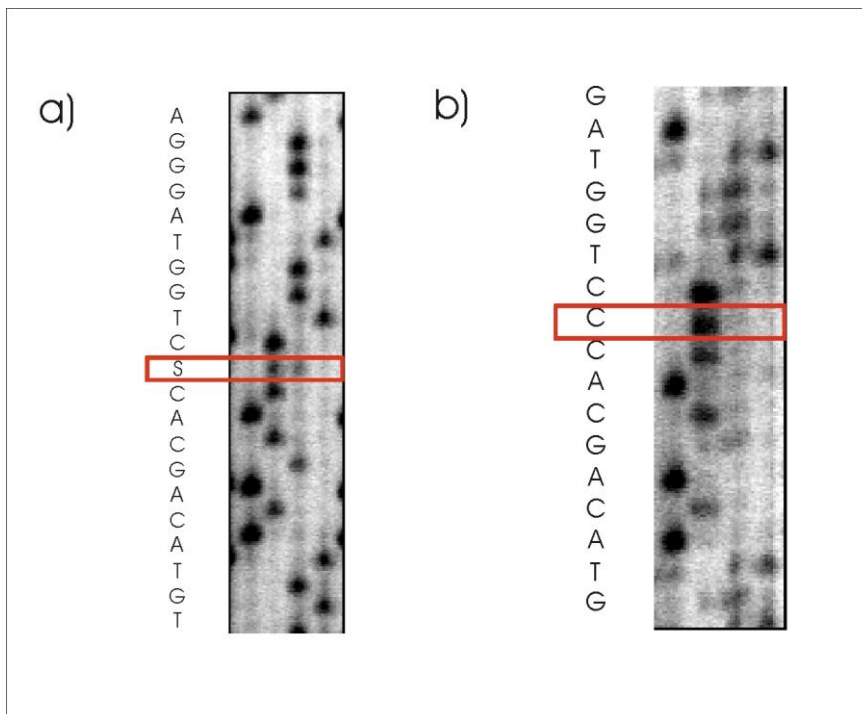
Abb.3: a) Heterozygot CYP3A4\*1A/\*1B; b) Homozygot CYP3A4\*1A/\*1A



### 3.2.3.7 Nachweis des Polymorphismus CYP3A4\*1F mittels Sequenzierung

Es wurde ein Gelbild mit einer Sequenzlänge von durchschnittlich 1130 Basen ermittelt. Der Polymorphismus \*1F lag dabei im Vorwärtsstrang in einer Entfernung von 680 Basen vom Primer, im Rückwärtsstrang in einer Entfernung von 450 Basen. Abb. 4 stellt den Nachweis der heterozygoten Variante \*1A/\*1F und der homozygoten Variante \*1A/\*1A dar.

Abb. 4: a) Heterozygot CYP3A4\*1A/\*1F b) Homozygot CYP3A4\*1A/ CYP3A4\*1A



### 3.2.3.8 Computerauswertung und Alignment

Zur Aufzeichnung der Daten wurde die Software des Herstellers BaseImageIR Version 4.1 verwendet. Für das Alignment wurde AlignIR Version 1.1 von Li-Cor eingesetzt.



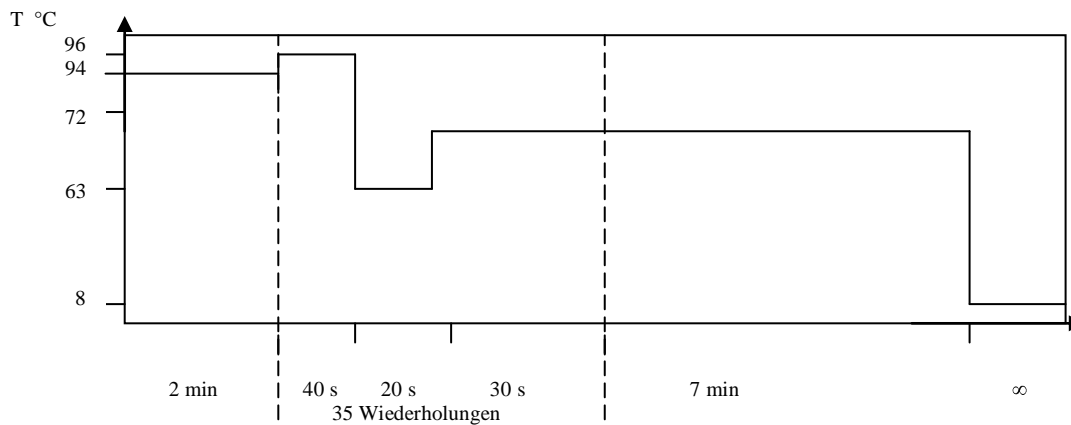
## 3.2.3.9 RFLP

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus der Sequenzierung wurden alle Proben anschließend einer Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Untersuchung (RFLP) unterzogen. Die Fragmente wurden mit dem Videodokumentationssystem nachgewiesen (s. Tab. 10)

Mastermix für die PCR für CYP3A4\*1B, je Ansatz:

- 10\*-Puffer 2,0 µl
- dNTPs 2,0 µl
- 3A4 v1 F3´C24 0,5 µl
- 3A4 v1 R3´-4g 0,5 µl
- taq-Polymerase 0,15 µl
- DMSO 2,0 µl
- MG-Puffer 1,2 µl
- DNA-Probe 2,0 µl
- aqua bidest. 9,65 µl

Inkubationsprofil des Cyclers:



Pipettierschema des Verdaus, je Ansatz:

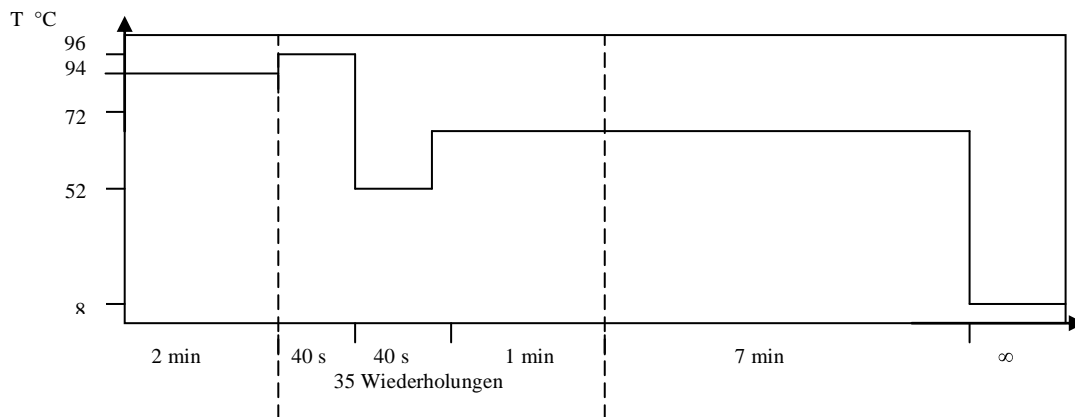
- 10\* O<sup>+</sup>-Puffer 3,0 µl
- Bme 1390 I 1,0 µl
- PCR-Produkt 20,0 µl
- aqua bidest. 6,0 µl

Die Detektion erfolgte nach Zugabe von 10 µl PCR-Laufpuffer auf einem 2,5%-tigen Agarosegel nach 45 min. Auftrennung bei 120 V. Als Längenstandard diente die pBs-Hpa II-ladder. Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 237 bp. CYP3A4\*1A wurde in Fragmente von 190 bp und 47 bp geschnitten. CYP3A4\*1B wies Fragmente der Länge 181 bp, 47 bp und 9 bp auf

Pipettierschema für die PCR für CYP3A4\*1F, je Ansatz:

- 10\*-Puffer 2,0 µl
- dNTPs 2,0 µl
- 3A4 m2 F01 0,5 µl
- 3A4 m2 R01 0,5 µl
- taq-Polymerase 0,2 µl
- Mg-Puffer 0,8 µl
- DNA-Probe 2,0 µl
- aqua bidest. 12,5 µl

Inkubationsprofil des Cyclers:



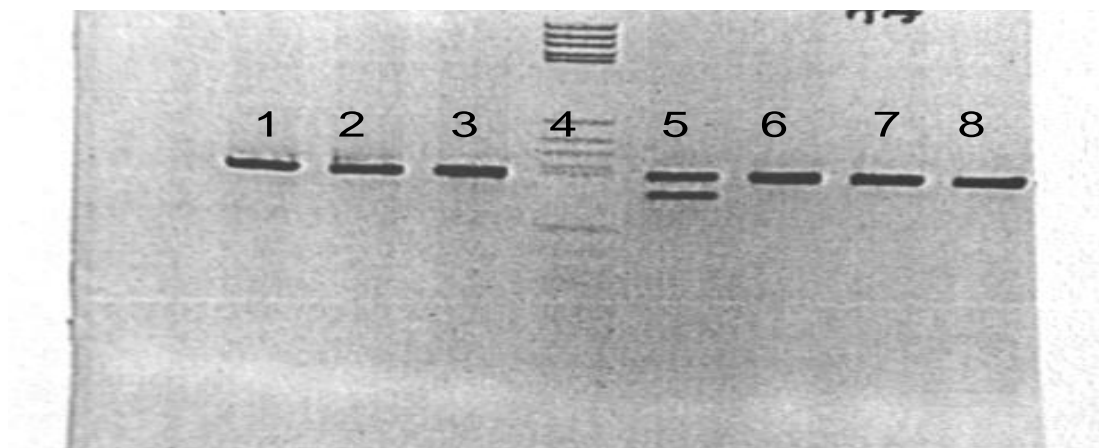
Pipettierschema des Verdaus, je Ansatz:

- 10\* NEB-Puffer 3,0 µl
- BsT N I 0,8 µl
- PCR-Produkt 20,0 µl
- aqua bidest. 6,2 µl

Die Detektion erfolgte nach Zugabe von 10 µl PCR-Laufpuffer auf einem 2,0%-tigen Agarosegel nach 45 min. bei 120 V. Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 753 bp. Das Wildtypallel CYP3A4\*1A wurde in Fragmente folgender Längen zerschnitten: 267 bp, 218 bp, 147 bp, 121 bp. Die Variante CYP3A4\*1F wies folgende Fragmentlängen auf: 414 bp, 218 bp und 212 bp.

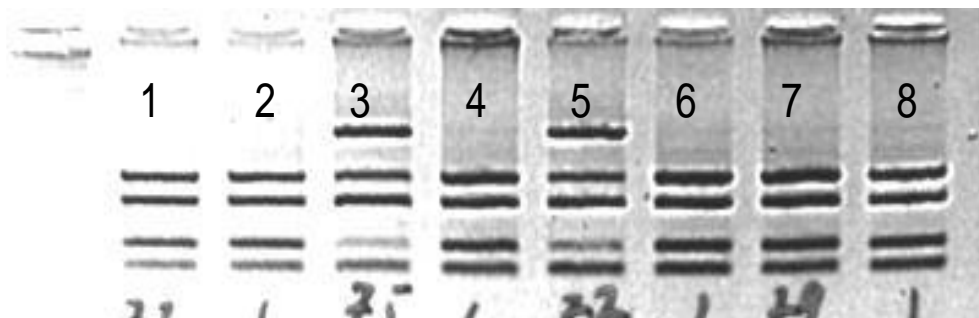
#### 3.2.3.10 Nachweis des Polymorphismus CYP3A4\*1B mittels RFLP

Abb. 5: Verdau von CYP3A4\*1B mit Bme 1390 I. Das Wildtypallel wurde in Fragmente von 190 bp und 47 bp geschnitten. Die Variante CYP3A4\*1B wies Fragmente der Länge 181 bp, 47 bp und 9 bp auf. In Reihe 4 der Marker, in Reihe 5 der Polymorphismus CYP3A4\*1A/\*1B, sonst Wildtyp.



### 3.2.3.11 Nachweis des Polymorphismus CYP3A4\*1F mittels RFLP

Abb. 6: Verdau von CYP3A4\*1F mit BsT N I. Das Wildtypallel CYP3A4\*1A wurde in Fragmente folgender Längen zerschnitten: 267 bp, 218 bp, 147 bp, 121 bp. Die Variante CYP3A4\*1F wies folgende Fragmentlängen auf: 414 bp, 218 bp und 212 bp. In den Reihen 3 und 5 der Polymorphismus CYP3A4\*1A/\*1F, sonst Wildtyp.

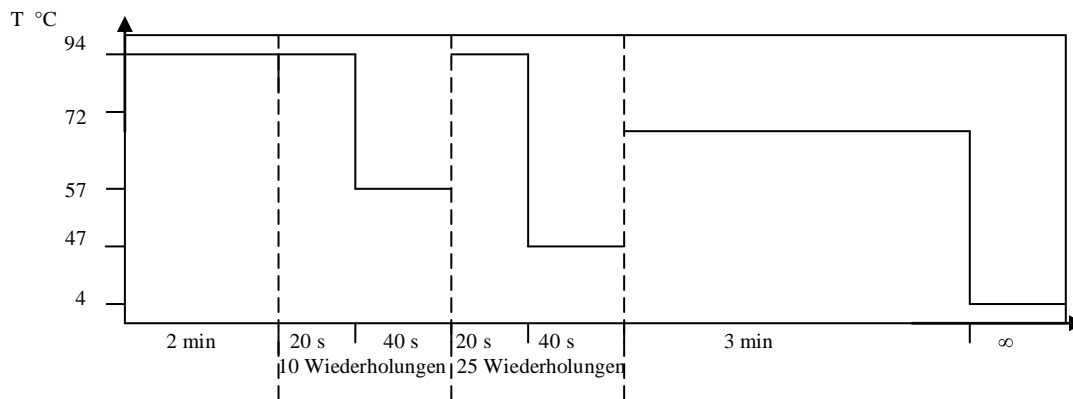


### 3.2.4 Epigenetische Analyse

Um die Entstehung einer neuen Methylierungsposition durch den Polymorphismus CYP3A4\*1F zu überprüfen, wurde die DNA der entsprechenden Probanden anschließend einer Bisulfitbehandlung unterzogen. Hierbei handelt es sich um eine Reaktion, die nicht methylierte Cytosinbasen der DNA aufgrund der katalytischen Wirkung von Bisulfit ( $\text{HSO}_3$ ) durch Desaminierung in Uracil umwandelt. Dieses wird bei der darauf folgenden PCR von der Polymerase wie Thymin behandelt. Methylierte Cytosinbasen werden durch diese Reaktion nicht modifiziert. Da in der menschlichen DNA ca. 2 bis 7% der Cytosinbasen methyliert sind, kommt es zu einer starken Anreicherung von Thymin und Verarmung von Cytosin in der so modifizierten DNA. Dadurch können Methylcytosin und Cytosin bei der anschließenden Sequenzierung durch Vergleich mit der ursprünglichen Sequenz unterschieden werden.



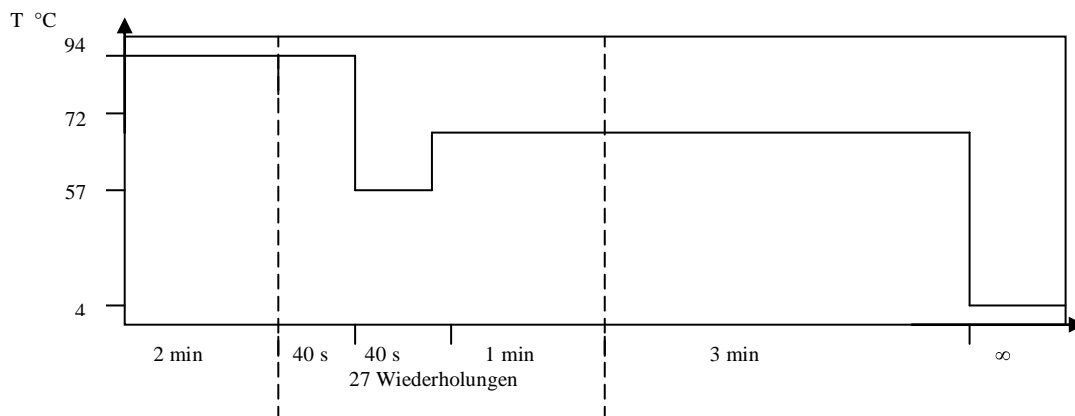
Inkubationsprofil des Cyclers:



2.) Mastermix für die Polymerase-Kettenreaktion:

- 10\* 4,00 µl
- dNTP 1,00 µl
- 3A4 CP\_101 0,50 µl
- 3A4 CP\_201 0,50 µl
- taq-Polymerase 0,20 µl
- Mg-Puffer 1,20 µl
- Aqua bidest. 30,60 µ

Inkubationsprofil des Cyclers:



### 3.2.4.3 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit dem AbiPrism-Sequencer der Firma ABI. Dieser Sequencer arbeitet ähnlich wie der Licor-Sequencer mit markierten Terminatoren, die die Sequenzierreaktion unterbrechen. Die fluoreszierenden Terminatoren ermöglichen die Detektion mit einem Lasersystem. Im Gegensatz zur Licor-Technologie finden jedoch die Reaktionen für die vier verschiedenen Basen zeitgleich statt, sie werden aufgrund des unterschiedlichen Absorptionsspektrums der Terminatoren differenziert. Das anschließende automatische Allignment wurde manuell kontrolliert. Die DNA-Proben aus der vorherigen PCR wurden zuerst mit jeweils einem Primer und den Terminatoren amplifiziert und dann in den Sequencer nach den Vorschriften des Herstellers geladen (s. Tab. 16).

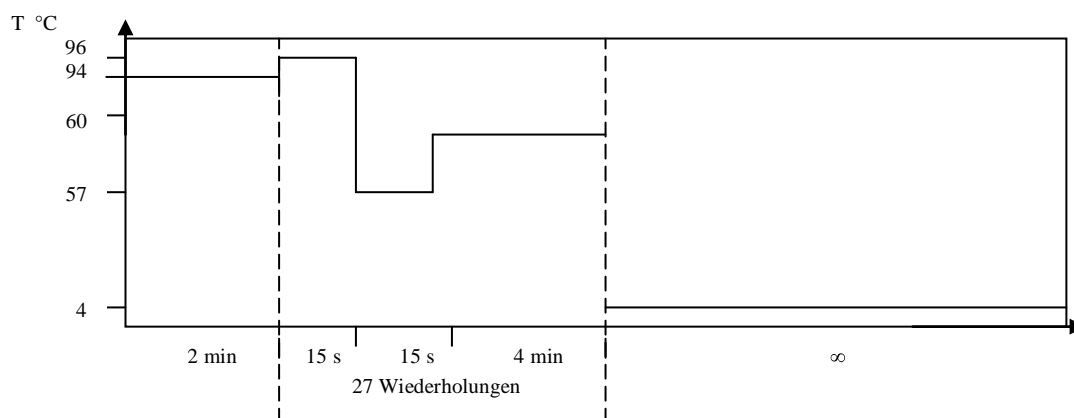
Ansatz für Sequenzier-PCR 1:

- 3A4 CP\_101                    1,0 µl
- Big-Dye                         5,5 µl
- Aqua bidest.                   5,5 µl

Ansatz für Sequenzier-PCR 2:

- 3A4 CP\_201                    1,0 µl
- Big-Dye                         5,5 µl
- Aqua bidest.                   5,5 µl

Inkubationsprofil des Cyclers:



Das Methylierungsmuster unterscheidet sich von Zelltyp zu Zelltyp. Weil die bei dieser Studie verwendete DNA aus Leukozyten stammt, ist ein von diesen Zellen verschiedenes Methylierungsmuster in Leberzellen, als dem hauptsächlichen Expressionsort von CYP3A4, nicht ausgeschlossen. Daher wurde zusätzlich zur DNA der Merkmalsträger CYP3A4\*1A/\*1F aus der vorliegenden Studie auch DNA aus der Leberbank des Instituts für Klinische Pharmakologie der Charité mit dem gleichen Polymorphismus sequenziert. Auch diese Proben stammten alle von heterozygoten Individuen.

#### 3.2.4.4 RFLP der bisulfontierten DNA

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus der Sequenzierung wurden die Proben einer RFLP unterzogen. Dabei wurden die Restriktionsenzyme so gewählt, dass sie in Anwesenheit der Mutation ein anderes Verhalten aufwiesen als beim Wildtyp. Die Fragmente wurden mit dem Videodokumentationssystem nachgewiesen (Chemikalien: s. Tab. 13).

Pipettierschema des Verdaus, je Ansatz:

- NEB 1                      3,0 µl
- Rsa I                        0,5 µl
- PCR-Produkt              10,0 µl
- Aqua bidest.              3,0 µl

Inkubationsprogramm des Cyclers:





Die Detektion erfolgte nach Zugabe von 10 µl PCR-Laufpuffer auf einem 2,5%-igen Agarosegel nach 45 min. Auftrennung bei 120 V. Als Längenstandard diente die pBs-Hpa II-ladder.

#### 3.2.4.5 Methylierungsreaktion

Die DNA der elf Merkmalsträger des Polymorphismus CYP3A4\*1A/\*1F wurde mittels Bisulfonierung auf den Methylierungsgrad untersucht. Da das Methylierungsmuster zelltypabhängig ist, wurden zusätzlich sieben Proben aus der Leberbank des Instituts für Klinische Pharmakologie, die den gleichen Polymorphismus aufwiesen, untersucht. Diese stammten aus Lebern, die aus diversen Gründen nicht transplantiert werden konnten. Es zeigte sich bei allen untersuchten Proben eine vollständige Methylierung im Bereich des Polymorphismus.

Prinzipiell kann es in der Umgebung des Polymorphismus CYP3A4\*1F bei heterozygoten Merkmalsträgern drei verschiedene Sequenzen geben:

- Die Wildtypsequenz CYP3A4\*1A. Diese ist bei erfolgreicher Methylierungsreaktion im Umfeld des Polymorphismus immer methyliert. Da kein CpG in dieser Sequenz vorhanden ist, sind Unterschiede im Methylierungsmuster ausgeschlossen. In 3'→5'Richtung ergibt dies die Sequenz CAAAATA.
- Der unmethylierte Polymorphismus CYP3A4\*1F. Dieser hat in Leserichtung 3'→5'die Sequenz CAACATA.
- Der methylierte Polymorphismus CYP3A4\*1F. Dieser hat in Leserichtung 3'→5'die Sequenz CAACGTA.

Abb. 7: Bisulfonierte homozygote Probe CYP3A4\*1A/\*1A. Durch die Bisulfonierung wurde nichtmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, das im Verlauf der PCR als Thymin abgelesen wurde. Da hier der Rückwärtsstrang dargestellt ist, stellt sich der „Kehrwert“ der Sequenz dar, also eine geringe Menge Guanin und eine Vermehrung von Adenosin.

A T C C C T A C C A A A A T A C T A T A C A C A

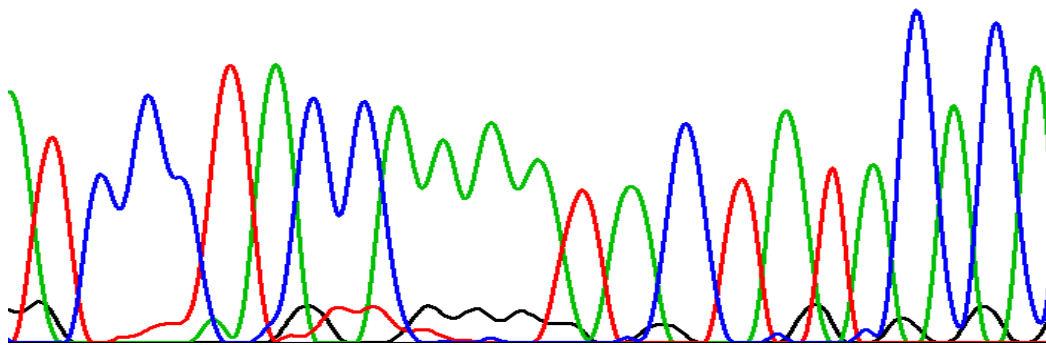


Abb. 8: Bisulfonierte heterozygote Probe CYP3A4\*1A/\*1F. Die Sequenz des Allels CYP3A4\*1F ist in a.) dargestellt; b.) würde einer nichtmethylierten bisulfonierten Sequenz entsprechen und c.) der methylierten bisulfonierten Sequenz. Es lässt sich erkennen, dass CYP3A4\*1F methyliert ist.

A T C C C T A C C A A A A T A C T A T A C A C A

	390	C	A	A	C	G	T	A	C	T	400
a.)		C	A	A	C	G	T	A	C	T	
b.)		C	A	A	C	A	T	A	C	T	
c.)		C	A	A	C	G	T	A	C	T	

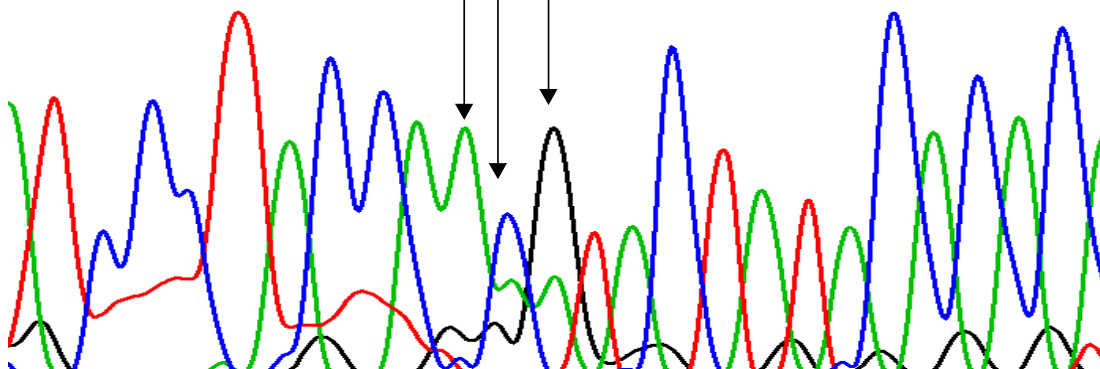
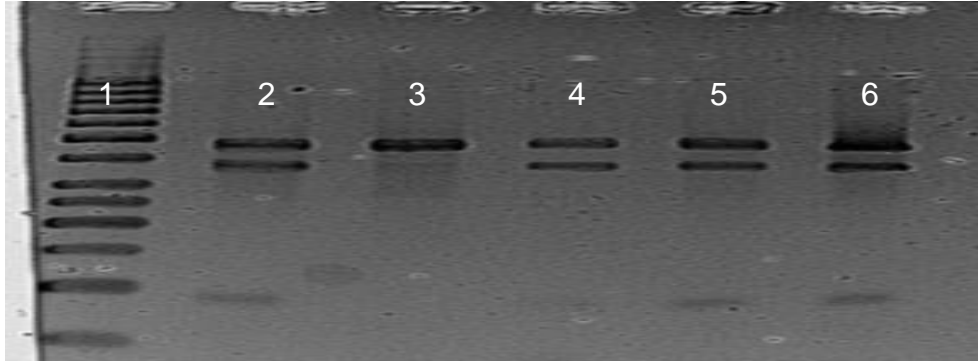


Abb. 9: Gelelektrophorese der RFLP der bisulfonierten DNA-Proben. In Reihe 2, 4, 5 und 6 CYP3A4\*1A/\*1F methylierte Proben, in Reihe 3 CYP3A4\*1A/\*1F eine unmethylierte Kontrolle, in Reihe 1 der Marker.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Probandenkollektiv

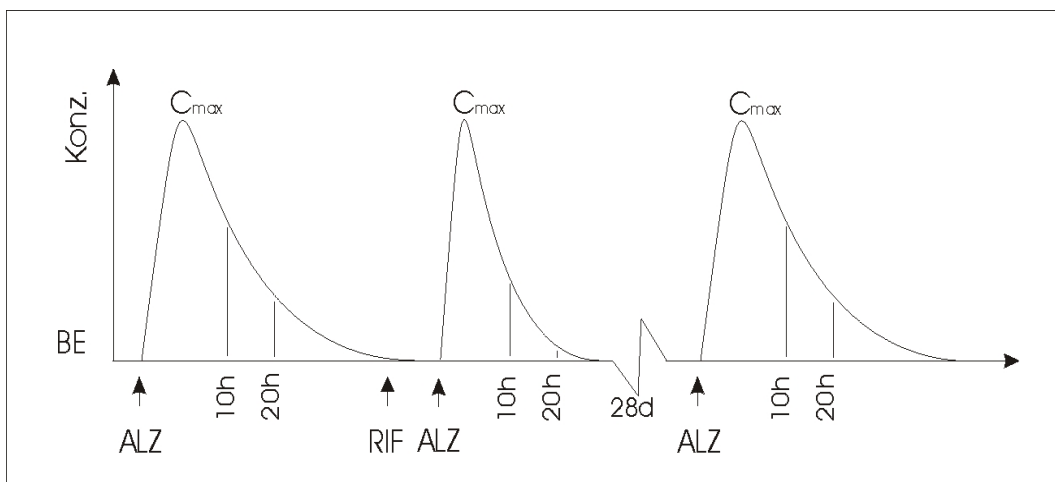
An der vorliegenden Studie nahmen 104 Probanden teil, davon waren 35 weiblich und 68 männlich. Ein Proband brach die Studie ohne Angabe näherer Gründe ab.

Tab. 18: Statistische Daten der Versuchsteilnehmer; angegeben sind arithmetisches Mittel (MW), Standardabweichung (SD), Maximal- (Max) und Minimalwert (Min).

	MW	SD	Max	Min
Alter [J]	27,7	7,3	64,0	19,0
Körperoberfläche [m <sup>2</sup> ]	22,6	2,6	29,5	17,8
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	22,6	2,6	29,5	17,8
ASAT [U/l]	6,0	11,3	29,0	0,2
ALAT [U/l]	12,40	5,81	29,00	4,00
γGT [U/l]	8,47	3,66	24,00	1,00
AP [U/l]	94	22	160	46
Bilirubin [mg/dl]	0,84	0,48	2,80	0,20

### 4.2 Alprazolamkonzentrationen im Plasma

Abb. 10: Schema der Blutentnahmen. BE: Blutentnahme. ALZ: Gabe von Alprazolam. RIF: Gabe von Rifampicin.



In Tab. 19 sind die Mittelwerte, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient der Plasmakonzentrationen für alle Messzeitpunkte dargestellt.

Tab. 19: Alprazolamkonzentration im Plasma zu verschiedenen Messzeitpunkten. Statistische Auswertung von 103 Versuchsteilnehmern.

Messzeitpunkt	Mittelwert [ng/ml]	Standardabweichung [ng/ml]	Variations- koeffizient
Basalwert (10 h)	8,4	1,9	22,5
Basalwert (20 h)	4,9	1,6	32,4
Induktionswert (10 h)	1,8	0,9	51,0
Induktionswert (20 h)	0,7	0,5	66,4
Kontrollwert (10 h)	7,8	1,8	23,5
Kontrollwert (20 h)	4,5	1,5	33,0

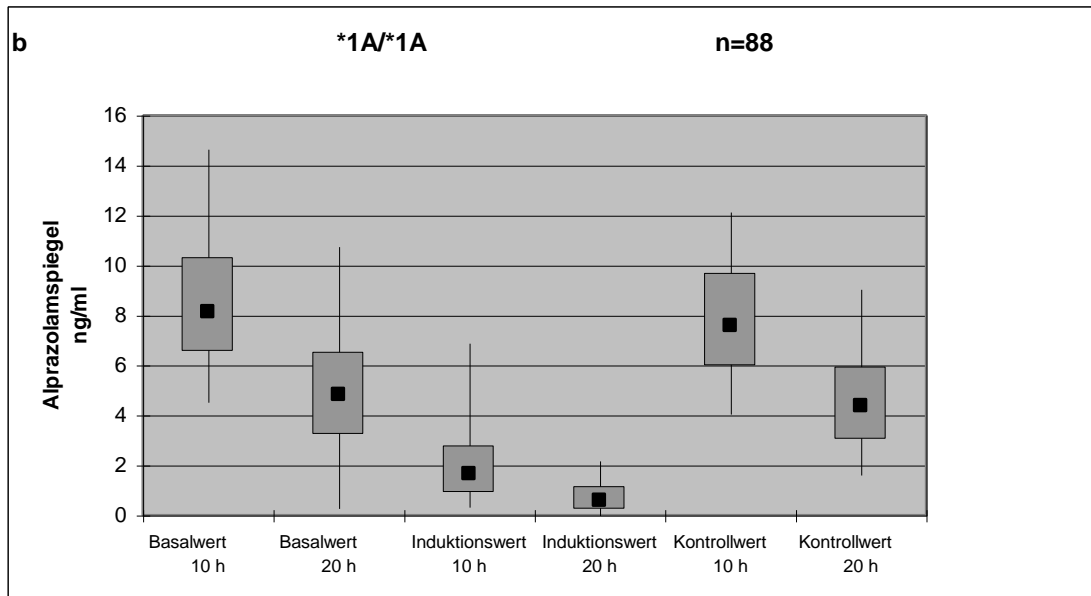
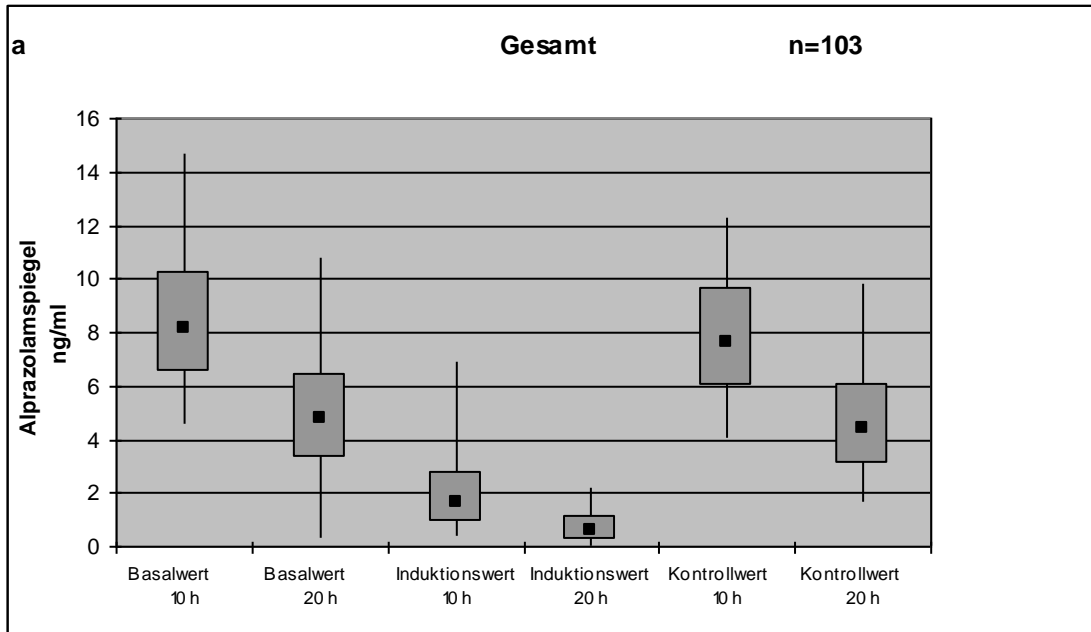
### 4.3 Ergebnisse der Genotypisierung

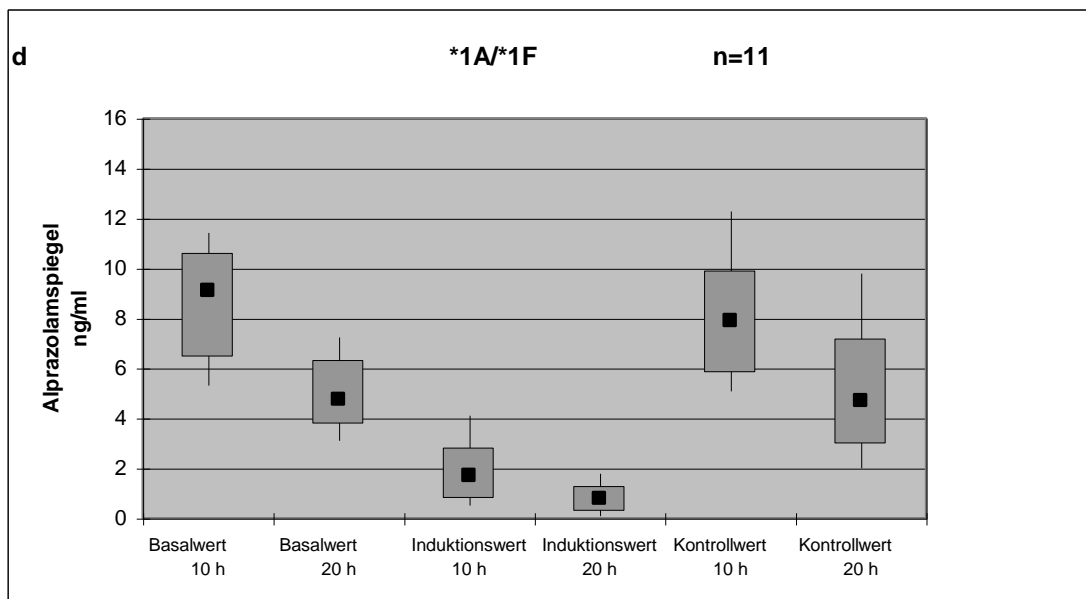
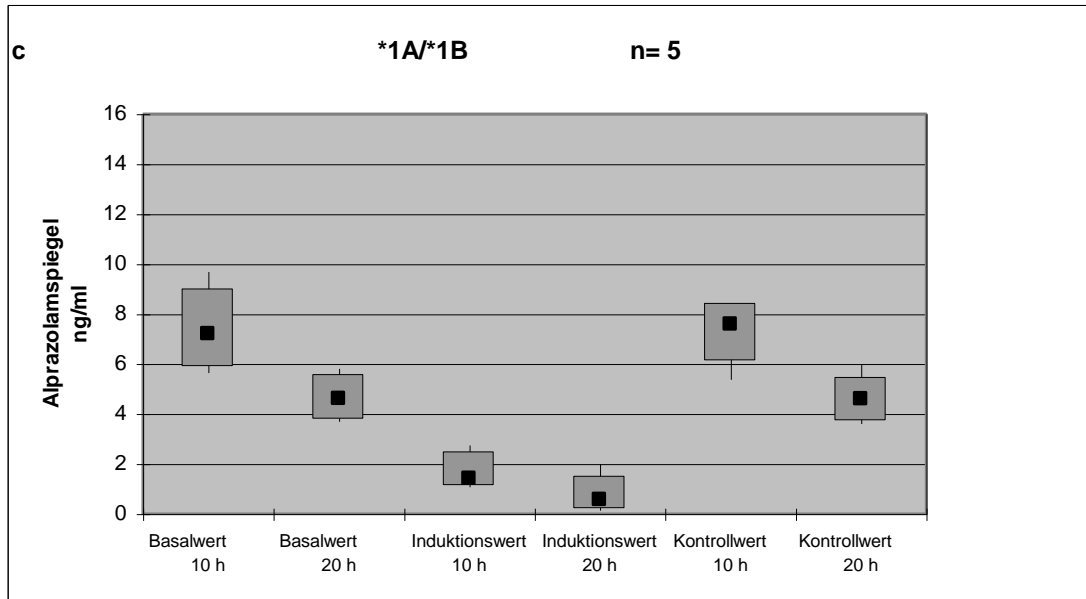
In Promoterbereich sind, neben dem Wildtypallel CYP3A4\*1A, fünf weitere Allele bekannt: \*1B, \*1C, \*1D, \*1E und \*1F. In der vorliegenden Studie konnten nur die Allele \*1B und \*1F nachgewiesen werden. Bisher unbekannte genetische Varianten wurden weder im Promoter noch in der Enhancerregion detektiert. Im Enhancer wurden keine Polymorphismen nachgewiesen. Das Allel \*1B wurde bei fünf Probanden nachgewiesen. Alle waren heterozygot. Das Allel \*1F wurde bei elf Probanden nachgewiesen, auch sie waren alle heterozygot. Daraus ergibt sich eine Allelhäufigkeit von 2,4% für \*1B und 5,3% für \*1F.

### 4.4 Genotyp-Phänotyp-Assoziation

Im Nachfolgenden sind die Alprazolamplasmaspiegel zum Zeitpunkt 10 h und 20 h vor und nach Induktion mit Rifampicin der Gesamtpopulation und für die Merkmalsträger der gefundenen Polymorphismen getrennt dargestellt.

Abb. 11: Mittelwerte und Standardabweichung der Alprazolamspiegel. Die Quadrate bezeichnen den Medianwert, Balken stellen den Bereich des Mittelwerts  $\pm$  Standardabweichung dar, Linien die Maximal- bzw. Minimalwerte. a.) Gesamtpopulation, n=103; b.) Merkmalsträger CYP3A4 \*1A/\*1A, n=88; c.) Merkmalsträger \*1A/\*1B, n=5; d.) Merkmalsträger CYP3A4\*1A/\*1F, n=11.



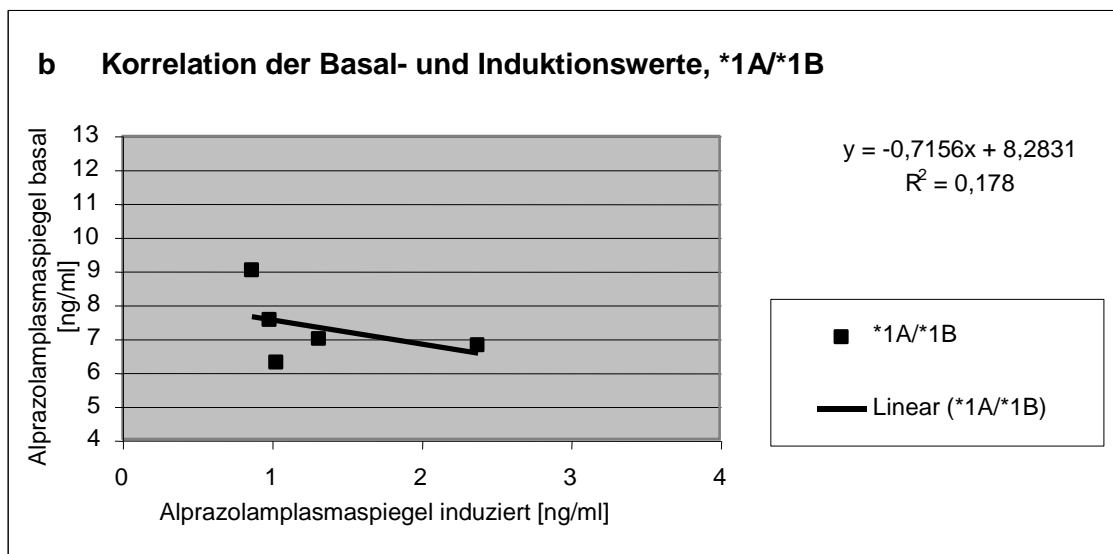
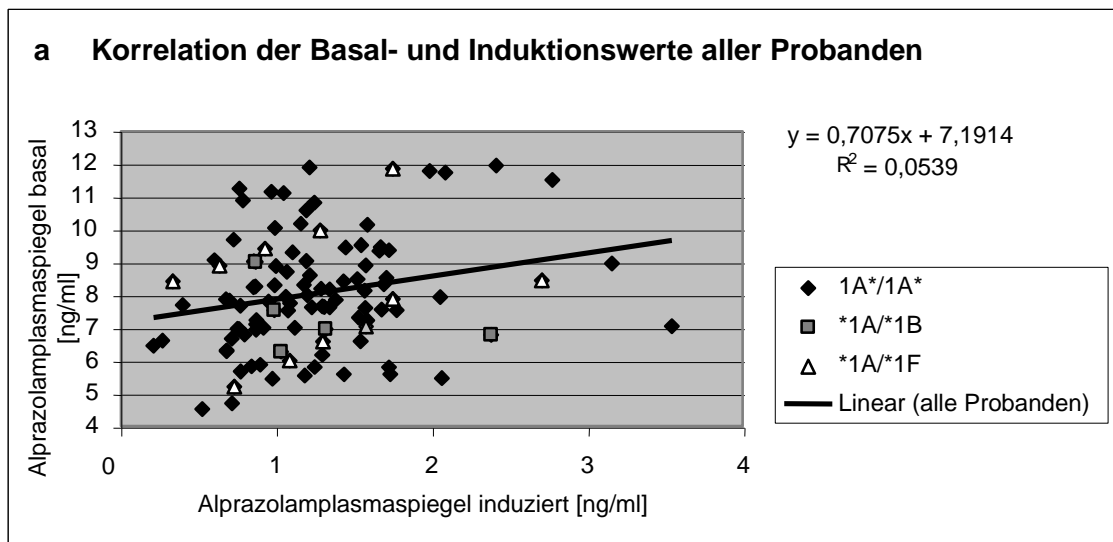


Die

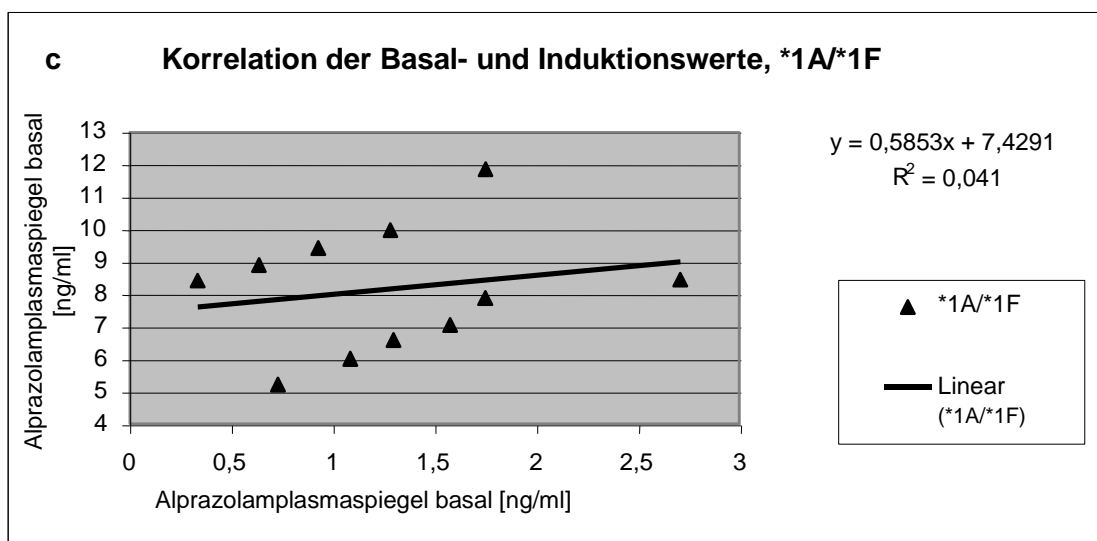
Mittelwerte aller Alprazolamkonzentrationen waren während des gesamten Versuchs bei Probanden mit dem Merkmal CYP3A4\*1A/\*1B geringfügig niedriger, bei Probanden mit dem Merkmal CYP3A4\*1A/\*1F geringfügig höher als bei homozygoten Trägern des Wildtyps. Aufgrund der geringen Anzahl der jeweiligen Merkmalsträger war der Unterschied jedoch nicht statistisch signifikant.

Ein die Induktion von CYP3A4 beeinflussender Polymorphismus kann sich nicht nur in den Absolutwerten, sondern auch im Verhältnis der Werte vor und nach Induktion ausdrücken. Im Folgenden sind basaler und induzierter Wert für die einzelnen Varianten gesondert gegeneinander aufgetragen, um die Frage eines möglichen Einflusses zu klären.

Abb. 12: a.) Verhältnis basal/induziert bei der gesamten Probandengruppe. b.) Verhältnis bei heterozygoten Trägern des Allels CYP3A4\*1B. c.) Verhältnis bei heterozygoten Trägern des Allels CYP3A4\*1F.







Wie aus Abb. 12 ersichtlich, besteht keine starke Korrelation zwischen basaler und induzierter Aktivität für die Polymorphismen \*1B von CYP3A4. Während bei Probanden mit dem Merkmal CYP3A4\*1A/\*1B kein Zusammenhang zwischen Induktion und basaler Aktivität besteht, ist bei heterozygoten Merkmalsträgern \*1A/\*1F eine bimodale Verteilung der Induktivität nicht ausgeschlossen.

Der Einfluss der Polymorphismen CYP3A4\*1B und CYP3A4\*1F wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test für alle sechs Blutentnahmezeitpunkte überprüft. Dabei zeigte sich jedoch für keinen der Polymorphismen für keinen Blutentnahmezeitpunkt ein signifikanter Unterschied zum Wildtyp.

Tab. 20: Ergebnis des Mann-Whitney-U-Test für die Polymorphismen CYP3A4\*1B und CYP3A4\*1F. Signifikanz bei  $\leq 0,05$ .

	Basalwert (10 h)	Basalwert (20 h)	Induktionswert (10 h)	Induktionswert (20h)	Kontrollwert (10 h)	Kontrollwert (20 h)
<b>CYP3A4 *1B</b>	0,234	0,093	1,000	0,529	0,345	0,116
<b>CYP3A4 *1F</b>	0,658	0,890	0,827	0,693	0,597	0,890

## 4.5 Statistische Auswertung

Um die Ursachen für die Streuung der Messwerte zu differenzieren, wurden die einzelnen möglichen Faktoren, welche die Plasmakonzentration beeinflussen könnten, untersucht. Dazu wurde durch eine Varianzkomponentenanalyse der Einfluss der intraindividuellen Abweichungen und von systematischen Fehlern anhand eines Vergleichs des Basalwertes 10 h nach Alprazolamgabe mit dem Kontrollwert 10 h nach Alprazolamgabe untersucht. Bei der Aufschlüsselung dieser Varianz ergaben sich die in Tab. 21 dargestellten Komponenten.

Tab. 21: Varianzkomponentenanalyse

<b>Varianz</b>	<b>Anteil</b>	<b>Anteil in %</b>
<b>Intraindividuelle Varianz</b>	0,019	1,9
<b>Messvarianz</b>	0,067	6,7
<b>Interindividuelle Varianz</b>	0,914	91,4

Dementsprechend ist der Einfluss von Messvarianz und intraindividuelle Varianz als gering einzuschätzen.

Der Anteil des genetischen Einflusses auf die intraindividuelle Variabilität lässt sich bei wiederholten Messungen am gleichen Probandenkollektiv wie folgt berechnen (80), wobei  $r_{GC}$  dem genetischen Anteil an der Variabilität entspricht,  $SD_b$  der interindividuellen und  $SD_w$  der intraindividuellen Standardabweichung:

$$r_{GC} = (SD_b^2 - SD_w^2) / SD_b^2$$

Entsprechend dieser Formel wurde der genetische Anteil an der Variabilität anhand der 10-h- bzw. 20-h-Werte berechnet. Er belief sich auf 79,8% für die 10-h-Werte und 79,0% für die 20-h-Werte. Da von den Messungen nach Induktion lediglich eine verwertbar war, konnte hierfür keine Berechnung erfolgen.

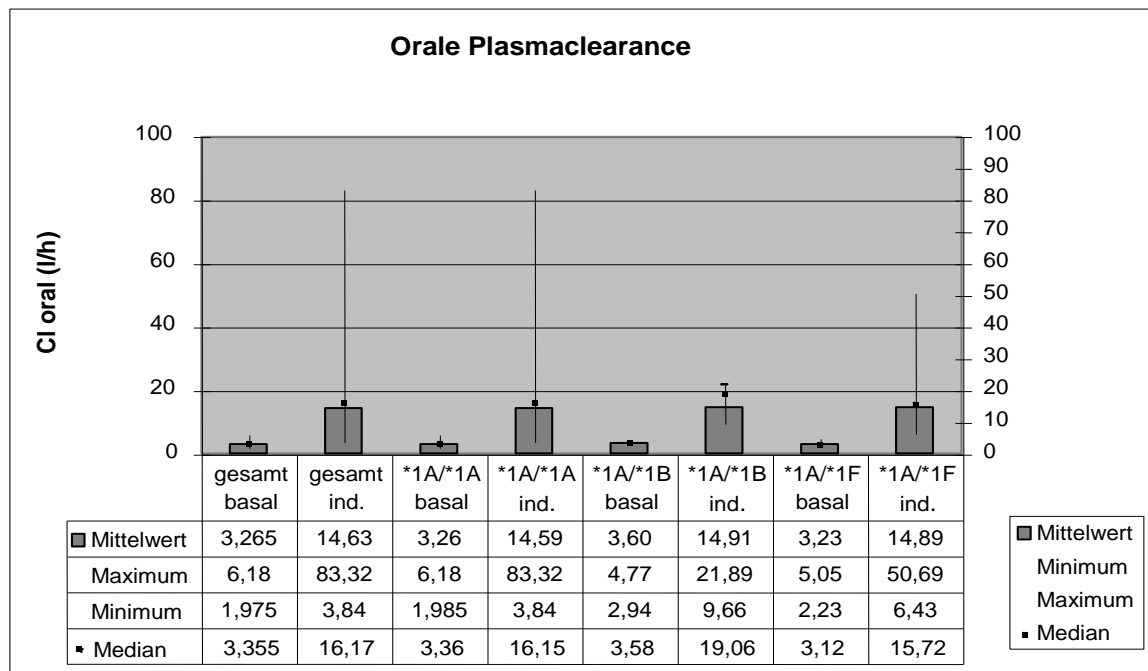
### 4.5.1 Clearance

Aufgrund der geringen Anzahl der Messpunkte ist eine exakte Berechnung pharmakokinetischer Daten wie Clearance, AUC und Halbwertszeit nicht möglich. Nach Schmieder et al., 1996, lässt sich die Clearance jedoch anhand der 10-Stunden-Werte mit folgender Formel abschätzen:

$$Cl_{\text{oral}} [\text{l/h}] = \text{Dosis} [\text{mg}] / (0,038 \times C_{\text{ALP}} [\mu\text{g/l}] - 0,001)$$

In der folgenden Tabelle sind die derart berechneten Daten dargestellt. Es ist eine deutliche Streuung der Clearancewerte 10 h nach Induktion zu beobachten. Insgesamt lässt sich jedoch feststellen, dass keine gravierenden Unterschiede der Mittel- und Medianwerte zwischen den einzelnen Genotypen zu verzeichnen sind.

Abb. 13: Orale Clearance von Alprazolam bei unterschiedlichen CYP3A4-Genotypen. Berechnung nach dem Alprazolam-Plasmaspiegel 10 Stunden nach Einnahme.



## 5 Diskussion

### 5.1 Nichtgenetische Einflüsse auf den Alprazolamabbau

Neben den in dieser Studie untersuchten genetischen Beeinflussungen des Alprazolamabbaus gibt es noch weitere Faktoren, die den Plasmaspiegel des Medikaments alterieren können. Bekannte Einflussmöglichkeiten wie Schwangerschaft, Adipositas und Nikotinkonsum wurden durch das Studiendesign weitestgehend ausgeschlossen. Daneben haben Nahrungsbestandteile, Pharmaka und andere Faktoren, wie Gewicht, Alter, Geschlecht, zyklusabhängige Hormonschwankungen sowie die Leber- und Nierenfunktion, einen Einfluss auf die Aktivität von CYP3A4. Ein relevanter Einfluss dieser Faktoren auf die Messergebnisse konnte in den Vorstudien ausgeschlossen werden (121, 95).

Der Einfluss von Pampelmusensaft auf den Abbau diverser Medikamente ist schon länger bekannt. Lown et. al. (68) zeigten, dass nach dem Genuss von Pampelmusensaft die Plasmakonzentration von Nifedipin, Verapamil, Felodipin, Ethinylestradiol und Cyclosporin A signifikant erhöht werden. Alle diese Medikamente werden von CYP3A4 metabolisiert. Da diese Wirkung des Pampelmusensaftes nur nach oraler Gabe der untersuchten Pharmaka, nicht jedoch nach intravenöser Applikation auftrat, wurde geschlossen, dass die Ursache des Effekts in einer Inhibition von CYP3A4 im Dünndarm zu suchen sei. Ein weiteres Indiz hierfür ist in der Reduktion der CYP3A4 mRNA um 62% in den Enterozyten nach Pampelmusensaftgenuß zu sehen. Um Einflüsse auf das Studienergebnis durch Nahrungsbestandteile zu minimieren, wurden die Probanden gebeten, vor und während der Studie keinen Pampelmusensaft zu konsumieren. Des Weiteren ist die Induktion von CYP3A4 durch Johanniskraut bekannt (74). In der genannten Studie wurde die Aktivierung des Pregnan-X-Rezeptors, der wiederum CYP3A4 aktiviert, in Zellkulturen nachgewiesen. Johanniskraut wird bei milden Depressionen verabreicht, da es als Tee jedoch frei verkäuflich ist, wird es vielfach nicht als Medikament wahrgenommen. Da der Zusammenhang erst nach Beginn der Studie bekannt wurde, kann ein möglicher Einfluss auf das Studienergebnis nicht ausgeschlossen werden.

Da viele Menschen auch als Nichtraucher passiv Zigarettenrauch ausgesetzt sind und dies auch möglicherweise die vorliegenden Ergebnisse beeinflusst haben könnte, wird im Folgenden auf den Zusammenhang zwischen Rauchen und Alprazolammetabolismus eingegangen. Der Zusammenhang zwischen Rauchen und dem Stoffwechsel von Alprazolam ist schon länger bekannt (98). In der genannten Studie war bei Rauchern die Clearance von Alprazolam um 24% größer als bei Nichtrauchern. In den Blutproben war die Konzentration des Alprazolams bei den Rauchern um 15-30% niedriger als bei den Nichtrauchern. Bei den Nichtrauchern war die Halbwertszeit 49% höher. Obwohl diese Zahlen als nicht signifikant eingestuft wurden, ist zu ersehen, daß die Aktivität des CYP3A4, das am Abbau von Alprazolam beteiligt ist, bei den Rauchern erhöht war. Diese Ergebnisse wurden durch weiteren Studie bestätigt, die auch erniedrigte Alprazolamspiegel maßen, jedoch ohne signifikante Unterschiede festzustellen (16, 80).

Da die Plasmakonzentration eines Arzneimittels vom Verteilungsvolumen abhängig ist, das wiederum mit Größe und Gewicht korreliert, wurden die Ergebnisse der Alprazolambestimmung mit diesen Werten in Korrelation gesetzt. Auch unter diesen Umständen änderte sich die Verteilung der Konzentrationen nicht wesentlich. Da der Korrelationskoeffizient bei allen Vergleichen kleiner 0,16 war, lässt sich auf eine nur schwach ausgeprägte Beziehung schließen. Auch nach Ausschluß der Beeinflußung durch Gewicht und Größe der Probanden waren keine Subpopulationen zu erkennen. Diese hätten als Hinweis für das Vorhandensein von Polymorphismen, die den Abbau von Alprazolam oder die Induktion durch Rifampicin verursachen, angesehen werden können.

Ein junger, gesunder Organismus unterscheidet sich im Stoffwechsel gegenüber einem älteren, bei dem bereits degenerative Prozesse eingesetzt haben. Auch nimmt mit zunehmendem Alter der Prozentsatz des Wassers am Gesamtkörpergewicht ab und der Fettanteil zu, was Einfluss auf lipo- und hydrophile Substanzen hat. Bei einer Studie über die Altersabhängigkeit des Alprazolamabbaus, an der 33 Probanden im Alter von 21 bis 87 Jahren teilnahmen, wurde ein geringfügig verlangsamter Alprazolamabbau bei älteren Probanden festgestellt, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (32). In einer weiteren Studie an 10 geriatrischen Patienten

konnte dieser Unterschied nicht bestätigt werden (114). Für höhere Altersgruppen lassen sich wegen der geringen Anzahl älterer Teilnehmer in der vorliegenden Studie keine verlässlichen Aussagen machen.

Eine eingeschränkte Nierenfunktion hat eine verzögerte Ausscheidung nierengängiger Stoffe zur Folge. Dies kann auch Einfluss auf den Plasmaspiegel von Alprazolam haben. So war die Alprazolamclearance in einer Studie mit jeweils 7 dialysepflichtigen und gesunden Probanden bei dialysepflichtigen Patienten im Durchschnitt um 23% niedriger als bei Gesunden (76). Da der Kreatininwert jedoch bei sämtlichen Probanden unserer Studie im Normbereich lag, kann davon ausgegangen werden, daß dies keinen Einfluß auf die von uns gemessenen Werte hatte.

Eine krankheitsbedingte Einschränkung der Leberfunktion zieht nicht unbedingt eine Beeinträchtigung der CYP450-abhängigen Abbauege nach sich. Noch 20% des Lebergewebes kann die volle Stoffwechsellistung aufrechterhalten. Allerdings entsteht bei einer Leberzirrhose ein Umgehungskreislauf, wodurch ein Teil des Blutes keinen Kontakt mit den stoffwechselaktiven Hepatozyten der Leber und deren Enzymen hat. Dies kann als Ursache einer signifikant kleineren Alprazolamclearance und einer längeren Halbwertszeit bei Patienten mit Leberzirrhose angesehen werden, wie es in einer Untersuchung an 17 gesunden und 17 an alkoholtoxischer Leberzirrhose erkrankten Probanden festgestellt wurde (50). Da die vor Beginn dieser Studie geprüften Leberwerte bei allen Probanden im Normbereich lagen, ist ein Einfluß auf die Messergebnisse auszuschließen.

## 5.2 Alprazolam als Testsubstanz von CYP3A4

Alprazolam ist ein *low clearance drug* mit einer oralen Bioverfügbarkeit von 80-100%. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Alprazolamclearance unabhängig von Leberblutfluss und *First-pass*-Mechanismen ist (94). Die Auswertung der klinischen Daten, speziell die nicht oder nur sehr gering vorhandene Korrelation zwischen Körpergröße, Oberfläche bzw. BMI und Alprazolamkonzentration, bestätigen diesen Vorzug als Testsubstanz. Alprazolam ist im Gegensatz zu einer Testsubstanz wie Erythromycin weder Autoinhibitor noch Induktor von CYP3A4.

Um Nebenwirkungen durch die sedativen Effekte von Alprazolam zu vermeiden, wurde 1 mg der Testsubstanz um 22.00 h gegeben. Die Blutentnahmen erfolgten am folgenden Tag um 8.00 h und 18.00 h. Da Rifampicin die Clearance jedoch im Durchschnitt verfünffacht, führte dieses Studiendesign dazu, dass die Alprazolamspiegel bei der zweiten Blutentnahme teilweise unter der Nachweisgrenze lagen. In folgenden Studien sollte dies entweder durch eine höhere initiale Alprazolamdosis oder durch applikationsnähere Blutentnahme vermieden werden. Da die therapeutische Dosis von Alprazolam mit 0,75-4,0 mg/d angegeben wird, sind einer höheren Dosierung jedoch Grenzen gesetzt. Prinzipiell könnte die niedrige Dosis aber auch eine Ursache dafür sein, dass in dieser Studie keine pharmakokinetischen Unterschiede festgestellt wurden. Dies wäre der Fall, wenn die Dosis so gering ist, dass CYP3A4 weit unterhalb der Sättigungsgrenze arbeitet und geringfügige Aktivitätsunterschiede durch einen Polymorphismus durch die Menge des vorhandenen Enzyms ausgeglichen werden können. Um dies auszuschließen, sollten weitere Untersuchungen mit höheren Alprazolamdosierungen stattfinden.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Senkung der applizierten Menge des Induktors Rifampicin. In der vorliegenden Studie wurden 450 mg/d Rifampicin gegeben, was der minimalen therapeutischen Tagesdosis entspricht. Eine weitere Möglichkeit, Alprazolamkonzentrationen unter der Nachweisgrenze zu vermeiden, wäre daher eine Senkung der Rifampicindosis. Die Induktion von CYP3A4 durch Rifampicin weist in Versuchen in Zellkulturen eine sigmoidale Sättigungskurve mit einer maximalen Induktion ab etwa 2,5  $\mu\text{M}$  auf (6). Diese Werte sind nicht

ohne weiteres auf klinische Studien übertragbar, es ist jedoch bekannt, dass schon eine Gabe von 300 mg Rifampicin zu einer suffizienten Induktion führt (38). Daher sollte eine Studie mit geringeren Dosierungen zur Klärung des minimalen Rifampicinbedarfs erfolgen. Zur Zeit liegen keine weiteren Studien zur gemeinsamen Gabe von Alprazolam und Rifampicin als Testsubstanz von CYP3A4 vor, aus der vorliegenden Studie lässt sich jedoch auf eine gute Kompatibilität der beiden Substanzen schließen.

Zusätzlich sollte aus den unter 5.5 genannten Gründen nicht nur eine Untersuchung des Gens von CYP3A4 erfolgen, sondern auch die Gene von CYP3A5, PXR und MDR1 sequenziert werden. Um auch den genetischen Anteil an der Induktion nach Özdemir (80) zu berechnen, wäre es sinnvoll, noch ein zweites Mal Rifampicin zu applizieren und die Induktionwerte mit denen von der ersten Gabe zu vergleichen.

Insgesamt lässt sich jedoch feststellen, dass mit Alprazolam eine Substanz gefunden wurde, für die CYP3A4 eine hohe Spezifität aufweist. In dieser Studie konnten die guten Eigenschaften von Alprazolam als Testsubstanz für CYP3A4 bestätigt werden. Es hat eine niedrige intraindividuelle Variabilität der Plasmaspiegel und ist gut verträglich. Die aus dieser Studie hervorgehenden Daten belegen für Alprazolam keine geschlechts- bzw. altersabhängige Veränderung im Metabolismus von Alprazolam vor und nach Induktion von CYP3A4 durch Rifampicin. Auch traten während der Studie durch die Einnahme des Präparates keine negativen Wirkungen auf. Unter Berücksichtigung der oben aufgeführten Einschränkungen kann daher Alprazolam als Testsubstanz für CYP3A4 sinnvoll verwendet werden.



### 5.3 Polymorphismen im Promoterbereich von CYP3A4

Genetisch bedingte Unterschiede im Cytochromstoffwechsel wurden bereits von Ball et al. (1) diskutiert. Diese Autoren fanden den Polymorphismus CYP3A4\*1B in einer Studie mit 802 freiwilligen Amerikanern europäischen, chinesischen, japanischen und afrikanischen Ursprungs in unterschiedlicher Häufigkeit, jedoch ohne einen Einfluss des Polymorphismus auf den Abbau von Erythromycin oder Nifedipin nachweisen zu können.

Die übrigen Polymorphismen im Promoterbereich - CYP3A4\*1C, \*1D, \*1E und \*1F - wurden nur in jeweils einer Studie nachgewiesen. CYP3A4\*1C und \*1D wurden mit einer Frequenz von 1% nachgewiesen (91), \*1E und \*1F wurden in einer weiteren Studie an 101 Probanden mit einer Frequenz von jeweils 1% (\*1E) und 8,4% bzw. 7,6% (Europäer und Iraner) nachgewiesen, CYP3A4\*1B wurde mit einer Häufigkeit von 9,6% bei Europäern beschrieben (40). Für keinen dieser neuen Polymorphismen ist der Einfluss auf die Aktivität von CYP3A4 untersucht. In diesen Studien zeigte sich ein deutlicher Unterschied in den Allelfrequenzen zwischen verschiedenen Populationen. Um ethnische Einflüsse auf den Alprazolamspiegel sicher ausschließen zu können, wurden in die vorliegende Studie nur Kaukasier aufgenommen.

In der Promoterregion von CYP3A4 wurde in der vorliegenden Studie ein Bereich von etwa 1000 Basen Länge sequenziert. Die Polymorphismen CYP3A4\*1C, \*1D und \*1E konnten nicht nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer niedrigen Allelfrequenz von etwa 1% war dies bei einer Anzahl von 104 Probanden mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 35% zu erwarten. Da die genannten Polymorphismen \*1C,\*1D und \*1E aber jeweils nur in einzelnen Studien nachgewiesen wurden und in nachfolgenden Studien, in denen der gleiche Bereich sequenziert wurde, nicht bestätigt werden konnten, ist auch nicht ausgeschlossen, dass sie seltener sind. Die vorliegenden Ergebnisse wären ein Hinweis darauf. Die Polymorphismen CYP3A4\*1B und \*F konnten in dieser Studie nachgewiesen werden, wenn auch in einer im Vergleich mit vorherigen Studien relativ geringen Frequenz. Es wurden keine neuen Polymorphismen in der Promoterregion entdeckt.

Tab. 22: Frequenz der Allele CYP3A4\*1B bis CYP3A4\*1F in verschiedenen Studien und ihr Einfluss auf die Aktivität von CYP3A4 (modifiziert nach 61)

Allel	Effekt <i>in vivo</i>	Frequenz in der vorliegenden Studie	Frequenz bei Kaukasiern	Frequenz bei anderen Ethnien	Referenz
CYP3A4*1B	keiner auf den Metabolismus von Midazolam, Nifedipin, Alprazolam frgl. bei Cyclosporin	2,4%	2-9,6%	Amerikanische Schwarze: 37-67% Japaner, Chinesen: u. a. 0% Hispanics: 9,3-11%	11, 85, 1, 91,
CYP3A4*1C	?	0%	1%	Amerikanische Schwarze: 0%	91
CYP3A4*1D	?	0%	1%	Amerikanische Schwarze: 0%	91
CYP3A4*1E	?	0%	<1%	Amerikanische Schwarze: 0%	40
CYP3A4*1F	?	5,3%	8,4%	Iraner: 7,6%	40

### 5.3.1 CYP3A4\*1B

Diese genetische Variante wurde in dieser Studie bei fünf Teilnehmern gefunden. Dies entspricht einer Allelfrequenz von 2,4%. Damit liegt die Häufigkeit dieses Polymorphismus in der untersuchten Population im unteren Bereich der für Kaukasier zu erwartenden Werte.

Die Alprazolamkonzentrationen vor und nach Induktion sowie die Induktivität und Clearance zeigten bei den Merkmalsträgern keine Abweichung von den Werten der restlichen Probanden. Somit ist kein Zusammenhang zwischen dieser genetischen Variante und einem veränderten Alprazolamstoffwechsel herzustellen.

Dies bestätigt die Ergebnisse einer anderen Studie an 90 schwarzen Afrikanern, von denen 8 homozygote Wildtypallelträger, 59 heterozygot und 23 homozygote \*1B-Träger waren, in der kein Einfluss des Polymorphismus auf den Abbau von Nifedipin und Erythromycin festzustellen war (1). Eine weitere klinische Studie untersuchte den Zusammenhang zwischen der H. pylori-

Therapie mit Clarithromycin, Omeprazol und Amoxicillin und dem Vorhandensein von CYP3A4\*1B. Grundlage war die Annahme, dass bei einem Polymorphismus im regulatorischen Bereich die Komedikation von CYP3A4-Substraten, die gleichzeitig Inhibitoren sind (Clarithromycin), und von Substraten wie Omeprazol das Therapieergebnis negativ beeinflussen kann. Dies konnte jedoch anhand der klinischen Ergebnisse ausgeschlossen werden (90). Im Gegensatz dazu fanden Min et al., 2003 (72) einen Einfluss des Polymorphismus auf den Abbau von Cyclosporin. Versuchsteilnehmer waren 14 gesunde Probanden im Alter von 18 bis 35 Jahren, die 5 mg/kg Cyclosporin erhielten. Die Geschlechtsverteilung in dieser Probandengruppe war gleich, 11 Probanden waren schwarze Amerikaner, der Rest europäischen Ursprungs. Es konnte eine signifikante Verringerung der maximalen Plasmakonzentration und der Clearance bei den homozygoten CYP3A4\*1B-Trägern festgestellt werden. Der Unterschied zwischen Heterozygoten und Probanden mit homozygotem Wildtypallel war jedoch statistisch nicht signifikant. In dieser Studie wurden allerdings nur jeweils vier homozygote und sechs heterozygote Probanden untersucht, so dass die Autoren eine Untersuchung an einem größeren Kollektiv zur Bestätigung ihrer Ergebnisse empfohlen haben. In einer anderen Studie an jeweils 15 jungen europäisch- (alle Wildtyp) und afrikanischstämmigen (4 heterozygote, 10 homozygote Träger des Allels \*1B) Männern wurde der Einfluss von CYP3A4\*1B nach der Gabe von 1 mg Midazolam intravenös und 2 mg Midazolam oral gemessen. Es konnte eine geringfügig verminderte systemische, jedoch unveränderte orale Clearance bei Probanden mit dem Allel \*1B nachgewiesen werden. Dies wurde erklärt durch den stärkeren Einfluss der intestinalen Aufnahme im Vergleich zum hepatischen Abbau auf die orale Clearance von Midazolam (106).

Da CYP3A4 am Metabolismus vieler Zytostatika beteiligt ist (s.Tab. 1), besteht die Möglichkeit, dass Polymorphismen, die die Abbaugeschwindigkeit dieser Arzneimittel beeinflussen, auch einen Effekt auf die Effizienz der medikamentösen Krebstherapie haben könnten. Dies spielt vor allem beim Hodgkinlymphom eine Rolle, da die meisten zur Behandlung eingesetzten Zytostatika von diesem Enzym abgebaut werden. Zudem ist eine Erhöhung des Risikos, an einer akuten myeloischen Leukämie (AML) nach erfolgreicher Chemotherapie zu erkranken, bekannt. Das Risiko für eine solche therapiebedingte Neoplasie liegt bei etwa 3%. In einer Studie an 99 Patienten mit *de novo* und 30 Patienten mit therapiebedingter AML wurde ein möglicher Schutz vor einer therapiebedingten Leukämie durch den Polymorphismus CYP3A4\*1B festgestellt.

Dies könnte sich aus einer erhöhten Abbaurrate der verwendeten Zytostatika und einer dadurch bedingten geringeren Toxizität erklären (16). Die Daten der vorliegenden Studie konnten diese Hypothese aber nicht erhärten. Eine weitere Studie an 224 Kindern mit einer akuten lymphoblastischen Leukämie, von denen im Verlauf 53 eine therapiebedingte myeloische Leukämie entwickelten, konnte keinen Zusammenhang zum Vorhandensein des Allels CYP3A4\*1B feststellen (5). Da CYP3A4\*1B häufig mit CYP3A5\*3 (s. 5.5) gemeinsam auftritt, ist zur Zeit nicht gesichert, ob eine der beiden Variationen oder die Kombination der beiden für diese Zusammenhänge verantwortlich ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sprechen in Übereinstimmung mit den vorhergehenden eher gegen eine relevante Rolle von CYP3A4\*1B, können sie aber nicht sicher ausschließen.

Es konnte somit bisher nicht geklärt werden, ob überhaupt und ggf. in welche Richtung das Vorhandensein des Allels CYP3A4\*1B die CYP3A4-Aktivität im Arzneimittelstoffwechsel beeinflusst. Über diese pharmakokinetischen Untersuchungen hinaus liegen eine Reihe von Studien vor, die den Zusammenhang zwischen dieser CYP3A4-Variante und verschiedenen Tumorarten untersucht haben. 1998 wurde ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des Allels CYP3A4\*1B und Prostata Tumoren festgestellt (85). In dieser Fallkontrollstudie an 230 europäischen Patienten mit Prostatakarzinom wurde bei 46% der Patienten mit einer Tumorklassifikation T3/T4 das Allel nachgewiesen, im Gegensatz zu 5% bei Patienten mit der Tumorklassifikation T1. In einer weiteren Fallkontrollstudie wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus CYP3A4\*1B und der Entstehung von Prostatakarzinomen auf der Grundlage einer benignen Prostatahyperplasie nachgewiesen (odds ratio 6,3; CI 2,3-17,3) (101). Diese Daten werden durch eine andere Studie bestätigt, die die Häufigkeit von CYP3A4\*1B in verschiedenen Populationen untersucht hat. Dabei wurde die Allelfrequenz bei insgesamt 864 gesunden europäischen, afrikanischen und schwarzamerikanischen Männern untersucht. Das Allel CYP3A4\*1B wurde dabei bei 8% der europäischstämmigen und 59% der afrikanischstämmigen Amerikaner nachgewiesen. In der afrikanischen Gruppe war es mit 80% vertreten. Diese Häufigkeit korreliert mit der erhöhten Häufigkeit von Prostata Tumoren bei Schwarafrikanern im Vergleich zu Europäern (120). Zusammenfassend scheint somit eine Korrelation zwischen der Häufigkeit von CYP3A4\*1B und dem Auftreten von Prostata Tumoren zu bestehen.

Bei einer Untersuchung an 137 gesunden US-amerikanischen 9-jährigen Mädchen kaukasischer, afroamerikanischer und hispanischer Abstammung wurde festgestellt, dass die Menarche bei Trägern des Polymorphismus signifikant früher einsetzt; so hatte bei 90% der homozygoten Trägerinnen die Pubertät schon eingesetzt, jedoch nur bei 56% der heterozygoten. Bei Trägerinnen des Wildtyps hatte die Pubertät erst bei 40% begonnen (51). Das frühe Einsetzen der Pubertät wiederum ist ein bekannter Risikofaktor für Brust- und Ovarialkarzinome. In Fallkontrollstudien bei 951 Frauen mit Brustkrebs (Kontrollgruppe: 500 Fälle) und 488 Frauen mit Ovarialkarzinomen (Kontrollgruppe: 276 Fälle) mit gleicher Altersverteilung konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und dem Auftreten von Brust- und Ovarialtumoren gefunden werden (98).

### **5.3.2 CYP3A4\*1F**

Diese genetische Veränderung wurde in dieser Studie bei elf Teilnehmern gefunden. Dies entspricht einer Allelfrequenz von 5,3%. Der Polymorphismus wurde vorher erst in einer Studie an 101 Probanden mit einer Frequenz von 8,4% bei Europäern und 7,6% bei Iranern nachgewiesen (40). In einer weiteren Untersuchung an 416 gesunden japanischen Probanden konnte er nicht nachgewiesen werden (20). Wie aus Abb 12 hervorgeht, konnte keine Korrelation zwischen dem Vorkommen des Polymorphismus und dem Alprazolamabbau oder der Induktion desselben durch Rifampicin nachgewiesen werden. In Abb. 20c.) scheint sich eine bimodale Verteilung der Werte anzudeuten. Diese war aufgrund der geringen Anzahl der Merkmalsträger nicht signifikant. Epigenetische Effekte als Ursache dieser Verteilung werden unter 5.4 diskutiert.

Es liegen zur Zeit keine Studien vor, die pharmakokinetische Effekte dieses Polymorphismus untersuchen, daher kann kein Vergleich angestellt werden. Die vorliegende Studie spricht aber gegen einen relevanten Effekt auf die Aktivität und das Induktionsverhalten von CYP3A4.

### 5.3.3 Enhancerregion

Zur Zeit liegen zwei Studien vor, die sich mit genetischen Varianten der Enhancerregion von CYP3A4 beschäftigen. In einer Studie mit 101 gesunden Probanden (40) konnten keine Polymorphismen nachgewiesen werden. Eine weitere Untersuchung an 416 gesunden japanischen Probanden fand 2 Polymorphismen, die jeder nur bei einem Probanden nachgewiesen wurde (20). Diese Region enthält die für die volle Induktion von CYP3A4 essentiellen DNA-Rezeptorbindungsstellen für den Pregnan-X-Rezeptor, sowie möglicherweise Bindungsstellen für den Glucocorticoidrezeptor, HNF4 und den Retinoid-X-Rezeptor. Der in der vorliegenden Studie sequenzierte Bereich umfasst 1100 Basen.

Im Jahr 2000 waren aus den Daten des Humanen Genom-Projekts und des SNP- Konsortiums im gesamten Genom 1,4 Millionen SNPs bei einer Gesamtlänge der Sequenz von 2,7 Milliarden Basen bekannt, das entspricht einem SNP alle 1.900 Basen. Diese Daten wurden aus der Analyse des gesamten Genoms von 24 ethnisch unterschiedlichen Personen erhoben. In einem Vergleich mit 500 weiteren Personen wurden 95% dieser SNPs mit einer Frequenz von über 10% wiedergefunden (49). Die Häufigkeit von SNPs mit einer Häufigkeit von über 1% wird jedoch auf einen alle 100 bis 300 Basen geschätzt (116). Dementsprechend müssten im sequenzierten Bereich rein statistisch drei bis 11 SNPs vorhanden sein. Im Vergleich dazu enthält die Promoterregion von CYP3A4 in einem Bereich ähnlicher Länge sechs Polymorphismen, von denen zwei mit einer Frequenz von bis zu 10% bei Kaukasiern auftreten.

Die Seltenheit von Polymorphismen in der Enhancerregion, die durch die vorliegende Studie bestätigt wird, scheint ihre Ursache in der Relevanz dieser Region für die Regulation von CYP3A4 zu haben. Möglicherweise existieren neben den bekannten und vermuteten DNA-Rezeptorbindungsstellen noch weitere bisher unbekannte Bindungsstellen in diesem Bereich, die für die Regulation von CYP3A4 von essentieller Bedeutung sind. Eine Inaktivierung durch Polymorphismen würde zu einer fehlerhaften Regulation von CYP3A4 führen, die aufgrund der zentralen Stellung des Enzyms in der Biotransformation fatale Defizite im Metabolismus zur Folge hätte.

## 5.4 Epigenetik

Der Polymorphismus CYP3A4\*F führt zur Veränderung der Sequenz AGGGT zu AGCGT, somit zur Entstehung eines neuen CG-Dinukleotides. Das Basenpaar CG tritt im Genom nur mit einer Häufigkeit von 20% der statistisch zu erwartenden Frequenz auf (26). Nur in den *CpG islands* – kurze Sequenzen, in denen das Basenpaar CG gehäuft vorkommt - ist es mit der zu erwartenden Häufigkeit oder sogar noch häufiger anzutreffen. Die meisten dieser *CpG islands* sind mit Genen assoziiert und kommen in deren Promoterbereich vor (69). Während lediglich 2-7% der Cytosinbasen in der gesamten DNA methyliert sind, trifft dies auf etwa 80% der CpGs außerhalb der *CpG islands* zu, während die CG-Dinukleotide in *CpG islands* meist unmethyliert sind (26). Die Ursache für die Methylierung ist darin zu sehen, dass Cytosin leicht spontan zu Uracil desaminiert werden kann, das bei der Replikation von der Polymerase als Thymin gelesen wird. Durch die Methylierung wird die Cytosinbase vor dieser Veränderung geschützt. Eine vermehrte Methylierung im Promoterbereich eines Gens geht jedoch üblicherweise mit einer Inaktivierung des Gens einher (26). Man geht davon aus, dass etwa 60% aller Gene mit einem *CpG island* assoziiert sind (90). Daher wurde der Methylierungsstatus des durch den Polymorphismus CYP3A4\*1F entstandenen sowie jeweils eines angrenzenden CG-Dinukleotids in dieser Studie untersucht, um einen Hinweis auf das Vorhandensein eines *CpG islands* und seines Methylierungsstatus zu bekommen.

Der Vergleich der Alprazolamspiegel vor und nach Induktion durch Rifampicin zeigte bei den Merkmalsträgern CYP3A4\*1A/\*1F eine auffällige, bimodale Verteilung. Eine mögliche Ursache dieser Bimodalität könnte in einem veränderten Imprinting liegen. Als Imprinting bezeichnet man die Tatsache, dass Gene nicht wie üblicherweise von beiden Elternteilen gleichwertig vererbt werden, sondern nur vom paternalen oder maternalen Allel exprimiert werden (13). Dies könnte im Falle von CYP3A4\*1F dazu führen, dass dieses Allel nur bei paternaler bzw. maternaler Vererbung aktiv würde, wodurch nur bei der Hälfte der Merkmalsträger eine volle Enzymexpression vorhanden wäre. Vom Imprinting sind vor allem Gene betroffen, die Einfluss auf das embryonale Wachstum haben oder für die geschlechtsspezifische Entwicklung verantwortlich sind. Ein Beispiel hierfür ist IGF 2 (78). Diese Gene werden in der Oogenese bzw. Spermatogenese von spezifischen Isoformen von DNMT1 gezielt methyliert bzw.

demethyliert (45). Da CYP3A4 am Abbau fast aller Steroidhormone teilnimmt und somit in die geschlechtsspezifische Entwicklung eingreift, besteht die Möglichkeit, dass es einem Imprinting unterliegen könnte. Ein weiteres Indiz ist, dass Gene, die einem Imprinting unterliegen, normalerweise als Cluster auftreten (83). Ein solcher Cluster, dessen Fehlregulation für etwa 10% aller Fälle des Silver-Russell-Syndroms verantwortlich ist, liegt auf Chromosom 7 im Bereich 7p11.3-13. Er ist verlinkt mit einem weiteren Cluster im Bereich 7q31-qter, also relativ nahe an CYP3A4, das im Bereich von 7q21 lokalisiert ist (41). Prinzipiell wäre somit ein Imprinting als Ursache der bimodalen Verteilung der Alprazolamspiegel vorstellbar.

Durch Sequenzierung der bisulfonierten DNA dieses Abschnittes konnte ein Unterschied im Methylierungsmuster in diesem Bereich als mögliche Ursache einer veränderten metabolischen Leistung von CYP3A4 ausgeschlossen werden. Da die in dieser Studie verwendete DNA jedoch aus Leukozyten stammt, die prinzipiell nicht das gleiche Methylierungsmuster wie Hepatozyten aufweisen, wurden fünf Leberproben, die den gleichen Polymorphismus aufwiesen, bisulfoniert und sequenziert. Auch hier zeigte sich, dass sämtliche Proben im Bereich des Polymorphismus methyliert waren. Eine Veränderung im Methylierungsmuster in diesem Bereich konnte somit als mögliche weitere Ursache eines veränderten Alprazolamstoffwechsels ausgeschlossen werden.

In nichtembryonalen Zellen sind etwa 80% aller CpGs methyliert. Nur die *CpG-islands* liegen normalerweise unmethyliert vor. Auf welche Weise diese Regionen vor der generellen Methylierung, die nach der Zellteilung stattfindet, geschützt werden, ist zur Zeit noch unklar (4). Es scheint jedoch, dass der Polymorphismus CYP3A4\*1F nicht zu einer von diesen Mechanismen geschützten Sequenz führt. Aus vorhergehenden Studien ist bekannt, dass eine Zunahme der Methylierung im Promoter eines Gens zu seiner Inaktivierung führt (18). Auch dies scheint im vorliegenden Fall nicht einzutreten. Somit lässt sich feststellen, dass die durch den Polymorphismus \*1F entstandene Methylierungsposition keinen relevanten Einfluss auf die Aktivität von CYP3A4 hat.



## 5.5 Weitere genetische Ursachen für Variationen im Alprazolamabbau durch CYP3A4

CYP3A4 wies in vorherigen Studien eine hohe interindividuelle Varianz in Expression und Aktivität auf (96). In Gewebeproben von Organspendern wurde eine bis zu vierzigfache Variabilität in der Enzymexpression festgestellt. *In vitro* wurde eine 35-100-fache Variabilität in der Enzymexpression festgestellt, *in vivo* eine etwa 20-fache (36, 114). *In vivo* wurde eine bis zu achtundvierzigfache Variabilität der Clearance nach oraler Gabe von Midazolam nachgewiesen, wobei 85% der Probanden eine Clearance von 10-40 ml/min kg aufwiesen (67). Im Vergleich ergab sich z. B. für das Substrat Lovastatin (12) ein Variationskoeffizient von 49-118%, für Alprazolam lag er bei einer Studie an 22 Probanden nach der oralen Gabe von 1 mg Alprazolam bei 11% (17). Auch bei diesen Studien variierte die metabolische Clearance bei der Mehrzahl der Probanden um das Vier- bis Sechsfache, während bei einigen ungewöhnlich hohe bzw. niedrige Werte gemessen wurden.

In der vorliegenden Studie wurden Schwankungen in der basalen Clearance um das 3-fache, in der Clearance nach Induktion durch Rifampicin um das 20-fache festgestellt. Zwei Probanden wiesen nach Induktion durch Rifampicin eine sehr viel höhere Clearance von 61,49 l/h bzw. 83,32 l/h im Vergleich zum Mittelwert von 14,49 l/h auf. Diese war jedoch nicht mit einem Polymorphismus in der Promoter- oder Enhancerregion assoziiert. Ein Proband mit dem Polymorphismus \*1A/\*1F wies eine Clearance von 50,69 l/h im Vergleich zum Mittelwert der Merkmalsträger von 14,91 l/h auf. Aufgrund der geringen Anzahl der Merkmalsträger können aus dieser Beobachtung jedoch keine sicheren Schlüsse abgeleitet werden.

An dieser hohen Variabilität haben neben den unter 5.1 diskutierten nichtgenetischen Einflüssen auf den Metabolismus von CYP3A4 auch genetische Faktoren einen wichtigen Anteil. Özdemir hat 2000 in einer Metaanalyse diesen genetischen Anteil untersucht. Dafür verglich er verschiedene bis dahin veröffentlichte Studien über den Abbau verschiedener Medikamente durch CYP3A4, bei denen die intra- und interindividuelle Standardabweichung bekannt war (s.Tab. 23). In der vorliegenden Studie betrug der genetische Anteil an der Variabilität im

Alprazolamstoffwechsel 79% (s. 4.4). Unterschiede im berechneten genetischen Anteil in den in der Tabelle angegebenen Studien beruhen auf Unterschieden bei den Messparametern. So liegen die Werte für Cyclosporin bei 66%, wenn die AUC von Gesamt cyclosporin betrachtet wird, bei 72%, wenn der gebundene Anteil gemessen wurde, und bei 63% bzw. 83%, wenn die entsprechenden Halbwertszeiten der Berechnung zugrunde lagen.

Tab. 23: genetischer Anteil an der Variabilität des Medikamentenmetabolismus bei verschiedenen CYP3A4-Substraten nach 80.

Substrat	Anzahl der Probanden in den jeweiligen Studien	Dosis und Verabreichungsform	Genetischer Anteil
Adriamycin	4	30 mg/m <sup>2</sup> , i.v.	91%
	11	40-130 mg, i.v.	46-63%
Cortisol	11	?, ?	14%
Cyclosporin	7	12 mg/kg, oral	66%
Ethinylestradiol	11	30 µg, oral	79%
	18	30 µg, oral	94%
	10	150 µg, oral	86%
Erythromycin	8	?, i. v.	89%
Ethylmorphin	6	25 mg, oral	98%
Midazolam	20	25 µg/kg, i. v.	87-96%
Nifedipin	12	20 mg, oral	82-84%
	12	10 mg, oral	74-99%
	8	60 mg/d, oral	74-89%
Nitrendipin	8	20 mg, oral	66%
Verapamil	5	320 mg, oral	57-62%

Diese Werte sagen jedoch nichts über die Art des genetischen Einflusses aus. Zudem ist es möglich, dass Polymorphismen, die den Metabolismus eines Substrats verändern, nicht unbedingt einen Einfluss auf den eines anderen haben müssen. So können die Unterschiede in der Pharmakokinetik der einzelnen Testsubstanzen in der basalen Clearance durch Polymorphismen im codierenden Bereich von CYP3A4 erklärt werden. Z. B. erhöht sich bei Probanden mit dem Allel CYP3A4\*2 die Clearance von Nifedipin, die 6-Hydroxylierung von Testosteron dagegen wurde durch diesen Polymorphismus nicht beeinflusst (91). Um gezielter nach relevanten Polymorphismen im Gen von CYP3A4 zu suchen, wurden 30 Langsammetabolisierer (Midazolam, Dextromethorphan) aus einer Gruppe von 360 Probanden auf die bekannten Polymorphismen \*1B, \*2, \*3, \*4, \*5, \*6, \*8, \*11, \*12 und \*13 untersucht. Dabei konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen \*1B und der Metabolisierungsrate für diese

Medikamente nachgewiesen werden. Die anderen Polymorphismen wurden in dieser Gruppe nicht gefunden (24).

Erschwerend für die Untersuchung des genetischen Einflusses kommt hinzu, dass nicht nur CYP3A4, sondern auch andere Enzyme in den Abbau der als Testsubstanzen verwendeten Medikamente involviert sind. Im Falle von Alprazolam ist dies vor allem CYP3A5. Alprazolam wird zu  $\alpha$ -Hydroxyalprazolam und 4-Hydroxyalprazolam abgebaut. Während das Ertere vor allem ein Produkt von CYP3A5 ist, ist das Zweite vor allem ein Produkt von CYP3A4, wobei bei Europäern  $\alpha$ -Hydroxyalprazolam auch vornehmlich ein Produkt von CYP3A4 ist (32). Eine vermehrte Expression von CYP3A5 ist mit dem Vorhandensein des Allels CYP3A5\*1 vergesellschaftet, während Individuen, die z. B. die Allele CYP3A5\*3 oder CYP3A5\*6 tragen, annähernd keine Expression des Enzyms aufweisen (59). Dass dies auch den Metabolismus von Alprazolam beeinflusst, wurde in einer Studie an 19 gesunden Probanden nachgewiesen, von denen fünf homozygot für das Allel CYP3A5\*1, 7 homozygot für das Allel CYP3A5\*3 und 7 heterozygot waren. Nach der oralen Gabe von 1 mg Alprazolam war die AUC bei den CYP3A5\*3/\*3-Trägern signifikant höher im Vergleich zu den CYP3A5\*1/\*1-Trägern (830,5 ng h/ml vs. 599,9 ng h/ml) (81). CYP3A5\*1 weist eine stark populationsgenetisch beeinflusste Verteilung auf. Es wird bei 60-73% der afroamerikanischen, jedoch nur bei 5-30% der europäischen Bevölkerung exprimiert (48). Bei Europäern treten außerdem signifikant häufig die Polymorphismen CYP3A5\*1 und CYP3A4\*1B gemeinsam auf (59). Eine weitere Studie an 14 Europäern, 14 in Amerika und 14 in Asien geborenen Asiaten konnte eine signifikant erhöhte Clearance und AUC von Alprazolam bei Asiaten nachweisen (66), was möglicherweise auch durch die populationspezifische Verteilung dieses Allels zu erklären wäre. Da die Clearance für die 4-Hydroxilierung von Alprazolam für CYP3A4 doppelt so hoch ist wie für CYP3A5, umgekehrt aber die Clearance für die  $\alpha$ -Hydroxilierung für CYP3A5 dreifach höher ist als bei CYP3A4, wurde das Verhältnis der beiden Metaboliten als Indikator für den Anteil der beiden Enzyme am Abbau von Alprazolam angesehen (43). In einer Studie an 12 gesunden europäischen Probanden wurde die Clearance von  $\alpha$ -Hydroxyalprazolam und 4-Hydroxyalprazolam nach der oralen Gabe von 1 mg Alprazolam gemessen (110). Dabei zeigte sich eine mehr als dreimal so hohe  $C_{\max}$  und AUC für 4-Hydroxyalprazolam. Um den Einfluss

von CYP3A5 auf den Metabolismus von Alprazolam genauer zu evaluieren, sollten daher beide Metaboliten von Alprazolam gemessen werden, außerdem sollten die Polymorphismen CYP3A4\*1B und CYP3A5\*3 analysiert werden.

Zudem könnten Polymorphismen in Phase-II-Enzymen, DNA-Rezeptoren oder Membranmolekülen das Metabolisierungsverhalten gegenüber bestimmten Substanzen modifizieren. So wurde in einer Studie an 144 menschlichen Leberproben festgestellt, dass der Polymorphismus 2677T im MDR1-Gen (*multi drug resistance 1*) im Vergleich zum Polymorphismus 2677G mit einer erhöhten Midazolamclearance einhergeht, andererseits jedoch mit einer geringeren Induktivität durch Rifampicin (62). In der gleichen Studie wurde eine sechs Basen betragende Deletion im Gen von PXR nachgewiesen, die die Aktivität von CYP3A4 beeinflusst. Ein weiterer natürlich vorkommender Polymorphismus dieses Rezeptors – R98C – zeigte *in vitro* keinerlei Aktivität am CYP3A4-Promoter (56). Es ist also davon auszugehen, dass die von Özdemir postulierte genetisch bedingte Variabilität im Metabolismus von CYP3A4 von 60-90% nicht nur im Gen dieses Enzyms, sondern auch in Transporter- und Rezeptorproteinen, die in Verbindung mit ihm stehen, zu suchen ist.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die Aktivität von CYP3A4 bei 104 gesunden europäischen Probanden anhand des Abbaus von Alprazolam durch das Enzym vor und nach der Induktion durch Rifampicin gemessen. Anschließend wurden die Promoter- und Enhancerregion des Enzyms sequenziert und der Zusammenhang zwischen Polymorphismen in diesem Bereich und der basalen sowie induzierten Aktivität des Enzyms analysiert.

In der Enhancerregion konnten keine Polymorphismen nachgewiesen werden. In der Promoterregion fanden wir die SNPs CYP3A4\*1B und CYP3A4\*1F. Weitere bekannte oder unbekannte Polymorphismen wurden nicht detektiert. Die Allelfrequenz von CYP3A4\*1B betrug in unserem Probandenkollektiv 2,4%. Dieser Polymorphismus hatte weder auf die basale Aktivität noch auf die Aktivität nach Induktion einen Einfluss. CYP3A4\*1F wurde mit einer Frequenz von 5,3% nachgewiesen. Auch hier wurde keine relevante Beeinflussung des Alprazolamabbaus beobachtet. Die durch diesen Polymorphismus entstandene CpG war sowohl in den Leukozytenproben aller Probanden als auch in sieben zusätzlich untersuchten Leberproben methyliert.

Dieses Ergebnis stützt die These, dass die Promoter- und besonders die Enhancerregion von CYP3A4 aufgrund ihrer hohen Relevanz für die Funktion des Enzyms stark konserviert sind. Des Weiteren lässt sich feststellen, dass die Methylierung von CpGs offensichtlich ein verhältnismäßig unspezifischer Vorgang ist, da selbst neu auftretende potentielle Methylierungspositionen im Genom vollständig methyliert werden.

## Literaturverzeichnis

- 1 Ball SE, Scatina J, Kao J, et al. Population distribution and effect on drug metabolism of a genetic variant in the 5' regulatory region of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 66:288-94.
- 2 Bertilson G, Heidrich J, Svenson K, et al. Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc Nat Acad Sci* 1998; 95:12208-13.
- 3 Bertilson L. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin Pharmacokinet* 1995; 29:192-209.
- 4 Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Gen & Dev* 2002; 16:6-21.
- 5 Blanco JG, Edick MJ, Hancock ML, et al. Genetic polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4 and NQO1 in children who developed therapy-related myeloid malignancies. *Pharmacogenetics* 2002; 12:605-11.
- 6 Bombail V, Taylor K, Gibson GG, Plant N. Role of Sp1, C/EBPalpha, HNF3, and PXR in the basal- and xenobiotic-mediated regulation of the CYP3A4 gene. *Drug Metab Dispos* 2004; 32:525-35.
- 7 Brockmüller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I. Combined analysis of inherited polymorphisms of aryl N-acetyltransferases M1 and T1, microsomal epoxid hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res* 1996; 56:3915-25.

- 8 Brockmüller J, Tamim N. Probandenstudie zu individuellen Unterschieden in der Aktivität von Cytochrom P450 3A4 und deren molekularen Ursachen. Institut für Klinische Pharmakologie der Charite, Berlin.
- 9 Brooks BA, McBride OW, Dolphin CT, et al. The gene CYP3 encoding P450CN1 (nifedipine oxidase) is tightly linked to the gene COL1A2 encoding collagen type alpha on 7q21-7q22. *Am J Hum Genet* 1988; 280-84.
- 10 Brown R, Strathdee G. Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. *Trends Mol Med.* 2002, 8, S.43-48,
- 11 Dai D, Tang J, Rose R, et al. Identification of variants in CYP3A4 and characterization of their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299:825-31.
- 12 Desager JP, Horsmans Y. Clinical pharmacokinetics of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 1996; 31:348-71.
- 13 Du M, Beatty LG, Zhou W, et al. Insulator and silencer sequences in the imprinted region of human chromosome 11p15.5. *Hum Mol Genet* 2003; 12(15):1927-39.
- 14 Duman RS. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. *Neuromolecular Med* 2004, 5, S.11-25,
- 15 Eiselt R, Domanski TL, Zibat A, et al. Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants. *Pharmacogenetics* 2001; 11:447-58.
- 16 Felix CA, Walker AH, Lange BJ, et al. Association of CYP3A4 genotype and treatment-related leukemia. *Proc Nat Acad Sci* 1998; 95:13176-81.

- 17 Friedman H, Redmont Jr. DE, Greenblatt DJ. Comparative pharmacokinetics of alprazolam and lorazepam in human and african green monkeys. *Psychopharmacology* 1991; *104*:103-05.
- 18 Fuks F, Burgers WA, Godin N, Kasai M, Kouzarides T. Dnmt3 binds deacetylases and is recruited by an sequence-specific repressor to silenc transscription. *EMBO J* 2001; *202*:536-44.
- 19 Fukuda Y, Ishida N, Nogushi T, Kappas A, Sassa S. Interleukin-6 down regulates the expression and transscripts encoding cytochrome P450 1A1, 1A2 and 3A3 in human hepatoma cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1992; *184*:960-65.
- 20 Fukushima-Uesaka H, Saito S, Watanabe H, et al. Haplotypes of CYP3A4 and their close Linkage with CYP3A5 Haplotypes in japanese population. *Hum Mut* 2004; *681* : online.
- 21 Furukori H, Otani K, Yasui N, et al. Effect of carbamazepine on the singe oral dose pharmacokinetics of alprazolam. *Neuropsychopharmacology* 1998; *18*:364-69.
- 22 Futscher BW, et al. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet* 2002; *31*:175-79.
- 23 Galetin A, Brown C, Hallifax D, Ito K, Houston JB. Utility of recombinant enzyme kinetics in prediction of human clearance: impact of variability, CYP3A5, and CYP2C19 on CYP3A4 probe substrates. *Drug Metab Dispos* 2004; *32*:1411-20.
- 24 Garcia-Manero G, Kantarjia H, Sanchez-Gonzalez B, et al. Results of a Phase I/II Study of the Combination of 5-aza-2'deoxyctidine and Valproic Acid in Patients with Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic syndrome. 2004. ASCO Annual Meeting Proceedings, 6544



- 25 Garcia-Martinez E, Martinez C, Pizarro RM, et al. CYP3A4 variant alleles in white individuals with low CYP3A4 enzyme activity. *Clin Pharmacol* 2001; *71*:196-204.
- 25a Gashaw I, Kirchheiner J, Goldammer M, et al. Cytochrome P450 3A4 messenger ribonucleic acid induction by rifampicin in human peripheral blood mononuclear cells: Correlation with alprazolam pharmacokinetics. *Pharm Drug Disp* 2003; *74*:1-9.
- 26 *Genes V* 2<sup>nd</sup> Ed. Oxford, Walton Street OX2 6DP Oxford University Press 1995; 835-38.
- 27 Gibson GG, El-Sankary W, Plant NJ. Receptor-dependent regulation of the CYP3A4 gene. *Toxicology* 2002; *181*:199-202.
- 28 Gibson GG, Plant NJ, Swales KE, Ayrton A, El-Sankary W. Receptor-dependent transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man. *Xenobiotica* 2002; *32*:165-206.
- 29 Gonzalez FJ, Schmid BJ, Umeno M, et al. Human P450CN1: sequence, chromosome localisation, and direct evidence through cDNA expression that P450CN1 is nifedipine oxidase DNA1988; *56*:1329-39.
- 30 Goodwin B, Hodgson E, Liddle C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol Pharmacol* 1999; *56*:1329-39.
- 31 Gorski JC, Jones DR, Wrighton SA, Hall SD. Characterization of dextromethorphan N-demethylation by human liver microsomes. Contribution of the cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol* 1994; *48*:173-82.

- 32 Gorski JC, Jones DR, Hamman MA, Wrighton SA, Hall SD. Biotransformation of alprazolam by members of the P4503A subfamily. *Xenobiotica* 1999; 29:931-44.
- 33 Greenblatt DJ, Divoll M, Abernaethy DR, Moschitto LJ, Smith RB. Alprazolam kinetics in the elderly, relation to antipyrine disposition. *Arch Gen Psych* 1983; 40:287-90.
- 34 Greenblatt DJ, von Moltke LL, Harmatz JS, Ciraulo DA, Shader RJ. Alprazolam pharmacokinetics, metabolism, and plasma levels: Clinical implications. *J Clin Psychiatry* 1993; 54:4-11.
- 35 Greenblatt JD, Wright CE, von Moltke LL, Harmatz JS, Ehrenberg BL, Harrel LM. Ketoconazole inhibition of triazolam and alprazolam clearance: differential kinetics and dynamic consequences. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 64:237-47.
- 36 Güngrich FP, Turvy CG. Comparison of levels of several human microsomal cytochrome P-450 enzymes and epoxide hydrolase in normal and disease states using immunochemical analysis of surgical liver samples. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256:1189-94.
- 37 Güngrich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J* 2006; 10:E101-11.
- 38 Haas CE, Brazeau D, Cloen D, et al. Cytochrome P450 mRNA in peripheral blood lymphocytes as a predictor of enzyme induction. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 61(8):583-93.
- 39 Haener BD, Gorski JC, Vandenbranden M, et al. Bimodal distribution of renal cytochrome P450 3A activity in humans. *Mol Pharmacol* 1996; 50:52-59.

- 40 Hamzeiy H, Vahdati-Mashhadian N, Edwards HJ, Goldfarb PS. Mutation analysis of the human CYP3A4 gene 5' regulatory region: population screening using non-radioactive SSCP. *Mutat Res* 2002; *500*:103-10.
- 41 Hannula K, Lipsanen-Nyman M, Kontiokari T, Kere J. A narrow segment of maternal uniparental disomy of chromosome 7q31-qter in Silver-Russell syndrome delimits a candidate gene region. *Am J Hum Genet* 2001; *68*:247-53.
- 42 Hashimoto H, Toide K, Kitamura R, et al. Gene structure of CYP3A4, an adult specific form of cytochrome P450 in human livers, and its transcriptional control. *Eur J Biochem* 1993; *218*:585-95.
- 43 Hirota N, Ito K, Iwatsubo T, et al. In vitro/in vivo scaling of alprazolam metabolism by CYP3A4 and CYP3A5 in humans. *Biopharm Drug Dispos* 2001; *22*:53-71.
- 44 Hostetler KA, Wrighton SA, Molowa DT, Thomas PE, Levin W, Guzelian PS. Co-induction of multiple hepatic cytochrome P-450 proteins and their messenger-RNAs in rats treated with imidazole antimycotic agents. *Mol Pharmacol* 1989; *35*:279-285.
- 45 Howell C, et al. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 2001; *104*:829-34.
- 46 Hsie KP, Lin YY, Cheng CI et al. Novel mutations of CYP3A4 in chinese. *Drug Metab Dispos* 2001; *29*:268-73.
- 47 Hunt CM, Westerkam WR, Save GM. Effect of age and gender on the activity of human hepatic CYP3A. *Biochem Pharmacol* 1992; *44*:275-83.

- 48 Hustert E, Haberl M, Burk O, et al. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 2001; *11*:773-79.
- 49 The international SNP Map Working group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; *409*:928-33.
- 50 Juhl RP, van Thiel DH, Dittert CW, Smith RB. Alprazolam pharmacokinetics in patients with liver disease. *J Clin Pharm* 1984; *24*:113-19.
- 51 Kadlubar FF, Berkowitz GS, DeLongchamp RR, et al. The CYP3A41\*B variation is related to the onset of puberty, a known risk factor for the development of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; *12*:327-31.
- 52 Kim TY, Bang YJ, Robertson KD. Histone Deacetylase Inhibitors for Cancer Therapy. *Epigenetics* 2006; *1*:14-23.
- 53 Kinirons MT, O'Shen D, Downing TE, Fitzwilliam AT, Joellenbeck L, Groopman JD. Absence of correlations among three putative in vivo probes of human cytochrome P4503A activity in young healthy men. *Clin Pharmacol Ther* 1993; *54*:621-29.
- 54 Kliewer SA, Moore JT, Wade L, et al. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel signaling pathway. *Cell* 1998; *92*:73-82.
- 55 Kolars JC, Schmiedelin-Ren P, Schuetz JD, Fang C, Watkins PB. Identification of rifampicin-inducible P450III A4 (CYP3A4) in human small bowel enterocytes. *J Clin Invest* 1992; *90*:1871-78.

- 56 Koyano S, Kurose K, Saito Y, et al. Functional characterization of four naturally occurring variants of human pregnane X receptor (PXR): one variant causes dramatic loss of both DNA binding activity and the transactivation of the CYP3A4 promoter/enhancer region. *Drug Metab Dispos* 2004; 32:149-54.
- 57 Kristjánsson C, Thorsteinsson C. Disposition of alprazolam in human volunteers. Differences between genders. *Acta Pharmaceutica Nordica* 1991; 32:49-50.
- 58 Krivoruk Y, Kinirons NT, Wood AJ, Wood M. Metabolism of cytochrome P4503A substrates in vivo administered by the same route: lack of correlation between alfentanil clearance and erythromycin breath test. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 56:608-14.
- 59 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; 27:383-91.
- 60 Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14:286-298.
- 61 Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Report* 2002; 54:1271-94.
- 62 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; 79:325-38.
- 63 Lehmann JM, McKee DD, Watson MA, Willson TM, Moore JT, Kliewer SA. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* 1998; 102:1016-23.

- 64 Levenson M, et al. Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem* 2006; *281*:15763-73.
- 65 Liddle C, Goodwin BJ, George J, Tapner M, Farrell CG. Separate and interactive regulation of cytochrome P450 3A4 by triiodothyronine, dexamethasone, and growth hormone in cultured hepatocytes. *J Clin Endocr Metab* 1998; *83*:2411-16.
- 66 Lin KM, Lau JK, Smith R, Phillips P, Anatal E, Poland RE. Comparison of alprazolam plasma levels in normal Asian and Caucasian male volunteers. *Psychopharmacology* 1988; *96*:365-69.
- 67 Lin YS, Lockwood GS, Graham MA, et al. In-vivo phenotyping for CYP3A by a single-point determination of midazolam plasma concentration. *Pharmacogenetics* 2001; *11*:781-91.
- 68 Lown KS, Bailey DG, Fontana RJ, et al. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J Clin Invest* 1997; *99*:2545-53.
- 69 Macleod D, Ali RR, Bird A. An alternative promoter in the mouse major histocompatibility complex class III-A beta gene: implications for the origin of CpG islands. *Mol Cell Biol* 1998; *18*:4433-43.
- 70 Magdinier F, Wollfe AP. Selective association of the methyl-CpG binding protein MBD2 with the silent p14/p16 locus in human neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; *98*:4990-95.
- 71 May DG, Porter J, Wilkinson GR, Branch RA. Frequency distribution of dapsone N-hydroxylase, a putative probe for P4503A4 activity, in a white population. *Clin Pharm Ther* 1994; *55*:492-500.

- 72 Min DI, Ellingrod VL. Association of the CYP3A4\*1B 5'-flanking region polymorphism with cyclosporin pharmacokinetics in healthy subjects. *Ther Drug Mon* 2003; 25:305-09.
- 73 Molowa DT, Schuetz EG, Wrighton SA, et al. Complete cDNA sequence of a cytochrome P-450 inducible by glucocorticoids in human liver. *Nat Acad Sci* 1986; 83:5311-15.
- 74 Moore LB, Goodwin B, Jones SA, et al. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Nat Ac Sci USA* 2000; 97:7500-02.
- 75 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51:263-73.
- 76 Nebert DW. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *Am J Hum Genet* 1997; 60:265-271.
- 77 Nelson DR, Koymanns L, Kamataki T, et al. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6:1-42.
- 78 Oakey JR, Beechey CV. Imprinted genes: identification by chromosome rearrangements and post-genomic strategies. *Trends in Genetics* 2002; 7:397-66.
- 79 Oellerich M, Burdelski M, Lautz HU, Schulz M, Schmidt FW, Hermann H. Lidocaine metabolite formation as a measure of liver funktion in patients with cirrhosis. *Ther Drug Monit* 1990; 12:219-26.
- 80 Ozdemir V, Kolowa W, Tang BK, et al. Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. *Pharmacogenetics* 2000; 10:466-70.

- 81 Park JY, Kim KA, Park PW, et al. Effect of CYP3A4\*3 genotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of alprazolam in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79:590-99.
- 82 Pikuleva IA. Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis. *Pharmacol Ther* 2006; 112:761-73.
- 83 Polychronakos C, Kukuvtis A. Parental genomic imprinting in endocrinopathies. *Eu J Endocrin* 2002; 147:561-69.
- 84 Raunio H, Hakkola J, Hukkanen J, et al. Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in human pulmonary tissue. *Exp Toxicol Pathol* 1999; 51:412-17.
- 85 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 Nat Cancer Inst* 1998; 90:1225-29.
- 86 Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 1975; 14:9-25.
- 87 Robertson G, Goodwin B, Field J, Liddle C. Transgenic mouse models of CYP3A gene subfamily in the mouse liver. abst. 46 13<sup>th</sup> International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations; Stresa, Italien, 2000.
- 88 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 1989
- 89 Santos KF, Mazzola TN, Carvalho HF. The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 1531-41.



- 90 Sapone A, Viara D, Trespidi S, et al. The clinical role of cytochrome P450 Genotypes in helicobacter pylori management. *Am J Gastroenterol* 2003; 98:1010-15.
- 91 Sata F, Sapone A, Elizando G et al. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67:48-56.
- 92 Schellens JH, Ghabrial H, van der Wart HH, Bakker EN, Wilkinson GR, Breimer DD. Differential effects of quinidine on the disposition of nifedipine, sparteine, and mephenytoin in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 50:520-28.
- 93 Schmieder J, Greenblatt JD, von Moltke LL, et al. Characterization of six in vitro reactions mediated by human cytochrome P450 (CYP): application to the testing of CYP directed antibodies. *Pharmacology* 1996; 32:324-31.
- 94 Schmieder J, Brockmöller J, Arnold G, Bauer S, Roots I. Simultaneous assesment of CYP3A4 and CYP1A2 activity in vivo with alprazolam and caffeine. *Parmacology* 1999; 9:725-34.
- 95 Seidemann J. Variabilität der CYP3A4-Aktivität gemessen mittels Alprazolam-Phänotypisierung vor und nach Enzyminduktion. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Docotor medicinae, vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt –Universität zu Berlin, 2003
- 96 Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Guengrich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 japanese and 30 caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 270:414-423.

- 97 Smith DA, Abel SM, Hyland R, Jones BC. Human Cytochrome P450s: selectivity and measurement in vivo. *Xenobiotica* 1998; 28:1095-28.
- 98 Spurdle AB, Goodwin B, Hodgson E, et al. The CYP3A4\*1B polymorphism has no functional significance and is not associated with risk of breast or ovarian cancer. *Pharmacogenetics* 2002; 12:355-66.
- 99 Stancheva et al., 2000 Stancheva I, Meehan RR. Transient depletion of xDnmt1 leads to premature gene activation in *Xenopus* embryos. *Genes Dev* 2000; 14:313-327.
- 100 Stryer L. *Biochemistry* 6<sup>th</sup> ed. New York, W.H. Freeman and Company, 2002:842-828. 0-7167-2009-6.
- 101 Tayeb MT, Clark C, Sharp L, et al. CYP3A4 promoter variant is associated with prostate cancer risk in men with benign prostate hyperplasia. *Onc Rep* 2002; 9:653-55.
- 102 Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Hartwell PS. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: in vitro-in vivo correlations in liver transplant patients. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271:549-56.
- 103 Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler EJ. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature reviews* 2007;8:355-67.
- 104 Urquart BL, Tirona RG, Kim BB. Nuclear receptors and the regulation of drug metabolizing enzymes and drug transporters: implication for interindividual variability in response to drugs. *J Clin Pharmacol* 2007; 47:566-78.

- 105 Wan YUY, An D, Cai Y, et al. Hepatocyte-specific mutation establishes retinoid X receptor as a heterodimeric integrator of multiple physiological processes in the liver. *Mol Cell Biol* 2000; 20:4436-44.
- 106 Wandel C, Witte JS, Hall JM, et al. CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4\*1B5<sup>-</sup>-promoter region polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 68:82-91.
- 107 Watkins PB, Wrighton SA, Maurel P, et al. Identification of an inducible form of cytochrome P-450 in human liver. *Nat Acad Sci* 1985; 82:6310-14.
- 108 Watkins P, Murray S, Winkelmann L, Heuman D, Wrighton S, Guzelian P. Erythromycin breath test as an assay of glucocorticoid -inducible liver cytochromes P450. *J Clin Invest* 1988; 83:688-97.
- 109 Watkins PB. Noninvasive tests of CYP3A enzymes. *Pharmacogenetics* 1994; 4:171-84.
- 110 Wennerholm A, Allqvist A, Svenson JO, Gustafson LL, Mirghani RA, Bertilsson L. Alprazolam as a probe for CYP3A using a single blood sample: pharmacokinetics of parent drug, and of alpha- and 4-hydroxy metabolites in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 61:113-18.
- 111 Westlind A, Lofberg L, Tindberg N, Anderson 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; 259:201-05.
- 112 Westlind A, Malmebo S, Johannson I, et al. Cloning and tissue distribution of a novel human cytochrome P450 of the CYP3A family, CYP3A43. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281:1349-55.

- 113 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*:755-61.
- 114 Wilkinson GR. Cytochrome P4503A (CYP3A) metabolism: prediction of in vivo activity in humans. *J Pharmacokin Biopharm* 1996; *24*:475-90.
- 115 Wrighton SA, Schuetz EG, Thummel KE, Shen DD, Korzekwa PB, Watkins PB. The human CYP3A subfamily: practical considerations. *Drug Metab Rev* 2000;*32*: 339-62.
- 116 What are SNPs? 20.11.2006 <http://www.ornl.gov/sci/techresources/HumanGenome/faq/snps.shtml>.
- 117 Yasuda K, Lan LB, Sanglard D, Furya K, Schuetz JD, Schuetz EG. Interaction of cytochrome P450 3A inhibitors with P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; *303*:323-32.
- 118 Yasui N. The relationship between single oral dose kinetics of alprazolam and cytochrome P4503A and cytochrome P4502C19. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 1996; *16*:109-12.
- 119 Yasui-Furukori N, Kendo T, Kubota T, et al. No correlations between urinary ratio of 6beta-hydroxycortisol to free cortisol and pharmacokinetics of alprazolam. *Eur J Pharmacol* 2001; *57*:285-88.
- 120 Zeigler-Johnson CM, Walker AH, Mancke B, et al. Ethnic differences in the frequency of prostate cancer susceptibility alleles at SRD5A2 and CYP3A4. *Hum Hered* 2002; *54*: 13-21.

- 121 Zoller C: Variabilität im Stoffwechsel von Alprazolam und Zusammenhänge mit genetischen Varianten von Cytochrom P450 3A4 und Cytochrom P450 2C19. Doktorarbeit Berlin, 2003.

**Anhang:****Abkürzungsverzeichnis:**

ALAT	Alanin-Aminotransferase
AML	akute myeloische Leukämie
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
Bdnf	Brain derived neurotrophic factor
BMI	Körper-Maß-Index
Bp	Basenpaar
BTE	basales Transskriptionselement
CAR	constitutiver Androstanrezeptor
cDNA	cyclische Desoxyribonucleinsäure
CTCF	CCCTC-Bindungsfaktor-Protein
CYP	Cytochrom P450
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DR	direkte Wiederholung
ER	umgekehrte Wiederholung
$\gamma$ GT	$\gamma$ -Glutamyl-Transferase
HAT	Histonmethyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDACI	Histondeacetylaseinhibitor
HMT	Histonmethyltransferase
HNF	hepatischer Kernrezeptor
HPLC	Hochdruckflüssigkeitchromatographie
HRE	Hormonantwortelement
HSO <sub>3</sub>	Bisulfit
IGF2	insulinähnlicher Wachstumsfaktor 2
KOF	Körperoberfläche
MDB	Methyl-CpG-Bindungsprotein
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NR 1I2	Nuklearrezeptor 1 I2
NTP	Nukleosidtriphosphat

PCR	Polymerasekettenreaktion
PM	Langsammetabolisierer
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
RAR	Retinolsäure-Rezeptor
RFLP	Restriktionsenzym-Längenpolymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute
RXR	Retinol-X-Rezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Einzelbasen-Polymorphismus
TEMED	Tetramethylethyldiamin
VDR	Vitamin-D-Rezeptor

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: CYP3A4: Promoter- und Enhancerregion. Eingetragen sind potentielle HREs, bekannte Polymorphismen (senkrechte Striche) und die Lage der PCR-Produkte der vorliegenden Studie (dünne schwarze Striche) (modifiziert nach 27).....	4
Abb. 2: Strukturformel von Alprazolam und seinen Metaboliten.....	6
Abb. 3: a) Heterozygot CYP3A4*1A/*; b) Homozygot CYP3A4*1A/* .....	26
Abb. 4: a) Heterozygot CYP3A4*1A/*1F b) Homozygot CYP3A4*1A/ CYP3A4*1A.....	27
Abb. 5: Verdau von CYP3A4*1B mit Bme 1390 I. Das Wildtypallel wurde in Fragmente von 190 bp und 47 bp geschnitten. Die Variante CYP3A4*1B wies Fragmente der Länge 181 bp, 47 bp und 9 bp auf. In Reihe 4 der Marker, in Reihe 5 der Polymorphismus CYP3A4*1A/*1B, sonst Wildtyp.....	30
Abb. 6: Verdau von CYP3A4*1F mit BsT N I. Das Wildtypallel CYP3A4*1A wurde in Fragmente folgender Längen zerschnitten: 267 bp, 218 bp, 147 bp, 121 bp. Die Variante CYP3A4*1F wies folgende Fragmentlängen auf: 414 bp, 218 bp und 212 bp. In den Reihen 3 und 5 der Polymorphismus CYP3A4*1A/*1F, sonst Wildtyp.....	31
Abb. 7: Bisulfonierte homozygote Probe CYP3A4*1A/*1A. Durch die Bisulfonierung wurde nichtmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, das im Verlauf der PCR als Thymin abgelesen wurde. Da hier der Rückwärtsstrang dargestellt ist, stellt sich der „Kehrwert“ der Sequenz dar, also eine geringe Menge Guanin und eine Vermehrung von Adenosin.....	37
Abb. 8: Bisulfonierte heterozygote Probe CYP3A4*1A/*1F. Die Sequenz des Allels CYP3A4*1F ist in a.) dargestellt; b.) würde einer nichtmethylierten bisulfonierten Sequenz entsprechen und c.) der methylierten bisulfonierten Sequenz. Es lässt sich erkennen, dass CYP3A4*1F methyliert ist.....	37
Abb. 9: Gelelektrophorese der RFLP der bisulfonierten DNA-Proben. In Reihe 2, 4, 5 und 6 CYP3A4*1A/*1F methylierte Proben, in Reihe 3 CYP3A4*1A/*1F eine unmethylierte Kontrolle, in Reihe 1 der Marker.....	38
Abb. 10: Schema der Blutentnahmen. BE: Blutentnahme. ALZ: Gabe von Alprazolam. RIF: Gabe von Rifampicin.....	39
Abb. 11: Mittelwerte und Standardabweichung der Alprazolamspiegel. Die Quadrate bezeichnen den Medianwert, Balken stellen den Bereich des Mittelwerts $\pm$ Standardabweichung dar, Linien die Maximal- bzw. Minimalwerte. a.) Gesamtpopulation, n=103; b.) Merkmalsträger CYP3A4 *1A/*1A, n=88; c.) Merkmalsträger *1A/*1B, n=5; d.) Merkmalsträger CYP3A4*1A/*1F, n=11.....	41
Abb. 12: a.) Verhältnis basal/induziert bei der gesamten Probandengruppe. b.) Verhältnis bei heterozygoten Trägern des Allels CYP3A4*1B. c.) Verhältnis bei heterozygoten Trägern des Allels CYP3A4*1F.....	43
Abb. 13: Orale Clearance von Alprazolam bei unterschiedlichen CYP3A4-Genotypen. Berechnung nach dem Alprazolam-Plasmaspiegel 10 Stunden nach Einnahme.....	46



## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Einige Substrate von CYP3A4 (37) .....	3
Tab. 2: Polymorphismen im Gen und der Promoterregion von CYP3A4 (k. D.: keine Daten verfügbar). 8	
Tab. 3: Medikamente für die klinische Studie.....	13
Tab. 4: Chemikalien und Lösungen zur Erythrozytenlyse .....	13
Tab. 5: Chemikalien und Lösungen zur DNA-Extraktion.....	13
Tab. 6: Chemikalien, Primer und Geräte für die PCR .....	14
Tab. 7: Chemikalien für die Gelelektrophorese.....	14
Tab. 8: Chemikalien für die Sequenzierreaktion .....	14
Tab. 9: : Chemikalien für die Sequenzierung .....	15
Tab. 10: Chemikalien für die Restriktionsenzymlyse .....	15
Tab. 11: Chemikalien für die Bisulfitbehandlung.....	16
Tab. 12: Amplifizierung der bisulfitierten DNA mittels <i>nested-PCR</i> .....	16
Tab. 13: Verdau nach Bisulfitbehandlung.....	16
Tab. 14: Sequenzierung der bisulfitierten DNA .....	17
Tab. 15: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	17
Tab. 16: Verwendete Computerprogramme .....	17
Tab. 17: Ablauf der klinischen Studie .....	19
Tab. 18: Statistische Daten der Versuchsteilnehmer; angegeben sind arithmetisches Mittel (MW), Standardabweichung (SD), Maximal- (Max) und Minimalwert (Min). .....	39
Tab. 19: Alprazolamkonzentration im Plasma zu verschiedenen Messzeitpunkten. Statistische Auswertung von 103 Versuchsteilnehmern. ....	40
Tab. 20: Ergebnis des Mann-Whitney-U-Test für die Polymorphismen CYP3A4*1B und CYP3A4*1F. Signifikanz bei $\leq 0,05$ .....	44
Tab. 21: Varianzkomponentenanalyse .....	45
Tab. 22: Frequenz der Allele CYP3A4*1B bis CYP3A4*1F in verschiedenen Studien und ihr Einfluss auf die Aktivität von CYP3A4 (modifiziert nach 61) .....	54
Tab. 23: genetischer Anteil an der Variabilität des Medikamentenmetabolismus bei verschiedenen CYP3A4-Substraten nach 80. ....	62

## **Danksagung**

Hiermit bedanke ich mich bei allen Personen, welche an der Realisierung dieser Arbeit Teil hatten.

Herrn Prof. Dr. Roots für die Möglichkeit in seinem Institut die Arbeit umzusetzen.

Herrn Prof. Dr. Brockmöller für die Ausarbeitung und Bereitstellung des Themas.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Laschinski und Herrn Goldammer, die mit ihrem ständigen Engagement, ihrer Hilfe und ihrer unglaublichen Geduld bei praktischen und theoretischen Fragen, diese Arbeit immer wieder unterstützten. Sie haben mir ein neues Verständnis für wissenschaftlich Arbeit vermittelt, welches für mich bei der Bewältigung der einzelnen Aufgaben sehr wichtig war.

Dank allen genannten und nicht genannten Mitarbeitern des Institutes für Klinische Pharmakologie der Charité, ohne deren harmonische und geordnete Zusammenarbeit diese Studie nicht so schnell und reibungslos hätte durchgeführt werden können.

Vielen Dank auch allen Probanden, die sich im Sinne der Wissenschaften, an dieser Studie beteiligt haben.

## **Lebenslauf**

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

### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Felix Stoffels, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

„Polymorphismen in der Promoter- und Enhancerregion von CYP3A4“

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

Berlin, den 09.11.2009

Felix Stoffels